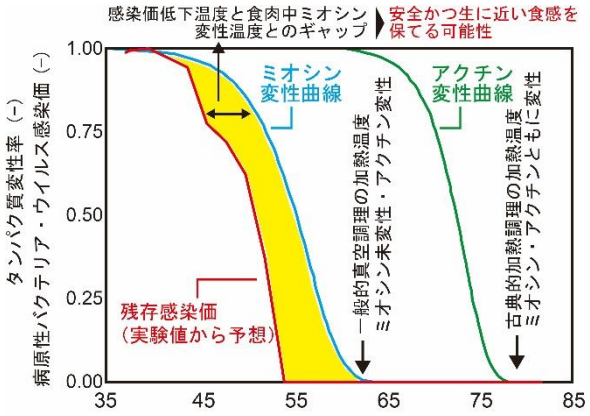
1. 分子美食学見地に基づく(安全な)低温調理法の確立
2. 木村善一郎先生
3. お肉を食べる。私達はこれを調理する時「焼く」という行為をする。私達はよりおいしくお肉を食べる為低温調理法について研究し、食文化に革命を起こす。
4. [目的]

畜肉を加熱処理し食べることは人類の歴史において世界中で行われてきた。加熱処理は消化しやすくすると同時に，畜肉内に常在する微生物に対する殺菌効果（i.e.安全性）をもたらす側面が存在する。畜肉の加熱処理は色、重量および内部テクスチャーに大きな様々な変化が生むがこれらの変化は畜肉を構成するタンパク質の物理的変化である熱変性が最も関与している。タンパク質の熱変性は様々な畜肉の品質にも影響を与えるため、過度な加熱処理は食品そのものの美味性を損なう危険性がある。最適な畜肉加熱処理条件を探索すべく、様々な加熱処理法が多くの調理者・研究者により検討されてきており、その代表ともいえるのが真空低温調理法である。本調理法は「食材を真空包装し、温度と時間管理を正確に行うことができる加熱機器で袋ごと低温調理する調理法」と定義される。微生物の増殖は畜肉喫食の懸念材料のひとつであるが本法は微生物が最も繁殖しやすい温度帯である10～63℃を急速冷却により素早く通過させることで、微生物の繁殖を予防している。また本法による加熱処理後の食材の特徴として、畜肉の場合一般的な焼成調理に比べ肉がジューシーかつ柔らかく仕上がり、重量損失が少なく、閉じた系内で加熱するため、油や水さらには水溶性成分の溶出が少ない点が挙げられる。

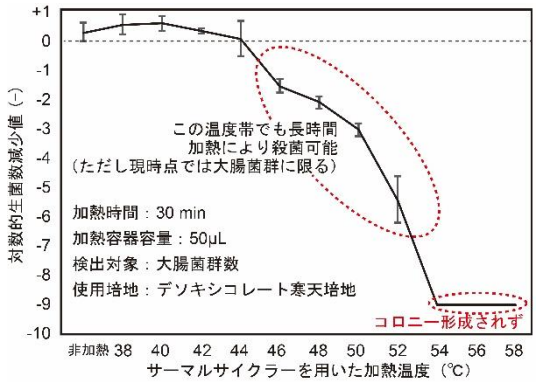


すなわち真空調理は「美味しい」のである。この特徴の多くは、タンパク質の熱変性という概念で説明できる。畜肉内に存在する筋原線維タンパク質であるアクチンは通常 65℃以上で変性が開始することが知られており、真空低温調理はこの温度を下回る条件で加熱することから、アクチンの変性が起こらず、アクチンが内包する水分（内部水）を失うことがない（多汁性の向上）。一方で右図に示すよう、一般的真空調理法は 65℃前後での加熱をおこなうことから、もう一つの筋原線維タンパク質であるミオシンの変性は生じているものと考えられる。ミオシンは筋原線維タンパク質としてアクチンのおよそ３倍の存在量を持ち、多汁性への相対的な寄与は大きい。我々は自らの専門分野である衛生工学との関連性から、畜肉において問題となる病原性微生物群の不活化可能温度とミオシンの変性温度の間に 10℃弱のギャップが存在する可能性を実験的に見出した（詳細は項目 8 において後述）。一般的低温調理法においても、ミオシンの変性に伴い畜肉のテクスチャーの変化は生じている。言い換えれば「肉に火が通って」いる。一方、見出した上記ギャップに従えば、より低温（50℃前後）

での調理が可能となることからテクスチャーの変化を最低限に、または、全く起こさずに、病原性微生物を不活化できる可能性がある。このことは、卑近な表現をするならば熱処理による「安全なレバ刺し」の実現可能性を示唆する。畜肉において病原性微生物群は多種類存在し、それぞれ不活化温度が異なるが、それぞれの不活化温度を同一の条件で調査した例は存在しない。現在一般的真空調理法において採用されている 65℃という温度設定は、複数の報告の最大公約数、かつ安全性の担保に重きを置いたものであり、各種病原性微生物の不活化温度を同時に調査することで、安全性を担保しながら、この温度を下げることが可能となる。

[今までの研究経過または準備状況]

本申請研究は畜肉表面・内部に存在する各種病原性微生物群の不活化温度及びそれに要する時間を詳細に調査することで、真空調理法における安全性と美味性の両立する加熱温度を探索することを目的とする。



研究遂行に先立ち、我々はデソキシコレート寒天培地による畜肉表面に存在する大腸菌群の培養・検出を行った。この際に、38℃から 58℃までの畜肉懸濁液を対象にサーマルサイクラーによる 30 分の加熱処理を行ったものを試料とした。結果として右図の生存曲線を得た。生存数の明確な現象は 46℃前後から発生しており、同温度における 30 分の加熱によりおよそ 2log（99%）の減少が確認された。同検出法は環境試料中に存在する従属栄養性・富栄養性のプロテオバクテリア門細菌（*Salmonella* 属細菌含む）を包括的に検出可能な手法であることから、畜肉由来の病原性微生物（e.g. *Salmonella* 属細菌 *Campylobacter* 属細菌, 腸管出血性大腸菌等、いずれもプロテオバクテリア門に属する）の不活化が同温度以上の加熱により可能であることが示唆されたと考えている。

ただし、この結果は培養可能な一部の病原性微生物の不活化が可能であることを示したに過ぎない。申請研究においてはこの温度帯の前後を対象に、培養不能あるいは培養困難微生物（e.g. E 型肝炎ウイルス等）についての感染能力を有する細胞・粒子数（感染価）を評価する必要がある。したがって、非培養的検出法である Q-PCR 法を採用し、同様の熱処理後サンプル内の感染価に取り組む。なお検出に必要な各種微生物群用のプライマー設計は既に完了している。

[実験計画と方法]

本研申請研究は下記に示す２種のタスクをそれぞれ独立に遂行し、結果を総合することで研究目的である安全性と美味性の両立する加熱温度を決定する。以下に両タスクの詳細

を示した。

タスク-1　食中毒原因細菌の不活化温度調査

食肉に関連する各種病原性微生物を一定時間加熱し、不活化した個体数を定量的に測定する。加熱による不活化に際し、サンプル間の誤差を最小限とするため、複数の温度による加熱を同時に実施することが望ましい。この実験を行うためグラジエント機能付きサーマルサイクラーを使用することを予定している。所属機関は当該装置を所有していないため、購入経費を計上した。加熱するサンプルは常温で 3 日間放置したニワトリ肉を使用することとする。ホモジナイザーによる破砕処理を行い 8 連 200μLPCR チューブに分注したものを加熱処理する。また加熱温度は 45～55℃とする。

加熱後の資料は Q-PCR 法を用いて DNA 存在量をマーカーとする感染価評価を行う。感染価評価手法は培養法をはじめ複数種が存在するが、培養法は原虫類やウイルス類の検出に不適であるため不採用とした。同様に抗体を用いた検出技法である ELISA 法は高感度検出が可能であるが、試料中に存在する抗体の存在量のみを定量可能であるため不活化の有無の判別が困難であるため不採用とした（下表）。Q-PCR 法は下記する DNase 処理と併用するという条件においては感染価評価に使用可能であるため本法を採用することとした。

加熱後試料の DNase 処理は不活化（i.e. 溶解した細胞）した個体由来の DNA を除去するために行うものである。試料に DNase を添加することで溶解細胞から溶出した細胞外 DNA を分解処理可能である。除去後の無傷の菌体を対象に DNA 抽出を行うことで細胞が溶解していない（i.e. 感染価を保った）細胞のみから DNA を得ることが出来る。なおこの DNase

食肉中の健康関連微生物		死滅温度（文献値）	感染価評価法		
			培養法	Q-PCR法	ELISA法
バクテリア	*Salmonella* 属細菌	60℃15分	○	条件付きで○	△
	Campylobacter 属細菌	50℃5分	○	条件付きで○	△
	Entrobacteriaceae 科細菌	60℃10分	○	条件付きで○	△
	Clostridia 綱細菌	芽胞形成	△	条件付きで○	△
原虫	*Trichinella* 属原虫	52℃47分	×	条件付きで○	△
	Toxoplasma 属原虫	49℃5分	×	条件付きで○	△
ウイルス	E型肝炎ウイルス	60℃10分	△	条件付きで○	△

処理操作は Q-PCR 法による感染価を評価において既に確立されたものであり、この手法を用いてすることは妥当であるとされている。

抽出後の DNA は Q-PCR による DNA 存在量から感染価を算出する。定量対象とする微生物は国内で生産される畜肉において問題となる病原性微生物である 7 種(バクテリア 5 種、原虫 2 種、上記表参照）とする。更に非加熱試料との比較から感染価が 1/10 に低下するために必要な時間（D 値）を算出する。

タスク-1　イノシシ糞便を用いた E 型肝炎ウイルス感染価評価

E 型肝炎ウイルスは、国内で流通する肉類においては存在量がそもそも希薄であり、なおかつヒト肝細胞を用いた培養系も運用が困難とされている。従って肉類を用いた感染価の消長を評価することは不可能であることから、別の経路で E 型肝炎ウイルスが高濃度に存在する試料を入手する必要がある。

この問題を解決するために、広島県内のジビエ業者からイノシシ糞便を入手することを着想した。イノシシは 30%～50%が E 型肝炎陽性とされていることから、排泄物である糞便も高濃度の E 型肝炎ウイルスが存在する。研究遂行にあたっては PCR 法を用いて陽性糞便をスクリーニングする。研究開始時期が年度の前半であるため、狩猟期間を過ぎていることから、狩猟対象ではなく駆除対象となった個体の糞便を対象とする。このため、陽性糞便入手に時間がかかることが予想される（3 か月程度を想定）。陽性が確定した糞便の入手に至ったのちは当該糞便を用いて上記タスク-1 同様に E 型肝炎ウイルスの加熱処理による感染価消長を評価する。

以上タスク-1,2 の結果を総合し安全で美味な畜肉調理法を確立する。なお月次計画は以下の通りとする。

<table>
<tr><td>年度</td><td></td><td colspan="5">平成 29 年度</td><td>30 年度以降</td></tr>
<tr><td>月</td><td></td><td>5-6</td><td>7-8</td><td>9-10</td><td>11-12</td><td>1-3</td><td>4 ～</td></tr>
<tr><td rowspan="2">研究項目</td><td>タスク -1 食中毒原因細菌の不活化温度調査</td><td>加熱処理食肉の大腸菌群数測定（培養法）</td><td colspan="3">加熱処理食肉の各種菌数（サルモネラ、糞便性大腸菌、カンピロバクター、クロストリディウム等）測定（Q-PCR 法）</td><td rowspan="2">安全に喫食可能な加熱温度についての精密・正確なガイドライン発信</td><td rowspan="2">・報告書執筆
・得られた知見を総合し畜肉の新規調理技法として一般化を目指す</td></tr>
<tr><td>タスク -2 イノシシ糞便を用いた E 型肝炎ウイルス感染価評価</td><td colspan="2">ジビエ業者を介し E 型肝炎ウイルス汚染イノシシ糞便の入手</td><td colspan="2">E 型肝炎ウイルスの不活化に要する加熱温度調査（Q-PCR 法）</td></tr>
<tr><td>成果報告</td><td></td><td colspan="4"></td><td>・論文執筆・投稿
・学会発表
・所属機関ホームページを介した情報発信</td><td>・新規調理技法として特許出願</td></tr>
</table>

[この研究の特徴]

述のように真空調理法の安全性に関する既往研究はすべて単一の細菌種を標的としており、調理中の微生物生存曲線に関する知見は存在しない。特定の「点」ではなく申請研究のように生存曲線の作図による「縦線」のデータ、病原性微生物「群」を対象にした「横線」のデータ、またこれらを併せ「面」のデータとすることの価値は、得られた知見の応用性、展開性から自明である。申請研究は真空調理法における病原性微生物感染価の唯一の「面」研究として、今後の本調理技術の発展に大いに貢献できるものと考えている。