

静岡県立大学
食品栄養科学
助教

博士（学術）
島村 裕子

共同研究者
増田 修一

2002年 学習院女子大学国際文化交流学部卒業
2004年 お茶の水女子大学人間文化研究科博士前期課程ライフサイエンス専攻 修了
2007年 お茶の水女子大学人間文化研究科博士後期過程人間環境科学専攻 修了
2007年 お茶の水女子大学人間文化創成科学研究科研究院 研究員
2008年 お茶の水女子大学生活環境教育研究センター 研究機関研究員
2011年 静岡県立大学食品栄養科学部助教(至現在)

食中毒菌の食肉への付着・侵入機構の解明と 電解水処理による殺菌法の確立

1. 本研究の学術的背景および目的

2011年、ユッケで起きた腸管出血性大腸菌 O-111 による集団食中毒事件を機に、消費者の食肉の安全性に対する不安が高まっている。我々は、2012年から、地域課題に係る産学共同研究委託事業（B-nest 静岡市産学交流センター・静岡市中小企業支援センター）の助成を受けて、食中毒菌に汚染された食肉を殺菌する手法として、酸・アルカリ性電解水併用処理を用いた殺菌方法について検討している。最終的には、実験室レベルで得られた食肉の洗浄・殺菌法の基礎的知見をもとに、内部まで菌が侵入する前段階の枝肉の皮剥ぎ工程に導入する実用スケールの殺菌・洗浄装置の開発を目指している。これまでの検討では、表面に付着した食中毒菌はほぼ殺菌されるが、切断面に付着した菌は食肉内部に入り込み、電解水処理後も食肉中に留まっていることを明らかにしている。したがって、食肉の食中毒菌における汚染において、食中毒菌が単に食肉の表面に付着しているだけでなく、食肉内部にまで侵入した場合、洗浄や表面の加熱のみでは、除去・除菌できない可能性がある。そこで、食中毒菌による汚染防御を考える上で、電解水を有効かつ少量で作用させるために、汚染菌が食肉表面にどのような状態で付着しているか、また、食中毒菌の食肉内部への付着や侵入に影響を与える因子を解明することは重要である。影響する因子としては、菌の濃度、菌株の種類、食肉の種類や鮮度、温度等が考えられるが、これらに関する知見は少ない。

そこで、本研究では、効果的な殺菌方法を見出すための基礎的な知見を得るために、①食肉の種類や部位の異なる様々な食肉を用いて、食中毒菌の付着や侵入に対する影響を調べ、食肉の微生物学的な安全性の維持に関与する因子について明らかにした。さらに、食中毒菌の食肉への付着・侵入を理解した上で、②食肉の種類や部位の異なる様々な食肉を用いて、各種食中毒菌を付着させた後、洗浄・殺菌処理を行い、より効果的な電解水による洗浄・殺菌方法について検討を行うとともに、食肉中の食中毒菌の分布（菌の侵入・付着部位の特定）についても明らかにした。また、③確立した電解水による洗浄・殺菌方法により、

食肉中や処理水中に非意図的生成物として変異原性物質等が生成する可能性を考慮し、電解水処理後の食肉および処理水中の安全性について、遺伝毒性試験であるエームス試験を用いて評価した。このように本研究では、食中毒菌の食肉への付着・侵入機構を解明することで、電解水を用いた効果的な微生物制御法を見出すとともに、その安全性と有効性について評価した。

2. 研究方法

2-1. 食肉の構造と侵入時間が食中毒菌の付着・侵入に与える影響

2-1-1. 試料の調製

試料は、鶏むね肉、牛レバーのブロック肉を試験に供した。試料はアオノミート株式会社より供与され、大学内に搬入後、冷蔵貯蔵3日以内に実験に供した。試験直前に各ブロック肉を無菌的に縦3 cm x 横3 cm x 高さ6 cmの立方体に包丁でカットした。鶏肉については上部表面の線維が平行に走っている肉片、または上部表面の線維が垂直に走っている肉片の2試料を作製した (Fig. 1)。

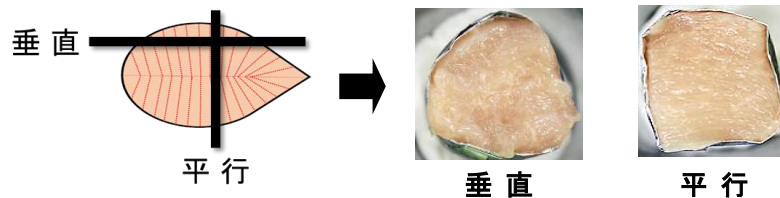


Fig. 1: 鶏むね肉の切断方法

2-1-2. 供試菌株および接種菌液の調製

Staphylococcus aureus C-29 および *Salmonella* Enteritidis NBRC3313 を試験に供した。一晚培養した各菌培養液 30 μ L を BHI (関東化学) 液体培地 (3 mL) に接種し、37 $^{\circ}$ C で 24 時間振盪培養した。培養後、マイクロチューブに各菌体の培養液 100 μ L と滅菌 PBS 900 μ L を分注し、懸濁した。この懸濁液を PBS で 5~6 log CFU/mL および 6~7 log CFU/mL の濃度に希釈し、調製後 1 時間以内に試験に供した。

2-1-3. 接種菌液の食肉への接種および菌数の測定

縦 3 cm x 横 3 cm x 高さ 6 cm の立方体にカットした肉片をアルミ箔に包み、直立させた。肉片の上に接種菌液を 0.1 mL (5~6 log CFU/mL) または 0.01 mL (6~7 log CFU/mL) スポットした。試料の乾燥を防ぐため、滅菌水を含ませたキムワイプでピーカーまたはシャーレを包み、その上からアルミホイルで覆った。各試料を低温室内 (4 $^{\circ}$ C) で 24 時間保存したものを菌汚染肉 (菌汚染肉の初発菌数は、4~5 log CFU/肉片) とした。24 時間後、各肉片の表面を綿棒で拭き取った (表面) 後、表面から 1 cm (0~1 cm)、表面から 2 cm (1~2 cm)、表面から 4 cm (2~4 cm)、表面から 6 cm (4~6 cm) の位置で切断した。食肉表面の菌数は、拭き取り後の綿棒については 90 mL の PBS に入れ、120 秒間ストマッキングすることで回収した。各切断した試料の菌は、試料をストマッカー袋に入れ、滅菌 PBS を 90 mL 加え、120 秒間ストマッキングすることで回収した。ストマッキング後、PBS による段階希釈液を 0.1 mL ずつ、黄色ブドウ球菌はマンニト食塩培地、サルモネラは XLD 寒天培地に滅菌コンラージ棒にて塗布した後、48 時間培養後のコロニー数を計測した。

2-2. アルカリ性・酸性電解水を用いた食肉の殺菌法の有用性

2-2-1. 試料の調製および接種菌液の食肉への接種

鶏むね肉のブロック肉を試験に供した。試料はアオノミート株式会社より供与され、大学内に搬入後、

冷蔵貯蔵 3 日以内に実験に供した。接種菌液の調製については、2-1-2. と同様に行った。食肉への接種は、10 g にカットした鶏むね肉の表面に各接種菌液を適量スポットすることにより行った。その後、安全キャビネット内で 15 分間乾燥させたものを汚染肉とした。

2-2-3. アルカリ性および酸性電解水併用処理

アルカリ性電解水 (pH 11.5、 7.6 ± 1.2 °C) 100 mL が入った滅菌マヨネーズ瓶に各肉片を入れ、3 分間浸漬・振盪させて有機物等の除去処理を 3 分間行った後、酸性電解水 100 mL を加えて中和した。次いで、各食肉を酸性電解水 100 mL の入ったマヨネーズ瓶に移し、3 分間浸漬・振盪させて殺菌処理を行った後、アルカリ性電解水 (pH 11.5、 7.6 ± 1.2 °C) 100 mL を加えて中和した。なお、滅菌水で処理した生肉をコントロールとし、酸性電解水は、冷蔵保存 (温度: 7.6 ± 1.2 °C、ACC: 30 ± 2.0 mg/L、ORP: 975 ± 15 mV)、室温保存 (温度: 25.2 ± 0.1 °C、ACC: 14 ± 1.5 mg/L、ORP: 960 ± 5 mV) のものを使用した。比較対照として、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) (50 ppm) 100 mL が入った滅菌マヨネーズ瓶に各肉片を入れ、3 分間浸漬・振盪させた。菌数の測定は、2-1-3. と同様に行った。

2-3. 細胞外マトリックスタンパク質に付着した食中毒菌に対する電解水の影響

各 ECM タンパク質 (コラーゲン I、コラーゲン IV、フィブロネクチン = 100 μ g/mL、ラミニン = 50 μ g/mL) 200 μ L で被膜した丸底 96 well plate に菌懸濁液 (10^9 CFU/g) 100 μ L を加え、25 °C で 2 時間インキュベーションした。菌懸濁液を除去した後、200 μ L のアルカリ性電解水、酸性電解水、PBS の順に 3 回洗浄した。付着した菌を 55 °C で 20 分間熱固定し、次いで 95 μ L の 1% クリスタルバイオレットで 25 °C で 45 分間反応させて染色した。各 well の過度の染色を滅菌水で 3 回リンスして除去し、室温で 30 分間空気乾燥させた。95% エタノール 100 μ L を well に加えて 15 分間脱色し、530 nm の吸光度を測定した。

2-4. アルカリ性電解水・酸性電解水処理液の安全性評価

アルカリ性電解水・酸性電解水処理液に 1/2 量の酢酸エチルを加え、分液ろうとに移して抽出操作を行った。下層の水層を三角フラスコに取り、上層の酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムを用いた脱水ろうとを通してナス型フラスコに分取した後、エバポレーターで減圧・乾固した。三角フラスコに取った水層を再度、酢酸エチルで抽出し、脱水ろうとを通して、一回目に回収したナス型フラスコに集めて減圧・乾固した。酢酸エチルによる抽出二回分の抽出物が入ったナス型フラスコに少量の酢酸エチルを加えて内容物を溶かし、共栓試験管に移し、N₂ パージで乾固後、DMSO で 1 mL に定量したものを試料とした。滅菌した試験管に試料 (陰性対照: DMSO) 100 μ L を加えた。陽性対象としてアジ化ナトリウム (AZS) 1.0 μ g/100 μ L、またはアミノアントラセン (2AA) 1.0 μ g/100 μ L を加えた (+S9mix: 2AA、-S9mix: AZS)。37 °C、30 分間インキュベーションした (100 strokes/min) 後、S9mix または PBS を 0.5 mL、*Salmonella* Typhimurium TA100 菌懸濁液 100 μ L を順次加え、37 °C、20 分間振とうした (100 strokes/min)。振とう後、ヒスチジン/ビオチン溶液を加えたソフトアガー 2 mL を加えて十分に混和し、寒天培地シャーレの上に播いて、均一に広げた。固化後、シャーレを倒置し、37 °C、48 時間インキュベートした。インキュベート後に誘発したコロニー数を計測した。

3. 結果

3-1. 食肉の構造と侵入時間が食中毒菌の付着・侵入に与える影響

鶏むね肉の線維方向が平行または垂直の面に菌液 0.1 mL ($4 \sim 5$ log CFU/肉片) を接種した場合、汚染後

24 時間において、線維方向が垂直の上部表面に菌を付着させた食肉では、菌が 6 cm 以上まで内部に侵入した。同じ条件下で、線維方向が平行の上部表面に菌を付着させた食肉においては、菌が内部 1 cm までの侵入に留まった (Table 1)。また、菌数は同じ (4~5 log CFU/肉片) で、菌液量を 0.01 mL に減少させて検討したところ、線維方向が垂直の上部表面に菌を付着させた食肉では、菌液量 0.1 mL で接種したものと比べて、上部表面 1 cm~6 cm での菌数が平均して約 1 log CFU/g まで減少した (Table 2)。

Table 1: 食肉の構造がサルモネラの付着・侵入に与える影響 (菌液量 0.1 mL)

菌付着面		サルモネラ	
		鶏むね肉 平行	鶏むね肉 垂直
上部表面	表面	2.74±0.42	2.87±0.15
	上部表面~1 cm	2.88±0.08	3.53±0.28
	上部 1 cm~2 cm	<1	2.24±0.19
	上部 2 cm~4 cm	<1	1.85±0.10
	上部 4 cm~6 cm	<1	2.70±0.14

初発菌数 4~5 log CFU/肉片、4°C、24 時間保存

log CFU/g (n=6)

Table 2: 食肉の構造が黄色ブドウ球菌、サルモネラの付着・侵入に与える影響 (菌液量 0.01 mL)

菌付着面		黄色ブドウ球菌	サルモネラ
		鶏むね肉 平行	鶏むね肉 垂直
上部表面	表面	3.13±0.18	2.91±0.19
	上部表面~1 cm	3.19±0.38	3.16±0.46
	上部 1 cm~2 cm	1.34±0.39	1.47±0.41
	上部 2 cm~4 cm	1.32±0.22	1.23±0.22
	上部 4 cm~6 cm	1.29±0.24	1.53±0.48

初発菌数 4~5 log CFU/肉片、4°C、24 時間保存

log CFU/g (n=6)

3-2. アルカリ性・酸性電解水を用いた食肉の殺菌法の有用性

3 種類の食中毒菌を各々付着させた 1~10 g の食肉をアルカリ性電解水 (pH 11.5) 100 mL および酸性電解水 (pH 2.5) 100 mL の併用処理で洗浄・殺菌した結果、全ての試料で 1 log CFU/g 以上の菌数減少が認められ、平均菌減少率は約 7~8 割程度を示した。鶏むね肉について、従来、殺菌剤として用いられている NaClO (50 ppm) と電解水との殺菌能の比較を行ったところ、電解水処理では 1 log CFU/g 以上殺菌効果が高かった (Fig. 2)。

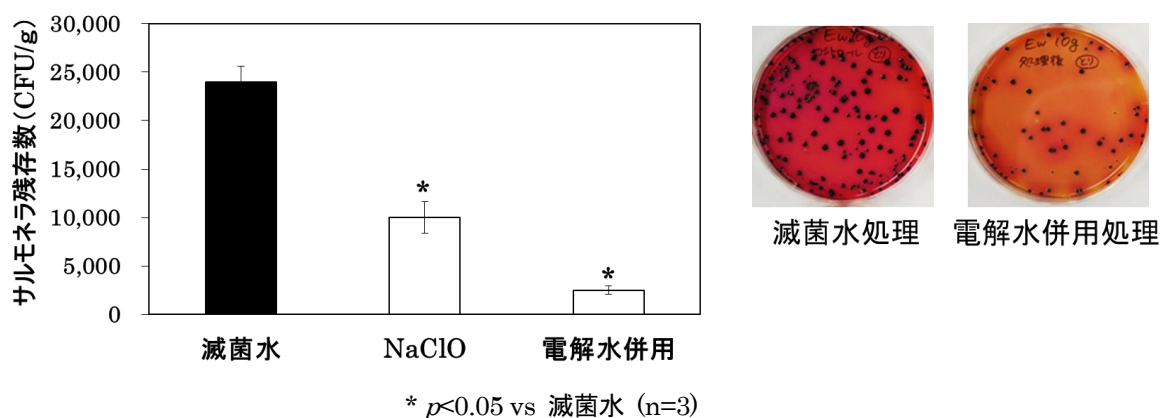
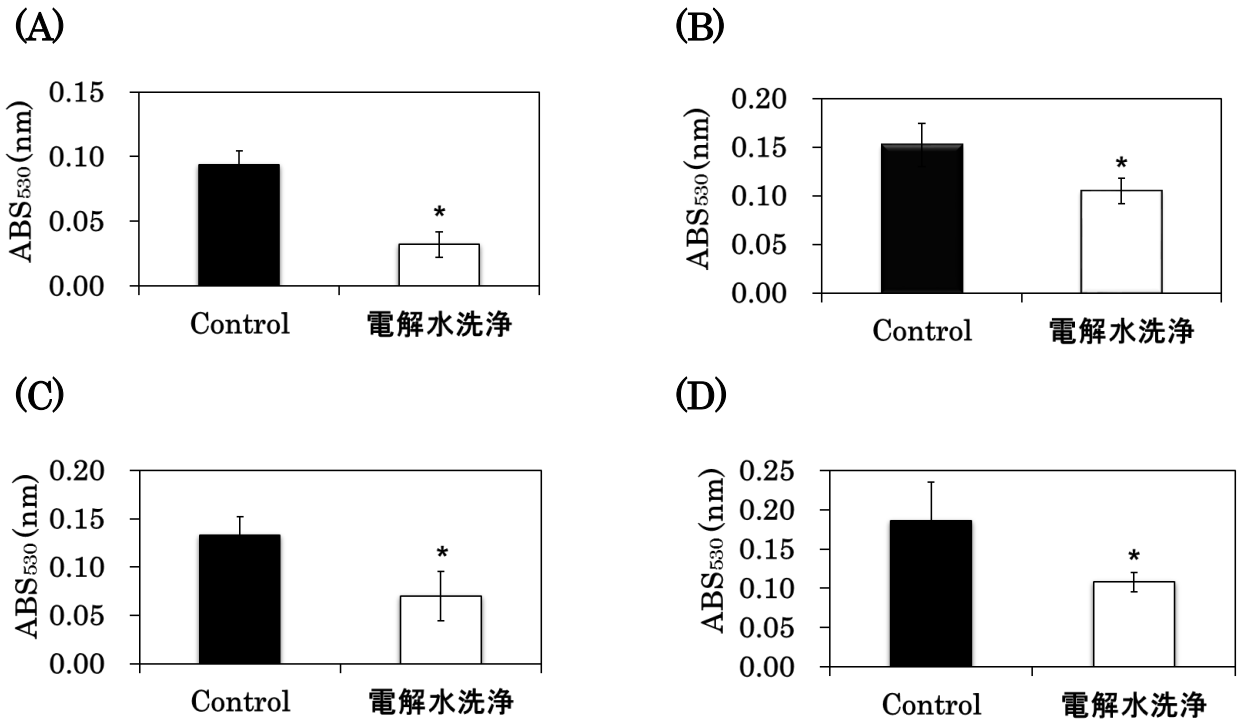


Fig. 2: 鶏むね肉における洗浄処理方法の違いによるサルモネラの殺菌効果

3-3. ECM タンパク質に付着した食中毒菌に対する電解水の影響

コラーゲン I およびフィブロネクチンについては、黄色ブドウ球菌が特異的に付着し、コラーゲン IV およびラミニンについては、サルモネラおよび大腸菌が特異的に付着した。食中毒菌の ECM タンパク質への付着に対する電解水の影響について検討した結果、コラーゲン I およびフィブロネクチンに付着した黄色ブドウ球菌は、電解水による洗浄で付着が増加した。一方、コラーゲン IV、ラミニンに付着したサルモネラ (Fig. 3 (A)、(B)) および大腸菌 (Fig. 3 (C)、(D)) は、電解水処理により付着が有意に減少した。



* $p < 0.05$ vs Control (n=3)

Fig. 3: 細胞外マトリックスタンパク質に付着した食中毒菌に対する電解水の影響

(A) サルモネラ (コラーゲン IV)、(B) サルモネラ (ラミニン)、(C) 大腸菌 (コラーゲン IV)、(D) 大腸菌 (ラミニン)

3-4. アルカリ性電解水・酸性電解水処理液の安全性評価

酸性電解水・アルカリ性電解水併用処理後の溶液の変異原性について、エームス試験を用いて評価した。その結果、鶏むね肉および牛レバー処理後の全ての試料について、±S9mix で陰性であった (Table 3)。

Table 3: 電解水処理液の安全性評価(エームス試験)

S9mix	ヒスチジン復帰コロニー数				
	DMSO	鶏むね肉		牛レバー	
		中和	酸性電解水	中和	酸性電解水
+	85±9.8	89±16.3	106±30.5	112±35.4	91±8.9
-	53±2.1	60±5.5	91±10.6	51±11.1	87±19.1

(n=3)

陽性対照: 2-アミノアントラセン (+S9mix) 731±128.6, アジ化ナトリウム (-S9mix) 772±91.3

4. 考察

効果的な殺菌方法を見出すための基礎的な知見を得るために、線維方向の異なる食肉 (**Fig. 1**) を用いて、食中毒菌の食肉への付着や侵入に対する影響を調べ、食肉の微生物学的な安全性の維持に関与する因子について検討した。汚染後 24 時間では、線維方向が垂直の上部表面に菌を付着させた食肉では、菌が 6 cm 以上まで内部に侵入することが明らかとなった (**Table 1**)。同じ条件下で、線維方向が平行の上部表面に菌を付着させた食肉においては、菌が内部 1 cm までの侵入に留まった (**Table 1**) ことから、食肉の線維方向が菌の侵入に大きな影響を及ぼす可能性が示唆された。また、菌数は同じで、菌液量を 0.01 mL に減少させて検討したところ、線維方向が垂直の上部表面に菌を付着させた食肉では、菌液量 0.1 mL で接種した場合と比べて、上部 1 cm~6 cm での菌数が平均して約 1 log CFU/g まで減少した (**Table 2**)。これらの結果より、食肉の水分量が食中毒菌の侵入に影響を与えることが示唆された。

電解水併用処理を用いて、食肉の殺菌条件の検討を行った。その結果、全ての試料で 1 log CFU/g 以上の菌数減少が認められた。また、平均の菌減少率は約 7~8 割程度を示し、電解水併用処理は効果的な殺菌方法であることが明らかとなった。鶏むね肉について、従来、殺菌剤として用いられている次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) と電解水の殺菌作用を比較したところ、電解水処理した鶏むね肉では、コントロール及び NaClO 処理した肉に比べ、1 log CFU/g 以上の菌数減少が認められ、電解水が優れた殺菌剤であることが明らかになった (**Fig. 2**)。しかし、電解水併用処理を行った食肉においても、3~4 log CFU/g の菌が残存していたことから、肉の表面に存在する脂肪やタンパク質等の有機物が殺菌効果に影響していることが考えられた。これらのことから、食肉表面に残存して、酸性電解水と接触した菌は殺菌されるが、切断面から肉の細胞内部まで侵入している菌に対しては、殺菌効果が弱いことが推察された。

食中毒菌の付着機構を解明するために、食肉に分布する結合組織の構成成分である ECM タンパク質に着目し (Zulfakar *et al.*, 2012)、その中でも食肉表面に多く分布するコラーゲン I、コラーゲン IV、フィブロネクチンおよびラミニンの 4 種について、食中毒菌の ECM タンパク質への付着特性を調べた。その結果、コラーゲン I およびフィブロネクチンについては、黄色ブドウ球菌が特異的に付着し、コラーゲン IV およびラミニンについては、サルモネラおよび大腸菌が特異的に付着した。そこで、食中毒菌の ECM タンパク質への付着に対する電解水の影響について検討したところ、コラーゲン I およびフィブロネクチンに付着した黄色ブドウ球菌は、電解水による洗浄で付着が増加した。その理由としては、グラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌では、ペプチドグリカン層が厚く、電解水による洗浄でペプチドグリカン層の一部が破壊されることで菌体内のタンパク質等が溶出し、染色領域が増加したことが推察された。一方、コラーゲン IV、ラミニンに付着したサルモネラおよび大腸菌は、電解水処理により付着が有意に減少した (**Fig. 3**)。これらの結果より、電解水処理により、食中毒菌の ECM タンパク質への付着を制御できることが示唆された。

アルカリ性電解水および酸性電解水併用処理による洗浄・殺菌により、食肉に付着した食中毒菌を約 7~8 割減少させることが可能となった。しかし、この電解水による洗浄・殺菌により、食肉中や処理水中における変異原性物質等の生成や食肉自体の品質の劣化が起こると実用化することは難しい。現在、畜肉加工工程では、大量の水または次亜塩素酸ソーダ等を用いた洗浄が行われているが、塩素系の薬剤を使用することにより生成するクロロホルム等のトリハロメタン類や最終製品に残存する塩素臭等の問題が指摘されている (Linger *et al.*, 2001)。そこで、遺伝毒性試験であるエームス試験を用いて、酸性電解水・アルカリ性電解水併用処理後の溶液の変異原性を評価した。その結果、鶏むね肉および牛レバー処理後の全ての試料について、±S9mix で陰性であった (**Table 3**)。これらの結果より、電解水併用処理は、有機塩素系化合物等が生成しない安全性の高い殺菌法であることが明らかとなった。

5. 要約

本研究では効果的な食肉の殺菌方法を見出すための基礎的な知見を得ることを目的として、アルカリ性・酸性電解水併用処理を用いた食肉の殺菌法について検討を行った。また、食中毒菌の付着・侵入に影響を与える各種因子について検討し、以下のことを明らかにした。

1. 電解水併用処理による食肉の殺菌効果を検討したところ、全ての試料で 1 log CFU/g 以上の菌数減少が認められた。また、酸性電解水は ACC 値および使用温度が高い程、強い殺菌効果が得られることが示唆された。
2. 電解水併用処理による食肉の殺菌効果は、従来の鶏肉の洗浄に用いられている次亜塩素酸ナトリウム処理よりも効果的であった。
3. 食肉処理後の電解水の安全性（変異原性）試験をエームス試験を用いて評価したところ、全ての試料について陰性を示した。
4. 食肉の食中毒菌汚染面の線維方向が垂直、また接種菌液の量が多い程、食中毒菌は、食肉内部に侵入した。これらの結果より、食肉の線維の方向および接種菌液の量が食中毒菌の食肉への付着・侵入に影響を与える因子であることを明らかにした。
5. 食肉の ECM タンパク質への付着特性は、食中毒菌の細胞壁の構造の違いにより異なることを明らかにした。また、電解水併用処理により、サルモネラおよび大腸菌における ECM タンパク質への付着を有意に抑制できることが示唆された。

本研究では、食中毒菌の食肉への付着・侵入機構を解明することで、アルカリ性・酸性電解水併用処理を用いた効果的な微生物制御法を見出すとともに、その有効性および安全性を明らかにした。今後、電解水併用処理による殺菌法を用いた実用スケールの新規殺菌・洗浄装置の開発が期待される。

6. 参考文献

- [1] Zulfakar, S. S., White, J. D., Ross, T., Tamplin, M. L.: Bacterial attachment to immobilized extracellular matrix proteins in vitro. *Int. J. Food Microbiol.*, **157**: 210-217 (2012).
- [2] Linger, J. B., Molinari, J. A., Forbes, W. C., Farthing, C. F., Winget, W. J.: Evaluation of a hydrogen peroxide disinfectant for dental unit waterlines. *J. Am. Dent. Assoc.*, **132**: 1287-1291 (2001).

7. 謝辞

本研究は、平成 25 年度 サッポロ生物科学振興財団研究助成の支援を受けて行いました。ここに記して感謝致します。