

令和 2 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、2020 年 11 月から 2021 年 2 月に 7 施設の協力のもとに牛枝肉合計 180 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。検体を増菌培養後、マルチプレックスリアルタイム PCR 法、血清凝集試験および生化学的性状試験にて STEC の検出・分離を行った。また、同時に生菌数の計数を行った。この結果、1 検体から 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 が分離された検体において生菌数が比較的高い値を示したことから、ウシや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のために、消毒薬として、酸性の過酢酸製剤、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、生理食塩水や液体培地中の STEC 浮遊液での消毒効果を検証した。結果として、十分な消毒効果が認められ、STEC 接種牛肉においても消毒液の量を増やすことにより菌数は減る傾向が認められた。

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*	豊岡大輔
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
国立医薬品食品衛生研究所	千葉由美、都丸亜希子、毛利拓子、廣瀬昌平

A. 研究目的

昨今の海外での和牛の需要の高まりや日本政府および業界関係者による和牛輸出促進の影響のため、海外への和牛輸出量が増加している。特に、米国への輸出は 2005

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年度には、国内食肉処理施設において、牛枝肉表面の STEC について定性的・定量的検出を行う。方法としては、USDA/FSIS の試験法を参考に志賀毒素遺伝子・大腸菌 O 抗原遺伝子検出のスクリーニングを行い、分離株の血清型別、毒素型別等の解析を行うこととした。また、各種殺菌剤について、生理食塩水や液体培地中の STEC 浮遊液での消毒効果を検証し、加えて牛肉での効果を予備的に検証することとした。

B. 研究方法

1. 牛枝肉の STEC 調査

2020 年 11 月～2021 年 2 月に国内の食肉検査所 7 か所にて、ウシ 180 頭からサンプリングを行った。実施機関、採取日、サンプリングに供した牛の情報を表 1-1 と表 1-2 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、滅菌水で浸漬した 30 cm×30 cm 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、クール宅急便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。培養液 $100 \mu\text{L}$ をマイクロチューブに入れ、 $10,000 \text{ g}$ で10分間遠心し、上清を取り除き、 50 mM の水酸化ナトリウム $85 \mu\text{L}$ に懸濁した。 100°C のヒートブロックで10分間加熱し氷で急冷後、 1M Tris-HCl (pH 7.0) を $15 \mu\text{L}$ 添加して中和した。 $10,000 \text{ g}$ で10分間遠心した上清 $100 \mu\text{L}$ を新しいマイクロチューブに移したものを DNA 抽出液とした。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 1-3 に示す。反応液は、DNA 抽出液 $5 \mu\text{L}$ 、 $2 \times$ Environmental Master Mix (サーモフィッシュャー サイエントフィック) $12.5 \mu\text{L}$ 、プライマーおよびプローブを加え、超純水で合計 $25 \mu\text{L}$ になるように調製した。Assay1 から Assay5 の反応溶液の組成および量を表 1-4-1 から表 1-4-5 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。この増幅反応は Applied Biosystems 7500 を用いて行った。

まず、プライマーセット Assay1 (*stx/eae*) および Assay2 (16S/0157) で増幅を行った。この結果、いずれの遺伝子でも陰性の場合には陰性と判定した。*stx* 遺伝子陰性または *eae* 遺伝子陰性であるが、0157 遺伝子陽性の場合には、0157 抗体の免疫磁気ビーズ法を以下の 3-3) の手順にしたがって行った。*stx* 遺伝子陽性かつ *eae* 遺伝子陽性の場合には、プライマーセット Assay3 (026/0111)、Assay4 (045/0121)、Assay5 (0103/0145) を用いて、上述と同様にリアルタイム PCR を行った。この結果、いずれの 0 群の遺伝子でも陰性の場合には陰性と判定した。いずれかの 0 群の遺伝子で陽性の場合、陽性判定となった 0 群抗体による免疫磁気ビーズ法を以下の 3-3) の手順にしたがって行った。

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。マイクロチューブに $25 \mu\text{L}$ の目的とする 0 群抗体の免疫磁気ビーズと培養液 1 mL を入れ転倒混和し、さらに、10分ごとに転倒混和し、30分間反応させた。このマイクロチューブをマグネチックスタンドにセットし、5分間吸着させ、培地を除去し、滅菌した PBS を入れることによりビーズの洗浄を行った。繰り返し洗浄した後、E バッファー(牛血清アルブミン 5 g 、緩衝ペプトン水

に調製し、孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルターでろ過（滅菌）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た。ビーズ懸濁液から $450\ \mu\text{L}$ をマイクロチューブにとり、1N 塩酸 $25\ \mu\text{L}$ に加えボルテックスミキサーで攪拌し、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 $100\ \mu\text{L}$ 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-STE C 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-STE C 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、以下の血清凝集試験およびラテックス凝集試験を行った。

3–4) STEC 7 血清群の血清凝集試験およびラテックス凝集試験

血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の血清は、病原大腸菌免疫血清「生研」（デンカ株式会社）を用い、026、0111、0157 のラテックス凝集試験はスライドラテックス凝集反応による大腸菌 026、0111、0157 鑑別試薬 E. coli 026、0111、0157-F「生研」（デンカ株式会社）を用いて行った。また、7 血清群に凝集試験したものについては、必要に応じて H 抗原の試験を行った。さらに、リアルタイム PCR による確認および最確数 (MPN) 法による定量的な検出を行った。

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 $50\ \mu\text{L}$ の滅菌水に懸濁し、懸濁液を作製した。このコロニーの懸濁液から $25\ \mu\text{L}$ をマイクロチューブにとり、 100°C のヒートブロックで 10 分間加熱し氷で急冷した。これを $10,000\ \text{g}$ で 10 分間遠心し、再度滅菌水に懸濁して DNA 抽出を行った。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) コロニー懸濁液からのコロニー再単離

3–5) の懸濁液の残りの $25\ \mu\text{L}$ を Tryptone soya agar (TSA) に画線し、 37°C 、24 時間培養を行い、コロニーを単離した。コロニーを以下のリアルタイム PCR および性状確認のための生化学的試験に供試した。3–7) 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

3–6) の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。

3–8) 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。なお、STEC の生化学的性状を表 1–5 に示す。試験は 3–7) のリアルタイム PCR に供したコロニーを用いて行った。TSI 寒天

培地および LIM 培地で 37°C、18~24 時間培養を行い、菌の性状を確認した。

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°C で保存しておいた検体懸濁液を用いて、MPN 測定を行った。mTSB によって 2 希釈段階 3 本ずつ作成し、42±1°C 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

「4-1)」で増殖した培養液 25 μL をマイクロチューブにとり、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 STEC 培地 2 枚ずつ塗抹し、36±1°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、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 による確認を行なわれた。

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、コロニーを 50 μL の滅菌水に懸濁し、懸濁液を作製し、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、3-6) と同様に非選択培地による単離を行った。

4-6) コロニー懸濁液からのコロニー再単離

4-5) の懸濁液の残りの 25 μL を 3-6) と同様に TSA 培地に画線し、37°C、24 時間培養を行い、コロニーを単離した。コロニーを以下のリアルタイム PCR および性状確認のための生化学的試験に供試した。

4-7) 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

4-6) の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。

4-8) 生化学的性状試験

3-8) 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* 遺伝子陽性かつ *eae* 遺伝子陽性の 7 血清以外の大腸菌の分離

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推定陽性検体について、増菌培養でのリアルタイム PCR の結果と合致する大腸菌があるか否か、再検討を行った。まず、1) で一

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 μ L に対して 4.5 mL の TBS を加え、42 \pm 1°Cで 18 時間増菌培養した。この増菌培養液を任意の血清群を用いて 3-3) と同様に免疫ビーズ法によって濃縮を行った。このビーズ懸濁液は E バッファーで 10⁻⁶まで 10 倍階段希釈し、各希釈液それぞれ 100 μ L ずつを SMAC 培地、CT-SMAC 培地クロモアガーSTEC 培地、CT-クロモアガーSTEC 培地に 1 枚ずつ塗抹し、36 \pm 1°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) と同様に非選択培地による単離を行い、3-7) と同様に単離したコロニーのリアルタイム PCR による判定を行い、3-8) と同様に生化学的性状試験を行った。

2. 牛肉の消毒効果の検討

(1) 菌株

026、045、0103、0111、0121、0145、0157 の 7 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 (ESC97、ESC425、ESC469、ESC530、ESC545、ESC548、ESC555) を供試した。

(2) 牛肉検体、

検体として供試する牛肉は、小売店から購入したブロック肉 (豪州産) を用いた。このブロック肉を約 5.5 cm 角、厚さ約 0.5 cm (約 20 - 30 g) にクリーンベンチ内で無菌的に切り分けた。切り分けた検体は、重量を測定した。

(3) 接種菌液の調製

接種菌液は、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

mL の Tryptone soya broth (TSB) に植菌し、37°Cで 18 時間静置培養したものを用いた。これらの菌液を、4°C、5,000 rpm、15 分間遠心し、滅菌した PBS または TSB 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で使用するまで保存した (最長 3 日間)。

なお、これら接種菌液中の菌数は、平板培養法で計数した。接種菌液を PBS 1.8 mL を 6 本用いて 10 倍階段希釈を行い、10⁻⁶希釈液までを作製し、10⁻⁵希釈液 (約 1 \times 10³ CFU/mL) および 10⁻⁶希釈液 (約 1 \times 10² CFU/mL) 0.1 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、培養し計数した。

(4) 消毒液の調製

効果を検証する消毒液は、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 25 年以降に新たに指定添加物として使用が認められた過酢酸製剤を、アルカリ性の消毒液として同規格基準に記載され従前より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 に示したように、過酢酸は約 pH 3 から 4、次亜塩素酸ナトリウムは約 pH 9、エタノールは約 pH 6.7 であった。

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

100、200、500、1,000 ppm に調製し、供試した。

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、滅菌した純水（滅菌水）で希釈して100、200、300、600 ppm に調製し、供試した。

エタノールは「消毒用エタノール『コザカイ・M』」（小塚製薬株式会社）（15℃で76.9 - 81.4 vol%）用い、販売濃度で供試した。

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

1）PBS 懸濁菌液での消毒液の効果

消毒液および菌液は、上述の方法に従って作製したものを供試した。検体である牛肉に接種する状態の菌液（PBS 懸濁）について、各消毒液の効果の確認を行った。過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムはともに最も低い濃度である 100 ppm のみで試験を行った。

各菌液を 100 μ L ずつポリスチレンチューブ（PS 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 PS チューブにそれぞれの消毒液を 10 mL 添加し、ピペッティングにより混合した。消毒液添加 30 秒後に 0.1 mL とり、この原液を TSA に塗抹し、滅菌水の場合は、0.9 mL の PBS 4 本を用いて 10 倍階段希釈を行い、 10^{-4} 希釈液までを作製し、原液から 10^{-4} 希釈液 0.1 mL ずつを TSA に塗抹し、37℃で 24 時間培養し、コロニー数計数を行った。消毒液の効果は、この計数の結果から判定した。

2）TSB 懸濁菌液での消毒液の効果

「1）PBS 懸濁菌液での消毒液の効果」の

PBS の代わりに、有機物が豊富な TSB に菌を懸濁し、各消毒液の効果を「1）PBS 懸濁菌液での消毒液の効果」と同様に検証した。

（6）消毒液の肉汚染 STEC への効果の検証

1）消毒液 2 回噴霧の効果

消毒液噴霧の効果の検証方法を図 2-1 に示す。検体は、上述の「（2）牛肉検体」の方法に従って切り分けた牛肉を用いた。菌液は、上述の「（3）接種菌液の調製」の方法に従って作製し PBS に再懸濁した。

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 2 回噴霧し、消毒液が流れ落ちない状態になるまで室温で 5 分間立てた状態で、消毒液の液切れを行った。

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。なお、過酢酸による消毒処理の場合は、0.1%のチオ硫酸ナトリウムで中和してからストマッカーを行った。これらの乳剤を、それぞれ 0.9 mL の PBS 3 本を用いて 10 倍階段希釈を行い、 10^{-3} 希釈液までを作製した。非処理検体については 10^{-1} から 10^{-3} 希釈液 0.1 mL ずつを、処理検体については、原液から 10^{-4} 希釈液 0.1 mL ずつを、TSA とクロモアガー STEC に塗抹し、37℃で 24 時間培養し計数した。

2）消毒液 10 回噴霧の効果

「1）消毒液 2 回噴霧の効果」の回数を 10 回に変更し、消毒液の液切り時間も 10 分間

に延長した。さらに、検体を筋に沿って切り分ける方法（枝肉表面）で切り分けたものを供した。この検体の大きさは、「1）消毒液2回噴霧の効果」の検体とほぼ同じ大きさにした。

これらを用いて、「1）消毒液2回噴霧の効果」と同様の方法（図2-1）で、噴霧回数を10回に変更して噴霧効果の試験を行い、同様に乳剤を作製し、菌数の計数を行った。

3) 消毒液浸漬の効果（浸漬）

消毒液浸漬の効果の検証方法を図2-2に示す。検体は、上述の「(2) 牛肉検体」の方法に従って切り分けた牛肉を用いた。切り分けた検体に、「1）消毒液2回噴霧の効果」と同様に菌液を接種し、菌液を浸透させた。この菌汚染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。消毒液が流れ落ちない状態になったものをストッカー袋に入れ、「1）消毒液2回噴霧の効果」と同様に乳剤を作製し、計数を行った。

4) 消毒液かけ流しの効果（かけ流し）

「1）消毒液2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（図2-1）。乳剤の作製は、かけ流し5分後および1時間後に行い、「1）消毒液2回噴霧の効果」と同様に乳剤を作製し、計数を行った。

C. 研究結果

1. 牛枝肉のSTEC調査

(1) 生菌数

全ての検体の生菌数の結果を採材日、施

設記号および牛の情報とともに表1-6に示す。検体の生菌数は、750 CFU/cm²から非検出（0.11 CFU/cm²未満）まであり、値のばらつきは大きかった。生菌数が検出されない27頭を除いた153頭の生菌数は12.2 ± 63.10（平均±SD）CFU/cm²であり変動係数（CV）=5.17であった（表1-7）。

雌雄で比較すると、オスは118頭のうち生菌数が検出されない22頭を除いた96頭では16.1 ± 79.15 CFU/cm²（CV=4.92）であるのに対して、メスは62頭のうち生菌数が検出されない5頭を除いた57頭では5.6 ± 8.07 CFU/cm²（CV=1.45）であった（表1-7）。オスの方がメスより生菌数の値が高く、そのばらつきが大きいといえる。しかし、オスでは、100 CFU/cm²を超えるウシが、検体B19（11月16日に採材した黒毛和種、30か月、去勢有）から750 CFU/cm²、検体B24（11月23日に採材した褐毛和種、29か月、去勢有）から171.7 CFU/cm²、検体B57（12月7日に採材した褐毛和種、29か月、去勢有）から119.3 CFU/cm²、検体B94（1月12日に採材した交雑種、27か月、去勢有）から107.8 CFU/cm²が検出され、雌雄合計の180頭中4頭（2.2%）が100 CFU/cm²を超えた。ちなみに、これらの生菌数の値を除いたオス92頭で平均値およびSDを算出した。その結果、4.3 ± 8.55 CFU/cm²（CV=2.0）となり、メスの5.6 ± 8.07 CFU/cm²（CV=1.45）と近い値となった。全ての検体の生菌数は、100 CFU/cm²を超える4頭の値を除いた149頭で算出すると4.8 ± 8.39 CFU/cm²（CV=1.76）となった。

ウシの種類別の生菌数を表1-7に示す。黒毛和種および褐毛和種の値がともに平均値が2桁であり他の種類と比べて高い値と

なり、それぞれ 20.4 ± 104.58 CFU/cm² (CV=5.13)、 67.0 ± 66.50 CFU/cm² (CV=0.99) であった。これらには、生菌数 100 CFU/cm² を超えるウシが黒毛和種には 1 頭 (B19)、褐毛和種には 2 頭 (B24、B57) 含まれている。これらの値を除いて平均値を算出すると、黒毛和種は 5.5 ± 8.54 CFU/cm² (CV=1.56)、褐毛和種は 14.7 ± 6.36 CFU/cm² (CV=0.43) となった。褐毛和種は、D 施設で採材の褐毛和種 2 頭 (B3、B56 の値がやや高い値ではあるが、黒毛和種はほかの種類牛とはほぼ同様な値となった。

施設別の生菌数の結果を表 1-8 に示す。A 施設は、36 頭中の 13 頭から生菌数が検出されず、生菌数非検出の頭数が最も多かった。検出した生菌数も最も少なく 0.5 ± 0.95 CFU/cm² であった。採材期間を通して、平均生菌数が最も多かった施設は D 施設であった。平均生菌数は 43.9 ± 124.58 CFU/cm² であり、100 CFU/cm² を超える頭が 4 頭あった。この施設の生菌数は採材月の 11 月から 2 月にかけて減少した。100 CFU/cm² を超えるウシは、11 月に 2 頭、12 月と 1 月に 1 頭ずつ検出されており、各月の生菌数は 88.3 ± 204.41 CFU/cm²、 33.0 ± 40.62 CFU/cm²、 18.6 ± 32.40 CFU/cm² であった。100 CFU/cm² を超えるウシの生菌数を除いた値で算出すると、それぞれ 13.7 ± 10.02 CFU/cm²、 15.8 ± 13.90 CFU/cm²、 7.5 ± 7.94 CFU/cm² となり、11 月から 2 月の平均生菌数も 13.4 ± 11.62 CFU/cm² となったが、他の施設に比較すると若干高い傾向である。

月別で算出した生菌数の結果を表 1-9 に示す。11 月から 2 月の平均生菌数は、 26.9 ± 117.44 CFU/cm² (CV=4.37)、 10.2 ± 26.08 CFU/cm² (CV=2.56)、 5.95 ± 15.29

CFU/cm² (CV=2.57)、 6.06 ± 9.89 CFU/cm² (CV=1.63) であり、月を追うごとに減少する傾向がみられるが、100 CFU/cm² を超えるウシが 11 月に 2 頭 (B19：黒毛和種および B24：褐毛和種、12 月に 1 頭 (B57、褐毛和種)、1 月に 1 頭 (B94、交雑種) が検出された。100 CFU/cm² を超えるウシの生菌数を除いた値で算出すると、11 月は 4.6 ± 7.61 CFU/cm² (CV=1.65)、12 月は 4.8 ± 9.46 CFU/cm² (CV=1.99)、1 月は 4.2 ± 7.47 CFU/cm² (CV=1.78) となり、2 月の生菌数の値に近い値であった。

(2) 血清群 0157 大腸菌の分離

定性的な検出 (図 1-1) のうち、検体を mTSB によって増菌培養し、STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR を行った結果を表 1-10 に示す。

リアルタイム PCR を行ったもののうち、Assay2 の 0157 遺伝子が陽性かつ、Assay1 の *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子がともに陽性であった検体は、B56 (2020 年 12 月 7 日に D 施設で採材した褐毛和種、30 か月、雄、去勢有) であり、Assay1 の *eae* 遺伝子のみ陽性であった検体は、B67 (2020 年 12 月 14 日に D 施設で採材した黒毛和種、29 か月、雄、去勢有) であった。

これらの検体増菌培養液を 3-3) による濃縮後、CT-SMAC 培地および CT-クロモアガー-STEC 培地に塗抹、培養し、生育したコロニーのうち血清群 0157 と疑われるコロニーを釣菌し、3-4) に従って 0157 のラテックス凝集試験を行い、リアルタイム PCR の Assay1 および Assay2 を実施した。

また、定量的な検出 (図 1-2) も同時に行った。4-1) および 4-2) に従って MPN 測定およびリアルタイム PCR を行った

結果を表1-11に示す。MPN測定で濁りの認められたチューブ3本に対して、リアルタイムPCRのAssay1およびAssay2を実施したが、全て陰性であったため、定量試験は終了した。

検体B56では、釣菌した33コロニーのうち3コロニーは*stx*遺伝子、*eae*遺伝子、0157遺伝子ともに陰性であったが、30コロニーは*stx*遺伝子、*eae*遺伝子、0157遺伝子ともに陽性であった。また、これら30コロニーは、血清型0157:H7であった(表1-13)。検体B67は釣菌した3コロニーすべて*stx*遺伝子、*eae*遺伝子、0157遺伝子ともに陰性であった。

(3) 0157以外の血清群の大腸菌の分離

「(2) 血清群0157大腸菌の分離」と同様に、定性的な検出(図1-1)として、検体をmTSBによって増菌培養し、STEC7血清群のマルチプレックスリアルタイムPCRを行った結果を表1-10に示す。

リアルタイムPCRを行ったもののうち、16SrRNA遺伝子(Assay2)が陽性かつ、Assay1の*stx*遺伝子および*eae*遺伝子が共に陽性であった検体は、検体B1(2020年11月9日にD施設で採材したホルスタイン、92か月、雌、産経有)および検体B3(2020年11月9日にD施設で採材した褐毛和種、43か月、雌、産経有)、検体B21(2020年11月16日にD施設で採材した黒毛和種、30か月、雄、去勢有)、検体B24(2020年11月23日にD施設で採材した褐毛和種、29か月、雄、去勢有)、検体B88(2021年1月12日にA施設で採材したホルスタイン、20か月、雄、去勢有)、検体B120(2021年1月19日にF施設で採材した交雑種、26か月、雄、去勢無)、検体B130(2021年1月25日

にB施設で採材した黒毛和種、28か月、雄、去勢有)、検体B148(2021年2月1日にA施設で採材したホルスタイン、19か月、雄、去勢有)の8検体であった(表1-10)。これらの検体には、Assay3、4、5を行った。

その結果、検体B3はAssay5の0103遺伝子、検体B120はAssay4の045遺伝子が陽性であったため、各検体の増菌培養液を「(2) 血清群0157大腸菌の分離」と同様に、各血清群の免疫磁気ビーズによる濃縮法を行い、得られた濃縮液をCT-SMAC培地およびCT-クロモアガー-STEC培地に塗抹し、培養した。これらの培地に生育したコロニーを釣菌し、検体B3には0103血清、検体B120には045血清で凝集試験を行い、検体B3にはAssay1、2、5、検体B120にはAssay1、2、4を行った。

検体B3では、釣菌した10コロニーのうち、5コロニーは*stx*遺伝子、*eae*遺伝子、0103遺伝子いずれも陰性であり、残りの5コロニーは*eae*遺伝子および0103遺伝子で陽性であったが、*stx*遺伝子が陰性であったため、検体B3は0103陰性と判定した。

検体B120では、釣菌した18コロニーのうち、1コロニーで*stx*遺伝子および*eae*遺伝子ともに陽性であるが045遺伝子は陰性、3コロニーで*eae*遺伝子陽性あるが*stx*遺伝子および045遺伝子はともに陰性、14コロニーで*stx*遺伝子、*eae*遺伝子、045遺伝子のいずれも陰性であったため、検体B120は045陰性と判定した。

検体B3は、凝集結果および0103遺伝子が陽性であったため、定量的な検出(図1-2)を行った。MPN測定および、これらのリアルタイムPCRの結果を表1-11に示す。MPN測定で濁りの認められたチューブ7本

に対して、Assay1 および Assay5 を実施したが、全て陰性であったため定量試験を終了した。

(4) *stx* 陽性および *eae* 陽性の 7 血清以外の菌株の分離

検体 B3、検体 B67 および検体 B120 の増菌培養後のリアルタイム PCR の結果を表 1-13 に示す。

検体 B3 の増菌培養した培養液のリアルタイム PCR の結果は、Assay1 の *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子、Assay5 の 0103 遺伝子が陽性であった (表 1-10) が、この 3 つの遺伝子がともに陽性である株は上述のように分離されなかった。そこで、「1) 検体の調製」で-80℃に保存してあった検体溶液から各遺伝子のいずれかが陽性である株の分離を検討した。-80℃に保存してあった検体溶液を増菌培養した培養液のリアルタイム PCR を行った結果は、表 1-10 と同様に *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子および 0103 遺伝子がいずれも陽性であった (表 1-13)。この増菌培養液を 3-3) および 3-4) に従って免疫ビーズ法で濃縮後、4 つの選択培地に塗抹し、出現した約 730 コロニーに関して 3-5) に従ってリアルタイム PCR の Assay1 および Assay5 を行った。陽性コロニーを 3-6) に従って単離を行った。単離コロニーを 3-7) に従ってリアルタイム PCR の Assay1 および Assay5 で確認を行うとともに、3-8) に従って生化学性状試験を行った。この結果、TSI および LIM 培地において大腸菌であると判定されたコロニーを保存株とし、*stx*(-)/*eae*(+)/0103(+) の 9 株、*stx*1(+)*stx*2(-)/*eae*(-)/0103(-) の 5 株を保存した (表 1-13)。

検体 B67 は、Assay1 の *eae* 遺伝子および

Assay2 の 0157 遺伝子が陽性であった (表 1-10) が、-80℃に保存してあった検体溶液を増菌培養した培養液のリアルタイム PCR の結果は、0157 遺伝子のみが陽性であった。検体 B3 と同様に濃縮し、選択培地で増殖した 6 コロニーについて検討した結果、1 コロニーで *stx*(-)/*eae*(-)/0157(+) として検出された。このコロニーを検体 B3 と同様に非選択培地で単離し、リアルタイム PCR および生化学性状試験を行った結果、陽性であると判定されたため、この 1 株を保存した (表 1-13)。

検体 B120 は、Assay1 の *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子、Assay4 の 045 遺伝子が陽性であった (表 1-10) が、-80℃に保存してあった検体溶液を増菌培養した培養液のリアルタイム PCR の結果は、*stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子が陽性であった。検体 B3 と同様に濃縮し、選択培地で増殖した約 350 コロニーで検体 B3 と同様に検討した結果、2 コロニーで *stx*(-)/*eae*(+)/045(-) として検出された。これらのコロニーを検体 B3 と同様に非選択培地で単離し、リアルタイム PCR および生化学性状試験を行った結果、陽性であると判定されたため、これら 2 株を保存した (表 1-13)。

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

1) PBS 懸濁菌液での消毒液の効果

実験 1-1 では、検体牛肉に供する状態の菌液 (PBS 懸濁) の各消毒液の効果を検討した。消毒液に関しては対象とするすべての血清群について試験を行い、対照となる滅菌水に関しては、血清群 045、0121、0145、0157 について試験を行った。

この結果 (表 2-2)、全ての STEC の血

清株について、消毒液を添加では菌は検出されなかった。滅菌水の添加の場合は、血清群 045、0121、0145、0157 は、それぞれ 8.9 ± 0.02 、 9.0 ± 0.04 、 8.7 ± 0.54 、 8.7 ± 0.05 log CFU/mL であった。

2) TSB 懸濁菌液での消毒液の効果

さらに、豊富に有機物を含む TSB に再懸濁して各消毒液の効果を検討した。有機物による消毒効果の低減を考慮したためである。消毒液および対照となる滅菌水に関してすべての血清群について試験を行った。

この結果(表 2-2)、「1) PBS 懸濁」と同様に、全ての STEC の血清株について、消毒液を添加では菌は検出されなかった。滅菌水の添加の場合は、血清群 026、045、0103、0111、0121、0145、0157 は、それぞれ 9.0 ± 0.08 、 8.9 ± 0.05 、 8.8 ± 0.08 、 8.8 ± 0.08 、 8.9 ± 0.05 、 8.9 ± 0.01 、 8.9 ± 0.06 log CFU/mL であった。

最も低い濃度で菌が検出されなかったことから、試験に用いるすべての消毒液に消毒効果があることが確認された。

(2) 消毒液の肉汚染 STEC への効果の検証

STEC を PBS に再懸濁し接種した汚染牛肉に対する消毒効果を検討した。噴霧効果による検証では、噴霧による消毒を行った。1 回あたりの噴霧量は表 2-1 にあるように、いずれの消毒液も約 0.8 mL である。

1) 消毒液 2 回噴霧の効果

過酢酸に関しては「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の 5 倍濃度 (500 ppm) で、次亜塩素酸ナトリウムに関しては 6 倍濃度 (600 ppm) で、計算上「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の菌液あたりの消毒効果は 1.6 倍と 0.96 倍と見積もられる。

すべての血清群に関して、過酢酸の 500 ppm と 1,000 ppm、エタノールおよび対照となる滅菌水の噴霧を行った。この結果、過酢酸(表 2-3)の 500 ppm では TSA は $7.2 - 7.4$ log CFU/片、クロモアガー STEC は $7.1 - 7.3$ log CFU/片であり、1,000 ppm では TSA は $7.2 - 7.5$ log CFU/片、クロモアガー STEC は $7.0 - 7.3$ log CFU/片であり、滅菌水(表 2-6)では TSA は $7.3 - 7.6$ log CFU/片、クロモアガー STEC は $7.3 - 7.8$ log CFU/片であり、対照となる滅菌水と消毒液での差は認められなかった。

次亜塩素酸ナトリウムに関しては、高濃度(300ppm および 600ppm)について、0103 と 0157 で試験を行った。この結果、次亜塩素酸ナトリウム(表 2-4)の 300 ppm では、0103 の TSA は 7.5 ± 0.10 log CFU/片、クロモアガー STEC は 7.5 ± 0.28 log CFU/片であり、0157 の TSA は 7.5 ± 0.08 log CFU/片、クロモアガー STEC は 7.4 ± 0.14 log CFU/片であり、600 ppm では、0103 の TSA は 7.5 ± 0.05 log CFU/片、クロモアガー STEC は 7.4 ± 0.18 log CFU/片であり、0157 の TSA は 7.3 ± 0.10 log CFU/片、クロモアガー STEC は 7.3 ± 0.15 log CFU/片であった。これらの値は対照となる滅菌水とほぼ同じであり、過酢酸と同様に、消毒効果は認められなかった。

エタノールでは、2 回噴霧(約 1.6 mL)

「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の 0.32 倍の消毒効力と見積もられる。対象とした全ての血清群について試験を行った。この結果(表 2-5)、検出された菌数は TSA で $7.3 - 7.4$ log CFU/片、クロモアガー STEC で $7.2 - 8.1$ log CFU/片であった。これらの値は対照となる滅菌水とほぼ同じで

あり、過酢酸、次亜塩素酸ナトリウムと同様に、消毒効果は認められなかった。

2) 消毒液 10 回噴霧の効果

10 回噴霧の量は、「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の 1.3 倍の消毒液量を菌体に接触させる計算となる。過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムで最も高い濃度（それぞれ、1,000 ppm と 600 ppm）に関して、0157 で試験を行った。この結果、過酢酸 1,000 ppm（表 2-3）では TSA は 7.3 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 7.2 log CFU/片であり、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm（表 2-4）では TSA およびクロモアガーSTEC はともに 7.4 log CFU/片であった。いずれの場合も「1) 消毒液 2 回噴霧の効果」とほぼ同じ値であり、消毒効果は認められなかった。

そこで、牛肉片の状態および菌液の浸透状態を考慮し、枝肉に類似するように筋に沿った切り方の肉片で、過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムで最も高い濃度（それぞれ、1,000 ppm および 600 ppm）、エタノール、滅菌水で同様な 10 回噴霧による消毒を試みた。この結果、過酢酸 1,000 ppm（表 2-3）では TSA は 7.3 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 7.2 log CFU/片、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm（表 2-4）では TSA は 7.0 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 6.9 log CFU/片、エタノール（表 2-5）では TSA は 7.2 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 7.1 log CFU/片、対照となる滅菌水（表 2-6）では TSA は 7.2 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 7.3 log CFU/片の菌数が検出された。対照となる滅菌水と各消毒液の値はほぼ同じであり、消毒効果は認められなかった。

3) 消毒液浸漬の効果（浸漬）

これは、「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の 10 倍量の消毒液に菌体を接触させる計算であり、汚染検体のほぼ倍量の消毒液に検体を浸漬させる試験である。すべての消毒液の全濃度に関して、0157 を用いて試験を行った。この結果、過酢酸（表 2-3）の TSA では 100、200、500、1,000 ppm でそれぞれ 7.0、6.9、6.8、6.7 log CFU/片、クロモアガーSTEC ではそれぞれ 7.1、6.9、6.8、6.7 log CFU/片であり、濃度が高くなるにつれ菌の検出数が低くなる傾向が見られた。次亜塩素酸ナトリウム（表 2-4）の TSA では 100、200、300 ppm はともに 7.1 log CFU/片、600 ppm は 7.0 log CFU/片であり、クロモアガーSTEC では 100 および 200 ppm はともに 7.1 log CFU/片、300 ppm は 7.0 log CFU/片、600 ppm は 6.9 log CFU/片であった。最も高い濃度（600 ppm）でも過酢酸の 100 および 200 ppm とほぼ同様の菌数であったが、濃度が高くなるにつれ菌の検出数が若干低くなる傾向が見られた。

エタノール（表 2-5）では TSA およびクロモアガーSTEC はともに 6.8 log CFU/片であり、過酢酸の 500 ppm とほぼ同様の菌数であった。この値は次亜塩素酸ナトリウムの最も高い濃度（600 ppm）より若干低い値である。

対照となる滅菌水（表 2-6）では TSA は 7.2 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 7.0 log CFU/片であり、「1) 消毒液 2 回噴霧の効果」と同様に接種菌液の菌数とほぼ同じであった。

検体の倍量の消毒液に検体を浸漬させた場合、高濃度の過酢酸およびエタノールで、

若干の消毒効果が見られた。

4) 消毒液かけ流しの効果 (かけ流し)

「1) 消毒液2回噴霧の効果」、「2) 消毒液10回噴霧の効果」および「3) 消毒液浸漬の効果 (浸漬)」の結果を踏まえて、菌体が消毒液と接触する量をさらに増やし、

「(1) 消毒液の STEC への直接効果の検証」の20倍量の消毒液を菌体に接触させた。さらに、消毒液に菌体を留めることによる消毒効果の低減を避けるため、菌体の洗い流しによる除去効果を狙って、消毒液によるかけ流しを行った。また、乾燥による殺菌効果も期待し、消毒終了5分後および1時間後で菌数の測定を行った。過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムでは最も高い濃度 (それぞれ、1,000 ppm および 600 ppm) および対照となる滅菌水について、0157 で試験を行った。

かけ流し5分後の結果は、過酢酸 1,000 ppm (表2-3) では TSA は 5.4 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 5.5 log CFU/片であり、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm (表2-4) では TSA およびクロモアガーSTEC はともに 5.8 log CFU/片であり、対照となる滅菌水では TSA は 6.1 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 6.0 log CFU/片であった。いずれの場合も接種菌液より約1桁の減少がみられた。

かけ流し1時間後の結果は、過酢酸 1,000 ppm (表2-3) では TSA は 5.7 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 5.6 log CFU/片であり、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm (表2-4) では TSA とクロモアガーSTEC はともに 5.9 log CFU/片であり、対照となる滅菌水では TSA は 5.8 log CFU/片、クロモアガーSTEC は 5.9 log CFU/片であり、1時間後

の菌数は、過酢酸、次亜塩素酸ナトリウム、滅菌水において検出菌数の差はみられず、また、1時間後の方が、5分後の値より、若干高い傾向があった。

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)。

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)。

今回、STEC 0157 の検出されたウシの糞便中の STEC の有無の調査をしていないため生体の保菌について不明だが、調査すれば有益と考えられる。また、この検体の生

菌数は、他の検体に比較して1から2桁高かったこと(表1-8)から、と畜段階の環境の影響の可能性も考えられる。

季節性に関しては、ウシのSTEC 0157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, 12)。今回は、サンプリング期間が冬季の連続した4か月であったが、月別の生菌数の変動(表1-9)はみられなかった。今後は、他の季節での調査を行う必要がある。

2. 牛肉の消毒効果の検討

検証を行った消毒液の特徴として、過酢酸は、すべての微生物に対して即効性を有することである(25)。特有な特徴として、分解生成物は、酢酸、水、酸素、過酸化水素であり、有害な分解生成物が生じないことであり、残留物が残らない、有機物の除去が促進されること(26)などがあげられる。銅、真鍮、青銅、普通銅、亜鉛メッキ鋼板を腐食させるが、腐食作用は、添加物やpH調製剤により抑制できる。希釈した場合は、不安定であるとされ、1%溶液の濃度は加水分解により6日間で半減するが、40%過酢酸の有効成分の減少は1か月あたり1-2%である(27)。

作用機序については、ほとんどわかっていない(25)が、他の酸化剤と同様に、タンパク質を変性させる、細胞壁の透過性を変化させる、酵素やほかの代謝物のスルフヒドリル基および硫黄結合を酸化させるなど(27)といわれている。殺菌作用として、グラム陽性およびグラム陰性菌、真菌、および酵母を100 ppm未満、5分以内で不活性化する。有機物の存在下では200から500 ppmが必要である

次亜塩素酸塩は、最も広く使用されている塩素消毒液あり、次亜塩素酸ナトリウムのような液状のものと次亜塩素酸カルシウムなどの固形のもの市販されている。もっとも普及している塩素製品は、次亜塩素酸ナトリウム水溶液の「ブリーチ」と称された家庭用漂白剤である。特徴として、広域スペクトルの抗菌活性があり、有毒な残渣を残さない、水の硬度に影響されない、安価で即効性がある(28)、乾燥または固着した微生物やバイオフィルムを表面から除去できる(29)、重大な毒性率が低い(30、31)であるが、高濃度(>500 ppm)での金属に対する腐食性、有機物による不活性化、漂白作用、アンモニアまたは酸との混合による有毒ガスの発生(20、21)、相対的安定性があること(22)などは、欠点としてあげられる。

塩素性の殺菌作用の大部分は非解離型次亜塩素酸(HClO)によるものであり、HClOの解離は、pHに依存しているため、塩素の消毒効果は、pHが上昇するとともに低下する(24、25)。微生物に対する正確な作用機序は明らかにされていない(25)が、微生物の不活性化はいくつもの要因によって、あるいは重要部位への作用によって生じると考えられている(23)。スルフヒドリル基やアミノ基の酸化、アミノ酸環の塩素置換、細胞成分の減少、栄養分の取り込み低下、呼吸成分の酸化、ATPの産生減少、DNA損傷、DNA合成の抑制などである(24、23)。

低濃度の遊離塩素は、有機負荷がない場合、栄養型の細菌(5 μm未満)は数秒で殺菌作用を示す(24、26)。AOACの使用希釈倍率法による100 ppmの遊離塩素(6%次亜塩素酸ナトリウムを含む家庭用漂白剤では60

倍希釈に相当) によって、 10^6 - 10^7 の黄色ブドウ球菌、*Salmonella choleraesuis*、緑膿菌は10分未満で死滅する(22)。

消毒薬としてのアルコールは、エチルアルコール(エタノール)とイソプロピルアルコールであり、栄養型細菌に対しては迅速な殺菌作用を示すが、殺菌活性は50%以下の濃度に希釈した場合急激に低下し、至適殺菌濃度は60から90%水溶液(v/v)である(27、28)。エタノールの殺菌活性はさまざまな濃度で調査され(27)、緑膿菌は30-100%(v/v)で、セラチア、大腸菌、チフス菌は40-100%によって、10秒で死滅した。グラム陽性球菌はわずかに抵抗性があり、65-95%によって10秒で死滅した。

アルコールの作用機序としては、タンパク質の変性が妥当な説明である(25)。これは、無水エタノールや脱水剤より、水の存在下の方が急激に変性すること(28、29)からも裏付けられる。

このような知見を踏まえ、「(1)消毒液のSTECへの直接効果の検証」を過酢酸および次亜塩素酸ナトリウムは100 ppmで、エタノールは市販の使用濃度で行った。この結果、有機物を含まないPBS懸濁菌液および有機物を含有するTSB懸濁菌液、ともに検討したすべての菌液でSTECは死滅した。次亜塩素酸ナトリウムは、有機物による効力の低下があるとされ、エタノールは希釈による効果の低減が言われているが、今回の有機物濃度や希釈倍率では、利用したすべての消毒薬への効力低減の影響はなく、従来の知見と合致した。

過酢酸製剤の食品に対する使用基準(30)は、過酢酸では「鶏の食肉にあつては浸漬液又は噴霧液1 kgにつき2.0 g(2,000 ppm)

以下、牛および豚の食肉にあつては浸漬液又は噴霧液1 kgにつき1.80 g(1,800 ppm)以下、果実および野菜にあつては浸漬液又は噴霧液1 kgにつき0.080 g(800 ppm)以下」である。そこで、本研究では1,000 ppmを上限とし、100、200、500、1,000 ppmを使用濃度とした。

次亜塩素酸ナトリウムの食品に対する使用基準は「ごまに使用してはならない。」(30)とされるだけであり、濃度の基準はない。医療現場では、5.25-6.15%の市販品を10から100倍に希釈して利用し、手指に対しては500 ppmを上限に使用されている。牛肉表面の殺菌を目的としたSally et al.(2012)の試験では600 ppmを上限として行っているため、本研究では600 ppmを上限とし、100、200、300、600 ppmを使用濃度とした。

消毒液の噴霧効果として、まず、高濃度消毒液2回噴霧である「(1)消毒液2回噴霧の効果」を行ったが、いずれの消毒液でも滅菌水との差は認められなかった(表2-3から4)。そこで、噴霧回数を10回に増やした「(2)消毒液10回噴霧の効果」を行った。この場合、消毒液の効力は「(1)消毒液のSTECへの直接効果の検証」と比較して、過酢酸1,000 ppmでは16倍、次亜塩素酸ナトリウム600 ppmでは9.6倍、エタノールでは1.6倍に相当するが、いずれの場合も「(1)消毒液2回噴霧の効果」とほぼ変わりがなく、消毒効果は認められなかった(表2-3から4)。なお、細菌懸濁液の浸透の程度を考慮し、牛肉の筋に沿った切り方、また、処理後の時間配分を変えた場合でも、同様に効果は認められなかった(表2-3から4)。

これらの結果から、噴霧ではなく、食鳥処理場等においてカンピロバクターの汚染低減策（31）で試みられた消毒液への浸漬による効果「3）消毒液浸漬の効果（浸漬）」を検討した。消毒液の量は菌液に対して「（1）消毒液の STEC への直接効果の検証」の 10 倍量としたため、菌液当たりの消毒効力は「（1）消毒液の STEC への直接効果の検証」と比較して、過酢酸 200、500、1,000 ppm では、それぞれ 20、50、100 倍、次亜塩素酸ナトリウム 300、600 ppm では、それぞれ 30、60 倍、エタノールでは 10 倍に相当する。この結果、過酢酸では 200 ppm でわずかに減少の傾向がみられ、濃度が高くなるほど減少する傾向が見られた（表 2-3）。次亜塩素酸ナトリウムでも、300 ppm より 600 ppm の方が減少する傾向がみられた（表 2-4）。エタノールでも減少する傾向が見られ、浸漬効果はあることが考えられた（表 2-5）。

有機物の影響が大きいと考えられる次亜塩素酸ナトリウムは、浸漬では牛肉による有機物の影響が大きいと考え、多量の消毒液を掛け流すことによる効果を検証した。

「3）消毒液浸漬の効果（浸漬）」との比較のため、過酢酸 1,000 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 600 ppm で行い、掛け流す量は「3）消毒液浸漬の効果（浸漬）」の倍量とした。この結果、いずれの場合も、「3）消毒液浸漬の効果（浸漬）」の細菌残存数より 1 桁低い値となった（表 2-3 と 2-4）。

以上のことから、今回のようなスモールスケールでは、エタノールの消毒効力最も高い傾向であり、次亜塩素酸ナトリウムが今回使用した諸毒薬の中では最も有機物の影響を受けやすい結果であった。消毒液の

接触手法は、かけ流しによる効果が最も効果的であったが、消毒液の量が影響しているのか、接触のさせ方の影響であるのかは今回の結果からは結論できない。

E. 結論

1. 牛枝肉の STEC 調査では、2020 年 11 月から 2021 年 2 月に 7 施設の協力のもとに牛枝肉合計 180 検体を供試した。検体を増菌培養後、マルチプレックスリアルタイム PCR 法、血清凝集試験および生化学的性状試験を併用し、同時に生菌数の計数を行った。この結果、1 検体から STEC O157: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 O157:H7 が分離された検体において生菌数が比較的高い値を示した。また、全体として検体の生菌数は、15% で検出されず、検出された検体では平均値 17.5 ± 63.50 (平均 \pm SD) CFU/cm² であった。施設による生菌数の違いがあり、ウシや環境状況の要因の可能性が考えられた。今回は冬でのサンプリングであったが、今後、他の季節についての調査も必要と考えられた。

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、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、生理食塩水や液体培地中の STEC 浮遊液での消毒効果を検証した。結果として、十分な消毒効果が認められ、STEC 接種牛肉においても消毒液の量を増やすことにより菌数は減る傾向が認められた。今後、さらに消毒方法の検討を行う予定である。

【 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. 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.
13. 医療施設における消毒と滅菌のための CDC ガイドライン 2008 満田 年宏 訳 ヴァン メディカル 2009年3月1日初版

14. Tucker RC, Lestini BJ, Marchent RE. Surface analysis of clinically used expanded PTFE endoscopic tubing treated by the STERIS PROCESS. *ASAIO J.* 1996; 42: 306-13
15. Block SS. Peroxygen compounds. In: Block SS, ed. *Disinfection sterilization, and preservation.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 185-204.
16. Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10: 597-610.
17. Merritt K, Hitchins VM, Brown SA. Safty and cleaning of medical materials and devices. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 53:131-6.
18. Jakobsson SW, Rajs J, Jonsson JA, Persson H. Poisoning with sodium hypochlorite solution. Report of a fatal care, supplemented with an experimental and clinic-epidemiological study. *Ann. J. Forensic Med. Pathol.* 1991; 12: 320-7.
19. Hoy RH. Accidental systemic exposure to sodium hypochlorite (Clorox) during hemodialysis. *Am. J. Hosp. Pharm.* 1981; 38: 1512-4.
20. Mrvos R, Dean BS, Krenzelok EP. Home exposures to chlorine / chloramine gas: review of 216 cases. *South Med. J.* 1993; 86: 654-7.
21. Gapanavicius M, Yellin A, Almog S, Tirosh M. Pneumomediastinum. A complication of chlorine exposure from mixing household cleaning agents. *JAMA* 1982; 248: 349-50.
22. Rutala WA, Cole EC, Thomann CA, Weber DJ. Stability and bacterial activity of chlorine solutions. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 1998; 19: 323-7.
23. Gerba CP, Rusin P. Relationship between the use of antiseptics/disinfection and the development of antimicrobial resistance. In: Rutala WA, ed. *Disinfection, sterilization and antisepsis: principles and practices in healthcare facilities.* Washinton, DC: Association for Professional in Infection Control and Epidemiology, 2001: 187-94.
24. Rutala WA, Cole EC, Thomann CA, Weber DJ. Stability and bacterial activity of chl Dychdala CR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS, ed. *Disinfection sterilization, and preservation.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 135-157
25. Hoffman PN, Death Coaters D. The stability of sodium hypochlorite solution. In: Collins CH, Allwood MC, Bloomfield SF, Fox A. eds. *Disinfections: their use and evaluation of effectiveness.* London: Academic Press, 1981: 77-83.

26. Lee DH, Miles RJ, Perry BF. The mycoplasmacidal properties of sodium hypochlorite. J. Hyg. (Lond). 1985; 95: 243-53. なし
27. Morton HE. The relationship of concentration and germicide efficiency of ethyl alcohol. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1950; 53: 191-96.
28. Ali Y, Dolan MJ, Fender EI, Lason EL. Alcohols. In: Block SS, ed. Disinfection sterilization, and preservation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 229-54.
29. Morton HE. Alcohols. In: Block SS, ed. Disinfection sterilization, and preservation. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983: 225-239.
30. 厚生省 (1959) 食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号)
31. 厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課 (2019) 厚生労働科学研究補助金事業および食鳥肉の汚染低減実証事業により得られた食鳥処理工程における微生物汚染低減策に関する事例集

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