

200501034A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

食品製造の高度衛生管理に関する研究

平成 17 年度総括研究報告書

主任研究者 品川邦汎

平成 18 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

1. 食品製造における HACCP システム構築に必要なデータの収集・整理と
データ活用のための CD-ROM 化の検討
2. 食品製造の高度衛生管理に関する実験的研究
品川邦汎（岩手大学農学部）

II. 分担研究報告書

II-1. 食肉製造の高度衛生管理に関する研究

- II-1-1. と畜場における高度衛生管理の確立のための病原体汚染実態調査
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-2. とちく処理工程における重要管理点に関する研究
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-3. 牛のとちく処理における白物内臓摘出時における腸切れに関する調査
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-4. 外皮由来枝肉汚染に関する研究
ー特に残毛と枝肉汚染の関係についてー
品川邦汎（岩手大学農学部）
- II-1-5. 参考資料

II-2. 冷凍食品製造の高度衛生管理に関する研究

- II-2-1. 冷凍食品製造の高度衛生管理に関する研究
大場秀夫（(社) 日本冷凍食品協会）
- II-2-2. 冷凍食品の細菌汚染に関する研究
大場秀夫（(社) 日本冷凍食品協会）
- II-2-3. 食品冷凍保存における病原細菌の挙動
宮原美知子（国立医薬品食品衛生研究所）

II-3. ナチュラルチーズ製造の高度衛生管理に関する研究

- II-3-1. ナチュラルチーズ製造の高度衛生管理に関する研究
高谷 幸（(社) 日本乳業協会）

II-3-2. 未殺菌乳を原料とするナチュラルチーズの製造工程におけるリステリアの挙動に関する研究

高谷 幸 ((社) 日本乳業協会)

II-3-3. 冷蔵保存したナチュラルチーズにおける *Listeria monocytogenes* の生残性

高谷 幸 ((社) 日本乳業協会)

厚生労働科学研究費補助金
(食品の安心・安全確保研究事業)

総括研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

食品製造の高度衛生管理に関する研究

1. 食品製造における HACCP システム構築に必要なデータの収集・整理と
データ活用のための CD-ROM 化の検討

近年、各種食品製造施設において、食品の高度衛生管理についてより一層の向上を図るため、危害分析・重要管理点方式 (HACCP) を導入した衛生管理システムの構築が進められている。HACCP 導入にあたっては、対象食品について発生しうる危害を科学的データに基づいて評価し、原料の搬入から製品となる製造の各段階で発生する危害を分析し、その管理手法を確立することが重要である。しかし、各種食品製造施設、特に中小規模の業者にとっては、多様な食品についてこれらのデータを各施設独自で収集し、科学的に分析することは困難である。

このため、近年多種の製品が製造されている 1) 冷凍食品製造過程での微生物汚染・危害について、また多くの食品の原料として用いられる食肉に対して、2) 食肉生産における牛・豚等の解体処理時における微生物危害について、さらに未殺菌生乳を用いて製造するナチュラルチーズにおいて最も危害発生が高いリステリア菌を対象に 3) 生乳中のリステリア菌の危害について、国内外の文献調査を行い、HACCP 構築のために必要な基礎的データを収集、整理し、データベース化を検討した。前年度収集した食肉製造、冷凍食品およびナチュラルチーズ製造における生物学的危害に関する、HACCP に有用な情報を病原微生物ごとに整理し、データベースを構築した。また、このデータベースを CD-ROM 等で簡便に検索できるように、プログラムの開発等を進めた。本データベースは、各食品製造における HACCP 構築に有用であると考えられる。

分担研究者

高谷 幸 (社) 日本乳業協会
大場秀夫 (社) 日本冷凍食品協会
協力研究者
小野裕二 青森県十和田食肉衛生検査所
高田清巳 岩手県食肉衛生検査所
瀬川俊夫 岩手県食肉衛生検査所
千葉 正 岩手県食肉衛生検査所
高橋雅輝 岩手県食肉衛生検査所
井上伸子 群馬県中央食肉衛生検査所
東京都芝浦食肉衛生検査所
西脇 寿 新潟県食肉衛生検査センター
長岡検査所
神田 隆 静岡県東部食肉衛生検査所
三輪憲永 静岡県西部食肉衛生検査所
久本千絵 兵庫県食肉衛生検査センター
井田正巳 鳥取県食肉衛生検査所
佐藤克巳 宮崎県都城食肉衛生検査所
安武康一郎 鹿児島県末吉食肉衛生検査所
大谷勝実 山形県衛生研究所

村田敏夫 山形県衛生研究所
五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所
畑山昭典 よつ葉乳業 (株)
遠藤 悟 雪印乳業 (株)
松崎 勝 森永乳業 (株)
阿部俊朗 明治乳業 (株)
相澤純一 (社) 日本乳業協会
鈴木 徹 東京海洋大学
宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所
前田裕之 (株) 日本水産
森 康益 (株) ニチレイ
伊藤敏行 (株) 味の素冷凍食品
秋田 勝 (株) 明治乳業
吉田重彦 (株) 日清フーズ
佐藤 久 (財) 日本冷凍食品検査協会
芦田勝朗 (財) 日本冷凍食品検査協会
石村和夫 (社) 日本冷凍食品協会
原田 眞 (社) 日本冷凍食品協会

A. 研究目的

近年、各種食品製造施設において、食品の高度衛生管理についてより一層の向上を図るため、危害分析・重要管理点方式（HACCP）を導入した衛生管理システムの構築が進められている。HACCP 導入にあたっては、対象食品について発生しうる危害を科学的データに基づいて評価し、原料の搬入から製品となる製造の各段階で発生する危害を分析し、その管理手法を確立することが重要である。

しかし、各種食品製造施設、特に中小規模の業者にとっては、多様な食品についてこれらのデータを各施設独自で収集し、科学的に分析することは困難である。

このため、近年多種の製品が製造されている 1) 冷凍食品製造過程での微生物汚染・危害について、また多くの食品の原料として用いられる食肉に対して、2) 食肉生産における牛・豚等の解体処理時における微生物危害について国内外の文献調査を行い、HACCP 構築のために必要な基礎的データを収集、整理し、データベース化して広く提供する。さらに、国内でも未殺菌生乳を用いてナチュラルチーズの製造を行おうとする中小規模の業者も出現してきており、これらの業者に対しても 3) 生乳中のリステリア菌の危害発生について、有効な安全確保に関するデータベースを提供する必要がある。

そこで、これらの食品製造における HACCP 導入のため、国内・外のデータを収集・解析し、HACCP 構築に必須なデータを抽出、整理することにより、誰にでも利用できるデータベースの構築を目的として本研究を行った。

B. 研究方法

前年度に引き続き、収集した文献は一定の書

式に従って HACCP 構築に有用な情報を抜き出し、各論文を要約した文献調査票を作成した。

C. 結果および考察

1. 文献の要約と整理

前年度に収集した、食肉、生乳・チーズ、冷凍食品の生物学的危害に関する論文を精読し、HACCP 構築のために有用なデータを抽出・整理した文献調査票を作成した（表 1）。文献調査票には、文献のタイトル、筆頭著者、雑誌名、発行年、巻、ページ等をはじめに示し、文献を容易に選出できるようにした。さらに、文献調査票にまとめられた情報について、各種食品ごとに病原微生物種別、製造工程別等、HACCP 構築に重要と考えられる視点からそれぞれの個表（表 2）の各項目ごとに文献を分類し、個表項目（表 3）にそってまとめ、（表 4）、各個表について解説を加えた（表 5）。さらに、分類・整理したデータベースを CD-ROM 化するため、電子ファイル化と検索プログラムの開発を行った。

D. 結論

食肉、冷凍食品およびナチュラルチーズ製造における HACCP 構築に必要な既報の論文（特に危害性の高い病原微生物についてのデータ）を収集し、活用しやすいデータベースの開発を行った。今後さらに、HACCP に必要なデータを検索し、情報量を増やすと共に、CD-ROM による情報の公開を検討することにより、HACCP 構築に有用なデータベースとすることができると考えられる。

表1 文献の例

文献カード	
文献番号	306
タイトル	The prevalence of <i>Arcobacter</i> spp. on chicken carcasses sold in retail markets in Turkey, and indentification of the isolates using SDS-PAGE
筆頭著者	Atabay, H.I.
論文年	Int. J. Food Microbiol. 81:21-28 (2003)
個表分類	1.3
調査国	トルコ
調査目的	トルコの小売市場や鶏肉屋からの鶏肉における <i>Arcobacter</i> spp.の汚染状況を知ること。
検体名 サンプルサイズ、及び 採集方法	トルコの4小売店から冷蔵、冷凍の様々な部位の鶏肉(丸ごと、下腿、胸肉、手羽先)75検体を採取。(①冷蔵丸鶏40検体②冷蔵下腿2検体③冷蔵手羽先2検体④冷凍丸鶏10検体⑤冷凍下腿10検体⑥冷凍胸肉2検体⑦冷凍手羽先9検体)
調査対象 微生物	<i>Arcobacter</i> spp.
検査方法、 増菌の有無、 培地	AEBで30°C2h増菌した増菌液を血液寒天上に置いたフィルター上に100-120 μ 接種、30°C培養。Mueller-Hinton Agar上で見られたコロニーをmultiplex-PCR、SDS-PAGEで同定。
結果 汚染実態 汚染菌の 性状 防除 対策等	冷蔵サンプルの95%、冷凍サンプルの23%から <i>Arcobacter butzleri</i> を検出。 <i>Arcobacter</i> 属の他種は見られなかった。
PubMed データ(半 角)	Atabay HI, Int. J. Food Microbiol, 81, 21

表2 個票一覧

	(文献数)
1) 原料における微生物汚染	(21)
2) 製造工程における微生物汚染	(9)
3) 製品における微生物汚染	(24)
4) 流通保管時の菌の消長	(9)
5) 調理時における微生物の消長	(9)
6) 冷凍食品の微生物の制御法	(31)
7) 検査方法の比較	(13)
8) 食中毒・苦情	
食中毒	(8)
苦情	(1)
9) 総説	(35)
10) その他	(59)
合計	219

表3 文献分類項目及び個票項目

1) 原料における微生物汚染

文献番号	国名	報告年	調査年	原産国	製造品目	検査対象菌	検査方法	検体数	サンプル量	増菌量	陽性検体数	汚染菌数	型別	備考
------	----	-----	-----	-----	------	-------	------	-----	-------	-----	-------	------	----	----

2) 製造工程における微生物汚染

文献番号	国名	報告年	調査年	調査国	調査対象	検査対象菌	工程	検査方法	検体数	結果	備考
------	----	-----	-----	-----	------	-------	----	------	-----	----	----

3) 製品における微生物汚染

文献番号	国名	報告年	調査年	原産国	製造品目	検査対象菌	検査方法	検体数	サンプル量	増菌量	陽性検体数	汚染菌数	型別	備考
------	----	-----	-----	-----	------	-------	------	-----	-------	-----	-------	------	----	----

4) 流通保管時の菌の消長

文献番号	国名	報告年	調査対象	保管温度	保管期間	包装形態	検査対象菌	検査方法	検体数	結果	備考
------	----	-----	------	------	------	------	-------	------	-----	----	----

5) 調理時における微生物の消長

文献番号	国名	報告年	調査品目	調査対象	調理方法	調理温度	調理時間	検査対象菌	調理前菌数	調理後菌数	検査方法	備考
------	----	-----	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	------	----

6) 冷蔵食品の微生物の制御法

文献番号	国名	報告年	調査国	検査対象菌	制御方法	制御条件	調査品目	検査方法	制御前菌数	制御後菌数	効果	備考
------	----	-----	-----	-------	------	------	------	------	-------	-------	----	----

7) 検査方法の比較

文献番号	国名	報告年	調査対象	検査対象菌	検査方法	検体数	結果	備考
------	----	-----	------	-------	------	-----	----	----

8) 食中毒・苦情
食中毒

文献番号	国名	報告年	発生年月日	対象食品	摂食者	患者数	発生原因	検査法	原因菌	原因菌数	備考
------	----	-----	-------	------	-----	-----	------	-----	-----	------	----

苦情

文献番号	国名	報告年	苦情の種類	発生場所	備考
------	----	-----	-------	------	----

9) 総説

文献番号	国名	報告年	表題等	備考
------	----	-----	-----	----

10) その他

文献番号	国名	報告年	表題等	備考
------	----	-----	-----	----

表4 個票の詳細データ

1) 原料における微生物汚染

文献番号	国名	報告年	調査年	原産国	製造品目	検査対象菌	検査方法	検体数	サンプル量	増菌量	陽性検体数(%)	汚染菌数	型別	備考	
306	トルコ	2003	-	トルコ	冷凍鶏肉	Arcobacter spp.	AEB増菌, Mueller-Hinton Agar, コロニー-multiplex PCR, SDS-PAGE	31	-	-	7(23)	-	-	-	部位別陽性数(文献力-D)
313	アメリカ	2004	2001-2002	26カ国	チルド鶏肉 挽肉、牛肉 ハーガー(凍結、チルド)	O157:H7	SMAC(直接), TSB(mTSB)増菌[免疫磁気ビーズ]CT-SMAC, EMB, PRS-MUG, コロニーをPCR	44 1,533	-	-	42(95) 43(2.8)	-	-	-	部位別陽性数(文献力-D)
307	英国	2003	-	英国	冷凍鶏肉表面	カンピロバクター	mCCDA 42°C, 48h(5%O ₂ , 5%H ₂ , 10%CO ₂ , 80%N ₂)	34	-	-	4(11)	-	-	-	-
2	日本	2001	1998	東南アジア1	冷凍エビ	カンピロバクター 腸炎ビブリオ	mCCDA 42°C, 48h(5%O ₂ , 5%H ₂ , 10%CO ₂ , 80%N ₂)	34 10	-	-	0 3(30.0)	-	-	-	-
						ビブリオ・アルギリシ カス		10	10g	-	4(40.0)	-	-	-	-
						ビブリオ・ブルニフィカ ス		10	10g	-	1(10.0)	-	-	-	-
						ビブリオ・フルビアリス		10	10g	-	3(30.0)	-	-	-	-
				東南アジア2		腸炎ビブリオ		10	10g	-	8(80.0)	-	-	-	-
				東南アジア3		ビブリオ・フルビアリス		10	10g	-	1(10.0)	-	-	-	-
						腸炎ビブリオ		10	10g	-	1(10)	-	-	-	-
						ビブリオ・アルギリシ カス		10	10g	-	6(60.0)	-	-	-	-
						ビブリオ・ブルニフィカ ス		10	10g	-	1(10.0)	-	-	-	-
				東南アジア4		ビブリオ・アルギリシ カス		10	10g	-	1(10.0)	-	-	-	-
				東南アジア5		腸炎ビブリオ		10	10g	-	2(20.0)	-	-	-	-
						ビブリオ・ミミカス		10	10g	-	3(30.0)	-	-	-	-

表5 各個票の概要

1) 原料における微生物汚染（説明文）

冷凍食品の製造に用いられる原材料は①食肉、②魚介類、③その他の食品に大きく分けられるが、それぞれにおける主な微生物の汚染状況を以下に示す。

①食肉の汚染状況

腸管出血性大腸菌 O157 は挽肉、牛肉バーガー（アイルランド；文献 313）の 2.80%（43/1,533）、非凍結包装牛肉バーガー（アイルランド；文献 313）の 4.46%から検出された。

サルモネラは牛肉（日本；文献 64）16.7%（6/36）、豚肉（日本；文献 64）20.5%（8/39）、鶏肉（日本；文献 64）35.5%（38/107）から検出された。一方、英国においては（文献 383）、生鶏肉の 8.0%（44/553）、冷凍鶏肉の 9.7%（18/186）から検出された。

カンピロバクターは生鶏肉（英国；文献 383）の 70.2%（388/553）、冷凍鶏肉（英国；文献 383）の 72.6%（135/186）から検出された。

リステリア（*L. monocytogenes*）は輸入冷凍鶏肉（UAE；文献 341）の 11.2～46.2%から、また、冷凍馬肉（ブラジル；文献 323）の 7.4%（9/121）から検出された。

アルコバクターは冷凍鶏肉（トルコ；文献 306）の 23%（7/31）、チルド鶏肉（トルコ；文献 306）の 95%（42/44）から検出された。

②魚介類の汚染状況

輸入魚介類（日本；文献 64）の腸炎ビブリオ汚染率は 0～23.1%、輸入冷凍エビ（日本；文献 92）10.0%（2/10）、また、冷凍エビ（日本；文献 64）からは大腸菌 0～36.4%、黄色ブドウ球菌 0～18.2%がそれぞれ検出された。

輸入冷凍魚介類（日本；文献 89）のコレラ菌（non-O1）汚染率は 37.4～38.5%、このうちコレラトキシン産生株も 0.07%（2/2,803）で検出された。

その他、生エビ（インド；文献 387）からは、大腸菌群 10.0～19.1%、大腸菌 1.3～3.5%、黄色ブドウ球菌 0.6～5.0%、サルモネラ 0.1%、一方、冷凍エビ（インド；文献 387）からは大腸菌群 25.8%（76/295）、大腸菌 4.8%（14/295）、黄色ブドウ球菌 0.7%（2/295）が、加熱済み冷凍エビ（インド；文献 387）からは大腸菌群 3.8%（35/928）がそれぞれ検出された。

③その他の食品としては、輸入チーズ（UAE；文献 341）の 1.0%（2/196）からリステリア（*L. monocytogenes*）が検出された。

なお、原材料の微生物汚染状況は、原産国や調査年（時期）、あるいは冷凍・冷蔵等、食品の保存（流通）状態により異なることを念頭に、使用目的に応じて本データを参考にされたい。

厚生労働科学研究費補助金

(食品の安心・安全確保研究事業)

総括研究報告書

主任研究者 品川邦汎 岩手大学

食品製造の高度衛生管理に関する研究

2. 食品製造の高度衛生管理に関する実験的研究

近年、各種食品製造施設において、食品の高度衛生管理についてより一層の向上を図るため、危害分析・重要管理点方式 (HACCP) を導入した衛生管理システムの構築が進められている。HACCP 導入にあたっては、対象食品について発生しうる危害を科学的データに基づいて評価し、原料の搬入から製品となる製造の各段階で発生する危害を分析し、その管理手法を確立することが重要である。

本研究では、食肉、ナチュラルチーズ、および冷凍食品を原因とする食品媒介細菌感染症を防止するために、各食品と密接に関連する病原細菌の汚染実態調査並びに危害分析を行った。

全国 6 カ所 (岩手、群馬、新潟、静岡、宮崎、鹿児島) のと畜場に搬入された牛 506 頭について直腸内容物、口腔内唾液、一部剥皮後切皮部ふき取り (肛門周囲)、外皮ふき取り (肛門周囲) および枝肉ふき取り (胸部及+肛門周囲) を材料として腸管出血性大腸菌 (EHEC) 026、0157 (以下 026、0157 と略す) の分離を試みた結果、直腸便では 506 検体中 60 検体 (10.7%)、口腔内唾液では 329 検体中 2 検体 (0.6%)、枝肉では 338 検体中 4 検体 (1.2%)、外皮の拭き取りでは 228 検体中 15 検体 (6.6%)、一部剥皮後の拭き取りでは 243 検体中 11 検体 (4.5%) が陽性であった。さらに、同一個体の直腸内容物、一部剥皮後切皮部および外皮由来の 0157 は PFGE パターンが同じであったことから、一部剥皮工程が汚染要因であることが示唆された。と畜場における高度衛生管理のためには生産段階からと畜場搬入、解体処理にわたる全ての過程で EHEC 特に 0157 のコントロールが重要である。

冷凍食品製造については、前年度同様に加工基準のある生食用魚介類に注目し、夏場の製造工程についてイカ類のさしみ製造工程およびほたて貝柱の製造工程における危害を分析した。生食用冷凍鮮魚介類製造工程の各工程において汚染指標細菌である細菌数、大腸菌群、*E. coli* および腸炎ビブリオ等の挙動を検討した。国内原料および輸入原料は比較的汚染菌数は低く、製造工程中のベルトコンベヤー及びカッター工程等で菌数が高くなる傾向がみられたが、許容範囲内であった。また、冷凍食品のなかで、食中毒発生の原因となる病原細菌はいかなる挙動を示すのかについて検討を行った。病原細菌は腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸炎ビブリオ、カンピロバクター、サルモネラ、リステリアと赤痢菌についての食品中での挙動を観察した。食品中での冷凍保存試験において、2-3 ヶ月保存によって菌数の低下が見られない病原細菌は EHEC、カンピロバクター、サルモネラ、リステリアであった。腸炎ビブリオと赤痢菌は徐々に菌数が低下していくが、6 ヶ月後にも一部数%は残存していた。汚染した病原細菌は冷凍された食品中でも長く残存することから、受け入れ時の検査又はその検査法が重要である。

さらに、ナチュラルチーズ製造においては、未殺菌生乳を原料としてナチュラルチーズを実際に製造し、その主な製造工程におけるリステリアの増殖を確認するためにスパイクテストを実施し、未殺菌乳を原料とするナチュラルチーズの製造工程におけるリステリアの消長は 3 種類のパターンに分類される事が分かった。上記実験結果を基に、現在製造しているナチュラルチーズの製造フローダイアグラムをベースに HACCP システムの基礎となる総括管理表を作成した。

分担研究者

高谷 幸 (社) 日本乳業協会
大場秀夫 (社) 日本冷凍食品協会
協力研究者
高田清巳 岩手県食肉衛生検査所
瀬川俊夫 岩手県食肉衛生検査所
千葉 正 岩手県食肉衛生検査所
高橋雅輝 岩手県食肉衛生検査所
井上伸子 群馬県中央食肉衛生検査所
西脇 寿 新潟県食肉衛生検査センター
長岡検査所
神田 隆 静岡県東部食肉衛生検査所
三輪憲永 静岡県西部食肉衛生検査所
久本千絵 兵庫県食肉衛生検査センター
井田正巳 鳥取県食肉衛生検査所
佐藤克巳 宮崎県都城食肉衛生検査所
安武康一郎 鹿児島県末吉食肉衛生検査所
大谷勝実 山形県衛生研究所
村田敏夫 山形県衛生研究所
五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所
畑山昭典 よつ葉乳業(株)
柴田貴弘 雪印乳業(株)
松崎 勝 森永乳業(株)
阿部俊朗 明治乳業(株)
相澤純一 (社) 日本乳業協会
五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所
岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所
田村 豊 酪農学園大学
上野弘志 酪農学園大学
男澤聖子 酪農学園大学
藤平ひとみ 酪農学園大学
上前知子 酪農学園大学
大塚佳代子 埼玉県衛生研究所
鈴木 徹 東京海洋大学
宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所
小野一晃 埼玉県衛生研究所
前田裕之 日本水産株式会社
進藤博且 株式会社ニチレイフーズ
山崎健次 味の素冷凍食品株式会社
畠山信行 マルハ株式会社
真木昌之 株式会社ニチロ
佐藤 久 (財) 日本冷凍食品検査協会
芦田勝朗 (財) 日本冷凍食品検査協会
石村和男 (社) 日本冷凍食品協会
原田 眞 (社) 日本冷凍食品協会

A. 研究目的

近年、各種食品製造施設において、食品の高

度衛生管理についてより一層の向上を図るため、危害分析・重要管理点方式(HACCP)を導入した衛生管理システムの構築が進められている。HACCP導入にあたっては、対象食品について発生しうる危害を科学的データに基づいて評価し、原料の搬入から製品となる製造の各段階で発生する危害を分析し、その管理手法を確立することが重要である。

本研究では、1)食肉生産における牛・豚等の解体処理時における微生物危害、2)未殺菌生乳を原料とするナチュラルチーズ製造、および3)冷凍食品製造過程での微生物汚染・危害について、HACCP構築のためのデータベース化を目的とし、国内外の文献調査による基礎的データの収集と整理を行った。さらに、これらの食品について、安全で衛生的な製造方法を構築するため、各食品の製造において最も危害発生の高い微生物を対象に、汚染実態調査並びに危害分析を行った。

B. 研究方法

B-1. 食肉製造の高度衛生管理に関する研究

1)平成17年4月～18年3月に各と畜場に搬入された牛506頭の糞便(0157;506検体、026;481検体)、口腔内唾液(0157,026共に329検体)、枝肉ふき取り(0157;338検体、026;298検体、胸部+肛門周囲)、外皮ふき取り(0157,026共に228検体、肛門周囲)、および一部剥皮後切皮部ふき取り(0157;243検体、026;213検体、肛門周囲)を検査材料とした。材料(糞便、唾液は各1g、スポンジは1個)をnovobiocin添加mEC(NmEC)に接種し42℃で18～24時間培養後、026および0157免疫磁気ビーズ(DYNAL)で集菌処理して各分離培地を用い36℃で18～24時間分離培養を行った。さらに、026の5株、0157の76株

について血清型別、薬剤感受性試験（ABPC、SM、TC、CPF、KM、CTX、CP、ST、NFLX、GM、NA、FOM）およびPFGE（制限酵素：Xba I）を実施した。さらに、全国9カ所のと畜場を対象として処理工程における重要管理点評価を行なった。さらに、と畜処理における食肉への病原体汚染を制御するための基礎的データを収集するために、と畜処理時における腸切れの頻度と原因についての調査および体毛の枝肉への残存と細菌汚染の関連についての調査を行った。

B-2. 冷凍食品製造の高度衛生管理に関する研究

食品衛生法の規格基準で加工基準が示されている生食用冷凍鮮魚介類の「いかさしみ」を対象とした。生食用冷凍鮮魚介類においては、細菌数、大腸菌群に加えて、腸炎ビブリオ最確数が100/g以下（アルカリペプトン水、TCBS寒天培地法）に規格基準が定められており、冷凍保存状態においては、腸炎ビブリオの生残推移は重要な問題と考えられる。さらに本年度は「ほたて貝柱」についても各製造工程における微生物汚染の定量的分析を実施し、その製造工程における微生物危害の把握を行った。

さらに、調理品「コロッケ」が冷凍食品全体の10%にあたり、数多く出荷されているが、各工場の製造工程が明らかにされていなかったことから、今回はA工場及びB工場の協力を得て、最終製品の細菌検査成績並びにコロッケの「バター」の使用中の経時変化と凍結前コロッケについて細菌検査を実施した。また、冷凍食品中での食中毒起因細菌の動態についても解析した。

B-3. ナチュラルチーズ製造の高度衛生管理に関する研究

わが国においてナチュラルチーズを製造して

いる主な企業（4社）の研究所において未殺菌の生乳を使用してナチュラルチーズを製造し、その主な製造工程におけるリステリアの増殖を確認するためのスパイクテストを実施した。

また、リステリアを添加した生乳から製造分離したホエーとカードへの本菌の分布状況を調査した。さらに、製造工場内等における製品へのリステリアの二次汚染等を考慮して市販チーズへのスパイクテストを実施した。

上記実験結果を基に未殺菌乳からナチュラルチーズ製造のための衛生管理を検討するため、現在製造しているナチュラルチーズの製造フローダイアグラムをベースにHACCPシステムの基礎となる総括管理表を作成した。

加えて昨年実施した主なナチュラルチーズの製造工場で使用している生乳のリステリアの汚染状況調査の結果、数件のリステリア汚染生乳が確認されたことから本年度も汚染の確認された生乳の集乳ルートについて再度汚染の状況を調査した。

C. 結果および考察

C-1. 食肉製造の高度衛生管理に関する研究

1) EHEC (026、0157) 分離成績

直腸便では、0157は506検体、026は481検体について検査を行った。分離成績を表1に示す。0157の60検体（10.7%）、026の3検体（0.3%）がそれぞれ陽性であった。口腔内唾液では、0157および026共に329検体を検査し、0157は2検体（0.6%）、026は1検体（0.3%）が陽性であった。枝肉では、0157は338検体、026は298検体について検査を行い、0157では4検体（1.2%）が陽性であった。026は検出されなかった。外皮の拭き取りでは、0157、026共に228検体を検査し、0157では15検体（6.6%）、026では1検体（0.4%）が陽性であった。さらに、

一部剥皮後の拭き取りでは、0157では243検体、026では213検体を検査し、0157は11検体(4.5%)が陽性であった。026は検出されなかった。

分離された0157 76株についてH抗原型別を行った結果、73株が0157:H7であり、3株が0157:H-であった。026 5株は、2株が026:H11、3株が026:H-と型別された。これらの菌株の病原因子保有状況を調査したところ、0157:H7の73株は全てstx遺伝子とeaeA遺伝子を保有していた。stx遺伝子の内訳は、stx1のみ保有するものが5株、stx2のみを保有するものが42株、stx1とstx2両者を保有するものが26株であった。0157:H-の3株も、全てstx遺伝子とeaeA遺伝子を保有していた。stx1のみ保有するものが2株、stx1とstx2両者を保有するものが1株で、stx2のみを保有するものは認められなかった。026:H11、026H-は、全てstx1とeaeA遺伝子を保有していた(表2)。

薬剤(ABPC, SM, TC, CPF, KM, CTX, CP, ST, NFLX, GM, NA, FOM)感受性試験では、0157の76株中、いずれの抗生物質にも感受性を示す株が51株(67%)で、1剤耐性が3株(4%)認められ、これらはいずれもSM耐性であった。また、2剤耐性が22株(29%)認められ、内訳はSM, TC耐性が20株(26%)、ABPC, SM耐性が2株(3%)であった(表3)。026の5株では、2株が全ての抗生物質に感受性を示したが、2株が3剤耐性(ABPC, SM, KM耐性およびSM, TC, CP耐性)、1株が4剤耐性(ABPC, SM, TC, ST耐性)であった(表4)。今回の調査では、検査した牛直腸内容物の0.3%から026が分離され、10.7%から0157が分離されたことから畜場搬入牛は腸管出血性大腸菌の重要な汚染要因であることが再確認された。

また、全国9個所のと畜場において、処理工

程ごとに衛生確保に係る重要度の評価を行ったところ、内臓(赤物、白物)摘出、食道結紮、肛門結紮、枝肉洗浄、枝肉冷却の各工程が枝肉の衛生確保を図る上で極めて重要であると評価された。さらに一部剥皮、全剥皮、スチームバキュームおよびトリミングの各工程についても重要であるとの認識が示された。

また、8カ所のと畜場で腸切れの発生状況を調査したところ、818頭中291頭(35.6%)に「腸切れ」が認められた。腸切れの発現率を引き上げる要因として、稼働設定を上回るとちく処理の速さ、吊り上げられたと体から内臓受け台までの間隔の大きさが考えられた。腸切れは特に十二指腸で高率に認められ、その多くは胃と腸の構造的特徴により発現したものと推察された。十二指腸以外の部位で認められた腸切れは、摘出作業の失宜など人為的な要因によるものであった。腸切れをおこした291頭中106頭(36.4%)のと体に腸内容物による汚染が認められた。腸切れの防止は衛生的なと畜処理を行う上で極めて重要である。さらに、枝肉汚染の一要因と考えられている残毛と枝肉汚染の関係を調査が、大腸菌数及び大腸菌群数は相関がなかったため、枝肉の残毛数は枝肉の細菌汚染の指標には適さないと考えられ、獣毛付着による細菌汚染の影響を上回る汚染要因の存在が示唆された。しかしながら、獣毛自体には多数の細菌が付着しており、枝肉の細菌汚染の要因の一つであると考えられる。大腿部における一部剥皮工程中の獣毛付着発生要因は、切皮時及びデハイダー作業時であり、デハイダー作業時に多くの残毛が発生していた左大腿部では、処理方法を改善することにより、残毛数を減少できると推察された。

C-2. 冷凍食品製造の高度衛生管理に関する研

究

昨年度から継続して「生食用いか刺身」について調査した結果、「生食用むきもんごういか」の細菌数は各工程を通じて $10^1\sim 10^3$ CFU/gの範囲であり、「冷凍するめいか刺身」については各工程を通じて $10^1\sim 10^3$ CFU/gの範囲であった。

さらに本年度は「生食用ほたて貝柱」についても調査をおこなった。「生食用ほたて貝柱」は、17年8月9日及び9月27日に生食用ほたて貝柱の工程である 1) 脱殻・内臓除去、2) 1次洗浄、3) 2次洗浄、4) 整列、5) 選別、に沿って各4検体をサンプリングした。その結果、工程が進むに従って細菌数が増加し、特に整列工程に細菌数の増加が見られた(図1)。本結果から、使用器具の洗浄の頻度管理を見直す必要がある。

また、冷凍食品の中でわが国において生産量が多いポテトコロケについて調査を行った。A工場及びB工場において平成17年4月～平成18年1月に製造された製品の細菌検査の成績を表5に示す。細菌数では9月に 10^5 の細菌汚染が見られた以外は 10^4 以下であり、大腸菌、サルモネラ及びブドウ球菌とも陰性であった。

さらに、牛挽肉、鶏挽肉へ病原菌を接種し、経時的に生菌数を調べることにより病原菌の生残性について検討した。牛挽肉には、そのものの一般生菌数が 2.9×10^4 cfu/gであったが、2ヶ月間の冷凍保存中この一般生菌数も接種したEHEC 5.6×10^5 cfu/g 菌数も変動がなかった。また、鶏挽肉は一般生菌数が 1.5×10^4 cfu/gであったが、接種カンピロバクターの菌数 2.7×10^4 cfu/gのどちらも2ヶ月間の冷凍保存中変動がほとんどなかった。サルモネラとリステリアを接種した鶏挽肉の一般生菌数は 8.0×10^3 cfu/gであったが、カンピロバクター接種前例と同様で、一般生菌数に変動はなかった。また、サルモネラとリステリア自体の接種菌数も変動がなかった。

食品中での冷凍保存試験において、2-3ヶ月保存によって菌数の低下が見られない病原細菌はEHEC、カンピロバクター、サルモネラ、リステリアであった。腸炎ビブリオと赤痢菌は徐々に菌数が低下していくが、6ヶ月後にも一部数%は残存していた。

C-3. ナチュラルチーズ製造の高度衛生管理に関する研究

1) ゴーダチーズへのリステリア接種後の消長

ゴーダチーズのカード形成後、 37°C 約180分の培養が行われるが、90分までリステリアの増殖がみられた(図2)。その後pHの低下とともにリステリアの減少がみられたが、検出限界以下までの減少はみられなかった。また、塩漬の培養条件は 10°C 1～3日であり、pHの低下とともにリステリアの減少は認められたが5日目になっても検出限界以下にはならなかった(図3)。最終工程である熟成工程は 10°C 30日であるが、5日目にpH、リステリア共に最低値を示したものの、その後pHは微増し、それに伴いリステリアの増加がみられ、15日目以降は培養開始時すなわち発酵開始時と同程度のリステリアの増殖が認められた(図4)。

(2) カマンベールへのリステリア接種後の消長

カード切断、ホエー分離後の型詰後、 30°C 、8～16時間培養される。1社の検体では培養後4時間まで、培養開始時に比べリステリアは約3倍に増加したが、8時間後には減少に転じpHの減少に伴い培養開始時と同程度となった(図5)。一方、もう一社の検体では培養開始時、pH 6.4であったのが18時間後にはpH 5.4まで低下した。これに伴ってリステリアも培養開始時より減少した(図6)。また、熟成時の培養条件は 10°C 、20日である。1社の検体では3日目まで増加を示したが、7日目以降減少に転じ17日目以降は

接種菌量より減少を示した。しかしながら40日目においても検出限界以下にはならなかった。一方、もう1社の検体では、培養1日目からpHの低下に伴ってリステリアの減少を示した。

3) 市販チーズ保存期間中におけるリステリアの消長

使用したクリームチーズの賞味期限は100日であった。リステリアの接種後10℃で保存しその増加傾向を調査した。これまでの結果では5日目までpHの減少と共に接種菌数の微減がみられたが、10日目で接種菌数の3倍程度まで菌数の増加を示し、30日目では再度菌数は減少に転じたものの、接種時の2倍程度を維持していた。この調査は180日までの保存して調査をすることとしている。市販のブルーチーズ、白カビタイプ、ウォッシュタイプ、アッペンツェラー、ファーマーなど5種のチーズ中での挙動では、30日間の観察で、4℃、10℃の保存とも白カビタイプを除いて、菌数の変化はほとんどなかった。白カビタイプでは、菌の増殖が認められた。

市販チーズの熟成・乾燥型チーズのグリュエール、レッドチェダーでは、観察期間中菌数が徐々に減少した。ソフトチーズのカマンベール（白カビタイプ）とモッツアレラでは、菌数の増加が観察された。カマンベールでは、4℃、10℃のいずれも急速に菌数を増やし、数日間で 10^7 ~ 10^8 程度の高い菌数に達し、その菌数を維持した。一方、モッツアレラでは、保存7日目までは、変化がなかったが、その後ゆっくりと増殖が認められた。このチーズでは菌株間の増殖の違いも観察された。

4) 原料中のリステリアのホエーとカードへの分布について

原料にリステリアを接種し、レンネットを添加、ホエーとカードに分離した後それぞれのリステ

リアについて検査をした。ホエー中のリステリアを1とすればカード中には2.2のリステリアの存在が確認された。

5) 生乳中のリステリアの再調査について

平成16年度に調査した生乳の集乳ルートの内リステリアの存在の可能性のある39ルートについて再度調査を行った結果今回3ルートからリステリアの存在が確認された。

6) HACCP作成の総括管理表について

現在製造しているナチュラルチーズの製造フローダイアグラムに基づきゴーダチーズ、カマンベールチーズ、クリームチーズ及びモッツアレラチーズの総括管理表を作成した（図7）。

未殺菌乳を原料として製造したナチュラルチーズ等へのリステリアスパイクテストについては今回の研究結果から、未殺菌乳を原料とするナチュラルチーズの製造工程におけるリステリアの消長は3種類のパターンに分類されることがわかった。その第一のパターンは一旦菌数が増殖を示した後、低下していく傾向を示すもので、カード形成後のゴーダチーズ、カマンベールチーズの型詰後及び一社の熟成時であった。第二のパターンは経時的に菌数の低下していくもので、ゴーダチーズの塩漬時と他社のカマンベール熟成時であった。第三のパターンは一旦菌数の低下を示してから増加に転ずるもので、ゴーダチーズの熟成時がこれに相当した。市販のクリームチーズ製品については第三のパターンを示した。

また、スターターとして用いられる乳酸菌や、熟成に使用される白カビの作用によってチーズ中間製品のpHの低下によりある程度のリステリア増殖抑制がおこることが示された。さらに、一旦増加した菌数がpHの変動を伴わずに低下する傾向も示されたことから、pH以外の増殖抑制要因も存在すると思われる。一社を除く大半の検体についてはリステリアが検出限界以下の菌数を

示すことはなく、ナチュラルチーズの原料生乳にリステリアが存在していた場合、複数の製造工程を経て製造された最終製品に本菌が残存する可能性は高いと思われた。

原料中のリステリアのホエーとカードへの分布については、ホエー中に比べ2倍強ほど多くのリステリアがカードに移行していることが確認された。また、昨年度に調査した生乳の集乳ルート別リステリアの調査結果から、リステリアの存在の可能性の高いルートについて再度調査を実施した。その結果リステリアが検出されたことから、生乳中にリステリアの存在があるものとするのが妥当であるとおもわれる。

D. 結論

近年、各種食品製造施設においてHACCP方式を基本とする衛生管理システムの構築が進められている。その場合、対象食品における微生物危害(食中毒菌)分析評価を行い、さらに製造工程での危害発生コントロール法を確立することが重要である。本研究は食肉、冷凍食品、およびナチュラルチーズについて安全な食品製造方法の構築を目指している。

本年度は上記の対象食品において危害性が最も高い微生物(食中毒菌)について、製造段階での汚染実態調査(定量的危害評価)を行うと共に、その生残性・増殖性等についても実験的に検討を加えた。これらのデータは食品製造における食中毒菌の危害評価を行う上で科学的根拠を与えるものであり、食品製造の高度衛生管理を実現する上で極めて有用であると考えられる。

E. 成果発表

1. 品川邦汎, 重茂克彦(2005) 牛の腸管出血性大腸菌 0157 および 026 保菌実態と子牛の保菌動態. シンポジウム-0157 感染症の現況と将来- 第

9 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム 抄録集 : 16.

2. 大谷勝実, 池田辰也, 瀬川俊夫, 高橋雅輝, 浅見成志, 佐藤 博, 神田 隆, 井田正巳, 佐藤克巳, 中本成彦, 重茂克彦, 品川邦汎(2005) ウシから分離された腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の細菌学および分子遺伝学的性状. 第 9 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム 抄録集 : 35.

3. 高橋雅輝, 瀬川俊夫, 浅見成志, 佐藤 博, 神田 隆, 井田正巳, 佐藤克巳, 中本成彦, 重茂克彦, 品川邦汎(2005) と畜場に搬入されたウシにおける腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の保有状況. 第 9 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム 抄録集 : 36.

4. 大谷勝実, 池田辰也, 瀬川俊夫, 高橋雅輝, 浅見成志, 佐藤 博, 神田 隆, 井田正巳, 佐藤克巳, 中本成彦, 重茂克彦, 品川邦汎(2005) と畜場に搬入されたウシにおける腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の保有状況. 第 59 回日本細菌学会東北支部総会 講演要旨集 : 16.

5. 瀬川俊夫, 高田清己, 浅見成志, 佐藤 博, 神田 隆, 井田正巳, 佐藤克巳, 中本成彦, 重茂克彦, 品川邦汎(2005) と畜場への搬入牛および枝肉の腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の汚染(全国的調査). 第 90 回日本食品衛生学会学術講演会 講演要旨集 : 69.

6. 村田敏夫, 大谷勝実, 瀬川俊夫, 高田清己, 高橋雅輝, 浅見成志, 佐藤 博, 神田 隆, 井田正巳, 佐藤克巳, 中本成彦, 重茂克彦, 品川邦汎(2005) ウシ由来腸管出血性大腸菌 0157 および 026 の各種性状. 第 90 回日本食品衛生学会学術講演会 講演要旨集 : 70.

7. 生食用冷凍鮮魚介類(イカ刺身)の製造工程における細菌汚染:大場秀夫、石村和男、原田 眞、佐藤 久、芦田勝朗、品川那汎 : 平成 17 年 10

月日本衛生学会第90回学術講演会

8. Frozen Pathogenic Bacteria in Food:

Michiko Miyahara, Kunihiro Shinagawa

119th AOAC Annual Meeting & Exposition,

September 11-15, 2005

9. 食品接種腸炎ビブリオ冷凍保存での動態：宮

原美知子、品川邦汎

第26回日本食品微生物学会学術総会

平成17年11月

10. 冷凍食品保存中接種食中毒起因細菌の挙

動：日本薬学会第126年会

平成18年3月

検査機関別STEC検出結果

表 1 腸管出血性大腸菌 O157およびO26の分離状況

検査頭数	直腸便・陽性数		口腔内・陽性数		枝肉・陽性数		外皮・陽性数		一部剥皮・陽性数	
	O157	O26	O157	O26	O157	O26	O157	O26	O157	O26
506	54	3	2	1	4	0	15	1	11	0
各材料ごとの検体数	506	481	329	329	338	298	228	228	243	213