

1 牛枝肉深部にみられたボーンテイントの原因究明

豊橋市食肉衛生検査所 ○合川敏彦 菅麻美子 松本圭
塚田真樹 本島雅昭 細井美博

はじめに

平成20年8月にAと畜場で処理された牛枝肉の脱骨時における大腿骨周辺部の筋肉及び真空パック保存されていた大腿部筋肉から、異臭を呈したいわゆるボーンテイント（Bone-taint）と思われる2件の事例に遭遇した。これら2件の異臭肉について、官能検査、微生物検査及び病理組織検査を実施したところ、クロストリジウム属菌の関与が強く疑われた。そこで、異臭の発生要因を追究するため、健康牛の枝肉を対象に、大腿骨体部の微生物検査及び冷却時間と枝肉深部温度の関係等を調査したところ、若干の知見を得たので報告する。

材料及び方法

1 異臭肉の官能検査、微生物検査及び病理組織検査

異臭肉の官能検査を行った後、変色し異臭を発する部位（以下、異臭部位）を直接スタンプ鏡検したところグラム陽性大桿菌（有芽胞）のみが確認されたため、以下のとおりクロストリジウム属菌の分離同定を実施した。異臭部位を GAM ブイヨン培地（日水製薬㈱）及びクックドミート培地（OXOID 社）で 37℃ 24 時間嫌気培養後、5%馬脱繊維血加寒天培地及び変法 GAM 寒天培地（日水製薬㈱）で 37℃ 24 時間嫌気培養し、クロストリジウム属菌を分離した。分離した菌株は、Api20A（日本ビオメリュー㈱）を用いて同定を行った。また、異臭部位を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、定法に従い、病理組織検査を行った。

2 健康牛の枝肉における調査及び温度別培養試験

（1）大腿骨体部の微生物検査

ホルスタイン種3頭、黒毛和種3頭、交雑種9頭（計15頭）の大腿骨体部を汚染のないように取り出し、滅菌綿棒を用いて約100cm²拭き取ると共に大腿骨周囲の筋肉を採材し、1と同様にクロストリジウム属菌の分離同定を実施した。

（2）冷却時間と牛枝肉深部温度の経時的変化の調査

ホルスタイン種8頭、黒毛和種2頭、交雑種16頭（計26頭）の大腿二頭筋及び半膜様筋より中心温度計を14cm差し入れ、牛枝肉大腿骨体部付近の温度を測定した。測定は、冷却開始時、冷却開始後3時間、5時間、22時間、26時間の5回実施し、冷却による経時的温度変化を調査した。

（3）クロストリジウム属菌の温度別培養試験

健康牛の大腿骨体部から分離した *Clostridium bifermentans*（以下 *C. bifermentans*）の菌液（ 7.7×10^2 cfu/ml）を、GAM ブイヨン培地に接種後、温度条件を 37℃、30℃、20℃、

15℃、4℃の5段階に設定しそれぞれ嫌気培養を行った。培養時間は、大腿部へのクロストリジウム属菌の接種実験で、38℃から20℃まで20時間かけ温度を下げた結果、異臭が発生したとの報告がある^[1]ことから、20時間とした。培養後、クロストリジア測定培地（日水製薬株式会社）を用いて菌数測定を行った。

成 績

1 異臭肉の官能検査、微生物検査及び病理組織検査

異臭肉は2件とも腐敗臭を発し、筋肉、脂肪は共に緑色を呈していた。直接スタンプ鏡検で確認したグラム陽性大桿菌（有芽胞）は、*Clostridium beijerinckii/butyricum*（以下 *C. beije/butyricum*）、*Clostridium* spp.であった。病理組織検査の結果、筋線維間に大桿菌（有芽胞）を確認したが、菌の周囲に好中球、リンパ球等の炎症細胞の集簇を認めなかった。

2 健康牛の枝肉における調査及び温度別培養試験

(1) 大腿骨体部の微生物検査

ホルスタイン種1頭の大腿骨周囲の筋肉から *C. beije/butyricum* を分離し、黒毛和種1頭の拭き取り検体から *C. bifementans* を分離した。

(2) 冷却時間と牛枝肉深部温度の経時的変化の調査結果

26頭の深部温度の平均値は、冷却開始時は40.1℃、冷却開始後3時間では40.8℃となり、5時間では39.1℃、22時間では17.9℃、26時間では13.2℃となった（表1、図1）。また、枝肉重量順に2グループに分け深部温度の経時的変化を比較した。重いグループは、軽いグループに比べて、温度が高い傾向がみられた（図2）。

表1 冷却時間と牛枝肉深部温度の経時的変化

冷却時間（時間）	0	3	5	22	26
平均値（℃）	40.1	40.8	39.1	17.9	13.2
最高値（℃）	41.0	43.2	42.2	22.0	16.9
最低値（℃）	39.2	37.4	35.5	13.2	7.8
標準偏差	0.5	1.5	1.6	2.6	2.4

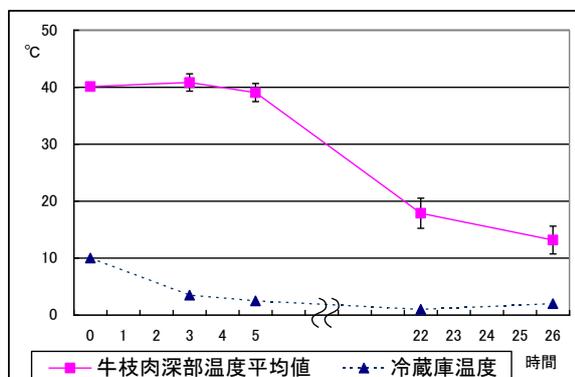


図1 牛枝肉深部温度及び冷蔵庫温度

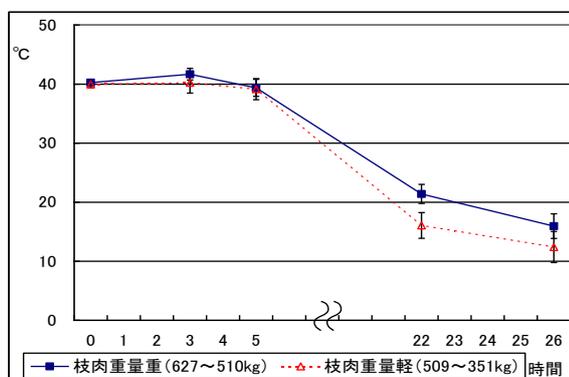


図2 牛枝肉深部温度（枝肉重量別）

(3) クロストリジウム属菌の温度別培養試験

培養前 7.7×10^2 cfu/ml の菌数は、37℃培養では 5.6×10^9 cfu/ml、30℃培養では 9.9×10^9 cfu/ml、20℃培養では 7.1×10^3 cfu/ml と増加し、15℃及び4℃培養では 3.0×10^2 cfu/ml 以下となった。

考 察

今回、異臭肉から、*C. beijerinckii/butylicum* 等のクロストリジウム属菌が分離された。クロストリジウム属菌の多くは、組織固有の加水分解酵素と相互反応して不快臭を呈する揮発性の化合物（酢酸塩、酪酸塩、プロピオン酸塩）を生成する^{〔2〕}と言われており、これらの菌が異臭の原因であったことが推察された。また、病理組織検査の結果より、とさつ解体後にこれらの菌が増殖した可能性が示唆された。

健康牛の大腿骨体部の微生物検査結果から、異臭を発していない枝肉においても、15頭中2頭にクロストリジウム属菌の存在が確認された。

牛枝肉深部温度は、経時的变化の調査結果から、ボーンテイントの抑制に推奨されている24時間後に深部温度を15℃に下げるという条件^{〔3〕}を概ね満たしていたが、一部の枝肉では、冷却が不十分となる可能性が考えられた。

温度別培養試験結果から、大腿骨体部から分離された *C. bifementans* は20℃以上で増殖し、15℃以下では増殖が抑制されることが分かった。

これらのことから、今回の異臭は枝肉の深部がクロストリジウム属菌の増殖可能な温度で維持されたため、大腿骨体部に存在した菌が増殖したことにより引き起こされたと考えられた。しかし、大腿骨体部におけるクロストリジウム属菌の保菌率と比較すると、異臭肉の発生頻度は低く、異臭の発生には原因となる細菌の発育温度だけでなく菌数、pH等、他の要因の関与が考えられる。

今後、さらに大腿骨体部におけるクロストリジウム属菌の分離同定及び菌数の測定等について取り組み、ボーンテイントの発生防止に努めていきたい。

引用文献

- [1] De Lacy K.M.; Broda D.M.; Bell R.G. *In vitro* assessment of psychrotrophic *Clostridium* spp. as possible causative agents of bone-taint in beef. Food Microbiol, Volume 15, Number 6, pp. 583-589 (1998)
- [2] 春田三佐夫ら監訳 食肉微生物学 建帛社 昭和62年3月25日初版発行
- [3] Kitchell, A.G. The Influence of rate of chilling on the microbiology of meat. In, *Meat Chilling: Why and How?* Meat Research Institute Symposium No. 2 (Ed. C.L. Cutting), pp. 2.1-2.6 (1972)