

200636014B

厚生労働科学研究費補助金

食の安心・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16－18年度総合研究報告書

主任研究者 品川邦汎

平成19年4月

# 目 次

I. 研究報告書	頁
1. 食肉処理の高度衛生管理に関する研究	1
品川邦汎 (岩手大学農学部)	
2. 冷凍食品製造の高度衛生管理に関する研究	15
大場秀夫 ((社) 日本冷凍食品協会)	
3. ナチュラルチーズ製造の高度衛生管理に関する研究	32
高谷 幸 ((社) 日本乳業協会)	
森田邦雄 ((社) 日本乳業協会)	
4. 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 の作成	44
品川邦汎 (岩手大学農学部)	

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）

分担研究報告書（平成16～18年まとめ）

食肉製造の高度衛生管理に関する研究

分担研究者 品川邦汎 岩手大学

と畜場における高度衛生管理（HACCP）確立し、食肉を原因とする食品媒介細菌感染症を防止するために、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を行った。牛が保有する重要な危害である026、0157を対象に、と畜場搬入牛の保菌状況を調査した。2）工程が多くしかも複雑な作業が続くと畜処理工程において、どの処理工程が最も微生物学的危害を受けやすいかを把握するために食肉衛生検査所の立場から処理工程ごとの微生物学的な重要度を肉眼的に評価した。また、腸内容物がと体を汚染する可能性の最も高い工程である白物内臓摘出における腸切れの枝肉に及ぼす汚染の影響について3）牛のとちく処理における白物内臓摘出時の腸切れに関する調査を行った。また、4）高度衛生管理に向けての衛生基礎調査として、工程・規模等の異なる複数処理施設を対象として、微生物制御に効果が期待される工程を選定した。さらに、5）と畜場（牛処理施設）の衛生管理に関する研究として、全国8箇所のと畜場における牛の解体・処理工程ごとの微生物汚染およびその制御等に関する実態調査を実施し、一般的な牛処理施設を想定したHACCPモデルとなる衛生管理総括表の作成および衛生管理に係る重要管理点（CCP）設定を行った。

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  
山目行人 岩手県食肉衛生検査所  
瀬川俊夫 岩手県食肉衛生検査所  
佐藤 敦 岩手県食肉衛生検査所  
高橋雅輝 岩手県食肉衛生検査所  
浅見成志 群馬県中央食肉衛生検査所  
井上伸子 群馬県中央食肉衛生検査所  
間瀬 徹 群馬県中央食肉衛生検査所  
佐藤 博 新潟県食肉衛生検査センター  
長岡検査所

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  
中本成彦 大阪市食肉衛生検査所  
柴折浩幸 兵庫県食肉衛生検査センター  
稲田一郎 兵庫県食肉衛生検査センター  
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

池田辰也	山形県衛生研究所
村田敏夫	山形県衛生研究所
金子紀子	山形県衛生研究所
重茂克彦	岩手大学農学部

#### A. 研究目的

近年、各種食品製造施設において、食品の安全確保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、と畜場における高度衛生管理 (HACCP) 確立し、食肉を原因とする食品媒介細菌感染症を防止するために、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を行った。牛が保有する重要な危害である 026、0157 を対象に、と畜場搬入牛の保菌状況を調査した。次いで、2) と畜処理工程における高度衛生管理 (HACCP システム) を確立する。そのために(1)腸内容物がと畜体を汚染する可能性の最も高い工程を肉眼的に評価した。(2)牛のとちく処理における内臓摘出時の腸切れに関する調査を行った。(3)高度衛生管理に向けて微生物制御に効果が期待される工程を選定した。さらに、(4)と畜場 (牛処理施設) の衛生管理に関して、HACCP モデルとなる衛生管理総括表の作成および衛生管理に係る重要管理点 (CCP) を設定した。

#### B. 材料及び方法

##### 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

平成 16 年 9 月～18 年 3 月に各と畜場に搬入された牛 1015 頭の糞便 (0157; 1007 検体、026;982 検体)、口腔内唾液 (0157, 026 共に 810 検体)、枝肉ふき取り (0157; 576 検体、026;536 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。

検体採取は、内臓摘出を行った後、直腸便を採取した。唾液はと殺後、滅菌綿棒で口腔内をぬぐって唾液を採取した。外皮および一部剥皮後切皮部は、ふき取り検査用滅菌スポンジで、肛門周囲部 10×10cm<sup>2</sup> をふき取った。

各材料を novobiocin 添加 mEC (NmEC) で 42°C、18～24 時間培養後、026 および 0157 免疫磁気ビーズで集菌処理し、各分離培地を用い 37°C で 18～24 時間分離培養を行った。026 の分離培地は Cefixime-Tellurite 添加 Rhamnose MacConkey (CT-RMAC)、0157 は CT 添加 Sorbitol MacConkey (CT-SMAC) およびクロモアガー 0157 (CHROM agar) を用いた。各集落を TSI、LIM、および CLIG で生化学性状を確認後、026、0157 診断用免疫血清 (デンカ生研) によるスライド凝集反応で確認した。次いで、市販の RPLA 法による毒素検出キット (デンカ生研) を用いてベロ毒素 (VT) 産生性試験を行った。分離した 026、0157 について O、H 血清型別、薬剤感受性試験 (ABPC、

SM、TC、CPFX、KM、CTX、CP、ST、NFLX、GM、NA、FOM) および PFGE (制限酵素: Xba I) を実施した。

## 2. と畜処理工程における重要管理点に関する研究

各県の食肉衛生検査所が所管すると畜場の牛処理施設 9 施設を対象として、平成 17 年 11 月～平成 18 年 1 月にかけて調査を行った。

1) とちく処理における食肉(枝肉)への微生物学的な危害防止の観点から、牛の処理工程に沿って「各工程の重要度」、「その工程における管理すべき項目とその重要度」について評価した。

2) 牛のとちく処理における白物内臓摘出時の腸切れに関する調査を行った。

平成 18 年 1 月～2 月にかけて、全国 8 個所のと畜場で処理された牛 818 頭を対象に調査を行った。調査内容は以下の通りである。

① 施設の処理能力別、白物内臓摘出時のと体の状況別、および牛種別による腸切れ発現状況調査を行った。

② 腸切れが認められたものについて、腸切れの部位および腸切れを起した原因について調査した。

③ 腸切れにより漏出した腸内容物のと体への汚染状況を肉眼的に調査した。

④ 腸切れ調査と平行し、肛門結紮および食道結紮の実施状況について調査した。

3. 牛の処理工程(内臓摘出)別汚染状況について調査した。

白物内臓摘出時の腸切れによる枝肉汚染状

況調査として、あらかじめ設定した条件に従い、一般生菌数及び大腸菌数により枝肉の汚染状況を比較した。ふき取りは最も汚染頻度の高い胸骨断面部とし、腸切れを認めない個体、腸切れを認めるが胸骨断面の汚染を認めない個体、腸切れを認め且つ胸骨断面の汚染を認める個体について実施した。

## ②処理工程における微生物制御に関する調査

処理工程、施設規模、処理頭数等の条件の異なる複数の施設について、微生物制御に効果が期待される工程(スチームバキューム工程、枝肉洗浄工程、枝肉冷却工程、トリミング工程)を選び、作業前後のふき取り検査によりその効果の検証を行った。

## 4. と畜処理における微生物汚染に関する重要度の評価

汚染に係る重要な処理工程の確認方法とその汚染防止指導について、さらに汚染を除去する工程の評価についても調査した。

5. 牛処理施設における衛生管理として衛生管理総括表の作成を行い、各と畜処理工程における CCP を設定した。さらに、と体(枝肉)が最も汚染を受けやすい工程の標準的衛生作業手順書の作成を行った。

「と畜処理における微生物汚染等に関する実態調査」において、処理工程の中で特にと体(枝肉)への微生物汚染の要因として重要と評価された食道結紮、肛門結紮、白物内臓(胃腸等)摘出、乳房除去および剥皮前処理の 5 工程について、それぞれの標準的衛生作業手順書(SSOP)を検討した。

## C. 結果および考察

### 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

#### 1) EHEC (O26、O157) 分離成績

直腸便では、O157 は 1007 検体、O26 は 982 検体について検査を行った。分離成績を表 1 に示す。O157 の 114 検体 (11.3%)、O26 の 10 検体 (1.1%) がそれぞれ陽性であった。口腔内唾液 810 検体中検査し、O157 は 13 検体 (1.6%)、O26 は 3 検体 (0.4%) が陽性であった。枝肉では、O157 については 576 検体、O26 では 536 検体を検査し、O157 は 15 検体 (2.6%) が陽性、O26 では 1 検体 (0.2%) が陽性であった。外皮の拭き取りでは、O157 では 15 検体 (6.6%)、O26 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、O157 は 11 検体 (4.5%) が陽性で O26 は検出されなかった。

#### 2) 分離された菌株の性状

分離された O157 168 株の H 抗原型は、O157:H7 が 159 株、O157:H- が 6 株、O157:H12 が 3 株であった。また、O26 27 株は、O26:H11 が 9 株、O26:H- が 16 株、O26:H40 が 2 株であった。さらに、これらの菌株の病原因子保有状況については、O157:H7 および O157:H- の 165 株は、全て stx 遺伝子と eaeA 遺伝子を保有していた。stx 遺伝子保有は、stx1 のみが 7 株、stx2 のみが 85 株、stx1 と stx2 両者を保有するものが 73 株であった。また、O26:H11、O26:H- は、全て eaeA 遺伝子を保有しており、O26:H11 の 7 株、O26:H- の 14 株は stx1 遺伝子を保有していた。

薬剤 (ABPC, SM, TC, CPF, KM, CTX, CP, ST, NFLX, GM, NA, FOM) 感受性試験では、O157 の 168 株中、いずれの抗生物質にも感受性を示したものが 121 株 (72.0%) で、1 剤耐性が 11 株 (6.6%) [SM 耐性 (5 株) および TC 耐性 (6 株)]、2 剤耐性が 35 株 (20.8%) [SM, TC 耐性が 28 株、ABPC, SM 耐性が 7 株]、さらに 3 剤耐性 (ABPC, SM, TC) が 1 株 (0.6%) 認められた。O26 の 27 株では、19 株 (70.4%) が全ての抗生物質に感受性を示したが、TC 耐性が 2 株、2 剤耐性 (ABPC, SA) 1 株、3 剤耐性 (ABPC, SM, KM 耐性、ABPC, SM, TC 耐性および SM, TC, CP 耐性) 4 株、4 剤耐性 (ABPC, SM, TC, ST 耐性) が 1 株であった。

PFGE による genotyping 解析では、STEC O157 および O26 共に、それぞれ分離された菌株の地域、および農場によってそれぞれ特有なパターンが観察された。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 O157 は同一の PFGE パターンが認められた。本結果から、一部剥皮工程が汚染要因であることが示唆され、衛生管理のうえで最も重要であることが明らかになった。以上の成績から、EHEC 特に O157 は牛が保有する重要な微生物学的危害であり、と畜場の衛生を確保していくためには生産段階からと畜場搬入、解体処理の全て過程で O157 のコントロールが重要であると考えられる。

### 2. と畜処理工程における重要管理点に関する研究

#### 1) 処理工程ごとの評価

処理工程ごとの重要度について、多くの検

査所では、赤物内臓摘出、白物内臓摘出、食道結紮、肛門結紮および枝肉冷却の各工程は重要度1と評価し、極めて重要な処理工程であるとの認識であった。また、枝肉洗浄、大腿部および胸部の一部剥皮、全剥皮、枝肉トリミングの各工程も重要であると判定されている(表2)。各施設は、規模(処理頭数、処理時間、作業員数)も処理方法も一様ではなかったが、衛生を確保する上で「極めて重要」と評価された工程はほぼ一致していた。

## 2) 牛のと畜処理工程中における腸切れの部位およびその原因調査

腸切れが認められた部位は、十二指腸が264頭(90.7%)、ついで直腸24頭(8.2%)、小腸(十二指腸を除く)6頭、大腸(直腸を除く)3頭であった。また、その原因として、胃腸の摘出時間差(腸または胃だけが先に内臓受け台に落下し、結果的に十二指腸部がちぎれたもの)により、腸切れが発現したと考えられたものが198頭(68.0%)と最も多かった。この他、摘出時にナイフで腸管を損傷したような人為的原因によるものが49頭(16.8%)、内臓の癒着等疾病によるものが3頭あった。さらに、腸切れにより腸内容物の汚染を受けた部位は、と体では胸骨断面部が71頭(24.4%)と最も多く、次いで腹腔内面が45頭(15.5%)、前肢と胸腔内面がそれぞれ5頭(5.1%)であった。また、内臓での汚染は肝臓15頭(5.1%)、その他横隔膜、心臓等であった。

## 3) 肛門結紮および食道結紮の状況

肛門結紮および食道結紮は、全頭実施され

ており、結紮が不完全のものは肛門で2.1%、食道で3.2%であった。

## 3. 牛のと畜処理における衛生管理調査

### 1) 処理工程(内臓摘出)別汚染状況

吊り下げ方式を採用している4施設69頭の調査では、施設構造及び作業工程が類似している3施設のデータについて検討した。その結果、腸切れのない群と腸切れを認めた群では、生菌数の汚染について有意な差が認められた。また、十二指腸内容物の生菌数及び大腸菌数に関し、3施設15頭については一般生菌数が $10^2$ ~ $10^5$ オーダー、大腸菌数が未検出~ $10^5$ オーダーであった。

### 2) 処理工程における微生物制御に関する調査

スチームバキューム工程の前後。枝肉のふき取り検査(2施設40頭)を行った。結果、生菌数の有意な減少が認められ、微生物汚染低減効果が確認された。枝肉洗浄工程についても、有意な微生物の減少が確認された。また、トリミング工程、保冷工程も効果が認められた。

十二指腸内容物では、大腸菌が $10^3$ オーダー程度認められることから、枝肉の汚染防止として腸切れ防止対策は急務である。また、胸骨断面部の腸切れの及ぼす影響に関して、腸切れを認めないものに比べ有意な差が認められた。

また、洗浄工程における調査では、枝肉洗浄直後に電解水を噴霧しており、微生物低減が顕著であった。さらに、トリミング工程については、汚染を適宜除去していくうえで欠

かせない工程であり、適切な作業の実践が望まれる。また、枝肉冷却においては、省令により枝肉中心温度は速やかに10℃以下に冷却されることとされており、保冷工程における温度管理は微生物制御の観点からも非常に重要である。今回の調査においても良好な微生物増殖防止効果が確認された。

### 3) と畜場（牛処理施設）の微生物汚染に関する実態調査

#### 3-1) と畜処理における微生物汚染に関する重要度の評価

と体（枝肉）への微生物汚染として重要度について、全処理工程を1～3の3段階で評価した。その結果、生体受入れ・繋留、食道結紮、肛門結紮、乳房除去および内臓摘出工程に対し、全ての検査所が重要度1と評価し、最も枝肉への汚染を注意すべき工程であった。また、正中線切皮および剥皮前処理工程についても重要度1または2と判定した施設がみられた。

#### 3-2) 処理工程での汚染確認方法及びその指導

と体（枝肉）への微生物汚染要因として極めて重要（重要度1）と評価された工程について、汚染の発生要因、汚染の確認方法及び改善すべき指導内容を作成した。

##### ① 生体受入れ・繋留工程

生体検査時、1頭ごとに体表の汚染を目視で確認すること、その改善指導は、その場でヨロイの除去、体表の糞便等の汚れを水洗する。

##### ② 食道結紮工程

結紮状況の適否を確認し、枝肉への胃（消化管内容物）等の付着を直接目視で確認する。結紮の失宜については、失宜が当日処理頭数の3%を超える場合、作業手順書を見直す。

##### ③ 肛門結紮工程

確認方法およびその指導は概ね食道結紮工程と同様と考えられる。

##### ④ 内臓摘出工程

食道結紮工程、肛門結紮工程と同様である。胃腸摘出時に胃腸破損をおこしたものが当日処理頭数の一定割合（10%または20%）を超える場合に作業手順書の見直しを図る。また、枝肉への汚染が目視で確認された場合は、枝肉トリミング工程において汚染部位を完全に除去させること。枝肉洗浄工程において水洗後、100ppm次亜塩素酸水溶液を汚染部位に散布するという方法もあげられた。

##### ⑤ 乳房除去工程

枝肉検査時に乳汁の付着を目視で確認する。改善指導は枝肉トリミング工程において汚染部位をナイフで除去する。

##### ⑥ 正中線切皮工程

枝肉検査時においてと体切皮面の残皮、残毛および糞便等の付着の有無を指標に目視で確認する。改善指導は枝肉トリミング工程において汚染部位をナイフで切除する。

##### ⑦ 剥皮前処理工程

確認方法およびその指導は正中線切皮工程の場合と同様に行う。

#### 3-3) 汚染を除去又は低減する工程

処理工程の中で、と体（枝肉）の汚染を除

去または低減する工程を抜き出した。全ての検査所が枝肉トリミング工程を重要度1（汚染を除去する）とした。また、重要度1または2（除去に準ずる効果がある）と評価した工程は、生体搬入・繫留工程および枝肉洗浄工程であった。特に、生体搬入工程では、体表のヨロイの除去及び糞便等汚染を水洗除去する作業を重視していた。

### 3-4) 一般的衛生管理プログラムに関する実態調査

各施設で実施されている一般的衛生管理プログラムについて実態調査を行った。

#### ① 使用水の衛生管理

施設での使用水は、全施設で自家水を使用しており、基準に定められている定期的な水質検査および貯水槽の点検・清掃を実施していた。

#### ② そ族・昆虫の防除

防そ・防虫設備の点検は毎日あるいは週1回実施し、定期的な駆除作業は多くの施設で月1回実施していた。

#### ③ 施設設備の清掃管理

清掃の方法は、施設により使用温湯の温度、洗浄消毒剤の使用については様々であった。洗浄消毒剤を使用していたのは5施設であった。

清掃の頻度は、繫留所およびと畜解体室については、全ての施設で毎日作業終了後に実施されていたが、懸肉室および枝肉の冷却保管庫については、毎日実施している施設から年2回実施している施設まで様々であった。機械器具の清掃管理についても、施設により

実施方法は様々であったが、基本的には温湯洗浄し、著しい汚染があった場合洗浄剤を併用していた。

#### ④ 従事者の衛生教育

従事者の衛生教育については、衛生講習は全てのと畜場で実施されていた。講習内容は、と畜・解体処理の衛生管理、食中毒予防等食品衛生、食肉衛生全般と多義にわたっていた。

特に重視している事項は、と畜処理の衛生管理、腸管出血性大腸菌の制御、作業手順の徹底等に関する事項であった。

#### ⑤ 作業前点検

日常実施されている作業前点検では、使用水の残留塩素濃度、機械器具の消毒槽等の温度、枝肉等冷蔵設備の室内温度、手指等の消毒液の補充状況等の項目を実施していた。

### 3-5) 牛処理施設における衛生管理

#### 3-5-1) 牛処理施設における衛生管理総括表の作成

標準的な HACCP モデル構築のため牛処理施設における一般的な処理工程を設定し、それぞれの工程の危害、危害の要因、危害の防止措置、管理点、管理基準、確認方法および改善措置を検討し、「一般的な牛処理施設における衛生管理総括表」としてまとめた（表3）。

##### ① 生体受入れ・繫留工程

搬入牛の体表汚染を受入れ時に確認し、汚染を除去するほか、頻繁に汚染牛を搬入する生産者に対しては文書により指導する。

##### ② 食道結紮工程

食道結紮の失宜については、失宜が当日処理頭数の3%を超えてる場合は、結紮工程の

作業訓練を実施する。

### ③肛門結紮工程

肛門結紮の失宜については、1頭でも失宜が認められた場合は結紮工程の作業訓練を実施する。さらに、1日の処理頭数の2%を超えて失宜が発生した場合は作業手順書の見直しを図る。

### ④乳房除去工程

と体への乳汁汚染が見られる場合、乳房除去担当者が汚染部位をトリミングする。

### ⑤剥皮前工程

と体剥皮部に残毛等の付着が見られる場合、剥皮担当者が汚染部位をトリミングする。

### ⑥内臓摘出工程

内臓摘出時に、内容物がと体（枝肉）への汚染した場合、内臓摘出担当者がその場で汚染部位をトリミングする。内臓摘出によると体（枝肉）の汚染が当日処理の10%を超えて発生した場合は摘出作業の訓練を実施する。

## 3-5-2) と畜処理における CCP の設定

処理工程中 CCP 管理が可能と考えられる工程としては、生体受入れ・繫留工程、食道結紮工程、肛門結紮、乳房除去、内臓摘出、枝肉の冷却・保管工程である。

これらの工程ではトリミング等により汚染を除去する作業が重要である。その他の処理工程については PP により管理する。

## 3-5-3) と体（枝肉）が最も汚染を受けやすい

### 工程の作業手順と衛生管理

処理工程の中で、特にと体（枝肉）への微生物汚染を受けやすい工程である食道結紮、

肛門結紮、白物内臓摘出、乳房除去および剥皮前工程についての SSOP を作成した。食道結紮および肛門結紮工程では作業者の手指および機械・器具の洗浄消毒の徹底が重要である。

また、内臓摘出工程では、摘出時の十二指腸部のいわゆる「腸切れ」をいかに防止するかが重要であり、この対策として腹腔外に取り出される腸の落下を一時的に停止させるような作業を行うこと。平成 15 年、と畜場法の一部改正により、と畜場およびと畜処理を衛生的に管理させるための衛生管理責任者と作業衛生責任者の設置が規定された。本研究により、と畜処理された牛の腸内容および外皮には腸管出血性大腸菌 0157 が高率に保有または汚染されていることが明らかとなり、牛処理施設における高度な衛生管理の確立の必要性が示唆された。

一般的衛生管理プログラムについては、法令等基準に基づき実施されていた。これら一般的衛生管理プログラムに関する施設設備の衛生管理、使用水の衛生管理、そ族・昆虫の防除等は、衛生管理の基盤であり確実な実施が求められる一方、検査所による定期的な立ち入り検査および監視指導が必要である。

牛処理施設における一般的な処理工程を設定し、各工程について予想される危害と危害の要因を列挙しそれぞれその防止措置、管理点、管理基準、確認方法および改善措置を検討し、「一般的な牛処理施設における衛生管理総括表」を作成した。確認方法では、ほとんどの工程で工程を受け持つ担当者による危害の確認が可能であるが、食道結紮や肛門結

繋工程で危害の有無を確認できない場合もある。危害の確認できる工程で汚染の除去およびその「記録」が重要である。危害の発生が一定の割合を超え発生する場合の措置について改善方法を示した。肛門結紮失宜による直腸内容物の汚染については、腸管出血性大腸菌による危害を考慮し、1頭でも汚染が確認された場合、その工程作業の訓練を課す等より厳重な措置とすべきである。内臓摘出工程における消化管内容物による枝肉への汚染があった場合の改善措置として、トリミングを行うことのほかに、汚染部位への100ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液の噴霧を行うこととした。

全工程についての管理方法として、最も汚染を受けやすい工程を重点的に管理すべきであると、生体受入れ・繋留、食道結紮、肛門結紮、乳房除去、内臓摘出の各工程を重要管理点（CCP）として管理することが適当と考えられた。病原微生物の増殖を制御できる枝肉の冷却・保管工程についても CCP での管理が適当と考えられた。

汚染を低減化する工程としてのスチームバキューム、電解水や次亜塩素酸ナトリウム溶液等の消毒液を併用した枝肉洗浄についても、CCP で管理するかについては今後さらに検討が必要である。食肉の衛生、安全性を高めるためには、と畜場の設置者または管理者およびと畜業者は、衛生管理の基本となる法令に規定する基準等を確実に履行するほか、施設の構造設備等の実情に沿った自主的な衛生管理体制の構築が不可欠であり、HACCP システムの早期導入が必要である。

表1 腸管出血性大腸菌O157およびO26の分離成績 (2004-2005)

	直腸便		口腔内		枝肉		外皮		一部剥皮	
	O157	O26								
検体数	1007	952	810	810	576	536	228	228	243	213
陽性数	114	10	13	3	15	1	15	1	11	0
陽性率 (%)	11.3	1.1	1.6	0.4	2.6	0.2	6.6	0.4	4.5	0.0

表2 処理工程ごとの重要度

施設 主な処理工程	A	B	C	D	E	F	G	H	I	重要度の 平均
生体搬入・繋留	2	2	1	2	2	3	2	2	2	2.0
生体洗浄	2	—	—	—	—	2	2	—	—	2.0
スタンニング	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2.9
放血	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2.1
除角	3	3	3	2	3	3	3	3	3	2.9
前肢除去	2	3	3	2	3	2	3	3	2	2.6
後肢除去	2	3	2	2	3	2	3	3	2	2.4
食道結紮	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1.2
肛門結紮	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1.2
もも部剥皮	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1.7
胸部剥皮	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1.7
全剥皮	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1.8
頭部切断	2	3	2	2	2	3	3	1	3	2.3
スチームバキューム	—	1	1	2	—	—	—	—	3	1.8
胸割り	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1.9
白物内臓摘出	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1.1
赤物内臓摘出	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1.1
(脊髄吸引)										
背割り	2	3	3	2	3	2	3	3	3	2.7
枝肉トリミング	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1.9
枝肉洗浄	2	1	1	2	3	2	1	1	1	1.6
枝肉冷却	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1.1

1) 重要度の評価 1:極めて重要、 2:重要、 3:普通

2) —は作業工程がないことを示す。

3) 脊髄吸引工程は評価していない。

表3 一般的な牛処理施設における衛生管理総括表

工程	危害	危害の要因	防止措置	管理点	管理基準	確認方法	改善措置	検証方法	記録文書名
1. 生体受入・繋留	病原微生物による汚染 腸管出血性大腸菌 サルモネラ カンピロバクター等	・搬入個体の汚れ ・搬入車両の汚染 ・個体の腸管内保菌	受入時の確認	COP	体表の糞便汚染がないこと	目視確認(全頭) 担当: 頻度:	・汚染の除去 ・搬入者(生産者)指導 ・健康個体搬入を指導		
	異物の混入	・注射針の残留 ・生産者、獣医師の取り扱いの不備 ・通路等の衛生管理不良	適正飼養の徹底 受入れ時の確認 飼養履歴の確認 施設の洗浄	COP COP	異物残留の無いこと 残留の無いこと 施設が狭小等で汚れていないこと	飼養管理履歴等関連書類の内容確認 飼養管理履歴等関連書類の内容確認 目視確認 担当: 頻度: 目視確認 担当: 頻度:	検査員への通報 搬入中止 生産者、獣医師への通知 汚染を確認した場合は洗浄		
2. 追い込み	病原微生物による汚染	・個体の損傷	従事者訓練		個体に損傷を与えないこと	目視確認 担当: 頻度: 目視確認 担当: 頻度:	注意しながらスタナニング場所へ誘導		
	病原微生物による汚染	・不動化装置の衛生管理不良	施設、器具の洗浄		施設、器具が清潔であること	目視確認 担当: 頻度:	施設、器具の再洗浄		
3. スタナニング	病原微生物による汚染	・ナイフの洗浄消毒不良	ナイフの洗浄・消毒		汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	ナイフ等の再洗浄・消毒		
	病原微生物による汚染	・食道損傷による消化管内内容物汚染 ・血液による汚染	従事者訓練		胃腸内内容物による汚染がないこと 血液汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	外皮に血液等の汚染があった場合は洗浄		
5. と体懸垂	病原微生物による汚染	・フックチェーンの衛生管理不良 ・と体の接触 ・個体落下	・フックチェーンの洗浄・消毒 ・従事者訓練 ・機械の保守点検		フックチェーンが汚れていないこと 落下の無いこと	目視確認 担当: 頻度:	・フックチェーンの洗浄・消毒 ・落下しないよう作業を実施		
	病原微生物による汚染	・食道分離装置等による胃内内容物汚染 ・食道結核機器の衛生管理不良 ・と体の接触 ・作業手拭の不良	・従事者訓練 ・食道結核機器の洗浄・消毒 ・従事者訓練	COP	・結核不良がないこと ・結核器の汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度: 目視確認 担当: 頻度:	・作業訓練(1日の処理頭数の3%を超えて発生した場合) 結核器の再洗浄・消毒		
7. 頭部処理 7-1 除角 7-2 面皮剥皮	病原微生物による汚染	・ナイフ等の衛生管理不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	ナイフ等の洗浄・消毒 従事者訓練		汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	ナイフ等の再洗浄・消毒、接触等により汚染の可能性がある部位はトリミングを実施		
	獣毛等のと体への付着	・と体の接触 ・従事者の作業不良	従事者訓練		獣毛等の付着がないこと	目視確認 担当: 頻度:	異物が付着した場合はトリミングを実施		

8. 前肢処理 8-1 前肢切断 8-2 前肢剥皮	病原微生物による汚染	ナイフ等の衛生管理不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	ナイフ等の洗浄、消毒 ・従事者訓練		はく皮部の汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	・ナイフ等の再洗浄、消毒 ・接触等により汚染の可能性 がある部位はトリミングを実施。 異物が付着した場合はトリミングを実施。		
	獣毛等と体への付着	・と体の接触 ・従事者の作業不良	従事者訓練		獣毛等の付着がないこと	目視確認 担当: 頻度:			
9. 後肢処理 9-1 後肢切断 9-2 後肢剥皮 9-3 掛け替え	病原微生物による汚染	フットカッター等の衛生管理不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	フットカッターの洗浄、消毒 ・従事者訓練		はく皮部の汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	・フットカッター等の再洗浄、消毒 ・接触等により汚染の可能性 がある部位はトリミングを実施。		
	獣毛等と体への付着	・と体の接触 ・従事者の作業不良	従事者訓練		獣毛等の付着がないこと	目視確認 担当: 頻度:	・異物が付着した場合はトリミングを実施。		
10. 肛門結紮	病原微生物による汚染	・肛門周囲の汚染 ・肛門結紮糸直等による消化管内内容物汚染	従事者訓練	CCP	・肛門周囲に汚染がないこと ・結紮不良がないこと	目視確認 担当: 頻度: 目視確認 担当: 頻度:	・消化管内内容物が付着した場合のトリミング ・作業訓練(養生を確認した場合) ・作業手順書の見直し(1日 の処理頭数の2%を越えて 発生した場合)		
	獣毛等と体への付着	・肛門結紮機器の衛生管理不良 ・と体の接触 ・作業手袋の不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	・肛門結紮機器の洗浄、消毒 ・従事者訓練		付着がないこと 結紮器の汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	・肛門結紮機器等の再洗浄、消毒。 異物が付着した場合はトリミングを実施。		
11. 正中線切皮	病原微生物による汚染	ナイフ等の衛生管理不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	ナイフ等の洗浄、消毒 ・従事者訓練		切皮部に汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	・ナイフ等の再洗浄、消毒。 ・接触等により汚染の可能性 がある部位はトリミングを実施。 異物が付着した場合はトリミングを実施。		
	獣毛等と体への付着	・と体の接触 ・従事者の作業不良	従事者訓練		切皮部に汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	異物が付着した場合はトリミングを実施。		
12. 乳房除去	病原微生物による汚染	乳汁漏出による汚染 ・従事者の作業不良	・乳汁による汚染を最低限に抑える	CCP	乳汁による汚染を最低限に抑える	目視確認 担当: 頻度: 目視確認 担当: 頻度:	乳汁が付着した場合はトリミングを実施。		
	獣毛等と体への付着	・ナイフ等の衛生管理不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	ナイフ等の洗浄、消毒 ・従事者訓練 従事者訓練		汚染がないこと 獣毛等の付着がないこと	目視確認 担当: 頻度: 目視確認 担当: 頻度:	・ナイフ等の再洗浄、消毒。 ・接触等により汚染の可能性 がある部位はトリミングを実施。 異物が付着した場合はトリミングを実施。		
13. 剥皮前処理 13-1 後肢剥皮 13-2 頭部剥皮 13-3 腹部剥皮	病原微生物による汚染	・ナイフ等の衛生管理不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	ナイフ等の洗浄、消毒 ・従事者訓練		汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	・ナイフ等の再洗浄、消毒。 ・接触等により汚染の可能性 がある部位はトリミングを実施。 異物が付着した場合はトリミングを実施。		
	獣毛等と体への付着	・と体の接触 ・従事者の作業不良	従事者訓練		獣毛等の付着がないこと	目視確認 担当: 頻度:	異物が付着した場合はトリミングを実施。		

14. 胸割り	病原微生物による汚染	・胸割り機の衛生管理不良 ・体の接触 ・作業手袋の不良	胸割り機の洗浄、消毒 従事者訓練	汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	・胸割り機の再洗浄、消毒 ・接触による汚染のある部位はトリミングを実施。	
	獣毛等のと体への付着	・胸割り作業失速等による消化管内内容物等の汚染 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	従事者訓練	付着がないこと	目視確認 担当: 頻度:	消化管内内容物の漏出等による汚染のある場合はトリミングを実施。	
15. 剥皮 ダウンプレー 2 ベッド方式	1 病原微生物による汚染	・ナイフ等の衛生管理不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良[ダウンプレー]・剥皮後の外皮の付着[ベッド方式]・ベッド台の清掃、消毒不良	従事者訓練	汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	接触等により汚染がある場合はトリミングを実施。	
	獣毛等のと体への付着	・と体の接触 ・従事者の作業不良	従事者訓練	獣毛等の付着がないこと	目視確認 担当: 頻度:	異物が付着した場合はトリミングを実施。	
	病原微生物による汚染	・消化管内内容物の枝肉汚染 ・従事者の作業不良	従事者訓練	消化管内内容物に汚染されていないこと	目視確認 担当: 頻度:	・汚染部位をトリミング、汚染部位が確指織の場合は100ppm塩素水を噴霧。 ・作業訓練(1日処理の10%を超えた胃腸破損によると体汚染が発生した場合)	
17. 背嚙吸引	病原微生物による汚染	・ナイフ等の衛生管理不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	ナイフ等の洗浄、消毒 従事者訓練	汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	・ナイフ等の再洗浄、消毒。 ・接触等により汚染の可能性のある部位はトリミングを実施。	
	SRMの上体への付着	・背嚙吸引装置の衛生管理不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	従事者訓練	汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	吸引装置の再洗浄、消毒。 接触等により汚染の可能性のある部位はトリミングを実施。	
18. 背割り	病原微生物による汚染	・ハンドソーの衛生管理不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	ハンドソーの洗浄、消毒 従事者訓練	SRM付着がないこと	目視確認 担当: 頻度:	汚染部位をトリミング	
	SRMの上体への付着	・と体の接触 ・従事者の作業不良	従事者訓練	SRM残留がないこと	目視確認 担当: 頻度:	残留したSRMをトリミング	
19. 整形・トリミング	病原微生物による汚染	・ナイフ等の衛生管理不良 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	ナイフ等の洗浄、消毒 従事者訓練	汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	・ナイフ等の再洗浄、消毒。 ・接触等により汚染の可能性のある部位はトリミングを実施。	
20. 筋肉洗浄	病原微生物による汚染	・洗浄能力の不足による汚染の拡大 ・と体の接触 ・従事者の作業不良	洗浄機の正常稼働 従事者訓練	汚染がないこと	目視確認 担当: 頻度:	洗浄機の調整。	
21. 冷却・保管	使用水の不良	・飲用不適な水質	飲用適の水であること	水道法に基づく水質基準	目視確認 担当: 頻度:	異常を認められた場合使用中止	
	病原微生物の増殖	・温度管理不良	施設の保守点検 庫内温度管理の徹底	庫内温度0℃以下(枝肉の温度が10℃以下になるように設定)	目視確認 担当: 頻度:	庫内温度の調整	

平成 18 年度厚生労働科学研究補助金（食品の安全性高度化推進 研究事業）  
分担研究者報告書（平成 16~17 年まとめ）

冷凍食品製造の高度衛生管理に関する研究

分担研究者 大場秀夫 社団法人日本冷凍食品協会

研究要旨

1. 冷凍食品製造における HACCP 構築に必要なデータの収集とデータベースの作成

冷凍食品の製造における高度衛生管理システムの構築に必要なデータを得るため、JOISEasy による文献検索システムを活用し、「冷凍食品(Frozen Food)」AND「微生物(Microorganism)」OR「食中毒(Food Poisoning)」OR「衛生管理(Sanitation)」AND pubyear:1994-current 等の簡単なキーワードを選定して文献の収集を行った。その内容を文献カードとして整理、要約した。文献カードは、テーマ別に分類し、その文献カードからキーワードのみを抽出した個票を作成し、これらのデータを冷凍食品の製造から消費までのフロー図において各段階(階層)に分けて整理し、パソコンで簡単に一覧できる CD-ROM としてまとめた。

なお、文献カードから PubMed にリンクすることができ、より詳しい元論文を参照することができる。

また、(社)日本冷凍食品協会、(財)日本冷凍食品検査協会、(財)食品産業センター、(社)大日本水産会および厚生労働省等の各ホームページにリンクできるようにした。

2. 有害微生物のコントロール手法の確立を目指した冷凍保存における病原細菌の挙動分析

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。

食品に病原細菌を接種して、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下に保存し、生残を検討した。

EHEC、カンピロバクター、サルモネラ、リステリアは、2-3ヶ月後でも減少せず、腸炎ビブリオと赤痢菌は大幅に減少した。

腸炎ビブリオは、培地およびするめいか、もんごういかに接種すると、培地接種では大幅に減少するが、食品接種では徐々に菌数が低下していくものの、6ヶ月後にも一部数%は生残していた。

病原細菌によっては、冷凍された食品中でも長く生残することから、原料の受け入れ時の検査又はその検査法が重要であり、洗浄の繰り返しによる細菌の低減を目的とする工程の衛生管理が重要である。

3. 冷凍食品製造における標準的 HACCP モデルの構築

国内で生産されている冷凍食品は、(社)日本冷凍食品協会の「日本の冷凍食品生産

高・消費高に関する統計」によると、年間約 1,500 千トンに達している。

国内で生産され流通する冷凍食品を任意に抽出した最終製品約 1,888 検体について、生食用魚介類（いか等）、加工用魚介類（むきエビ等）、加熱済魚介類類（魚フライ等）、調理品類（畜産フライ類・調理フライ類等）に分類し、細菌試験結果を検討したところ、調理品類の 1 検体に比較的高い細菌数、生食用魚介類の 1 検体に大腸菌群が検出された。

冷凍食品の品目は、多岐にわたっており、品目の中では生産数量が一番に多い冷凍コロッケについて危害分析を行った。しかし、冷凍食品は、喫食する時に加熱調理の必要性を記載することとしているが、その中でも無加熱摂取冷凍食品は、製品特性から高度な衛生管理を必要としており、生食用冷凍鮮魚介類はこの範疇に入るものであり、成分規格、加工基準、保存基準の規定があることに注目し、冷凍いか刺身類、生食用冷凍ほたて貝柱について危害分析を行った。

冷凍いかさしみ類、生食用冷凍ほたて貝柱について、原料、製造工程、製品までの細菌汚染について検討を行った。

汚染指標細菌については、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。

するめいか、ほたて貝（殻付）の原料は、国産品を使用し、もんごういかの原料は、輸入品を使用した。

今回使用した原料の汚染指標細菌数は、国産品、輸入品とも低い数値であった。

製造工程においては、工程別に製品の細菌の挙動を調査・検討し、生食用冷凍ほたて貝柱の製造工程に限り、環境汚染度についての細菌ふき取り調査を行った。

搬送ベルトコンベアおよびカッター工程等で細菌数の増加が見られた。また、原料処理、一次洗浄前までの工程での汚染度が高く、汚染区の細菌を非汚染区に持ち込まない区画、区分が必要であり、機器、器具等の洗浄、従業員の作業衛生手順などを整備する必要を示唆している。

製品の細菌数等については、すべて基準値以内の結果であった。

生食用冷凍鮮魚介類の標準的 HACCP モデルを構築するため、冷凍するめいか刺身、生食用冷凍ほたて貝柱、生食用冷凍むきもんごういかについて、各製造工場で実施した製造工程毎の細菌汚染調査を基に、専門家に意見を求め標準的 HACCP プランを作成した。生食用冷凍ほたて貝柱に関する文献は、国内に 2 件あり参考にした。

#### 研究協力者

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）  
原田 眞（（財）日本冷凍食品検査協会）  
石村和男（（社）日本冷凍食品協会）  
竹村昌樹（（社）日本冷凍食品協会）

#### I 目的

近年多品目の製品が製造される冷凍食品製造施設においても、大規模製造施設を中心に食品の安全確保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）の導入が進められている。HACCP

導入にあたっては、対象品目について発生しうる危害の科学的データに基づいた評価を行い、その管理手法を確立することが必要とされる。しかし、冷凍食品は多様であり、中小規模の製造業者にとってはそれらデータを収集し、科学的に分析することは困難である。

このため、冷凍食品製造過程での微生物汚染・危害要因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利用できる情報を提供する。さらに、冷凍食品の中でも危険度の高い品目の調査を通してそれら冷凍食品の製造工程における危害分析を実際に行い、有害微生物のコントロール手法を確立するとともに、危険度の高い冷凍食品の安全な製造のための標準的な HACCP モデルを作成することを目的とする。

具体的には、冷凍食品製造に対して以下の3項目とする。

#### 1. 冷凍食品製造における HACCP 構築に必要なデータの収集とデータベース作成

すなわち、高度衛生管理システムの構築に必要なデータを冷凍食品製造に携わる人々が容易に利用できるデータベース検索システムの構築を行い、誰でもが本研究で収集した文献の検索および情報の活用が行える CD-ROM を作成することを目的とした。

#### 2. 有害微生物のコントロール手法の確立を目指した冷凍保存における病原細菌の挙動分析

すなわち冷凍食品の中で、食中毒発生の原因となる病原細菌の挙動を明らかにすることを目的とした。

#### 3. 冷凍食品製造における標準的 HACCP モデルの構築

すなわち冷凍食品の品種ごとに市販製品の汚染状況の調査分析を行い冷凍食品の中で危険度の高い食品を絞り込み、その食品について、さらに詳細な分析を行い HACCP モデルの構築を行った。

## II 研究方法

### 1. 冷凍食品製造における HACCP 構築に必要なデータの収集とデータベース作成

#### (1) 文献収集

冷凍食品の歴史は浅く、本食品に関する文献は少ないことが想定されたことから、冷凍食品製造に関連した文献を幅広く収集するために、簡単なキーワードを選定し、過去に公表されたデータを JOISEasy による文献検索システムを活用することにより、国内外の文献の収集を行った。

#### (2) 文献の要約と整理

1) 収集した文献から冷凍食品製造に関連したデータを抽出し、調査項目に該当する必要な事項を簡潔にまとめて記載・整理するための書式を検討し、文献カードを作成した。

これら作成した文献カードの内容を整理分類して、「著者」、「文献タイトル」、「誌名」、「巻・号」、「ページ」、「報告年」等、キーワードのみを抜き出し一覧表（個票）としてまとめた。

#### 2) 個票および説明文の作成

すべての文献カードの内容を整理し、1) 原料における微生物汚染、2) 製造工程における微生物汚染、3) 製造工程における微生物の制御法、4) 製品における微生物汚染、5) 流通保管時の微生物の消長、6) 解凍調

理時における微生物の消長、7) 新規殺菌手法による微生物制御法、8) 検査方法の比較、9) 食中毒・苦情、10) 総説の各項目について一覧表（個票）としてまとめた。

また、各個票には解説欄（説明文）を設け、その内容が容易にわかるようにした。なお、説明文には個票中の文献すべてを引用し、後のその内容を検索できるようにした。

#### 3) 文献カードの整理

CD-ROM 化に当たり、各文献カードの内容を簡潔でわかりやすい記載に改めた。

なお、文献カードからは米国国立医学図書館の文献検索システムである PubMed にリンクすることができ、より詳しい元論文の情報を参照することができるようにした。

#### 4) 製造工程フロー図の作成

冷凍食品の製造に当たり、原料の受け入れから、製造、流通保管、解凍調理、喫食までの一連の工程における微生物汚染やその制御法についての一連の流れを一目でわかるようフロー図にまとめた。

#### 5) リンク集の作成

（社）日本冷凍食品協会、（財）日本冷凍食品検査協会、（財）食品産業センター、（社）大日本水産会および厚生労働省等の各ホームページにリンクできるようにし、そこからも必要な情報が得られるようにした。

#### 6) 用語集・定義の作成

本 CD-ROM を活用するに当たり、「個票」、「文献カード」などの用語についてわかりやすく解説した。

## 2. 有害微生物のコントロール手法の確立を目指した冷凍保存における病原細菌の挙動分析

腸炎ビブリオに関しては、検討した病原細菌と食品は次の通りである。

(1)「実験 1」腸炎ビブリオ O3:K6 2 株（いずれも TDH 産生株）を使用して、アルカリ性ペプトン水培地中での保存における菌数の変動について検討した。

(2)「実験 2」腸炎ビブリオ O3:K6 2 株を使用して、アルカリ性ペプトン水培地中での -20℃ 冷凍保存における菌数の変動について検討した。

(3)「実験 3」市販するめいか刺身各 25g をストマフィルターに無菌的に分配した。

同様の接種実験をもんごういかおいても行った。ただし、接種菌数は  $7.6 \times 10^2$  CFU/g 腸炎ビブリオであり、するめいかでの実験より、約 1/100 の接種菌数とした。

各接種菌については、新鮮培養菌を実験に用いた。腸管出血性大腸菌 (EHEC)、サルモネラ、リステリア、赤痢菌については保存培地からトリプトソイ培地 (TSB) 3ml へ接種し 36℃ (リステリアのみ 30℃) での培養を行った。その培養液を滅菌生理食塩水により適宜希釈を行って、実験菌液とした。カンピロバクターについては冷凍保存菌株グリセリン含寒天培地を Muller-Hinton agar 上に塗抹し、42℃ 微好気培養 2-3 日後出現したコロニーをエーゼで掻き取り、Muller-Hinton 培地に懸濁させ、適宜滅菌生理食塩水により 10 倍希釈を行って実験菌液とした。腸炎ビブリオ保存株はアルカリ性ペプトン水 (APW) に懸濁させ、36℃ での一晚培養により、滅菌生理食塩水により適当に 10 倍希釈を行って実験菌液を作製した。接種菌液については、適当倍の希釈菌液 0.1ml を TSA に 5 枚塗抹を行って、培養後、出現コロニー数により接種菌数を計