

平成27年度
生食用牛レバー処理技術開発
事業報告書

1 はじめに

ユッケ、レバ刺し等に使用される生食用牛肉及び牛レバーについては、ユッケが原因とされる腸管出血性大腸菌O111による食中毒の発生を契機として、生食用牛肉については「生食用食肉の規格基準（平成23年9月12日付け厚生労働省告示第321号）」（以下「生食用牛肉の規格基準」という。）が設けられた。

これを踏まえ、ユッケ、タタキ等生食用牛肉については、全国食肉事業協同組合連合会（以下「全肉連」という。）が加工現場での生食用牛肉の衛生的な取扱いについての基本及び手順を解説した「生食用牛肉加工マニュアル」、「牛タタキの加工マニュアル」を作成し、関係事業者配布してきたところである。

一方、生食用牛レバーについては平成24年7月から提供が禁止されたが、牛レバーに代替する商品がないこと、生食及び加熱用途による商品価値の差が大きく、これを取り扱う関係事業者の経済的損失も多大であること等から、生産者や食肉加工、卸・小売、飲食業の関係者、また消費者から安全な生食用牛レバーの提供の再開が渴望されている。

しかしながら、これまでの知見では牛レバーの表面はもとより内部からも大腸菌群等が検出され、特に厚生労働省の汚染実態調査（全国16食肉衛生検査所における平成23年8～11月の調査）において少数例ではあるが腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌）がレバー内部から検出されたこと等により、生食用牛レバーの提供が禁止に至った経緯があり、これに対し、生食用牛肉のように表面の加熱処理を行うことや次亜塩素酸ソーダ等消毒剤の浸漬等によって、牛レバー内部の菌群の完全な殺菌ができないこともあって、生食用牛レバーの提供に向けた有効な処理方法が見出せずにいる。

こうした状況を踏まえ、全肉連では昨年度より、衛生、獣医、微生物学の専門家、食肉処理・加工事業者等を委員に委嘱し、生食用牛レバーの提供再開に向け、検討会を開催し、牛レバーの適正な処理方法の開発、検証等を行ってきた。

本年度は、牛レバー内部の菌群の分布状況、特に牛レバーの生食用として供される部位（左葉部）での腸管出血性大腸菌の存在の有無を引続き調査するとともに、「生食用牛肉の規格基準」において衛生指標菌とされた腸内細菌科菌群に関しては、市販の加熱済み食品からも検出されるなど、汚染経路が牛の腸由来に限られるものではなく、空気中や作業者等からの可能性や、食中毒と無関係なリスクの低い細菌まで検出してしまう懸念があるとの専門家の意見も踏まえ、新たに食中毒の原因となるハザードとして腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラ属菌の3菌種を設定し、衛生面に加え、経済・コスト面を考慮したピンポイントかつ迅速な検査法として、遺伝子検査法（PCR法）の確立を目標に、牛レバーの適正な処理方法の開発、検証等を行った。

生食用牛レバーの再開に向けては、現在のところ有効な処理方法等についての知見も少なく、その開発も含め試行錯誤の段階にはあるが、サンプリング（牛レバーの一部を採取し検査）により前述の3菌種が陰性のレバーのみを選別して流通させる識別流通（以下「識別流通」という。）を行うこととし、そのための検査手法として確立を目指したPCR法について、既存の培養法と比較して遜色なくその有用性が確認されたこと、また過酢酸製剤による牛レバー表面

等からの二次汚染防止効果が認められたこと、さらに限られたデータ（353検体）ではあるが牛レバー内部のうち生食用として供される部位（左葉部）からは、これまで腸管出血性大腸菌やサルモネラ属菌の検出がされていないこと、一方、生食用部位（左葉部）からカンピロバクターが検出されたものの、牛レバーの凍結融解処理（マイナス35℃、6日間の凍結後、氷上での24時間チルド解凍）を通じて陽性率が著しく低減できることなど、一定の成果とともに貴重なデータの蓄積が図られた。

昨年度及び本年度の事業の成果が、今後の生食用牛レバーの再開、さらには加熱調理用途の牛レバーの衛生的処理を進める上でも一助となることを願うとともに、本年度新たに取り組み、生食用牛レバーの識別流通に当たってのハザード検査法として提唱したPCR法が、本報告を端緒として、今後、食品の様々な分野において幅広く検討され活用されることを期待し、報告とするものである。

2 事業の目的・趣旨

平成23年10月に「生食用食肉の規格基準」が施行され、平成24年7月に生食用牛レバーの提供が禁止された。

特に、鮮度の関係から国産品が専ら使用されてきた牛生レバーの提供の禁止は、生産者はもとより国産牛の内臓を取扱う加工・流通・外食業者等に多大な経済的損失を与える等大きな影響がみられた。

生食用牛レバーの提供再開に向けた関係者の根強い意向等を踏まえ、厚生労働省においても、放射線利用や洗浄消毒等による牛レバーの殺菌処理等についての調査・研究が実施されているが、放射線による牛レバーの処理については、現時点では国民感情面での抵抗や理解不足もあり、多くの消費者の受け入れは困難と予想される。

このため、全肉連では（独）農畜産業振興機構の助成を受け、生食用牛レバーの提供再開に向け、衛生的な処理・加工・流通のための基礎技術の確立を図ることとし、昨年度に続き、腸管出血性大腸菌をはじめ、牛レバー内部での菌群の分布状況の調査を実施する。

さらに平成24年7月に食品衛生法に基づき牛レバーの生食が禁止される根拠となった腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターに加えサルモネラ属菌の3菌種を牛レバーを生食する場合におけるハザードとして設定し、当該3菌種についての遺伝子検査（PCR法）と公定法（培養法）との比較、検出感度の確認等により有用性の検証を行うとともに、食品添加物として認可される方向にある過酢酸製剤による二次汚染防止技術の実証等を図るため、実態調査、基礎的データの蓄積を図ることとする。

3 事業の実施内容

(1) 検討会の開催

事業の目的を踏まえ、下記の具体的な事項についての検討を行うため、学識経験者、食肉事業者等を委員とする生食用牛レバー処理技術開発検討会を開催した。

①検討事項

- ア 牛レバー表面・内部、胆汁中の各種細菌群の分布状況の調査
- イ 腸管出血性大腸菌の牛レバー内部（生食用部位・非生食用部位）の分布状況の調査
- ウ リアルタイムPCR法と培養法の比較によるPCR法検証試験
- エ PCR法の検出感度確認試験
- オ 過酢酸製剤による牛レバー表面の殺菌試験
- カ その他、前年度から引き続いての牛レバー処理方法等の検討
 - ・牛レバーの採取時期の検討
 - ・牛レバーの前処理・消毒方法（消毒剤・濃度・洗浄方法等）の検討
 - ・牛レバーの保存方法（温度管理）、凍結・融解方法の検討
 - ・牛個体ごとの牛レバー検査による識別流通方法の検討

②検討委員会の委員

検討委員会の委員は下記のとおり。

委員氏名		所属・役職
1	関崎 勉	東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
2	浅井 鉄夫	岐阜大学大学院連合獣医学研究科 教授
3	山崎 伸二	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 教授
4	山口 葵	(一社)日本畜産副産物協会 会長
5	田島 実	(一社)日本畜産副産物協会 副会長
6	大森 一隆	東京芝浦臓器株式会社 常務取締役
7	森田 邦雄	(一社)食肉科学技術研究所 専務理事
8	河原 光雄	全国食肉事業協同組合連合会 会長

※検討会には、上記委員の他、アドバイザーとして検査・分析機関及び農林水産省、(独)農畜産業振興機構の担当者が出席。

4 試験調査等の結果概要

(1) 結果概要

①PCR法について

- 牛レバーを生食する場合におけるハザードは、平成24年、食品衛生法に基づき生食が禁止される根拠となった腸管出血性大腸菌及びカンピロバクターに加えサルモネラ属菌の3菌種とした。
- 牛レバーの生食用部位（左葉部）の先端内部を部位1、左葉部方形葉側内部を部位2、胆管付近内部を部位3として、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌及びカンピロバクターについて50検体（部位1については21検体目から開始）をPCR法及び培養法により

検査を行った。

その結果、腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌については全て陰性であった。カンピロバクターについては、部位1については10/30（33%）、部位2については12/50（24%）、部位3については9/50（18%）と検出された。

なお、この結果はPCR法及び培養法ともに一致していた。（一般社団法人食肉科学技術研究所の結果）

- PCR法について、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌及びカンピロバクターを0.0014CFU/g*となるよう調整した培養液について検査した結果、いずれも適正に検出された。
 - *PCR法による検出感度確認試験のため、「生食用牛肉における腸内出血性大腸菌及びサルモネラ属菌の食品健康影響評価」における達成目標値（PO）を培養液の希釈の基準として設定し調整した。
- さらに腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌及びカンピロバクターを同時に検出するマルチプレックスPCR法を構築し、特異性、感度を確認したところそれぞれ100%であった。また、スパイク実験と増菌培養によりそれぞれの菌に対する検出下限を調べた結果、純培養菌で1から10CFU/PCRチューブ、スパイク実験で1から10CFU/50gであった。（大阪府立大学の結果）

②過酢酸製剤による牛レバー表面の殺菌試験について

腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクター及びリステリア・モノサイトゲネスについて牛レバー表面に塗布し、200ppmに調整した過酢酸製剤を噴霧した後の拭き取り検査の結果、腸管出血性大腸菌が 3.2×10^4 から4に、サルモネラ属菌が 4.4×10^4 から 1.2×10 に、カンピロバクターが 8.4×10^4 から0に、リステリア・モノサイトゲネスが 1.8×10^4 から4にそれぞれ減少していた（単位はいずれもCFU/100cm²）。（一般社団法人食肉科学技術研究所の結果）

③牛レバー内部におけるstx遺伝子等の検出について

- 牛レバー内部における汚染状況を牛レバーの生食に供される左葉部を部位1及び部位2とし、生食に供されない右葉部を部位3、部位4及び部位5と分割し、腸管出血性大腸菌について、stx遺伝子の検出を行い、部位1については0/221、部位2については0/225といずれも生食に供される部位では陰性であった。
 - 一方、部位3については2/220（1.0%）、部位4については3/211（1.6%）、部位5については2/211（1.1%）と生食用に供されない部位（以下「非生食用部位」という。）においては陽性のものがあった。（2012年11月～2015年9月23日）
 - さらに別の時期の結果では、部位1～5で0/78の結果もみられている。（2015年10月～2016年3月1日）
 - これら生食・非生食用部位を含む牛レバー全体の通算での陽性率は1.7%（5/

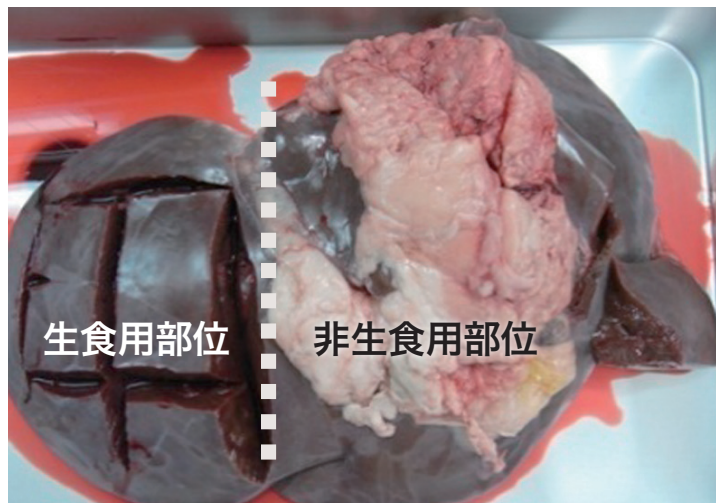
303) となっている。(大阪府立大学の結果)

- 一方、前述のPCR法での検証試験の結果では、牛レバー内部（50検体の生食用部位（左葉部）、その他）において腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌は検出されなかった。(一般社団法人食肉科学技術研究所の結果)

④凍結融解処理によるカンピロバクターの生存率について

- 前述のPCR法の検証試験の結果では、カンピロバクターについては、部位1については10/30（33%）、部位2については12/50（24%）、部位3については9/50（18%）と検出された。(一般社団法人食肉科学技術研究所の結果)
- 牛レバーの凍結融解処理（マイナス35℃、6日間）を行った試験では、部位1では凍結融解無しと凍結融解有りでそれぞれ40%（51/129）と3%（2/67）の陽性率に、部位2では35%（45/129）と0%（0/68）の陽性率になっており、凍結融解処理によりカンピロバクターの陽性率は著しく減少した。一方、胆汁の陽性率は64%（93/135）で、凍結融解後で陽性となった2検体は胆汁中の菌数が 10^6 CFU/mL以上と著しく菌数が多かった検体であり、事前にイムノクロマトグラフィー等で胆汁中のカンピロバクターを検出し、菌数の多いものについて排除することができれば、凍結融解によって検出限界以下にすることも可能である。(大阪府立大学の結果)

注) 牛レバー内の部位の位置標記は、一般社団法人食肉科学技術研究所と大阪府立大学で相違があるので、別添のそれぞれの報告書を参照のこと。なお、(1) 結果概要中においては、生食用部位（左葉部）の番号のみ斜体表記（例：部位1,2）した。



(参考画像) 生食用部位と非生食用部位の位置関係

(2) PCR法等のプロトコール及び結果概要

PCR法のプロトコール及び各調査の結果等については、それぞれ一般社団法人食肉科学技術研究所及び大阪府立大学の報告（別添）を参照のこと。

(3) 全体考察

①PCR法の有用性について

生食用牛レバーの提供再開に向け、識別流通と組み合わせた迅速検査法としてPCR法の

検証試験を行ったところ、腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌に関しては全て陰性、カンピロバクターに関しては17試料で陽性が認められ、PCR法と培養法との検査結果が一致したことが確認された。

また、PCR法の検出感度確認試験においても、各菌種を希釈後添加し、培養後の増菌液をPCR法により検査した結果、それぞれ適正に検出されPCR法の有用性が検証できた。

さらに、ハザードの3菌種を同時検出するマルチプレックスPCR法についてもスパイク実験で10CFU/50g以下で検出可能であり、その有用性が示された。

②腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクターの検出状況及び汚染経路について

- *stx* 遺伝子（腸管出血性大腸菌）に関しては、本事業で実施した計353検体（大阪府立大学303検体、一般社団法人食肉科学技術研究所50検体）全てにおいて生食用牛レバーとして供される左葉部からは検出されず、それ以外の部位（非生食用部位）においては、1.4%の陽性率（大阪府立大学で1.7%（5/303）、一般社団法人食肉科学技術研究所で0%（0/50））で検出されている。

一方、生食用牛レバー提供禁止の判断材料の一つとなった、平成23年8月から11月の全国16の食肉衛生検査所の実態調査の結果では、牛レバー内部として1.7%（3/173）の陽性率（ちなみに、牛レバー表面は6.7%（13/193）の陽性率）となっており、その際のサンプリングの部位は特定されていないが、今回の調査結果における非生食用部位での*stx* 遺伝子の陽性率にほぼ近い数値となっている。

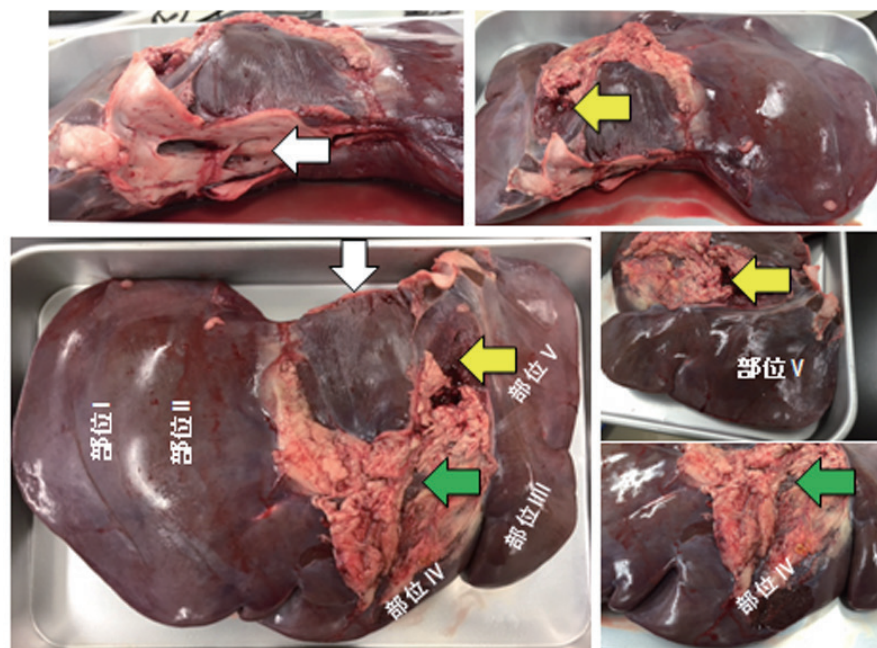
ちなみに、サルモネラ属菌については生食用部位（左葉部）、非生食用部位とも検出されていない（一般社団法人食肉科学技術研究所で陽性率0%（0/50））。

- 一方、カンピロバクターについては、生食用部位（左葉部）で24～33%、非生食用部位で18%の陽性率で検出されており（いずれも一般社団法人食肉科学技術研究所の結果）、前述の腸管出血性大腸菌等の検出状況と異なった様相となっている。
- このことから、カンピロバクターについては胆汁中で高い陽性率を示したことから、胆汁、胆管を介した牛レバーの内部汚染の可能性が考えられた。これに対し、*stx* 遺伝子については、牛レバー表面で検出されている（大阪府立大学で7.6%（16/211）の陽性率）ものの、胆汁中からは検出されておらず（大阪府立大学で0%（0/277））、さらに牛レバー内部については、硬膜に覆われ外部損傷の殆どみられない牛レバー先端部の生食用部位（左葉部）からは検出されておらず、全て非生食用部位からの検出となっている。このことから、牛レバーの腸管出血性大腸菌の汚染は、屠畜解体時及び牛レバー検査時の胆管や門脈の切除等牛レバーの表面の損傷を介する外部からのもので、カンピロバクターで見られたように当初予想した胆汁、胆管を介する汚染とは異なった経路からの汚染の可能性が考えられた。

- いずれにしても、牛レバー内部からの腸管出血性大腸菌の検出の報告が生食用レバーの提供禁止の判断材料となり、一方、現時点において生食用として供される牛レバー先端部

(左葉部)からは腸管出血性大腸菌が未検出である点に留意するならば、今後さらにデータ数を積み重ね、牛レバー内部における腸管出血性大腸菌または糞便系大腸菌の分布状況、特に生食用部位における腸管出血性大腸菌の存在の有無、汚染経路等について実態解明に努めることが重要と言える。

「参考写真：牛レバー表面の切除部位及び損傷状況」



※矢印はそれぞれ切除部位を表す。(白：静脈、緑：胆管、黄：門脈)
部位1と2はほとんど傷ついていないが、部位3～5は切除面のほか、物理的な損傷を受けている。

③過酢酸製剤の効果について

過酢酸製剤を用いた牛レバー表面の殺菌試験（前述3菌種にリステリア・モノサイトゲネスを加えた4菌種）についての結果から、過酢酸製剤*は濃度200ppmで十分効果があることが認められた。

特に有機物との接触により不活化しやすい塩素系消毒剤に比べ、過酢酸製剤の殺菌効果が高いことから、硬膜に覆われ表面の損傷の殆どみられない生食用部位（左葉部）の表面からの二次汚染防止には有用と考えられる。

*過酢酸製剤は、本報告書作成時（平成28年3月）において、食品安全委員会から厚生労働省に健康影響評価が通知されており、今後使用基準1800ppmで認可される方向にある。

④カンピロバクターの制御について

○ カンピロバクターについては生食用部位からも検出されたが、牛レバーの凍結融解処理によって著しく検出限界まで減少する（マイナス35℃、6日間）。一部胆汁中に 10^6 CFU/mL以上と高濃度のカンピロバクター属菌が存在した場合、 10 CFU/gほど残存した場合もあった。事前に胆汁中に 10^6 CFU/mL以上のカンピロバクターが存在

する検体を排除するか、あるいは凍結期間が長いほどより死滅しやすいことが報告されているので凍結条件を最適化し 10^7 CFU/gのカンピロバクターでも死滅させることのできる凍結融解条件を見出せば、PCR法による生食用牛レバーの識別流通に併せ、凍結保存・融解処理等の行程を加えることにより、大幅なリスクの低減が可能であると考えられる。

なお、過去の試験において、一度の凍結・融解処理では、鮮度（見た目や食感等）において新鮮な牛レバーと遜色ないことも報告されている。

⑤生食用牛レバーの識別流通の実現可能性について

○ 生食用牛レバーの識別流通に向けては、

ア．ハザード検査法としてPCR法の有用性が確認されたこと

イ．生食用部位（左葉部）では腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌が全て陰性であること

ウ．生食用部位で検出されたカンピロバクターについては凍結融解処理により著しくリスク低減が図れること

エ．過酢酸製剤の噴霧によりに牛レバー表面からの二次汚染防止効果が高いこと等の結果から、

i．衛生的に処理されたと畜場から得た牛レバーについて、速やかに中心部がマイナス35℃に達するよう凍結する。

ii．6日間経過後、凍結した牛レバーから検体を採取し、PCR法によりそれぞれの特異遺伝子を検出することにより腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌及びカンピロバクターについて陰性であるかどうかを確認する。

iii．陰性が確認され選別された牛レバーについて、リステリア・モノサイトゲネスを含む牛レバー表面からの二次汚染を考慮して200ppmに調整した過酢酸製剤を噴霧した後、商品として出荷する。

等により、牛レバーを生食することによる人の健康被害を防止できるものと思われる。さらに、これらの検査を積み重ね、殆どの牛レバーについて、腸管出血性大腸菌やサルモネラ属菌に加えカンピロバクターについても陰性であることが確認できることになれば、検体について、例えば50検体を混合して1検体とするコンポジット方式の採用により検査コストの大幅な低減も可能と思われる。

○ 以上のように、生食用牛レバーの識別流通のためのPCR法の検証等、基礎技術面において一定の成果が得られたものの、その実現に当たっては、検査法（PCR法）の確立のみならず、牛レバーの衛生的な処理を担保するための分離処理、洗浄消毒、温度管理、凍結保存・融解処理等に処理手順や商品の管理方法を標準化することや施設の条件等について詰めるべき課題が残されており、今後、牛レバーの内部の腸管出血性大腸菌の分布等の解明に併せ、これら処理・管理面での取組みも進めて行く必要がある。

研究課題：生食用牛レバー処理技術開発基礎研究

一般社団法人 食肉科学技術研究所

1. 目的

牛レバーを生食用として流通させる方策の検討に当たっては、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及びサルモネラ属菌などの食中毒細菌にレバー内部が汚染されていないことが前提となるため、PCR 法にて選別が可能であるか実験した。また、牛レバー内部が汚染されていないくても、表面は食肉処理場で交差汚染を受ける可能性がある。

そこで、交差汚染を想定して、食品添加物として使用が許可されている過酢酸製剤を用いて牛レバー表面の食中毒細菌を殺菌することができるかを併せて実験することとした。

2. 実験方法

1) 牛レバー内部が腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及びサルモネラ属菌に汚染されていないことを PCR 法及び培養法により確認した。

(1) PCR 法による検査

検査に供する牛レバーは、生食用に供する左葉部分の先端内部 (21 試料目より実施)、方形葉側内部及び胆管付近内部からそれぞれ 25 g ずつ採取した。(図 1、図 2、図 3)

①腸管出血性大腸菌検査

採取した牛レバーに 9 倍量の mEC 培地を加え、 $42.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養した。培養液を PCR 検査用キット・TaKaRa CycleavePCR O157(VTgene) Screening Kit Ver.2.0 の手順に沿って検査した。

②カンピロバクターの検査

採取した牛レバーに 100ml のプレストン培地を加え、 $42.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、24 時間微好気培養した。培養液を PCR 検査用キット・TaKaRa CycleavePCR Campylobacter(jejuni/coli) Typing Kit の手順に沿って検査した。

③サルモネラ属菌の検査

採取した牛レバーに 9 倍量の BPW 培地を加え、 $37.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養した。



図 1. 左葉部分先端内部より採取

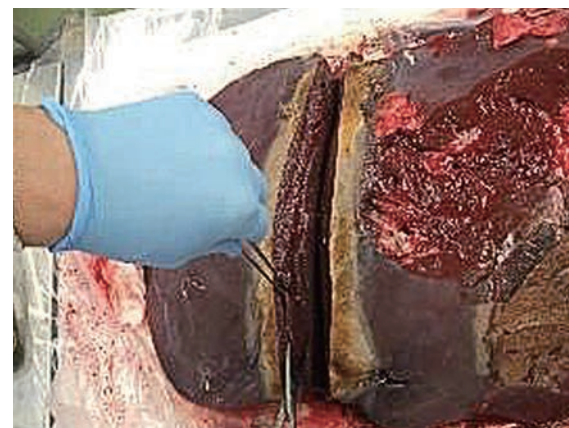


図 2. 左葉部分方形葉側内部より採取



図 3. 胆管付近内部より採取

培養液を PCR 検査用キット・TaKaRa CycleavePCR Salmonella Detection Kit Ver.2.0 の手順に沿って検査した。

(2) 培養法による検査

①腸管出血性大腸菌検査 1)

PCR 検査に供した培養液 $10\mu\text{l}$ を CT-SMAC 平板培地及び CHR-STEC 平板培地に塗抹し、 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、24 時間培養した。平板上に定型集落が認められた場合は生化学的性状試験を行い、腸管出血性大腸菌の菌種を確定した。平板上に定型集落

②カンピロバクターの検査 2)

PCR 検査に供した培養液 $10\mu\text{l}$ を mCCDA に塗抹し、 $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、48 時間微好気培養した。平板上に定型集落が認められた場合は生化学的性状試験を行い、カンピロバクターを確定した。平板上に定型集落が認められなかった場合は陰性と判定した。

③サルモネラ属菌の検査 3)

PCR 検査に供した培養液 0.1mL を RV 培地 10mL に、1mL を TT 培地 10mL にそれぞれ接種し、 $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養した。培養後 1 白金耳量を、硫化水素の産生により判定する分離用寒天培地 (XLD、DHL) 及び硫化水素産生、非産生によらずサルモネラと判定する分離用寒天培地 (SM2、CHS) のグループからそれぞれ 1 種類を選び、画線塗抹し、 $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 22 時間 $\pm$ 2 時間培養した。平板上に定型集落が認められた場合は生化学的性状試験を行い、サルモネラ属菌を確定した。平板上に定型集落が認められなかった場合は陰性と判定した。

(3) PCR 法の検出感度確認試験

①レバーに 1CFU/ g の菌が存在するよう腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及びサルモネラ属菌を調製し、培養後 PCR 検査に供した。

②腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及びサルモネラ属菌が 0.0014CFU/ g となるよう調製し、培養後 PCR 検査に供した。

2) 1) で汚染のないことを確認した牛レバーの表面に、前 3 菌種及びリステリア・モノサイトゲネスをそれぞれ接種した後、過酢酸製剤を噴霧して培養法によりそれぞれの試験に供した。(図 4)

(1) レバーの表面をアルコールで消毒し十分乾燥させた後、菌数を約 10^4CFU/ g に調製した腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及びサルモネラ属菌をコンラージ棒を用いて 100cm² に塗抹し、約 5 分間放置して菌を定着させた。その後、100cm² の半分を拭取り、残りの半分は 200ppm に調製した過酢酸製剤を噴霧した後拭取り、菌数測定をした。過酢酸製剤の噴霧条件は、市販の噴霧器を使い 15 秒間レバーに噴霧し、その後 30 秒間静置した。

(2) 10⁵CFU/ml に調製した腸管出血性大腸菌、カンピロバクター (ジェジュニ) 及びサルモネラ属菌を塗抹した平板培地に、200ppm (一部 1000ppm も併用) 過酢酸製剤を浸み込ませたペーパーディスクを置き殺菌効果を確認した。

3. 結果

1) PCR 法及び培養法による検査結果 (別紙 1)

牛レバー 50 試料中腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌はいずれの部位においても PCR 法、培養法ともに全て陰性であった。カンピロバクターは 17 試料で陽性が認められた。(陽性率 34.0%) これらは PCR 法と培養法の結果が一致していた。

部位別の陽性率は左葉部分先端内部 (-1)(21 試料目より実施) が 33.0% (10 試料 /30 試料中)、左葉部分方形葉側内部 (-2) が 24.0% (12 試料 /50 試料中)、胆管付近内部 (-3) が 18.0% (9 試料 /50 試料中) であった。

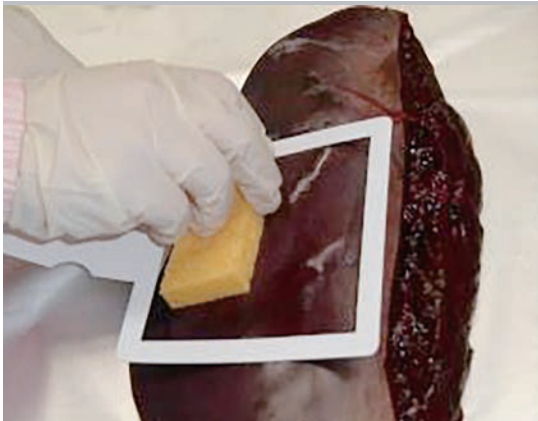


図 4. レバーの拭取り

カンピロバクター陽性 17 試料の検出箇所別の陽性数

検出箇所	陽性試料数	割合
全ての部位注1)	7	41.2%
左葉部分先端内部 (-1) + 左葉部分方形葉側内部 (-2)	4	23.5%
左葉部分先端内部 (-1) + 胆管付近内部 (-3)	1	5.9%
左葉部分方形葉側内部 (-2) + 胆管付近内部 (-3)	0	0
左葉部分先端内部 (-1) のみ	4	23.5%
左葉部分方形葉側内部 (-2) のみ	0	0
左葉部分方形葉側内部 (-2) のみ	1	5.9%

注1) 別紙 1 において、20 試料までは左葉部分先端内部及び左葉部分方形葉側内部を -1、胆管付近内部を -2、21 試料からは、左葉部分先端内部を -1、左葉部分方形葉側内部を -2、胆管付近内部を -3 と表記した。

2) PCR 法の検出感度確認試験結果

(1) 腸管出血性大腸菌 (1.2 × 10⁹CFU/ml)、カンピロバクター (1.3 × 10⁸CFU/ml)、サルモネラ属菌 (1.0 × 10⁹CFU/ml) がレバーに 1CFU/g の菌が存在するよう希釈した後添加し、培養後の増菌液を PCR 法により検査した結果、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及びサルモネラ属は適正に検出された。

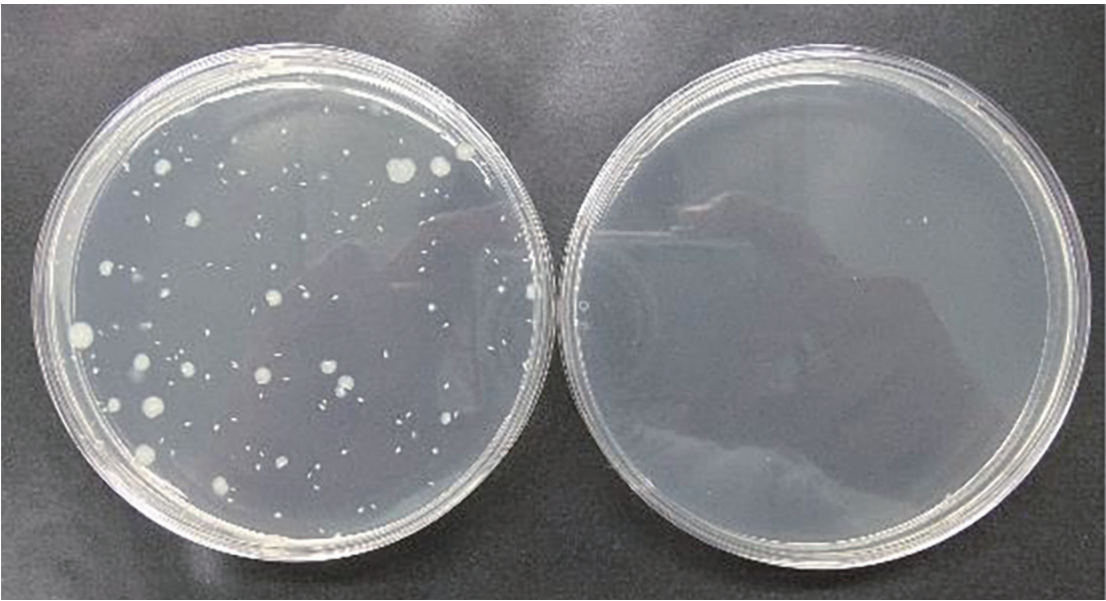
(2) (1) の培養液を 0.0014CFU/ g となるよう調製し、培養後 PCR 法により検査した結果、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター及びサルモネラ属は適正に検出された。

3) 過酢酸製剤による殺菌試験結果

(1) 200ppm に調製した過酢酸製剤*1) 噴霧による拭取り試験

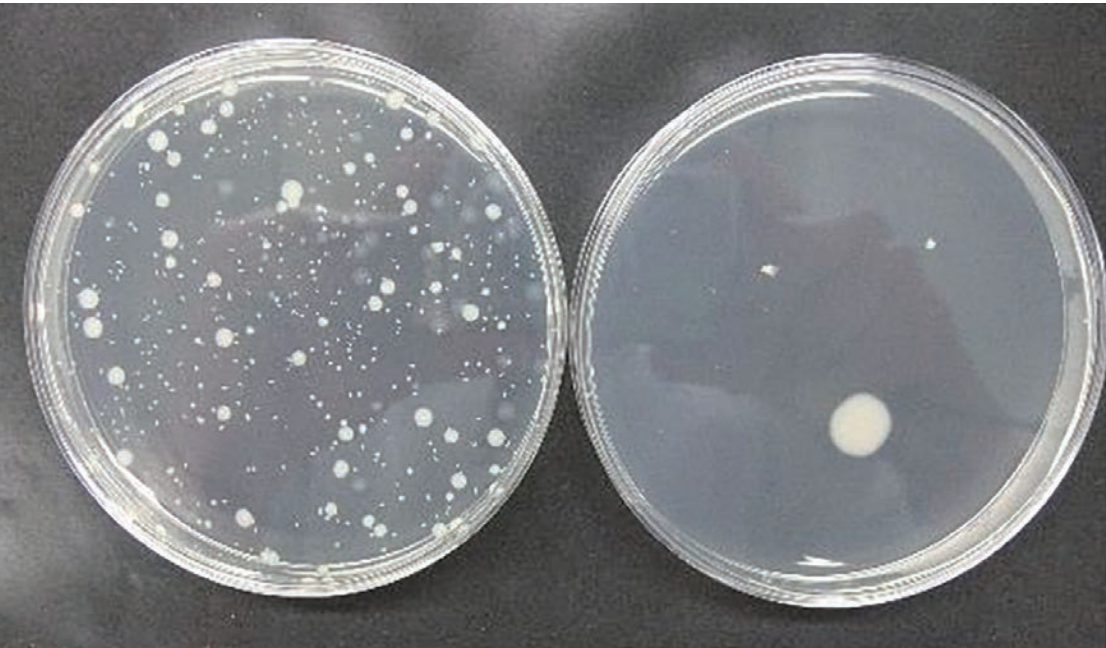
	添加菌数 (CFU/100cm ²)	噴霧後の菌数 (CFU/100cm ²)
腸管出血性大腸菌	3.2×10 ⁴	4
サルモネラ属菌	4.4×10 ⁴	1.2×10
カンピロバクター	8.4×10 ⁴	0
リステリア・モノサトゲネス	1.8×10 ⁴	4

* 1) 過酢酸製剤 150 を使用



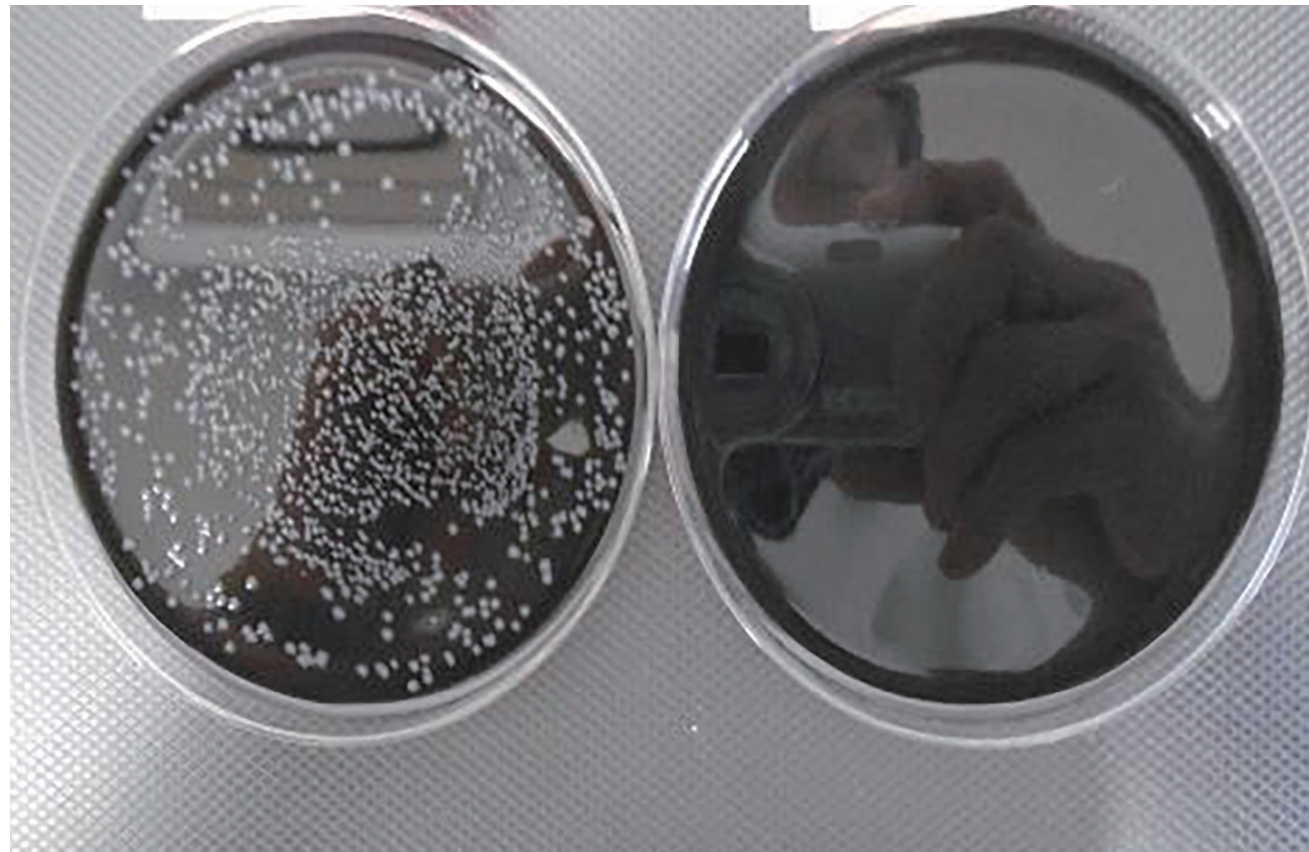
腸管出血性大腸菌添加

噴霧後



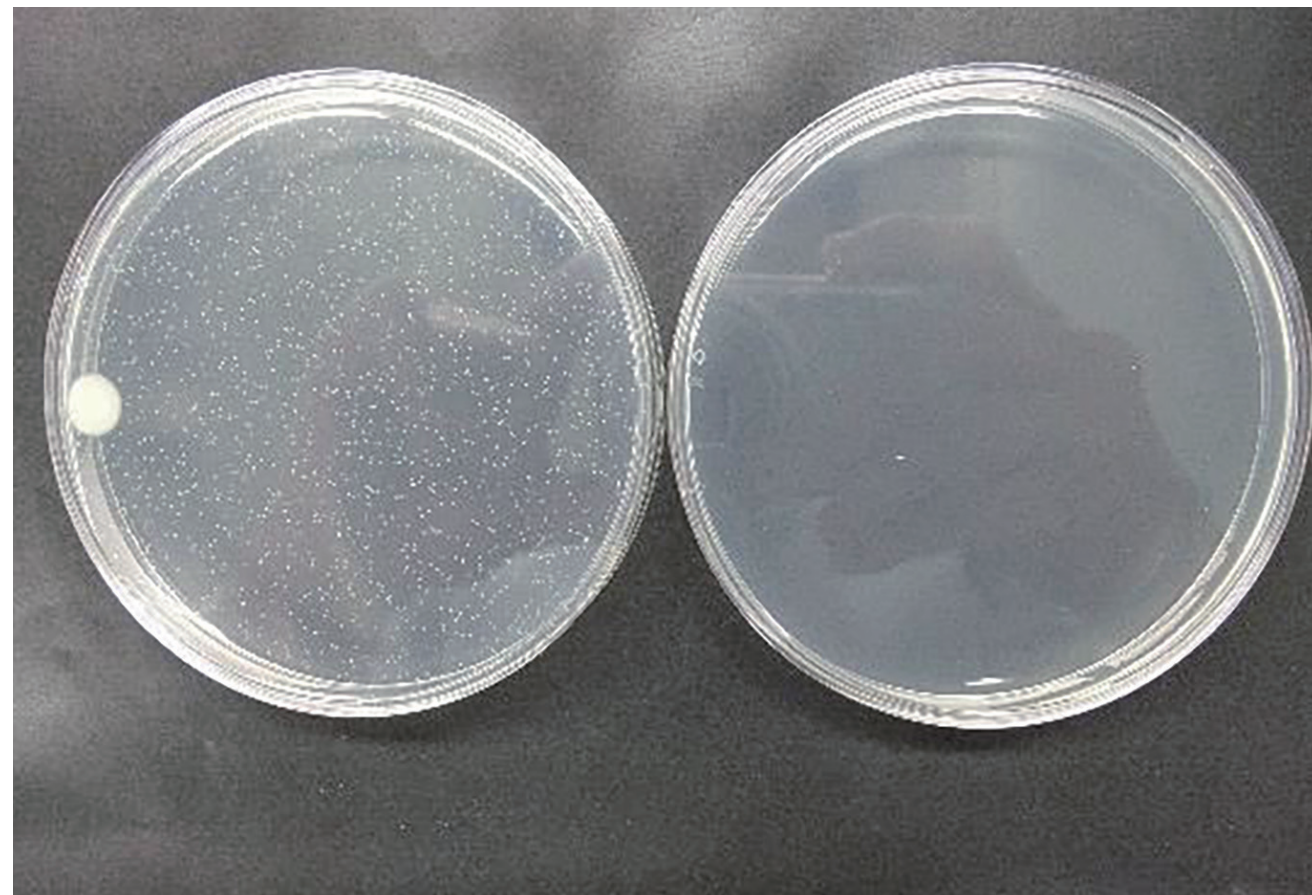
サルモネラ属菌添加

噴霧後



カンピロバクター添加

噴霧後



リステリア・モノサトゲネス添加

噴霧後

(2) 過酢酸製剤による阻止円 (いずれの平板も 10^5 CFU/ml の菌数を塗抹した)



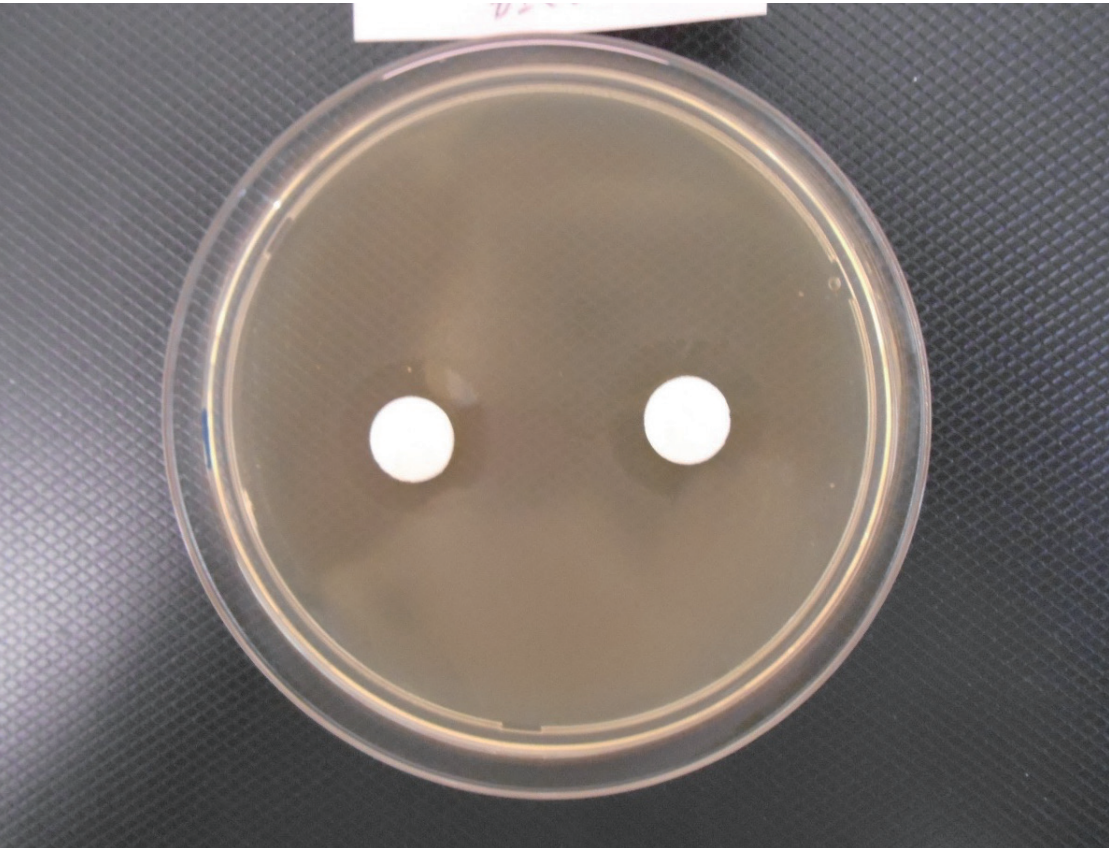
腸管出血性大腸菌 (過酢酸製剤濃度 200ppm(左)、1000ppm(右))



サルモネラ属菌 (過酢酸製剤濃度 200ppm(左)、1000ppm(右))



サルモネラ属菌 製剤濃度 200ppm (過酢酸製剤 150(左)、過酢酸製剤 200(右))



カンピロバクター
製剤濃度 200ppm (過酢酸製剤 150(左)、過酢酸製剤 200(右))

4. 考察

PCR 法により牛レバー内部の腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、カンピロバクターを測定した結果、カンピロバクターのみ検出され、陽性率は 34%であった。PCR 法は死菌でも検出することがあるが、今回は併行して実施した培養法の結果と一致しているため全て生菌であると考えられる。部位別の結果からは、以前は生食用として供されていた左葉部先端部分が高く、生食用として供していない胆管付近の陽性率が低かった。

PCR 法の検出感度は腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラ属菌が牛レバーに 1CFU/ g の菌が存在するよう希釈した後添加した結果及び同菌種を 0.0014CFU/ g となるよう調製した試料から適正に検出できた結果から牛レバーの迅速検査に活用できると考えられた。

過酢酸製剤を用いた牛レバー表面の殺菌結果から、過酢酸製剤は濃度 200ppm で十分効果があることがわかった。菊池ら4) も実験結果から、その殺菌効果を実証している。今後予定されている高濃度での使用が許可された場合さらなる殺菌効果が期待出来る。

以上のことから、牛レバー内部を PCR 法により測定し、腸管出血性大腸菌、カンピロバクター、サルモネラ属菌が検出されないレバーのみを選別すること、検査結果が分かるまでの間は冷凍庫で保管し、表面は過酢酸製剤を用いて殺菌することで生食用として識別流通させる可能性が期待された。

(参考文献)

- 1) 平成 26 年 11 月 20 日付け食安監発 1120 第 1 号「腸管出血性大腸菌 O26、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」による。
- 2) 食品衛生検査指針 (微生物編 2004) による。
- 3) 衛乳第 54 号 (平成 27 年 7 月 29 日食安発 0729 第 5 号) による。
- 4) 食品と開発 Vol.51 No.2 38-41

別紙 1：PCR 法及び培養法の検査結果									
検査日	通し番号	PCR 法			培養法			と畜場所	個体識別番号 耳標番号
		サルモネラ 属菌	カンピロ バクター	腸管出血性 大腸菌	サルモネラ 属菌	カンピロ バクター	腸管出血性 大腸菌		
10月7日	1-1	-	-	-	-	-	-	芝浦	14077-1092-9
	1-2	-	-	-	-	-	-		
	2-1	-	-	-	-	-	-		13505-2653-0
	2-2	-	-	-	-	-	-		
10月14日	3-1	-	-	-	-	-	-	芝浦	14347 0812 8
	3-2	-	-	-	-	-	-		
	4-1	-	-	-	-	-	-		13810 3966 5
	4-2	-	-	-	-	-	-		
10月21日	5-1	-	+	-	-	+	-	芝浦	13457 6867 9
	5-2	-	+	-	-	+	-		
	6-1	-	+	-	-	+	-		13400 9220 5
	6-2	-	+	-	-	+	-		
10月28日	7-1	-	-	-	-	-	-	羽曳野	1341643468
	7-2	-	-	-	-	-	-		
	8-1	-	-	-	-	-	-		1368915265
	8-2	-	-	-	-	-	-		
11月4日	9-1	-	+	-	-	+	-	芝浦	13385 7849 0
	9-2	-	+	-	-	+	-		
	10-1	-	+	-	-	+	-		08598 3016 2
	10-2	-	+	-	-	+	-		
11月11日	11-1	-	-	-	-	-	-	羽曳野	1352634295
	11-2	-	+	-	-	+	-		
	12-1	-	-	-	-	-	-		1382704999
	12-2	-	-	-	-	-	-		
11月18日	13-1	-	-	-	-	-	-	芝浦	13691 9237 5
	13-2	-	-	-	-	-	-		
	14-1	-	+	-	-	+	-		02039 7849 6
	14-2	-	+	-	-	+	-		
11月25日	15-1	-	-	-	-	-	-	羽曳野	1338885048
	15-2	-	-	-	-	-	-		
	16-1	-	+	-	-	+	-		859881683
	16-2	-	-	-	-	-	-		
12月2日	17-1	-	-	-	-	-	-	芝浦	14201 3912 7
	17-2	-	-	-	-	-	-		
	18-1	-	-	-	-	-	-		13493 6395 5
	18-2	-	-	-	-	-	-		

注) 通し番号 -1 は方形葉側内部、-2 は胆管付近内部

別紙 1：PCR 法及び培養法の検査結果									
検査日	通し番号	PCR 法			培養法			と畜場所	個体識別番号 耳標番号
		サルモネラ 属菌	カンピロ バクター	腸管出血性 大腸菌	サルモネラ 属菌	カンピロ バクター	腸管出血性 大腸菌		
12月9日	19-1	-	-	-	-	-	-	羽曳野	1393412333
	19-2	-	-	-	-	-	-		
	20-1	-	-	-	-	-	-		1388014078
	20-2	-	-	-	-	-	-		
12月16日	21-1	-	-	-	-	-	-	芝浦	13511 8342 8
	21-2	-	-	-	-	-	-		
	21-3	-	-	-	-	-	-		
	22-1	-	-	-	-	-	-		
	22-2	-	-	-	-	-	-		14451 4934 7
	22-3	-	-	-	-	-	-		
	23-1	-	-	-	-	-	-		
	23-2	-	-	-	-	-	-		14451 4589 9
12月22日	23-3	-	-	-	-	-	-	芝浦	
	24-1	-	+	-	-	+	-		
	24-2	-	+	-	-	+	-		13796 9821 8
	24-3	-	+	-	-	+	-		
	25-1	-	-	-	-	-	-		
	25-2	-	-	-	-	-	-		08598 8718 0
	25-3	-	-	-	-	-	-		
	26-1	-	-	-	-	-	-		
1月6日	26-2	-	-	-	-	-	-	芝浦	13469 4976 3
	26-3	-	-	-	-	-	-		
	27-1	-	+	-	-	+	-		
	27-2	-	+	-	-	+	-		13433 8161 0
	27-3	-	-	-	-	-	-		
	28-1	-	-	-	-	-	-		
	28-2	-	-	-	-	-	-		14300 7262 9
	28-3	-	-	-	-	-	-		
1月13日	29-1	-	+	-	-	+	-	羽曳野	
	29-2	-	-	-	-	-	-		859826080
	29-3	-	-	-	-	-	-		
	30-1	-	-	-	-	-	-		
	30-2	-	-	-	-	-	-		1339163848
	30-3	-	-	-	-	-	-		
	31-1	-	-	-	-	-	-		
	31-2	-	-	-	-	-	-		1340043184
	31-3	-	-	-	-	-	-		

注) 通し番号 20 番までの -1 は方形葉側内部、-2 は胆管付近内部、21 番以降の -1 は左葉部先端内部、-2 は方形葉側内部、-3 は胆管付近内部

別紙 1：PCR 法及び培養法の検査結果									
検査日	通し番号	PCR 法			培養法			と畜場所	個体識別番号 耳標番号
		サルモネラ 属菌	カンピロ バクター	腸管出血性 大腸菌	サルモネラ 属菌	カンピロ バクター	腸管出血性 大腸菌		
1 月 19 日	32-1	-	-	-	-	-	-	芝浦	13636 1675 4
	32-2	-	-	-	-	-	-		
	32-3	-	-	-	-	-	-		
	33-1	-	-	-	-	-	-		14341 7757 3
	33-2	-	-	-	-	-	-		
	33-3	-	-	-	-	-	-		
	34-1	-	+	-	-	+	-		14201 4189 2
	34-2	-	-	-	-	-	-		
	34-3	-	+	-	-	+	-		
	35-1	-	+	-	-	+	-		13580 6038 8
	35-2	-	-	-	-	-	-		
	35-3	-	-	-	-	-	-		
1 月 27 日	36-1	-	+	-	-	+	-	羽曳野	1351836157
	36-2	-	+	-	-	+	-		
	36-3	-	-	-	-	-	-		
	37-1	-	-	-	-	-	-		1467009575
	37-2	-	-	-	-	-	-		
	37-3	-	-	-	-	-	-		
	38-1	-	+	-	-	+	-		1473000702
	38-2	-	+	-	-	+	-		
	38-3	-	-	-	-	-	-		
2 月 2 日	39-1	-	+	-	-	+	-	芝浦	13927 9986 2
	39-2	-	-	-	-	-	-		
	39-3	-	-	-	-	-	-		
	40-1	-	-	-	-	-	-		13464 5150 1
	40-2	-	-	-	-	-	-		
	40-3	-	-	-	-	-	-		
	41-1	-	-	-	-	-	-		13622 5720 0
	41-2	-	-	-	-	-	-		
	41-3	-	-	-	-	-	-		
2 月 10 日	42-1	-	-	-	-	-	-	羽曳野	1340290052
	42-2	-	-	-	-	-	-		
	42-3	-	-	-	-	-	-		
	43-1	-	-	-	-	-	-		1248078042
	43-2	-	-	-	-	-	-		
	43-3	-	-	-	-	-	-		
	44-1	-	+	-	-	+	-		1430912444
	44-2	-	+	-	-	+	-		
	44-3	-	+	-	-	+	-		
2 月 18 日	45-1	-	+	-	-	+	-	芝浦	14435 0770 5
	45-2	-	+	-	-	+	-		
	45-3	-	-	-	-	-	-		
	46-1	-	-	-	-	-	-		08605 5690 7
	46-2	-	-	-	-	-	-		
	46-3	-	-	-	-	-	-		
	47-1	-	-	-	-	-	-		08605 5694 5
	47-2	-	-	-	-	-	-		
	47-3	-	-	-	-	-	-		
2 月 24 日	48-1	-	-	-	-	-	-	羽曳野	14453-14189
	48-2	-	-	-	-	-	-		
	48-3	-	-	-	-	-	-		
	49-1	-	-	-	-	-	-		13493-85735
	49-2	-	-	-	-	-	-		
	49-3	-	-	-	-	-	-		
	50-1	-	-	-	-	-	-		13628-42734
	50-2	-	-	-	-	-	-		
	50-3	-	-	-	-	-	-		

注) 通し番号 -1 は左葉部先端内部、-2 は方形葉側内部、-3 は胆管付近内部

生食用牛レバー処理技術開発基礎研究

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

山崎 伸二

① 目的

牛肝臓内部から志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) が検出され、大きな問題となった。この原因として、牛消化管内に存在する STEC が、胆汁を介して肝臓を汚染している可能性が指摘されている。本研究では、生食用牛レバーの殺菌処理技術を開発し、腸内細菌科菌群フリーの牛レバーの流通体制を構築するため、肝臓、胆汁及びその他消化管等における腸内細菌科菌群及び STEC の分布、及び各部位での相関性を調べ、肝臓内への STEC を含む腸内細菌科菌群の汚染経路について検証するとともに、腸内細菌科菌群の効果的な消毒・殺菌法について試験する。

さらに、平成 24 年 7 月に食品衛生法に基づき生食が禁止される根拠となった志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) 及びカンピロバクターに加えサルモネラ属菌の3菌種を、牛レバーを生食する際のハザードとして設定し当該3菌種について遺伝子検査 (PCR) 法と培養法との比較、検出下限の確認等その有用性を評価する。

② 昨年度までに明らかとなったこと

- 1. 大腸菌群は唾液から肛門に至るまでの消化管ではほぼ 100% 検出された。しかし、予想に反して肝臓内での検出率が 68% であるのに対し、胆汁の検出率は 14% と低く、肝臓内の大腸菌群の汚染は胆汁と胆汁以外の経路がある可能性が示された。
- 2. Stx 遺伝子は舌や唾液を含め消化管内から検出された。特に、肛門組織では 78% と高い陽性率であったが、胆汁からは全く検出されなかった。
- 3. 牛肝臓内の大腸菌群は部位 3、4、5 で検出率が高く、部位 1、2 では検出率が 3～5 と比べ低かった。一方、肝臓内の大腸菌群は夏場で陽性率が高く、冬場に低い傾向になった。
- 4. 肝臓内での Stx 遺伝子は、部位 3、4、5 からは検出されたが、部位 1、2 からは検出されなかった。
- 5. 塩素系消毒薬あるいは電解水処理後、急速冷凍、チルド解凍を行なうことで牛肝臓内、部位 1、2 における腸内細菌科菌群の陽性率が低下しただけでなく、菌数も減少した。

③ 調査 (試験) の概要

- 1. 牛肝臓の塩素系消毒薬、凍結融解処理による殺菌効果の評価
- 牛肝臓内部を、胆管を通じてそれぞれの濃度の各種消毒薬を1回3秒間で 75 ml、レバー 2 kg に対して3回、ポンプを用いて圧力をかけながら注入洗浄した。その後、-35℃で急速冷凍し、6 日後にチルド解凍し厚労省の生食肉検査基準に準じた方法 (図1) で菌の検出を行なった。

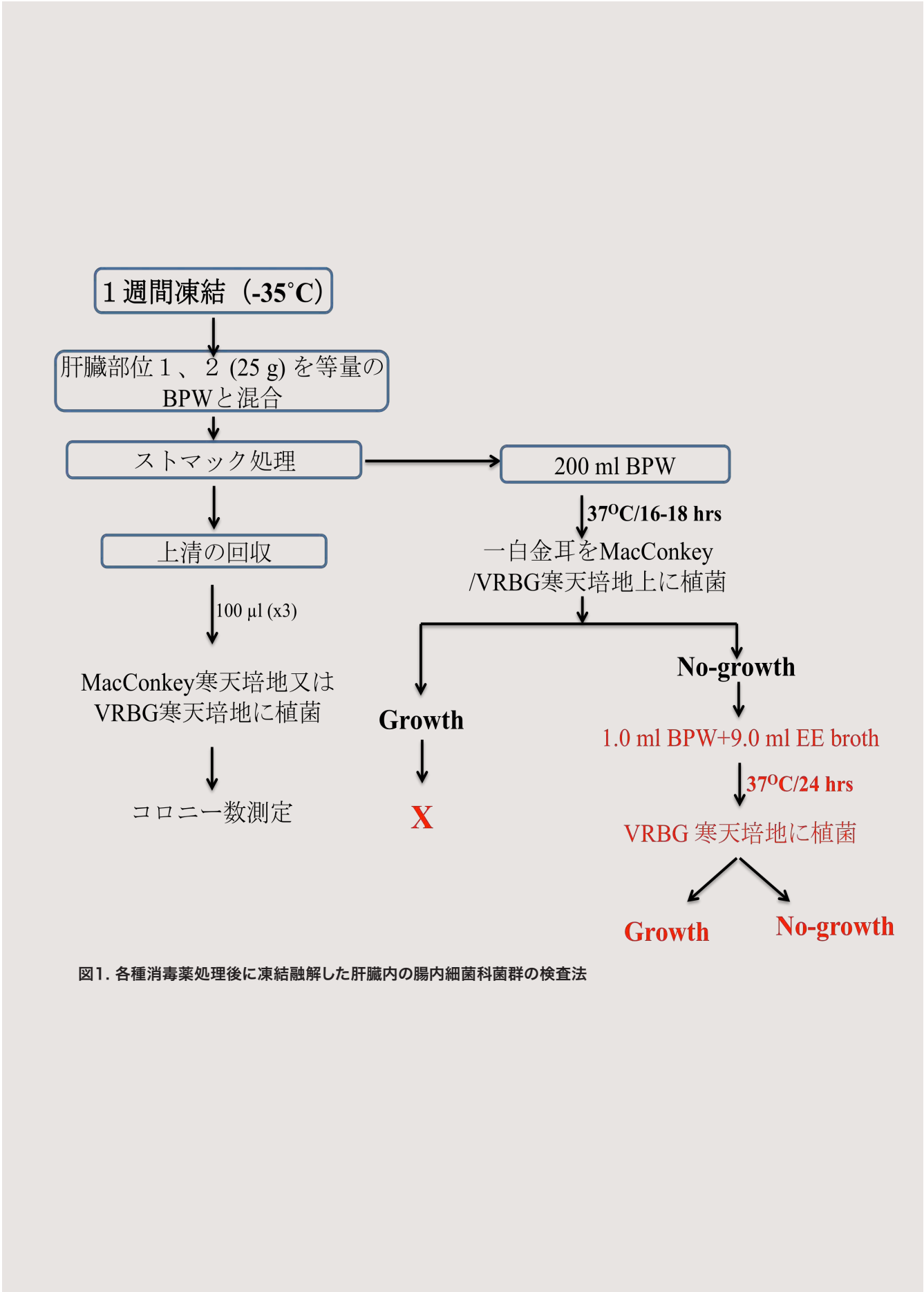
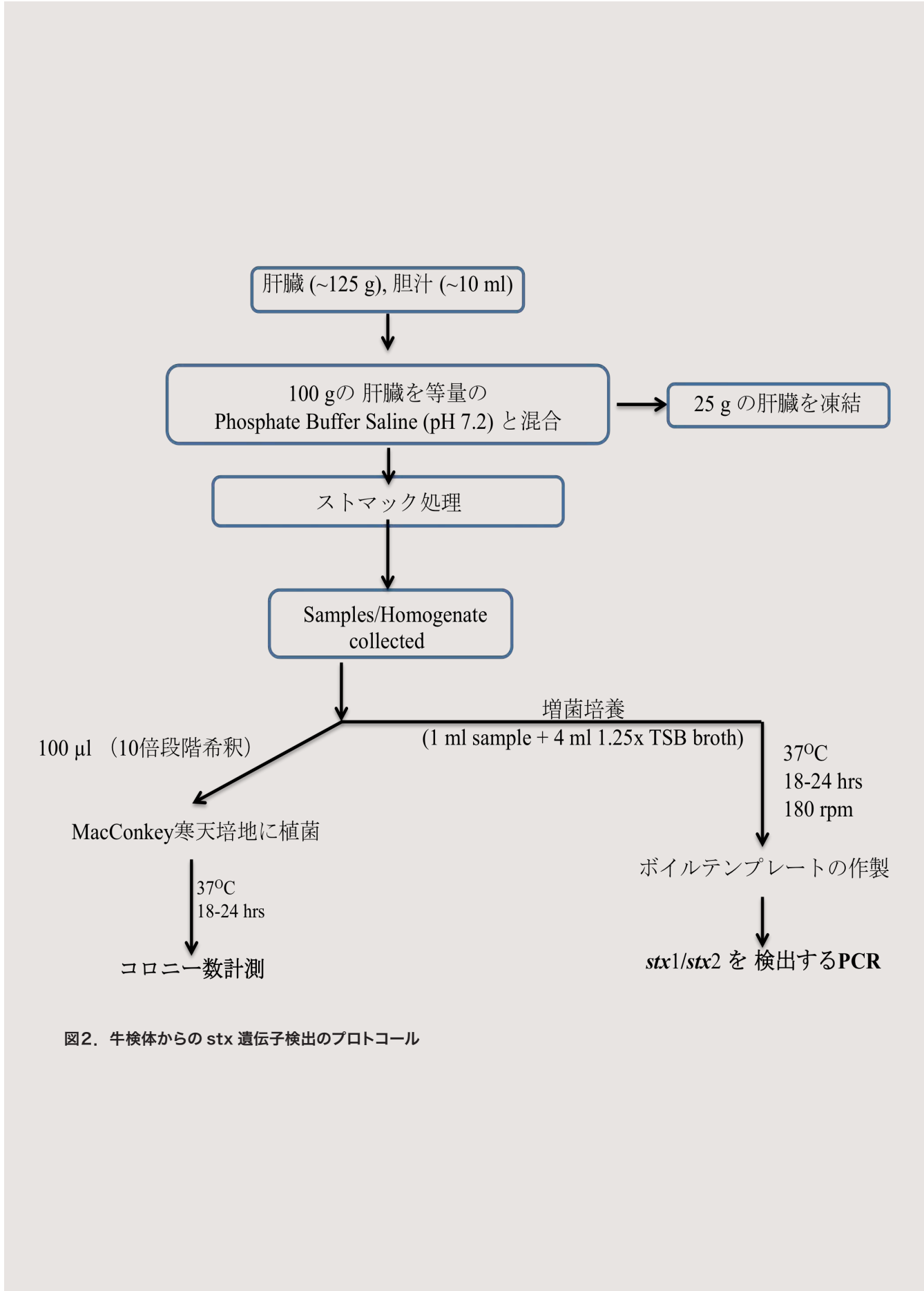


図1. 各種消毒薬処理後に凍結融解した肝臓内の腸内細菌科菌群の検査法

表1. アルカリ系消毒薬処理後凍結の有無、2次増菌後の部位ごとの肝臓内大腸菌群陽性検体数と陽性

消毒薬	部位 1 (%)			部位 2 (%)		
	凍結無	凍結有	凍結 2 次増菌	凍結無	凍結有	凍結 2 次増菌
アルカリ系 A` [16`]	12* (75)	9 (56)	15 (94)	11 (69)	9/15 (60)	15/15 (100)
アルカリ系 B` [7]	5 (71)	4 (57)	7 (100)	6 (86)	4 (57)	7 (100)
アルカリ系 C\$ [9]	5 (56)	3 (33)	9 (100)	6 (67)	3 (33)	8 (89)

調査時期：*H27/5-H27/8,**H27/6-H27/8,\$H27/8-H27/9, # 陽性検体数, + 総検体数



2. Stx 遺伝子の検出

図2に記したように 2015 年 4 月から 2015 年 9 月までは、100 g の肝臓から増菌培養液を作製し、stx1 と stx2 遺伝子を同時に検出できるマルチプレックス PCR で検出した。2015 年 10 月以降は、左葉（部位1と2）と右葉（部位3～5）に分けて、それぞれ 10 カ所から 5 g ずつ、合計 50 g 採取し 50 ml の TSB を加え、ストマック処理を行なった後、TSB を加え 250 ml にメスアップし 37°C、18 時間の増菌培養を行った。増菌培養液を遠心分離により菌体を回収し、等量の TE を加え 10 分間煮沸後、PCR の鋳型 DNA として用いた。

3. 牛肝臓及び胆汁からのカンピロバクター属菌の分離

牛肝臓 50 g を採取し、等量の滅菌 PBS を加え、ストマック処理を行ない、懸濁液を滅菌 PBS で希釈し、100 µl を mCCDA に植菌し、37°C、微好気条件下で培養しコロニー数を測定した。胆汁については、直接滅菌 PBS で希釈し同様に培養した。また、懸濁液 1 ml を 4 ml の 1.25 x のプレストン培地に植菌し、37°C、微好気条件下で静置培養し、以下に述べる PCR 法及び mCCDA 培地に植菌し、カンピロバクター属菌の有無について確認した。

4. STEC、サルモネラ属菌及びカンピロバクターを同時に検出できるマルチプレックス PCR 法

STEC、サルモネラ属菌、カンピロバクターそれぞれに特異的な遺伝子を標的としたマルチプレックス PCR 法を構築し、特異性、感度を調べた。特異性については異なる 10 菌種、感度についてはそれぞれの菌種を 20 株用いた。

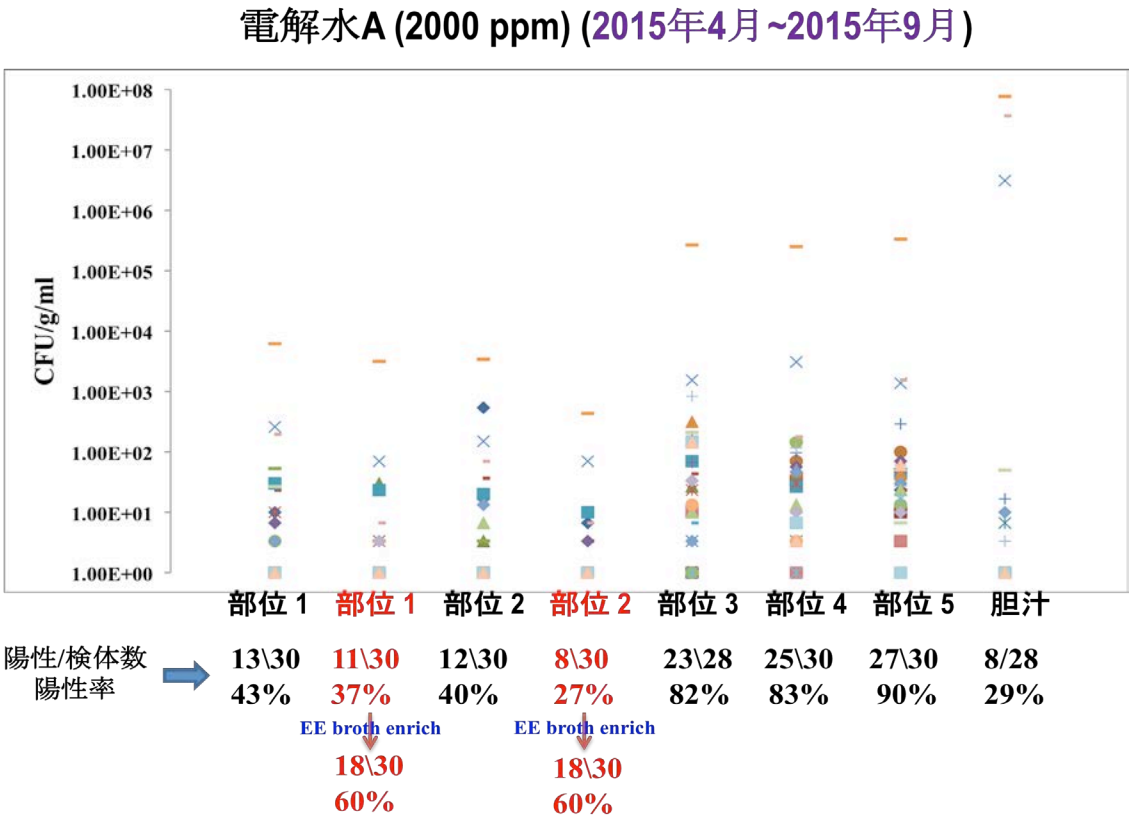


図3. 電解水処理後の肝臓内部位ごとの大腸菌群検出率とその菌数、赤は凍結融解後の結果を示す

④ 結果概要

1. 牛肝臓を様々な消毒薬で処理後、急速凍結、チルド解凍による殺菌効果

アルカリ系消毒薬 (MC-A、MC-B、MC-C) を用いて肝臓内を処理した後、凍結融解し大腸菌群の陽性率を調べた。その結果、2次増菌後は部位1、2とも 89% 以上の陽性率であった。図 3 に示したように、2000 ppm の電解水で肝臓内部を洗浄後、凍結処理有無で大腸菌群の有無を図1に記した方法で調べた。その結果、部位1と2の陽性率はそれぞれ 43% と 40% であったが、凍結融解後はそれぞれ 37% と 27% に陽性率は下がった。しかし、2次増菌後では、それぞれ 60% で陽性となった。

一方、表1や表2に示した消毒薬では、2次増菌後の陽性率が 86% 以上とあまり殺菌効果が得られなかった。さらに詳細を調べることを目的に、25 g 一カ所でなく、2.5 g を 10 カ所から回収し、腸内細菌科菌群の陽性率について調べた。400 ppm の塩素系消毒薬で処理した場合、部位1と2に相当する左葉では、2次増菌後の陽性率が 53% であった。

表 2. 各種消毒薬で処理後、牛肝臓左葉、右葉及び胆汁の大腸菌群陽性率

消毒薬	左葉 (%)			右葉	胆汁
	凍結無	凍結有	凍結 2 次増菌	凍結無	
電解水 A 500 ppm [*] [18 ⁺]	8 [#] (44)	6 (33)	16 (89)	18 (100)	6/14 (43)
電解水 A 2000 ppm ^{**} [22]	10 (45)	5 (22)	19 (86)	21 (95)	2/15 (13)
電解水 B ^{\$} [5]	4 (80)	2 (40)	5 (100)	5 (100)	2/4 (50)
塩素系 B ^{\$S} [3]	1 (33)	3 (100)	3 (100)	3 (100)	1/3 (33)

調査時期 : *H27/10-H27/12, **H27/10-H27/12, \$H27/10, \$\$H27/10, # 陽性検体数, + 総検体数

塩素系消毒薬A (400 ppm) (2016年1月ー3月)

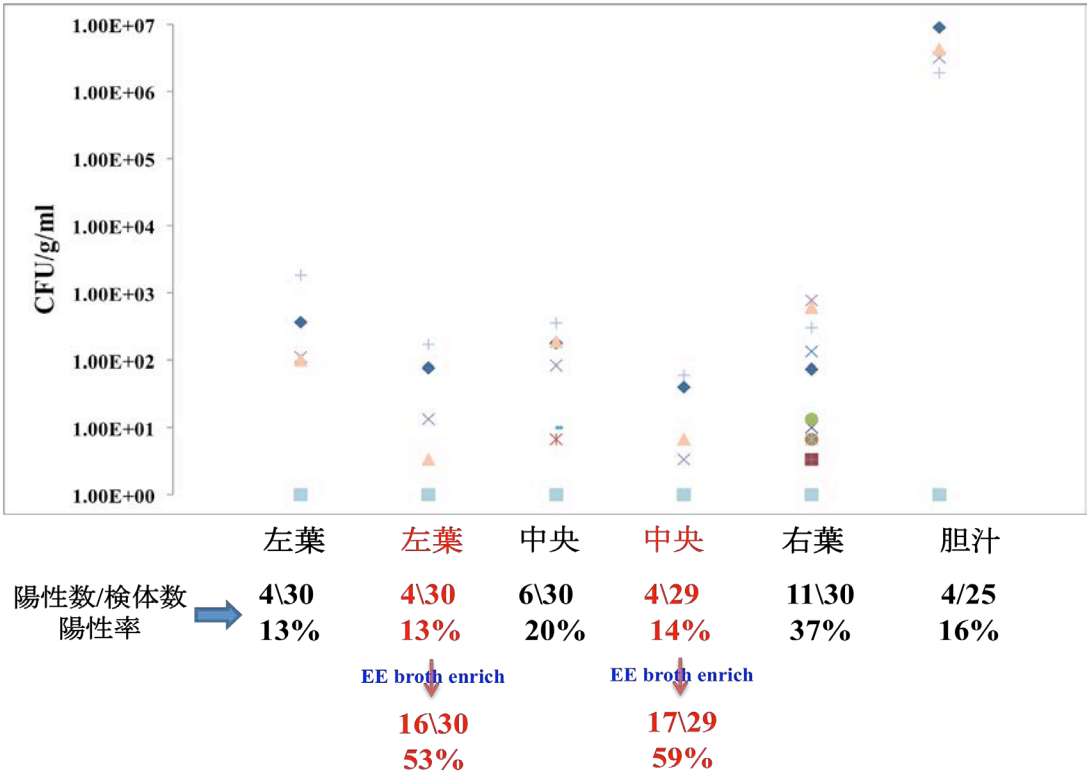


図 4. 消毒薬で処理後の牛肝臓左葉、中央、右葉及び胆汁での大腸菌群又は腸内細菌科菌群の陽性率

2. Stx 遺伝子の検出

牛消化管各部位における stx 遺伝子の陽性数について昨年度までの調査結果に加え、今年度の結果を加え表3にまとめた。その結果胆汁からは全く stx 遺伝子が検出されなかったが、肛門内容物、肛門組織で最も陽性率が高く、それぞれ 45%、83% で陽性となった。一方、肝臓内部においては 1.7% で陽性となった。部位ごとの陽性率では、生食用として提供されていた部位1と2では stx 遺伝子は検出されず、一方、部位3、4、5ではそれぞれ 1.0%、1.6%、1.1% の陽性率であった。肝臓表面の汚染率も 7.6% と高かった。さらに、牛肝臓を左葉と右葉に分けて stx 遺伝子を検出した結果、調べた 78 検体全てで陰性となった。

表 3. 牛の消化管部位における stx 遺伝子の分布

採取部位 (検体数)	stx1 陽性数	stx2 陽性数	stx1/2 陽性数	合計 (%)
舌 (46)	1	1	1	3 (6.5)
唾液 (41)	1	3	5	9 (22)
胆汁 (277)	0	0	0	0 (0)
肝臓 (303)	0	5	0	5 (1.7)
肝臓表面 (211)	0	15	1	16 (7.6)
第一胃内容物 (46)	2	1	1	4 (8.6)
十二指腸組織 (68)	1	2	1	4 (5.8)
十二指腸内容物 (68)	2	6	2	10 (15)
盲腸組織 (69)	4	14	2	18 (26)
盲腸内容物 (69)	4	12	2	18 (26)
肛門組織 (245)	10	132	61	203 (83)
肛門内容物 (65)	6	16	7	29 (45)

表 4. 肝臓の部位別 stx 遺伝子陽性率 (増菌液 1 ml、2012 年 11 月 -2015 年 9 月)

部位	部位 1	部位 2	部位 3	部位 4	部位 5	胆汁
陽性 / 検体数	0/221 (0)	0/225 (0)	2/220 (1.0)	3/211 (1.6)	2/211 (1.1)	0/216 (0)

検出下限 :62 CFU/50 g

表 5. 肝臓の部位別 stx 遺伝子陽性率 (増菌液 250 ml、2015 年 10 月 -2016 年 3 月)

部位	左 (部位 1/2)	右 (部位 3-5)	胆汁
陽性 / 検体数	0/78 (0)	0/78 (0)	0/61 (0)

検出下限 :6.2 CFU/50 g

3. 牛肝臓及び胆汁からのカンピロバクターの分離

表6と表7に肝臓の部位ごとと胆汁でのカンピロバクターの陽性率をまとめた。その結果、胆汁での陽性率は 49% から 69% と高い陽性率であった。一方、カンピロバクターが生食として供される部位1では凍結無と凍結有でそれぞれ 40% (51/129) と 3% (2/67) の陽性率に、部位2では 35% (45/129) と 0% (0/68) の陽性率になっており、67 検体中 2 検体で検出されたが、-35℃ で 6 日間凍結することでそのカンピロバクターの陽性率は著しく減少した (表8)。

4. STEC、サルモネラ属菌及びカンピロバクターを同時に検出できるマルチプレックス PCR 法

マルチプレックス PCR の特異性、感度を調べた結果それぞれ 100% であった。また、検出下限は、純培養菌で 1-10 CFU/PCR チューブあるいはスパイク実験で 1-10CFU/50 g であった。凍結処理で大腸菌群が検出されず、2 次増菌後に腸内細菌科菌群が検出された 33 検体について本マルチプレックス PCR で STEC とサルモネラ属菌の検出を試みたが、STEC やサルモネラ属菌は検出されなかった。

表6. 各種消毒薬処理後凍結有・無での牛肝臓内の部位ごとのカンピロバクターの陽性率

処理条件	部位 1 (%)	部位 2	部位 3	胆汁
未処理・凍結無 [45 ⁺]	21 [#] (47)	21 (47)	16 (36)	30 (67)
塩素系 B 400 ppm・凍結無 [28]	13 (46)	13 (46)	7 (25)	21 (75)
塩素系 B 400 ppm・凍結有 [14]	2 (14)	0 (0)	5 (36)	8 (57)
電解水 2000 ppm・凍結無 [10]	2 (20)	0 (0)	1 (10)	6 (60)
電解水 2000 ppm・凍結有 [11]	0 (0)	0 (0)	5 (45)	10 (91)
合計凍結無	36/83 (43)	34/83 (41)	34/108 (31)	75/108 (69)
合計凍結有	2/25 (8)	0/25 (0)	NA	NA

陽性検体数, + 総検体数

表7. 各種消毒薬処理後凍結有・無での牛肝臓内の部位ごとのカンピロバクターの陽性率

消毒薬	部位 1 (%)		部位 2		部位 3	胆汁
	凍結無	凍結有	凍結無	凍結有	凍結無	
電解水 2000 ppm [19 ⁺]	4 [#] (21)	0/17 (0)	1 (5)	0/17 (0)	3 (16)	6/17 (35)
アルカリ系 A [11]	5 (45)	0 (0)	4 (37)	0 (0)	2 (18)	6/10 (60)
アルカリ系 B [7]	3 (43)	0 (0)	2 (29)	0 (0)	0 (0)	2/4 (50)
アルカリ系 C [9]	3 (33)	0/7 (0)	4 (44)	0/8 (0)	4 (44)	4/6 (67)
合計	15/46 (33)	0/42 (0)	11/46 (24)	0/43 (0)	9/46 (20)	18/37 (49)

陽性検体数, + 総検体数

表8. 凍結有・無での牛肝臓内の部位ごとのカンピロバクターの陽性率 (表6+表7)

	部位 1 (%)		部位 2		胆汁
	凍結無	凍結有	凍結無	凍結有	
表 6 計	36 [#] /83 ⁺ (43)	2/25 (8)	34/83 (41)	0/25 (0)	75/108 (69)
表 7 計	15/46 (33)	0/42 (0)	11/46 (24)	0/43 (0)	18/37 (49)
合計	51/129 (40)	2/67 (3)	45/129 (35)	0/68 (0)	93/145 (64)

陽性検体数, + 総検体数

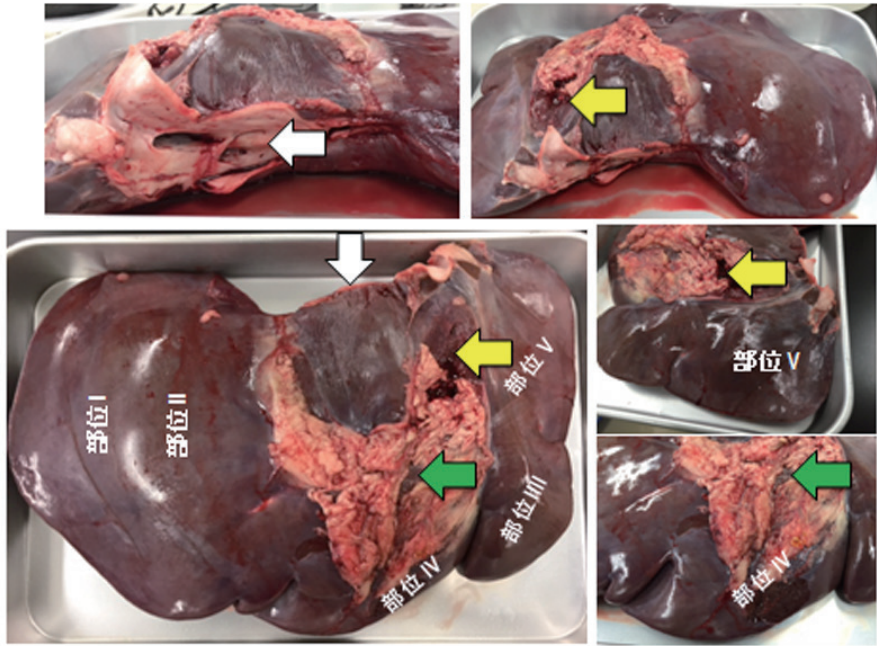
⑤考察

牛肝臓内のカンピロバクター汚染は胆汁を介した可能性が考えられた。しかしながら、カンピロバクターは凍結により死滅しやすいことから凍結処理によって2 検体以外全て陰性となった。また、増菌培養を行ってもカンピロバクターは検出されなかった。カンピロバクターが陽性となった2 検体は胆汁中の菌数が 10⁶ CFU/ml 以上と多かった。カンピロバクターは凍結時間が長くなることで死滅しやすくなるため、凍結条件を最適化するか、胆汁中のカンピロバクターをなんらかの方法で検出し 10⁶ CFU/ml 以上ある検体は排除する等の方法が考えられる。

一方、牛肝臓内の STEC は、当初胆汁を介した汚染が考えられたが今回の実験結果から、外部からの汚染の可能性が考えられた。その理由として、胆汁から STEC が全く検出されなかったこと、Stx 遺伝子が検出された部位 3、4、5 は胆管、門脈、静脈のつなぎ目が切除されており内部が露出されやすい、あるいは屠畜解体時に傷つきやすい部位であることから外部汚染を受けやすいと考えられる。事実、硬膜に覆われ比較的傷つきにくい部位 1 と 2 では stx 遺伝子は検出されなかった。

様々な消毒薬で胆管を通じて肝臓内部を洗浄し、急速冷凍、チルド解凍することで牛肝臓内の腸内細菌科菌群の殺菌を試みたが確実に死滅させる条件は見つからなかった。よって、牛肝臓を出来るだけ傷つけず、外部汚染をさせないように処理し、塩素系消毒薬等で表面汚染を取り除き、肝臓内部を洗浄することで、ハザードリスクの指標菌となる STEC、サルモネラ属菌、カンピロバクターの汚染を軽減させ、PCR 法でそれぞれの特異遺伝子を検出し、陰性となった牛レバーだけを流通に回すという方法も1 つである。今後さらに検体数を増やし、部位 1 と 2 から stx 遺伝子が検出されないこと、凍結融解の条件を検討し、カンピロバクターを確実に死滅させる条件等検討して行く必要がある。

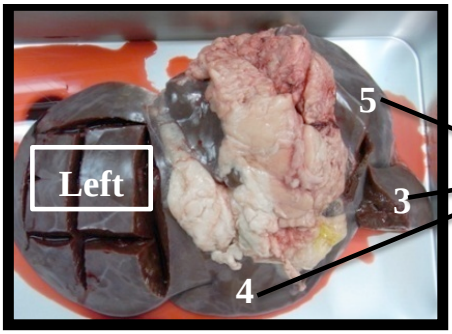
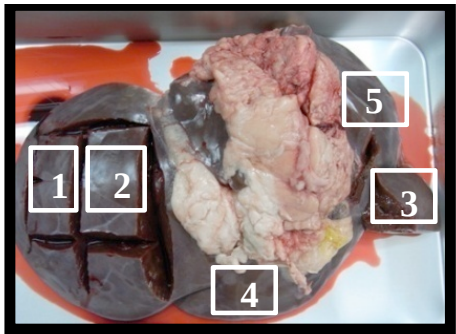
「参考写真：牛レバー表面の切除部位及び損傷状況」



※矢印はそれぞれ切除部位を表す。(白：静脈、緑：胆管、黄：門脈)
部位 1 と 2 はほとんど傷ついていないが、部位 3 ～ 5 は切除面のほか、物理的な損傷を受けている。

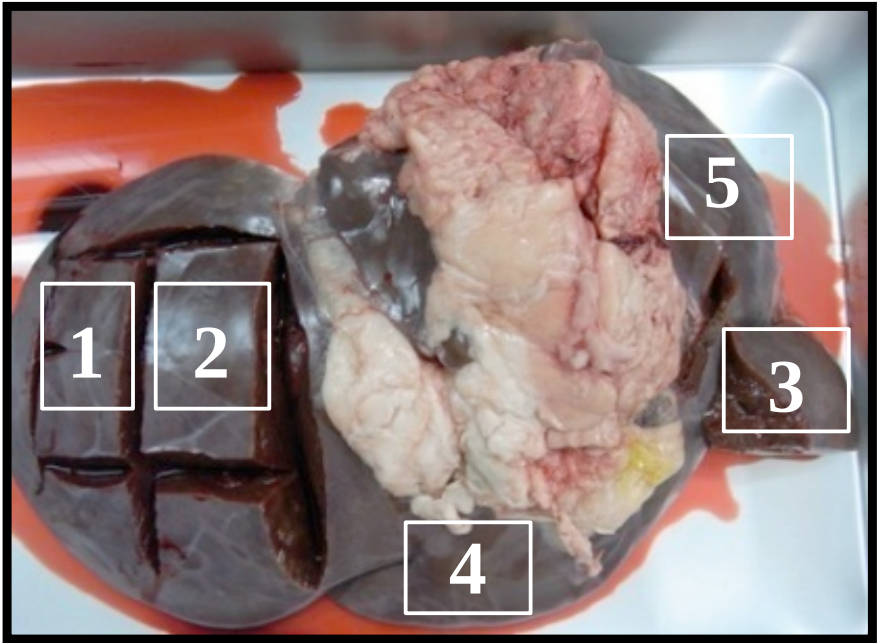
2012年11月から-2016年3月までに解析した結果の内訳

処理	肝臓部位 I-V	肝臓 L(左葉)+R(右葉)	合計
未処理	54	0	54
ソーダスト	20	0	20
塩素系A 400 ppm	52	30	82
電解水A 2000 ppm	67	22	89
電解水A 500 ppm	0	18	18
アルカリ系-A	16	0	16
アルカリ系-B	7	0	7
アルカリ系-C	9	0	9
電解水B	0	5	5
塩素系B	0	3	3
スライス実験	5	0	5
合計	230	78	308

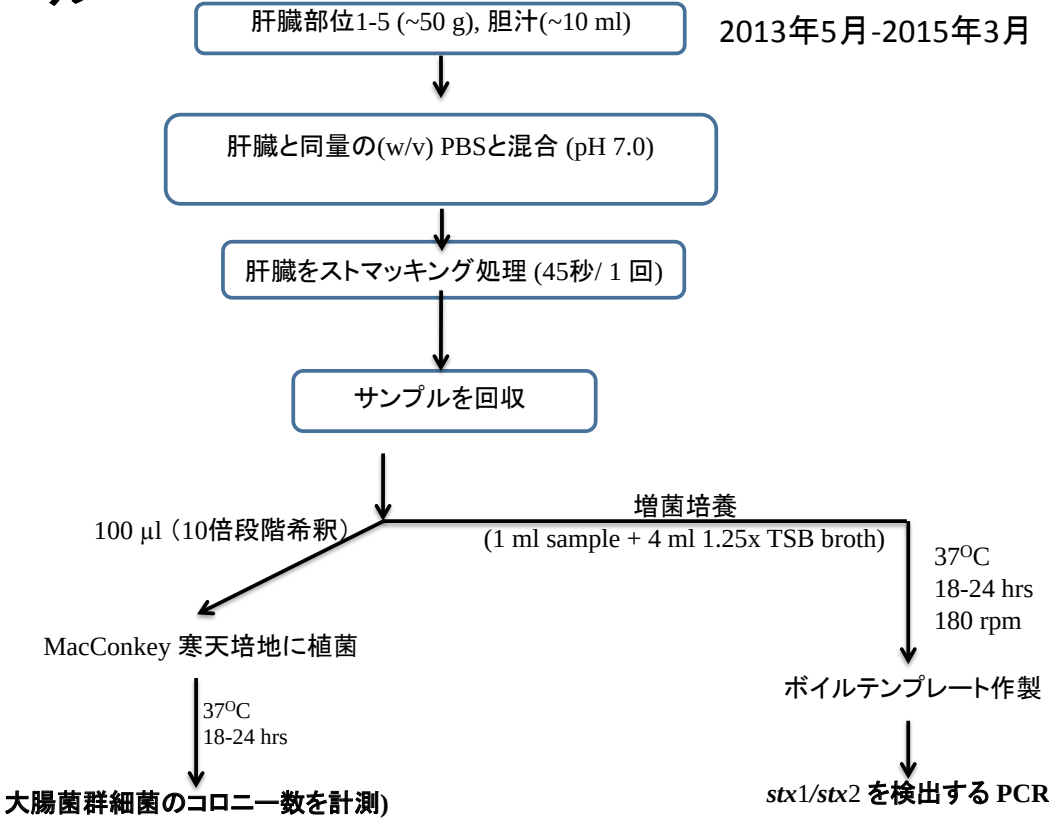
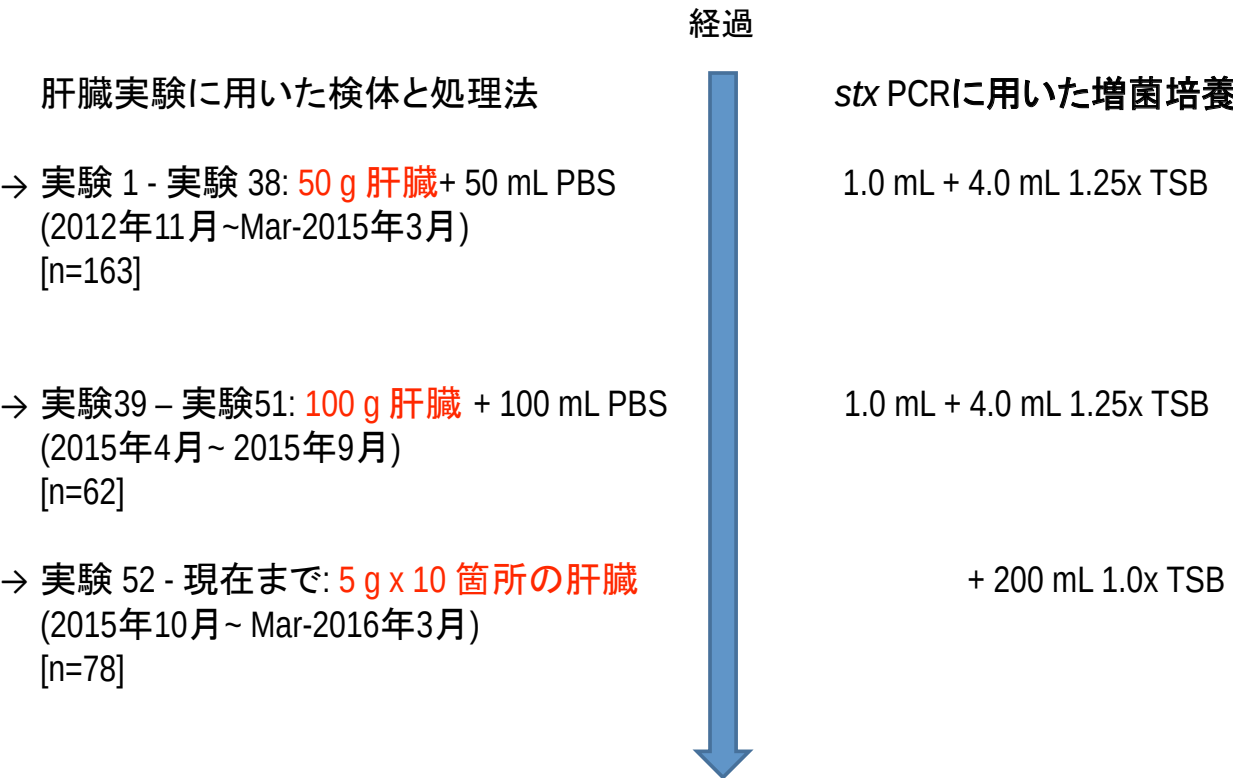


Right

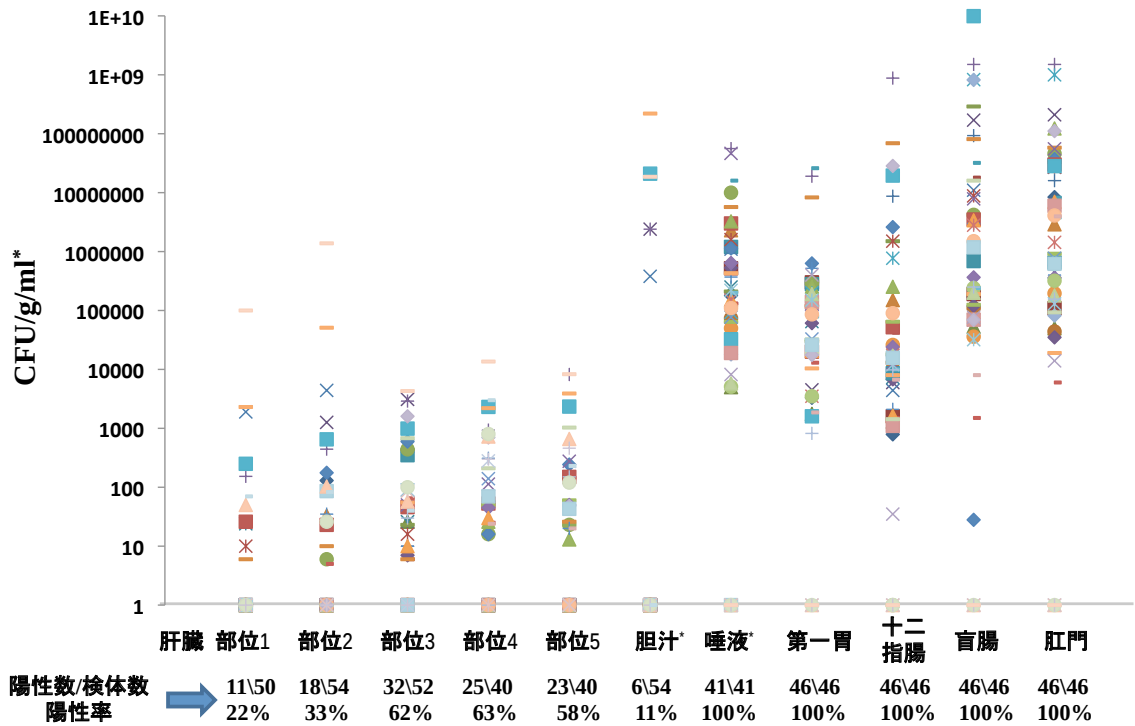
Liver parts



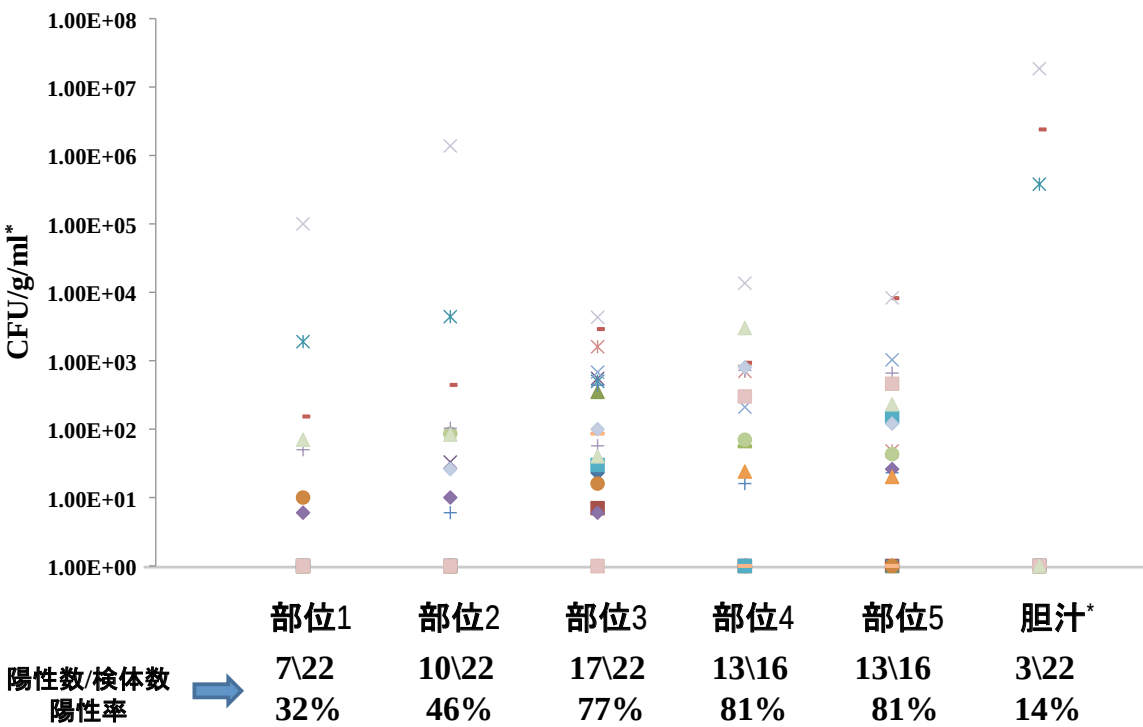
プロトコール



牛肝臓及び消化管各部位に置ける大腸菌群細菌の
検出率と細菌数(2012年11月~2014年8月)



夏場の牛肝臓内における大腸菌群細菌の陽性率と細菌数
(2013年5月-9月、2014年4月-8月)



冬場の牛肝臓内における大腸菌群細菌の陽性率と細菌数
(2013年10月-2014年3月)

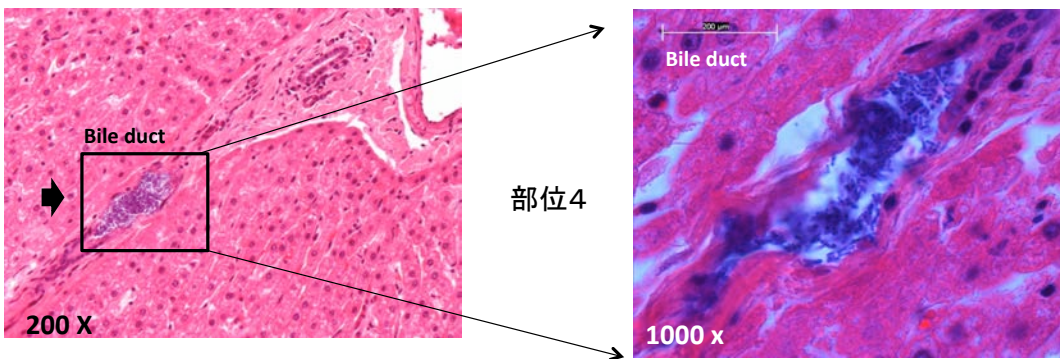
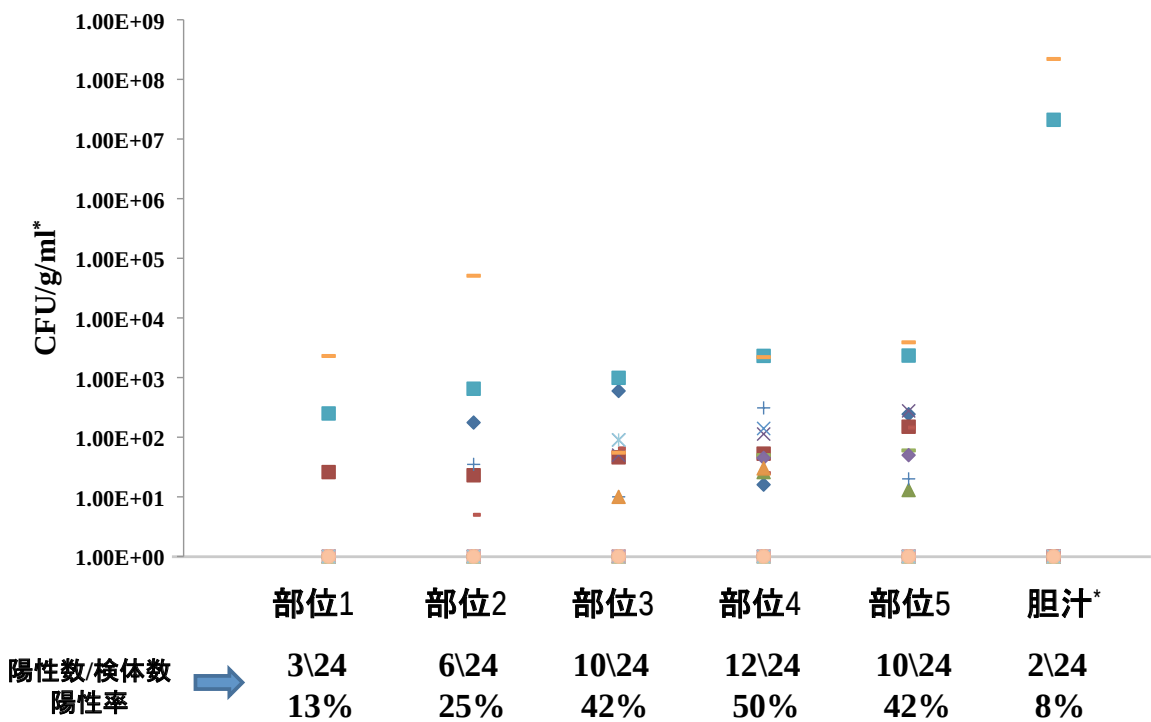


図5-1. 牛肝臓胆管内に検出された細菌

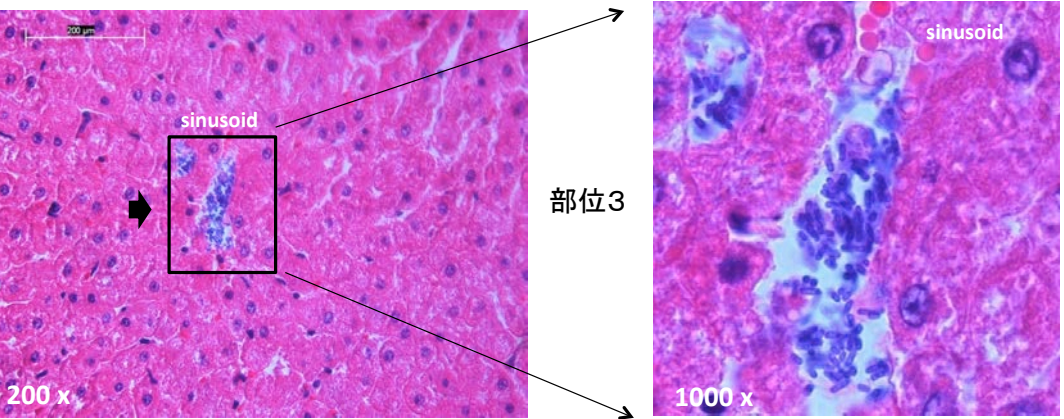
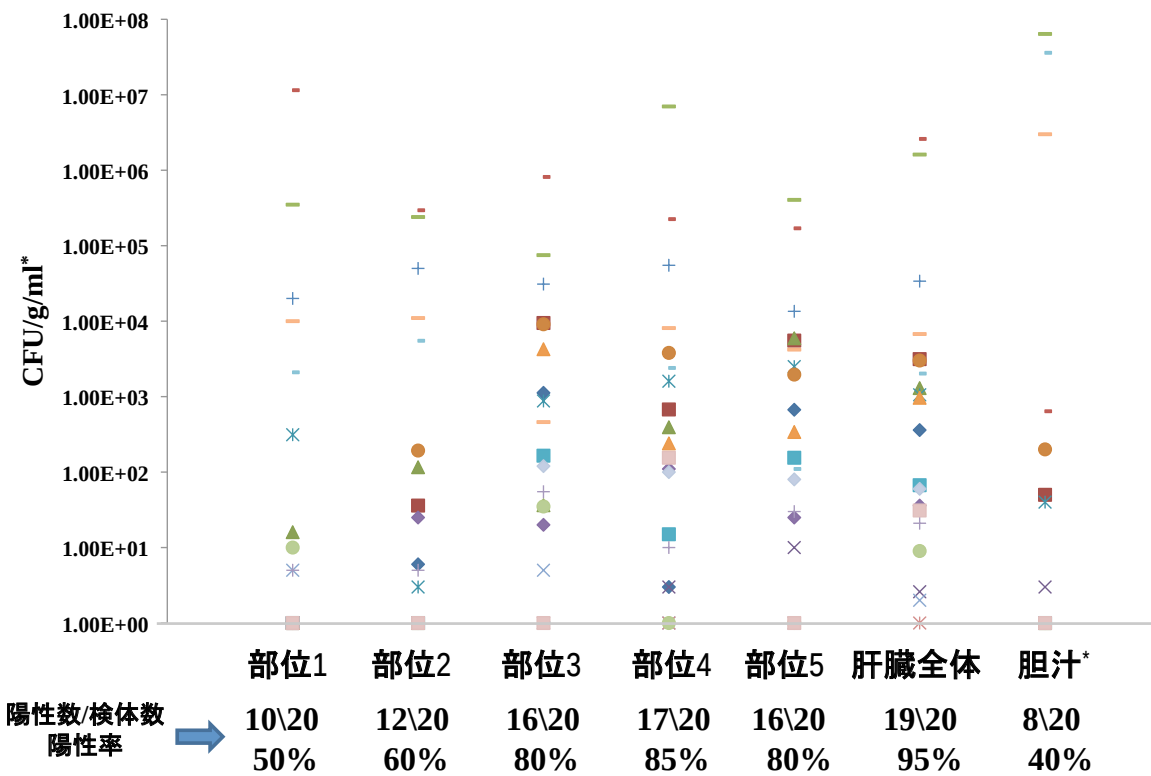
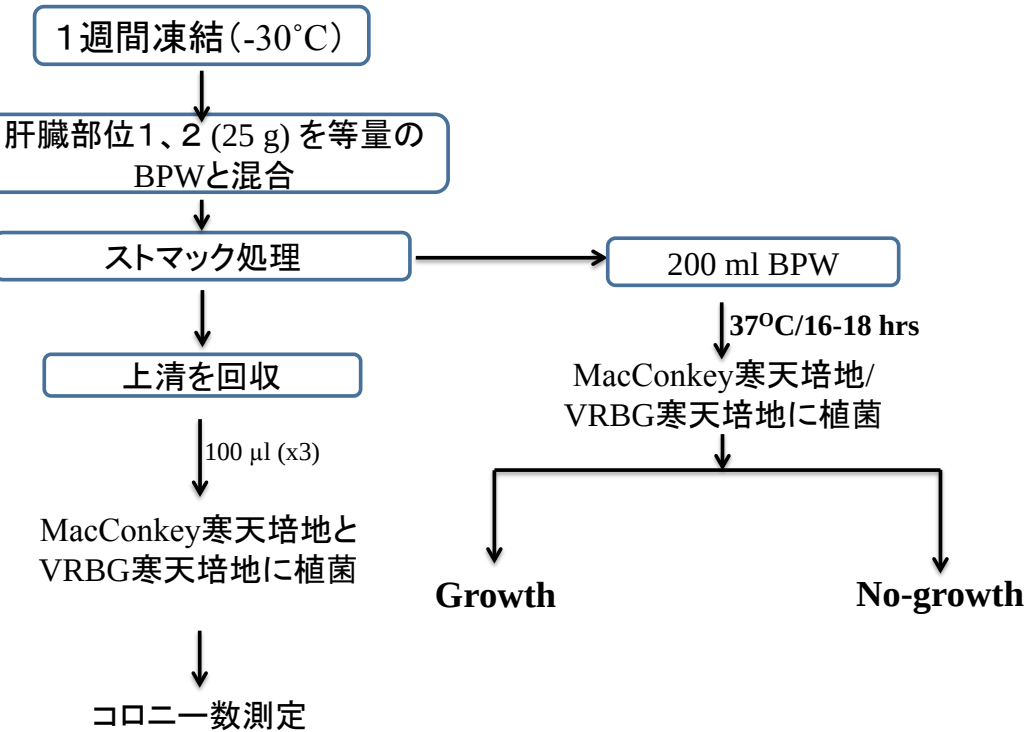


図5-2. 牛肝臓類洞内に検出された細菌

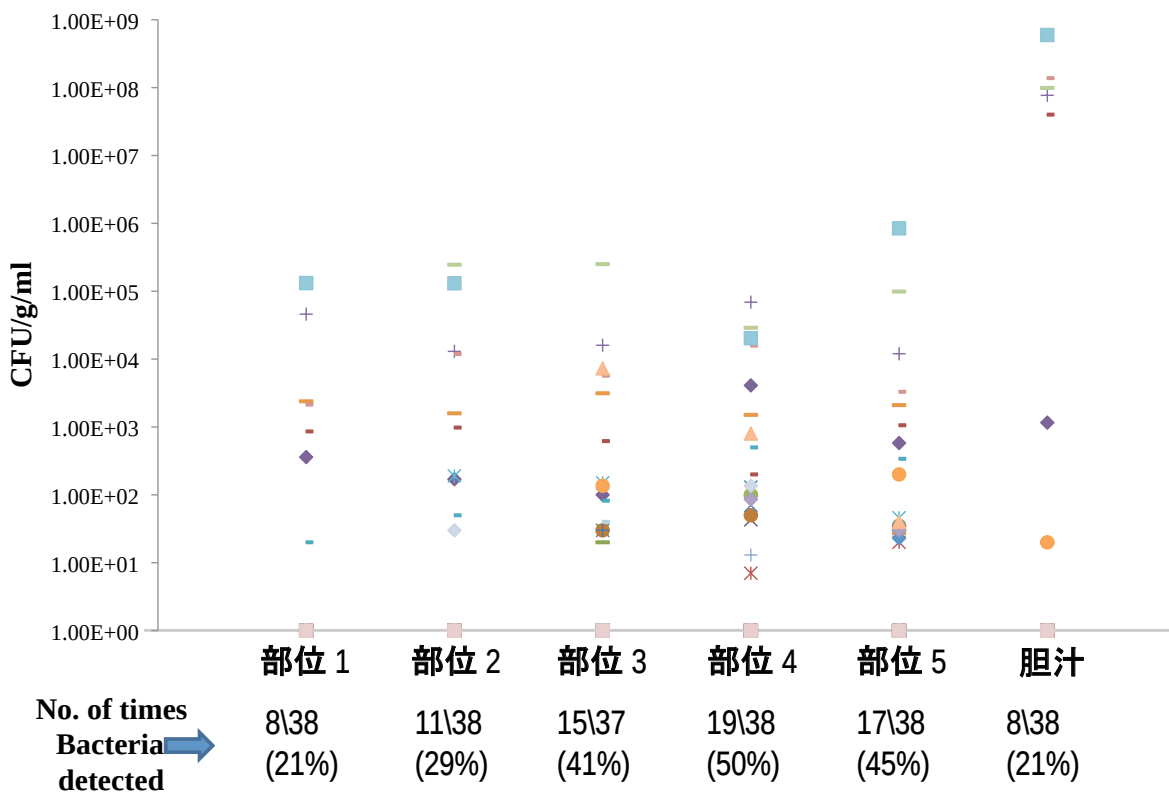
Sawdustの牛肝臓における大腸菌群細菌の陽性率と細菌数
(2013年9月~2014年4月)



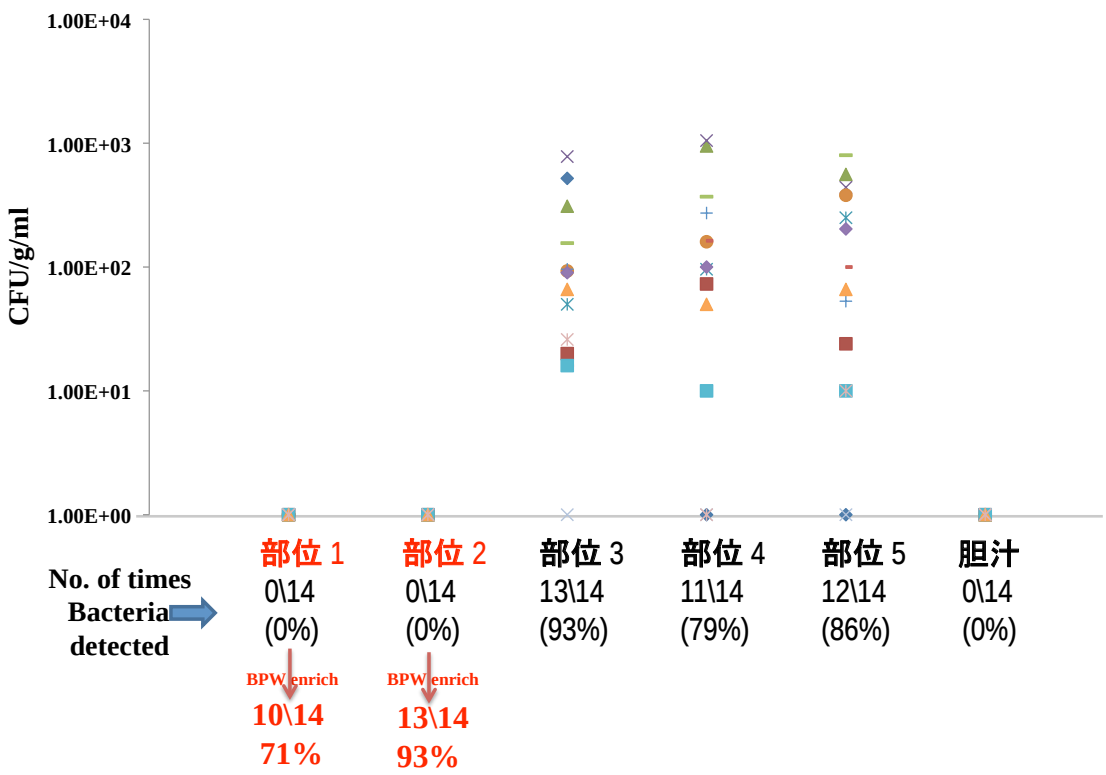
プロトコール:
消毒薬処理後に凍結融解した肝臓内の腸内細菌科菌群



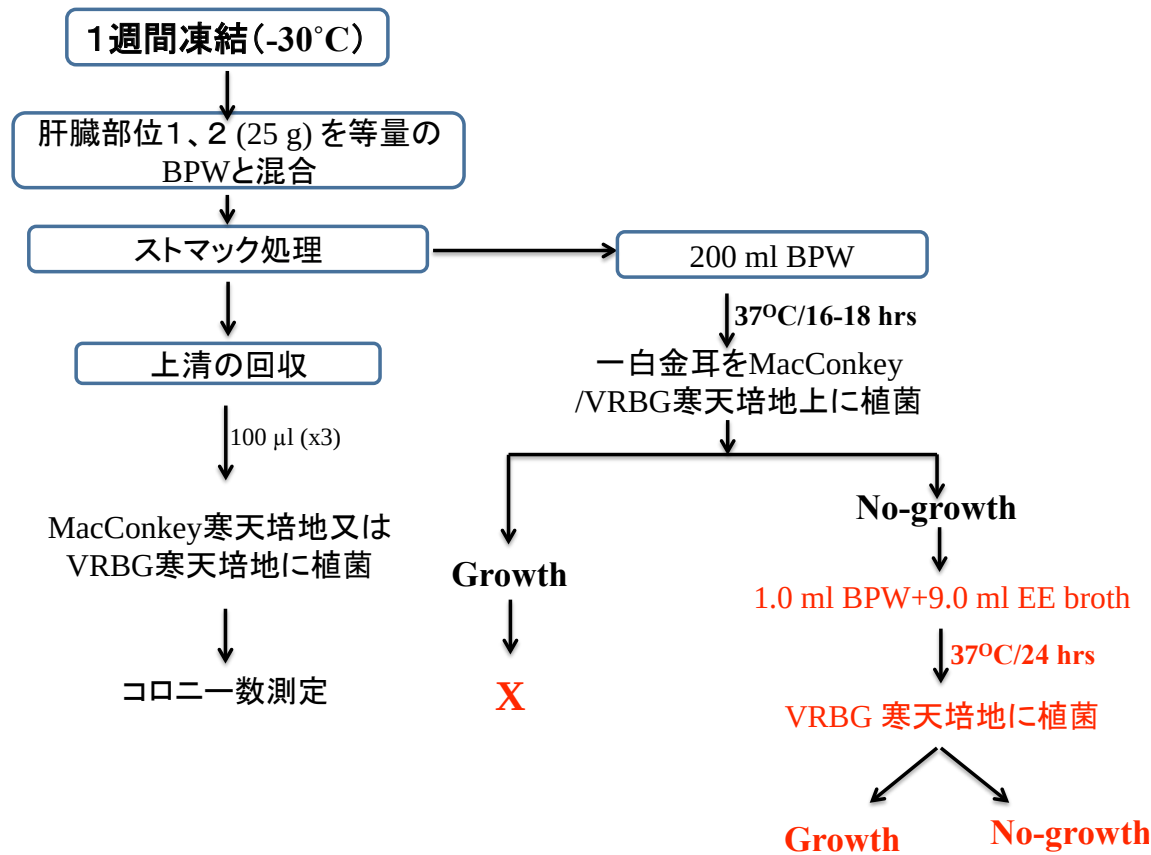
塩素系消毒薬A(400 ppm) 凍結無 (2014年9月~2014年12月)



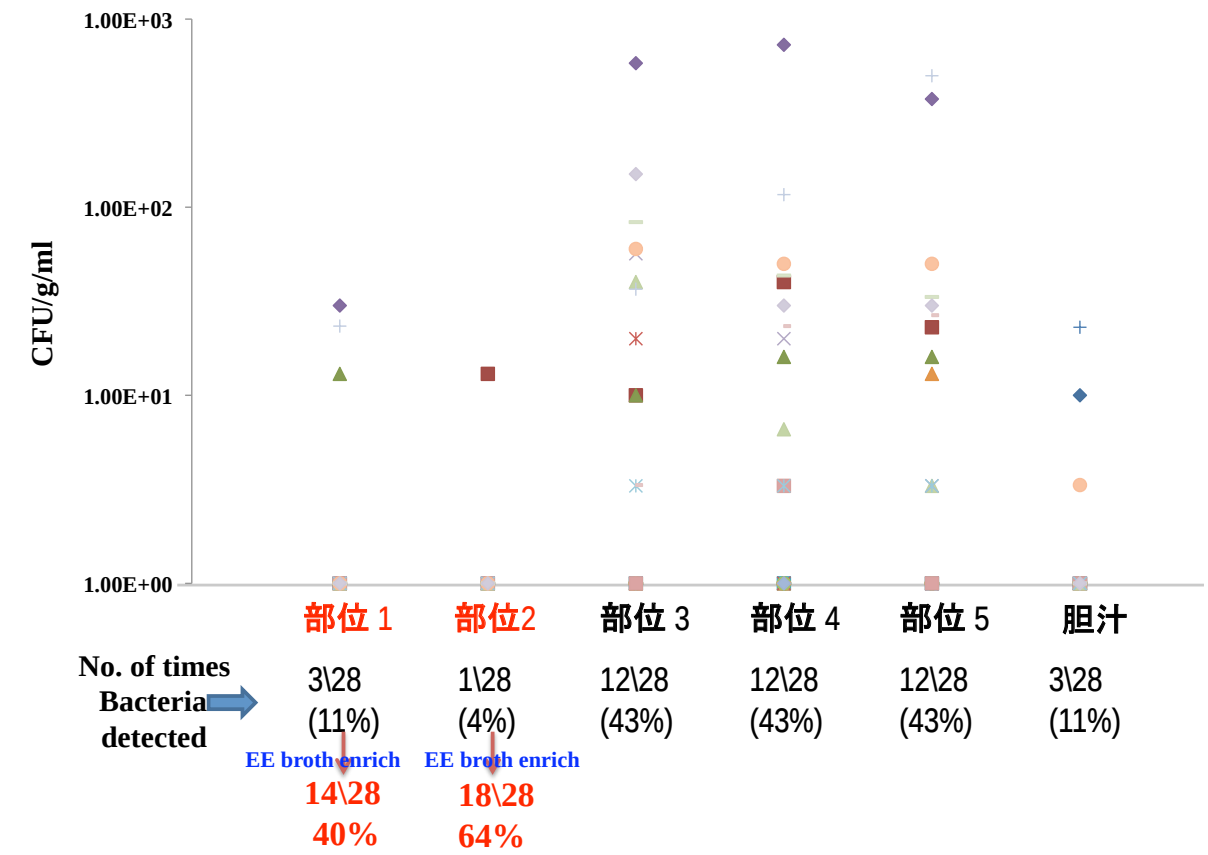
塩素系消毒薬 A(400 ppm)-凍結有 (2014年10月~2014年12月)



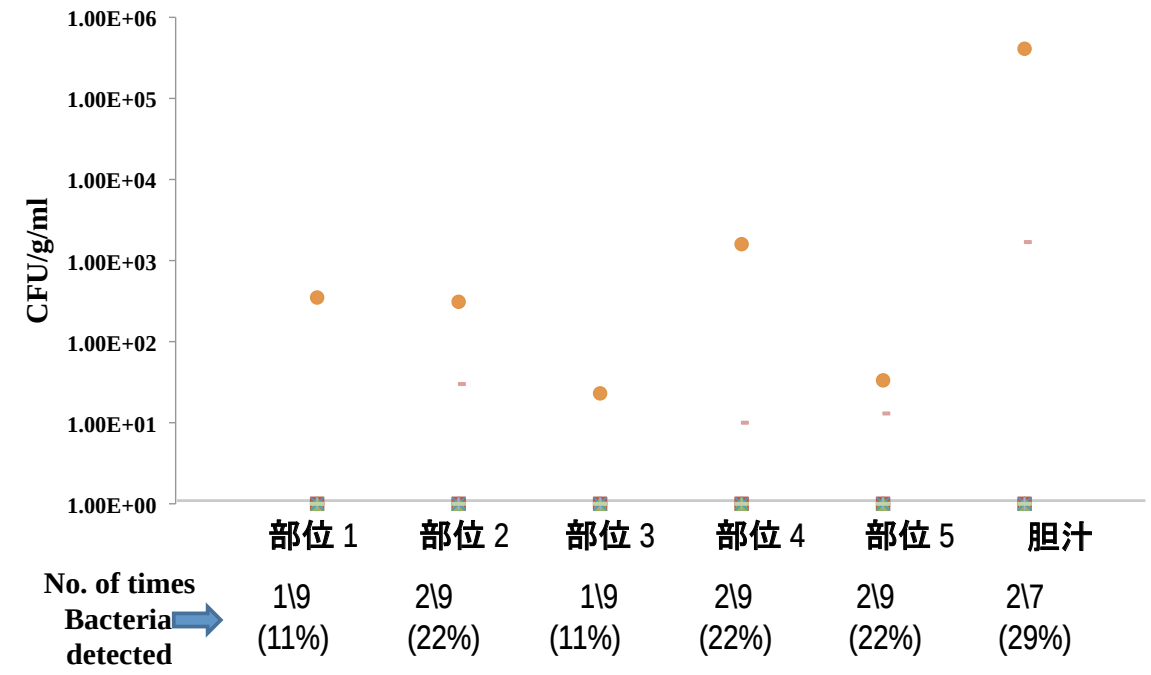
プロトコール: 消毒薬処理後に凍結融解した肝臓内の腸内細菌科菌群



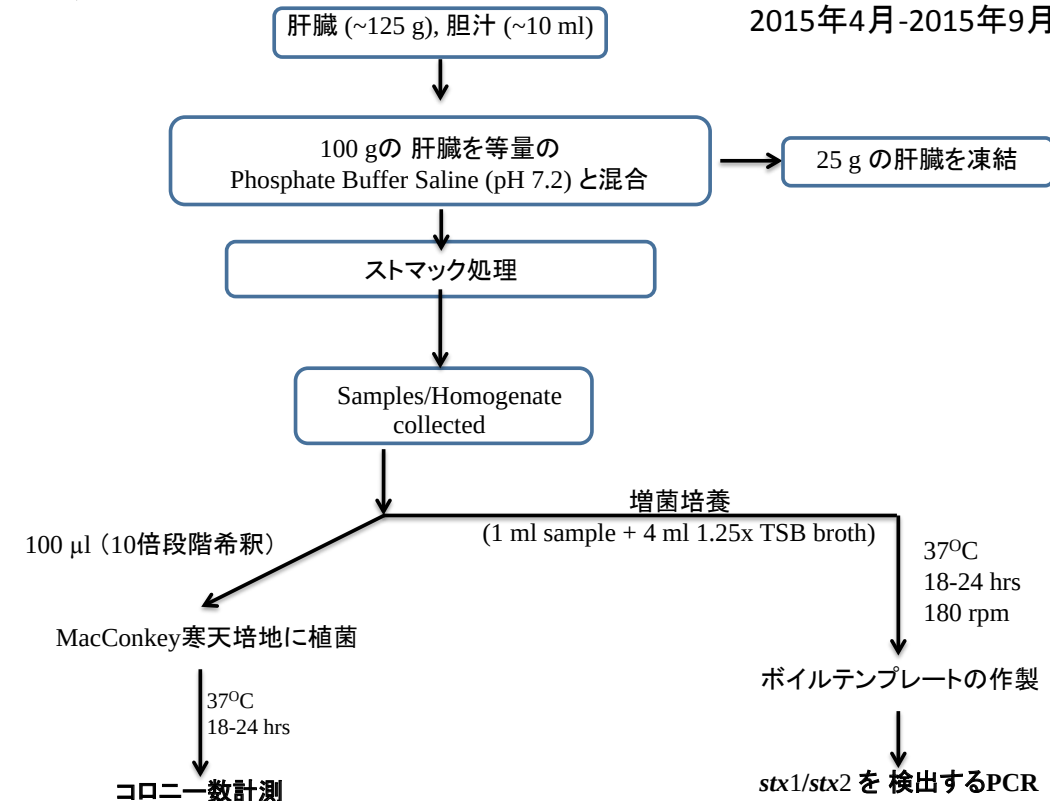
電解水A (2000 ppm) –凍結有 (2014年12月~2015年3月)



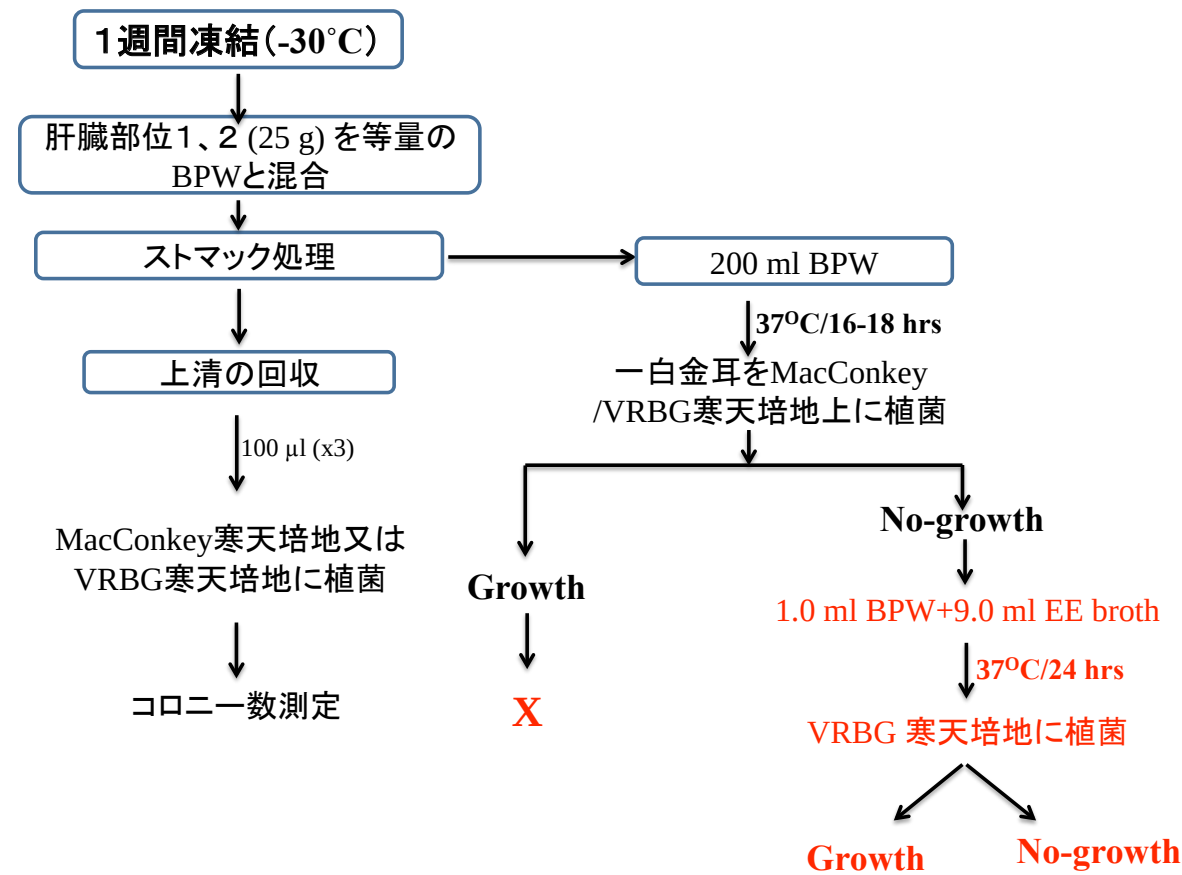
電解水A (2000 ppm) 凍結無 (2014年12月~2015年1月)



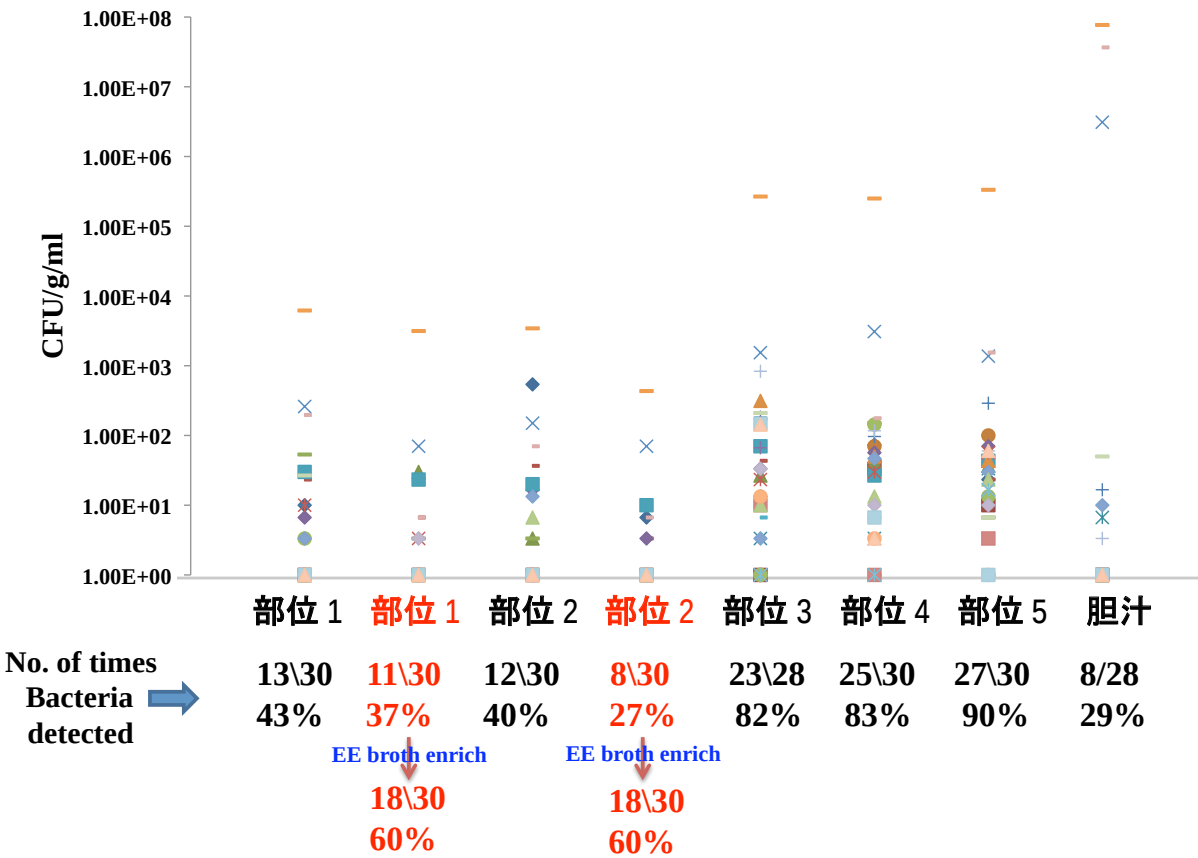
プロトコール



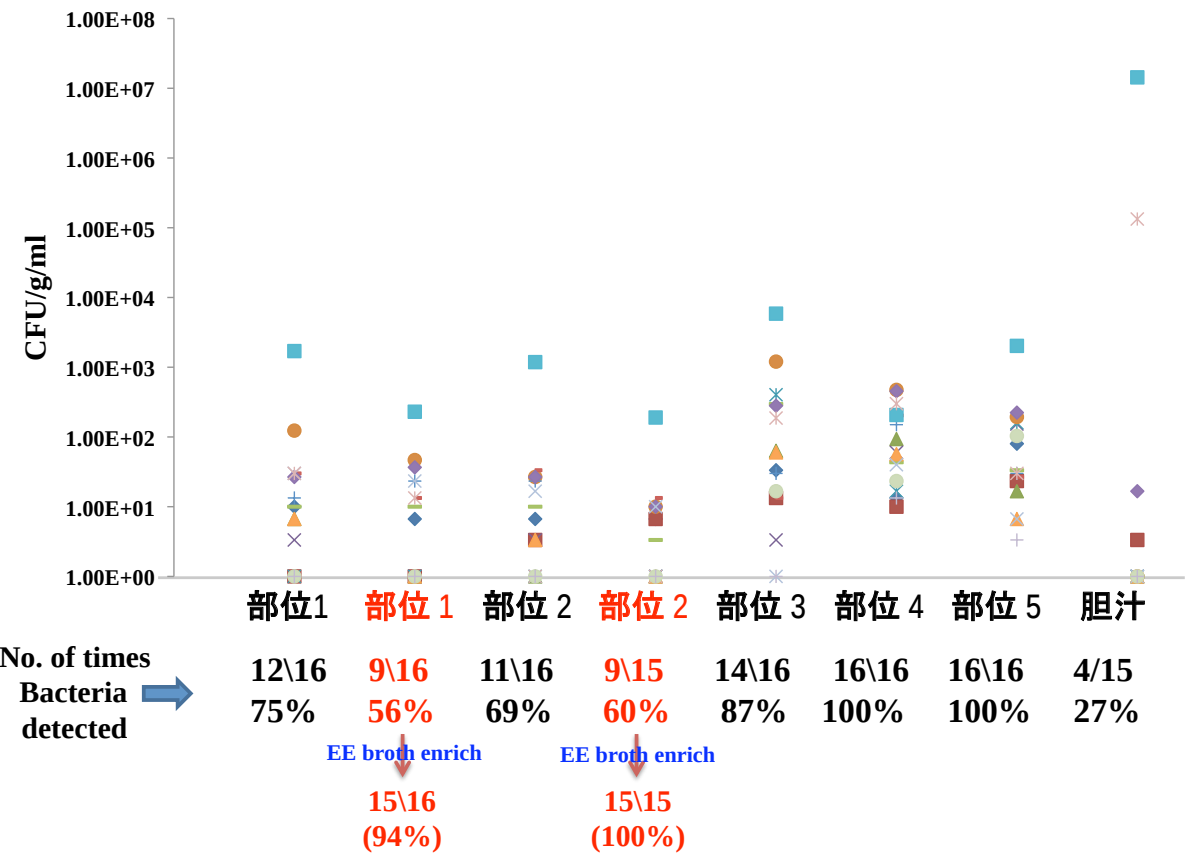
プロトコール: 消毒薬処理後に凍結融解した肝臓内の腸内細菌科菌群



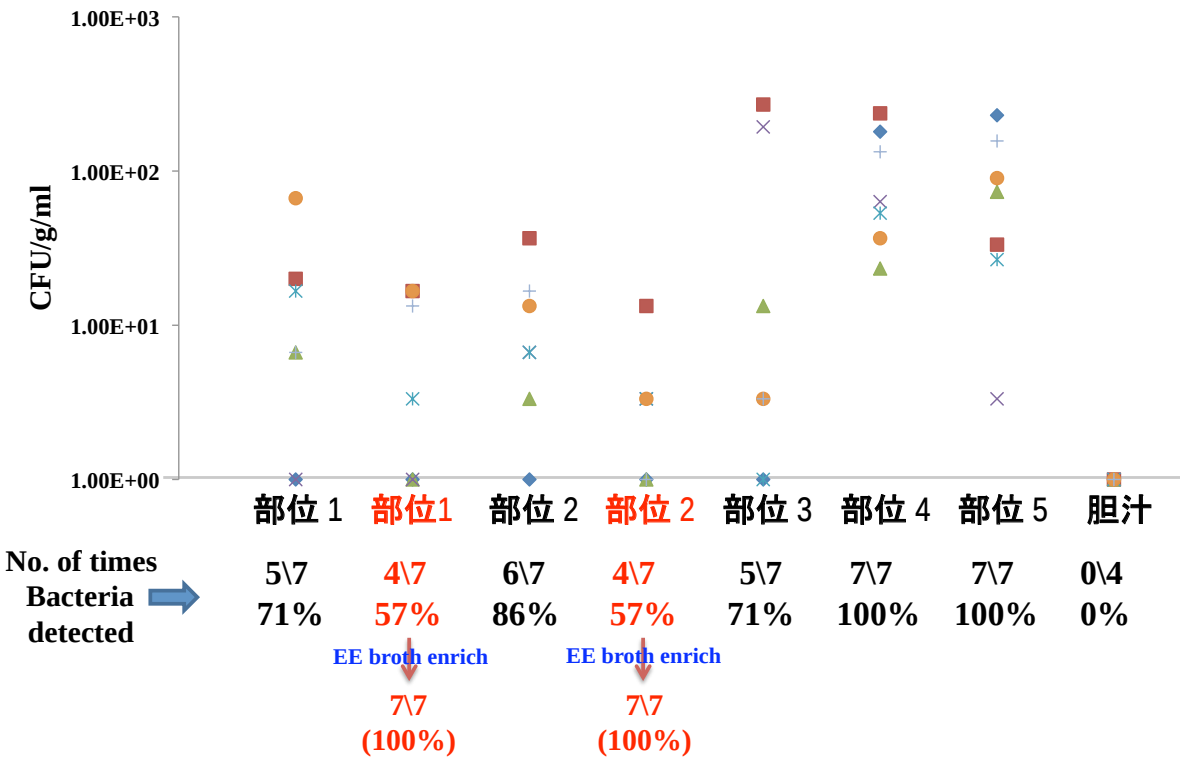
電解水A (2000 ppm) (2015年4月~2015年9月)



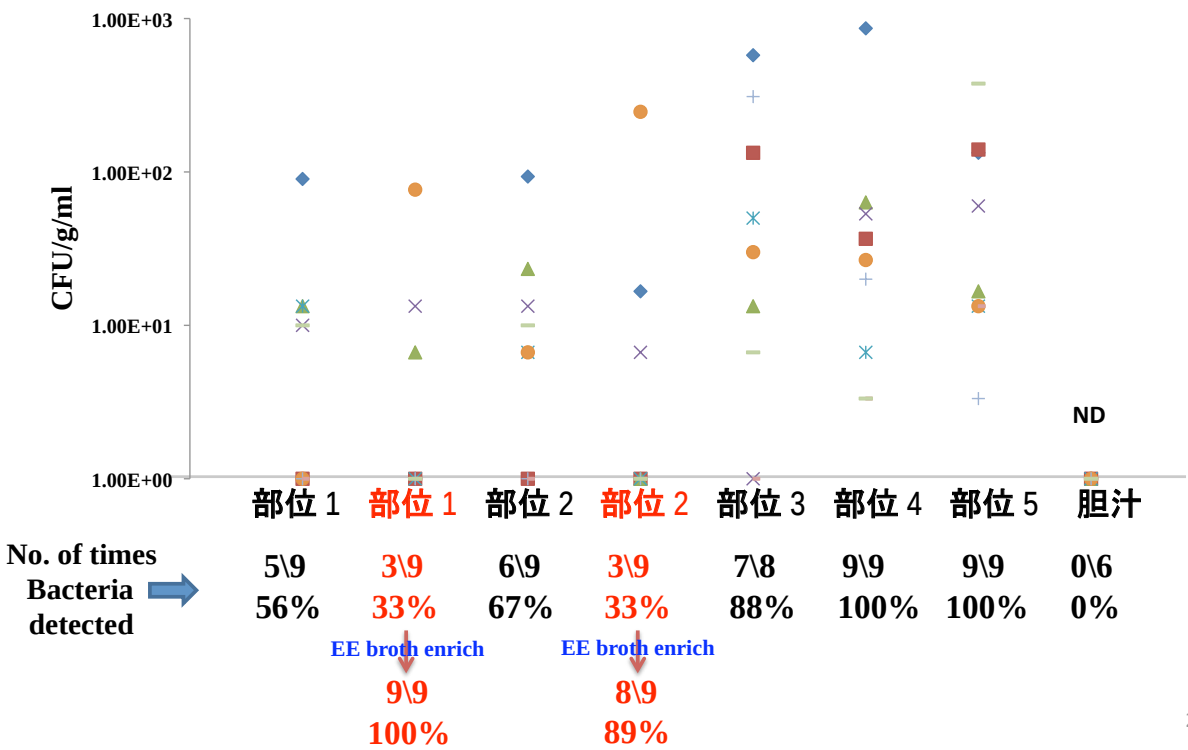
アルカリ系消毒薬A (2015年5月~2015年8月)



アルカリ系消毒薬B (2015年6月~2015年8月)



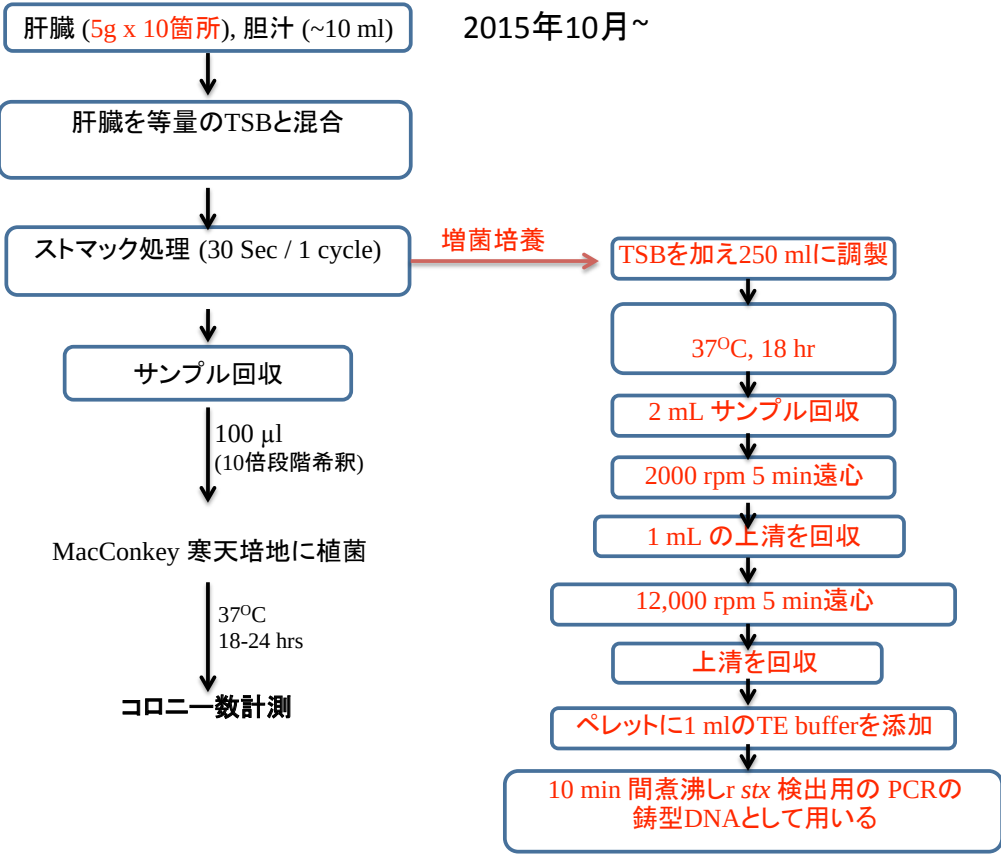
アルカリ系消毒薬C (2015年8月~2015年9月)



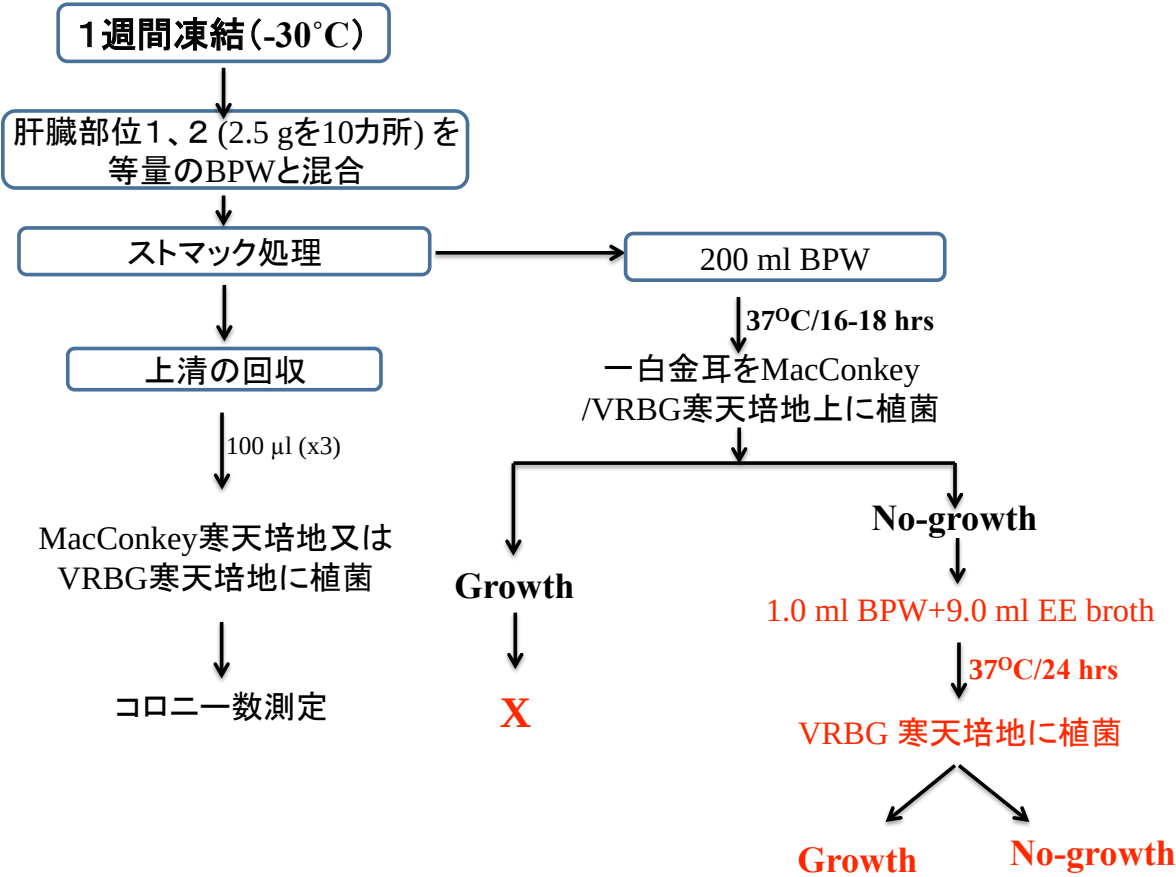
Liver parts used in these experiments



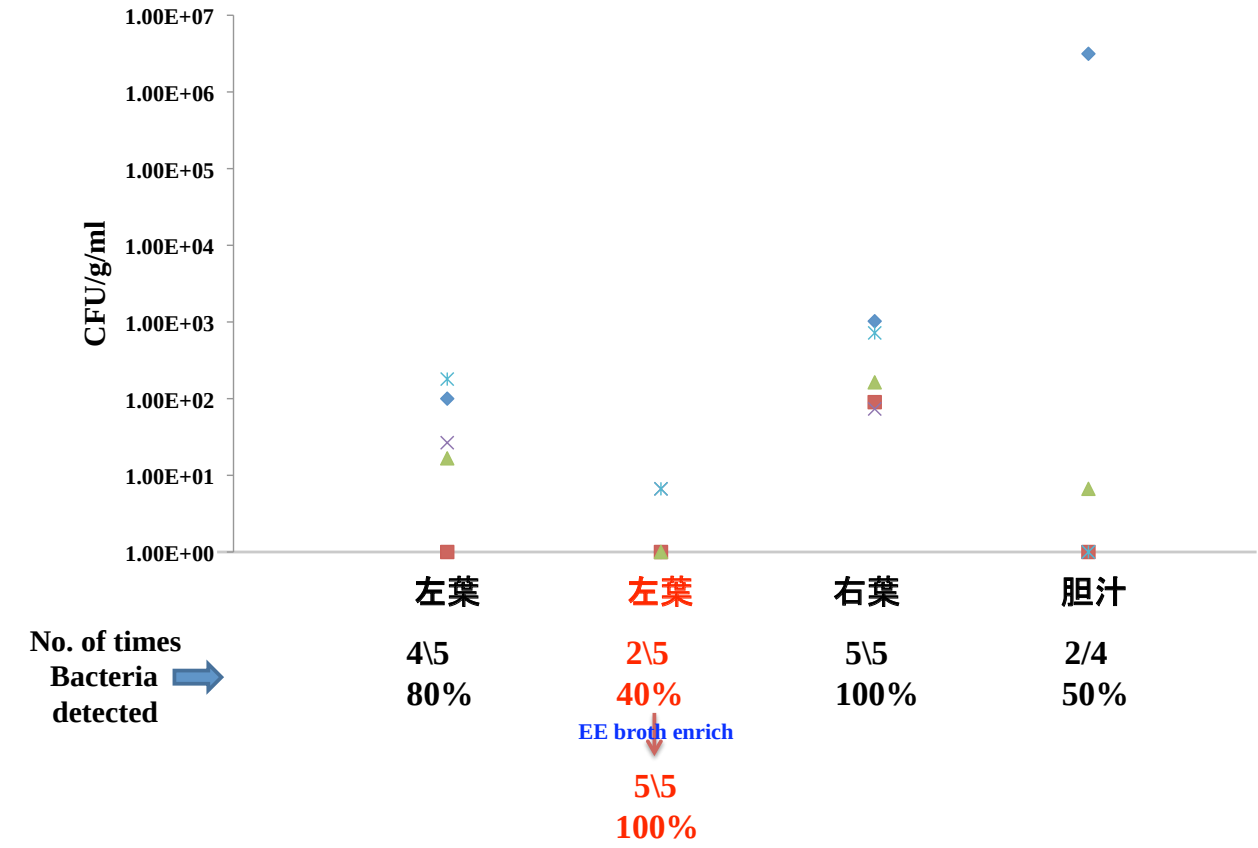
プロトコール



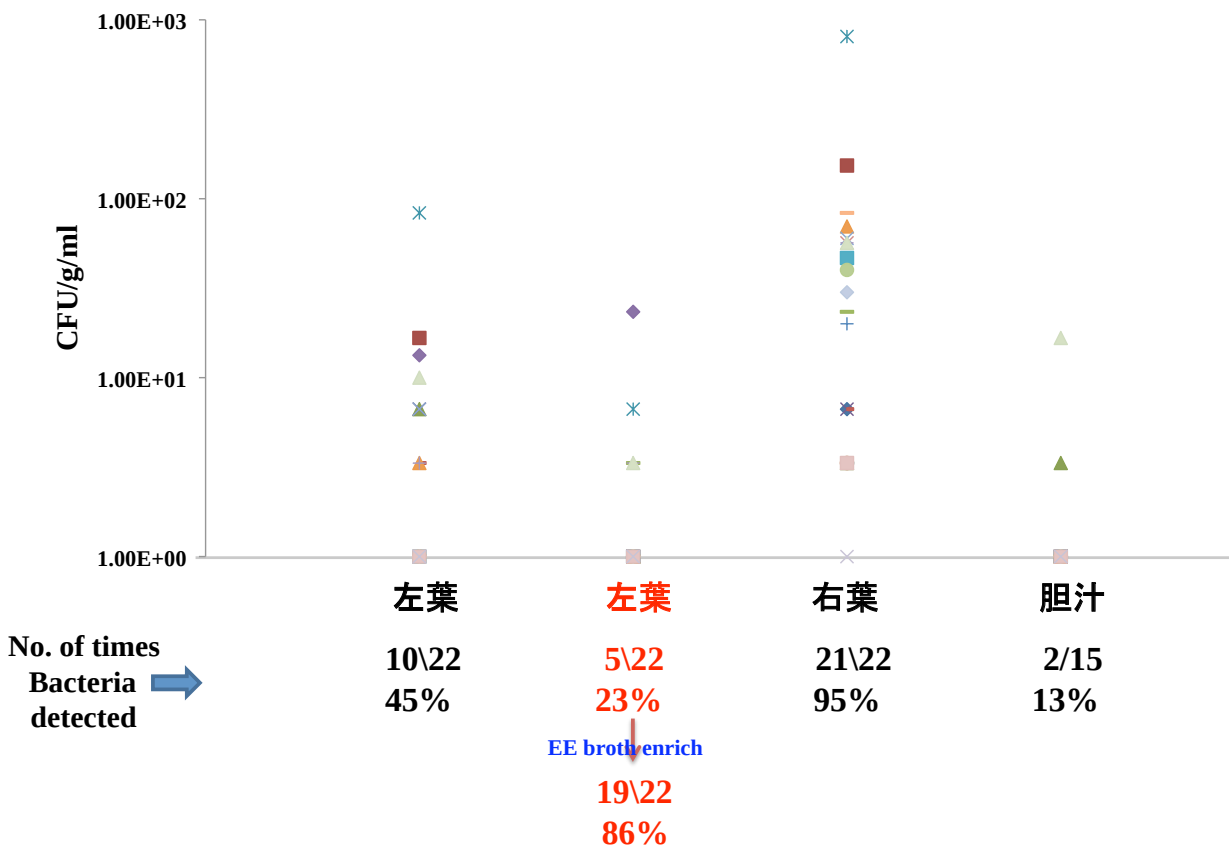
プロトコール: 消毒薬処理後に凍結融解した肝臓内の腸内細菌科菌群



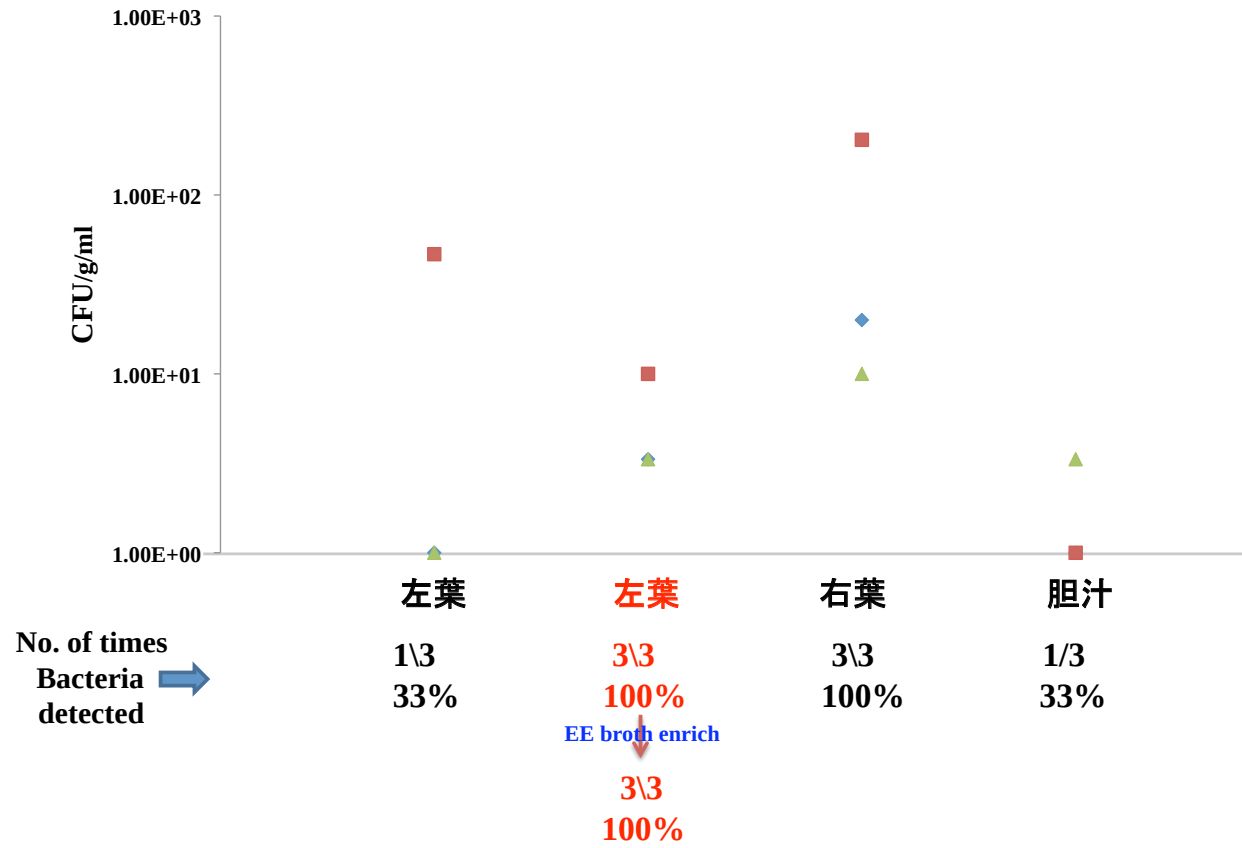
電解水B (Oct-2015)



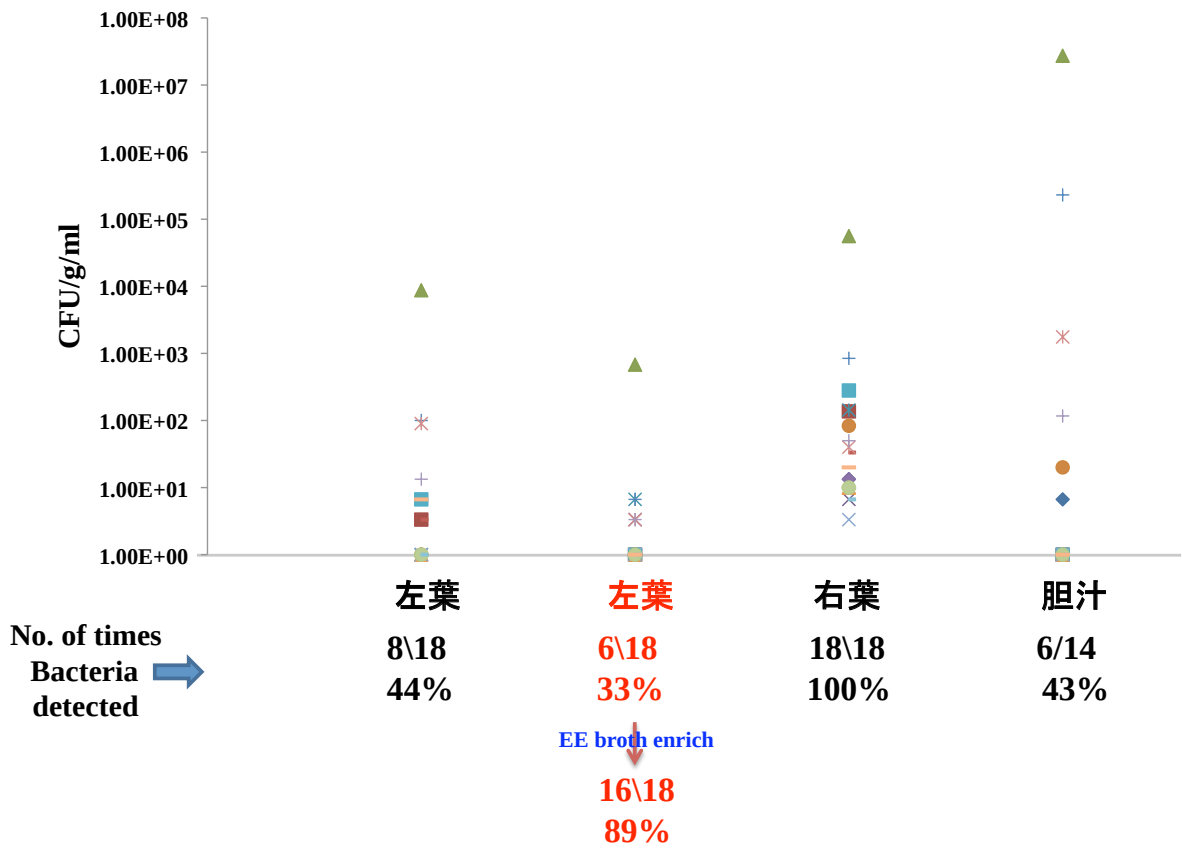
電解水A (2000 ppm) (2015年10月~2015年12月)

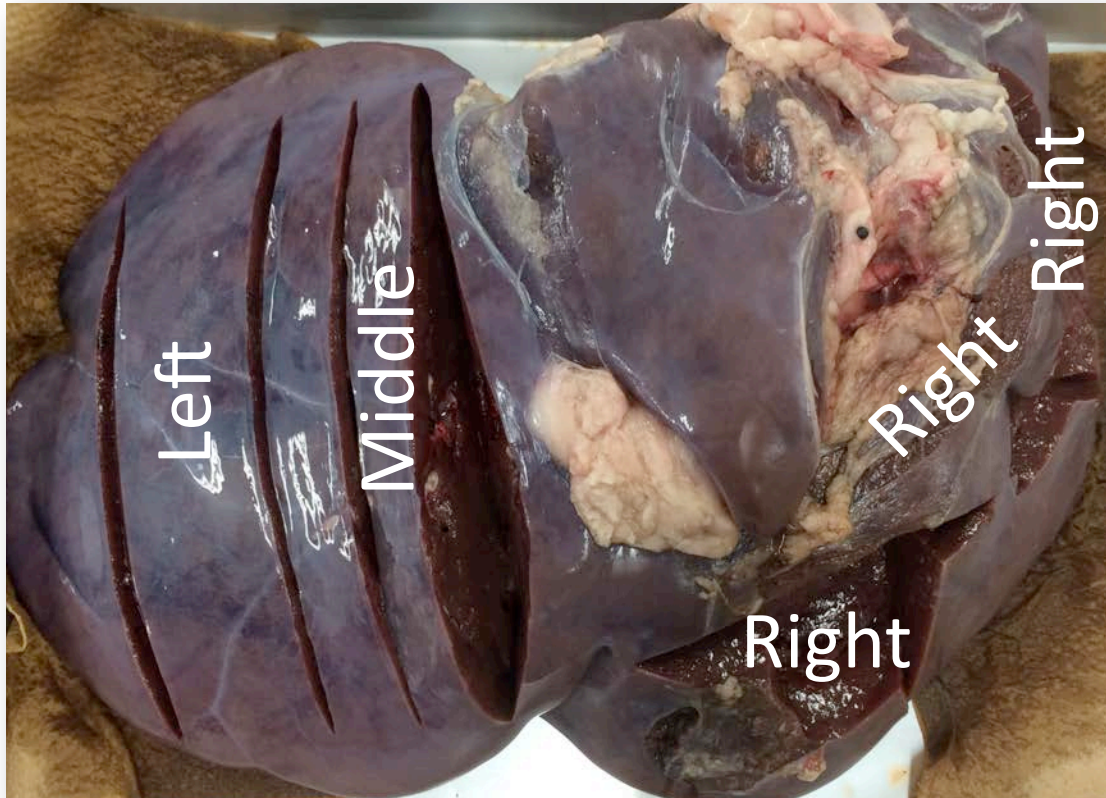


塩素系消毒薬 B (2015年10月)

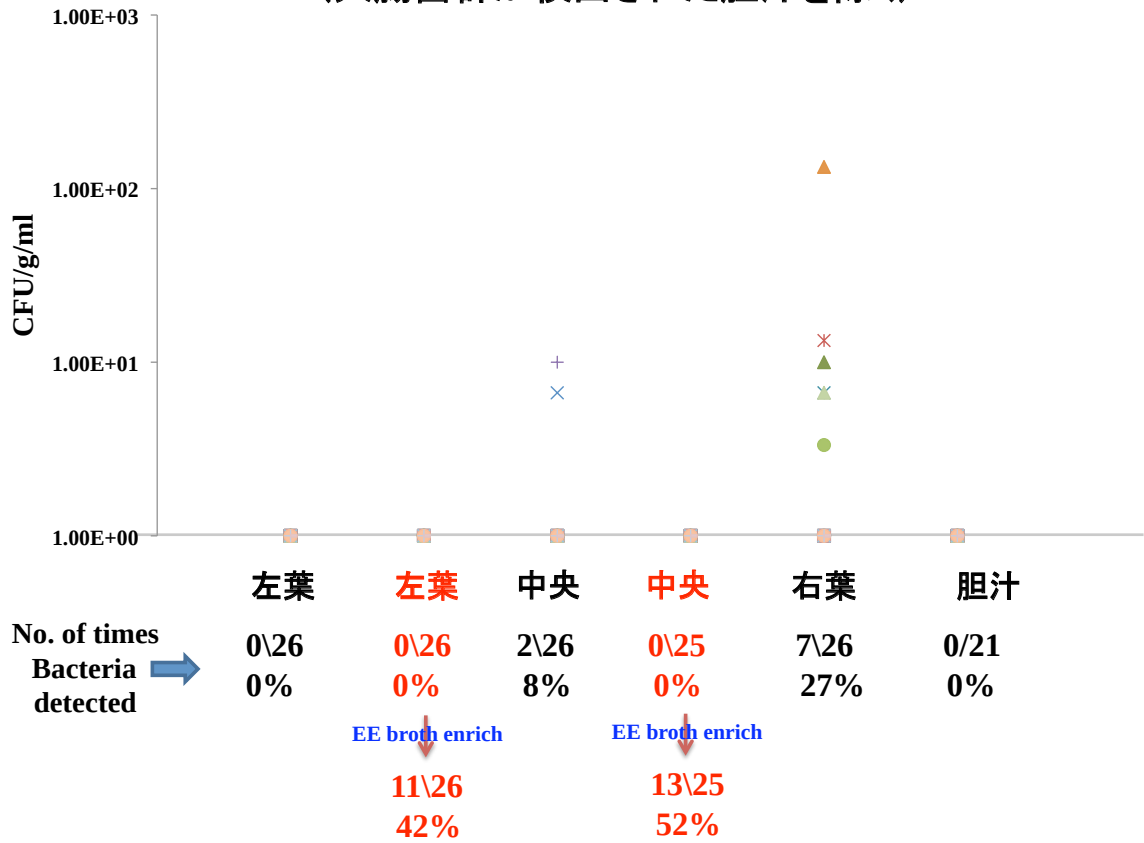


電解水A (500 ppm) (2015年10月~2015年12月)

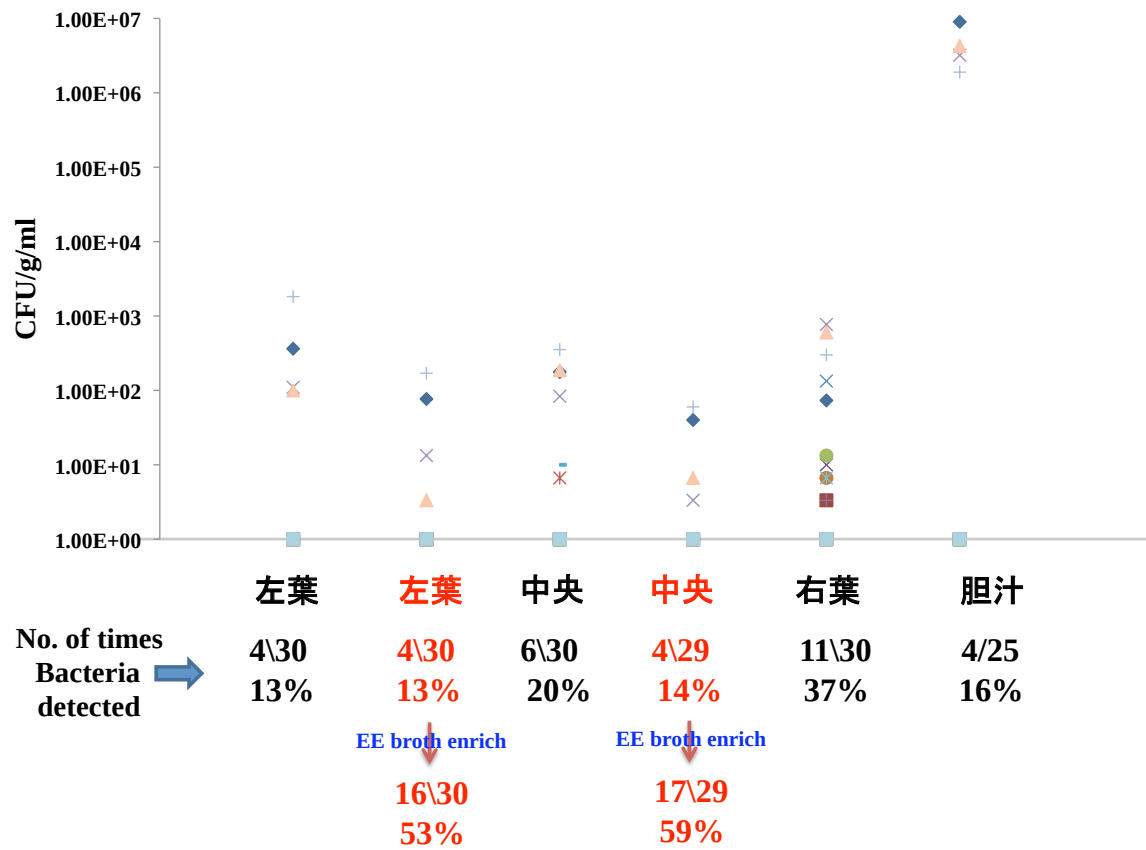




塩素系消毒薬B (400 ppm) (2016年1月—3月)
(大腸菌群が検出された胆汁を除く)



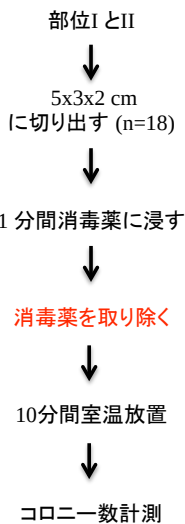
塩素系消毒薬A (400 ppm) (2016年1月—3月)



スライス実験 (n=5)

スライス実験1

プロトコール



Slice Experiment Expt_42_150519: Liver 4

	凍結	サンプル	CFU/plate			CFU/g	BPW増菌培養
1	-	L4_未処理	204	319	351	2.91E+03	Growth
2	-	L4_未処理	617	668	597	6.27E+03	Growth
3	-	L4_未処理	498	398	517	4.71E+03	Growth
4	+	L4_未処理	110	125	100	1.12E+03	Growth
5	+	L4_未処理	42	41	47	4.33E+02	Growth
6	+	L4_未処理	247	243	225	2.38E+03	Growth

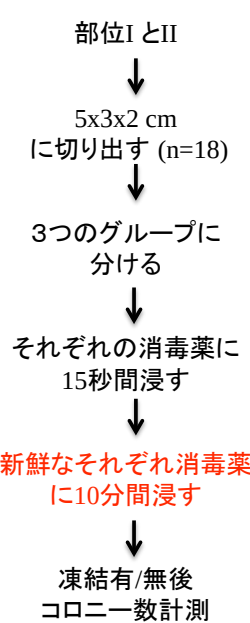
1	-	L4_電解水A	544	504	522	5.23E+03	Growth
2	-	L4_電解水A	541	571	509	5.40E+03	Growth
3	-	L4_電解水A	611	597	544	5.84E+03	Growth
4	+	L4_電解水A	64	79	85	7.60E+02	Growth
5	+	L4_電解水A	4	6	12	7.33E+01	Growth
6	+	L4_電解水A	9	8	8	8.33E+01	Growth

1	-	L4_アルカリ系A	478	518	511	5.02E+03	Growth
2	-	L4_アルカリ系A	568	497	561	5.42E+03	Growth
3	-	L4_アルカリ系A	592	597	607	5.99E+03	Growth
4	+	L4_アルカリ系A	182	189	153	1.75E+03	Growth
5	+	L4_アルカリ系A	85	126	120	1.10E+03	Growth
6	+	L4_アルカリ系A	40	45	39	4.13E+02	Growth

胆汁	405	378	871	5.51E+06
----	-----	-----	-----	----------

スライス実験2

プロトコール



Slice Experiment Expt_43_150602: Liver 1

	凍結	サンプル	CFU/plate			CFU/g	BPW増菌培養
1	-	L1_未処理	0	0	0	0	Growth
2	-	L1_未処理	0	0	0	0	No growth
3	-	L1_未処理	0	0	2	6.67E+00	Growth
4	+	L1_未処理	0	0	0	0	Growth
5	+	L1_未処理	0	0	0	0	Growth
6	+	L1_未処理	0	0	1	3.33E+00	Growth

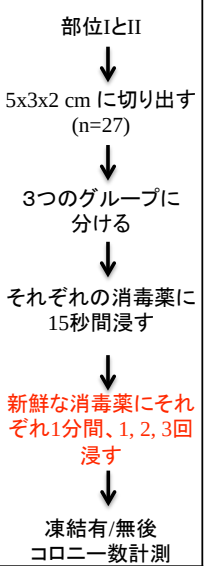
1	-	L1_電解水A	0	0	0	0	Growth
2	-	L1_電解水A	0	0	0	0	Growth
3	-	L1_電解水A	0	0	0	0	No growth
4	+	L1_電解水A	0	0	0	0	Growth
5	+	L1_電解水A	0	0	0	0	No growth
6	+	L1_電解水A	0	0	0	0	No growth

1	-	L1_アルカリ系A	0	0	0	0	Growth
2	-	L1_アルカリ系A	0	0	0	0	No growth
3	-	L1_アルカリ系A	0	0	0	0	Growth
4	+	L1_アルカリ系A	0	0	0	0	Growth
5	+	L1_アルカリ系A	0	0	0	0	No growth
6	+	L1_アルカリ系A	0	0	0	0	Growth

胆汁	0	0	0	0.00E+00
----	---	---	---	----------

スライス実験3

プロトコール

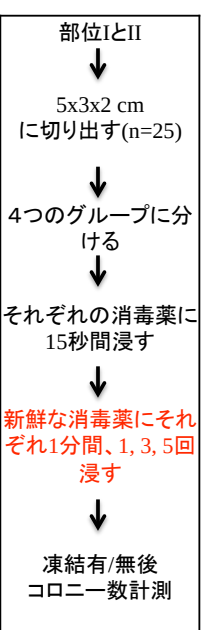


Expt_44_150615: Liver 2

	サンプル	処理時間 (分)	凍結	CFU/plate			CFU/g	BPW増菌培養
1	L2_未処理	-	-	0	0	0	0.00E+00	Growth
2	L2_未処理	-	-	0	0	0	0.00E+00	Growth
3	L2_未処理	-	-	0	0	2	6.67E-01	Growth
4	L2_電解水A	1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
5	L2_電解水A	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
6	L2_電解水A	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
7	L2_電解水A	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
8	L2_電解水A	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
9	L2_電解水A	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
10	L2_アルカリ系A	1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
11	L2_アルカリ系A	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
12	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
13	L2_アルカリ系A	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
14	L2_アルカリ系A	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
15	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
16	L2_アルカリ系B	1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
17	L2_アルカリ系B	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
18	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
19	L2_アルカリ系B	1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
20	L2_アルカリ系B	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
21	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
22	塩素系B	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
23	塩素系B	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
24	塩素系B	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
25	塩素系B	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
26	塩素系B	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
27	塩素系B	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
	胆汁	NA	NA	0	0	0	0.00E+00	NA

スライス実験4

プロトコール

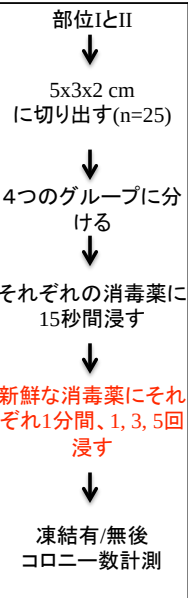


Expt_45_150630: Liver 5

	サンプル	処理時間と回数 (分)	凍結	CFU/plate			CFU/g	BPW増菌培養
1	L2_未処理	-	-	0	0	0	0.00E+00	ND
2	L2_未処理	-	-	0	0	0	0.00E+00	ND
3	L2_未処理	-	-	0	0	1	3.33E-01	ND
4	L2_未処理	-	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
5	L2_未処理	-	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
6	L2_未処理	-	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
7	L2_電解水A	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
8	L2_電解水A	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
9	L2_電解水A	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
10	L2_電解水A	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
11	L2_電解水A	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
12	L2_電解水A	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
13	L2_アルカリ系A	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
14	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
15	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
16	L2_アルカリ系A	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
17	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
18	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
19	L2_アルカリ系B	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
20	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
21	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
22	L2_アルカリ系B	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
23	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
24	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
25	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
	胆汁	NA	NA	0	0	0	0.00E+00	NA

スライス実験5

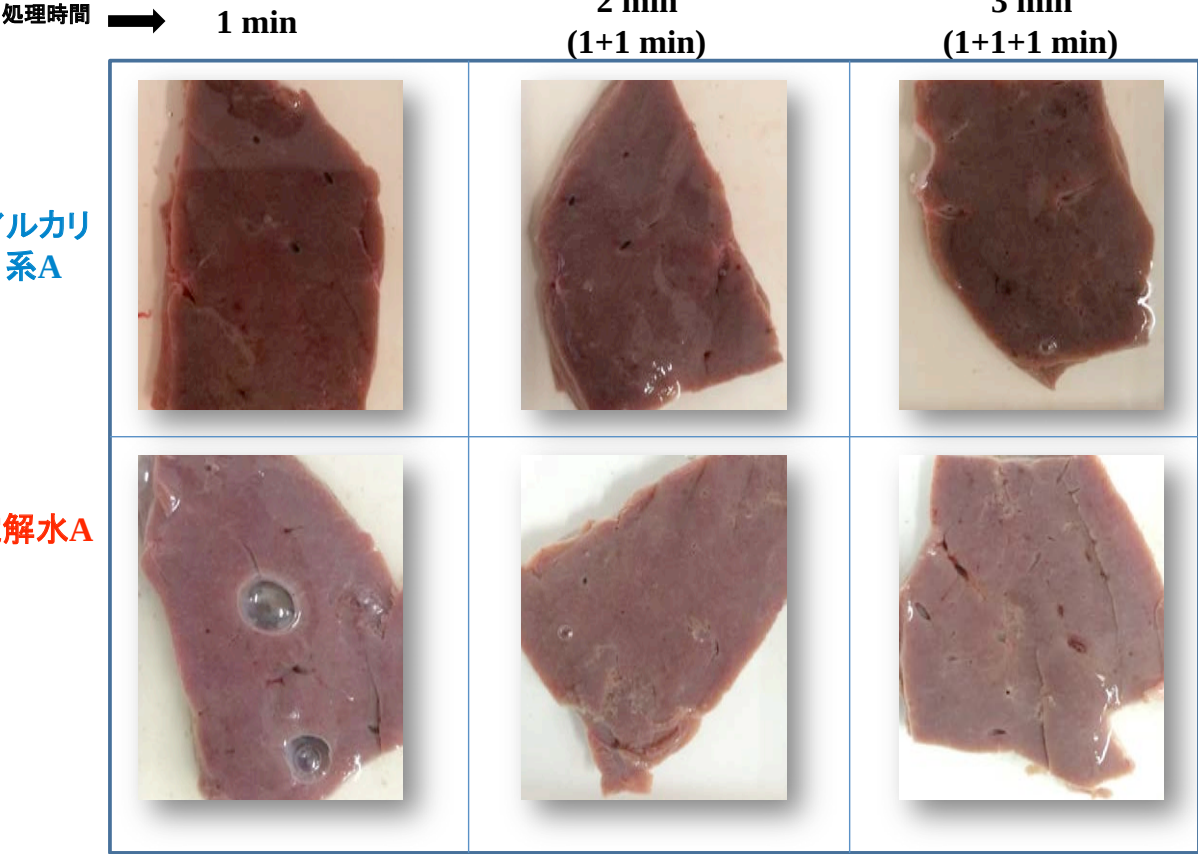
プロトコール



Expt_46_150709: Liver 2

	消毒薬	処理時間と回数 (分)	凍結	CFU/plate			CFU/g	BPW増菌
1	L2_未処理	-	-	0	0	0	0.00E+00	ND
2	L2_未処理	-	-	0	0	1	3.33E+00	ND
3	L2_未処理	-	-	0	0	1	3.33E+00	ND
4	L2_未処理	-	+	1	0	0	3.33E+00	Growth
5	L2_未処理	-	+	0	0	2	6.67E+00	Growth
6	L2_未処理	-	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
7	L2_電解水A	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
8	L2_電解水A	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
9	L2_電解水A	1 + 1 + 1	+	1	0	0	3.33E+00	Growth
10	L2_電解水A	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
11	L2_電解水A	1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
12	L2_電解水A	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
13	L2_アルカリ系A	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
14	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
15	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
16	L2_アルカリ系A	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
17	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
18	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	No growth
19	L2_アルカリ系A	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
20	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1	+	0	0	2	6.67E+00	Growth
21	L2_アルカリ系A	1 + 1 + 1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
22	L2_アルカリ系B	1	+	0	0	1	3.33E+00	Growth
23	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
24	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
25	L2_アルカリ系B	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
26	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1	+	0	1	0	3.33E+00	Growth
27	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1 + 1 + 1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
28	L2_アルカリ系B	1	+	0	0	0	0.00E+00	Growth
29	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1	+	0	0	1	3.33E+00	No growth
30	L2_アルカリ系B	1 + 1 + 1 + 1 + 1	+	0	0	1	3.33E+00	Growth
	胆汁	NA	NA	0	0	0	0.00E+00	Growth

スライス実験3



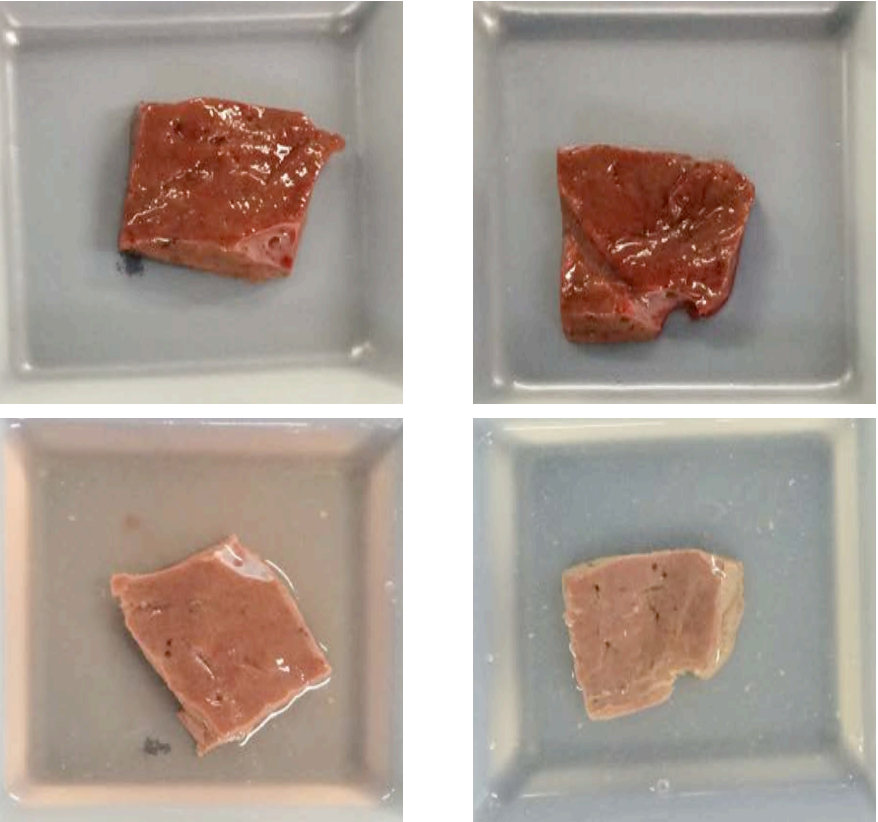
スライス実験2

アルカリ系A (10 min)

電解水A (10 min)

Before Treatment

After Treatment



Date of Experiment_150602

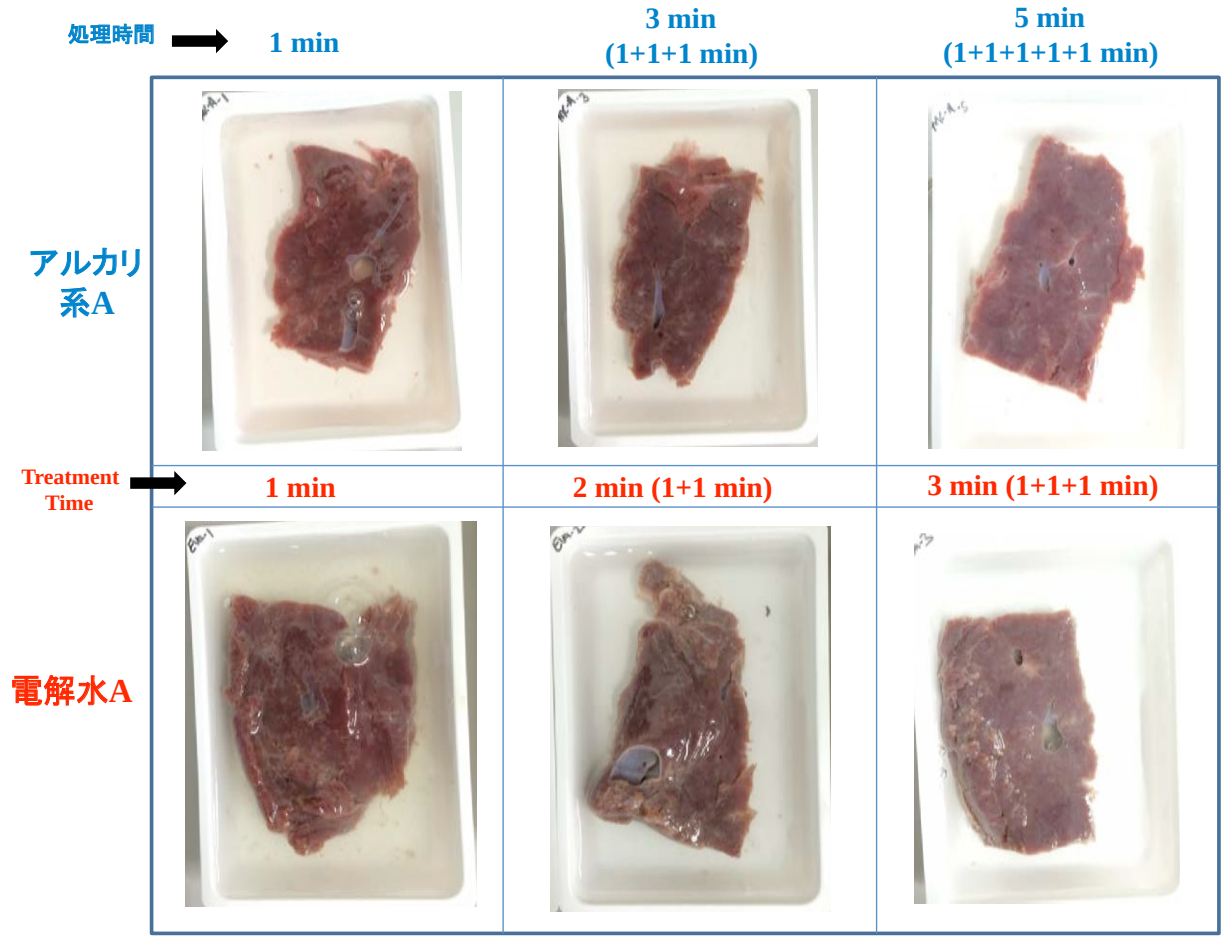
スライス実験3

塩素系B: 20 倍 (3 min)

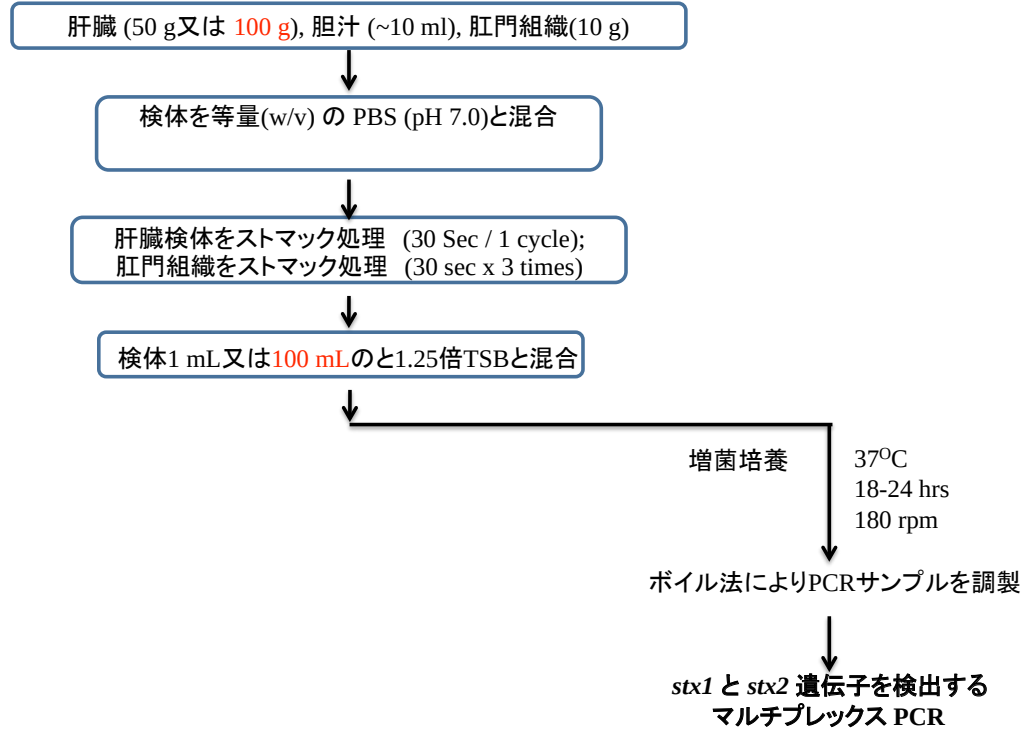
塩素系B: 100 倍 (3 min)



スライス実験4



牛検体からのstx遺伝子の検出プロトコール



肝臓を含む牛消化管各部位のstx遺伝子の分布と陽性率(2016年3月1日)

回収部位	舌	唾液	胆汁	肝臓	肝臓表面	第一胃内容物	十二指腸組織	十二指腸内容物	盲腸組織	盲腸内容物	肛門組織	肛門内容物
Total	46	41	277	303	211	46	68	68	69	69	245	65
stx-1 (n)	1	1	0	0	0	2	1	2	4	4	10	6
stx-2 (n)	1	3	0	5	15	1	2	6	12	12	132	16
stx 1 & 2	1	5	0	0	1	1	1	2	2	2	61	7
Total %	3 6.5	9 21.9	0 0	5 1.86	16 7.6	4 8.7	4 5.8	10 14.7	18 26.0	18 26.0	203 82.9	29 44.6

肝臓の部位別stx遺伝子の陽性率(増菌液 1mLより/2012年11月-2015年9月23日)

部位	1	2	3	4	5	胆汁
陽性/検体数	0/221 (0)	0/225 (0)	2/220 (1.0)	3/211 (1.6)	2/211 (1.1)	0/216 (0)

検出下限:62 CFU/ 50 g

肝臓の部位別stx遺伝子の陽性率(増菌液 100mLより/2015年10月-2016年3月1日)

部位	左(部位1/2)	右(部位3/4/5)	胆汁
陽性/検体数	0/78 (0)	0/78 (0)	0/61 (0)

検出下限:6.2 CFU/ 50 g

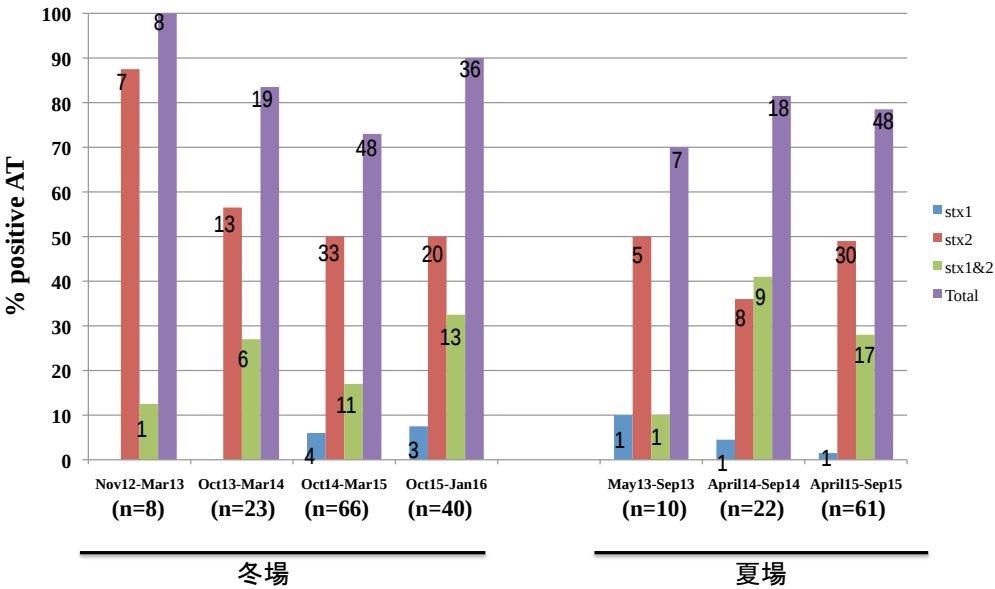
stx 遺伝子が陽性となった牛肝臓の性状

実験日	系統	性	胆嚢	胆汁	肝臓		肛門		CFU/g/ml				
					内部	表面	組織	内容物	部位I	部位 II	部位 III	部位 IV	部位V
130911*	黒毛和種	雌	ND	-/-	-/+ (III)	ND	NR	NR	0.00E+00	6.00E+00	1.12E+03	3.00E+00	6.70E+02
130911*	黒毛和種	雌	ND	-/-	-/+ (V)	ND	NR	NR	1.60E+01	1.16E+02	3.64E+01	3.93E+02	5.93E+03
141105	黒毛和種	雌	-/-	-/-	-/+ (IV)	-/-	+/+	ND	0.00E+00	0.00E+00	7.80E+02	1.05E+03	4.40E+02
141118	交雑種	去勢	-/-	-/-	-/+ (III-V)	+/+	+/+	ND	0.00E+00	0.00E+00	1.56E+02	3.70E+02	8.00E+02
141118	黒毛和種	雌	-/-	-/-	-/+ (IV)	-/+	-/-	ND	0.00E+00	0.00E+00	9.00E+01	1.00E+02	2.03E+02

NR: not received; ND: not done

*Saw-dust Livers

肛門組織におけるstx 遺伝子検出の季節性



サルモネラ、STEC及びカンピロバクターを検出するためのマルチプレックスPCR法の構築

サルモネラ、STECとカンピロバクターを同時に検出ためのマルチプレックスPCR

Establishment of the PCR System Specific to *Salmonella* spp. and Its Application for the Inspection of Food and Fecal Samples
Sou-ichi MAKINO, Hisao KURAZONO¹⁾, Manas CHONGSANGUAM²⁾, Hideo HAYASHI³⁾, Hyeng-il CHEUN, Saori SUZUKI and Toshikazu SHIRAHATA
Department of Veterinary Microbiology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada 2-1, Obihiro 776-8555, Japan; ²⁾Department of Medical Technology, School of Health Sciences, Okayama University, Okayama 700-8558, and ³⁾Department of Microbiology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan
(Received 21 April 1999/Accepted 7 July 1999)

ABSTRACT. We established the PCR detection system specific to *Salmonella* species using *Salmonella enteritidis* gene (*stn*). The detection limit was one bacterial cell per one gram of fecal and minced-meat samples using enrichment procedure by Trypticase soy broth or *Salmonella* enrichment broth, respectively. We concluded that this PCR system is useful for the practical application in the field of the public hygiene. —KEY WORDS: food, PCR, salmonella.

—J. Vet. Med. Sci. 61(11): 1245–1247, 1999

Target gene: **stn**
Amplicon size: 260 bp
Sal-stn-489F: CTTTGGTCGTAAAATAAGGCG
Sal-stn-748R: TGCCCAAAGCAGAGAGATTC
(Annealing Temp: 55°C)

Microbiol. Immunol., 40(5), 345–352, 1996
Typing of Verotoxins by DNA Colony Hybridization with Poly- and Oligonucleotide Probes, a Bead-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and Polymerase Chain Reaction
Shinji Yamasaki^{1,*}, Zaw Lin¹, Hiromasa Shirai¹, Akito Terai¹, Yuichi Oku¹, Hideaki Ito¹, Mari Ohmura^{1,2}, Tadahiro Karasawa¹, Teizo Tsukamoto¹, Hisao Kurazono^{1,3}, and Yoshifumi Takeda^{1,4,5}
¹Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan; ²Research Insti-

Target gene: **stx**
Amplicon size: 518 bp
VTcomU1: GAACGAAATAATTTATATGTG
VTcomD2: TGATGATGGCAATTTCAGTAT
(Annealing Temp: 58°C)

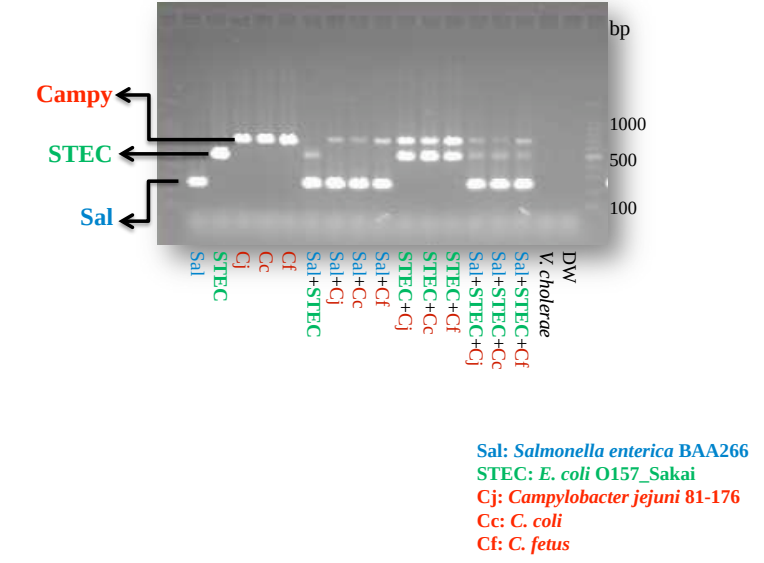
ELSEVIER Microbial Pathogenesis 42 (2007) 174–183
Comparative analysis of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains
Masahiro Asakura^{a,b}, Worada Samosornsuk^a, Masumi Taguchi^c, Kazuhiro Kobayashi^c, Naoki Misawa^d, Masahiro Kusumoto^{e,f}, Kazuhiko Nishimura^g, Akio Matsuhisa^{a,b}, Shinji Yamasaki^{a,*}
^aGraduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, Gakuencho, Nakai-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan
^bResearch and Development Center, Fuso Pharmaceutical Industries Ltd., Osaka, Japan
^cOsaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka, Japan
^dFaculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki, Japan
^eTenaga Institute of Biotechnology, Tenaga Co., Ltd., Fukui, Japan

Target gene: **cdtB**
Amplicon size: ~712 bp
cdtBcom1: ACTTGGGAATTTGCAAGGC
cdtBcom2: TCTAAAATTTACGGGAAATG
[H: Not G (A or C or T)]
(Annealing Temp: 50°C)

サルモネラ、STECとカンピロバクターを検出するためのマルチプレックスPCR

PCR condition
94°C: 3 min
94°C: 30 sec
54°C: 30 sec
72°C: 1.5 min
72°C: 2 min
4°C: ∞
x30

Reaction Mix
Boiled Template: 1.0 µl
10x Ex-Taq buffer: 2.0 µl
2.5mM dNTP: 1.6 µl
Sal_stn_489F: (10µM) 1.0 µl
Sal_stn_748R: (10µM) 1.0 µl
VT-com-U1: (10µM) 1.0 µl
VT-com-D2: (10µM) 1.0 µl
Cdt_B-com1: (10µM) 1.0 µl
Cdt_B-com2: (10µM) 1.0 µl
Ex-taq enzyme: 0.1 µl
DW: 9.3 µl
Total: 20 µl

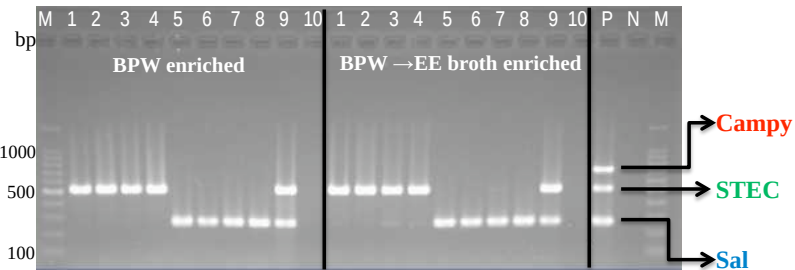


サルモネラ、STEC及びカンピロバクターを検出できるマルチプレックスPCR法のスパイク実験による検出下限

PCR condition
94°C: 3 min
94°C: 30 sec
50°C: 30 sec
72°C: 1.5 min
72°C: 2 min
4°C: ∞
x35

Reaction Mix
Boiled Template: 1.0 µl
10x Ex-Taq buffer: 2.0 µl
2.5mM dNTP: 1.6 µl
Sal_stn_489F: 0.25 µl
Sal_stn_748R: 0.25 µl
VT-com-U1: 0.5 µl
VT-com-D2: 0.5 µl
Cdt_B-com1: 1.0 µl
Cdt_B-com2: 1.0 µl
Ex-taq: 0.1 µl
DW: 9.3 µl

Stock primer concentration is 10 µM



Sample Details
1. 3.9E+00 cfu **STEC**
2. 3.9E+00 cfu **STEC**
3. 3.9E+01 cfu **STEC**
4. 3.9E+02 cfu **STEC**
5. 2.1E+00 cfu **Sal**
6. 2.1E+00 cfu **Sal**
7. 2.1E+01 cfu **Sal**
8. 2.1E+02 cfu **Sal**
9. 3.9E+01 cfu **STEC** + 2.1E+01 cfu **Sal**
10. No inoculation

Sal: *Salmonella enterica* BAA266
STEC: *E. coli* O157_Sakai
Cj: *Campylobacter jejuni* 81-176
M: 100 bp DNA ladder

サルモネラ, STEC及びカンピロバクターが検出できるマルチプレックスPCRの
STECに対する検出下限

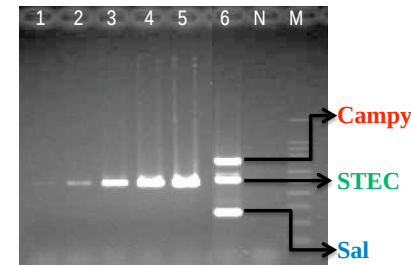
PCR condition

94°C: 3 min
94°C: 30 sec
50°C: 30 sec
72°C: 1.5 min
72°C: 2 min
4°C: ∞

Reaction Mix

Boiled Template: 1.0 µl
10x Ex-Taq buffer: 2.0 µl
2.5mM dNTP: 1.6 µl
Sal_stn_489F: 0.25 µl
Sal_stn_748R: 0.25 µl
VT-com-U1: 0.5 µl
VT-com-D2: 0.5 µl
Cdt_B-com1: 1.0 µl
Cdt_B-com2: 1.0 µl
Ex-taq: 0.1 µl
DW: 11.8 µl

Stock primer concentration is 10 µM



Sample Details

1. 1.0E+00 cfu/tube **STEC**
2. 1.0E+01 cfu/tube **STEC**
3. 1.0E+02 cfu/tube **STEC**
4. 1.0E+03 cfu/tube **STEC**
5. 1.0E+04 cfu/tube **STEC**
6. **STEC** + **Campy** + **Sal**

Sal: *Salmonella enterica* BAA266
STEC: *E. coli* O157_Sakai
Cj: *Campylobacter jejuni* 81-176
M: 100 bp DNA ladder

凍結増菌培養後に陽性となった検体でのサルモネラ、STEC
及びカンピロバクターを検出できるマルチプレックスPCR

実験日	肝臓 (n)	部位 I	部位 II	左葉	中央
51_150923	5	-	-	NA	NA
52_151007	10	NA	NA	-	ND
60_160209	6	NA	NA	-	-
61_160216	6	NA	NA	-	-
62_160301	6	NA	NA	-	-
合計	33	0/5	0/5	0/28	0/18

NA: 関係無し
ND: 行っていない

平成26年度
生食用牛レバー処理技術開発
事業報告書

1 はじめに

ユッケ、レバ刺し等に使用される生食用牛肉及び牛レバーについては、ユッケが原因とされる腸管出血性大腸菌O157による食中毒の発生を契機として、生食用牛肉については「生食用食肉の規格基準（平成23年9月12日付け厚生労働省告示第321号）」（以下「生食用牛肉の規格基準」という。）が設けられ、一方、生食用牛レバーについては平成24年7月から提供が禁止された。

ユッケ、タタキ等生食用牛肉については、「生食用牛肉の規格基準」を踏まえ、全国食肉事業協同組合連合会（以下「全肉連」という。）が加工現場での生食用牛肉の衛生的な取扱いについての基本及び手順を解説した「生食用牛肉加工マニュアル」、「牛タタキの加工マニュアル」を作成し、関係事業者に配布してきたところである。

こうした取り組みを通じて、生食用牛肉の販売、外食店での提供が衛生的な管理の下で実施され、徐々に生食用牛肉の需要は回復しつつある。

一方、生食用牛レバーについては、鮮度等の商品価値の面で国産品が使用されてきたところであるが、牛レバーの提供禁止に伴って豚やジビエの生レバーが提供される等、食品衛生上看過できない事態が生じている。

こうした中、E型肝炎、寄生虫等の感染リスクのより高い豚内臓の規格基準が制定されることにより生食用の提供が禁止されることになったが、牛レバーに代替する商品がないこと、生食及び加熱用途による商品価値が大きくこれを取り扱う関係業者の経済的損失も多大であること等から、生産者はもとより食肉加工、卸・小売、飲食業に関わる関係者、また消費者から安全な生食用牛レバーの提供の再開が渴望されているところである。

しかしながら、これまでの知見では、牛レバーの表面はもとより内部からも大腸菌群等が検出され、また少数例ではあるが腸管出血性大腸菌O157の汚染も報告されており、生食用牛肉のように表面の加熱処理では、これら菌群の殺菌ができないこともあって、生食用牛レバーの提供に向けた有効な処理方法が見いだせずにいる。

こうした状況を踏まえ、全肉連においては、衛生、獣医、微生物学の専門家、食肉処理・加工事業者等を委員に委嘱し、生食用牛レバーの提供再開に向け、検討会を開催し、牛レバーの適正な処理方法の開発、検証等を行うこととした。

本報告書は、生食用牛レバーの提供の再開のみならず、現在認められている加熱調理用の牛レバーについてのより衛生的な処理・加工・流通を促進する観点からも、牛レバーの各種細菌群の分布、各種消毒薬による洗浄試験の効果等の実態調査、基礎的データの蓄積を図ることとし、各種の試験等を実施することとした。

なお、生食用牛レバーの再開に向けては、現在のところ牛肝臓を安全に生食するための有効な処理方法等についての知見も少なく、その開発も含め試行錯誤の段階にあるが、これまでの調査及び試験の結果の取りまとめを行うことにより、生食用牛レバー再開の一助とすること、加熱調理用牛レバーの少しでもより良い衛生的な処理に寄与できることを願い、中間報告とするものである。

2 事業の目的・趣旨

平成23年10月に「生食用食肉の規格基準」が施行され、平成24年7月に生食用牛レバーの提供が禁止された。

特に、鮮度の関係から国産品が専ら使用されてきた牛生レバーの提供の禁止は、生産者のもとより国産牛の内臓を取扱う加工・流通・外食業者等に多大な経済的損失を与える等大きな影響がみられた。

生食用レバーの提供再開に向けた関係者の根強い意向等を踏まえ、厚生労働省においても、放射線利用や洗浄消毒等による牛レバーの殺菌処理等についての調査・研究が実施されているが、放射線によるレバーの処理については、現時点では国民感情面での抵抗や理解不足もあり、多くの消費者の受入が困難と思慮されるところである。

このため、全肉連では（独）農畜産業振興機構の助成を受け、生食用牛レバーの提供再開に向け、また加熱調理用の牛レバーについてのより衛生的な処理・加工・流通を促進する観点も含め、牛レバーの各種細菌群の分布、各種消毒薬による洗浄効果等の実態調査、基礎的データの蓄積を図ることとする。

3 事業の実施内容

（1）検討会の開催

事業の目的を踏まえ、下記の具体的な事項についての検討を行うため、学識経験者、食肉事業者等を委員とする生食用牛レバー処理技術開発検討会を開催した。

①検討事項

- ア 牛レバー分離時における衛生的処理方法の検証
- イ 牛レバー表面・内部、胆汁中の各種細菌群の分布状況の調査
 - ＊腸内細菌科菌群フリーの牛レバー部位（レバ刺しに提供される左葉部）の識別流通のフィジビリティを探索するための調査
- ウ 殺菌力のある洗浄水による消毒方法の開発と効果の検証
 - ・消毒薬の種類（次亜塩素酸ソーダ、機能水、過酢酸等）
 - ・消毒薬の濃度
 - ・洗浄方法（表面及び胆管内部）
- エ 衛生的な保存、輸送形態の検討
 - ・と畜後（牛レバー分離後）の牛レバー内部における温度の経時変化
 - ・冷水・氷詰めでの輸送、冷蔵庫での冷蔵・冷凍処理、急速冷凍処理による細菌群の検出状況
- オ 解凍後の官能試験
- カ その他、有効な殺菌方法の検討

②検討委員会の委員

検討委員会の委員は下記のとおり。

委員氏名		所属・役職
1	関崎 勉	東京大学大学院農学生命科学研究科 教授
2	浅井 鉄夫	岐阜大学大学院連合獣医学研究科 教授
3	山崎 伸二	大阪府立大学大学院生命研究科学研究科 教授
4	大谷 谷光	松原アディションミート株式会社
5	山口 葵	(一社) 日本畜産副産物協会 会長
6	河原 光雄	全国食肉事業協同組合連合会 会長

※検討会には、上記委員の他、アドバイザーとして検査・分析機関及び農林水産省、(独)農畜産業振興機構の担当者が出席。

4 試験調査等の結果概要

(1) 食肉科学技術研究所での概要(8月6日～9月26日)

—予備調査—

①目的

下記の仮説の下、腸内細菌科菌群等の細菌フリーの肝臓部位(レバ刺しに提供される左葉部)の識別流通の可能性を検証するため、肝臓表面・内部(4ヶ所)、胆汁の細菌検査を行い、肝臓内部の細菌の分布状況について予備的な調査を実施した。

(検査実施に当たっての仮説)

○健康な生きた牛の肝臓組織内には、本来、腸管出血性大腸菌O157は存在しないのではないか。

○肝臓内部が汚染されるとすれば、と畜後、横倒しになった際に、消化管が圧迫され、胆管等を通じて腸から内容物が逆流することによるものではないか。

○とすれば、肝臓が全て汚染されているとは限らない。また、肝臓深部(レバ刺し用に供される左葉部)での汚染の可能性が低いのではないか。

○肝臓の洗浄消毒による殺菌と組み合わせ、肝臓の細菌検査を実施することで、細菌フリーの肝臓を識別流通できるのではないか。(細菌フリーであることが確認されるまでの間は、凍結保存)

②予備調査の概要

こうした考えの下に、肝臓の各部位(表面、組織内部(4ヶ所：図 肝臓の検査部位参照)、胆汁中)の細菌検査を実施した。

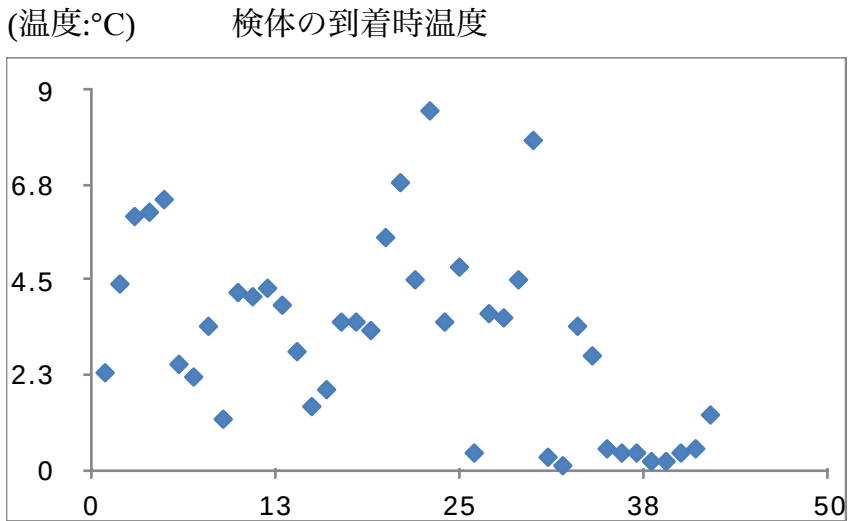
対象とした細菌の種類は、生食用牛肉の危害要因である腸管出血性大腸菌O157、サ

ルモネラ属菌を含み、成分規格に衛生指標菌として採用されている腸内細菌科菌群の検査からはじめ、検査結果を踏まえ、大腸菌群、細菌数(肝臓表面)及びカンピロバクターについても追加検査を実施した。(検査法等については、別添資料に記載)

牛生レバーの検体は、南大阪食肉市場及び大阪市中央卸売市場南港市場でと畜された牛より採取されたもので、胆嚢を切除し、次亜塩素酸ソーダで表面洗浄消毒及び胆管内部の洗浄消毒が実施されたものを氷詰めの後、(一社)食肉科学技術研究所に冷蔵輸送(輸送時間は1日程度)したものを供した。

なお、南大阪食肉市場では、内臓分離後、肝臓を吊り下げて処理室に搬入されており、洗浄水の次亜塩素酸ソーダの濃度は500ppm、南港市場ではシュートで搬入されており、次亜ソの濃度は200ppmで洗浄消毒したものであった。

検体レバーの到着時の温度は、下表のとおり平均3.1℃であったが、期間が夏季ということもあり、8℃近い検体も散見された。



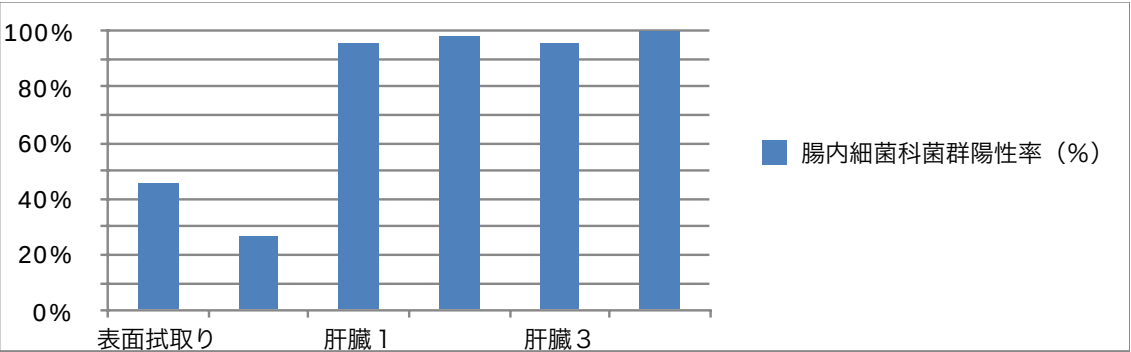
③予備調査の結果概要

○腸内細菌科菌群の検出状況(8月6日～9月26日)

と畜場で採取された表面拭き取り液、胆汁の腸内細菌科菌群の検出状況を見ると、表面拭き取り液の陽性率が45%、胆汁の陽性率が26%であった。

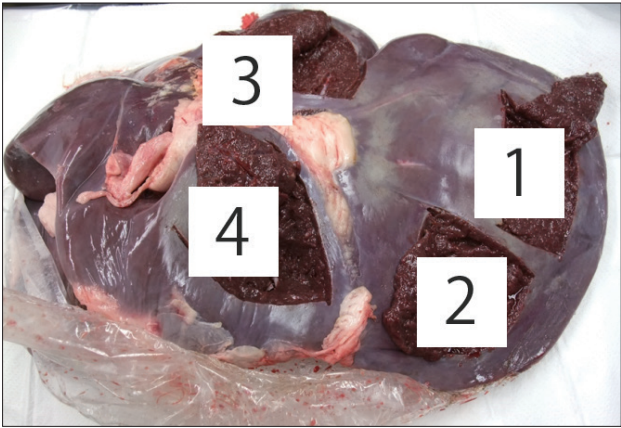
これに対し、輸送後の肝臓内部の陽性率は、肝臓の部位にかかわらず、96%から100%と高い割合を示した。

腸内細菌科菌群(8月6日～9月26日)			
	検体数	腸内細菌科菌群陽性検体数	腸内細菌科菌群陽性率(%)
表面拭き取り	44	20	45%
胆汁	46	12	26%
肝臓1	46	44	96%
肝臓2	46	45	98%
肝臓3	46	44	96%
肝臓4	46	46	100%



試料採取か所

(肝臓表面を火炎殺菌後
図の4ヶ所から採取)



○大腸菌群及びカンピロバクターの検出状況（9月9日～9月26日）

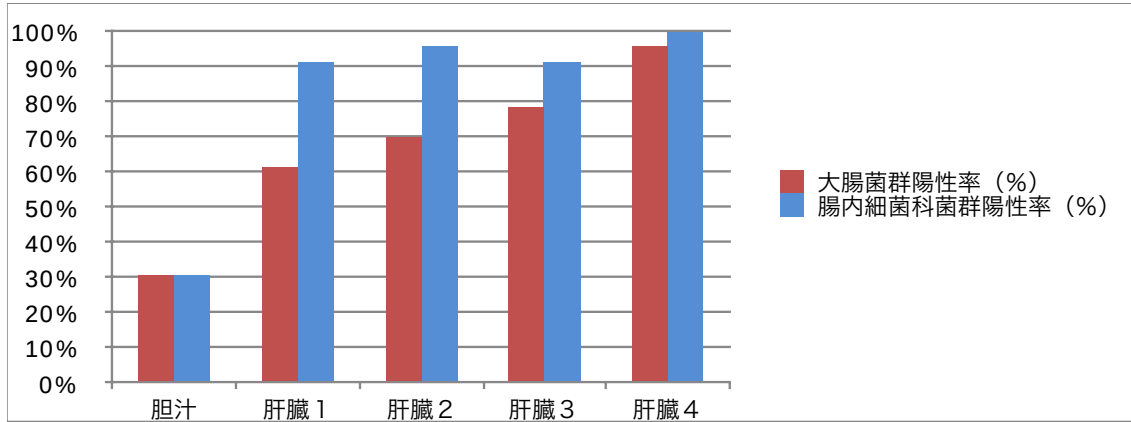
と畜場で採取された胆汁の大腸菌群の検出状況をみると、腸内細菌科菌群の陽性率と同水準の30%であった。

これに対し、輸送後の肝臓内部の大腸菌群の陽性率は、腸内細菌科菌群の陽性率を下回るものの、61%から96%と高い割合を示した。

なお、同時に行った肝臓1でのカンピロバクターの検査（23検体）は、陽性率がゼロであった。

大腸菌群、腸内細菌科菌群（9月9日～9月26日）

	検体数	大腸菌群陽性検体数	腸内細菌科菌群陽性検体数	大腸菌群陽性率 (%)	腸内細菌科菌群陽性率 (%)
胆汁	23	7	7	30%	30%
肝臓1	23	14	21	61%	91%
肝臓2	23	16	22	70%	96%
肝臓3	23	18	21	78%	91%
肝臓4	23	22	23	96%	100%



○肝臓表面の細菌数の検出状況（8月6日～9月26日）

肝臓表面の拭き取り液の細菌数をと畜場（肝臓全面拭き取り）と輸送後の検査時（肝臓各部位の表面）で比較してみると、下表、図のとおり、明らかに輸送後に細菌数が増加しており、肝臓の重量が6～9キロと大きく、到着時の温度等から考察してみても、肝臓内部までの冷却に時間を要し、輸送中において細菌類が増殖したことが推測された。

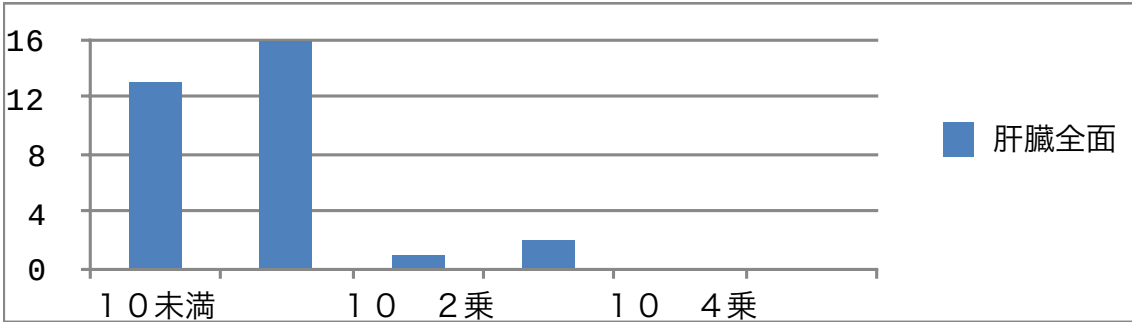
肝臓表面細菌数（%）（8月6日～9月26日）

	計	10未満	10 1乗	10 2乗	10 3乗	10 4乗	10 5乗
肝臓全面	100%	41%	50%	3%	6%	0%	0%

輸送後

	計	10未満	10 1乗	10 2乗	10 3乗	10 4乗	10 5乗
肝臓1	100%	13%	25%	44%	16%	3%	0%
肝臓2	100%	3%	38%	41%	16%	3%	0%
肝臓3	100%	6%	34%	44%	9%	6%	0%
肝臓4	100%	9%	44%	31%	9%	3%	3%

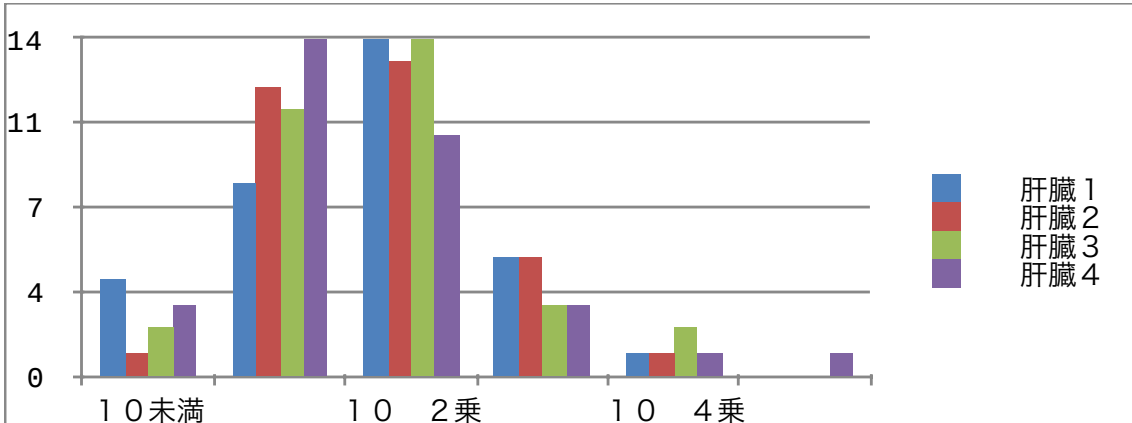
検体数



輸送前（と畜場での拭き取り）

の細菌数の分布

検体数



輸送後の細菌数

ちなみに、輸送前の拭き取りで細菌数が10未満の検体のみについて、輸送後の細菌数の分布状況をみると、次のとおりであり、細菌数の増加はみられるものの、全体に比べて細菌数の分布は下方にあった。

肝臓表面生菌数（％）

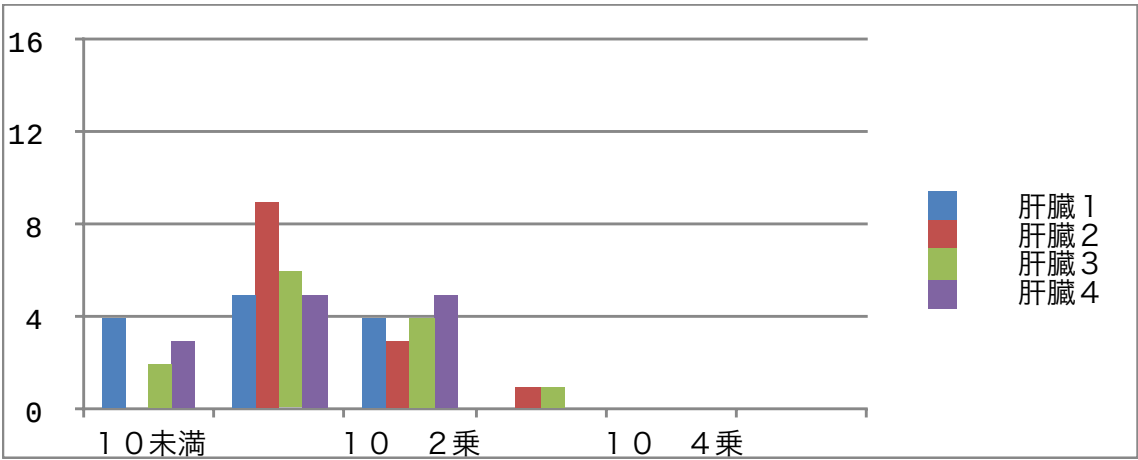
輸送前（現地拭き取り）

	計	10未満	10 1乗	10 2乗	10 3乗	10 4乗	10 5乗
肝臓全面	100%	100%	0%	0%	0%	0%	0%

輸送後

	計	10未満	10 1乗	10 2乗	10 3乗	10 4乗	10 5乗
肝臓1	100%	31%	38%	31%	0%	0%	0%
肝臓2	100%	0%	69%	23%	8%	0%	0%
肝臓3	100%	15%	46%	31%	8%	0%	0%
肝臓4	100%	23%	38%	38%	0%	0%	0%

検体数



輸送後の細菌数の分布

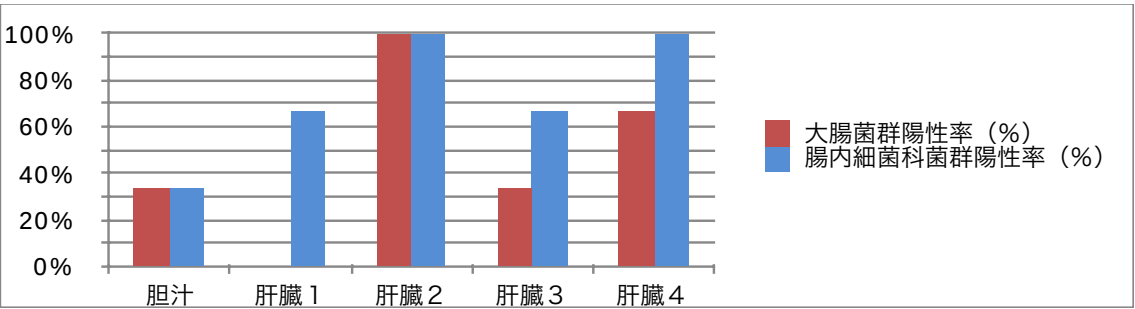
○予冷及び冷凍した肝臓の細菌群の検出状況（9月11日～9月26日）

以上のような輸送途中での細菌の増殖の可能性が否定できない検出状況を踏まえ、少数例ではあるが、輸送前に冷蔵庫において冷蔵（予冷）した場合、または冷凍した場合の腸内細菌科菌群及び大腸菌群の検出状況を調べてみた。

少数例であり、定性的なことは言えないもの、冷蔵庫で予冷した肝臓または冷凍（緩慢冷凍）した肝臓の部位の一部で大腸菌群の陽性率がゼロとなっており、肝臓の衛生的な処理、保管、輸送等において急速に冷却する等の温度管理の重要性が認められた。

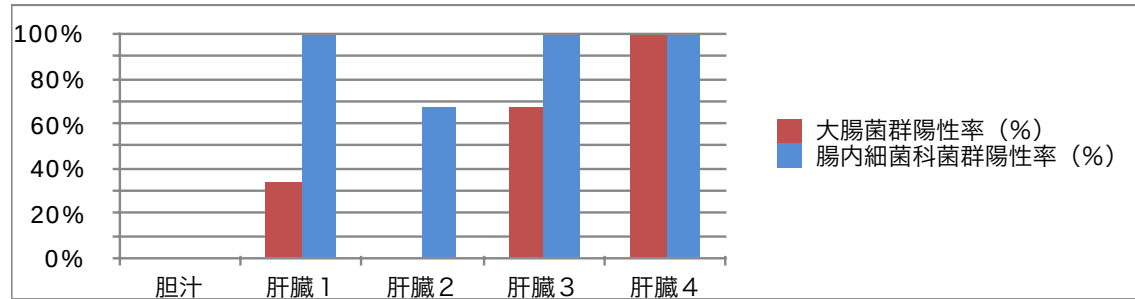
予冷（南港市場）

	検体数	大腸菌群陽性検体数	腸内細菌科菌群陽性検体数	大腸菌群陽性率（％）	腸内細菌科菌群陽性率（％）
胆汁	3	1	1	33%	33%
肝臓1	3	0	2	0%	67%
肝臓2	3	3	3	100%	100%
肝臓3	3	1	2	33%	67%
肝臓4	3	2	3	67%	100%



冷凍（南大阪市場）

	検体数	大腸菌群陽性検体数	腸内細菌科菌群陽性検体数	大腸菌群陽性率（％）	腸内細菌科菌群陽性率（％）
胆汁	3	0	0	0%	0%
肝臓1	3	1	3	33%	100%
肝臓2	3	0	2	0%	67%
肝臓3	3	2	3	67%	100%
肝臓4	3	3	3	100%	100%



一本調査(10月1日～2月27日)

①目的及び調査概要

予備調査において、現地拭き取りに比べ輸送後の生菌数が増加している等輸送途中における細菌の増殖が懸念されたこと等を踏まえ、と畜・内臓分離後の肝臓内部の温度変化を測定するとともに、輸送前の冷蔵(予冷)または冷凍処理等による増殖抑制の効果を調査するため、10月以降、輸送前にアルコールによる急速冷凍を行った肝臓(内臓分離後30分から1時間後に冷凍)、冷蔵庫で1日間保管し冷蔵した肝臓、または冷凍(急速凍結・緩慢冷凍)した肝臓についての細菌群の検出状況を調べてみた。

②結果概要

○肝臓内部の温度変化

大阪南港臓器株式会社の協力をえて、平成26年12月23日に常温下(16℃)、冷蔵下(0℃)、平成27年2月6日に冷水下(4℃)、氷水下(-0.4℃)での肝臓内部の温度変化を調査した。

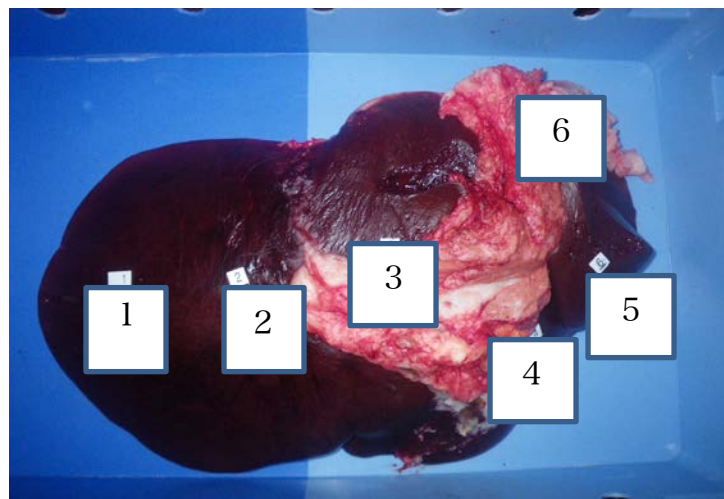
常温下(16℃)での肝臓内部の温度は、肝臓の洗浄処理後5時間経過した時点で18～25℃であったのに対し、冷蔵庫で保管(0℃)した場合には、生レバーとして提供される左葉肉厚部(番号2)で2時間後に15℃、5時間後に5℃に低下した。

一方、冷水(4℃)に漬込んだ場合には、左葉肉厚部(番号2)で1時間後に15℃、4時間後に6℃、また氷水下(-0.4℃)に漬込んだ場合には、15～30分後に15℃、2時間半後に6℃、3時間半後に2℃に低下した。

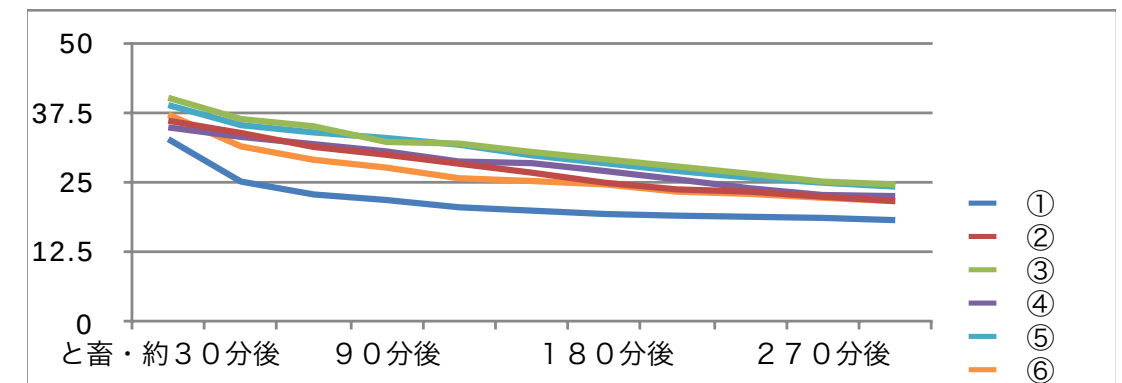
肝臓は重量ベースで6～8キロと容量が大きく、室温、又は冷蔵下においても冷却に長時間を要することからも、肝臓の洗浄処理を速やかに行い、内臓分離後、短時間で冷水又は氷水に漬込むことにより冷却を早めまた、冷蔵又は冷凍保管し肝臓内部の温度を下げる必要があると認められた。

なお、冷水等への漬込みの際には、真空パック等により流水中での2次汚染防止に留意する必要があると考えられる。

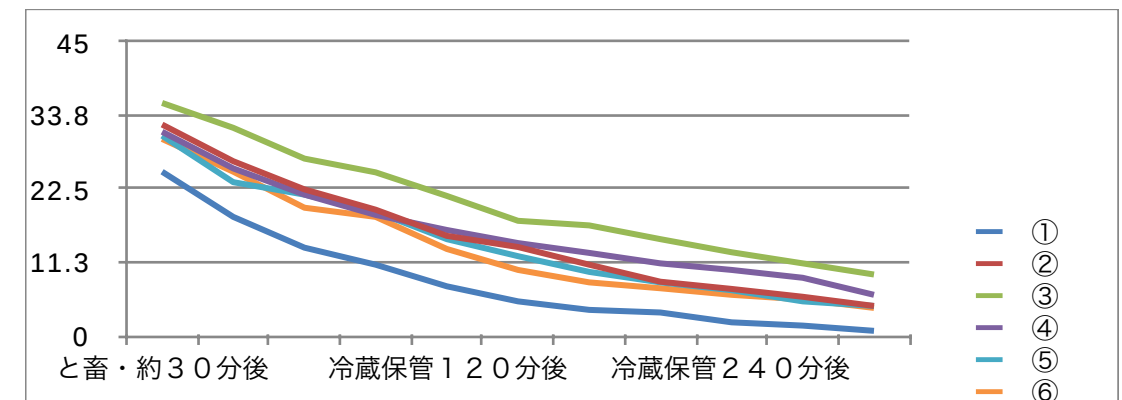
肝臓内部の温度計測カ所(南港臓器株式会社提供)



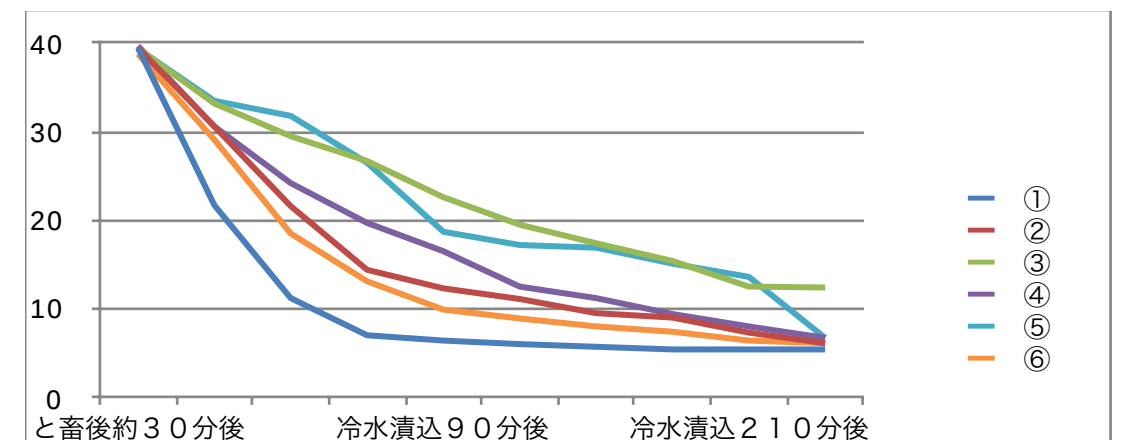
温度(℃) 常温下(16℃)での肝臓内部の温度変化



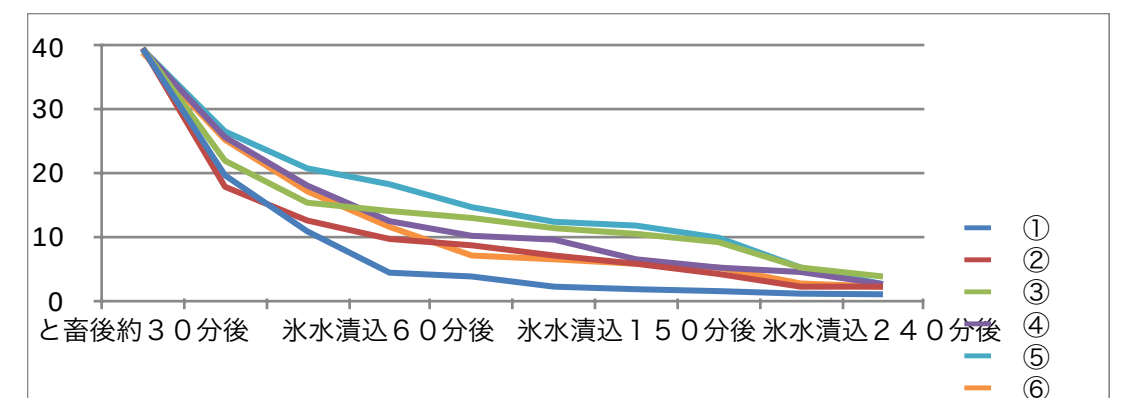
温度(℃) 冷蔵下(0℃)での肝臓内部の温度変化



温度(℃) 冷水下(4℃)での肝臓内部の温度変化



温度(℃) 氷水下(-0.4℃)での肝臓内部の温度変化



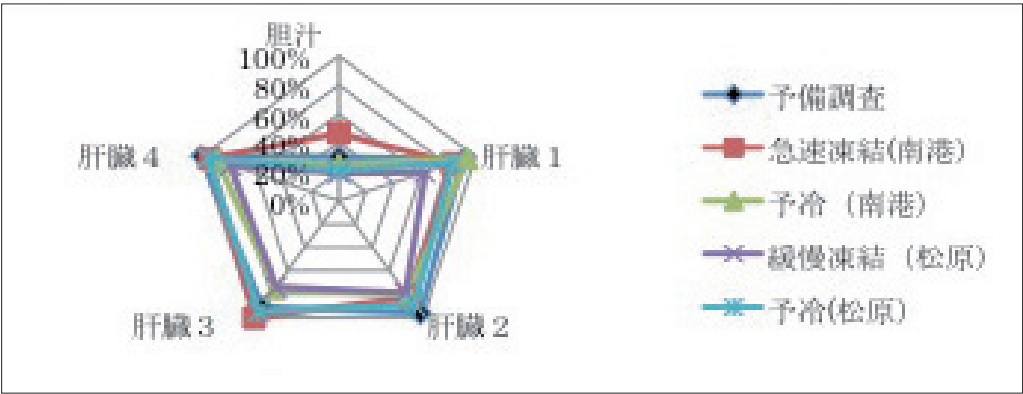
○腸内細菌科菌群の検出状況（10月1日～2月27日）

急速冷凍（アルコール）または冷蔵庫で予冷した肝臓並びに冷凍（緩慢冷凍）した肝臓について、予備調査の腸内細菌科菌群の検出結果と比較すると、予備調査が91～100%の陽性率であったのに対し、急速凍結（南港市場）で83～100%、緩慢凍結（南大阪市場）で63～79%、予冷で75～94%（南港市場）、84～95%（南大阪市場）であった。前処理や洗浄法が場所によって異なることから、一概に言えないものの、腸内細菌科菌群については、予備調査とその後の調査の間で、夏場と冬場といった季節差も含め、大きな差はなく効果はみられなかった。

腸内細菌科菌群陽性率

	予備調査	急速凍結（南港）	予冷（南港）	緩慢凍結（松原）	予冷（松原）
胆汁	30%	47%	25%	19%	21%
肝臓1	91%	83%	94%	63%	84%
肝臓2	96%	83%	81%	79%	89%
肝臓3	91%	100%	75%	74%	95%
肝臓4	100%	94%	88%	79%	95%

注）18検体のうち2検体は、肝臓全体を急速冷凍。16検体は左葉部とそれ以外を分離し、左葉部のみ真空パックし急速冷凍、その他の部位（肝臓3、4）は冷蔵。



○大腸菌群の検出状況（10月1日～2月27日）

一方、大腸菌群について予備調査の検出結果と比較すると、予備調査が61～96%の陽性率であったのに対し、急速凍結（南港市場）で28～67%、緩慢凍結（南大阪市場）で37～42%、予冷で25～50%（南港市場）、31～58%（南大阪市場）であった。

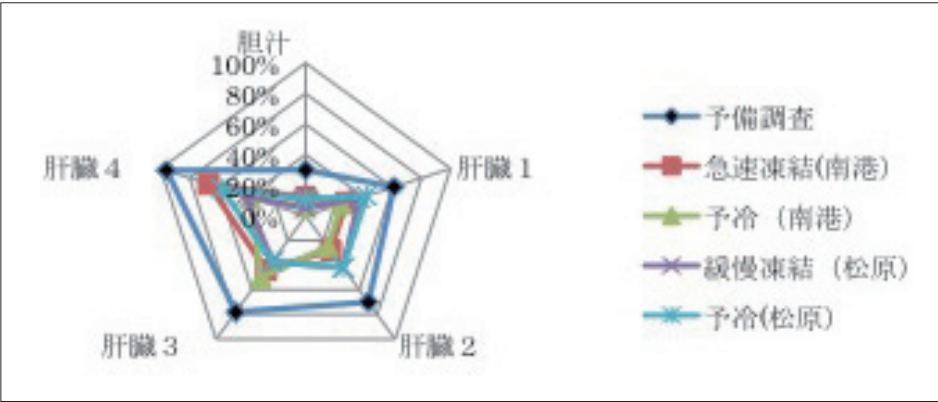
場所によって条件が異なるものの、総じて、腸内細菌科菌群が予備調査との間で大差がみられなかったのに対し、大腸菌群については、約2分の1水準まで低下しており、夏場と冬場との季節の影響も考えられるが、冷蔵及び冷凍保管を通じた温度管理を行うことの効果が認められた。

しかし、陽性の発現率は、肝臓各部うち左葉部（1及び2）において、総じて低い傾向がみられたものの、肝臓各部間で、例えば、3が陰性であれば、1及び2も陰性となるといった明確な関係性を示す発現状況はみられなかった。

大腸菌群陽性率

	予備調査	急速凍結（南港）	予冷（南港）	緩慢凍結（松原）	予冷（松原）
胆汁	30%	12%	6%	5%	11%
肝臓1	61%	28%	25%	37%	42%
肝臓2	70%	28%	25%	42%	42%
肝臓3	78%	44%	50%	37%	37%
肝臓4	96%	67%	38%	42%	58%

注）18検体のうち2検体は、肝臓全体を急速冷凍。16検体は、肝臓1、2の左葉部とそれ以外を分離し、左葉部のみ真空パックし急速冷凍、その他の部位（肝臓3、4）は冷蔵。



1. 急速冷凍（南港市場）：10月1日～2月27日

	検体数	大腸菌群陽性 検体数	腸内細菌科菌群 陽性検体数	大腸菌群陽性率 （%）	腸内細菌科菌群 陽性率（%）
胆汁	17	2	8	12%	47%
肝臓1	18	5	15	28%	83%
肝臓2	18	5	15	28%	83%
肝臓3	18	8	18	44%	100%
肝臓4	18	12	17	67%	94%

＊注：18検体のうち2検体は、肝臓全体を急速冷凍。16検体は、肝臓1、2の左葉部とそれ以外を分離し、左葉部のみ真空パックし急速冷凍、その他の部位（肝臓3、4）は冷蔵。

2. 予冷（南港市場）：10月1日～2月27日

	検体数	大腸菌群陽性 検体数	腸内細菌科菌群 陽性検体数	大腸菌群陽性率 （%）	腸内細菌科菌群 陽性率（%）
胆汁	16	1	4	6%	25%
肝臓1	16	4	15	25%	94%
肝臓2	16	4	13	25%	81%
肝臓3	16	8	12	50%	75%

3. 緩慢冷凍（南大阪市場）：10月1日～2月27日

	検体数	大腸菌群陽性 検体数	腸内細菌科菌群 陽性検体数	大腸菌群陽性率 （%）	腸内細菌科菌群陽 性率（%）
胆汁	19	1	3	5%	19%
肝臓1	19	7	12	37%	63%
肝臓2	19	8	15	42%	79%
肝臓3	19	7	14	37%	74%
肝臓4	19	8	15	42%	79%

4. 予冷（南大阪市場）：10月1日～2月27日

	検体数	大腸菌群陽性 検体数	腸内細菌科菌群 陽性検体数	大腸菌群陽性率 （％）	腸内細菌科菌群 陽性率（％）
胆汁	19	2	4	11%	21%
肝臓1	19	8	16	42%	84%
肝臓2	19	8	17	42%	89%
肝臓3	19	7	18	37%	95%
肝臓4	19	11	18	58%	95%

5. 予備調査：9月9日～9月26日

	検体数	大腸菌群陽性 検体数	腸内細菌科菌群 陽性検体数	大腸菌群陽性率 （％）	腸内細菌科菌群 陽性率（％）
胆汁	23	7	7	30%	30%
肝臓1	23	14	21	61%	91%
肝臓2	23	16	22	70%	96%
肝臓3	23	18	21	78%	91%
肝臓4	23	22	23	96%	100%

③文献データとの比較

以上の予備調査及び本調査の結果をこれまでの他機関での検査結果（文献データ）と比較すると

○大腸菌群の陽性率は、食肉衛生検査所での調査（1の①参照）では胆汁が11％、肝臓組織内が23％であった。

また厚労省の汚染実態調査（1の②参照）では肝臓組織内で24％、農水省の汚染実態調査（1の③参照）では肝臓組織内で45％であった。

一方、調査方法の違いがあるが、予備調査では61％～96％と相当高い陽性率にあったものの、本調査で予備調査の約2分の1と、食肉衛生検査所等での検出結果に近い水準となり、処理後の温度管理の重要性が認められる結果となった。

○一方、腸内細菌科菌群については、市販食品、市販食肉類についての検査結果がみられたが、それによると、市販食品（くらしの科学研究所：2の①参照）の腸内細菌科菌群等の陽性率は生肉で100％（ちなみに、大腸菌群が同じく生肉で50％）と高い検出率であった。

なお、腸内細菌科菌群については、非加熱惣菜で87％、また加熱後包装食肉製品や加熱惣菜類など加熱製品にあっても、25％、35％と相対的に高い陽性率であった。また市販食肉類（東京都健康安全研究センター：2の②参照）の牛レバーの腸内細菌科菌群の陽性率は100％（ちなみに、糞便系大腸菌群が67％、大腸菌が100％）と高い検出率であった。

なお、食肉全般で腸内細菌科菌群については67～100％と高い陽性率であった。他方、調査方法の違いがあるが、予備調査及び本調査とも腸内細菌科菌群については、市販食品（非加熱）類と同様の高い陽性率を示した。

参考）文献データ

1牛肝臓での大腸菌群等の検出状況（と畜場で採取検体）

①肝臓及び胆汁の大腸菌群検出状況

（大分県食肉衛生検査所：23年11月～24年7月）

検体数	肝臓	胆汁	肝臓・胆汁	非検出
胆汁 538		60（11.2％）		
肝臓（胆汁） 123	28（22.8％）	19（15.5％）	15（12.2％）	91（74.0％）
うち				
胆汁検出 19	15（78.9％）			
胆汁非検出 104	13（12.5％）			
うち				
肝臓検出 28		15（72.0％）		
肝臓非検出 95		4（4.2％）		

胆汁中の大腸菌群及びカンピロの検出状況

検体数	大腸菌群	カンピロバクター	大腸菌群・ カンピロバクター	非検出
胆汁 291	32（11.0％）	62（21.3％）	3（3.3％）	200（68.7％）

＊胆汁中で両菌の共存割合は低い。

②腸管出血性大腸菌 EHEC（分離培養）

汚染実態調査（品川邦汎）23年8月～11月：全国16食肉衛生検査所

検体数	EHEC	STEC0157	遺伝子検出率 V T
糞便 173	20（12％）	11（6％）	41%
胆汁 186	0	0	1%
肝臓表面 193	13（7％）	5（3％）	20%
肝臓内部 173	3（2％）	2（1％）	6%

大腸菌検出状況

同上：全国4食肉衛生検査所

検体数	大腸菌
糞便 50	35（70％）
胆汁 50	9（18％）
肝臓表面 50	28（56％）
肝臓内部 50	12（24％）

③肝臓の大腸菌及びカンピロバクター検出状況

汚染実態調査（農水）23年9月～12月：3と畜場

検体数	大腸菌	カンピロバクター	大腸菌・ カンピロバクター	非検出
肝臓 96	43（45％）	21（22％）	10（10％）	42（44％）

＊stecは非検出

2 市販食品中での大腸菌群及び腸内細菌群検出状況

①くらし科学研究所：23年10月～11月

検体数		大腸菌群	腸内細菌科菌群
生肉	8	4 (50%)	8 (100%)
加熱後包装食肉製品	4	0	1 (25%)
未加熱惣菜	23	11 (48%)	20 (87%)
加熱済惣菜	20	1 (5%)	7 (35%)
合計	55	16 (29%)	36 (65%)

②東京都健康安全研究センター：23年8月～9月

検体数		大腸菌	糞便系大腸菌群	腸内細菌科菌群
ローストビーフ	17	0	1 (6%)	13 (77%)
タタキ・ユッケ用牛肉	2	0	1 (50%)	2 (100%)
馬刺し	2	0	0	2 (100%)
牛レバー	6	6 (100%)	4 (67%)	6 (100%)
挽肉	32	26 (81%)	15 (47%)	26 (81%)
成型・結着肉	9	6 (67%)	1 (11%)	6 (67%)
牛カルビ肉	1	0	0	1 (100%)
合計	69	38 (55%)	22 (32%)	65 (94%)

*糞便系大腸菌群が大腸菌より陽性率が低いのは検査法の違いによると考えられる。

(2) 大阪府立大学での概要

(生食用牛レバー処理技術開発基礎研究)

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科
山崎 伸二

①目的

牛肝臓内部から志賀毒素産生性大腸菌が検出された大きな問題となった。この原因として、牛消化管内に存在する志賀毒素産生性大腸菌が、胆汁を介して肝臓を汚染している可能性が指摘されている。本研究では、生食用牛レバーの処理技術を開発し、大腸菌群等フリーの牛レバーの流通体制の構築するため、肝臓、胆汁及びその他消化管等における大腸菌群及び志賀毒素産生性大腸菌の分布、及び各部位での相関性を調べ、肝臓内への大腸菌汚染の経路について検証するとともに、大腸菌群等の効果的な消毒・殺菌法について試験を行う。

②調査(試験)の概要

牛の屠畜解体後、直ちに消化管及びその内容物を持ち込み

1. 牛消化管部位ごとの大腸菌群細菌の検出及び細菌数と消化管部位ごとの stx 遺伝子の検出

屠畜解体直後の牛から、第一胃 (n=46)、十二指腸 (n=68)、盲腸 (n=69)、直腸 (n=65) のそれぞれの内容物と胆嚢 (n=65)、肝臓 (n=69)、胆汁 (n=69) と唾液 (n=41) を採取し直ちに研究室に持ち込み実験に供した。図1に記したように、肝臓は約 50 g を、その他の組織と内容物は約 10g を採取し、等量の滅菌 PBS に加えた。肝臓についてはストマッカー処理を 30 秒間行い、処理が不十分な場合は、さらに 30 秒間行なった。その他の検体についてはボルテックス処理を 30 秒間、3 回行った。胆汁と唾液検体については原液を、ストマッカー処理した肝臓とボルテックス処理した他の消化管とその内容物については得られた懸濁液を直接滅菌 PBS で 10 倍段階希釈し、マッコニキー寒天培地に植菌して、37℃ で 18 ～ 24 時間培養しコロニー数を測定した。さらに、胆汁及び唾液検体をそれぞれ 1 mL、ストマッカー処理した肝臓とボルテックス処理した他の消化管とその内容物の懸濁液 1 mL を 1.25 倍の TSB 4 mL に加え 37℃、18 ～ 24 時間浸透培養した。得られた増菌培養液 100 µL を 900 µL の TE buffer (pH 8.0) に加え、100℃、10 分間加熱後、その上清を鋳型 DNA として PCR を行い、stx 遺伝子を検出した 1)。

2. 季節ごとの肝臓部位別大腸菌群細菌の検出率及び細菌数

牛肝臓を図2に示したように5つの部位に分け、2013年5月～同年10月、2013年11月～2014年5月、2014年8月～2014年11月、2014年11月～2015年2月にそれぞれ肝臓と胆汁、23、33、35及び17検体について1に述べた方法で大腸菌群細菌を検出した。

図1

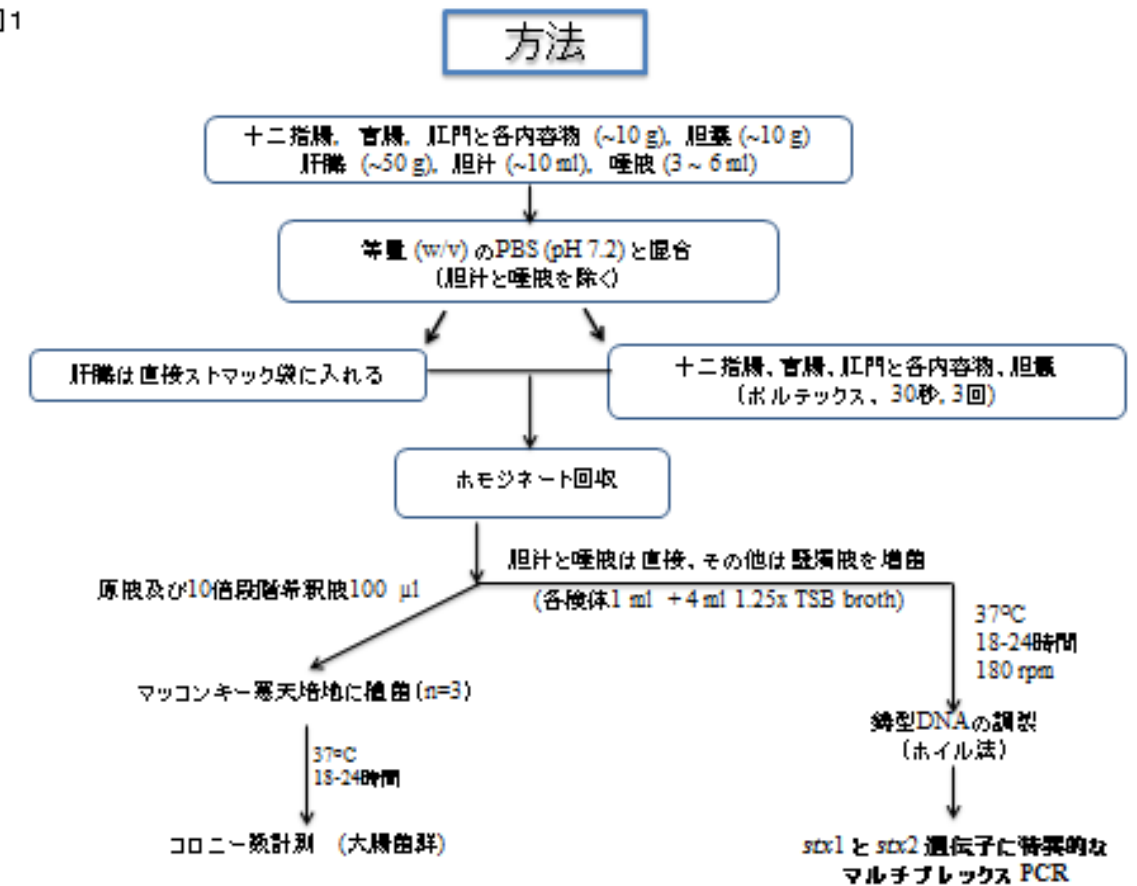
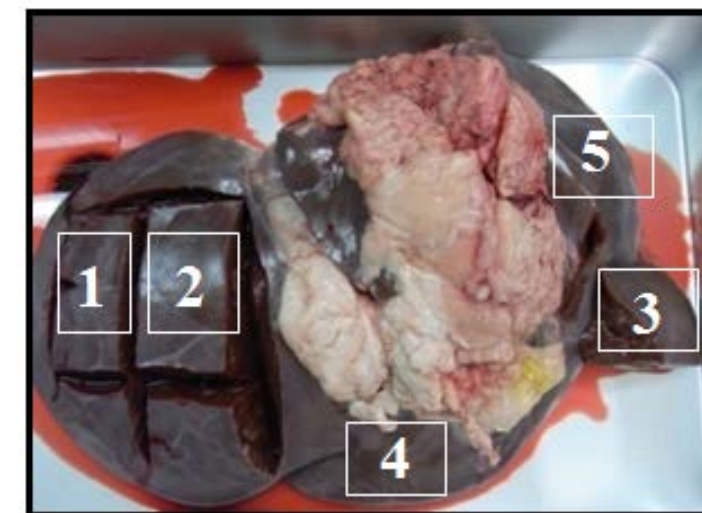


図1. 検体の調製法と大腸菌群細菌数と stx 遺伝子の検出プロトコル

細菌汚染を検出した牛肝臓の5部位



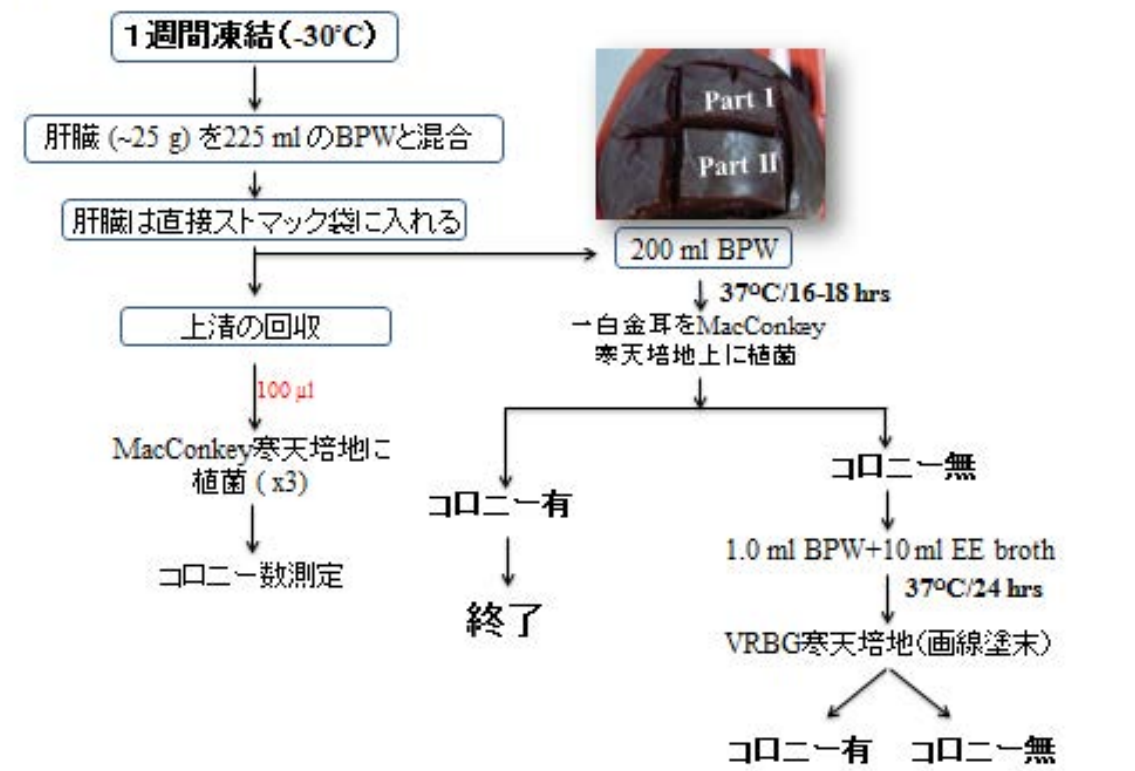
3. 肝臓の部位別 stx 遺伝子の検出率

2の方法に準じて肝臓を5つの部位に分け（図2）、1の方法に準じて胆汁を含めPCR法により stx 遺伝子を検出した。

4. 牛肝臓の塩素系消毒薬、凍結融解処理による殺菌効果の評価

牛肝臓内部を、胆管を通じて肝臓番号 28-7 から 31-8 までの 14 検体は、400 ppm の次亜塩素酸系消毒薬で約 40 ml/kg を 5 回噴霧器で注入洗浄し、肝臓番号 32-4 から 35-4 については、2,000 ppm の塩素系消毒薬 75 ml/kg を 5 回、ポンプを用いて圧力をかけながら注入洗浄した。その後、-30℃ で急速冷凍し、1 週間後にチルド解凍し、厚労省の生食肉検査基準に準じた方法（図3）で菌の検出を行なった。

図3 塩素系消毒薬で処理した肝臓中の腸内細菌科菌群



③結果概要

1. 牛消化管部位ごとの大腸菌群細菌の検出率、細菌数と stx 遺伝子の検出率

唾液から肛門にかけてほぼ 100% で大腸菌群細菌が検出された（表1）。図4に示したように、検出された細菌数も第一胃から肛門に近づくに従って多くなった。しかしながら、大腸菌群細菌の検出率は胆汁では 14%、肝臓では 68%、胆嚢でも 21% となった（表1）。牛消化器内容物について PCR 法で stx 遺伝子を検出した結果、肛門組織で 78.3% と最も陽性率が高かった（表2）。しかしながら、肛門内容物では 45%、盲腸組織では 29%、盲腸内容物で 26%、十二指腸組織で 5.8%、十二指腸内容物で 15%、第一胃内容物で 8.6% であった。一方、唾液で 22% とやや高めの値を示した。胆汁では調べた 149 検体全てで stx 遺伝子は検出されなかったが、肝臓では 3.3% で陽性となった。

表1. 消化管内の大腸菌群細菌陽性率

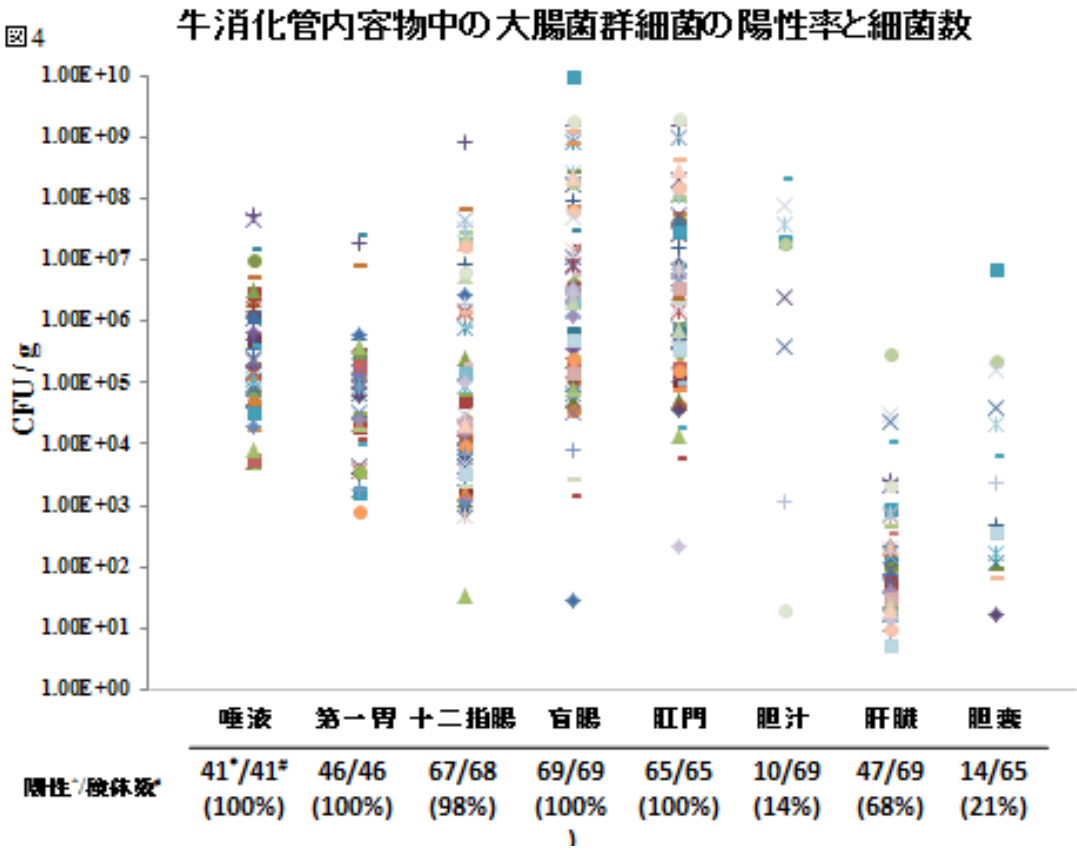
	陽性数／検体数 (%)
唾液	41/41 (100)
第一胃内容物	46/46 (100)
十二指腸内容物	67/68 (98)
盲腸内容物	69/69 (100)
直腸内容物	65/65 (100)
胆汁	10/69 (14)
肝臓	47/69 (68)
胆嚢	14/65 (21)

表2. 牛の消化管部位における stx 遺伝子の分布

採取部位 (検体数)	stx1 陽性数	stx2 陽性数	stx1/2 陽性数	合計 (%)
舌 (46)	1	1	1	3 (6.5)
唾液 (41)	1	3	5	6 (21.9)
胆汁 (149)	0	0	0	0 (0)
肝臓 (149)	0	5	0	5 (3.3)
第一胃内容物 (46)	2	1	1	4 (8.6)
十二指腸内容物 (68)	2	6	2	10 (14.7)
盲腸内容物 (69)	4	12	2	18 (26)
肛門内容物 (65)	6	16	7	29 (44.6)
十二指腸 (68)	1	2	1	4 (5.8)
盲腸 (69)	4	14	2	20 (28.9)
肛門 (120)	7	61	26	94 (78.3)

2. 季節ごとの肝臓部位別大腸菌群細菌の検出率及び細菌数

1の実験で 69 検体の肝臓のうち 47 検体(68%)から大腸菌群細菌が検出されたため、肝臓の部位別大腸菌群細菌数の検出率と細菌数を解析した。本受託研究



開始前に大阪南港臓器（株）からの受託研究で行なっていたデータとあわせてまとめた結果、季節によって大腸菌群の検出率及び大腸菌群細菌数に違いがあることがわかった(表3)。すなわち、図5と図7に示したように気温の高い夏場では大腸菌群細菌数が多いが、気温の低い冬場では大腸菌群細菌数は少なかった(図6、8)。同様に、大腸菌群細菌の部位別検出率においても、非可食部に相当する部位3～5では大腸菌群細菌数は全般に多いが、可食部に相当する部位1と2では、陽性率も低く、検出された大腸菌群細菌数も少なかった。

表3. 季節ごとの肝臓部位別大腸菌群細菌陽性率(下線部は冬場の陽性率)

月 / 年	部位 1	部位 2	部位 3	部位 4	部位 5	胆汁
5/13-10/13	10/23 (43)	15/23 (65)	20/23 (87)	16/17 (94)	16/17 (94)	8/23 (35)
11/13-5/14	<u>7/33 (21)</u>	<u>8/33 (24)</u>	<u>16/33 (49)</u>	<u>17/33 (52)</u>	<u>15/33 (45)</u>	<u>4/33 (12)</u>
8/14-11/14	10/35 (29)	12/35 (34)	18/34 (53)	22/35 (63)	21/35 (60)	9/35 (26)
11/14-2/15	1/17 (5.9)	2/17 (12)	2/17 (12)	3/17 (18)	2/17 (12)	1/14 (7.1)
夏場 (計)	20/58 (34)	27/58 (47)	38/57 (67)	38/52 (73)	37/52 (71)	17/58 (31)
冬場 (計)	<u>8/50 (16)</u>	<u>10/50 (20)</u>	<u>18/50 (36)</u>	<u>20/50 (40)</u>	<u>17/50 (34)</u>	<u>5/47 (11)</u>
合計	28/108(26)	37/108(34)	56/107(52)	58/102(57)	54/102(53)	22/75 (29)

図5 部位別牛肝臓の大腸菌群細菌数と検出率(2013年5月-2013年10月)



図6 部位別牛肝臓の大腸菌群細菌数と検出率(2013年11月-2014年5月)

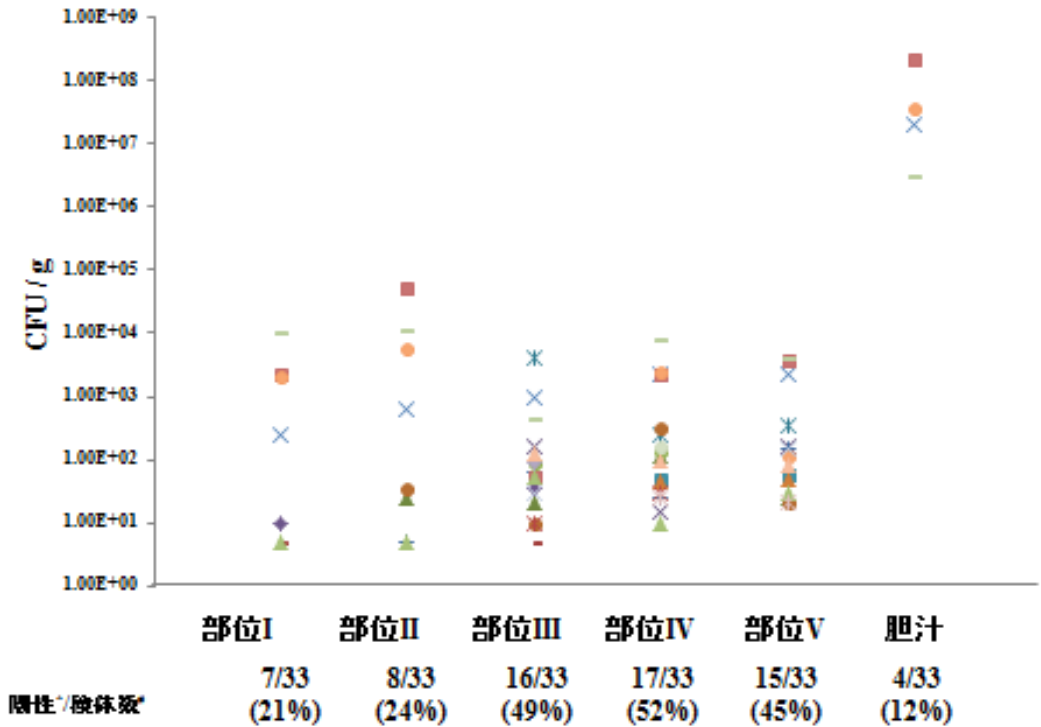


図7 部位別牛肝臓の大腸菌群細菌数と検出率(2014年8月-2014年11月)

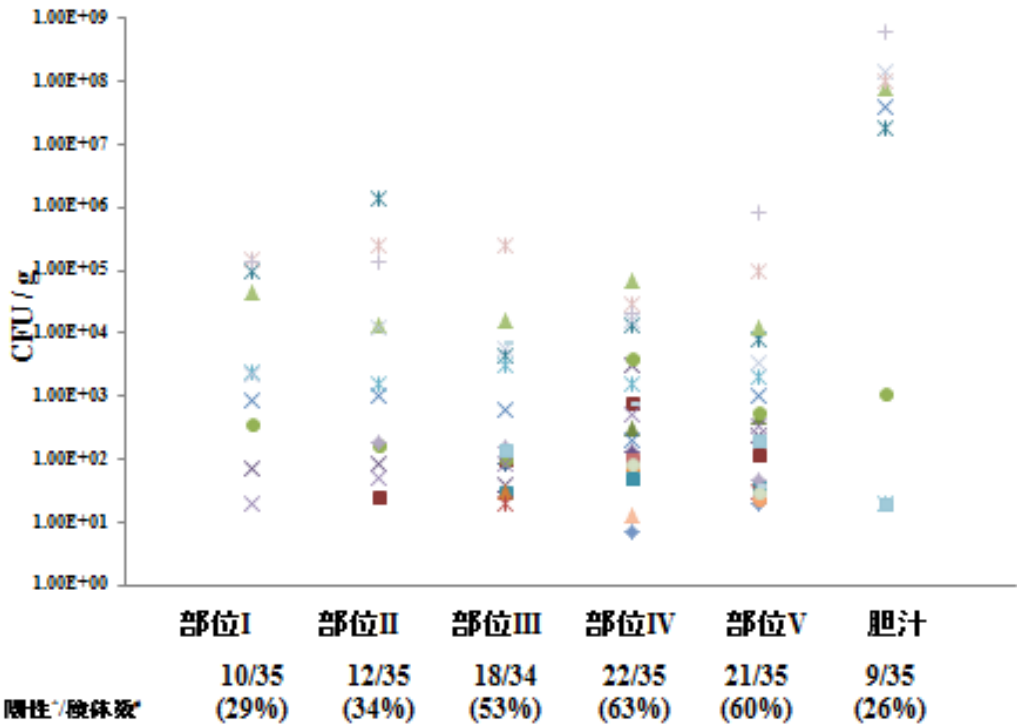
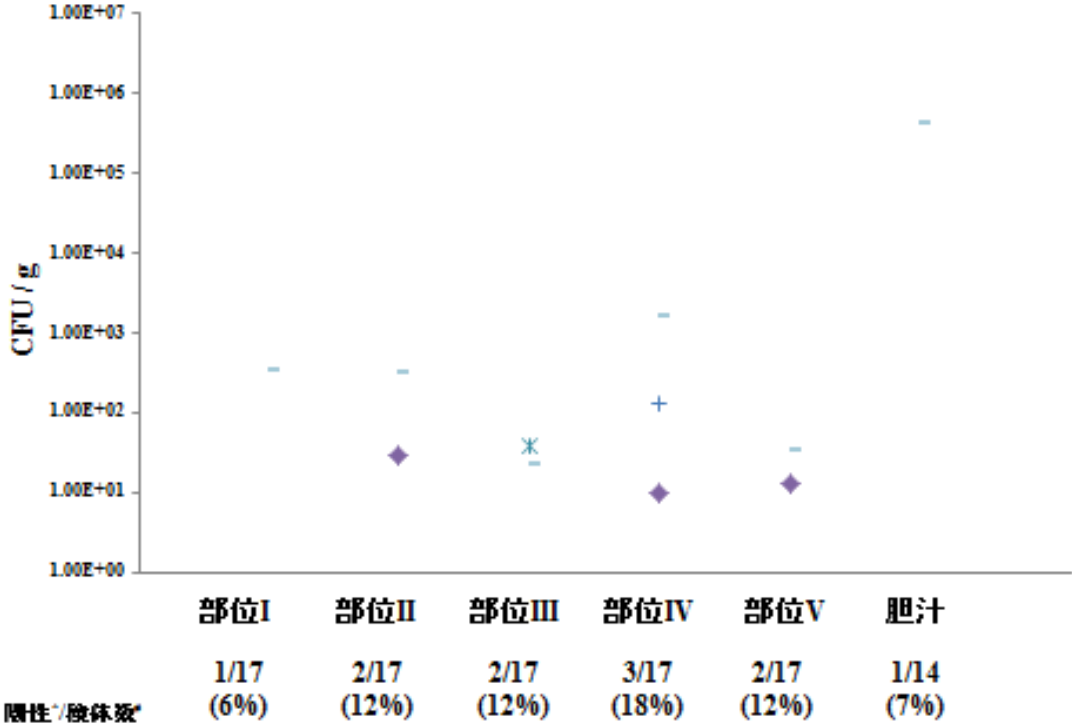


図8 部位別牛肝臓の大腸菌群細菌数と検出率(2014年11月-2015年2月)



肝臓の部位別 stx 遺伝子の検出率

肝臓の部位別 stx 遺伝子陽性率の結果を表4にまとめた。可食部の部位1と2では、凍結、新鮮に関わらず調べた145と149検体全てでstx遺伝子が検出されなかった。一方、非可食部である部位3－5では1.4-2.2%で陽性となった。

表 4. 肝臓の部位別 stx 遺伝子の検出率

部位	新鮮 陽性数 / 検体数 (%)	凍結 陽性数 / 検体数 (%)
1	0/117 (0)	0/28 (0)
2	0/121 (0)	0/28 (0)
3	2*/147 (1.4)	ND
4	3*/135 (2.2)	ND
5	2*/135 (1.5)	ND

*1 検体、3箇所 で stx 遺伝子が検出、ND: not done

3. 塩素系消毒薬と凍結融解処理後の腸内細菌科菌群の検出

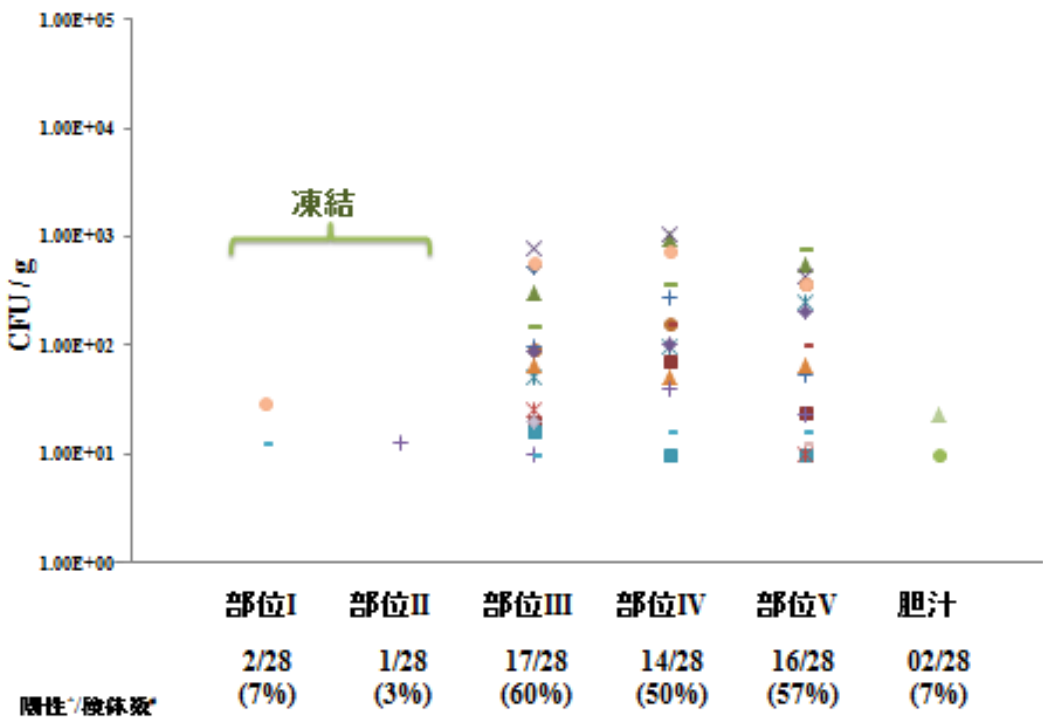
塩素系消毒薬と凍結融解処理後、部位1と2の腸内細菌科菌群について調べたところ、表5に示したように全体を通して増菌培養前に大腸菌群細菌が検出されたのは部位1で28検体中2検体、部位2では28検体中1検体であった。図9に示したように凍結した部位1と2では、部位3－5と比べて、また、図5－8の部位1と2と比べても陽性率のみならず細菌数も格段に減少していた。その後のBPW培地で増菌後、細菌が検出されなかったのは、部位1で28検体中14検体、部位2では28検体中13検体であった。400ppmの次亜塩素酸系消毒薬(40mL/kg)で処理した肝臓番号28-7から31-8の14検体のうち10検体はEE培地での増菌培養(VRBG培地)の検査は行わなかった。それゆえ、400ppmの次亜塩素酸系消毒薬の効果については十分評価できないが、以後の2,000ppmの塩素系消毒薬で処理した検体については、部位1では14検体中9検体でBPWとEE培地での増菌培養(VRBG培地)での増菌培養後菌が検出されなかった。一方、部位2についても14検体中9検体で、BPWとEE培地での増菌培養後、VRBG培地で菌が検出されなかった。

表5. 塩素系消毒薬と凍結融解による肝臓内腸内細菌科菌群殺菌効果

肝臓	部位 1*	BPW	VRBG#	部位 2*	BPW	VRBG#
28-7	0.00E+00	無し	ND	0.00E+00	有	ND
28-8	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
29-7	0.00E+00	無し	ND	0.00E+00	無し	ND
29-8	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
29-9	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
29-10	0.00E+00	無し	ND	0.00E+00	無し	ND
30-5	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
30-6	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
30-7	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
30-8	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
31-5	0.00E+00	無し	無し	0.00E+00	無し	無し
31-6	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
31-7	0.00E+00	無し	無し	0.00E+00	無し	無し
31-8	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
32-4	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
32-5	0.00E+00	無し	無し	1.30E+01	有	ND
32-6	1.30E+01	有	ND	0.00E+00	無し	無し
33-4	0.00E+00	無し	無し	0.00E+00	無し	無し
33-5	0.00E+00	無し	無し	0.00E+00	無し	無し
33-6	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
34-4	0.00E+00	無し	無し	0.00E+00	無し	無し
34-5	0.00E+00	無し	無し	0.00E+00	無し	無し
34-6	0.00E+00	有	ND	0.00E+00	有	ND
34-7	3.00E+01	有	ND	0.00E+00	有	ND
35-1	0.00E+00	無し	無し	0.00E+00	無し	無し
35-2	0.00E+00	無し	無し	0.00E+00	無し	無し
35-3	0.00E+00	無し	無し	0.00E+00	無し	無し
35-4	0.00E+00	無し	無し	0.00E+00	無し	無し
陽性 / 計	2/28	14/28	9/14	1/28	13/28	9/14

* 大腸菌群細菌、# 腸内細菌科細菌、ND: not done

図9 凍結部位別牛肝臓の大腸菌群細菌数と検出率2014年11月-2015年2月



⑤ 考察

牛消化管内の大腸菌群細菌の分布を調べた結果、唾液から直腸に至る内容物ではほぼ100% 大腸菌群細菌が検出された（表1）。肝臓についても68%で検出されたが胆汁では14%と、肝臓との陽性率に相関性が見られなかった。よって、肝臓内汚染は、単純に屠畜解体時の胆汁汚染ではない可能性が考えられた。STECの存在の可能性を調べるためstx遺伝子の分布について調べた結果、表2に示したように第一胃から肛門に至る内容物では、8.6、14.7、26、44.6%と約1.7倍ずつ増加しているのに対し、組織においては十二指腸から盲腸では5.8%から28.9%と5倍に、盲腸から肛門組織に関しては、28,9%から78.3%と2.7倍と急激に上昇していた。このことは、肛門に近づくに従いSTECが腸管内容物ではなく、組織内で濃縮されていることを示している。すなわち、STECと親和性の高い細胞が肛門に近づくに従い多く存在する可能性が考えられる。

一方、牛消化管内での大腸菌群細菌の検出率および細菌数には季節性が認められた。すなわち、夏場に検出率、細菌数とも多く、冬場に少なかった。同様の傾向が肝臓内部の部位別大腸菌群細菌の検出においても認められた。このことは、牛の屠畜解体前が気温の高い夏場である場合、何らかのストレスが牛にかかり、その結果肝臓内の細菌数の増加、また検出率の増加に繋がっている可能性が考えられる。今回結果には示していないが、肝臓内に細菌が検出された時の組織学的解析から、胆管内のみならず類洞内で細菌が検出され、軽い炎症が起こっている可能性が認められた。肝臓内でのstx遺伝子の分布を調べたところ、非可食部位の3－5で1.4-2.2%の割合でstx遺伝子が検出されたが、可食部位の1と2では調べた約150検体すべてでstx遺伝子は検出されなかった。このことは、可食

部位に相当する部位1と2ではSTECが存在していない可能性が高く、塩素系消毒薬と凍結融解を組み合わせた方法で、STECのみならず腸内細菌科細菌フリーの肝臓を提供できる可能性が高い。さらに、屠畜解体後の牛の肝臓を塩素系消毒薬と凍結融解処理により、約50%の割合で厚労省の生食用食肉の規格基準用の検査で腸内細菌科菌群は検出されなかった。このことは、塩素系消毒薬と凍結融解処理により肝臓内、特に部位1と2について腸内細菌科菌群フリーにできる可能性がある。

今後さらに検体数を増やして、今回認められた結果を検証していく必要がある。一方、なぜ夏場に肝臓内でより多くの細菌が検出されるのか、このような肝臓をより簡便な検査で調べる方法を開発するなど、多くの課題も残されている。次年度の研究でこれらの問題点を解決していく必要がある。

文献:

I.A. Pal, S. Ghosh, T. Ramamurthy, S. Yamasaki, T. Tsukamoto, S.K. Bhattacharya, G.B. Nair and Y. Takeda. Shiga-toxin producing Escherichia coli from healthy cattle in a semi-urban community in Calcutta, India. Indian J. Med. Res., 110: 83-85, 1999.

(1) 全体考察

○ 食肉科学技術研究所での予備調査及び本調査の結果又は肝臓の温度変化の調査結果から、内臓分離後、早い段階で冷却し、冷蔵または冷凍等の温度管理を徹底することの重要性が認められた。

○ また大阪府立大学での調査結果からは、150検体すべてについて可食部位(部位1, 2)からのstx遺伝子が検出されず、同部分にはSTECが存在しない可能性が高いこと、また塩素系消毒薬と凍結融解処理により腸内細菌科菌群が約50%陰性であることが認められた。

このことにより、可食部位について、生食用牛レバーの識別流通の可能性があると認められた。

○ こうしたことを踏まえ、生食用としての流通の実現、さらには加熱調理用として衛生管理、鮮度管理の向上により品質を高めるためにも、今後、検体数を増やすとともに、消毒薬の種類、濃度、消毒方法の違い等による効果を検証し、処理技術の改良、開発を進める必要が認められた。

○ 一方、これまでの消毒や温度管理等の徹底により、腸内細菌科菌群や大腸菌群の陽性率の発現を抑制する等の効果は認められたものの、まだ一定の比率で陽性となることから、引き続き、上記の肝臓原体の洗浄消毒の方法(基礎技術として)の調査・試験に加え、

①電磁波や超音波等を利用した非加熱、非破壊的な方法による殺菌方法の開発、実用性の検討

②短冊状にスライスした肝臓(左葉部)について消毒剤に浸漬し、殺菌効果を試験し、殺菌済み個食パック等の開発の可能性

(次亜ソ系の消毒剤は有機物に接触することにより殺菌効果が消滅することを踏まえ、肝臓原体(有機物の塊)でなく、調理前の薄切りの肝臓を対象に消毒薬の種類、濃度、浸漬時間、柵の厚さ等を変えて殺菌効果を試験)

③にんにく、しょうが、わさび等殺菌効果がある薬味液、または酢、塩、しょうゆ等調味液への漬込み(又は上記②との組合せ)による新たな加工品(腸内細菌科菌群がフリーで生レバーの食味、食感を有する加工品)の開発の可能性等についても、引き続き検討する必要があると考えられた。

○ 今回、国際的な規格基準設定の原則を示したコーデックスのガイドラインに則り、日本の食品の中で初めて腸内細菌科菌群が生食用牛肉の規格基準(食安発0912第8号)の成分規格として採用された。(参考②、食品の細菌学的成分規格)同規格基準では、肉塊の表面1cmの深部を60℃で2分間以上加熱することが義務付けられて

おり、この加熱条件を担保するねらいで、1ロットあたり25検体を検査し、すべての検体で腸内細菌科菌群が陰性であることが求められている。

しかし、記述の市販食品等の検査結果をみても明らかなように、腸内細菌科菌群については、未加熱惣菜、また加熱後包装食肉製品や加熱惣菜においてでさえも高い陽性率を示している。このことから、牛の腸由来でない細菌まで拾ってしまったたり、食中毒と無関係なリスクの低い細菌を必要以上に検出してしまうことになる懸念も否定できない。(腸管出血性大腸菌等牛の腸由来の病原菌の衛生指標菌として妥当かどうか。)

食品の安全確保のため、一食品にのみ、他とはバランスを欠く形で無菌状態あるいはゼロリスク、過剰なバリアを求めることは、当然、問題である。また、同じロジックを追求すれば、これまで築かれてきた日本の生食文化そのものを否定することにもなりかねない。現に、「腸内細菌科菌群は衛生指標菌というよりも、むしろ加熱の指標菌として考えるが妥当ではないか」とする意見(参考①)もある。

このことから、腸内細菌科菌群の非加熱食品への適用は避けるべきであり、食品の由来(例えば牛又は牛以外の由来)また衛生管理の手段(加熱・包装又は非加熱等)など食品の性質を踏まえた衛生指標菌について慎重に検討すべきと考えられる。

注 参考①: JFRL ニュース vol.4 No.1 Oct. 2011「食品微生物試験法の国際調和の必要性」

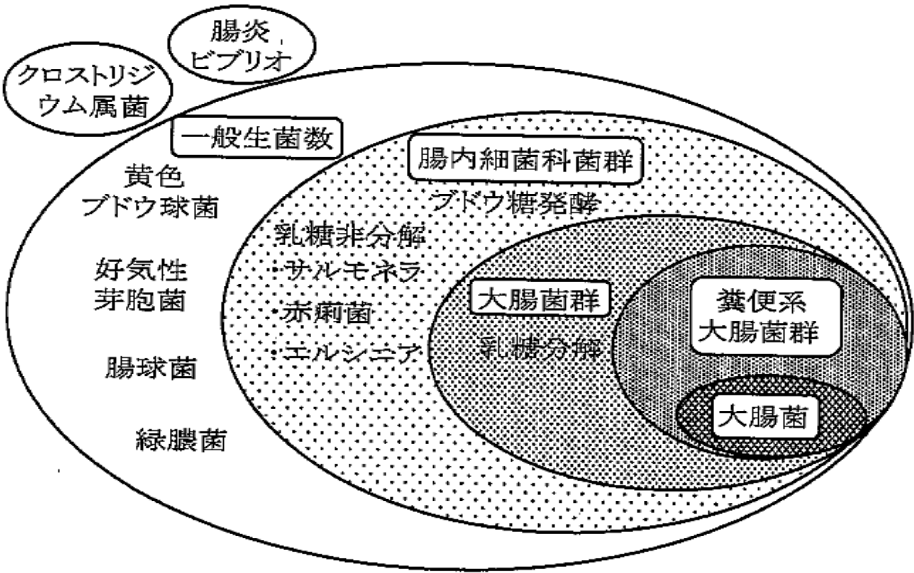


図-1 衛生指標菌の相関図

出典: JFRL ニュース vol.4 No.1 Oct. 2011「食品微生物試験法の国際調和の必要性」

参考②

食品の細菌学的成分規格

	細菌数	腸内細菌科菌群	大腸菌群	糞便系大腸菌群	大腸菌	腸炎ビブリオ	その他
生食用食肉							
牛の食肉（内臓を除く）	-	陰性	-	-	-		
馬の肝臓又は肉	-	-	-	陰性	-		サルモネラ属菌陰性
食肉製品							
乾燥食肉製品	-	-	-	-	陰性		水分活性0.87
非加熱食肉製品	-	-	-	-	100/g以下		黄色ブドウ球菌1000/g以下
特定加熱食肉製品	-	-	-	-	100/g以下		クロストリジウム属菌1000/g以下 黄色ブドウ球菌 クロストリジウム属菌
加熱食肉製品 （包装後過熱殺菌）	-	-	陰性	-	-		
加熱食肉製品 （加熱殺菌後包装）	-	-	-	-	陰性		黄色ブドウ球菌 サルモネラ属菌陰性
鯨肉製品	-	-	陰性	-	-		
魚肉ねり製品	-	-	陰性	-	-		
冷凍ゆでだこ	10万/g以下	-	陰性	-	-	陰性	
生食用かき	5万/g以下	-	-	-	230/100g以下	<100/g	
冷凍食品						<100/g	
無加熱摂取冷凍食品	10万/g以下	-	陰性	-	-		
加熱後摂取冷凍食品 （凍結直前加熱）	10万/g以下	-	陰性	-	-		
加熱後摂取冷凍食品 （凍結直前加熱以外）	300万/g	-	-	-	陰性		
生食用冷凍鮮魚介類	10万/g以下	-	陰性	-	-		
容器包装詰加圧加熱殺菌食 （レトルト食品）	発生し得 陰性	-	-	-	-		
生食用鮮魚介類	-	-	-	-	-	<100/g	

細菌検査方法

1. 生菌数検査方法

1) 試料の調製

食肉拭き取り用スポンジ入り密封バックに滅菌緩衝ペプトン水(以下「BPW」という。)を10ml加えスポンジを膨らませた後、指定の箇所(図.1)を100cm²拭取り、スポンジ入り密封バックにBPWを15ml加えたものを試料とした。この試料にBPW75mlを加えて密封バックの外側から静かにスポンジを揉み100mlの試料原液とした。

大阪松原食肉市場で拭取られた試料は、拭取り液を試料原液とした。

2) 検査手順(フロー図参照)

- ① 1平板に15～300の集落が得られるよう、試料原液の段階希釈液を調製した。(試料原液1mlをBPW水9mlに加え、ボルテックスミキサーで攪拌混合して10-2希釈液(100倍希釈液)を調製する。順次希釈操作を繰り返して試料原液の10倍段階希釈液を調製する。)
- ② 試料原液及び各段階希釈液を、滅菌ピペットを用いて1mlずつシャーレに無菌的に採取した。
- ③ 44～47℃に保温した標準寒天培地約12～15mlをシャーレに注ぎ、試料液とよく混釈した。
- ④ 固まった平板は、倒置してふ卵器にいれ、35±1℃で48±3時間培養した
- ⑤ ふ卵器から取り出した平板は、コロニーカウンターを用いて発生した細菌集落数を算定した。

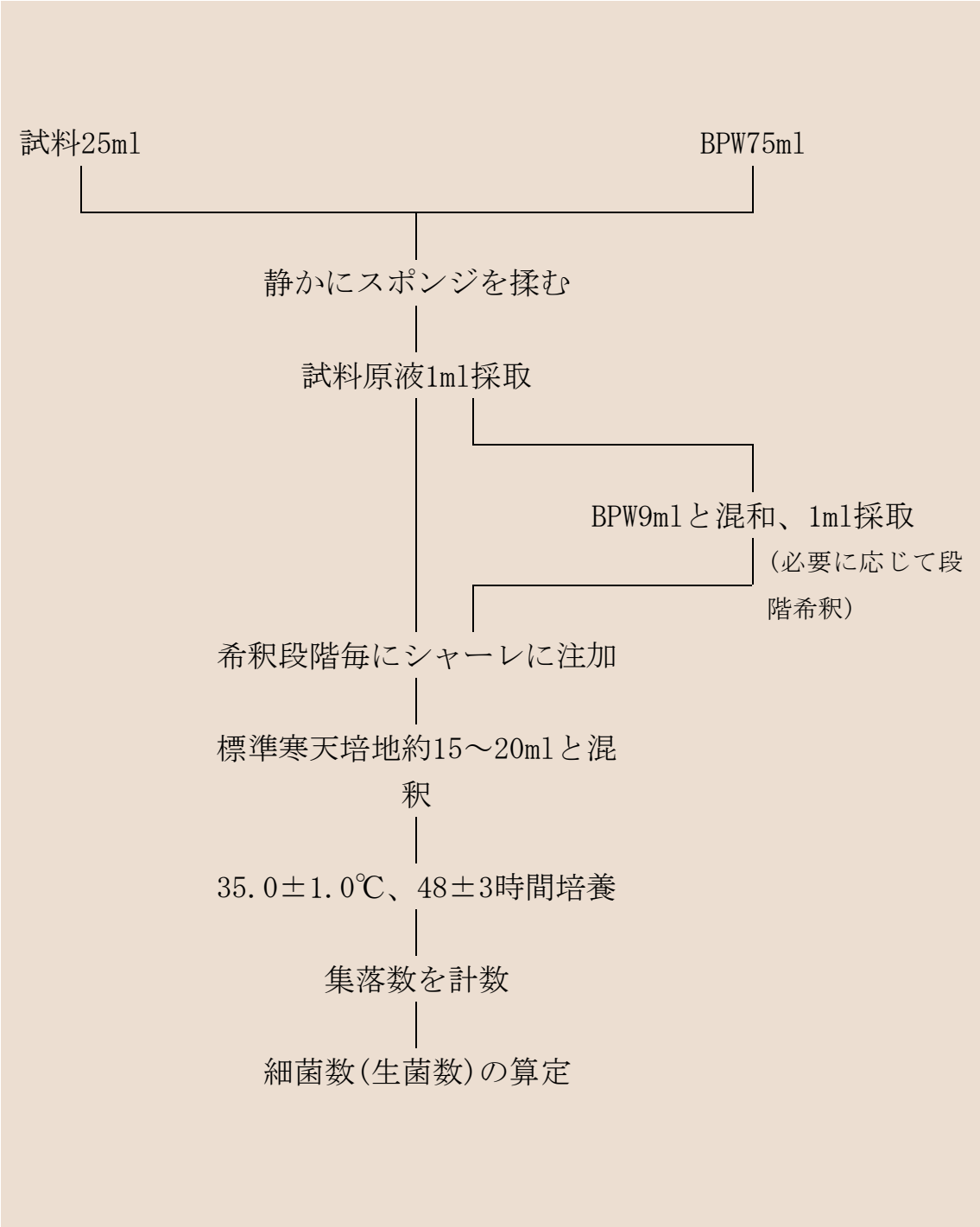
3) 対照試験

検査に用いたシャーレ、希釈液及び培地が無菌であったこと並びに操作が完全であったことを確認するために、試料液の代わりにBPWを用いて同様に操作を行い、集落の発生が無いことを確認した。

図1. 生菌数拭取り箇所



図 検査手順 (フロー図)



2. 腸内細菌科菌群検査方法

1) 試料の調製

レバー表面からの汚染を考慮して、火炎にて表面を殺菌し (図1)、指定箇所のレバー内部 (図2) から検体として 25g をストマッカー袋に秤量して試料とした。また、胆汁液、大阪松原食肉市場で拭取り取った拭取り液についても試料とした。

2) 検査手順 (フロー図参照)

①前増菌培養

ストマッカー袋中の試料に 225ml の緩衝ペプトン水を加え 2 分間ストマッカー処理後、37.0 ± 1.0℃で 18 ± 2 時間培養した。

②選択増菌培養

培養後の緩衝ペプトン水 1 ml を EE ブイヨン 10ml に加え、37.0 ± 1.0℃で 24 ± 2 時間培養した。

③選択分離培養

培養後の EE ブイヨンから、1 白金耳量を取り、VRBG 寒天培地に画線塗抹した後、37.0 ± 1.0℃で 24 ± 2 時間培養した。

3) 集落の判定及び継代培養

①培養後の寒天平板上に腸内細菌科菌群の典型集落 (淡紅色～赤色又は紫色を呈する集落) が形成されているかを判定した。典型集落が認められた場合は、任意に独立集落を選定した。ある種の腸内細菌科菌群は集落又は培地の脱色を引き起こすことがある。従って、特徴的な集落が存在しない場合、白みがかった集落を確定のために選定した。形状の異なる複数の典型集落が認められた場合は、それぞれに独立集落を選定した。

②選定した集落をそれぞれ釣菌し、普通寒天平板に画線塗抹する。37.0 ± 1.0℃で 24 ± 2 時間培養後、独立集落を選定して次の確定試験を実施した。

4) 確定試験

培養後の普通寒天培地上に形成された単離集落について、オキシダーゼ試験及びブドウ糖発酵性試験を実施した。

①オキシダーゼ試験

チトクローム・オキシダーゼ試験用ろ紙をシャーレに入れ、精製水数滴を滴下してろ紙全体を湿らせる。直ちにその上に継代培養した独立集落を滅菌ガラス棒で釣菌し、塗布した。10 秒以内にろ紙が暗色化しない場合、オキシダーゼ反応は陰性と判定した。

②ブドウ糖発酵性試験

白金線を用いて、オキシダーゼ反応が陰性の集落をブドウ糖発酵性試験用培地に穿刺した後、37.0 ± 1.0℃で 24 ± 2 時間培養した。培養後、培地全体の色調が黄色に変色した場合、ブドウ糖発酵性は陽性と判定した。

③腸内細菌科菌群の確定

オキシダーゼ反応が陰性、かつブドウ糖発酵性が陽性と判定された集落を腸内細菌科菌群と確定した。

図1. レバー表面の火炎殺菌



図2. 試料採取箇所

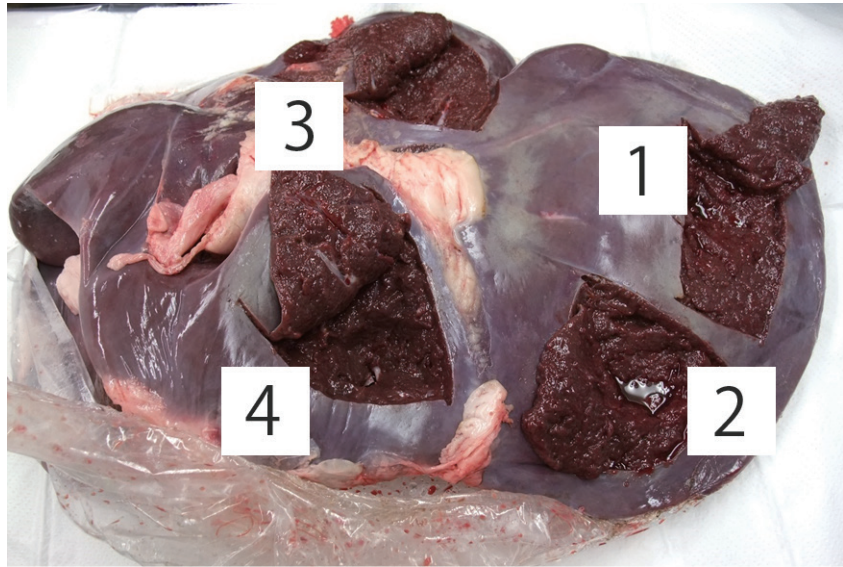
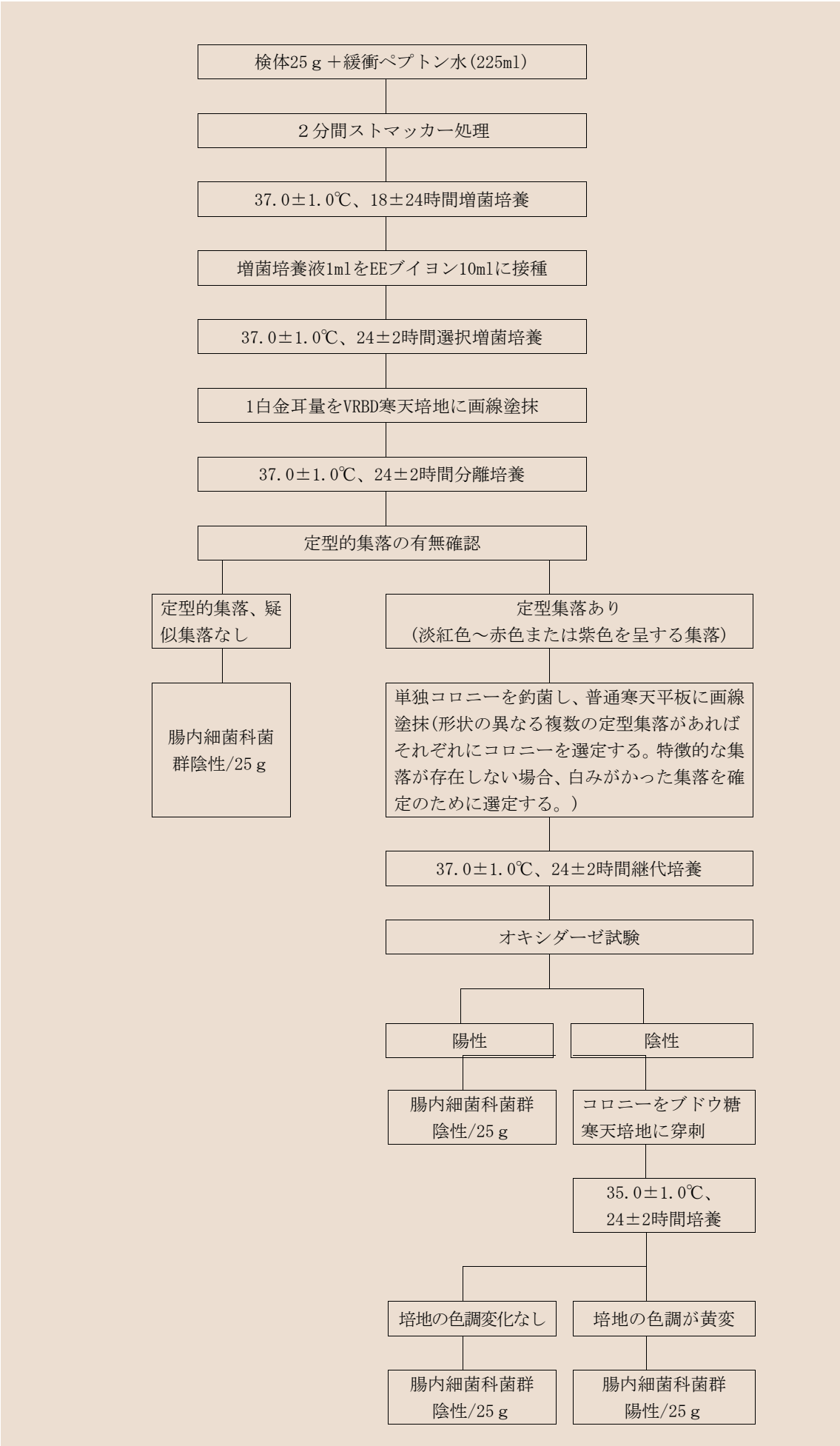


図 検査手順（フロー図）



3. 大腸菌群検査方法

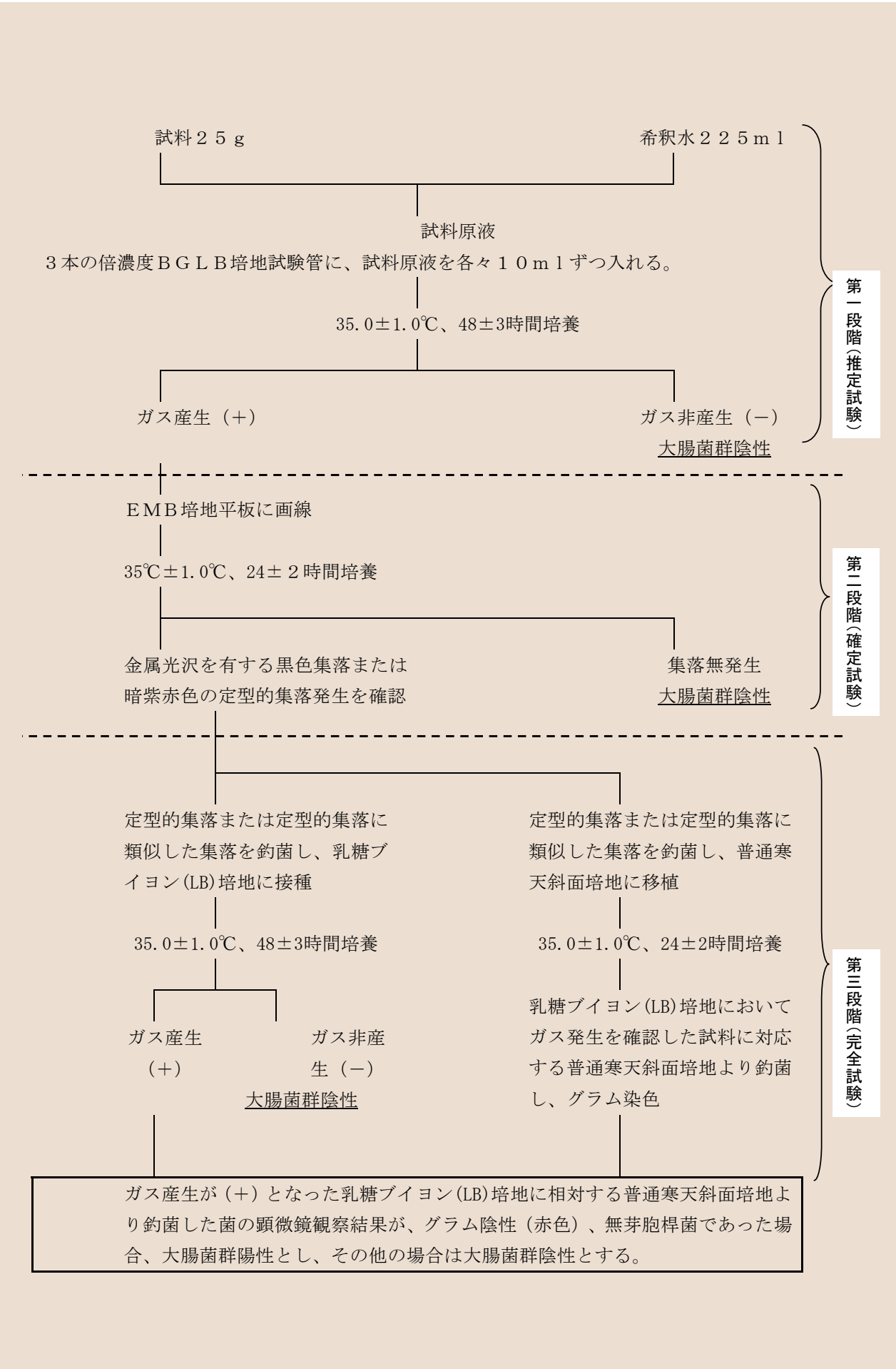
1) 試料の調製

レバー表面からの汚染を考慮して、火炎にて表面を殺菌し、指定箇所のレバー内部から検体として 25g をストマッカー袋に秤量して試料とした。また、胆汁液についても試料とした。レバー及び胆汁液については腸内細菌科菌群検査用試料と共通とした。

2) 検査手順 (フロー図参照)

- ① 3本の倍濃度BGLB培地に試料液 10 ml ずつをそれぞれに接種し、 $35.0^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ の温度で 48 ± 3 時間培養した後、ガス発生を認めないものは大腸菌群陰性とする。
- ② ガス発生を認めた場合は、ガスを発生したすべてのBGLB培地試験管について直ちに 1 白金耳量をEMB培地に塗抹培養して、独立した集落を形成させる。
- ③ $35.0^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養した後EMB培地から大腸菌群の定型的集落 (定型的集落がない場合は、定型的集落に類似した集落 2 以上) を釣菌して、乳糖ブイヨン培地及び普通寒天斜面培地にそれぞれ移植する。定型的集落がない場合は、定型的集落に類似した各集落から釣菌したもの別にそれぞれ移植する。
- ④ その乳糖ブイヨン培地で当該集落を 48 ± 3 時間、寒天斜面は $35 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ で 24 ± 2 時間 (寒天斜面の培養時間は、冷凍食品規格基準による。) 培養し、乳糖ブイヨン培地においてガス発生を確認した場合に、これと相対する普通寒天斜面培地について鏡検し、グラム陰性無芽胞桿菌を認めた場合を大腸菌群陽性とし、その他の場合は大腸菌群陰性とする。

図 検査手順 (フロー図)



memo

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

memo

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

平成27年度生食用牛肉等提供体制緊急構築事業
生食用牛レバー処理技術開発事業報告書

平成28年3月発行

発行者 全国食肉事業協同組合連合会
〒107-0052 東京都港区赤坂 6-13-16 アジミックビル
TEL 03 (3582)1241 FAX 03 (3589)1783

後援  独立行政法人農畜産業振興機構