

I. 総合研究報告

動物性食品輸出の規制対策のための研究

研究代表者 榎山浩

(星薬科大学薬学部)

動物性食品輸出の規制対策のための研究

研究代表者 穂山 浩

研究要旨

EUに動物性食品を輸出するためには、残留物質モニタリング計画を作成し、A物質（スチルベン類等）及びB物質（抗菌性物質等）のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査においてB物質がモニタリング部位（肝臓、腎臓等）から検出された場合は筋肉（可食部位）の検査を行い、基準値を超過した場合に原因等の調査が求められる。しかし、B物質の筋肉を対象とした分析法は整備されていない。本研究ではB物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング部位が肝臓または腎臓の物質について筋肉を対象とした分析法（39分析法）を確立した。妥当性評価試験を実施した結果、真度 73.4～115.7%、併行精度 1.1～11.7%、室内精度 2.3～19.9%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかったことから、いずれの分析法も筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。本研究で確立した分析法を用いることにより、B物質が牛や鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに筋肉（可食部位）の検査を実施することができ、EUへ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

牛肉の STEC 汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC 調査では、2020 年 10 月から 2023 年 1 月に食肉検査所（生菌数のみ測定のみ 1 ヶ所を除く 11 ヶ所）の協力のもとに牛枝肉合計 480 検体から 7 血清群（026、045、0103、0111、0121、0145、0157）の STEC を対象とした試験を行った。この結果、3 検体（0.6%）から STEC 0157 が分離され、その汚染は低率であるものの牛肉の取り扱いには十分な注意が必要であることが明らかとなった。また、さらなる汚染低減にその制御法の確立が求められる。また、2. 牛肉の消毒効果の検討では、一般に使われている酸性、アルカリ性および中性の消毒薬、ならびに有機酸から 6 種類を選定し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。その結果、消毒液によっては使用量を増やすことや濃度を高めることによって STEC の減少効果が認められた。また、消毒後の滅菌水洗浄は消毒液の酸臭の軽減対策として有効であった。これらの結果から牛肉の消毒に有用な消毒薬として、過酢酸があげられ、55℃に加温しての使用や消毒後の洗浄によって酸臭を軽減することで現実的に使用できると考えられる。

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

研究分担者

志田（齊藤）静夏（国立医薬品食品衛生研究所 食品部第三室長）

工藤由起子（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長）

研究協力機関

（一財）日本食品分析センター

研究協力者（*牛枝肉の STEC 調査研究について）

星薬科大学 伊藤里恵

北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課* 島田光平、豊岡大輔、

北海道東藻琴食肉衛生検査所* 児山綾子

北海道早来食肉衛生検査所* 石田祥士

北海道帯広食肉衛生検査所* 吉田千央、鈴木竹彦、笹谷優子、鈴木 綾

十和田食肉衛生検査所検査第二課* 東海林明子

十和田食肉衛生検査所検査第三課* 高橋むつみ

秋田市食肉衛生検査所* 山口健一

熊本県食肉衛生検査所* 大迫英夫

岐阜県飛騨食肉衛生検査所* 塚本真由美、荻谷俊宏、山崎翔矢

宮崎県都農食肉衛生検査所* 黒木麻衣

徳島県食肉衛生検査所* 片山直人、飛梅三喜

佐賀県食肉衛生検査所* 瀧下恵里子、大澤加奈子

長崎県諫早食肉衛生検査所* 樋渡佐知子、松尾保雄

国立医薬品食品衛生研究所 廣瀬昌平、千葉由美、都丸亜希子、池内隼佑

A. 研究目的

EU 輸出実施要領(薬生食監発 0627 第 11 号「EU に輸出される豚及び鶏の食肉等、牛の乳並びに鶏卵に係る 2019 年残留物質等モニタリング計画の実施について」)では、輸出される動物性食品のモニタリングにおいて B 物質

（抗菌性物質、駆虫剤、抗コクシジウム剤、非ステロイド性抗炎症薬、カルバメート系農薬等）がモニタリング対象部位（肝臓、腎臓等）から検出された場合には必要に応じて筋肉（可食部位）の検査等を行うこととなっている。しかしながらモニタリング対象部位

（肝臓、腎臓等）の分析法は確立されているが、筋肉を対象とした分析法は整備されていない。そのため、モニタリングで検出された場合に直ちに筋肉（可食部位）の調査を実施することができず、当該施設からの EU への輸出再開が遅れるなどの支障をきたし、円滑な輸出の障害となる。本研究では、B 物質のうち、牛及び鶏においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓となっている物質について、筋肉を対象とした分析法を開発又は適用拡大し、確立した分析法について妥当性評価を実施することにより、モニタリングで検出された場合に輸出再開に向けた迅速な対応が取れる体制を整備することを目的とする。

また、国内の対米輸出食肉取扱施設では、牛枝肉の微生物検査として STEC の検査が求められている。STEC が陽性となった陽性となった検体が由来するロットは、原則加熱加工原料用として国内向けに流通するようになる。しかし、他用途としてのブロック肉利用が求められており、STEC リスク低減化の手法を示す必要がある。ブロック肉表面の加熱殺菌及びトリミングによる手法はリスク低減化に効果的であるが、生肉として販売する量が減少することが難点である。このため、効率的なブロック肉利用が可能な方法によるブロック肉表面殺菌が期待されている。しかし、厚生労働省より平成 8 年に通知された腸管出血性大腸菌が検出された枝肉の消毒方法については、科学的根拠データの脆弱性が指摘されており、また、殺菌効果の高いことが近年

知られている過酢酸製剤については、STEC に対する殺菌効果の検証及び妥当性に関する検討が不足している。そこで、本研究では、国産食用ブロック肉の汚染状況を把握した上で、効果的な微生物コントロール方法を明らかにする研究を行うことを目的とする。

B. 研究方法

I.動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

令和2年度は、牛の筋肉を対象として、13分析法（抗菌性物質、駆虫剤、有機塩素系物質）を確立し、B物質36化合物について妥当性評価試験を実施した。令和3年度は、鶏の筋肉を対象として、12分析法を確立し、B物質29化合物について妥当性評価試験を実施した。令和4年度は、鶏の筋肉を対象として、14分析法を確立し、B物質27化合物について妥当性評価試験を実施した。

II.牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC 調査

2020年10月から2023年1月に国内の食肉検査所12ヶ所にて、ウシ504頭からサンプリングを行った。なお、N施設からの検体（24検体）では、生菌数測定のみを実施した。また、検体液の一部を定量試験用に冷蔵保管した。残りの検体液はサンプリングバッグのまま、42±1℃で15-24時間培養を行った。この培養液からDNAアルカリ熱抽出を行い、このDNA抽出液をSTEC7血清群のマルチプレックスリアルタイムPCRのテンプレートとして用いた。リアルタイムPCRの結果、*stx* および *eae* 遺伝子陽性の検体は、続けてSTEC7血清群O遺伝子を試験した。選択培地上に発育した疑わしいコロニーについては、STEC7血清群をリアルタイムPCRにより判定を行った。STEC分離株のO血清群

は、病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ株式会社）または市販のラテックス凝集試薬を用いて判定した。STEC7血清群に判定された菌株については、H血清群を抗血清およびH-genotypingを用いて決定した。なお、これら以外についてはO血清群を抗血清およびO-genotypingにて決定した。STEC7血清群が陽性となった検体については、冷蔵保存しておいた検体液を最確数法（MPN、3本法）にて同様の培地を用いて定量試験を行った。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 文献調査

牛屠体の消毒として使う方法のうち科学的な根拠がある方法を調べることを目的として、Carcasses、Dressed Cattle、Block Meat、Disinfection、Decontamination、Disinfectants、acids、hot water、steam、Microorganisms、bacteria、*E.coli*、STECをキーワードとして、PubMedで文献調査を行った。

(2) 菌株

国立医薬品食品衛生研究所で保有しているSTEC血清群O26、O103、O111およびO157の各菌株を供試した。

(3) 牛肉検体

牛肉は、小売店から購入したブロック肉を用いた。牛肉表面の筋膜をつけたままの検体（筋膜あり）および筋膜を取り除いた検体（筋膜なし）は、クリーンベンチ内で厚さ約1cm、約5cm角（約25g）に無菌的に切り分けて作製し、冷凍保存した。使用する前に4℃に戻して供試した。

(4) 接種菌液の調製

半流動性のカジトン培地に室温保存されている菌株を、10mLのTSBに植菌し、37℃で18時間静置培養した。この培養液を4℃、5,000rpm、15分間遠心し、滅菌リン酸緩衝生

理食塩水（PBS）に再懸濁することを2回繰り返し接種菌液を作製した。これら接種菌液中の菌数はTryptone soya agar（TSA）およびクロモアガーSTECに塗抹し、それぞれ37℃で24時間および37℃で20時間培養し、生育したコロニーを計測した。

（5）消毒液の調製

酸性の消毒液として「食品、添加物等の規格基準」（昭和34年厚生省告示第370号）に平成28年に使用基準が改正された過酢酸製剤および酸性化した亜塩素酸ナトリウム、従前より使用が認められ指定添加物である過酸化水素、アルカリ性の消毒液として同規格基準で使用が認められ指定添加物である次亜塩素酸ナトリウム（次亜塩素酸ソーダ）、中性の消毒液として一般飲食物添加物であるエタノール（エチルアルコール）、有機酸として同規格基準で使用が認められ指定添加物である乳酸を用いた。

（6）消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証

1）STEC 接種検体の作製

滅菌した1本の竹串に1検体を刺し、菌液を10 μ Lずつ5カ所（合計50 μ L）に接種し、15分間室温保存することによって菌液を検体に浸透させた。この菌接種検体を垂直に固定した。

2）消毒液噴霧の方法

消毒液を2回、10回または60回噴霧した。2回（1.6 mL）噴霧では、筋膜なし検体で、過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm、1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 300 ppm、600 ppm およびエタノールで行った。

3）消毒液 50 mL 浸漬の方法

菌接種検体を滅菌ピンセットで50 mL の消毒液に沈めてから持ち上げることを20秒間で

10回繰り返した。筋膜なし検体を使用し、過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm、1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 300 ppm、600 ppm およびエタノールで行った。

4）消毒液 100 mL および 500 mL かけ流しの方法

菌接種検体に消毒液 20 mL をシリンジで5回（合計 100 mL、100 mL かけ流し）、または、50 mL をシリンジで10回（合計 500 mL、500 mL かけ流し）かけ流しを行った。

5）25℃および55℃の消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ流し後の洗浄方法

「洗浄なし」では、菌接種検体ごとに25℃もしくは55℃に加温した消毒液（過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm および乳酸 4%）50 mL をシリンジで10回（合計 500 mL）かけ流しを行った。

6）消毒後検体中の菌数の測定

消毒後、室温で5分間立てた状態で消毒液または洗浄滅菌水の液切りを行った。消毒液が流れ落ちない状態になったことを確認し、各検体を竹串から外し、それぞれストマッカー一袋に入れた。検体の10倍量になるように滅菌済みのPBSを添加し、1分間ストマッカーを行ったものを乳剤とした。これらの乳剤中の菌数を、「（4）接種菌液の調製」と同様の方法で計測した。

（7）消毒液による肉の変色と臭味

菌を接種していない検体にて、消毒液による肉の変色と臭味を確認した。

C. 研究結果

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

[令和2年度]

牛の筋肉を対象として、以下の13分析法を確

立し、B 物質 36 化合物について妥当性評価試験を実施した。

抗菌性物質

- ① チルミコシン分析法
- ② スルファモイルダブソン分析法
- ③ クロルテトラサイクリン及びオキシテトラサイクリン分析法
- ④ エンロフロキサシン（シプロフロキサシンとの和）分析法
- ⑤ フロルフェニコール分析法

駆虫剤

- ⑥ トリクラベンダゾール分析法

抗コクシジウム剤

- ⑦ サリノマイシン及びモネンシン分析法
- ⑧ トルトラズリル分析法

ピレスロイド系農薬

- ⑨ ペルメトリン分析法

有機塩素系物質

- ⑩ HCB 分析法
- ⑪ DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 及び γ -HCH 分析法
- ⑫ クロルデン及びノナクロル分析法
- ⑬ PCB（28、52、101、138、153 及び 180 の総和）分析法

その結果、真度 77.9～112.6%、併行精度 1.1～10.8%、室内精度 2.3～17.6%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、13 分析法は牛の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。

[令和 3 年度]

鶏の筋肉を対象として、以下の 12 分析法を確立し、B 物質 29 化合物について妥当性評価

試験を実施した。

- ① タイロシン及びチルミコシン分析法
- ② チルバロシン分析法
- ③ リンコマイシン分析法
- ④ ストレプトマイシン及びジヒドロストレプトマイシン分析法
- ⑤ カナマイシン分析法
- ⑥ スルファメトキサゾール、スルファメトキシム、スルファキノキサリン、トリメトプリム及びチアンフェニコール分析法
- ⑦ エンロフロキサシン（シプロフロキサシンとの和）及びノルフロキサシン分析法
- ⑧ クロルテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン及びドキシサイクリン分析法
- ⑨ フロルフェニコール分析法
- ⑩ アモキシシリン、アンピシリン及びベンジルペニシリン分析法
- ⑪ ノシヘプタイド分析法
- ⑫ エンラマイシン分析法

その結果、真度 77.3～115.7%、併行精度 1.8～9.3%、室内精度 2.4～14.2%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、確立した分析法は鶏の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。

[令和 4 年度]

鶏の筋肉を対象として、以下の 14 分析法を確立し、B 物質 27 化合物について妥当性評価試験を実施した。

- ① ドラメクチン分析法
- ② レバミゾール分析法
- ③ トリクラベンダゾール分析法
- ④ ピペラジン分析法
- ⑤ アンプロリウム分析法
- ⑥ エトパベート分析法

- ⑦ ナイカルバジン及びハロフジノン分析法
- ⑧ モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法
- ⑨ カルバリル分析法
- ⑩ ペルメトリン分析法
- ⑪ シフルトリン及びフルメトリン分析法
- ⑫ フルニキシン分析法
- ⑬ DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH並びに γ -HCH分析法
- ⑭ PCB (28、52、101、138、153及び180の総和)分析法

その結果、真度 73.4～109.7%、併行精度 1.3～11.7%、室内精度 3.4～19.9%となり、良好な結果が得られた。また、いずれも定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。これらの結果から、14分析法は鶏の筋肉を対象とした分析法として妥当であることが示された。

II 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC 調査

生菌数は、504 検体のうち 40 検体で検出限界未満であり、他 464 検体での平均は 487.2 CFU/cm²であった。ウシの種類別で比較すると、頭数が少なく、限られた施設由来ではあるが、アングスの生菌数が 9,387.6 CFU/cm²で最も高かった。採材期間を通して、生菌数が最も多かった施設は F 施設であった。また、施設ごとの生菌数が 1,000 CFU/cm²を超える施設は、E および F 施設であり、その生菌数はそれぞれ 1,156.7 および 3,193.0 CFU/cm²であった。月ごとの生菌数では、7 月が最も高く 5,133.4 CFU/cm²、次いで 6 月が 699.9 CFU/cm²であり、気温が高い夏に高い傾向が見られ

た。

STEC 7 血清群を試験した 480 検体のうち、*stx* あるいは *eae* 遺伝子の少なくともいずれかが陽性であった検体は 110 検体であり、そのうち 31 検体は *stx* および *eae* 遺伝子陽性となった検体であった。さらに、そのうち 15 検体は *stx* および *eae* 遺伝子陽性ならびに STEC 7 血清群遺伝子陽性となった。これらのうち、STEC 7 血清群の分離が可能であった検体は B56、D68 および J23 の 3 検体 (3/480、0.6%) であり、全株とも血清型は O157:H7 であった。これら STEC O157 が分離されたのは、2020 年 12 月に採材された D 施設の褐毛和種、2021 年 8 月に採材された E 施設の交雑種および 2022 年 6 月に採材された M 施設の黒毛和種からであった。これらの施設においては、枝肉の消毒等の適切な措置が講じられた。なお、同一施設において、検体採取時期が異なるにもかかわらず、血清型ならびに *stx* および *eae* 遺伝子保有パターンが同一の大腸菌が分離されることが散見された。

STEC O157 が分離された検体について、MPN 法にて定量したところ、その定量値は、1 検体 (D68) については 1.02 MPN/100cm² (11 MPN/100mL 検体液) であり、その他 2 検体 (B56 および J23) については検出限界未満となる 0.33 MPN/100cm² (3.0 MPN/100mL 検体液) 未満であった。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 文献調査

検索の結果、31 報見つかった。効果が認められた条件(10 報)で、比較的多い消毒液は乳酸 (8 報) および過酢酸 (2 報) であり、温度としては 55°C (4 報) であった。

(2) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果

1) 消毒液噴霧の効果

STEC の菌数は、2 回噴霧（筋膜なし検体）では、消毒液で 7.0 - 8.1 log CFU/片、滅菌水で 7.3 - 7.8 log CFU/片であり、10 回噴霧（筋膜なし検体および筋膜あり検体）では、消毒液で 6.9 - 7.4 log CFU/片、滅菌水で 7.2 - 7.3 log CFU/片であり、消毒液による STEC の減少効果は認められなかった。60 回噴霧では、筋膜なし検体において、消毒液で $7.0 \pm 0.1 - 7.2 \pm 0.1$ log CFU/片、滅菌水で 7.3 ± 0.1 log CFU/片であり、筋膜あり検体において、消毒液で $5.9 \pm 0.6 - 6.7 \pm 0.4$ log CFU/片、滅菌水で 6.9 ± 0.3 log CFU/片であり、消毒液による STEC の減少効果が若干認められた。

2) 消毒液 50 mL 浸漬の効果

消毒液では 6.8 - 7.1 log CFU/片であり、滅菌水では 7.0 log CFU/片であり、消毒液による STEC の減少効果は認められなかった。

3) 消毒液 100 mL および 500 mL かけ流しの効果

消毒液 100 mL かけ流しでは、筋膜なし検体において、消毒液で $6.8 \pm 0.1 - 7.1 \pm 0.3$ log CFU/片、滅菌水で 7.4 ± 0.3 log CFU/片であり、筋膜あり検体において、消毒液で $5.7 \pm 0.3 - 6.5 \pm 0.2$ log CFU/片、滅菌水で 6.8 ± 0.2 log CFU/片であり、60 回噴霧より消毒液による STEC の減少効果が認められた。消毒液 500 mL かけ流しでは、消毒液で $4.8 \pm 0.9 - 6.0 \pm 0.4$ log CFU/片、滅菌水で 6.6 ± 0.5 log CFU/片であり、100 mL かけ流しより消毒液による STEC の減少効果が認められた。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた消毒液からは STEC および生菌は検出されなかった。

4) 25°C および 55°C の消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ流し後の洗浄の効果

25°C の洗浄なしでは、消毒液で $5.4 \pm 0.3 - 5.6 \pm 0.6$ log CFU/片、滅菌水で 6.8 ± 0.6 log CFU/

片であり、25°C の洗浄ありでは、消毒液で $4.7 \pm 0.8 - 6.1 \pm 0.6$ log CFU/片、滅菌水で 6.3 ± 0.3 log CFU/片であり、55°C 洗浄なしでは、消毒液で $5.4 \pm 1.7 - 5.7 \pm 0.5$ log CFU/片、滅菌水で 6.3 ± 0.1 log CFU/片であり、55°C 洗浄ありでは、消毒液で $5.2 \pm 0.3 - 5.7 \pm 0.5$ log CFU/片、滅菌水では 6.4 ± 0.2 log CFU/片であった。消毒液による STEC の減少効果は認められたが、消毒液の 55°C 加温効果は認められなかった。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた消毒液および消毒液と洗浄滅菌水の混合液からは STEC および生菌は検出されなかった。

5) 消毒液による肉の変色と臭味

肉表面の変色に関しては、最大濃度 1,000 ppm を使用しても過酢酸では変色は認められなかったが、200 ppm 以上で使用した亜塩素酸ナトリウム、600 ppm の次亜塩素酸ナトリウムおよび 70% エタノールではやや白色に、3.5% 過酸化水素は白色に、4% 乳酸では茶褐色に変色した。臭味に関しては、過酢酸では最小濃度 50 ppm を使用した場合でも酸臭が、亜塩素酸ナトリウムでは 200 ppm 以上を使用した場合および次亜塩素酸ナトリウムでは 600 ppm を使用した場合に塩素臭が認められたが、70% エタノールでは直後にアルコール臭が残るものの比較的すみやかに消失した。3.5% 過酸化水素および 4% 乳酸では臭味は認められなかった。過酢酸の酸臭は、過酢酸の濃度が高いほど強くなる傾向であったが、滅菌水による消毒後の洗浄によって酸臭は軽減し、55°C の過酢酸では 25°C の過酢酸よりも消毒後の酸臭が弱かった。

C. 考察

I. 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

牛の筋肉を対象とした 13 分析法、また鶏の筋肉を対象とした 26 分析法として妥当であることが示された。確立した分析法を用いることにより、B 物質が牛や鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに筋肉の検査を実施することができ、EU へ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

II 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC 調査

本調査では牛枝肉からガーゼを用い STEC 分離に供した 480 検体中、3 検体 (0.6%) から STEC7 血清群のひとつである STEC O157 が分離された。STEC O157 が分離された 3 検体を含む 15 検体 (3.1%) は、*stx* および *eae* 遺伝子の両方ならびに STEC 7 血清群のいずれかが陽性であった。と畜場でのウシの糞便からは STEC O157 が高頻度に検出されていることと比較し、その汚染率は低率であり、衛生的な管理がなされているとされた。その一方、各年度の分離率は同等であったことならびにその定量値は検出限界未満が多かったことから、さらなる汚染低減にはその制御法の確立が課題である。

測定された生菌数は季節的な影響が大きいと考えられた。平均生菌数は 7 月が最も多く次いで 6 月、8 月であり、その他の月は生菌数が 102 CFU/cm² 以下にとどまっていた。施設 E・F の生菌数が高かったことが要因と考えられ、夏季においては牛肉の衛生状態の低下が推察される。生菌数が高い施設では、汚染防止策などを含む衛生管理を確実に実施する必要がある、衛生状態を改善することが求められる。

stx、*eae* および STEC 7 血清群のいずれかの

遺伝子が陽性の培養液から分離された菌株では、STEC 7 血清群ではない菌株が大部分を占めていた。同一施設において、同一の血清型ならびに *stx* および *eae* 保有パターンの大腸菌が継続的に分離されたことから、施設内での汚染あるいは特定の農場での大腸菌の保菌等が原因として疑われた。今後、これらの菌株の病原性について、検討を行う必要があると考えられた。

牛肉の STEC による汚染の低減は食の安全に関わる重要な課題となっている。と畜場での牛肉の汚染は低率であるものの、牛肉の取り扱いには十分な注意が必要である。また、と畜場での衛生管理や施設での消毒処理等は、STEC の主要な汚染防止策であることから、STEC 汚染についての調査を継続するに加えて、それらの管理や消毒方法を改良していく必要があると考えられた。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 文献調査

比較的多い消毒条件 (10 報) すべてにおいて効果を検討し、国内の指定添加物である乳酸は、消毒液としての効果を検討する必要があると考えた。また、効果のある温度条件で最も多かった 55°C に関しても、消毒効果の向上を期待して検討することを考えた。

(2) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果

消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証では、噴霧 (2 回計 1.6 mL、10 回計 8 mL および 60 回計 48 mL)、浸漬 (50 mL) およびかけ流し (100 mL および 500 mL) を行った。令和 2 および令和 3 年度で試みた噴霧では、60 回噴霧で消毒液による STEC の減少効果が若干認められた。

令和 2 年度で試みた浸漬では、60 回噴霧とほぼ同量の消毒液を用いたにもかかわらず減

少効果は認められなかった。浸漬では牛肉由来の有機物による消毒液の不活性化や、酸臭および塩素臭の肉深部への浸透が考えられるため、多量の消毒液をかけ流すことにより効果が向上することを期待し、令和3年度では消毒液のかけ流しを試みた。この結果、100 mL かけ流しは、60回噴霧より STEC の減少効果が認められた。また、同じ濃度では 100 mL より 500 mL かけ流しの方が STEC の減少効果が認められ、同じかけ流し量では消毒液の濃度が高い方が STEC の減少効果が高い傾向であった。

令和2および令和3年度の結果から、500 mL かけ流しが最も STEC の減少効果が認められたため、令和4年度でも継続して行った。また、肉色の変化がないことから過酢酸が牛肉の消毒液として最も実用的であると考えられたが、酸臭が残ることが難点であった。令和4年度では、文献調査によって情報収集した米国での使用状況および EU での使用許可状況を鑑みて、過酢酸だけでなく、有機酸である乳酸についても試みた。消毒効果の向上を期待して消毒液の 55°C 加温、酸臭の軽減対策として消毒後の滅菌水洗浄を加えて、STEC O157 の減少効果を試みた。ばらつきはあるが、消毒液の方（約2桁減少）が滅菌水のみ（約1桁減少）より STEC の減少効果が認められ、消毒液による一定の効果が明らかになった。特に、過酢酸による消毒では、菌数減少効果と併せて牛肉表面を変色させない利点が明らかになった。酸臭が残ることが難点であったが、55°C に加温することによって酸臭の軽減されることが判明した。なお、55°C に加温することによる STEC の減少効果は認められなかった。

また、乳酸による消毒では、酸臭は認めら

れなかったが、牛肉表面が茶褐色に変色した。しかし、乳酸消毒による肉質への影響はないとする報告があり、肉表面のトリミングなどによって除去できることを考慮すると、乳酸も消毒剤として実用性があると考えられる。

C. 結論

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

令和2年度は牛の筋肉を対象として B 物質の分析法（13 分析法）を確立した。令和3年度は鶏の筋肉を対象として B 物質のうち抗菌性物質の分析法（12 分析法）を確立した。令和4年度は鶏の筋肉を対象として B 物質の抗菌性物質以外の分析法（14 分析法）を確立した。確立した分析法の妥当性評価試験を実施した結果、いずれも良好な結果（真度、併行精度、室内精度及び選択性）が得られた。本研究で確立した分析法を用いることにより、B 物質が牛や鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに筋肉の検査を実施することができ、EU へ動物性食品を輸出する際に求められる検査を円滑に進めることが可能と考えられる。

II 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC 調査では、2020 年 10 月から 2023 年 1 月に食肉検査所（生菌数のみ測定のみ 1 ヶ所を除く 11 ヶ所）の協力のもとに牛枝肉合計 480 検体から 7 血清群（O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157）の STEC を対象とした試験を行った。この結果、3 検体（0.6%）から STEC O157 が分離され、その汚染は低率であるものの牛肉の取り扱いには十分な注意が必要であることが明らかとなった。

また、さらなる汚染低減にその制御法の確立が求められる。また、2. 牛肉の消毒効果の検討では、一般に使われている酸性、アルカリ性および中性の消毒薬、ならびに有機酸から6種類を選定し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。その結果、消毒液によっては使用量を増やすことや濃度を高めることによって STEC の減少効果が認められた。また、消毒後の滅菌水洗浄は消毒液の酸臭の軽減対策として有効であった。これらの結果から牛肉の消毒に有用な消毒薬として、過酢酸があげられ、55°Cに加温しての使用や消毒後の洗浄によって酸臭を軽減することで現実的に使用できると考えられる。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito-Shida S., Kashiwabara N., Nemoto S., Akiyama H. Determination of 8 α -hydroxymutilin as a marker residue for tiamulin in swine tissue by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 14, 845-855 (2021).
2. Akiyama H, Takagi A, Inoue K, Suzuki Y, Ito R, Wakui N, Asai M, Sugiura J. Evaluation of a risk communication program for pesticide residues, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 62, 187-192 (2021).

2. 学会発表

1. Shizuka Saito-Shida, Seiichiro Iizuka, Ayumu Nakamura, Satoshi Isagawa, Satoru Nemoto, Hiroshi Akiyama. Development and validation of

an analytical method for determining total florfenicol residues as florfenicol amine in bovine muscle using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2021 AOAC INTERNATIONAL、令和3年8月27日

2. 廣瀬昌平、都丸亜希子、亀山浩、工藤由起子. 牛肉の志賀毒素産生大腸菌汚染に対する消毒液の効果の検討. 日本食品衛生学会第118回学術講演会、長崎市、令和4年11月11日.

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし