

令和3年度 厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
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 (星薬科大学)

分担研究報告書

牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究
研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

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、2021 年 4 月から 2022 年 2 月に 7 施設の協力のもとに牛枝肉合計 163 検体について 7 血清群 (026、045、0103、0111、0121、0145、0157) の STEC を対象とした調査を行った。供試検体を増菌培養後、STEC7 血清群マルチプレックスリアルタイム PCR を行い、分離株の血清凝集試験および生化学的性状試験を行った。また、検体の生菌数の計測を行った。この結果、1 検体 (0.6%) から STEC 0157 が分離されたが、1 検体のみであったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。STEC 0157 が分離された検体および施設において生菌数が比較的高い値を示したことから、施設の環境状況の要因の可能性が考えられた。また、2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、酸性の過酢酸製剤、酸性化した亜塩素酸ナトリウムおよび過酸化水素、アルカリ性の次亜塩素酸ナトリウム (次亜塩素酸ソーダ)、中性のエタノール (エチルアルコール) を選択し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。結果として、消毒液の使用量を増やすことや濃度を高めることにより菌数減少の傾向が認められた。消毒薬の種類としては、肉表面に変化を起こさない過酢酸が最も優れていると考えられた。今後、使用後の酢酸臭を流水で除去できる過酢酸濃度を検討したい。

研究協力者 (*牛枝肉の STEC 調査研究について)

北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課*	島田光平
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
青森県十和田食肉衛生検査所*	高橋むつみ
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
徳島県食肉衛生検査所*	片山直人
宮崎県都農食肉衛生検査所*	黒木麻衣
国立医薬品食品衛生研究所	池内隼佑、千葉由美、都丸亜希子、廣瀬昌平

A. 研究目的 促進の影響のため、海外への和牛輸出量が
昨今の海外での和牛の需要の高まりや 増加している。特に、米国への輸出は 2005
日本政府および業界関係者による和牛輸出 年から解禁されているが、近年、米国では

腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC）食中毒防止対策のひとつとして牛肉の STEC 検査を行い、検出した関連製品については米国向けに輸出ができないため、現在は国内の加熱加工原料向けに転用している。和牛は畜産食品のなかでも単価の高い高級食材であり、国内で限られた数の対米輸出食肉取扱施設でのと畜、食肉処理による生産量を考えると、加熱加工原料のみならず、効果的な殺菌方法による食中毒の発生予防措置をとった上で、加熱加工原料用以外の転用を可能にすることは、国内生産者や食肉処理関係者の継続的な生産・関連業務にもつながることが期待される。

令和2年度（2020年11月から2021年2月）には、国内食肉処理施設において、180検体の牛枝肉表面の STEC について定性的・定量的検出を行い、1検体から STEC O157:H7 が分離された。分離された株は *stx2* 陽性および *eae* 陽性であった。令和3年度も引き続き牛枝肉表面からの STEC 検出を続けた。また、各種消毒薬および消毒方法について、牛肉での STEC の消毒効果を検証し、肉表面の変色や消毒薬由来の臭味を含め、実用的な消毒方法を検討した。

B. 研究方法

1. 牛枝肉の STEC 調査

2021年4月から2022年2月に国内の食肉検査所7ヶ所にて、ウシ163頭からサンプリングを行った。サンプリングに供したウシの情報を表1-1に示す。また、STEC の検出の流れについて定性的な検出方法を図1-1に、定量的な検出方法を図1-2に示す。まず、定性的に STEC を検出し、定

性的検出陽性の場合に定量的な検出を開始し、同時に進める手順で検出を行った。対象とした O 血清群は、O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157 の 7 血清群とした。

（1）と畜場での作業

検体の採取は、処理された異なるウシ3頭から枝肉を各1本ずつ選定し、選定した枝肉ごとに頸部から胸部の任意の3箇所を選び、滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で浸漬した30cm×30cmサイズの滅菌したガーゼを密着させることによって行った。サンプリングを行ったガーゼは、それぞれ滅菌済みポリエチレン袋（サンプリングバッグ）に入れ、国立医薬品食品衛生研究所に送付するまで氷上もしくは2~4℃で保存し、宅配便（冷蔵）によって国立医薬品食品衛生研究所へ送付された。

（2）STEC 検出方法および生菌数測定

1) 検体の調製

検体は、試験に使用するまで氷上もしくは4℃に保管された。サンプリングバッグを無菌的に開封し、Modified tryptone soya broth (mTSB) 250 mL を加え、バックの外からよく手で揉み、検体液とした。この検体液から、3 mL を生菌数測定用に使用した。また、1 mL をチューブに取り DMSO 0.1 mL を入れ-80℃で凍結保存した。さらに、残りの検体液を定性的および定量的検出に使用した。なお、使用するまで氷上もしくは4℃に保管した。

2) 生菌数の計数

検体液を10倍階段希釈にて 10^{-2} 希釈液まで作製し、検体液原液は0.2 mL ずつを標準寒天培地5枚に塗抹し、 10^{-1} および 10^{-2} 希釈液については0.1 mL ずつを標準寒天培地にそれぞれ2枚ずつ塗抹し、37℃で48時

間培養を行い、生育コロニーの計数を行った。

3) 定性的な STEC 7 血清群の検出

定性的な検出方法の流れを図 1-1 に示す。

3-1) 検体の増菌液からの DNA 抽出

検体液はサンプリングバッグのまま、 $42\pm 1^\circ\text{C}$ 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った。この DNA 抽出液を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。

3-2) STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

プライマーセット Assay1 (*stx/eae*) ではベロ毒素遺伝子 (*stx* 遺伝子) およびインチミンタンパク質遺伝子 (*eae* 遺伝子) を、Assay2 (16S/0157) では 16SrRNA 遺伝子および 0157 遺伝子、Assay3 (026/0111) では 026 遺伝子および 0111 遺伝子、Assay4 (045/0121) では 045 遺伝子および 0121 遺伝子、Assay5 (0103/0145) では 0103 遺伝子および 0145 遺伝子を検出する。プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせおよび配列を表 1-2 に示す。

Assay1 から Assay5 の反応溶液の組成および量を表 1-3-1 から表 1-3-5 に示す。リアルタイム PCR の反応条件は、 95°C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95°C で 15 秒、 59°C で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。

3-3) STEC 7 血清群の免疫磁気ビーズ法による濃縮および選択培地による単離

免疫磁気ビーズ法は、免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145、0157「生研」(デンカ株式会社) を用いて行った。最終的に E バッファー 1 mL に懸濁したものをビ

ーズ懸濁液とした。

さらに、酸処理ビーズ懸濁液を作製し、ローテーターで 1 時間反応させた。

ビーズ懸濁液を E バッファーで 10 倍および 100 倍希釈し、各希釈液 100 μL をセフィキシム・亜テルル酸 (CT) 加ソルビトールマッコンキー寒天 (SMAC) 培地および CT-クロモアガー STEC 培地の 2 枚ずつ塗抹した。酸処理ビーズ懸濁液は E バッファーで 2 倍および 20 倍に希釈した液を CT-SMAC 培地および CT-クロモアガー STEC 培地 2 枚ずつ塗抹した。これらを $36\pm 1^\circ\text{C}$ で 18-24 時間培養した。これらの培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、以下の血清凝集およびラテックス凝集試験を行った。

3-4) 分離株の血清型別

基本的には、血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ株式会社) を用い、状況によっては市販のラテックス凝集試薬を用いた。7 血清群に凝集したものについては、必要に応じて H-genotyping (Iguchi *et al.*) および抗血清を用いて H 血清型を決定した。また、7 血清群以外については 0 血清群を 0-genotyping (Iguchi *et al.*) および抗血清にて決定した。

3-5) コロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

コロニーを 0.1 mL の TE 緩衝液 (PH 8) に懸濁し、DNA 抽出をした。この抽出液をテンプレートとして、Assay1 および目的とする 0 群によるプライマーを用いて、3-2) と同様にリアルタイム PCR を行った。この結果、陰性の場合には陰性と判定し、陽性の場合には 3-6) の非選択培地による単離を行

った。

3-6) 単離したコロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

典型的なコロニーから、3-5) と同様に DNA を熱抽出し、Assay1 および目的とする 0 群について、3-2) と同様にリアルタイム PCR で確認した。

3-7) STEC 7 血清群の生化学的性状試験

ブドウ糖、乳糖および白糖の発酵およびガス産生、硫化水素産生を観察するために Triple sugar iron agar (TSI 寒天培地) を、リジン脱炭酸産生、インドール産生、運動性を観察するために Lysine Indole motility medium (LIM 培地) の培養を行った。

4) 定量的な STEC 7 血清群の検出

定量的な検出方法の流れを図 1-2 に示す。

4-1) STEC 7 血清群の MPN 測定

血清凝集試験およびラテックス凝集試験により推定陽性と判断した、培養前の 1 日目に 4℃ で保存しておいた検体懸濁液を用いて、MPN 測定 (3 本法) を行った。mTSB を用いて希釈段 3 段とし、42±1℃ で 15-24 時間培養した。

細菌の増殖が認められた培養液を用いて、Assay1 および目的とする 0 群のリアルタイム PCR を行った。

4-2) STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

3-5) と同様に DNA を熱抽出し、Assay1 および目的とする 0 群について、3-2) と同様にリアルタイム PCR で確認した。Assay1 陽性かつ 0 群陽性の場合、陽性判定となった 0 群抗体による免疫磁気ビーズ法

を行った。

4-3) STEC 7 血清群の免疫磁気ビーズ法による濃縮および選択培地による単離

3-3) の免疫磁気ビーズ法 (酸処理は行わない) と同様に、濃縮し、CT-SMAC 培地および CT-クロモアガー-STEPC 培地 2 枚ずつ塗抹し、36±1℃ で 18-24 時間培養した。これらの培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、血清凝集試験およびラテックス凝集試験を行った。

4-4) STEC 7 血清群の血清凝集試験およびラテックス凝集試験

目的とする 0 群抗体を用いて、3-4) と同様の手順に従って凝集試験において、凝集が見られたコロニーは、以下のリアルタイム PCR による確認を行った。

4-5) コロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

3-5) と同様に、リアルタイム PCR で確認した。Assay1 陽性かつ 0 群陽性の場合、3-6) と同様に非選択培地による単離を行った。

4-6) 単離したコロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

典型的なコロニーから、3-5) と同様に DNA を熱抽出し、Assay1 および目的とする 0 群について、3-2) と同様にリアルタイム PCR で確認した。

4-7) 生化学的性状試験

3-7) と同様に、TSI 寒天培地および LIM 培地による性状確認を行った。

5) *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方または片方が陽性であった検体からの大腸菌の分離

上記 1) から 4) の一連の検出方法にお

いて、7血清群の STEC が分離されなかった検体のうち、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方または片方が陽性であった検体について、増菌培養液でのリアルタイム PCR の結果と合致する大腸菌の分離を行った。まず、1) で -80°C で凍結保存しておいた溶液を室温で解凍し、この溶液 $500\ \mu\text{L}$ に対して $4.5\ \text{mL}$ の Tryptone soya broth (TSB) を加え、 $42\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18 時間増菌培養した。この増菌培養液を PBS で 10^{-6} まで 10 倍階段希釈し、各希釈液それぞれ $100\ \mu\text{L}$ ずつを 4 種類の培地 (SMAC 培地、CT-SMAC 培地、クロモアガー STEC 培地、クロモアガー STEC、CT-クロモアガー STEC 培地) に 1 枚ずつ塗抹し、 $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 18–24 時間培養した。これらの培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、3–5) と同様にリアルタイム PCR をおこなった。

この結果、陽性検体に関して 3–6) と同様に単離したコロニーのリアルタイム PCR による *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の保有の判定を行い、3–7) と同様に生化学的性状試験を行って大腸菌であることを確認した。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 菌株

消毒液の STEC への直接効果の検証では、026、0103、0111、0157 の 4 血清群の STEC を対象とし、国立医薬品食品衛生研究所保有している菌株 (026:ESC97、0103:ESC548、0111:ESC469、0157:ESC425) を供試した。また、消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証では STEC のうち血清群 0157 (ESC425) のみを供試した。

(2) 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) については、クリーンベンチ内でブロック肉の表面の筋膜部分 (厚さ約 $1\ \text{cm}$) を切りとり、さらに約 $5\ \text{cm}$ 角 (約 $25\ \text{g}$) に無菌的に切り分けて作製した。牛肉表面の筋膜を取り除いた検体 (筋膜なし) については、筋膜を取り除いたブロック肉を厚さ約 $1\ \text{cm}$ 、約 $5\ \text{cm}$ 角 (約 $25\ \text{g}$) 切り分けて作製した。切り分けた検体は、重量を測定し、ラップに包みサンプリングバックに入れてシールし、冷凍保存した。使用前日に 4°C に戻して供試した。解凍時に生成したドリップは滅菌した綿でふき取った。

(3) 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各菌株を、それぞれ $10\ \text{mL}$ の TSB に植菌し、 37°C で 18 時間静置培養した。このうち $8\ \text{mL}$ を、 4°C 、 $5,000\ \text{rpm}$ 、15 分間遠心し、滅菌した PBS $8\ \text{mL}$ に再懸濁することを 2 回行ったものを接種菌液とした。試験を行うまで、これらの菌液は氷上もしくは 4°C で保管された (最長 3 日間)。

なお、これら接種菌液中の菌数を以下の方法にて確認した。まずは、接種菌液を PBS にて、 10^{-6} まで 10 倍階段希釈を行い、 10^{-5} 希釈液 (約 $1\times 10^3\ \text{CFU/mL}$) および 10^{-6} 希釈液 (約 $1\times 10^2\ \text{CFU/mL}$) $0.1\ \text{mL}$ ずつを TSA およびクロモアガー STEC に 5 枚に塗抹し、TSA は 37°C で 24 時間、クロモアガー STEC は 37°C で 20 時間、培養し、生育したコロニーを計測した。

(4) 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ている指定添加物である過酸化水素を、アルカリ性の消毒液として同規格基準に記載され使用が認められている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）を、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）を用いた。なお、使用時の各 pH は表 2-1 に示した。

過酢酸製剤は「ダイヤパワー（低濃度過酢酸）（三菱ガス化学株式会社）」（過酢酸 6%、過酸化水素 8%、酢酸 32%、水 54%）を用いた。滅菌した純水（滅菌水）で希釈して 50、100、1,000 ppm に調製し、供試した。この消毒液によって肉の表面は変色しないが、酢酸臭が残ることが難点である（表 2-1）。

亜塩素酸ナトリウムは「Keeper Pro®（バイオサイド・インターナショナル社）」（高純度亜塩素酸ナトリウム 8.35%）にクエン酸（食品添加物 富士フィルム和光純薬（株））を添加し酸性化した亜塩素酸ナトリウム水として、200、500、1,200 ppm に調製し、供試した。この消毒液によって肉の表面はやや白く変色し、やや塩素臭が残ることが難点である（表 2-1）。

過酸化水素（食品添加物 35.0 - 36.0% 富士フィルム和光純薬（株））は純水で 10 倍に希釈し、供試した（3.5%）。この消毒液によって肉の表面は白く変色し、やや柔らかくなる傾向があることが難点であるが、臭いはない（表 2-1）。

次亜塩素酸ナトリウムは「ピューラックス（株式会社オーヤラックス）」（次亜塩素酸ナトリウム 6%）を用いた。過酢酸製剤と同様に、純水で希釈して 600 ppm に調製し、供試した。この消毒液によって肉の表面はやや白く変色し、塩素臭が残ることが難点

である（表 2-1）。

エタノールは「消毒用エタノール『コザカイ・M』」（小堺製薬株式会社）（15℃で 76.9 - 81.4 vol%）用い、販売濃度で供試した。この消毒液によって肉の表面は若干白く変色するが、アルコール臭はすぐに消失する（表 2-1）。

なお、対照用溶液は滅菌水を用いた。

（5）消毒液の STEC への直接効果の検証

PBS 懸濁菌液での消毒液の効果を令和 2 年度と同様に検証した。供試した消毒液の種類と濃度を表 2-2 に示した。

各接種菌液を 100 μ L ずつ 50 mL チューブに分注し、試験を実施するまで氷上もしくは 4℃で保存した。菌液が入ったそのチューブにそれぞれの消毒液を 10 mL 添加し、ピペティングにより混和した（原液）。消毒液添加 30 秒後に 0.1 mL をとり、この原液を TSA に塗抹した。対照用溶液である滅菌水の場合は、0.9 mL の PBS にて 10^{-4} まで 10 倍階段希釈を行い、原液から 10^{-4} 希釈液 0.1 mL ずつを TSA に塗抹した。それらを 37℃で 24 時間培養し、コロニーを計測した。

（6）消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証

消毒液の効果の検証方法を図 2-1 および表 2-2 に示す。

1) 消毒液 60 回噴霧（420 mL）の効果

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。この菌汚染検体を 4 個作製し、3 個は刺した竹串を垂直に固定し、検体ごとに各消毒液を 60 回噴霧（420 mL）し、室温で 5 分間立てた状態で、消毒液の液切りを行った。

各検体から竹串を外してそれぞれストマッカー袋に入れ、それぞれ検体の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。これらの乳剤を、それぞれ0.9 mLのPBSにて 10^{-3} まで10倍階段希釈を行った。原液から 10^{-3} 希釈液0.1 mLずつを、TSAとクロモアガーSTECに塗抹し、37°Cで24時間培養し、コロニーを計測した。

2) 消毒液100 mLかけ流しの効果(かけ流し100 mL)

「1) 消毒液60回噴霧の効果」と同様に検体を竹串に刺した汚染検体を作製した。消毒液を噴霧する代わりに、検体ごとにそれぞれの消毒液20 mLをシリンジで5回(合計100 mL)かけ流しを行った。以下、「1) 消毒液2回噴霧の効果」と同様に行った。

3) 消毒液500 mLかけ流しの効果(かけ流し500 mL)

「1) 消毒液60回噴霧の効果」と同様に検体を竹串に刺した汚染検体を作製した。

「2) 消毒液100 mLかけ流しの効果」より大きいシリンジを用いて、検体ごとにそれぞれの消毒液50 mLをシリンジで10回(合計500 mL)かけ流しを行った。以下、「1) 消毒液2回噴霧の効果」と同様に行った。また、下に流れ落ちた消毒液および滅菌水中のSTEC菌数を計測した。まず0.9 mLのPBSにて 10^{-3} まで10倍階段希釈を行った。原液から 10^{-3} 希釈液0.1 mLずつを、TSAとクロモアガーSTECに塗抹し、37°Cで24時間培養し、コロニーを計測した。

C. 研究結果

1. 牛枝肉のSTEC調査

(1) 生菌数

調査した検体163頭のうち、生菌数が検出された150頭の生菌数の平均は 62.8 ± 437.2 (平均 \pm SD) CFU/cm²であった(表1-4)。

雌雄で比較すると、オスは110頭のうち生菌数が検出されない9頭を除いた101頭では 82.0 ± 534.0 CFU/cm²であるのに対して、メスは53頭のうち生菌数が検出されない4頭を除いた49頭では 23.1 ± 30.7 CFU/cm²であった(表1-4)。

ウシの種類別で比較すると、ホルスタインの平均値が3桁であり他の種類と比べて高い値となり、 130.3 ± 684.4 CFU/cm²であった。これらには、生菌数1,000 CFU/cm²を超えるウシが2頭含まれている(表1-4)。

施設別の生菌数の結果を表1-5に示す。採材期間を通して、平均生菌数が最も多かった施設はE施設であった。平均生菌数は 218.1 ± 860.4 CFU/cm²であり、100 CFU/cm²を超えるウシは5頭であった。

月別で算出した生菌数の結果を表1-6に示す。7月が最も高く $452.4 \pm 1,311.1$ 、次いで8月が 39.6 ± 72.3 であり、気温が高い夏に高い傾向が見られた。1,000 CFU/cm²を超えるウシは7月に2頭、100 CFU/cm²を超えるウシは7月に1頭、8月に2頭であった。

(2) STEC7血清群の分離

定性的な検出を図1-1に示すように行い、増菌培養液が*stx*遺伝子および*eae*遺伝子の両方あるいは片方が陽性であった検体のSTEC7血清群のリアルタイムPCRの結果を表1-7に示す。供試検体163検体のうち、39検体が*stx*遺伝子および*eae*遺伝子の少なくとも片方が陽性であり、両遺伝子のい

ずれもが陽性となった検体はそのうち 11 検体であった。上記 39 検体のうち、5 検体が STEC 7 血清群のいずれかで陽性となり、同一検体で複数の 0 血清群で陽性となった検体は D41、D42 および D68 の 3 検体であり、それぞれの Ct 値は検体 D41 で 0157 (Ct 値：29.4)、026 (30.5)、045 (29.4) および 0103 (33.0)、検体 D42 では 026 (33.8) および 045 (26.0)、また、検体 D68 では 0157 (27.3)、026 (36.2) および 045 (37.4) であった。血清群 0103 のみが陽性となった検体は D4 および D118 であり、Ct 値は D4 で 25.4、D118 で 24.2 であった。

リアルタイム PCR でいずれかの遺伝子が陽性となった培養液から分離した菌株の 0 血清群と保有遺伝子を表 1-8 に示す。STEC 7 血清群保有かつ *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性で分離が可能であった検体は D68 のみであり、その血清型は 0157:H7 であった。この株の生化学的性状は、一般的な STEC 0157:H7 と一致した (表 1-9) また、分離された STEC 0157 は、*stx1* 遺伝子を保有せず、*stx2* 遺伝子のみを保有していた。生菌数について、D68 は 272 CFU/cm² であり、同じ施設からの検体 D41 を除いて、菌株の分離が可能であったその他の検体と比較して 10¹-10² の単位で生菌数が高い値であった。

stx 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性であった検体、STEC7 血清群のリアルタイム PCR 陽性検体から STEC7 血清群が分離された検体を表 1-10 にまとめた。*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性であった検体は合計で 11 検体であり、これらの検体において、分離陽性検体は STEC 0157 が分離された 1 検体のみであった。リアルタイム PCR で血清群

0157 が陽性となった検体は D41 および D68 の計 2 検体であり、分離陽性検体となったのは最終的に D68 の 1 検体のみであった。血清群 026、045 および 0103 はリアルタイム PCR 陽性であったが菌株の分離には至らなかった。なお、STEC 7 血清群に該当しない菌株として、D4 および D41 から *eae* 遺伝子および 0103 遺伝子陽性の菌株が分離され、D118 から 0103 遺伝子のみ陽性の菌株が分離された。

ウシの種類、施設および採材年月のカテゴリ別に STEC7 血清群分離個体を表 1-11 にまとめた。STEC 0157 が分離されたのは、2021 年 8 月に採材された E 施設からの交雑種であった。

(3) STEC7 血清群以外で *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方あるいは片方を保有する大腸菌および、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陰性である STEC7 血清群の大腸菌の分離

表 1-7 に示すように供試検体 163 検体のうち、39 検体が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の少なくとも片方が陽性であり、両遺伝子のいずれもが陽性となった検体はそのうち 11 検体であった。*stx* 遺伝子のみが陽性であった検体は 13 検体、*eae* 遺伝子のみが陽性であった検体は 15 検体であった。陽性となった遺伝子の Ct 値は、*stx* 遺伝子については最低値 16.3、最高値 36.2 であり、*eae* 遺伝子については最低値 21.2、最高値 43.1 であった。

リアルタイム PCR でいずれかの遺伝子が陽性となった培養液から分離した菌株の 0 血清群と保有遺伝子を表 1-8 に示す。分離株の 0 血清群は OUT を含む多様なものであり、施設あるいはウシの種類との関連性

などの特徴はなかった。検体の生菌数は、非検出から 5,111 CFU/cm² までと幅が大きく、0 血清群ごとに特徴的な違いはみられなかった。

(4) STEC7 血清群の定量

定性試験で *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子陽性の 0157 が分離された検体 D68 については、定量的な試験を行った (図 1-2)。MPN 法 (3 本法) での定量結果を表 1-12 に示す。1 段目において、3 本のうち 2 本が *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子および 0157 遺伝子のすべてがリアルタイム PCR 陽性となった。1 段目の残り 1 本、2 段目および 3 段目については *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子および 0157 遺伝子のすべて非検出であった。STEC 0157 の定量値は、試験液 100 mL あたり 11 MPN あるいはガーゼ表面積 100 cm² あたり 1.02 MPN であった。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証

PBS 中の STEC への各消毒液の効果 (30 秒後) を検討した。

過酸化水素 (3.5%) を除いた全ての消毒液では、全血清群は検出されなかった (表 2-3)。過酸化水素では、血清群 026、0103、0111、0157 は、それぞれ 5.9 ± 0.0 、 5.8 ± 0.1 、 5.7 ± 0.1 、 5.8 ± 0.0 log CFU/mL であった。

滅菌水では、血清群 026、0103、0111、0157 は、それぞれ 6.0 ± 0.0 、 6.0 ± 0.0 、 5.8 ± 0.0 、 5.9 ± 0.1 log CFU/mL であった。

(2) 消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証

1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果

筋膜ありの牛肉では、過酢酸 1,000 ppm、

次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm、エタノール、亜塩素酸ナトリウム 500 ppm と 1,200 ppm、過酸化水素の効果を検証した。この結果 (図 2-2)、最も効果があった亜塩素酸ナトリウム 1,200 ppm では 5.9 ± 0.6 log CFU/片であり、次に効果があったものは過酢酸 1,000 ppm の 6.0 ± 0.4 log CFU/片であった。最も効果がなかった過酸化水素では 6.7 ± 0.4 log CFU/片であった。対照となる滅菌水では 6.8 ± 0.2 log CFU/片であった。

筋膜なしの牛肉では、亜塩素酸ナトリウム 500 ppm と 1,200 ppm、過酸化水素の効果を検証した。この結果 (図 2-3)、最も効果があった亜塩素酸ナトリウム 1,200 ppm では 7.0 ± 0.1 log CFU/片であり、最も効果がなかった過酸化水素では 7.2 ± 0.1 log CFU/片であった。対照となる滅菌水では 7.4 ± 0.1 log CFU/片であった。

2) 消毒液 100 mL かけ流しの効果 (かけ流し 100 mL)

筋膜ありの牛肉では、「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」 (筋膜あり) と同様の消毒液で検証した。この結果 (図 2-4)、最も効果があった消毒液は「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」の「筋膜あり」とは異なり過酢酸 1,000 ppm で 5.7 ± 0.3 log CFU/片であり、次に効果があったものは亜塩素酸ナトリウム 500 ppm と 1,200 ppm の 5.9 ± 0.3 log CFU/片と 5.9 ± 0.4 log CFU/片であった。最も効果がなかった消毒液は「1) 消毒液 60 回噴霧 (420 mL) の効果」の「筋膜あり」と同様に過酸化水素で 6.2 ± 0.2 log CFU/片であった。対照となる滅菌水では 6.9 ± 0.2 log CFU/片であった。

筋膜なしの牛肉では、「1) 消毒液 60 回

噴霧(420 mL)の効果」(筋膜なし)と同様の消毒液で検証した。この結果(図2-5)、最も効果があった消毒液は「1)消毒液60回噴霧(420 mL)の効果」の「筋膜なし」と同様に最も効果があった亜塩素酸ナトリウム1,200 ppmで $6.8 \pm 0.1 \log$ CFU/片であり、最も効果がなかった消毒液は「1)消毒液60回噴霧(420 mL)の効果」の「筋膜なし」と異なり亜塩素酸ナトリウム500 ppmで $7.1 \pm 0.3 \log$ CFU/片であった。対照となる滅菌水では $7.4 \pm 0.3 \log$ CFU/片であった。3)消毒液500 mLかけ流しの効果(かけ流し500 mL)

「1)消毒液60回噴霧(420 mL)の効果」(筋膜あり)と同様の消毒液、および、過酢酸50、100、200、500 ppm、亜塩素酸ナトリウム200 ppmを追加して検証した。この結果(図2-6)、最も効果があった消毒液は「2)消毒液100 mLかけ流しの効果」と同様に過酢酸1,000 ppmで $4.8 \pm 0.9 \log$ CFU/片であり、最も効果がなかった消毒液は過酢酸50 ppmで $6.0 \pm 0.4 \log$ CFU/片であった。対照となる滅菌水では $6.6 \pm 0.5 \log$ CFU/片であった。

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(図2-7)。

D. 考察

1. 牛枝肉のSTEC調査

牛など反芻動物は、STEC 0157:H7の保菌動物として重要とされており(1、2)、ヒトでの本菌感染にウシに関連する食品が報告されている(3)。ウシのSTEC 0157:H7の保菌率は、これまで0-27.3%であるといわれている(4)が、ほとんどのウシ由来の

株(bovine strains)はヒトが発病する病原因子を持っていないことも知られている

(1)牛枝肉のSTEC汚染には、糞便が関わっているとされる。糞便中のSTEC 0157:H7の濃度は、 10^2 から 10^6 CFU/gと個体によって異なり(5)、 10^7 CFU/gの高濃度が検出されることもあるが、ほとんどの場合10~100 CFU/g未満である(6、7)。牛枝肉汚染および牛糞中の含有率は相関がある(8)という報告があるが、細菌が腸外に潜伏するために、糞便の排出と牛枝肉汚染はほとんど相関がない(9)ともいわれている。また、ウシのSTEC 0157保菌には年齢と出産が関係し、保菌率は2歳の牛で最も高く、それ以上の年齢の動物では減少し、未経産牛(1歳以上の動物)は保菌率が低く(10)、菌の排出は、生後2か月未満および生後6か月以上の子牛と比較して生後2~6か月の子牛で最も高いとの報告がある(11)。

本調査では牛枝肉からガーゼを用いた163検体中、1検体(0.6%)からSTEC7血清群のひとつであるSTEC 0157が分離された。この1検体を含む5検体(3.1%)は、*stx* 遺伝子および*eae* 遺伝子の両方ならびにSTEC7血清群のいずれかがリアルタイムPCRで陽性であった。と畜場におけるウシの糞便からも高率にSTECが分離されていること(12)と比較して、汚染率は低いことが明らかとなった。これらの陽性検体であったウシとそうでないウシでの特徴の違いを見いだすことはできなかったが、これら検体の元のウシの腸管内容物におけるSTECの有無を調査すれば有益と考えられる。

牛枝肉のSTEC7血清群の汚染は施設の衛生状態も関連していることも示唆された。施設ごとの生菌数についても、E施設以外の

平均生菌数は 10^{1-2} CFU/cm² 程度であるのに対して、E 施設では平均生菌数が 10^3 CFU/cm² と 1 桁多くなっている(表 1-5)。さらには、STEC 0157 が分離された施設は E 施設であり、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方ならびに STEC 7 血清群のいずれかがリアルタイム PCR で陽性となった 5 検体のうち 4 検体が E 施設であった。したがって、施設内の作業の変化によっては、牛枝肉への STEC7 血清群の汚染頻度が上昇することも考えられ、食肉処理過程や牛肉の保管には十分な注意が必要である。

分離された菌株は STEC 7 血清群ではない菌株が大部分を占めていた(表 1-8)。*eae* 遺伝子は、病原性大腸菌が腸管上皮細胞に接着した後の菌体の上皮細胞への固定化に関与している。*eae* 遺伝子を保有している菌株が複数の施設から分離されていることから、これらの菌株の病原性についてさらなる検討を行う必要もある。また、指標菌とし食肉の衛生管理に役立つことも考えられた。

本調査では、比較的牛枝肉の汚染が低率であったが、枝肉にガーゼを密着させたのちに剥がして検体としていることから、ガーゼに移行した菌のみが検体に含まれており、枝肉表面にあった他の菌が検体に含まれていない可能性がある。STEC 0157:H7 の牛肉内浸潤に関する検討(13)では、表面に接種した STEC 0157:H7 は表面から 5-10mm の部位においても浸潤していたことから、採材時の負担との兼ね合いもあるが、牛肉の表面から数センチを切り取り牛肉自体の培養を行うことにより、より深部に浸潤した菌体について分離が可能となると考えられる。

分離された季節に関しては、ウシの STEC

0157:H7 の保有率はヒトと同様に温帯気候では春の終わりから秋の初めに比較的高いといわれている(1, 14)。今回分離された STEC 0157:H7 は 8 月に採材された検体からであったこと(表 1-11)からも、採材について、夏季に集中的に行う等により STEC の汚染状況について詳細に明らかにできる可能性も考えられる。今後は、季節的な要因についてもさらなる検討を行う必要がある。

2. 牛肉の消毒効果の検討

消毒液の STEC への直接効果の検証を行った結果、供試した消毒液の種類と濃度(表 2-3)では菌が検出されなかったことから、これらの条件は牛肉での消毒効果が期待されると考えられた。

消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証では、牛肉検体として筋膜あり検体と筋膜なし検体を供試したが、最終的な用途が筋膜のある枝肉であることから、特に、筋膜あり検体の結果に注目し、以下のように考察する。なお、全体的に筋膜なしの検体では筋膜ありの検体と比べて消毒効果が弱い傾向であった。

滅菌水を用いて検証方法の比較をすると、噴霧およびかけ流し(100 mL)では、接種菌数から約 1 桁弱減少したが、かけ流し(500 mL)では、それらよりも若干減少し、3つの検証方法の中ではかけ流し(500 mL)が効果的と考えられた。

次に、消毒薬を用いて検証した。

消毒液 60 回噴霧(420 mL)では、亜塩素酸ナトリウム 1,200 ppm および過酢酸 1,000 ppm では滅菌水と 1 桁弱の減少があったが、その他の消毒液では滅菌水との差は認めら

れなかった。

消毒液かけ流し 100 mL は、消毒液 60 回噴霧 (420 mL) よりも確実に検体に消毒液が接触し、また洗い流し効果が高い条件であると考えて行った。その結果、供試した消毒液の多くで滅菌水と比べて菌数が約 1 桁減少することが認められた。また、消毒液 60 回噴霧 (420 mL) と比較すると、かけ流し 100 mL の方が液量が約 1/4 量であるにもかかわらず、噴霧より効果がある傾向であった。

このため、さらなる洗い流し効果を狙って、500 mL にかけ流し量を増加して試みた。その結果、滅菌水を 500 mL かけ流すだけでも接種菌数が約 1 桁減少し、さらに消毒液では 2 桁弱減少した。3 つの検証方法の中ではかけ流し (500 mL) が最も効果的と考えられた。

消毒薬の効果を比較すると、いずれの検証方法においても、過酢酸 (1,000 ppm) が最も大きな菌数減少を示した。次に、亜塩素酸ナトリウム (500 ppm および 1,200 ppm) が大きな減少を示した。しかし、次亜塩素酸ナトリウム (600 ppm)、エタノールおよび過酸化水素では、減少はしたものの上記の消毒薬よりも効果が弱かった。

また、いずれの検証方法においても、亜塩素酸ナトリウムは低濃度設定の 500 ppm でも肉表面が変色し、塩素臭が若干あった。また、過酢酸 (1,000 ppm) は、肉表面の変色が認められなかったものの、酢酸臭が確認された。肉表面の変色がないことから、過酢酸の方が用途に適すると考えられた。このため、できるだけ低い濃度で消毒効果を検証するために、100 ppm と 50 ppm にて試験した。しかし、菌数減少は 1,000 ppm と

比較して約 1 桁以上小さかった。今後、過酢酸 1,000 ppm と 100 ppm の間の濃度で、消毒効果が高く、臭いが洗い流せる濃度を検討したい。

E. 結論

1. 牛枝肉の STEC 調査では、2021 年 4 月から 2022 年 2 月に 7 施設の協力のもとに牛枝肉合計 163 検体を供試した。検体を増菌培養後、STEC7 血清群マルチプレックスリアルタイム PCR を行い、分離株の血清凝集試験および生化学的性状試験を行った。また、検体の生菌数の計測を行った。この結果、1 検体 (0.6%) から STEC 0157 : H7 が分離されたが、1 検体のみであったことからウシの種類や性別などの特徴については考察には至らなかった。STEC 0157 : H7 が分離された検体および施設において生菌数が比較的高い値を示したことから、施設の環境状況の要因の可能性が考えられた。培養液から分離された STEC7 血清群に該当しない *stx* 遺伝子または *eae* 遺伝子を保有する菌株も分離されたことから指標菌とし食肉の衛生管理に役立つことも考えられた。

2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、酸性の過酢酸製剤、酸性化した亜塩素酸ナトリウムおよび過酸化水素、アルカリ性の次亜塩素酸ナトリウム (次亜塩素酸ソーダ)、中性のエタノール (エチルアルコール) を選択し、牛肉での STEC の消毒効果を検証した。結果として、消毒液の使用量を増やすことや濃度を高めることにより菌数減少の傾向が認められた。消毒薬の種類としては、肉表面に変化を起さない過酢酸が最も優れていると考えられた。今後、使用後の酢酸臭を流水で除去できる過酢酸濃

度を検討したい。

【 参考文献 】

1. Ferens WA, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis* 2011;8:465-87.
2. Munns KD, Selinger LB, Stanford K et al. Perspectives on supershedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle. *Foodborne Pathog Dis* 2015;199-103.
3. Callaway TR, Carr MA, Edrington TS et al. Diet, *Escherichia coli* O157:H7, and cattle: a review after 10 years. *Curr Issues Mol Biol* 2009;11:67-79.
4. Hussein HS, Bollinger LM. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle. *J Food Prot* 2005;68:2224-2241.
5. Zhao T, Doyle MP, Shere J, Garber L. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herds. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1290-1293.
6. Fegan N, Vanderlinde P, Higgs G, Desmarchelier P. The prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in faeces of cattle from different production systems at slaughter. *J Appl Microbiol* 2004;97:362-370.
7. Widiasih DA, Ido N, Omoe K, et al. Duration and magnitude of faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from naturally infected cattle. *Epidemiol Infect* 2004;132:67-75.
8. Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, et al. Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2999-3003.
9. Boqvist S, Aspan A, and Eriksson E. Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in fecal and ear samples from slaughtered cattle in Sweden. *J Food Prot* 2009;72:1709-1712.
10. Mir RA, Weppelmann TA, Kang M et al. Association between animal age and the prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a cohort of beef cattle. *Vet Microbiol* 2015;175:325-31.
11. Nielsen EM, Tegtmeier C, Andersen HJ et al. Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of Verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms. *Vet Microbiol* 2002;88:245-57.
12. Fukushima, H., Seki, R. High numbers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* found in bovine faeces collected at slaughter in Japan. *FEMS Microbiol. Letters* 2004;238:189-197.
13. 厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食中毒・乳肉水産食品合同部会

(平成 23 年 7 月 6 日開催) 資料 4
腸管出血性大腸菌 0157 の牛肉内浸潤
と加熱処理による低減効果に関する検
討

14. Cobbold RN, Rice DH, Szymanski M, et al. Comparison of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* prevalences among dairy, feedlot, and cow-calf herds in Washington State. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:4375-4378.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

なし

(学会発表)

なし

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし