

II.総合分担研究報告

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク 低減に関する研究

令和5年度～令和7年度

研究分担者 工藤由起子
星薬科大学

令和 5～7 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強化に資する研究

研究代表者 穂山 浩(星薬科大学)

総合分担研究報告書

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

研究分担者 工藤由起子 星薬科大学

研究要旨

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査では、令和 5 年度は 5 施設の協力のもとに集収した牛枝肉培養液を STEC 7 血清群(026、045、0103、0111、0121、0145、0157)については 40 検体およびサルモネラ属菌については 86 検体を試験に供試したが、いずれも検出されなかった。続いて、令和 6 年度および令和 7 年度は 3 施設の協力のもとに集収した枝肉密着ガーゼ検体合計 255 検体を試験し、サルモネラ属菌が 1 検体から検出され、血清型は Dublin であった。しかし、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。なお、STEC7 血清群は検出されなかった。検体採取としては、ガーゼを枝肉に密着させて回収の方が検出感度が優れる可能性が示された。また、生菌数についても測定を行ない、施設や月ごとに解析した。2. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査では、STEC 検査およびサルモネラ検査において、遺伝子検査での判定時のトラブルを改善する必要があると考えられた。3. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行では、菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出を実施した。また、使用マニュアルを作成したので、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられる。

研究協力者(*STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査についてのみ協力)

北海道帯広食肉衛生検査所*	鈴木竹彦、松本斉子
岩手県食肉衛生検査所	久松暢子、北村洸人、阿部嘉智、遠藤裕美
岐阜県飛騨食肉衛生検査所	越 勝男
栃木県食肉衛生検査所	関口明子、永島琴美、田中倭恵
京都市衛生環境研究所食肉検査部門*	川見明日香
姫路市食肉衛生検査センター*	橋本朋美
熊本県食肉衛生検査所	小林将英
大分県食肉衛生検査所	渡邊春香、吉田史子
宮崎県高崎食肉衛生検査所*	越野慶太

国立医薬品食品衛生研究所
日本フードパッカー株式会社
星薬科大学薬学部

廣瀬昌平、千葉由美

天野壮俊、鏡山雅人、本多加衣、内場健朝、
伊藤彩花、佐伯英莉衣、佐藤菜々美、森谷悠衣、
大塚佳代子、奥 輝明、築地 信

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、米国への輸出においては、米国の示す腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*; STEC）およびサルモネラ属菌の検査が必要である。対米輸出食肉取扱施設や食肉検査所では、牛肉の腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌の検査を輸出先国の試験法で実施している。本研究では、一定の方法で腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌が陽性ではない検体でも汚染リスクが潜むことを考え、より精度高く腸管出血性大腸菌およびサルモネラ属菌の検出指標を変えて検体の汚染リスクを検討した。令和 5 年度には、各食肉衛生検査所での牛肉検体培養液を研究班に送付とした。しかし、陽性検体は認められなかったため、令和 2 年度から 4 年度に実施した各食肉衛生検査所で滅菌ガーゼを枝肉表面に密着させて回収する方法で複数検体から腸管出血性大腸菌 0157 が分離されたことを参照し、令和 6 年度および令和 7 年度は滅菌ガーゼを密着させ回収したものを検体とした。結果について、処理工程の改善検討等に役立てられることを期待して、即時にフィードバックすることとした。

また、対米輸出食肉取扱施設では輸出先国の試験法の標準作業手順書（SOP）を作成するが、緻密な試験への経験や知識の必要性や慢性的な人員不足による記載事項の再確認や再検討など精査が不足する傾向があり、試験法について高い専門性を有する者による客観的な検査体制の確認の機会が必要とされている。このため、本研究では、各検査所の SOP 収集および検査体制の聞き取り調査を実施し、対米輸出に必要な検査の逸脱防止を試みる。

さらに、対米輸出食品での試験法は、MLG 掲載 (<https://www.fsis.usda.gov/news-events/publications/microbiology-laboratory-guidebook>) または第 3 者認定を受けた方法 (https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/Validated-Test-Kit.pdf) が認められており、それらは国内試験法とは異なるため知識や手技の高度な習得が必要である。2024 年 9 月には、MLG 5C.04 (https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/documents/MLG-5C.04.pdf) の更新があり、特に、遺伝子スクリーニング法が変更になったため、その方法と第 3 者認定を受けた方法のうち国内流通可能な方法について、食肉衛生検査所での導入の参考になる試行を行った。

B. 研究方法

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

令和 5（2023）年 11 月から令和 8（2026）年 3 月に国内の食肉衛生検査所計 5 施設にて、ウシ計 455 頭からサンプリングを行った。

（1）と畜場での作業

令和 5 年度については、5 施設の STEC 試験培養液残液 40 検体およびサルモネラ試験培養液残液 86 検体を宅配便（冷蔵）によって国立医薬品食品衛生研究所へ、令和 6 年度および令和 7 年度については、滅菌リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に浸漬した 30 cm×30 cm サイズの滅菌ガーゼを枝肉に密着させ回収したガーゼ検体合計 255 検体を宅配便（冷蔵）によって星薬科大学へ送付した。

（2）STEC・サルモネラ属菌検出法および生菌数測定

1）検体の調製

食肉衛生検査所の培養液残液では、Tryptone soya broth (TSB) にて 42℃で 18 時間培養（二次増菌培養）し検体液とした。ガーゼ検体では、Modified tryptone soya broth (mTSB) 300 mL を加え、検体液とした。

2）生菌数測定

検体液を適宜 10 倍階段希釈し、標準寒天培地に塗抹し、37℃で 48 時間培養後、生菌数測定を行った。

3）定性的な STEC 7 血清群の検出

食肉衛生検査所の培養液残液およびガーゼ検体の増菌培養液（42±1℃で 15-24 時間）から DNA をアルカリ熱抽出した。この DNA 抽出液をマルチプレックスリアルタイム

PCR に用いた。STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR [Assay 1 (*stx/eae*) : ベロ毒遺伝子 (*stx* 遺伝子) およびインチミンタンパク質遺伝子 (*eae* 遺伝子)、Assay 2 (16S/0157) : 16SrRNA 遺伝子および 0157 遺伝子、Assay 3 (026/0111) : 026 遺伝子および 0111 遺伝子、Assay 4 (045/0121) : 045 遺伝子および 0121 遺伝子、Assay 5 (0103/0145) : 0103 遺伝子および 0145 遺伝子] の反応条件は、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。Assay 1、2 の結果、*stx* 陽性かつ *eae* 陽性の検体は、続けて Assay 3、4、5 を同時に行い、7 血清群 0 遺伝子が陽性になるかを確認し、陽性となった 0 血清型について免疫磁気ビーズ法を行った。なお、7 血清群 0 遺伝子が陽性にならなかった場合は STEC 7 血清群陰性とした。ビーズ濃縮液をセフィキシム・亜テルル酸 (CT) 添加クロモアガー STEC など培養し、疑わしいコロニーについては前述の STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR を行い、*stx* 陽性、*eae* 陽性かつ血清群 0 遺伝子が陽性のコロニーは、STEC 7 血清群陽性と判定した。さらに、0 血清型および H 血清型を血清凝集反応によって確認した。

4）サルモネラ属菌の検出方法

STEC 試験で調製したアルカリ熱抽出 DNA をサルモネラ属菌特異的 *ttr* 遺伝子を検出するリアルタイム PCR に用いた。反応条件は、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。*ttr* 遺伝子がない場合はサルモネラ属菌陰性とした。*ttr* 遺伝子が陽性だった検体の増菌培養液または培養液残液の

二次増菌培養液をテトラチオネート (TT) 培地および Rappaport-Vassiliadis R10 (RV) 培地に接種し、42℃で 18～24 時間培養した。それらを DHL 寒天培地および CHROMagar Salmonella にて培養し、典型的コロニーについては生化学的性状や血清型の試験を行なった。なお、典型的なコロニーが認められない場合は、陰性と判断した。さらに、サルモネラ属菌が分離されたガーゼ検体については、4℃で保存しておいた培養前の検体液を用いて、MPN 測定法 (3 本法) を行い、サルモネラ属菌の汚染菌数を測定した。

2. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

令和 5 年度には国内の対米輸出認定食肉取扱施設 9 ヶ所の協力を得て STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査を実施した。まず、各施設で使用している SOP を収集し、その内容について項目ごとに整理した。

3. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC 遺伝子スクリーニング方法についての試行

(1) 試薬キット

以下の 3 種類を供試し、各専用機器にて使用した。

①GENE-UP 試薬シリーズの STEC 検出キット 5 種 (bioMérieux [フランス] ビオメリュー・ジャパン国内対応)、②SureTect 試薬シリーズの STEC 検出キット 2 種 (ThermoFisherScientific[米国]、サーモフィッシャーサイエンティフィック国内対応)、③Molecular Detection Assay2 STEC Gene Screen(*stx* and *eae*) (Neogen[米国]、ネオジェンジャパン国内対応)

(2) 検体作製

1) 菌株および牛肉の培養

腸管出血性大腸菌 (血清群 026 : 2 株、045 : 1 株、0103 : 1 株、0111 : 1 株、0121 : 1 株、0145 : 1 株、0157 : 2 株) を Trypticase soy broth (TSB) 中にて 37℃で 18 時間培養した。また、市販の牛スライス肉を 9 倍量の mTSB 中にて 42℃で 18 時間培養した。

2) 菌希釈検体の作製

各菌株の培養液を滅菌 PBS にて 10^{-7} まで 10 倍階段希釈し、菌液を作製した。また、それら 10 倍階段希釈菌液を 9 倍量の牛肉培養液にて 10 倍希釈し、菌添加牛肉培養液を作製した。また、必要に応じて適宜希釈した。なお、PBS で希釈した 10^{-7} および 10^{-6} 希釈菌液 0.1 mL を TSA に塗抹し、37℃で 18 時間培養し、生育したコロニー数を測定し、菌液の菌数を算出した。

(3) 菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出

各キットの使用手順に従って、実施した。

(4) キット使用のためのマニュアル作成

食肉衛生検査所でのキット導入に必要な使用マニュアルを作成した。試薬構成、必要機材、キットの使用方法的動作詳細について写真を主にした初心者でもわかりやすい内容にした。

C. 研究結果

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

令和 5 年度には、検体培養液は STEC およびサルモネラ属菌のいずれも陰性であった。また、培養液のため、検体の生菌数測定の実施対象にはならなかった。

以下、令和 6 年度および令和 7 年度についての結果を取りまとめて示す。

(1) 生菌数

調査した検体 255 頭のうち 148 頭の検体から生菌が認められ、その平均は $52,682.2 \pm 363,333.6$ (平均 $\pm$ SD) CFU/cm²であった。雌雄で比較すると、オス計 131 頭では $34,336.9 \pm 286,848.7$ CFU/cm²であるのに対して、メス計 124 頭では $69,146.0 \pm 42,155.4$ CFU/cm²であった。ウシの種類別で比較すると、黒毛和種の平均値が $4,628,307.1 \pm 32,956,476.2$ CFU/cm²で最も多く、次いでホルスタイン、交雑種、日本短角種、褐色和種の平均値がそれぞれ $2,063.3 \pm 11,641.1$ CFU/cm²、 37.9 ± 105.0 CFU/cm²、 3.0 ± 3.0 CFU/cm²、 0.4 ± 0.1 CFU/cm²であった。施設別で比較すると、採材期間を通して、平均生菌数が最も多かった施設は B 施設であった。平均生菌数は $110,003.3 \pm 524,237.9$ CFU/cm²であった。次いで C 施設、A 施設の平均生菌数がそれぞれ $1,696.1 \pm 10,575.6$ CFU/cm²、 2.9 ± 8.5 CFU/cm²であった。月別で算出し比較すると、2025 年 7 月が最も高く $770,107.0 \pm 1,241,833.5$ CFU/cm²、次いで 2024 年 10 月が $8,859.0 \pm 26,511.3$ CFU/cm²であった。2025 年 7 月の平均生菌数が高いのは、B 施設の黒毛和種 3 頭が約 2,600,000 CFU/cm²であったことによる。さらに、2024 年 10 月の平均生菌数が高いのは、C 施設のホルスタイン 1 頭が約 80,000 CFU/cm²であったことによる。

(2) STEC7 血清群の分離

供試検体 255 検体のうち、増菌培養液が *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の両方が陽性となった 8 検体のうち 2 検体が STEC 7 血清群の 045 で陽性となり、それぞれ Ct 値は 29.7 (検体番号 24-105)、38.9 (検体番号 25-

107)であった。さらに、検体番号 24-105 の検体では、0121 も陽性となり、Ct 値は 36.0 であった。

(3) サルモネラ属菌の検出

増菌培養液が *ttr* 遺伝子陽性となった検体は 1 検体 (検体番号 24-27) で、CT 値は 35.6 であった。この検体は、10 月に黒毛和種のオス、30 ヶ月齢から採取されたものであり、その検体から *Salmonella* Dublin が分離された。検体の生菌数は 3.3 CFU/cm²、サルモネラ MPN は 3 未満/試験液 100mL であり、ガーゼ表面積 100 cm²あたり 0.33MPN 未満であった。

2. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

検体採取法は、全施設が N60 サンプリング法であり、遺伝子検出のための使用機器は、クオリバックス Q7 システムが 6 施設、RapidFinder が 3 施設だった。クオリバックス Q7 システムが 6 施設、RapidFinder が 3 施設だった。判定時のトラブルは、7 施設で認められ、陽性対照 DNA 溶液の偽陰性等が挙げられた。

3. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行

実施結果については、別途とりまとめた。また、各キットの使用マニュアルを作成し、作成時に厚生労働省に提出した。

D. 考察

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査

R6 年と R7 年において、本調査では牛枝肉からガーゼを用いた 255 検体および培養液残液 9 検体 (合計 108 検体) からは STEC は分離されなかった。リアルタイム PCR で *stx*

遺伝子、*eae* 遺伝子、045 血清群または／かつ 0121 血清群が陽性の検体あったが、該当する STEC は検出されなかった。より効果的な分離方法の検討が必要であると考えられる。

一方、255 検体中 1 検体から *Salmonella* Dublin が分離された。また、令和 2 年度から 4 年度の調査ではサルモネラ属菌は検出対象でなかったため、今回の調査で検出されたことは今後の牛肉の衛生管理において重要な対象となることが考えられる。ただし、今回のサルモネラ定量試験において、MPN 法により、検出限界以下であったことから、汚染濃度は低いことが推察される。

検体採取としては、令和 5 年度の各食肉衛生検査所の培養液を検体とした試験で陰性であったことから、ガーゼを枝肉に密着させて回収した検体を使用した方が感度が優れる可能性が示された。

生菌数は季節の影響が大きいと考えられた。1 月から 5 月の平均生菌数は、それぞれ $121.6 \pm 189.8 \text{ CFU/cm}^2$ 、 $22.7 \pm 40.7 \text{ CFU/cm}^2$ 、 $68.3 \pm 54.6 \text{ CFU/cm}^2$ 、 $25.4 \pm 13.4 \text{ CFU/cm}^2$ 、 $72.8 \pm 45.6 \text{ CFU/cm}^2$ であり、気温が低いと生菌数が低いことが認められた。

2. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

複数の項目において施設ごとに異なる点が認められた。STEC 検査およびサルモネラ検査において、クオリバックス Q7 システムおよび RapidFinder での判定時のトラブルが複数の施設で認められたため、今後検証を進め、改善策を提示する必要があると考えられた。

2. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行

供試したキットシリーズは、STEC7 血清群が効率的に検出できるコンセプトになっていることが確認された。使用マニュアルを作成したので、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられる。

E. 結論

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減のための研究を実施した。1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌調査では、令和 5 年度は 5 施設の協力のもとに収集した牛枝肉培養液を STEC 7 血清群 (026、045、0103、0111、0121、0145、0157) については 40 検体およびサルモネラ属菌については 86 検体を試験に供試したが、いずれも検出されなかった。続いて、令和 6 年度および令和 7 年度は 3 施設の協力のもとに集収した枝肉密着ガーゼ検体合計 255 検体を試験し、サルモネラ属菌が 1 検体から検出され、血清型は Dublin であった。しかし、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。なお、STEC7 血清群は検出されなかった。検体採取としては、ガーゼを枝肉に密着させて回収する方が検出感度が優れる可能性が示された。また、生菌数についても測定を行ない、施設や月ごとに解析した。2. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査では、STEC 検査およびサルモネラ検査において、遺伝子検査での判定時のトラブルを改善することが必要があると考えられた。3. MLG 掲載または第 3 者認定を受けた STEC スクリーニング方法についての試行では、菌液および菌添加牛肉培養液からのキットを用いた DNA の抽出および検出を実施した。また、使用マニュアルを作

成したので、簡易に技術を習得し、確実な試験実施が行えるものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, Suzuki T, Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y.: Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from the Surfaces of Beef Carcasses in Slaughterhouses in Japan. J Food Prot. 2024;87:100263.

Hirose, S., Tomaru, A., Akiyama, H., Hara-Kudo, Y. Effective decontamination methods for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on beef carcass surfaces for application in beef carcass hygiene. J. Food Prot. 2024;87:100366.

(学会発表)

廣瀬昌平，池内隼佑，島田光平，児山綾子，石田祥士，吉田千央，東海林明子，高橋むつみ，山口健一，大迫英夫，塚本真由美，津江友紀，片山直人，瀧下恵里子，樋渡佐知子，林谷秀樹，穠山浩，工藤由起子. 国内食肉処理施設における牛枝肉の志賀毒素産生性大腸菌保有状況調査. 日本食品衛生学会第 119 回学術講演会.

令和 5 年 10 月 12 日-13 日. 東京

Ikeuchi, S. Hirose, S., Chiba, Y., Akiyama, H., Hayashidani, H., and Hara-Kudo, Y. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* contamination on the surfaces of beef carcasses in slaughterhouses in Japan. IAFP Annual Meeting 2024. 2024 年 7 月 15 日 米国.

鏡山雅人、天野壮俊、本多伽衣、大塚佳代子、奥輝明、築地信、内田和之、菊地真由美、穠山浩、工藤由起子. 対米輸出和牛の国内試験への新規遺伝子検出法導入のための評価. 第 121 回日本食品衛生学会学術講演会. 2025 年 10 月 16-17 日. 東京.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし