

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、牛の筋肉を対象として13分析法（チルミコシン分析法、スルファモイルダプソン分析法、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、エンロフロキサシン（シプロフロキサシンとの和）分析法、フロルフエニコール分析法、トリクラベンダゾール分析法、サリノマイシン及びモネンシン分析法、トルトラズリル分析法、ペルメトリン分析法、HCB分析法、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、クロルデン及びノナクロル分析法、PCB分析法）を確立し、これらの分析法の妥当性評価試験を実施した。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。本研究で確立した分析法を用いることにより、B物質が牛のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに牛の筋肉（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。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、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。

研究分担者

志田(齊藤)静夏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部主任研究官)

工藤由起子(国立医薬品食品衛生研究所
衛生微生物部部長)

研究協力者

(一財)日本食品分析センター

飯塚誠一郎((一財)日本食品分析センター)

中村歩((一財)日本食品分析センター)

小杉正樹((一財)日本食品分析センター)

伊佐川聡((一財)日本食品分析センター)

豊岡大輔(北海道保健福祉部健康安全局食品
衛生課)

東海林明子(十和田食肉衛生検査所検査第二
課)

高橋むつみ(十和田食肉衛生検査所検査第三
課)

山口健一(秋田市食肉衛生検査所)

大迫英夫(熊本県食肉衛生検査所)

千葉由美、都丸亜希子、毛利拓子、廣瀬昌平
(国立医薬品食品衛生研究所)

A. 研究目的

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

EUに動物性食品を輸出するためには、欧州理事
会指令 96/23/EC および規則(EU)2017/625
に従って作成した残留物質モニタリング計画に基
づき、A物質(スチルベン類、抗甲状腺薬、ステロ
イド類、レゾルシン酸ラクトン類、 β -作動薬、
Council Regulation (EEC) 2377/90 AnnexIV に掲
げられた禁止物質(クロラムフェニコール、ニトロフ
ラン類、ニトロイミダゾール等))及び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、カルバマゼート系農薬、ピレスロイド系
農薬、有機塩素系農薬、PCB、有機リン系農薬、

重金属・有害元素、マイコトキシン)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A
物質がモニタリング部位から検出された場合は、原
因等を調査して必要な措置をとるまでの間、EUへ
輸出することはできない。一方、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。このため、B
物質についてはモニタリング部位を対象とした分
析法に加え、筋肉を対象とした分析法も必要とな
る。しかしながら、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、モニタリング検査
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した。令和2
年度(1年目)は、B物質のうち、牛においてモニ
タリング部位が肝臓又は腎臓の物質(抗菌性物質
(チルミコシン等の6項目)、駆虫剤(トリクラベン
ダゾール)、抗コクシジウム剤(モネンシン等の3
項目)、ピレスロイド系農薬(ペルメリン)及び有機塩
素系物質(HCB等の15項目))について、牛の筋
肉を対象とした分析法を確立し、妥当性評価を実
施した。

牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研 究

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防止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.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て 13 分析法であるチルミコシン分析法、スルファモイルダプソン分析法、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、エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)分析法、フロルフエニコール分析法、トリクラベンダゾール分析法、サリノマイシン及びモネンシン分析法、トルトラズリル分析法、ペルメリン分析法、HCB 分析法、DDT、アルドリ、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、クロルデン及びノナクロル分析法、PCB 分析法の確立と妥当性評価を行った。実験方法の詳細は研究分担者 志田(齊藤)静夏の分担報告書に記載した。

2.牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

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・定量的検出を行った。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った。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た。また牛肉での効果を予備的に検証した。実験方法の詳細は研究分担者 工藤由起子の分担報告書に記載した。

C. 研究結果及び考察

1.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。

- ①抗菌性物質(チルミコシン分析法、スルファモイルダプソン分析法、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、エンロフロキサシン(シプロフロキサシンとの和)分析法、フロルフエニコール分析法)
- ②駆虫剤(トリクラベンダゾール分析法)
- ③抗コクシジウム剤(サリノマイシン及びモネンシン分析法、トルトラズリル分析法)
- ④ピレスロイド系農薬(ペルメリン分析法)
- ⑤有機塩素系物質(HCB 分析法、DDT、アルドリ、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、クロルデン及びノナクロル分析法、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。

2. 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

生菌数が検出されない 27 頭を除いた 153 頭の生菌数は 17.5 ± 63.50 (平均 \pm SD) CFU/cm² であり変動係数 (CV) = 3.62 であった。ウシの種類別の生菌数、施設別の生菌数、月別で算出した生菌数、STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR、定量的な検出である MPN 測定およびリアルタイム PCR、検体増菌培養後のリアルタイム PCR の結果を算出した。

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、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。

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、 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 未満であった。牛枝肉汚染および牛糞中の含有率は相関がある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、未經産牛 (1 歳以上の動物) は保菌率が低く、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。

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。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。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。

作用機序については、ほとんどわかっていないが、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のような液状のものと次亜塩素カルシウムなどの固形のものが市販されている。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、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、重大な毒性率が低いであるが、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、相対的安定性があることなどは、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(HOCl)によるものであり、HOCl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。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。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。

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 μ m未満)は数秒で殺菌作用を示す。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。

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。エタノールの殺菌活性はさまざまな濃度で調査され、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。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、従来知見と合致した。

過酢酸製剤の食品に対する使用基準は、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。」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。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。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。

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。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。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。

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。

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。

D. 結論

1. 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て B 物質の分析法 (13 分析法) を確立し、妥当性評価試験を実施した。その結果、いずれの分析法も良好な結果 (真度、併行精度、室内精度及び選択性) が得られ、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。本研究で確立した分析法を用いることにより、B 物質が牛のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに牛の筋肉 (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。

2. 牛肉の STEC 汚染リスク低減に関する研究

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 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。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。

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、さらに消毒方法を検討を行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

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 (印刷中)

2. 学会発表

志田（齊藤）静夏、柏原 奈央、根本 了、穂山 浩. 畜産物中のチアムリン試験法の開発. 第57回全国衛生化学技術協議会年会、令和2年11月9日～令和2年11月10日

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし