

III. 分担研究報告

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

衛生微生物部

令和4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、2022年5月から2023年1月に5施設の協力のもとに牛枝肉合計137検体から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。また、他1施設を加えた6施設の協力のもとに牛枝肉合計161検体について生菌数測定を行なった。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。この結果、1検体(0.7%)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。また、2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、過酢酸(100 ppm、200 ppm、500 ppm)および乳酸(4%)を選択し、牛肉での STEC (0157) の消毒効果を検証した。加えて、消毒効果の向上を期待して55℃に加温した消毒液、酸臭の軽減対策として消毒後の滅菌水洗浄を試みた。結果として、滅菌水よりも消毒液によるかけ流しの方が STEC の減少効果があった。また、消毒液を55℃に加温することによる減少効果は認められなかった。しかし、酸臭軽減の効果があることが判明した。さらに、消毒後の滅菌水洗浄は、酸臭の軽減対策として有効であった。

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*	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
北海道帯広食肉衛生検査所*	吉田千央、鈴木竹彦、笹谷優子
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

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、国内に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 年度から始めた本研究では、令和 2 年度・3 年度それぞれ 1 検体から STEC O157:H7 が分離された。このため令和 4 年度も引き続き調査を継続した。また、昨年度効果的であった過酢酸および米国で消毒として一般に使われている乳酸について、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

2022 年 5 月から 2023 年 1 月に国内の食肉検査所 6 ヶ所にて、ウシ 161 頭からサンプリングを行った。なお、N 施設からの検体では、生菌数測定のみを実施した。

(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 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、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、定量的検出用として 35mL を別容器に分注し 4℃に保管した。

2) 生菌数測定

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 時間培養後、生菌数測定を行った。

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±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 Assay 1 (*stx/eae*) ではベロ毒遺伝子 (*stx* 遺伝子) およびインチミンタンパク質遺伝子 (*eae* 遺伝子) を、Assay 2 (16S/0157) では 16SrRNA 遺伝子および 0157

遺伝子を、Assay 3 (026/0111) では 026 遺伝子および 0111 遺伝子を、Assay 4 (045/0121) では 045 遺伝子および 0121 遺伝子を、Assay 5 (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。

Assay 1 から Assay 5 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℃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。まず初めに Assay 1、2 を行った。その結果、*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た。STEC 7 血清群陽性の検体は、陽性となった 0 血清型について免疫磁気ビーズ法を以下のように行った。7 血清群 0 遺伝子がない場合は STEC 7 血清群陰性とした。

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濃縮液とした。このビーズ濃縮液を E バッファーで 10 倍および 100 倍希釈し、各希釈液 0.1 mL をソルビトールマッコンキー寒天 (SMAC) 培地、セフィキシム・亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー寒天 (CT-SMAC) 培地、クロモアガー STEC 培地およびセフィキシム・亜テルル酸加クロモアガー STEC (CT-クロモアガー STEC) 培地にそれぞれ 1 枚ずつ塗抹した。

さらに、酸 (1N 塩酸) を加え、ローテーターで 1 時間反応させたものを酸処理ビーズ濃縮液とした。この酸処理ビーズ濃縮液は E バッファーで 2 倍および 20 倍に希釈した液 0.1 mL ずつを SMAC 培地、CT-SMAC 培地、クロモアガー STEC 培地、および CT-クロモアガー STEC 培地に 1 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、以下の STEC 7 血清群の確認を行った。

3-4) 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 熱抽出を行なった。この抽出液をテンプレートとして、Assay 1 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、7 血清群 0 遺伝子が陰性となったこのコロニーを STEC 7 血清群陰性と判定した。*Stx* 陽性かつ *eae* 陽性、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、必要に応じて同様の操作を行った。

3-5) STEC 分離株の血清型の再確認

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) また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、H 血清型を抗血清および H-genotyping (1) を用いて H 血清型を決定した。なお、7 血清群以外については 0 血清群を抗血清および 0-genotyping (2) にて決定した。

3-6) 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 血清群の汚染菌数の定量

上記の菌株が、STEC 7 血清群であった場合、4℃で保存しておいた培養前の検体濃縮液を用いて、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、以下の Assay 1 および目的とする O 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

3-1) と同様に DNA を熱抽出し、Assay 1 および目的とする O 群について、3-2) と同様にリアルタイム PCR で確認した。*Stx* 陽性かつ *eae* 陽性、7 血清群 O 遺伝子が陽性となった検体は、陽性となった O 血清型について免疫磁気ビーズ法を以下のように行った。

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を行った。このビーズ濃縮液を E バッファーで 10 倍および 100 倍希釈し、0.1 mL ずつを SMAC 培地、CT-SMAC 培地、クロモアガー-STEPC 培地および CT-クロモアガー-STEPC 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、以下の STEC 7 血清群の確認を行った。ただし、酸処理の手法は行わなかった。

4-4) 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 熱抽出を行なった。この抽出液をテンプレートとして、Assay 1 および目的とする O 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、7 血清群 O 遺伝子が陰性となったこのコロニーを STEC 7 血清群陰性と判定した。*Stx* 陽性かつ *eae* 陽性、7 血清群 O 遺伝子が陽性判定のコロニーは、STEPC 7 血清群陽性と判定し、必要に応じて同様の操作を行った。

4-5) STEC 分離株の血清型の再確認

基本的には、血清群 O26、O45、O103、O111、O121、O145 および O157 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、必要に応じて抗血清および H 血清型 H-genotyping 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 O 血清群を抗血清および O-genotyping にて決定した。

4-6) 生化学的性状試験

3-6) 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* および *eae* 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* および *eae* 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、この増菌培養液を PBS で 10^{-3} まで 10 倍階段希釈し、各希釈液それぞれ 0.1 mL ずつを SMAC 培地、CT-SMAC 培地、クロモアガー-STEPC 培地、および CT-クロモアガー-STEPC 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、3-4) と同様にリアルタイム PCR をおこなった。この結果、*stx* および *eae* 陽性検体に関して、必要に応じて同様の操作を行った。また 3-6) 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) 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 (屠体)、Dressed Cattle (精肉)、Block Meat (ブロック肉)、Disinfection (消毒)、Decontamination (除菌)、Disinfectants (消毒剤)、acids (酸)、hot water (熱水)、steam (蒸気)、Microorganisms (微生物)、bacteria (細菌)、*E. coli* (大腸菌)、STEPC (志賀毒素産生性大腸菌) をキーワードとして、PubMed で文献調査を行った。

(2) 菌株

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。

(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）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 cm）を切りとり、さらに約 5 cm 角（約 25 g）に無菌的に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。使用する前日に 4℃ 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。

(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、10 mL の Tryptone soya broth (TSB) に植菌し、37℃ で 18 時間静置培養した。このうち 8 mL を、4℃、5,000 rpm、15 分間遠心し、滅菌した PBS 8 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℃ で保管された。

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^{-7} まで 10 倍階段希釈を行い、 10^{-6} 希釈液（約 1×10^2 CFU/mL）および 10^{-7} 希釈液（約 1×10^1 CFU/mL）0.1 mL ずつを Tryptone soya agar (TSA) およびクロモアガー STEC に 5 枚に塗抹し、TSA は 37℃ で 24 時間、クロモアガー STEC は 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

昨年の結果から、最も効果的な手法は 500 mL のかけ流しであった。また、酢酸臭は残るが、牛肉の変色がなく、STEC の減少効果が高かった過酢酸を引き続き検討した（表 2-1）。また、従前より国内で使用が認められている指定添加物であり、米国では食肉処理の最後

に枝肉表面に残っている細菌を殺菌するための有機酸洗浄として最も一般に使われている乳酸も検討した（表 2-1）。なお、各消毒液の pH を使用前に測定した。

過酢酸製剤は昨年と同様に「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 ppm、200 ppm、500 ppm に調製し、供試した。

乳酸としては「DL-乳酸（シグマ アルドリッチジャパン合同会社）」を用いた。製品の説明書には、乳酸濃度が 85.0 - 92.0% と記されているため、濃度を 90% とみなした。これを滅菌水で希釈して 4% に調製し、供試した。

なお、対照用溶液は滅菌水を用いた。

(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 および消毒試験条件を表 2-1 に示す。

1) 25℃ 消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）

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た。検体ごとに 25℃ に加温したそれぞれの消毒液 50 mL をシリンジで 10 回（合計 500 mL）かけ流しを行い、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、それぞれストマッカー袋に入れた。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 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 20 時間培養し、コロニーを計測した。

2) 25℃ 消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ

流し後の洗浄方法（洗浄あり）

「1）25℃消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）」と同様に検体ごとにそれぞれの消毒液でかけ流しを行い、消毒液の液切りを行った後に、滅菌水による洗浄を行った。洗浄は、液切り後の検体に常温（23.5 - 24.0℃）の滅菌水 50 mL をシリンジで 10 回（合計 500 mL）かけ流しを行い、室温で 5 分間立てた状態で、洗浄滅菌水の液の液切りを行った。以下、「1）25℃消毒液 500 mL かけ流しの効果（洗浄なし）」と同様に行った。

3）55℃消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）

55℃に加温した消毒液を用いて「1）25℃消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）」と同様に行った。

4）55℃消毒液 500 mL かけ流しならびにかけ流し後の洗浄方法（洗浄あり）

55℃に加温した消毒液を用いて「2）25℃消毒液 500 mL かけ流し後に洗浄滅菌水 500 mL かけ流しの方法（洗浄あり）」と同様に行った。

（7）消毒液による肉の変色と臭味

「（6）消毒液の牛肉汚染 STEC への効果の検証」の消毒液かけ流しおよび洗浄方法について、菌を接種していない検体にて肉の変色と臭味を確認した。

C. 研究結果

1. 牛枝肉の STEC 調査

（1）生菌数

調査した検体 161 頭はすべての検体から生菌数が測定され、その平均は $1,334 \pm 8,095.2$ （平均±SD）CFU/cm²であった（表 1-4）。

雌雄で比較すると、オスの 90 頭は $2,063.5 \pm 10,684.9$ CFU/cm² であるのに対して、メスの 71 頭では $409.3 \pm 1,756.2$ CFU/cm² であった（表 1-4）。

ウシの種類別で比較すると、アンガスの平均値が $13,130.1 \pm 10,868.2$ CFU/cm² であった（表 1-4）。これらには、生菌数 10,000

CFU/cm² を超えるウシが 3 頭含まれていた。

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 F 施設であった。平均生菌数は $4,786.1 \pm 19,398.1$ CFU/cm² であり、1,000 CFU/cm² を超えるウシは 3 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 $8,878.1 \pm 21,561.4$ 、次いで 6 月が $1,437.1 \pm 4,448.7$ であり、気温が高い夏に高い傾向が見られた。10,000 CFU/cm² を超えるウシは 6 月に 1 頭、7 月に 5 頭であった。10,000 CFU/cm² 未満かつ 1,000 CFU/cm² を超えるウシは 6 月に 2 頭、7 月に 2 頭、8 月に 2 頭、9 月および 11 月に 1 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 137 検体のうち、34 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 34 検体のうち、7 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 J71 の 1 検体のみであり、Ct 値は 026（37.9）および 045（29.0）であった。血清型 0157 のみが陽性となった検体は検体番号 J23 および J34 であり、Ct 値は J23 で 22.4、J34 で 26.9 であった。血清型 045 のみが陽性となった検体は検体番号 J7、J11、J28 および J150 であり、Ct 値は J7 で 36.0、J11 で 31.5、J28 で 30.8、J150 で 35.0 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 J23 のみであり、その血清型は 0157:H7 であった。J23 の生菌数は 109.1 CFU/cm² であり、分離が可能であったその

他の検体と比較して、生菌数が 10,000 CFU/cm² を超えていた J35 を除くと、平均的な値に近かった。J23 から分離された STEC 0157:H7 は、*stx1* 遺伝子を保有せず、*stx2* 遺伝子のみを保有していた。また、本菌株の生化学的性状は、一般的な STEC 0157:H7 と一致した（表 1-9）

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 J23 および J34 の計 2 検体であり、分離陽性検体となったのは最終的に J23 の 1 検体のみであった。血清群 026 および 045 についてリアルタイム PCR 陽性であった検体は菌株の分離には至らなかった。

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、2022 年 6 月に採材された M 施設からの黒毛和種であった。この施設においては、枝肉の消毒等の適切な措置が講じられた。

(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 137 検体のうち、34 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 9 検体、*eae* 遺伝子のみが陽性であった検体は 14 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 18.3、最高値 44.1 であり、*eae* 遺伝子については最低値 19.3、最高値 39.0 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、1.00 から 24,167 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。また、*stx* のサブタイプについて、*stx2* 遺伝子が陽性である分離株は 7 株みられ、*stx1* 遺伝子が陽性である分離株は 1 株みられた。

(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 J23 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、2 段目および 3 段目について *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子および 0157 遺伝子のすべてが非検出であった。STEC 0157 の定量値は、検出限界以下となる試験液 100mL あたり 3 MPN 未満あるいはガーゼ表面積 100 cm² あたり 0.33 MPN 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。効果が認められた消毒液は、乳酸（8 報）、過酢酸（2 報）、カプリル酸（1 報）であった。消毒効果のある温度は 55°C（4 報）、50°C（1 報）、45°C（2 報）であった。そのうち、比較的多い条件は、消毒液としては乳酸および過酢酸であり、温度としては 55°C であった（10 報）。以下の 4 つのカテゴリにまとめた。

「55°C の乳酸の効果あり（表 2-2）」では、55°C での、自動塗布による 3% 乳酸で効果があり、スプレーによる 4% 乳酸で効果があり、また、ミストによる 2% 乳酸の方が 2% 酢酸より効果があった。

「55°C の乳酸・過酢酸の効果あり（表 2-3）」では、55°C での、スプレーによる 2.5% および 5% 乳酸、また、室温でのスプレーによる 400 ppm 過酢酸で効果があった。

「55℃以外の乳酸の効果あり（表2-4）」では、スプレーによる2%乳酸で効果があり、スプレーによる3%乳酸は3%酢酸よりも効果があり、スプレーによる5%乳酸は、5%酢酸および5%クエン酸より効果があった。

「55℃以外のカプリル酸・過酢酸・次亜塩素酸および71℃温水の効果あり（表2-5）」では、リンスによる3%カプリル酸は2%乳酸および200 ppm ペルオキシ酸より効果があり、スプレーによる400 ppm 過酢酸、600 ppm 次亜塩素酸および71℃温水で効果があった。

（2）消毒液の牛肉汚染 STEC への効果

各消毒液の pH の測定結果を表2-6に示した。供試した消毒液はすべて酸性であり、過酢酸は濃度が高いほど pH は低く、乳酸が最も低い値であった。

「1）25℃消毒液 500 mL かけ流しの効果（洗浄なし）」では、洗浄なしの対照用溶液である滅菌水、過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm および乳酸4%で、それぞれ 6.8 ± 0.6 、 5.5 ± 0.7 、 5.7 ± 0.5 、 5.5 ± 0.6 および 5.4 ± 1.7 log CFU/片であり、滅菌水より消毒液の方が STEC の減少効果が認められた（図2-2）。消毒液の種類および濃度の違いによる差は認められなかった（図2-2）。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2-3）。

「2）25℃消毒液 500 mL かけ流し後に洗浄滅菌水 500 mL かけ流しの効果（洗浄あり）」では、それぞれ 6.3 ± 0.3 、 5.7 ± 0.5 、 5.2 ± 0.3 、 5.7 ± 0.5 および 5.2 ± 0.5 log CFU/片であり、滅菌水洗浄なしの場合と同様に、滅菌水より消毒液の方が STEC の減少効果が認められた（図2-4）。ばらつきはあるが、過酢酸では 500 ppm が最も効果があり、4%乳酸と同様の効果があった（図2-4）。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた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（図2-5）。

「3）55℃消毒液 500 mL かけ流しの効果

（洗浄なし）」では、洗浄なしの対照用溶液である滅菌水、過酢酸 100 ppm、200 ppm、500 ppm および乳酸4%で、それぞれ 6.3 ± 0.1 、 5.5 ± 0.7 、 5.7 ± 0.5 、 5.5 ± 0.6 および 5.4 ± 1.7 log CFU/片であり、ばらつきは大きい。25℃洗浄なしの場合と同様に、滅菌水より消毒液の方が STEC の減少効果が認められた（図2-6）。消毒液の種類および濃度の違いによる差は認められなかった（図2-6）。滅菌水では 25℃洗浄なしの場合と比較して、55℃に加温することによって STEC の減少効果が若干あったが、消毒液では認められなかった（図2-2 および図2-6）。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）。

「4）55℃消毒液 500 mL かけ流し後に洗浄滅菌水 500 mL かけ流しの効果（洗浄あり）」では、それぞれ 6.4 ± 0.2 、 5.7 ± 0.5 、 5.2 ± 0.3 、 5.7 ± 0.5 および 5.2 ± 0.5 log CFU/片であり、ばらつきはあるが洗浄なしの場合と同様に、滅菌水より消毒液の方が STEC の減少効果が認められた（図2-8）。消毒液の種類および濃度の違いによる差は認められなかった（図2-8）。55℃洗浄なしの場合と異なり、滅菌水および消毒液、いずれも 55℃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（図2-4 および図2-8）。なお、牛肉に供試し、下に流れ落ちた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（図2-9）。

消毒液による肉の変色と臭いの結果を表2-6に示した。牛肉表面の変色に関しては、過酢酸では変色は認められなかったが、乳酸では茶褐色に変色した。臭いに関しては、過酢酸では濃度が高いほど酸臭が強くなる傾向があったが、両温度の消毒液ともに滅菌水による洗浄によって酸臭は軽減した。また、55℃の消毒液では、25℃の消毒液よりも肉の酸臭が弱かった。一方、乳酸では酸臭は認められなかった。

D. 考察

1. 牛枝肉の STEC 調査

本調査では牛枝肉からガーゼを用いた 137 検体中、1 検体 (0.7%) から STEC7 血清群のひとつである STEC 0157 が分離された。STEC 0157 が分離された 1 検体を含む 7 検体 (5.1%) 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。と畜場でのウシの糞便からは STEC 0157 が高頻度に検出されていること (3) と比較すると、その汚染率は低率であった。その一方、令和 3 年度の結果 (0.6%、1/168) と同等の汚染程度であったことならびに定量試験において、STEC 0157 陽性検体は MPN 法により、検出限界以下であったことから、さらなる汚染低減にはその制御法の確立が課題となってくるであろう。また、リアルタイム PCR 陽性検体および陰性検体のウシには特徴的な差異は見られなかったが、各々の検体についてウシの腸管内容物での STEC の有無等を調べることで、より詳細な情報が得られると考えられた。

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 8.9×10^4 CFU/cm² で最も多く次いで 6 月、8 月であり、その他の月のほとんどは生菌数が 10^2 CFU/cm² 程度にとどまっていた。したがって、夏季においては牛肉の衛生状態の低下が推測された。また、STEC 0157 が分離された検体の採取月は平均生菌数が二番目に多い月である 6 月であったことから、夏季が汚染時期であることを示している。令和 4 年度における全体の平均生菌数が $1,334$ CFU/cm² であり (表 1-4)、サンプリング時期が同じであった令和 3 年度の平均生菌数が 62.8 CFU/cm² であったことと比べて 21.4 倍高かった。この理由として、特に施設 E・F の生菌数 (表 1-5) が高かったことが影響したと考えられた。それらの施設以外では、衛生管理が適切に行われていたと考え

られたが、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り、衛生状態を改善することが求められる。また、ウシの種類について、特にアンガス種 5 検体のうち 3 検体では生菌数が $10,000$ CFU/cm² 以上を示してり、高度に汚染されていたことから、これらウシの種類に対しても衛生状態のさらなる向上に努める必要がある。

stx、*eae*、7 血清群のいずれかの遺伝子が PCR 陽性の培養液から分離された菌株は STEC 7 血清群ではない菌株が大部分を占めていた。*stx* 遺伝子が陽性であった株は特定の施設に由来する株が多かったことから、特定の施設において *stx* 遺伝子保有株が分離される要因について、明らかにする必要がある。分離された菌株の半数が *eae* 遺伝子を保有していたが、分離される時期は夏季が多く、由来となる施設および牛の種類は多様であった。*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。さらに、*stx* あるいは *eae* 遺伝子を保有している菌を指標菌とし食肉の衛生管理に用いることも検討したい。

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

今回の文献調査において、比較的多い消毒条件 (10 報) (表 2-2、表 2-3、表 2-4、表 2-5) の国別の内訳は、米国 (5 報)、アルゼンチン (2 報)、チェコ共和国 (2 報)、大韓民国 (1 報) であった。これら 10 報すべてにおいて、効果の有無にかかわらず乳酸に

よる消毒効果を検討していた。有機酸である乳酸は、従前より国内での使用が認められている指定添加物であり、国内でも利用できる消毒液として効果の検討を行う必要があると考えた。また、米国およびアルゼンチンでは消毒液を 55℃ (130℉) に加温した効果を検討していた。このことを加味し、消毒効果の向上を期待して 55℃ に加温した消毒液による効果の検討を考えた。

米国農務省食品安全検査局 (United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, USDA FSIS) の「Industry Guideline for Minimizing the Risk of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli (STEC) in Beef including Veal) Slaughter Operations 021 Guideline」には、枝肉表面の微生物汚染の洗浄のために次亜臭素酸、水酸化ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウムを含んだ界面活性剤、塩素を含んだ水、有機酸 (酢酸、乳酸、クエン酸)、また、熱水や蒸気による洗浄および乾燥を記載している (4)。EU は 2013 年に微生物汚染を低減させることを目的として、屠殺場での乳酸の利用 (2-5% 濃度、55℃ までの加温) を認めた (5)。

乳酸は、米国では食肉処理の最後に枝肉表面に残っている細菌を大幅に殺菌するために一般的に使われている有機酸である (4)。

過酢酸は強力な殺菌効果のある酸化剤として米国 (6) や日本で許可されている。乳酸と異なり微生物の耐性反応の誘導は知られていない (7)。過酢酸の殺菌効果については数多くの研究が報告されている (表 2-2、表 2-3、表 2-5)。

これらのことを鑑みて、昨年度に最も効果のあった方法である 500 mL のかけ流しを採用し、消毒効果の向上を期待して 55℃ に加温した消毒液、酸臭の軽減対策として消毒後の滅菌水洗浄を加えて STEC (0157) の減少効果を検討した。過酢酸は 200-400 ppm、乳酸は 3-

4% が妥当であると提案する総論 (7) や昨年度までの結果から、今年度は過酢酸を 100 - 500 ppm の範囲 (昨年度は 50 - 1,000 ppm) で、乳酸は 4% で消毒を行った。

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た (図 2-2、図 2-4、図 2-6、図 2-8)。滅菌水では 55℃ に加温することにより STEC の減少効果が若干あったが、消毒液では加温することによって STEC の減少効果は認められなかった (図 2-4、図 2-6、図 2-8)。また、処理後の消毒液を含んだ混合液中には STEC を含んだ微生物は検出されなかった (図 2-3、図 2-5、図 2-7、図 2-9)。これらのことから、消毒液による一定の効果が期待できる。

効果的な除菌には、薬剤との接触時間や接触間隔、濃度、pH、温度、圧力、滞留時間などの組み合わせと装置の設定が関係する (4, 7)。本研究での結果は、食肉処理場の消毒に参考になると考えられる。

過酢酸による消毒では、昨年度の結果から、牛肉表面を変色させないが酸臭が残ることが難点であった (表 2-6)。そこで、酸臭を軽減させるため、消毒後の滅菌水洗浄を試みた。滅菌水洗浄は酸臭を軽減させ、さらに、消毒液を 55℃ に加温することによって酸臭の軽減に相乗効果があることが判明した (表 2-6)。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もある (表 2-3、表 2-4)。肉表面の変色はトリミングなどによって除去できることを考慮すると、乳酸は消毒剤として有効であると考えられる。

E. 結論

1. 牛枝肉の STEC 調査では、2022 年 5 月から 2023 年 1 月に 5 施設の協力のもとに牛枝肉合計 137 検体を供試した。また、別の 1 施設につ

いては、計 24 検体を生菌数の測定のみにも供試した。1 検体(0.7%)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。培養液から分離された STEC 7 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。今後も、と畜場において解体処理工程では注意深い取り扱いが必要である。

2. 牛肉の消毒効果の検討では、消毒薬として、過酢酸 (100 ppm、200 ppm、500 ppm) および乳酸 (4%) を選択し、牛肉での STEC (0157) の消毒効果を検証した。加えて、消毒効果の向上を期待して 55°C に加温した消毒液、酸臭の軽減対策として消毒後の滅菌水洗浄を試みた。結果として、滅菌水よりも消毒液によるかけ流しの方が STEC の減少効果があった。また、消毒液を 55°C に加温することによる減少効果は認められなかった。しかし、酸臭軽減の効果があることが判明した。さらに、消毒後の滅菌水洗浄は、酸臭の軽減対策として有効であった。

【 参考文献 】

1. Banjo M, Iguchi A, Seto K, Kikuchi T, Harada T, Scheutz F, Iyoda S; Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan. *Escherichia coli* H-Genotyping PCR: a Complete and Practical Platform for Molecular H Typing. *J Clin Microbiol.* 2018;56:e00190-18.
2. Iguchi A, Iyoda S, Seto K, *et al.* *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2427-2432.
3. Elder RO, Keen JE, Siragusa GR, *et al.* Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 prevalence in

feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2999-3003.

4. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service Industry (USDA FSIS). Guideline for Minimizing the Risk of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) in Beef (including Veal) Slaughter Operations 2021 Guideline.
5. Commission Regulation EU No 101/2013. Official Journal of the European Union. 2013;L34/1
6. Code of Federal Regulations. Title 21 Parts 170 § 173.370 Peroxyacids 2012:152.
7. Han J, Dong P, Holman BWB, *et al.* Processing interventions for enhanced microbiological safety of beef carcasses and beef products: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022;23:1-25.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

なし

(学会発表)

廣瀬昌平、都丸亜希子、穂山浩、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.

H. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし

定性的検出

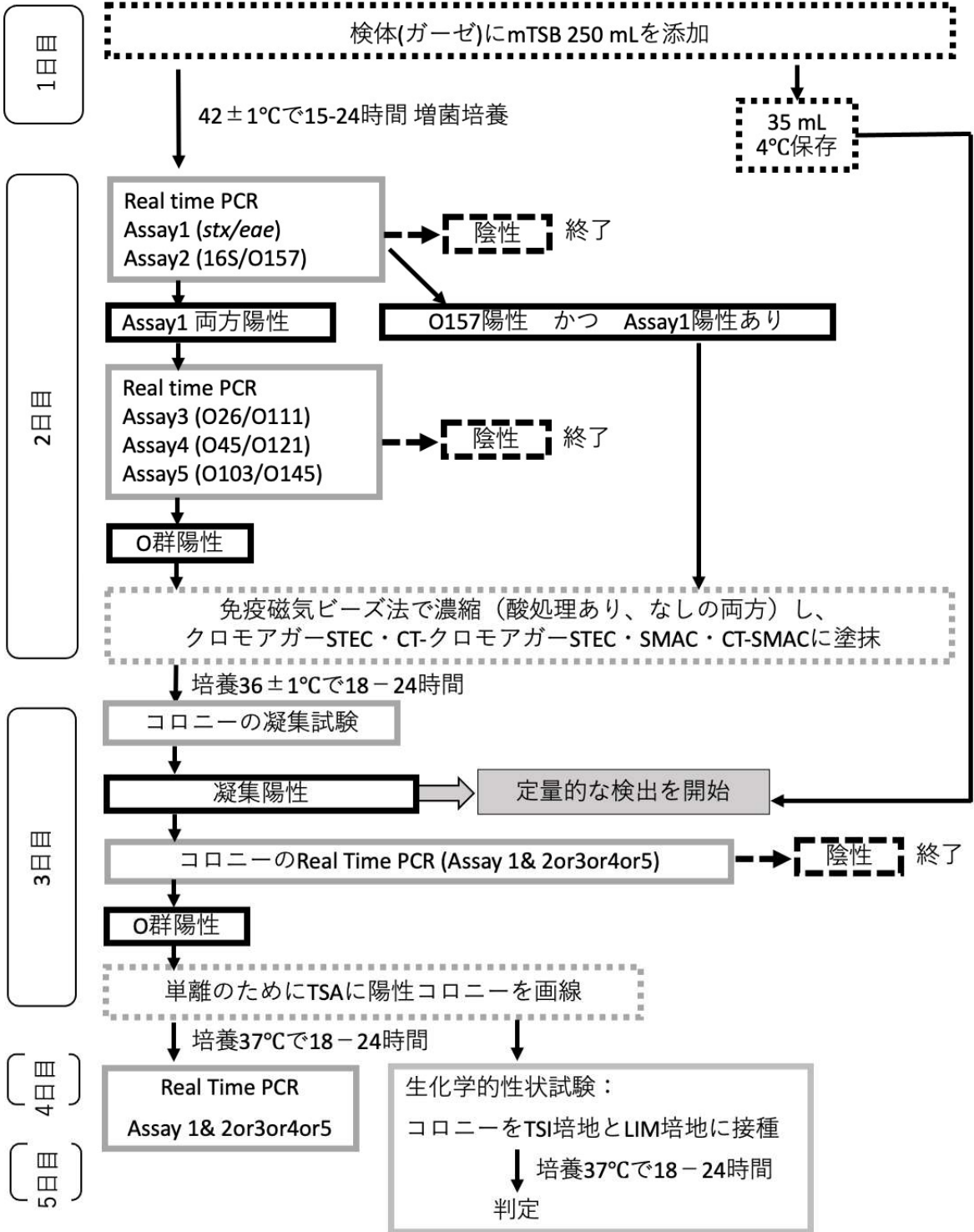


図 1-1 定性的な検出方法

定量的検出

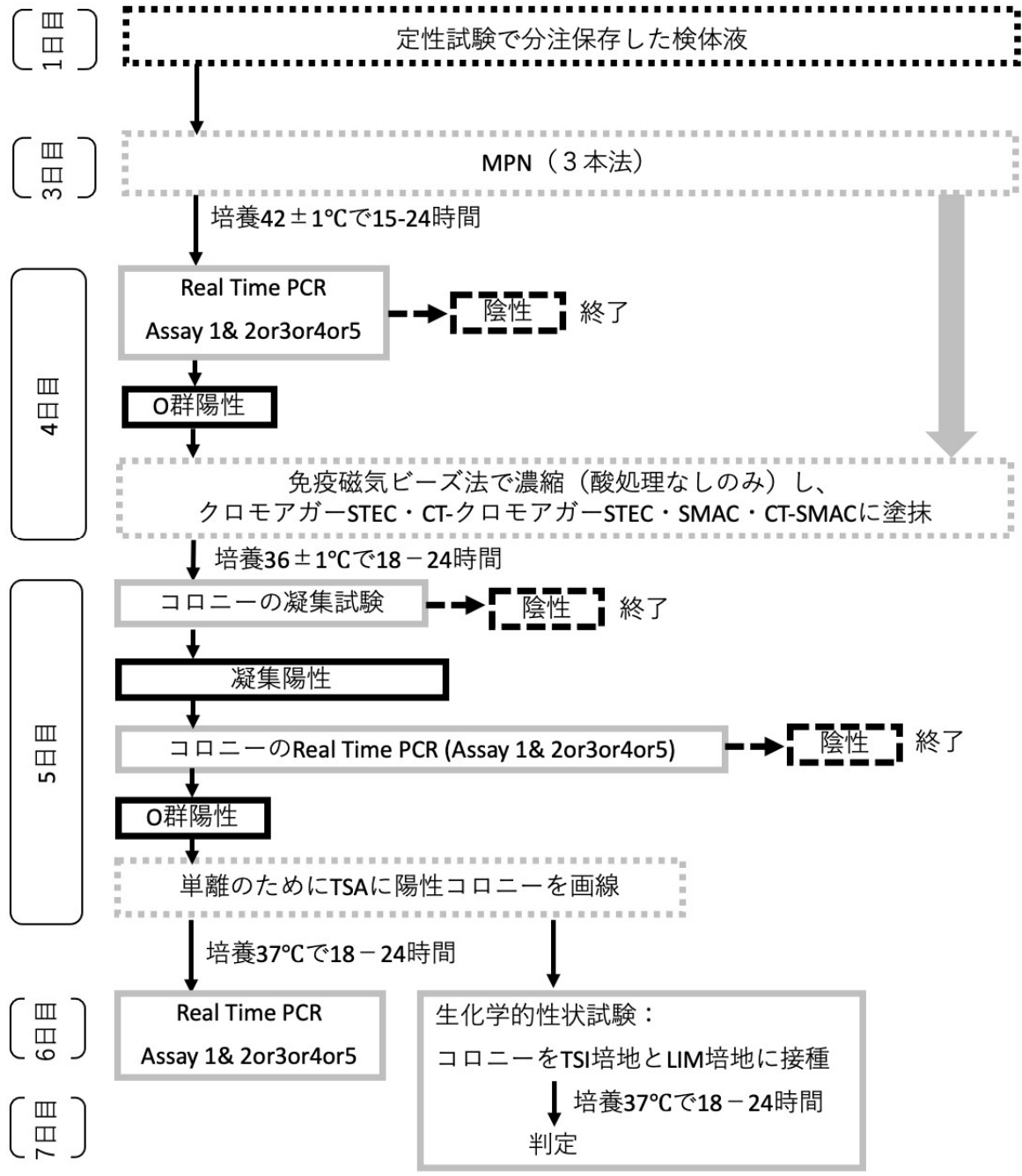


図 1-2 定量的な検出方法

表 1-1 供試検体のウシ種類、性別、齢および個体数

ウシの種類	合計 個体数	性別	個体数	月齢の幅	月齢別	個体数
ホルスタイン	74	オス	51	13 - 21	20未満	43
					20以上30未満	8
					30以上	0
		メス	23	15 - 119	20未満	1
					20以上30未満	3
					30以上	19
黒毛和種	35	オス	22	24 - 30	20未満	0
					20以上30未満	20
					30以上	2
		メス	13	23 - 139	20未満	0
					20以上30未満	9
					30以上	4
交雑種	32	オス	11	23 - 25	20未満	0
					20以上30未満	11
					30以上	0
		メス	21	22 - 35	20未満	0
					20以上30未満	17
					30以上	4
褐毛和種	15	オス	1	28	20未満	0
					20以上30未満	1
					30以上	0
		メス	14	27 - 30	20未満	0
					20以上30未満	13
					30以上	1
アングス	5	オス	5	26 - 34	20未満	0
					20以上30未満	2
					30以上	3
		メス	0	-	20未満	0
					20以上30未満	0
					30以上	0

表 1-2 リアルタイム PCR のプライマーおよびプローブ

アッセイ名	標的 遺伝子	プライマー とプローブ	配列	出典
Assay1	<i>stx</i>	Stx-F	5' TTTGTACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG 3'	USDA
		Stx-R	5'CCCCAGTTCARWGTTRAGRTCMACDTC 3'	
		Stx1-P	5' FAM-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A-BHQ_1 3'	
		Stx2-P	5' FAM-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-MGB 3'	
	<i>eae</i>	Eae-F	5' CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA 3'	USDA
		Eae-R	5' CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTM 3'	
Eae-P		5' HEX-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC-BHQ_1 3'		
Assay2	16S rRNA gene	16S rRNA-F	5' CCT CTT GCC ATC GGA TGT G 3'	USDA
		16S rRNA-R	5' GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC 3'	
		16S rRNA-P	5' HEX-GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC-BHQ_1 3'	
	<i>rfbE0157</i>	RfbE O157-F	5'-TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A-3'	EFSA
		RfbE O157-R	5'-CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT-3'	
		RfbE O157-P	5' FAM-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG-BHQ_1 3'	
Assay3	<i>wzx026</i>	Wzx O26-F	5' GTA TCG CTG AAA TTA GAA GCG C 3'	USDA
		Wzx O26-R	5' AGT TGA AAC ACC CGT AAT GGC 3'	
		Wzx O26-P	5' 56-FAM-TGG TTC GGT TGG ATT GTC CAT AAG AGG G- 3BHQ_1 3'	
	<i>wbd/O111</i>	WbdI O111-F	5' TGT TCC AGG TGG TAG GAT TCG 3'	USDA
		WbdI O111-R	5' TCA CGA TGT TGA TCA TCT GGG 3'	
		WbdI O111-P	5' 5MAXN - TGA AGG CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GC- 3IABkFQ 3'	
Assay4	<i>wzx045</i>	Wzx O45-F	5' CGT TGT GCA TGG TGG CAT 3'	USDA
		Wzx O45-R	5' TGG CCA AAC CAA CTA TGA ACT G 3'	
		Wzx O45-P	5' 56-FAM- ATT TTT TGC TGC AAG TGG GCT GTC CA-3BHQ_1 3'	
	<i>wzx0121</i>	Wzx O121-F	5' AGG CGC TGT TTG GTC TCT TAG A 3'	USDA
		Wzx O121-R	5' GAA CCG AAA TGA TGG GTG CT 3'	
		Wzx O121-P	5' 5MAXN - CGC TAT CAT GGC GGG ACA ATG ACA GTG C- 3IABkFQ 3'	
Assay5	<i>wzx0103</i>	Wzx O103-F	5' TTG GAG CGT TAA CTG GAC CT 3'	USDA
		Wzx O103-R	5' ATA TTC GCT ATA TCT TCT TGC GGC 3'	
		Wzx O103-P	5' HEX- AGG CTT ATC TGG CTG TTC TTA CTA CGG C-BHQ-1 3'	
	<i>wzx0145</i>	Wzx O145-F	5' AAA CTG GGA TTG GAC GTG G 3'	USDA
		Wzx O145-R	5' CCC AAA ACT TCT AGG CCC G 3'	
		Wzx O145-P	5' FAM-TGC TAA TTG CAG CCC TTG CAC TAC GAG GC-BHQ_1 3'	

USDA: USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01

EFSA: EFSA Journal. 11:3138, 2013

表 1-3-1 Assay1 の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	蛍光標識
2× Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer stx F (50 μM)	0.63	1.25	
Primer stx R (50 μM)	0.63	1.25	
Primer Eae F (50 μM)	0.50	1.00	
Primer Eae R (50 μM)	0.50	1.00	
Probe stx1 P (5 μM)	1.25	0.25	FAM
Probe stx2 P (5 μM)	1.25	0.25	FAM
Probe Eae-P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	1.74		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-3-2 Assay2 の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	蛍光標識
2× Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer 16SRna-F (20 μM)	0.20	0.16	
Primer 16SRna-R (20 μM)	0.20	0.16	
Primer RfbE-O157-F (20 μM)	0.25	0.20	
Primer RfbE-O157-R (20 μM)	0.25	0.20	
Probe 16SrRNA-P (5 μM)	0.50	0.10	HEX
Probe RfbE-O157-P (5 μM)	0.25	0.05	FAM
滅菌蒸留水	5.85		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-3-3 Assay3 の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	蛍光標識
2× Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O26 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O26 R (20 μM)	0.31	0.25	
Primer WbdI O111 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer WbdI O111 R (20 μM)	0.31	0.25	
Probe Wzx O26 P (2 μM)	1.88	0.15	FAM
Probe WbdI O111 P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	3.38		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-3-4 Assay4 の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μ l)	終濃度 (μ M)	標識
2×Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O45 F (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O45 R (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 F (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 R (20 μ M)	0.31	0.25	
Probe Wzx O45 P (2 μ M)	2.34	0.19	FAM
Probe Wzx O121 P (5 μ M)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	2.92		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-3-5 Assay5 の 1well あたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μ l)	終濃度 (μ M)	標識
2×Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O103 F (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O103 R (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 F (20 μ M)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 R (20 μ M)	0.31	0.25	
Probe Wzx O103 P (5 μ M)	1.00	0.20	HEX
Probe Wzx O145 P (2 μ M)	2.50	0.20	FAM
滅菌蒸留水	2.76		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表 1-4 供試検体のウシの種類別、性別での生菌数

ウシ	個体数	生菌検出* 個体数 (%)	生菌数** (平均 ± SD CFU/cm ²)	
ウシの種類	ホルスタイン	74	74 (100)	1,948.7 ± 11,198.5
	黒毛和種	35	35 (100)	65.6 ± 172.8
	交雑種	32	32 (100)	59.2 ± 82.4
	褐毛和種	15	15 (100)	48.3 ± 66.9
	アングス	5	5 (100)	13,130.1 ± 10,868.2
性別	オス	90	90 (100)	2,063.5 ± 10,684.9
	メス	71	71 (100)	409.3 ± 1,756.2
全体	161	161 (100)	1,334 ± 8,095.2	

SD: standard deviation

* : 非検出は、0.11 CFU/cm²未満

** : 検出個体のみでの平均 ± SD

表 1-5 施設別の生菌数

(表1-5 1/2)

施設	月	個体数		生菌検出 個体数*		生菌数** (平均±SD CFU/cm ²)	
		月ごと	合計	月ごと	合計	月ごと	施設合計
E施設	4	—		—		—	
	5	5		5		121.8 ± 95.4	
	6	5		5		4,795.6 ± 7,693.1	
	7	5		5		12,850 ± 9,757.1	
	8	5		5		710.8 ± 548.4	
	9	5	45	5	45	438.5 ± 858.1	2,129.1 ± 5,564.0
	10	5		5		74.7 ± 73.9	
	11	5		5		25.8 ± 22.4	
	12	5		5		133.7 ± 168.6	
	1	5		5		11.2 ± 13.7	
	2	—		—		—	
	F施設	4	—		—		—
5		—		—		—	
6		3		3		15.0 ± 19.4	
7		3		3		37,394.7 ± 50,038.9	
8		3		3		142.9 ± 68.2	
9		3	24	3	24	320.4 ± 191.0	4,786.1 ± 19,398.1
10		3		3		9.3 ± 1.6	
11		3		3		43.9 ± 9.7	
12		3		3		12.7 ± 8.4	
1		3		3		349.9 ± 550.8	
2		—		—		—	
G施設		4	—		—		—
	5	3		3		13.6 ± 5.6	
	6	3		3		12.6 ± 6.9	
	7	3		3		21.3 ± 6.4	
	8	3		3		21.7 ± 22.7	
	9	3	27	3	27	33.1 ± 46.1	17.5 ± 20.7
	10	3		3		38.0 ± 28.6	
	11	3		3		10.7 ± 14.1	
	12	3		3		2.3 ± 0.8	
	1	3		3		4.1 ± 4.4	
	2	—		—		—	

(表1-5のつづき 2/2)

	4	—	—	—	—		
	5	3	3	3	2.3 ± 1.7		
	6	—	—	—	—		
	7	3	3	3	73.3 ± 46.8		
	8	3	3	3	149.8 ± 67.9		
I施設	9	—	20	—	20	—	42.5 ± 62.1
	10	2	2	2	9.9 ± 4.3		
	11	3	3	3	5.8 ± 2.7		
	12	3	3	3	39.6 ± 59.7		
	1	3	3	3	6.0 ± 6.1		
	2	—	—	—	—		
	4	—	—	—	—		
	5	—	—	—	—		
	6	3	3	3	60.2 ± 43.0		
	7	3	3	3	127.4 ± 31.4		
	8	3	3	3	8.8 ± 1.1		
M施設	9	3	21	3	21	5.3 ± 3.3	82.4 ± 216.6
	10	3	3	3	6.0 ± 3.2		
	11	3	3	3	359.1 ± 560.2		
	12	—	—	—	—		
	1	3	3	3	9.9 ± 12.0		
	2	—	—	—	—		
	4	—	—	—	—		
	5	—	—	—	—		
	6	3	3	3	63.1 ± 52.6		
	7	3	3	3	154.2 ± 49.3		
	8	3	3	3	24.6 ± 11		
N施設	9	3	24	3	24	30.6 ± 36.5	43.4 ± 53.6
	10	3	3	3	26.7 ± 19.2		
	11	3	3	3	14.9 ± 14.1		
	12	3	3	3	1.6 ± 0.7		
	1	3	3	3	31.2 ± 39.2		
	2	—	—	—	—		

SD: standard deviation

*: 非検出は、0.11 CFU/cm²未満

**: 検出個体のみの平均 ± SD

表 1-6 月別の生菌数

(表1-6 1/2)

年 月	ウシの種類	個体数		生菌検出 個体数*		生菌数** (平均±SD CFU/cm ²)		月の統計
		種類 ごと	合計	種類 ごと	合計	種類ごと		
2022 4	ホルスタイン	—		—		—		—
	黒毛和種	—		—		—		
	交雑種	—	—	—	—	—		
	褐毛和種	—		—		—		
	アングス	—		—		—		
5	ホルスタイン	7		7		57.1 ± 65.6		59.7 ± 84.8
	黒毛和種	1		1		250 ± 0		
	交雑種	—	11	—	11	—		
	褐毛和種	3		3		2.3 ± 1.7		
	アングス	—		—		—		
6	ホルスタイン	8		8		336.0 ± 832.6		1,437.1 ± 4,448.7
	黒毛和種	3		3		60.2 ± 43.0		
	交雑種	3	17	3	17	63.1 ± 52.6		
	褐毛和種	—		—		—		
	アングス	3		3		7,124.1 ± 9,841.5		
7	ホルスタイン	9		9		14,691.1 ± 30,574.4		8,878.1 ± 21,561.4
	黒毛和種	3		3		127.4 ± 31.4		
	交雑種	3	20	3	20	154.2 ± 49.3		
	褐毛和種	3		3		73.3 ± 46.8		
	アングス	2		2		22,139.0 ± 2,868.0		
8	ホルスタイン	11		11		368 ± 480.9		229.9 ± 385.5
	黒毛和種	3		3		8.8 ± 1.1		
	交雑種	3	20	3	20	24.6 ± 11.0		
	褐毛和種	3		3		149.8 ± 67.9		
	アングス	—		—		—		
9	ホルスタイン	10		10		316.5 ± 604.2		197.7 ± 476.7
	黒毛和種	4		4		26 ± 41.5		
	交雑種	3	17	3	17	30.6 ± 36.5		
	褐毛和種	—		—		—		
	アングス	—		—		—		
10	ホルスタイン	11		11		46.8 ± 56.4		33.3 ± 46.0
	黒毛和種	5		5		17.8 ± 18.3		
	交雑種	1	19	1	19	9.2 ± 0		
	褐毛和種	2		2		9.9 ± 4.3		
	アングス	—		—		—		

(表1-6のつづき 2/2)

2022	ホルスタイン	3		3		10.7 ± 14.1	
	黒毛和種	6		6		182.4 ± 403.7	
	11 交雑種	11	20	11	20	27.8 ± 19.7	71.6 ± 220.7
	褐毛和種	—		—		—	
	アンガス	—		—		—	
2022	ホルスタイン	6		6		7.5 ± 7.8	
	黒毛和種	5		5		22.8 ± 47.8	
	12 交雑種	5	17	5	17	133.7 ± 168.6	49.2 ± 104.4
	褐毛和種	1		1		9.6 ± 0	
	アンガス	—		—		—	
2023	ホルスタイン	9		9		121.3 ± 324.5	
	黒毛和種	5		5		11.3 ± 12.6	
	1 交雑種	3	20	3	20	31.2 ± 39.2	63.0 ± 218.0
	褐毛和種	3		3		6.0 ± 6.1	
	アンガス	—		—		—	
2023	ホルスタイン	—		—		—	
	黒毛和種	—		—		—	
	2 交雑種	—	—	—	—	—	—
	褐毛和種	—		—		—	
	アンガス	—		—		—	

SD: standard deviation

*: 非検出は、0.11 CFU/cm²未満

**: 検出個体のみでの平均 ± SD

表 1-7 増菌培養がリアルタイム PCR 陽性となった検体

検体 番号	施設 記号	リアルタイムPCRの結果*									
		<i>stx</i>	<i>eae</i>	16S	O157	O26	O111	O45	O121	O103	O145
J004	E施設	28.7	UD	17.1	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J005	E施設	23.0	UD	16.8	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J006	E施設	UD	25.0	13.4	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J007	E施設	24.7	39.0	16.9	UD	UD	UD	36.0	UD	UD	UD
J011	G施設	26.0	19.3	13.6	UD	UD	UD	31.5	UD	UD	UD
J013	F施設	UD	29.1	16.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J014	F施設	UD	24.7	16.2	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J023	M施設	25.0	24.0	14.5	22.4	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J024	M施設	UD	22.2	13.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J025	M施設	26.6	UD	14.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J028	G施設	33.0	33.2	17.0	UD	UD	UD	30.8	UD	UD	UD
J034	E施設	44.1	32.0	16.4	26.9	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J035	E施設	28.0	30.9	18.0	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J038	F施設	UD	23.9	15.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J043	I施設	UD	21.1	14.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J044	I施設	UD	27.3	14.6	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J045	I施設	UD	24.5	13.8	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J058	I施設	25.6	UD	14.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J061	M施設	34.1	25.9	13.6	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J070	E施設	UD	38.9	14.7	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J071	E施設	32.1	35.7	14.6	UD	37.9	UD	29.0	UD	UD	UD
J081	M施設	UD	23.0	14.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J089	E施設	UD	26.0	14.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J091	E施設	27.8	28.8	14.9	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J111	E施設	UD	37.1	14.7	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J112	E施設	30.0	31.8	14.7	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J114	E施設	18.3	UD	14.6	UD	UD	UD	UD	UD	UD	UD
J115	E施設	UD	25.2	14.3	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J117	M施設	22.9	UD	14.0	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J124	G施設	29.0	UD	13.8	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J133	I施設	UD	23.6	13.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J137	F施設	29.2	UD	14.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT
J150	F施設	35.0	34.0	16.1	UD	UD	UD	35.0	UD	UD	UD
J155	E施設	29.6	UD	14.9	UD	NT	NT	NT	NT	NT	NT

*数値はCT値、UDは非検出、NTは非試験

表 1-8 リアルタイム PCR で *stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、7 血清群のいずれかが陽性の培養液から菌株が分離された検体

O血清	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	検体 番号	採材日	施設 記号	生菌数 (CFU/cm ²)	ウシの種類	月齢 (ヶ月)	性別	経産 の有無	去勢 の有無
O10	-	-	+	J43	220726	I施設	127.1	褐毛和種	30	メス	-	-
O113	-	+	-	J114	221125	E施設	7.67	交雑種	25	オス	-	有
O128	-	-	+	J24	220627	M施設	28.6	黒毛和種	27	オス	-	有
O145	-	-	+	J43	220726	I施設	127.1	褐毛和種	30	メス	-	-
O145	-	-	+	J44	220726	I施設	51.2	褐毛和種	28	メス	-	-
O156	-	-	+	J14	220603	F施設	5.11	ホルスタイン	13	オス	-	有
O156	-	-	+	J133	221213	I施設	9.56	褐毛和種	28	オス	-	有
O157	-	+	+	J23	220627	M施設	109.1	黒毛和種	28	オス	-	有
O157	-	-	-	J32	220722	E施設	522.2	ホルスタイン	119	メス	有	-
O157	-	-	-	J85	220927	G施設	1	ホルスタイン	18	オス	-	有
O157	-	-	-	J138	221220	F施設	22.2	ホルスタイン	20	オス	-	有
O177	-	-	+	J7	220527	E施設	250	黒毛和種	47	メス	有	-
O181	-	+	-	J5	220527	E施設	74.3	ホルスタイン	94	メス	有	-
O181	-	+	-	J7	220527	E施設	250	黒毛和種	47	メス	有	-
O183	+	-	-	J117	221128	M施設	1,005	黒毛和種	28	オス	-	有
O186	-	-	+	J11	220531	G施設	10.2	ホルスタイン	18	オス	-	有
OUT	-	+	-	J35	220722	E施設	24,167	アングス	28	オス	-	有
OUT(Og171)	-	+	-	J71	220909	E施設	1,972	ホルスタイン	20	オス	-	有
OUT(OgGp7)	-	+	-	J137	221220	F施設	9.56	ホルスタイン	20	オス	-	有

表 1-9 J23 由来 STEC O157:H7 の生化学的性状

培地	J23からの分離株		参考		
	血清型 O157: H7		血清型 O157: H7	血清型 O157: H-	その他の主な血清型
TSI寒天	斜面	黄色	黄色	黄色	黄色
	高層	黄色	黄色	黄色	黄色
	硫化水素産生	-	-	-	-
	ガス産生	+	+	+	+
LIM培地	リジン	+	+	+	+
	インドール	+	+	+	+
	運動性	+	+	-	+

表 1-10 *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子陽性検体、そのうちの 7 血清群陽性検体

項目	リアルタイムPCR陽性検体		分離陽性検体		定量値
	検体数	検体番号 (試験コロニー数)	検体数	検体番号 (分離コロニー数)	
<i>stx</i> (+) & <i>eae</i> (+)	11	J7 (28), J11 (46), J23 (43), J28 (22), J34 (50), J35 (25), J61 (24), J71 (69), J91 (25), J112 (24), J150 (53)	1	J23 (40)	
上記のうち					
O26 (+)	1	J71 (69)	0	分離コロニーなし	NA
O45 (+)	5	J7 (28), J11 (46), J28 (22), J71 (69), J150 (53)	0	分離コロニーなし	NA
O157 (+)	2	J23(43), J34(50)	1	J23 (40)	< 0.33 MPN/100cm ³

NA:非該当

表 1-11 分類項目別の 7 血清群 STEC の分離結果

分類項目		試験個体数	陽性個体数	血清型
ウシの種類	ホルスタイン	74	0	—
	黒毛和種	29	1	O157:H7
	交雑種	14	0	—
	褐毛和種	15	0	—
	アングス	5	0	—
施設	早来	45	0	—
	東藻琴	27	0	—
	帯広	24	0	—
	徳島	20	0	—
	佐賀	21	1	O157:H7
年月	2022年4月	0	0	—
	2022年5月	11	0	—
	2022年6月	14	1	O157:H7
	2022年7月	17	0	—
	2022年8月	17	0	—
	2022年9月	14	0	—
	2022年10月	16	0	—
	2022年11月	17	0	—
	2022年12月	14	0	—
	2023年1月	17	0	—
	2023年2月	0	0	—

表 1-12 STEC O157 が定性試験で分離された検体(J23)での定量試験結果

遺伝子	試験結果									定量値 (MPN)	
	1段目			2段目			3段目			／試験液100mL	／表面積100 cm ²
<i>stx</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 3	< 0.33
	UD	NT	NT	UD	NT	UD	NT	NT	NT		
<i>eae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 3	< 0.33
	UD	NT	NT	UD	NT	UD	NT	NT	NT		
O157	-	-	-	-	-	-	-	-	-	< 3	< 0.33
	UD	NT	NT	UD	NT	UD	NT	NT	NT		

*UDは非検出

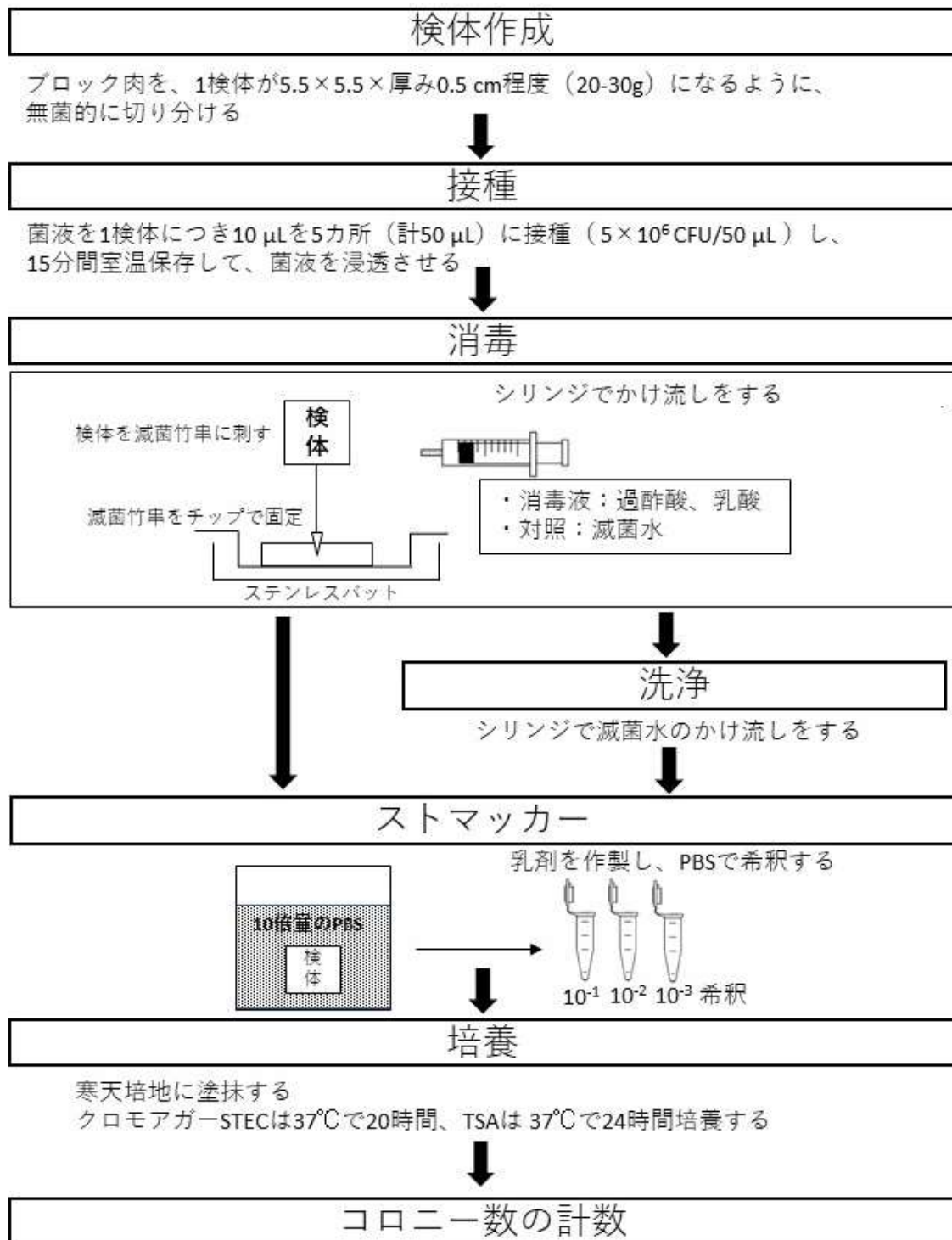


図 2-1 消毒液の効果の検証方法

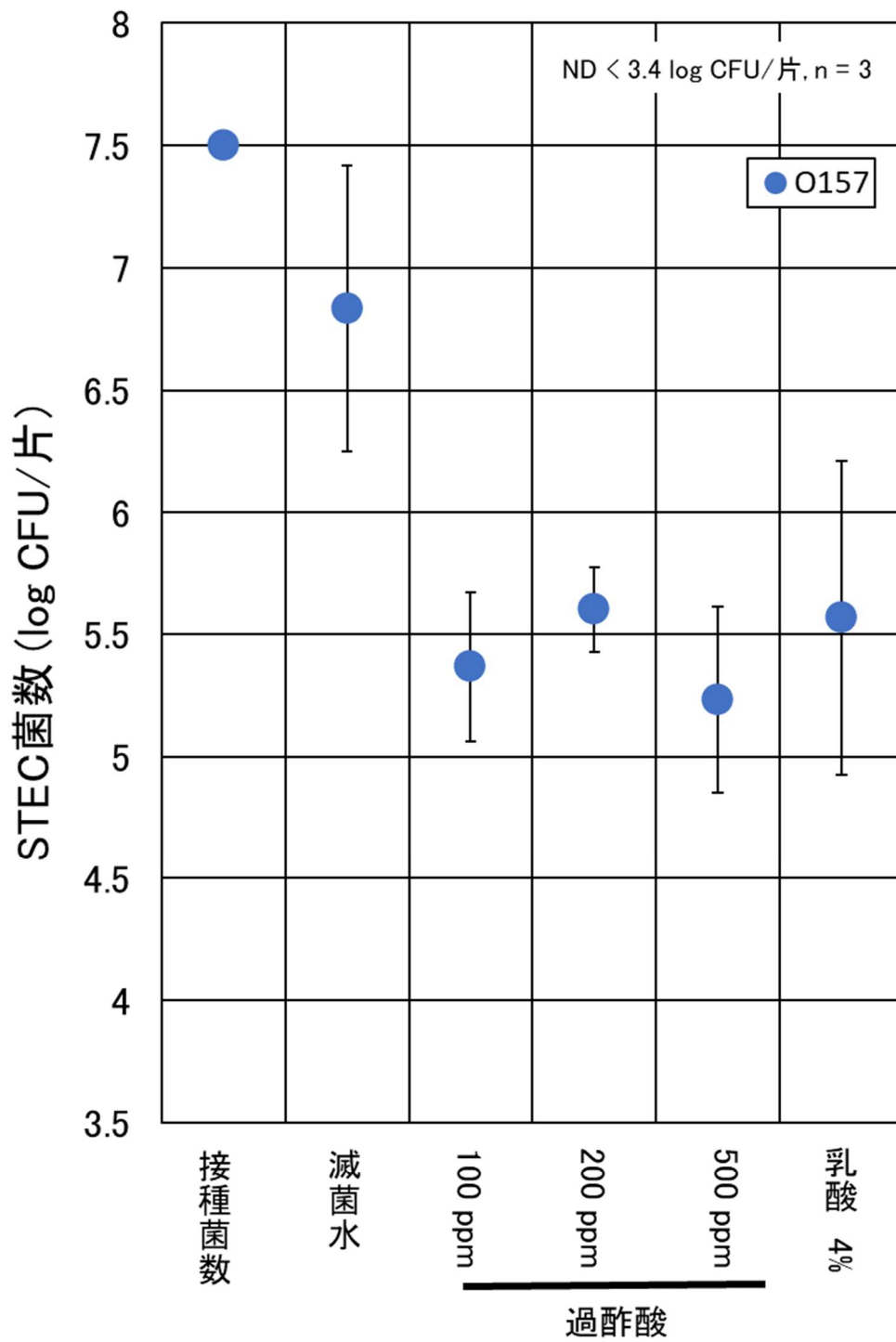


図 2-2 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(25°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し 500 mL)

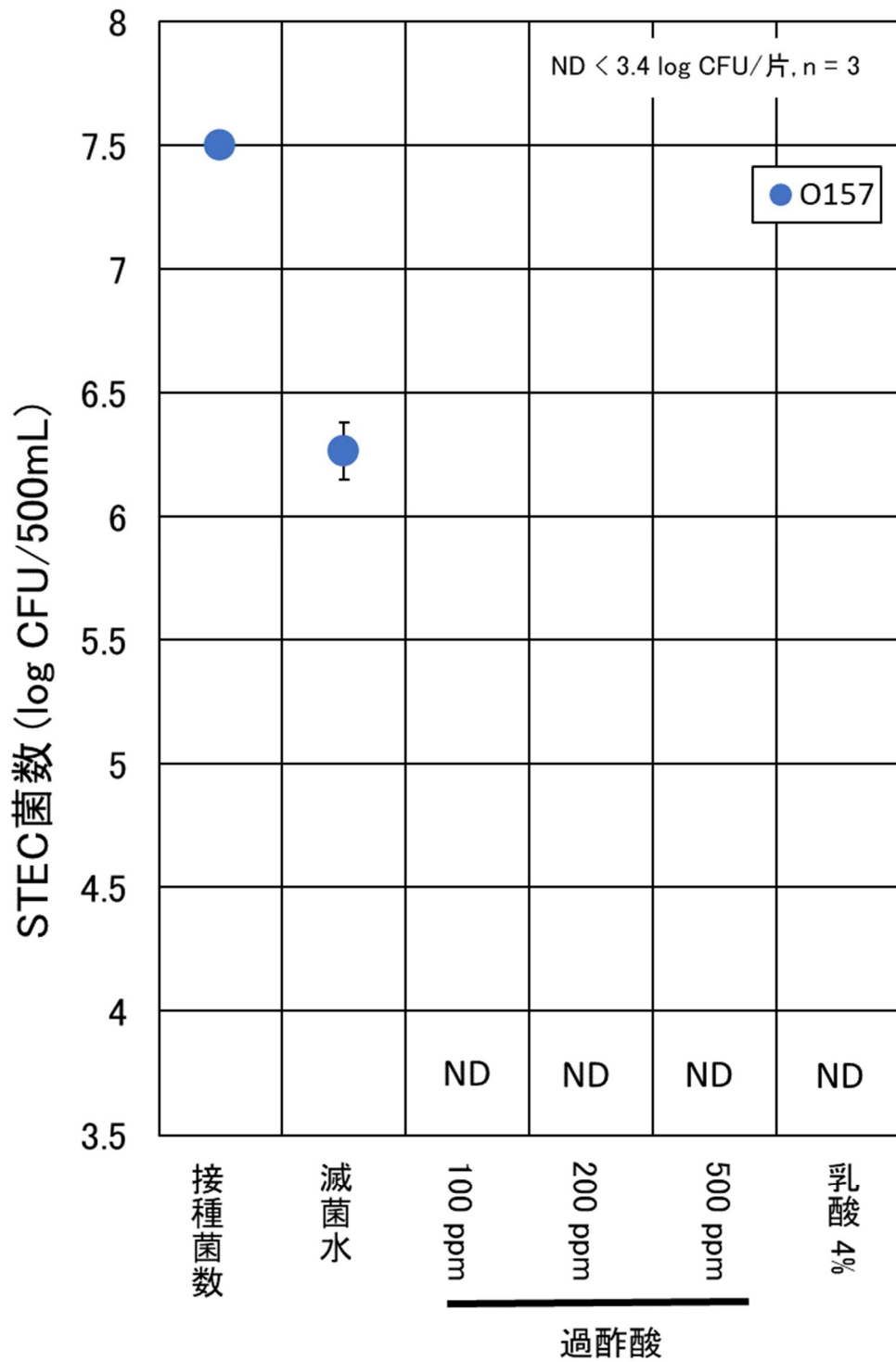


図 2-3 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
 (25℃、筋膜あり検体、消毒液かけ流し後の消毒液 500 mL)

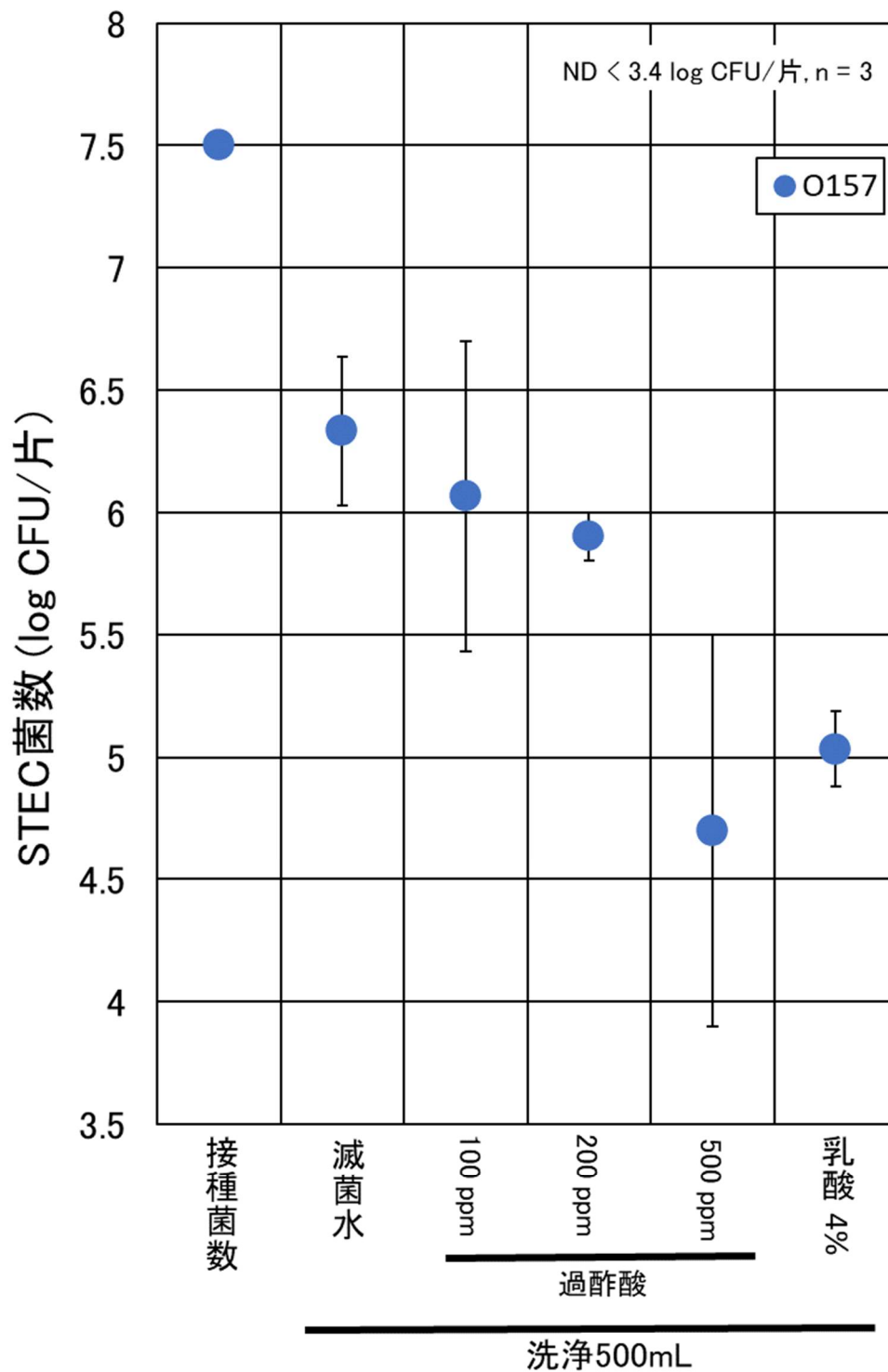


図 2-4 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
 (25°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し 500 mL、消毒後の洗浄滅菌水 500 mL)

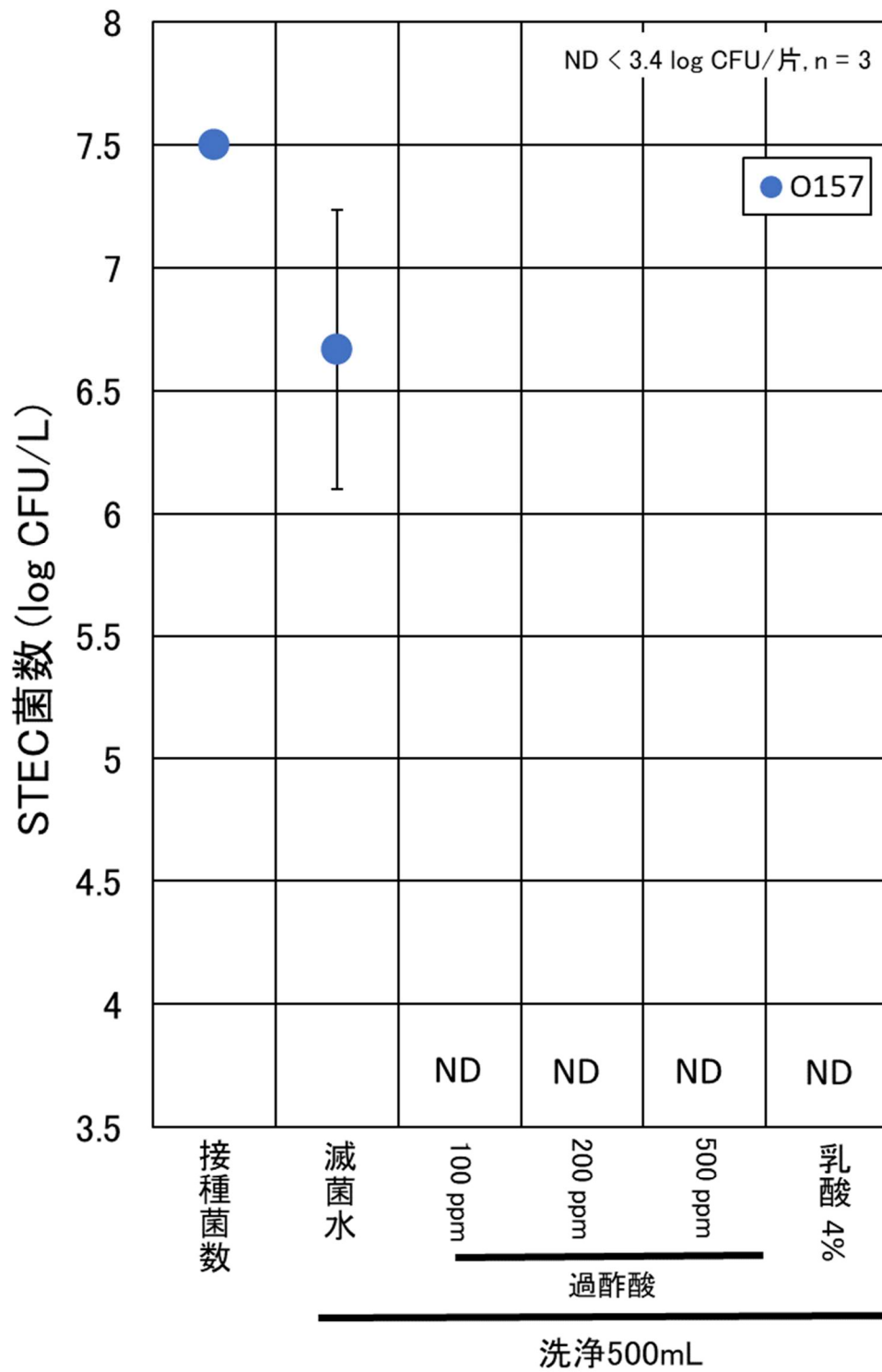


図 2-5 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
 (25°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し後の消毒液および洗浄滅菌水1 L 中)

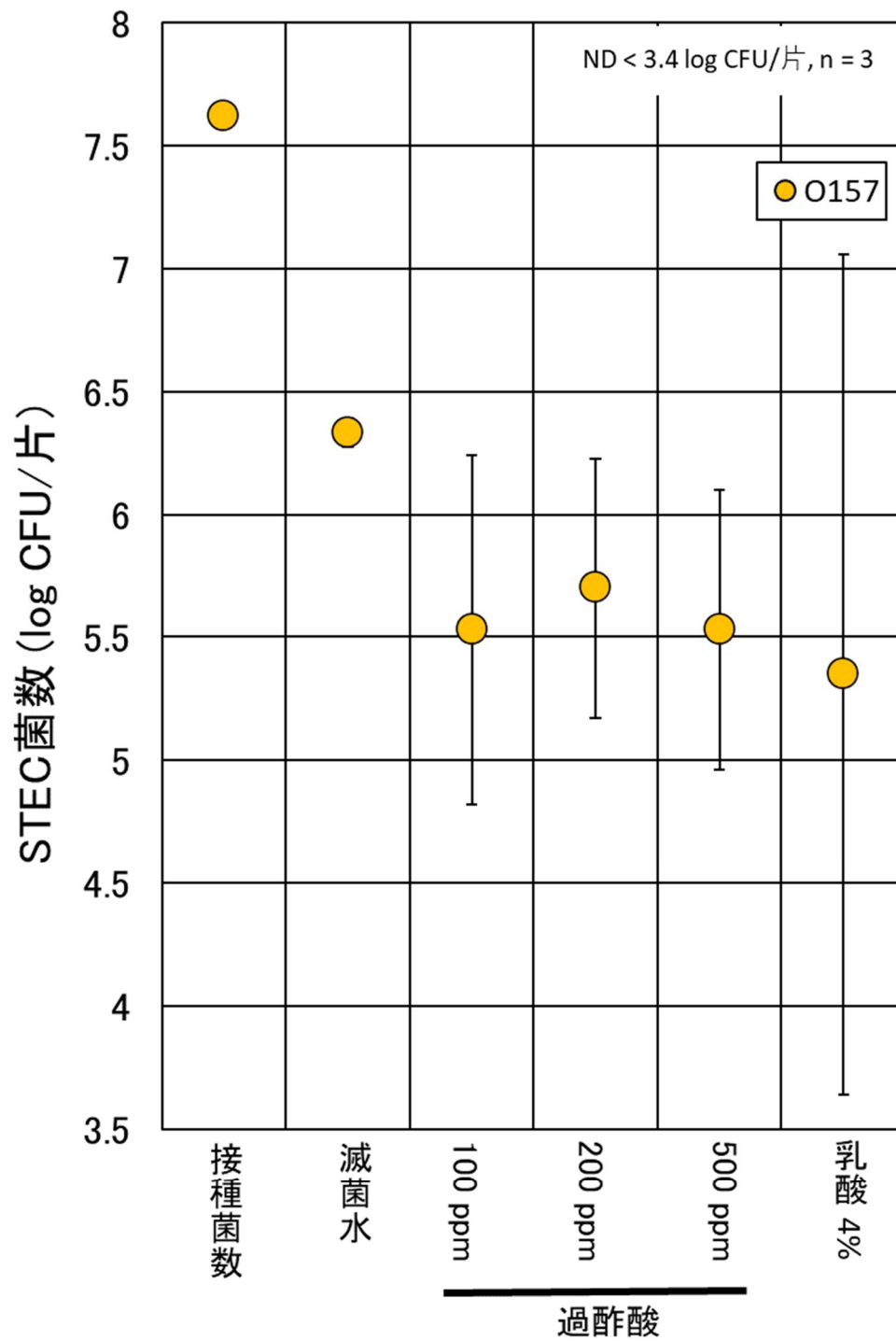


図 2-6 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
(55°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し 500 mL)

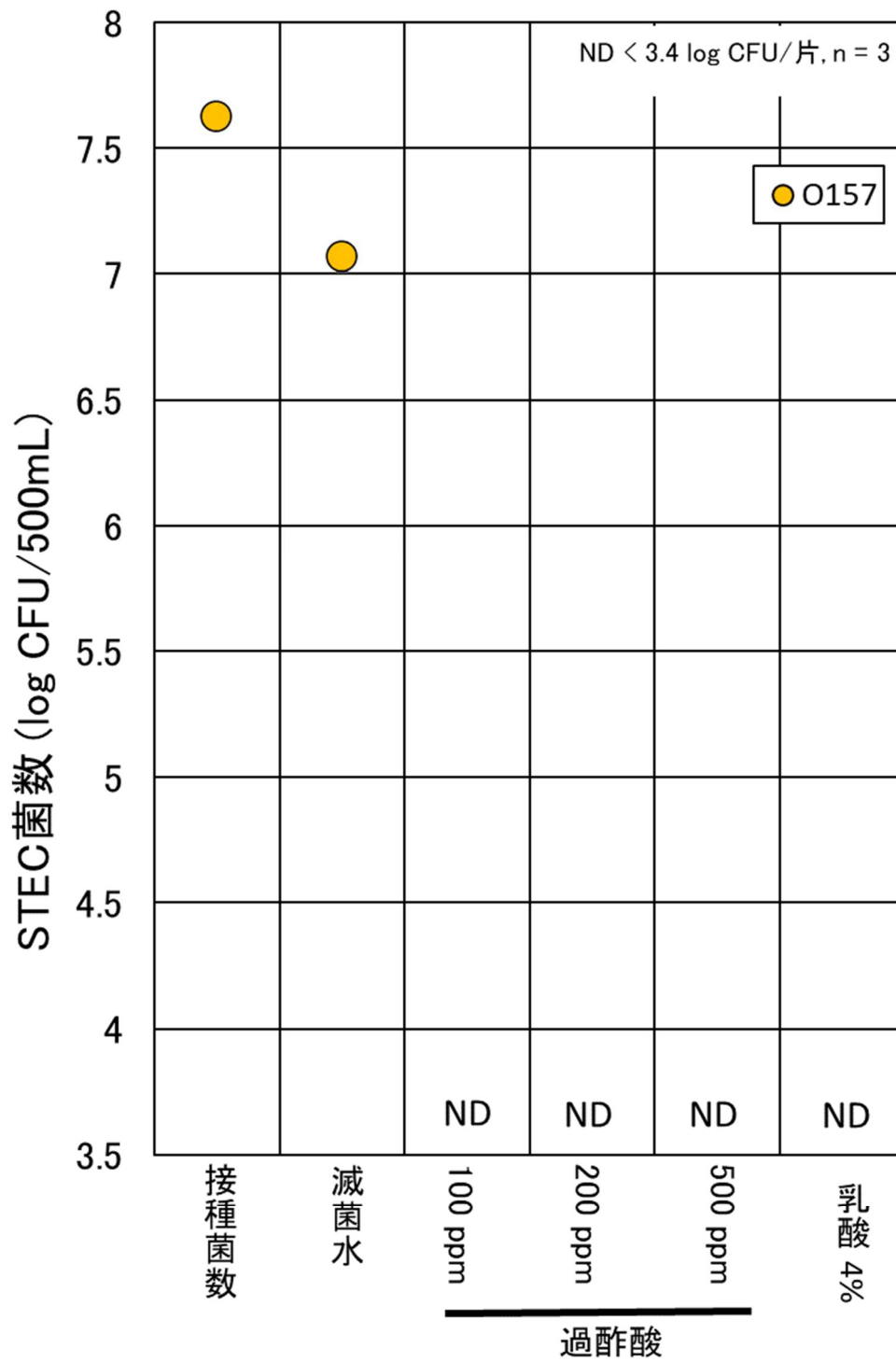


図 2-7 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
 (55°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し後の消毒液 500 mL 中)

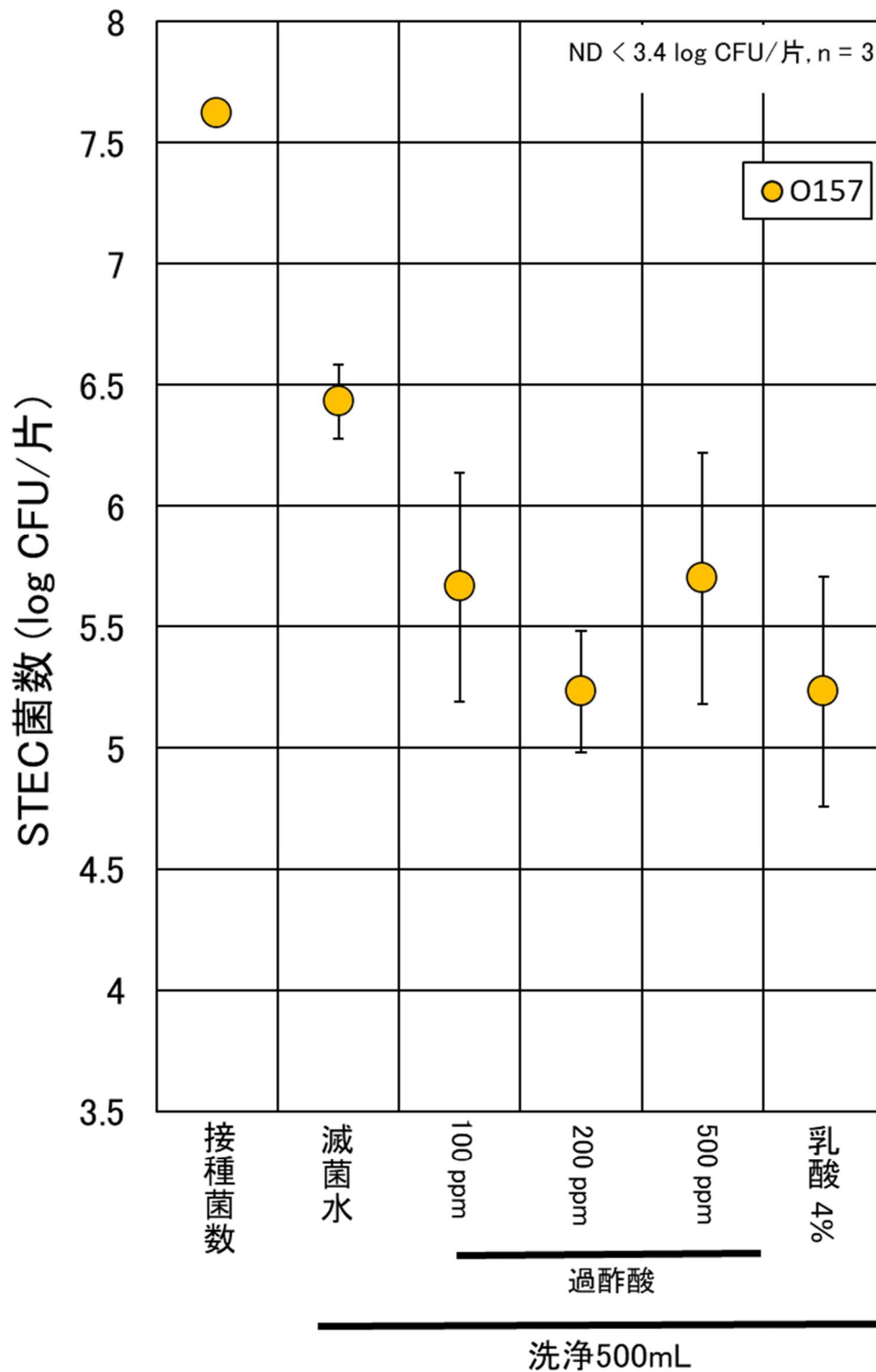


図 2-8 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
 (55°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し 500 mL、消毒後の洗浄滅菌水 500 mL)

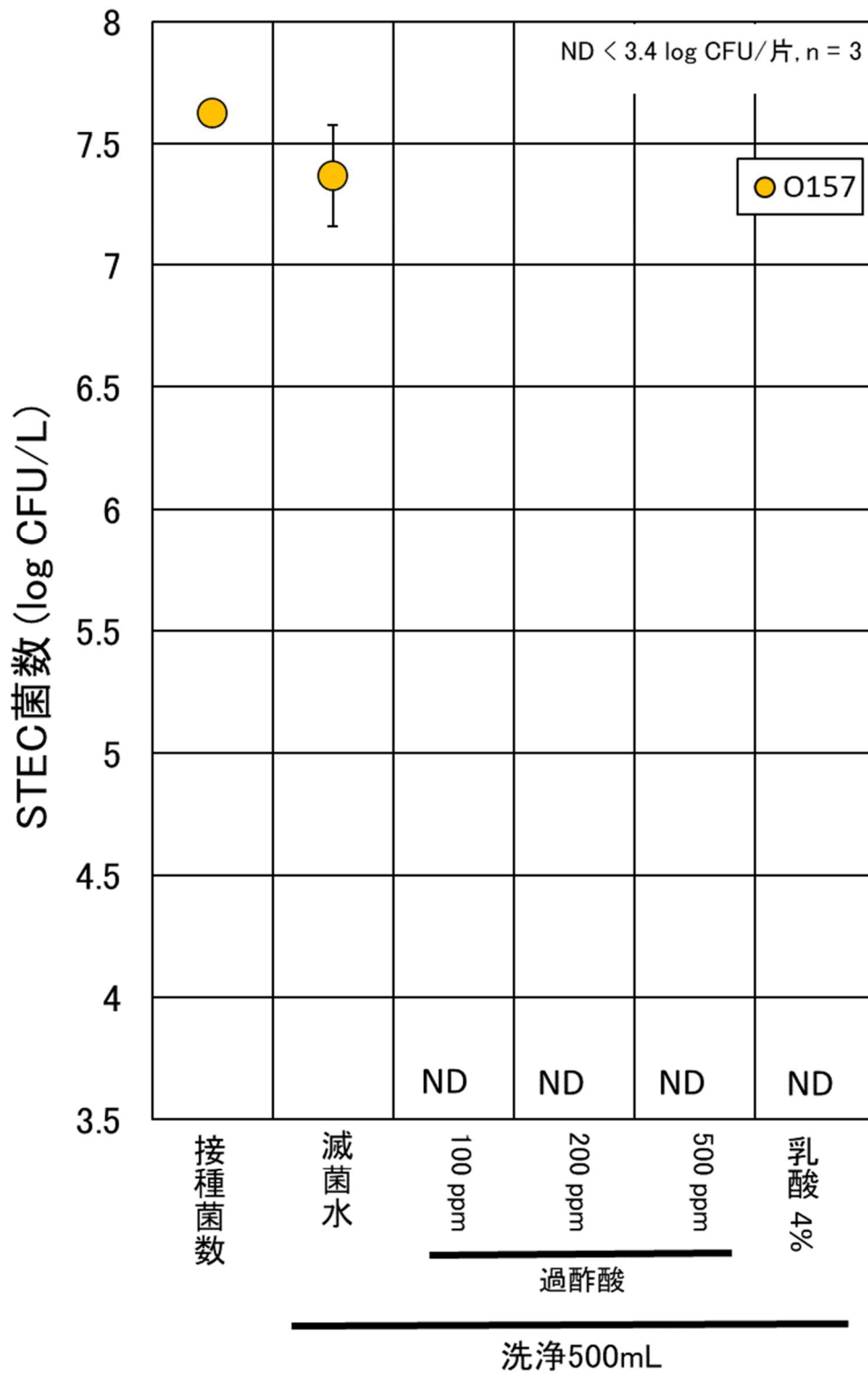


図 2-9 汚染牛肉 STEC への消毒効果の検証
 (55°C、筋膜あり検体、消毒液かけ流し後の消毒液および洗浄滅菌水1 L 中)

表 2-1 消毒試験条件

消毒液	濃度	25°C		55°C	
		洗浄 なし	洗浄 あり	洗浄 なし	洗浄 あり
過酢酸	100 ppm	T	T	T	T
	200 ppm	T	T	T	T
	500 ppm	T	T	T	T
乳酸	4 %	T	T	T	T

T: 実施

表 2-2 55°Cの乳酸の効果あり

論文 No.	著者	タイトル	雑誌	国	概要
1	Signorini, M. ら	Evaluation of decontamination efficacy of commonly used antimicrobial interventions for beef carcasses against Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i>	MEAT SCIENCE Vol. 142 p. 44-51 2018年	アルゼンチン	<p>検体: 牛枝肉 温度条件: 55°C 薬剤: 3%乳酸 効果: 30-60分の換気後2%乳酸を自動塗布、および55°Cでの3%乳酸自動塗布が最も効果的。2%乳酸手動塗布は効果なし。3%乳酸手動塗布は結果なし。 システム: 電動ポンプ (220V) およびステンレスキャビネット (自動塗布) http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.009</p>
2	Castillo, A. ら	Lactic acid sprays reduce bacterial pathogens on cold beef carcass surfaces and in subsequently produced ground beef	JOURNAL OF FOOD PROTECTION Vol. 64 No. 1 p. 58-62 2001年	米国	<p>検体: 牛枝肉 温度条件: 55°C 薬剤: 4%乳酸 効果: 乳酸を使用したプレチル処理およびポストチル処理の消毒効果の検討。プレチル処理では55°C250ml30秒2%乳酸を塗布。ポストチル処理では55°C500ml30秒4%乳酸を塗布。プレチル処理により、<i>Escherichia coli</i> O157:H7および<i>Salmonella Typhimurium</i>は、水洗浄のみでは3.3~3.4 log cycle、水洗浄と4%乳酸では5.2 log cycle減少した。ポストチル処理を加えることにより、<i>E. coli</i> O157:H7は2.0-2.4 log cycle、<i>Salmonella Typhimurium</i>は1.6-1.9 log cycleの追加の消毒効果がみられた。4%乳酸スプレー塗抹のポストチル処理をプレチル処理に組み合わせることで、合計6.8-7.2 log cycle減少が達成された。 システム: なし http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-64.1.58</p>
3	HARDIN, MD. ら	Comparison of methods for decontamination from beef carcass surfaces	JOURNAL OF FOOD PROTECTION Vol. 58 No. 4 p. 368-374 1995年	米国	<p>検体: 牛枝肉 温度条件: 55°C 薬剤: 2%乳酸 効果: 枝肉表面から80cm離れた地点からミスト (200ml、40psi、55°C) で11秒間塗布。2%乳酸は2%酢酸よりも有意に大腸菌 O157:H7 を減少させたが、サルモネラ菌の減少に対する両有機酸の消毒効果の差は顕著ではなかった。 システム: なし http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-58.4.368</p>

表2-3. 55°Cの乳酸・過酢酸の効果あり

論文 No.	著者	タイトル	雑誌	国	概要
4	Eastwood, LC. ら	Efficacy of antimicrobial interventions in reducing <i>Salmonella enterica</i> , Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter</i> , and <i>Escherichia coli</i> biotype 1 surrogates on non-chilled and chilled, skin-on and skinless pork	MEAT SCIENCE Vol. 172 108309 2021年	米国	検体: 豚枝肉 (皮付き、皮なし、ノンチルド、チルド) 温度条件: 55°C 薬剤: 5%乳酸 効果: 2.5%および5%乳酸のスプレー塗布によるSTECの減少は0.8から1.7 log10CFU/cm ² であった。ノンチルド皮なし枝肉に最も消毒効果があった。乳酸およびPAA処理は、処理した豚肉の客観的および官能的な色彩評価では、豚肉の色彩への悪影響は最小限であった。 システム: なし http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108309

表2-4. 55°C以外の乳酸の効果あり

論文 No.	著者	タイトル	雑誌	国	概要
5	Pipek, P. ら	Microbial decontamination of beef carcasses by combination of steaming and lactic acid spray	JOURNAL OF FOOD ENGINEERING Vol. 67 p. 309-315 2005年	チェコ共和国	検体: 牛枝肉 温度条件: 45°C 薬剤: 蒸気および2%乳酸 効果: 使用した薬剤は2%乳酸のみ。本文では、蒸気と2%乳酸を組み合わせた消毒法の有効性を検討している。本消毒法では、牛枝肉表面の微生物数(低温細菌および中温細菌)が減少し、消毒後の低温保存中の微生物増殖を遅延させることを示した。枝肉や食肉の保存期間を大幅に延長することができるとしている。 システム: なし http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.04.033
6	Ba, HV. ら	The effects of pre-and post-slaughter spray application with organic acids on microbial population reductions on beef carcasses	MEAT SCIENCE Vol. 137 p. 16-23 2018年	大韓民国	検体: 牛 温度条件: 室温(記載なし) 薬剤: 3% 乳酸 効果: 2回に分けたスプレー噴霧の消毒効果の検討。屠殺前に手動スプレーで噴霧(1 L)し、屠殺後最終工程に手動スプレーで噴霧(0.5L)した。3% 乳酸および3%酢酸の噴霧は有意に消毒効果があるとし、2種の有機酸のうち、3% 乳酸がより高い消毒効果を示した。 システム: なし http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.11.006
7	CUTTER, CN. ら	Efficacy of organic-acids against escherichia-coli o157-h7 attached to beef carcass tissue using a pilot-scale model carcass washer	JOURNAL OF FOOD PROTECTION Vol. 57 No. 2 p. 97-103 1994年	米国	検体: 牛枝肉から切取した赤身と脂肪組織(7.5 cm x 7.5 cm x 0.5cm) 温度: 24°C 薬剤: 5%乳酸 効果: 乳酸、酢酸及びクエン酸を異なる濃度(1, 3, 5%)で牛肉塊に噴霧し、組織中の <i>Escherichia coli</i> O157:H7 および <i>Pseudomonas fluorescens</i> の消毒効果を検討。5%乳酸は、組織の種類に関わらずに、用いた薬剤の中で最も効果があった。その他の薬剤についても最も濃度の高い5%が最も消毒効果があった。消毒後の表面pHの結果から、細菌数の減少は酸性pHの影響によるものである可能性が示唆された。 システム: CAPER unit http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-57.2.97
8	Pipek, P. ら	Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid	JOURNAL OF FOOD ENGINEERING Vol. 74 p. 224-231 2006年	チェコ共和国	検体: 豚枝肉 温度条件: 45°C 薬剤: 蒸気および2%乳酸 効果: 使用した薬剤は2%乳酸のみ。通し番号28と同一の方法で検討を行っており、蒸気と2%乳酸を組み合わせた消毒法の有効性を検討している。本消毒法では、豚枝肉表面の微生物数(低温細菌および中温細菌)が減少し、消毒後の低温保存中の微生物増殖を遅延させることを示した。また、その効果は、より汚染された枝肉でより良く、牛肉枝肉と比較してより顕著であった。 システム: なし http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.03.015

表2-5. 55°C以外のカプリル酸・過酢酸・次亜塩素酸および71°C温水の効果あり

論文 No.	著者	タイトル	雑誌	国	概要
9	Cap, M. ら	Inactivation of Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> in fresh beef by electrolytically-generated hypochlorous acid, peroxyacetic acid, lactic acid and caprylic acid	MEAT SCIENCE Vol. 157 107886 2019年	アルゼンチン	検体: 牛もも塊肉 (アイオブラウンド) 温度: 50° C 薬剤: 3%カプリル酸 効果: 15秒間100mlのリンス試験において、3%カプリル酸が最も有効であり、次いで2%乳酸、200ppmペルオキシ酢酸となり、電解水は効果を示さなかった。官能分析では、カプリル酸で処理したサンプルとコントロールサンプルの間で、風味および色のいずれにおいても有意差は認められなかった。 システム: なし http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.107886
10	Pozuelo, KC. ら	Validation of post-harvest antimicrobial interventions to control Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) on market hog carcass surfaces	INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY Vol. 358 109421 2021年	米国	検体: 豚枝肉 温度条件: 常温 薬剤: 酸性化過酢酸 (pH1.2) 効果: 低用量塗布 (3L) のみでの比較した場合、400ppm 酸性化過酢酸 (pH1.2) の処理後の消毒効果は2.3 log10CFU/cm ² で最も効果があった。大容量塗布 (60L) の検討では、71°Cの温水、400ppm 過酢酸および600ppm次亜塩素酸で効果があった。検討されたすべての消毒は枝肉の色に影響を及ぼさなかった。 システム: Chad carcass cabinet http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109421

表 2-6 供試した消毒液による牛肉表面の変色と臭味

温度 (°C)	消毒後 の洗浄 (500mL、 1回)	消毒液	濃度	pH	牛肉表面の変色 (部位による)	臭味
25	なし	純水		6.9	ほとんどなし	なし
		過酢酸	100 ppm	4.2	ほとんどなし	なし
			200 ppm	4	ほとんどなし	弱い酢酸臭
			500 ppm	3.8	ほとんどなし	酢酸臭
			乳酸	4%	2.7	茶褐色
	あり	純水		6.9	ほとんどなし	なし
		過酢酸	100 ppm	4.2	ほとんどなし	弱い酢酸臭を感じる場合もある
			200 ppm	4	ほとんどなし	弱い酢酸臭を感じる場合もある
			500 ppm	3.8	ほとんどなし	弱い酢酸臭を感じる場合もある
			乳酸	4%	2.7	茶褐色
55	なし	純水		6.7	ほとんどなし	なし
		過酢酸	100 ppm	3.9	ほとんどなし	なし
			200 ppm	3.7	ほとんどなし	若干酢酸臭を感じる場合もある
			500 ppm	3.5	ほとんどなし	若干酢酸臭を感じる場合もある
			乳酸	4%	2.4	茶褐色
	あり	純水		6.7	ほとんどなし	なし
		過酢酸	100 ppm	3.9	ほとんどなし	なし
			200 ppm	3.7	ほとんどなし	若干臭いを感じる場合もある
			500 ppm	3.5	ほとんどなし	若干臭いを感じる場合もある
			乳酸	4%	2.4	茶褐色