

I. 総括研究報告

研究代表者 榎山浩

(星薬科大学薬学部)

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または腎臓の物質について筋肉を対象とした分析法を確立し、妥当性を評価することを目的とした。本年度は、鶏の筋肉を対象として14分析法（ドラメクチン分析法、レバミゾール分析法、トリクラベンダゾール分析法、ピペラジン分析法、アンプロロリウム分析法、エトパベート分析法、ナイカルバジン及びハロフジノン分析法、モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン分析法、カルバリル分析法、ペルメトリン分析法、シフルトリン及びフルメトリン分析法、フルニキシン分析法、DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH並びに γ -HCH分析法、PCB分析法；27化合物）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73.4～109.7%、併行精度1.3～11.7%、室内精度3.4～19.9%となり、良好な結果が得られた。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、14分析法は鶏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物質が鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに鶏の筋肉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。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（O26、O45、O103、O111、O121、O145、O157）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 O157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（O157）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。

研究分担者

志田(齊藤)静夏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部第三室長)

研究分担者

工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所

研究協力機関

(一財)日本食品分析センター

研究協力者

星薬科大学 伊藤里恵

研究協力者 (*牛枝肉の STEC 調査研究について)

島田光平(北海道保健福祉部健康安全局食品衛生課*)

児山綾子(北海道東藻琴食肉衛生検査所*)

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

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、欧州理事會指令 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、カルバメート系農薬、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 4 年度(3 年目)は、抗菌性物質以外の B 物質のうち、鶏においてモニタリング対象部位が肝臓又は腎臓の物質(ドラメクチン等の 27 化合物)について、鶏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。

B. 研究方法

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

鶏の筋肉は、インターネット経由で岩手県産(ペラジン分析法は神奈川県川崎市のスーパーで四国産、PCB 分析法はインターネット経由で青森県産)を購入した。可能な限り脂肪層を除き、ロボ

クーブブリクサーを用いて細切均一化した。

- ・ドラメクチン分析法
- ・レバミゾール試験法
- ・トリクラベンダゾール試験法
- ・ピペラジン試験法
- ・アンプロリウム試験法
- ・エトパペート試験法
- ・ナイカルバジン及びハロフジノン試験法
- ・モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン試験法
- ・カルバリル試験法
- ・ペルメトリン試験法
- ・シフルトリン及びフルメトリン試験法
- ・フルニキシン試験法
- ・DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH 並びに γ -HCH 試験法
- ・PCB(28、52、101、138、153 及び 180 の総和)分析法)

の 14 分析法について添加回収実験を行い、妥当性評価試験を行った。

II 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

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。

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)、STEC (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 O157(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°Cに戻して供試した。解凍時に生成したドリップは滅菌した綿でふき取った。

(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°C で 18 時間静置培養した。このうち 8 mL を、4°C、5,000 rpm、15 分間遠心し、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (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°C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°C で 24 時間、クロモアガーSTEC は 37°C で 20 時間、培養し、生育したコロニーを計測した。

(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。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。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

1) 25°C 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 か所（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°C 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°C で 24 時間および 20 時間培養し、コロニーを計測した。

2) 25°C 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°C 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°C) 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°C 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°C 消毒液 500 mL かけ流しの方法（洗浄なし）

55°C に加温した消毒液を用いて「1) 25°C 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°C 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°C に加温した消毒液を用いて「2) 25°C 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

I 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

鶏の筋肉を対象として、以下の 14 分析法を確立し、B 物質 27 化合物について妥当性評価試験を実施した。

- ・ドラメクチン分析法
- ・レバミゾール試験法
- ・トリクラベンダゾール試験法
- ・ピペラジン試験法

- ・アンプロリウム試験法
- ・エトパベート試験法
- ・ナイカルバジン及びハロフジノン試験法
- ・モネンシン、ラサロシド、ナラシン及びサリノマイシン試験法
- ・カルバリル試験法
- ・ペルメトリン試験法
- ・シフルトリン及びフルメトリン試験法
- ・フルニキシシン試験法
- ・DDT、アルドリン及びディルドリン、エンドリン、ヘプタクロル及びヘプタクロルエポキシド、 α -HCH、 β -HCH並びに γ -HCH試験法
- ・PCB (28、52、101、138、153 及び 180 の総和) 分析法)

その結果、真度 73.4~109.7%、併行精度 1.3~11.7%、室内精度 3.4~19.9%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、14 分析法は鶏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。

II 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

(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 \pm SD) 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 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。

(2) STEC7 血清群の分離

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 O 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 O26 (37.9)および O45 (29.0)であった。

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 O157 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 O157 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 O26 および O45 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。

(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

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。

(4) STEC 7 血清群の定量

stx 遺伝子、*eae* 遺伝子および O157 遺伝子のすべてが非検出であった。STEC O157 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つのカテゴリーにまとめた。

（2）消毒液の牛肉汚染 STEC への効果

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。

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。臭味に関しては、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。一方、乳酸では酸臭は認められなかった。

D. 考察

I 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

今年度に検討した 14 分析法は鶏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。このことから輸出再開に向けた検査に適用できると考えられる。

II 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

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 O157 が分離された。STEC O157 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 O157 が高頻度に検出されていることと

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 O157 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るであろう。

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。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。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）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。

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。過酢酸は強力な殺菌効果のある酸化剤として米国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。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。

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。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°Cに加熱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。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。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

鶏の筋肉を対象として抗菌性物質以外のB物質27化合物の分析法（14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、鶏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物質が鶏のモニタリング部位から検出された場合にも速やかに鶏の筋肉（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。

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供試した。1検体(0.7%)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。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（O157）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に加熱した消毒液、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に加熱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。

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

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし