

猪解体・加工調理施設における微生物動態に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	池田徹也	北海道立衛生研究所
研究協力者	川瀬 遵	島根県保健環境科学研究所
研究協力者	伊澤和輝	東京工業大学大学院
研究協力者	小西良子	麻布大学 生命・環境科学部

研究要旨

猪肉の加工調理工程における細菌動態を検討するため、施設 A で製造加工される猪肉缶詰製品の原材料及び中間・最終製品を衛生試験に供した。結果として、原料肉の衛生状況は高く、腸内細菌科菌群は 12 検体中 2 検体で 50 CFU/g が検出されたが、大腸菌（群）は全て陰性であり、一般細菌数は 12 検体中 10 検体から 50～5100CFU/g であった。中間・最終製品は、全ての指標菌が不検出であった。一方、近郊の別施設 B で一次加工された猪原料肉 12 検体を同様の試験に供したところ、4 検体から腸内細菌科菌群、7 検体から大腸菌群が検出され、猪肉を用いた食品の製造加工にあたっては、適切な原料の選択と確保が重要であること、また缶詰製品の製造加工にあたっては、食品衛生法の製造基準を遵守することで安全性を確保できることが示された。

次に、猪原料肉の衛生確保に向けた活動のうち、猪解体施設の施設環境調査については細菌を指標としたもののみが実施されてきた状況を鑑み、本研究では、真菌の分布調査による各施設の施設環境に関する調査をはじめて行うこととした。施設 A に原料を提供する猪解体処理施設 C では、解体室を汚染区として、一次加工室等と明確な区分化を図っていた。同施設での真菌汚染調査を通じ、解体室床の付着真菌数や隣接するとたい冷蔵庫内の空気浮遊真菌数が高い傾向にあった。一方、一次加工室からは少数が検出されるに留まり、区分化による猪肉の衛生確保がなされていると判断された。猪解体処理施設における真菌分布の普遍性を評価するため、異なる地域の施設 D で同様の調査を行ったところ、施設 D でも解体室床の付着真菌数は他区域に比べて高い傾向が同様に観察されたほか、衛生指標菌検出状況は極めて良好と考えられたが、同施設では高温環境を好む *Cladosporium* 属菌が特に解体室、とたい冷却室、一次加工室等で多く検出されたため、室内の湿度管理が同施設での今後の衛生管理向上に資する課題として抽出された。以上より、猪肉缶詰製造加工施設での衛生管理の向上には、原料肉の適切な選定と確保のほか、食品衛生法の製造基準に従った加圧加熱殺菌工程を行うことで微生物危害を十分に低減し、安全性を確保できることが実証された。また、真菌分布の探知は施設の衛生管理実態の指標として有効であり、本年度の研究対象施設では、施設の区分化及び湿度管理の徹底が猪肉の腐敗要因ともなりうる真菌の汚染制御を講じる上での対策として挙げられた。熟成肉が嗜好されつつある昨今、野生鳥獣由来食肉の真菌汚染実態についても今後把握する必要があると思われる。

A. 研究目的

野生鳥獣の利活用に向け、厚生労働省では 2013年に野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドラインを定め、食用としての適正な利活用を図るべく普及活動を行っている。家畜・家禽とは異なり、野生鳥獣は飼養管理がなされてい

いため、自然保有する病原体の種類や分布等については徐々に明らかにされつつあるものの、依然として不明な点も多い。従って、野生鳥獣を食用に供する上で、更なる衛生管理の向上に資する科学的知見の集積が求められている。

先行研究では、鹿肉及び猪肉の加工調理段階

における衛生管理要点を科学的な観点から収集・検証し、特に鹿肉の調理加工工程での衛生管理に必要と思われる項目を国内の実態を踏まえた上で提案した。しかしながら、猪肉の加工調理に関しては十分な知見が集積されておらず、本研究では、猪肉の加工調理工程における実態把握並びに衛生管理向上に資する科学的知見の集積を図ることを目的とした。

加えて、食肉を含む食品や食品加工・製造環境には真菌が多く存在し、異常増殖を呈した場合には、異味・異臭等を伴う腐敗を齎すことが知られるが、野生鳥獣由来食肉の製造加工環境における真菌分布についてはこれまで検討がされておらず、衛生管理上の要点を真菌分布実態から抽出することについても、併せて研究目的とした。

以上の背景を踏まえ、本年度の分担研究においては、猪肉を用いた製造加工施設における微生物動態を検証すると共に、猪解体施設における真菌分布に関する調査を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 猪肉缶詰製造施設における採材及び衛生試験

猪缶詰製品製造施設Aの協力を得て、主原料である猪肉(モモスライス肉、ローススライス肉)、並びに中間製品(加圧加熱殺菌前)及び最終製品(加圧加熱殺菌後)の3点を対象として採材を行った。なお、対象製品はビール煮及びポトフ煮とした。また、施設Aの近郊に所在する、別施設(施設B)からも原料肉(猪モモスライス肉、猪カタ・スライス肉)を別途入手し、以下の衛生試験に供した。

衛生(細菌)試験のうち、衛生指標菌の定量検出試験については、1検体につき25gをサンプリングし、225mLの緩衝ペプトン水(BPW, Oxoid)を用いて懸濁液を調整した(試験原液)。

同試験原液及び同10倍階段希釈列を100 μ lづつ、標準寒天培地、VRBG寒天培地、VRBL寒天培地、TBX寒天培地、ペアード・パーカー寒天培地に塗布し、ISO法に準じた条件で培養を行い、確認試験を経て、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数、黄色ブドウ球菌数を求めた。各培地は1検体につき、2枚以上使用した。

腸管出血性大腸菌及びサルモネラ属菌については、公定法により定性検出試験を行い、それらの有無を確認した。

2. 菌叢解析

項1.にて得られた試験原液10mlを遠心分離し、得られた沈査より、MaxWell DNA prep kit (Promega)を用いてDNAを抽出した。これを鋳型として、16S rRNA V5-V6領域をPCR増幅し、得られたアンプリコンの等量混合溶液をライブラリーとした。

シーケンシング解析には、Ion CHEF/PGMシステム(Thermo Fisher Scientific)を用い、400base-readデータを取得した。得られた配列情報は、CLC Genomic Workbench (Qiagen-CLC)によりTrimming及びQuality checkを、RDP Classifier (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>)により階層分類を行った。

3. 猪解体処理施設等における真菌分布調査

猪解体処理施設C(施設Aに原料を提供する施設)、施設A、並びに異なる地域に所在する猪解体処理施設Dの協力を得て、真菌の汚染分布を調査した。

各施設では、室内・室外空気及び壁床等の付着物を採取した(表1)。空気の採材には、エアサンプラー エア-イデアル 3P(シスメックス・ピオメリユー)を用いて100L容量を

採取し、DRBC 寒天培地 (Oxoid) 上に捕捉した。環境ふき取り検体の採取には、ふき取り用スポンジスティック (3M) を用い、10ml の BPW を用いて懸濁液を調整した後、空気浮遊真菌と同様、DRBC 寒天培地に同液 100 μ L を接種した。各培地は接種後、25℃ で 7 日間培養し、得られた発育集落数を計測し、総真菌数を求めると共に、目視及び実体顕微鏡下での集落性状観察を通じ、*Aspergillus* 属菌、*Penicillium* 属菌、*Cladosporium* 属菌、及び酵母類の総真菌数に対する占有率を求めた。各環境での優占菌種の同定は、ポテト・デキストロース寒天平板培地 (PDA, 栄研化学) 上で 10~14 日間 25℃ で分離培養を行い、目視及び顕微鏡観察を通じた形態学的同定により行った。

また、ふき取り懸濁液残液は、項 1 で示す衛生試験にも併せて供した。

C. 研究結果

1. 猪肉缶詰製品の製造加工工程を通じた微生物挙動

施設 A で製造加工されるビール煮及びポトフ煮製品を対象として、原料肉、中間製品 (加圧加熱殺菌前)、最終製品 (加圧加熱殺菌後) 中の指標菌及び病原細菌の検出状況を確認した。

施設 A では、原料肉は、猪解体処理施設 C (後述) で一次加工された後、冷凍保存輸送されたものを受入れ、一晚冷蔵温度帯で自然解凍させて製造加工に供していた。衛生試験の結果、ローススライス 6 検体のうち、2 検体からは 50 CFU/g と少数の腸内細菌科菌群を認めただけ、一般細菌数は 5 検体より 50~5100CFU/g が検出されるに留まった (表 1)。他の指標菌及び病原細菌は全て不検出であった。また、モモスライス肉 6 検体では、一般細菌数が 4 検体から 50~550CFU/g の範

囲で検出されたものの、他の指標菌及び病原細菌は検出されなかった (表 1)。

原料肉を用いた猪肉缶詰製品の製造加工は以下の工程に沿って実施されていた。

・ポトフ煮：原料肉を細切した野菜と混合後、調味料を加えて、約 1 時間釜で煮込み、肉と抽出汁のみを封缶したものを、120℃ 30 分の殺菌処理を行い、製品としていた。

・ビール煮：ポトフ煮と同様、細切した野菜と原料肉に調味料を加えた後、釜で約 1 時間加熱調理し、肉と抽出汁のみを封缶したものを、120℃ 30 分の殺菌処理を行い、製品としていた。

・上記の加圧加熱殺菌条件の確認には、オートクレーブ缶内にロガーを設置し、使用時毎に温度を記録確認していた。

上記の条件を踏まえ、1 時間加熱調理後の中間製品及び最終製品について衛生試験を実施したが、全検体から何れの指標菌及び病原細菌は検出されなかった (表 1)。

一方、近隣に所在する別の猪解体処理施設 B にて一次加工された原料肉 12 検体を同様に衛生試験に供したところ、一般細菌数は計 12 検体全てより 1.4×10^3 ~ 2.0×10^6 CFU/g の範囲で検出されたほか、腸内細菌科菌群は 4 検体より 3.0×10^2 ~ 2.9×10^4 CFU/g、大腸菌群は 7 検体より 1.0×10^2 ~ 2.3×10^3 CFU/g、黄色ブドウ球菌は 8 検体より 5.0×10^0 ~ 3.1×10^2 CFU/g の検出を認めた。大腸菌は全て陰性 (<5CFU/g) であった (表 1)。

施設 B 由来原料肉検体のうち、 2.9×10^4 CFU/g の腸内細菌科菌群を認めた検体 # 15 (表 1) の構成菌叢を 16S rRNA 菌叢解析により求めたところ、腸内細菌科に属する細菌属の多くは *Serratia* 属菌であった (図 1)。

次に、施設 A で用いる原料肉及び施設 B で一次加工された原料肉各 3 検体を無作為に抽出し、構成菌叢を比較したところ、施設 B 由

来の原料肉は検体間で構成菌叢が大きく異なっていたが、施設 A 由来の原料肉は検体間での差異が極めて少ない状況にあった(図 2)。

以上の結果より、当該製品の製造加工においては適切な原料の選択と確保が重要であること、並びに猪肉を原料とした場合にも適切な加圧加熱殺菌処理は確実な微生物汚染低減を果たすことが示された。

2. 猪解体処理施設における真菌汚染実態

(1) 施設 C 及び A

施設 A で使用される原料肉を解体・一次加工して提供する施設 C では、生体受入後に、施設敷地内でとさつすることで、とたいと同時に内臓の異常確認を行う体制としていた。解体室内には、内臓摘出を行う前に一時的に保管するための剥皮前用冷蔵庫と内臓摘出及び剥皮後のとたいを一次加工に進める前に一時的に保管するための剥皮後冷蔵庫がそれぞれ設置されていた。なお、作業動線や作業衣等の面で、解体室と一次加工室は明確に区分化されていた。採材は表 2 に示す箇所を対象として作業中に実施し、真菌及び衛生試験に供した。

DRBC 寒天平板培養上の代表的な発育真菌像を図 3 に、空中浮遊真菌数及びその構成に関する成績を図 4 に示した。冷蔵庫を除く全ての採材箇所において、空中浮遊真菌数は通常の室内と同等の菌数であった(通常の室内環境として、ここでは、日本建築学会が発表した室内環境の維持管理規準値推奨値 1,000 CFU/m³を指標とした)。各室内採材箇所における真菌の構成は外気と同様の特徴を示し、施設 C 内では真菌の異常増殖は概ねないと判断された。

拭取り検体を用いて各採材箇所の付着真菌数を求めたところ、一次加工室のほか、施設 A の調理室では、施設 C の解体室、並びに同室

内に配置された冷蔵庫及び外毛に比べ、総真菌数が少なかった(一次加工室壁からの検出菌数は、 2.0×10^2 CFU/ml; 図 5A)。解体室床では相対的に真菌付着数が多く、 1.26×10^5 CFU/ml であった(図 5A)。また、剥皮前冷蔵庫壁からは 6.9×10^3 CFU/ml, 床からは 6.4×10^3 CFU/ml と同じく高菌数が検出された(図 5A)。

真菌構成比較を通じ、解体室等では酵母の付着割合が共通して多い状況であったのに対し、一次加工室では酵母の割合は比較的 low、通常の室内環境に近い状況であることが明らかとなった(図 5B)。また、確認試験を通じて、*Mucor* 属菌、*Aspergillus* 属菌、*Penicillium* 属菌等、採材箇所別の分布状況が明らかとなった(表 3)。

以上の結果より、施設 C においては解体室及びこれに付随するとたいを取り扱う汚染区と一次加工室との間で真菌分布は大きく異なっていることが示された。

(2) 施設 D

施設 D は、施設 C とは異なる地域の猪解体処理・加工施設である。当該施設の協力を得て、上述の施設 C と同様に真菌分布調査を行った。なお、当該施設では解体処理工程で剥皮は行わず、湯剥きにより外毛を除去後、内臓摘出及び頭部・脚部を除去したとたいを一次加工室で脱骨・成型していた。

DRBC 寒天平板培養上の代表的な発育真菌像を図 6 に、空中浮遊真菌数及びその構成に関する成績を図 7 に示した。

空中浮遊真菌数は一次加工室を除く全ての採材箇所でも通常の室内と同等であった(図 7)。真菌構成からも、施設 D の空気浮遊真菌は概ね通常の外気と同様の特徴を示し施設内での真菌異常増殖はなかったと評価できた(図 7)。なお、一次加工室では 2 枚の平板間で大きな

差異も認められたが、その要因としては作業中に採材を行ったためと考えられた。

拭取り検体を用いて各採材箇所の付着真菌数を求めたところ、解体室床からは 1.3×10^4 CFU/ml の真菌が検出され、施設 C と同様、真菌数が最も高い箇所であることが裏付けられた。また、その構成は酵母が 8.0×10^3 CFU/ml、*Aspergillus* 属菌が 3.3×10^3 CFU/ml、その他が 2.0×10^3 CFU/ml であった(図 8A)。猪外毛からはクロラムフェニコール耐性を示す細菌のみが検出された(図 8A)。内臓摘出後に一次保管されるとたい冷蔵庫の壁から検出された真菌数は少数であったが、ほぼ全てが *Cladosporium* 属菌により占有されていた(図 8B)。同様に *Cladosporium* 属菌の高い占有率は解体室の壁でも認められたほか、とたい冷蔵庫に隣接する一次加工室の壁でも一定の割合で認められた(図 8B)。なお、一次加工室壁の構成真菌叢は、外気と類似していた(図 8B)。

確認試験を通じ、施設 D で検出される真菌の採材箇所別分布状況を把握することができた(表 3)。

以上の結果より、施設 D では、施設 C と同様に、汚染区での真菌数が高い傾向を示したが、構成真菌の識別化を図ることで、とたい由来ではなく、解体室及び隣接する箇所で *Cladosporium* 属菌が占有している状況が確認された。

(3) 施設 C, A, D における衛生試験成績

真菌分布調査対象としたふき取り懸濁液を用いて、衛生指標菌の検出状況を確認したところ、施設 C では、解体室の床、壁、猪外毛のほか、剥皮前冷蔵室の壁、床、剥皮後冷蔵室の床から、 2.6×10^2 ~ 3.1×10^6 CFU/100cm² の範囲で腸内細菌科菌群が検出された(図 9A)。

また、大腸菌は猪外毛、解体室の床、剥皮前

冷蔵室の床等から、 1.3×10^2 ~ 9.8×10^3 CFU/100cm² の範囲で検出された(図 9A)。

一方、これらの糞便汚染指標は、一次加工室及び施設 A の調理室からは検出されなかった(図 9A)。

施設 D では真菌検出状況と同様に、解体室床及び外毛から 1.0×10^3 ~ 2.65×10^4 CFU/100cm² の範囲で腸内細菌科菌群が検出された(図 9B)ほか、大腸菌は解体室床のみから、 9.5×10^3 ~ 3.8×10^4 CFU/100cm² の範囲で検出された(図 9B)。内臓摘出後のとたい冷蔵室以降の箇所からは腸内細菌科菌群及び大腸菌は検出されなかった(図 9B)。

以上の結果より、施設 C, D においては解体室及びこれに類する汚染区での糞便汚染指標が検出されたものの、一次加工以降の工程箇所からは不検出であることが示され、両施設の糞便汚染対策のための衛生管理は適正に行われているものと判断された。

D. 考察

本研究では、猪肉製造加工施設で用いられる原料肉を対象とした、衛生試験並びに菌叢解析を通じた検討を通じ、猪原料肉の微生物学的品質は、解体・一次加工処理工程を通じた衛生管理の差異によるものと目され、原料肉の衛生状況を見極めた上で、適正な原料肉を確保することが、猪肉加工食品の安全性を確保する上で重要な管理項目であることが示された。また、施設 A で製造される猪肉缶詰製品の製造加工にあたっては、封缶後に 120 分間の加圧加熱殺菌を施していた。缶詰製品等の容器包装詰加圧加熱殺菌食品に対して、食品衛生法では、中心部が 120 分以上の加熱を製造基準として設定しているが、今回調査対象とした施設 A ではより厳しい加熱殺菌条件を設定し、発育しうる微生物が陰性となるよう対策を講じていた。

原料肉の衛生管理を行う上では、とたい由来の病原微生物の制御に加え、施設環境の衛生状況の確保も重要な項目と考えられる。これを評価する一つの指標として本研究では、真菌汚染分布に関する検討を行った。検討を通じ、2 対象施設では酵母が多く認められた。酵母は物性として空気中に浮遊するよりも壁や床等に付着する性質が強いことから、猪解体処理施設等での衛生状況確認を目的とした真菌調査には、ふき取り法が空気浮遊法よりも適していると考えられた。

施設内の真菌数に関する法的規制値は存在しないが、日本建築学会が発表する室内環境の維持管理規準値推奨値（1,000 CFU/m³）と比較した結果、2 対象施設のうち、施設 C については真菌の異常発育はないと判断されたが、解体室、冷蔵庫、外毛等では酵母が比較的高い占有率を示した。これらとはたい由来の真菌が伝播した可能性が考えられた一方、一次加工室では酵母の割合は低かったことを踏まえると、一次加工室で検出された真菌は外環境や室内のハウスダスト等の影響によるものと推察される。

施設 D では、施設 C に比べ、真菌叢の多様性が小さい状況にあった。このことは、当該施設は人為的影響を受けた微生物環境にあると想定される。このうち、*Cladosporium* 属菌は解体室やとたい冷蔵庫、一次加工室等で高い割合で分布していた。聞き取り調査を通じ、当該施設では、殺菌剤を用いた洗浄消毒を励行しており、実際に糞便汚染指標菌の分布は解体室に限定されていたこと、汚染菌数も施設 C に比べて低いこと等から、生体由来の病原菌排除の観点では十分に機能していると考えられたが、その一方で当該施設は湯剥きで外毛除去を行っているため、周辺を含めた室内環境が高湿となっていた可能性が考えられた。*Cladosporium* 属菌はその生育に高湿を好

むことを鑑みて、施設 D における真菌の異常増殖を防止する上では湿度管理を図ることが有効な対策と考えられる。

表 2 に、各施設のサンプルから検出された主な真菌の種類一覧を示した。食肉から検出されることが多いとされる *Mucor* 属菌、*Geotrichum* 属菌、*Penicillium* 属菌など、および野生動物を含む動物由来であり皮膚感染性がある *Trichosporon* 属菌が検出された一方、表中のその他の属の菌は、土壌や空中など環境から普遍的に検出される種類であったことから、各施設室内の真菌叢は、屠体および外環境の影響を大きく受けていることが確認された。

E. 結論

本研究では、猪肉缶詰製品の製造加工工程を通じた微生物動態を検証し、衛生的な原料肉を確保する重要性と、十分な加熱殺菌工程を経ることで、安全性を確保しうること示した。また、原料肉を製造する猪解体処理施設での衛生試験並びに真菌汚染調査を通じ、猪生体に由来する真菌の汚染が解体室等で生じやすい一方、区分化を図ることで一次加工室の真菌汚染を制御しうることを実証した。また、高湿環境により真菌の異常増殖を示した可能性を探知し、その制御に向けた対応として湿度管理が有効である可能性を提示した。通じた検証を行い、具体的な条件を例示した。本研究の成績は関連事業者が衛生確保に向けた取り組みを行う上での参考知見として活用されることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamazaki A, Honda M, Kobayashi N, Ishizaki N, Asakura H, Sugita-Konishi Y.

The sensitivity of commercial kits in detecting the genes of pathogenic bacteria in venison. J Vet Med Sci. 2018.

80(4):706-709.

- 2) Honda M, Sawaya M, Taira K, Yamazaki A, Kamata Y, Shimizu H, Kobayashi N, Sakata R, Asakura H, Sugita-Konishi Y. Effects of temperature, pH and curing on the viability of *Sarcocystis*, a Japanese sika deer (*Cervus Nippon centralis*) parasite, and the inactivation of their diarrheal toxin. J Vet Med Sci. 2018. 80(8): 1337-1344.

2. 学会発表

なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし



図 1 . 施設 B 由来の猪原料肉検体 15 の構成細菌叢に関するサンバーストチャート

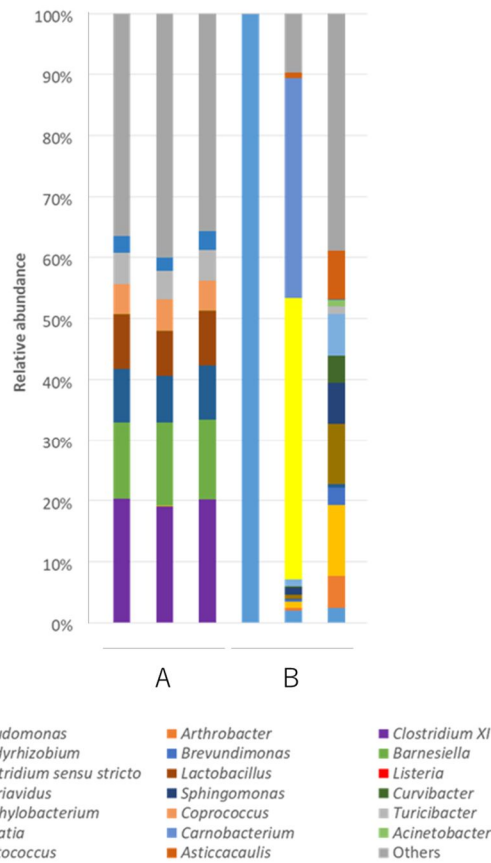


図 2 . 施設 B 由来猪原料肉代表検体 (モモ) の構成菌叢比較

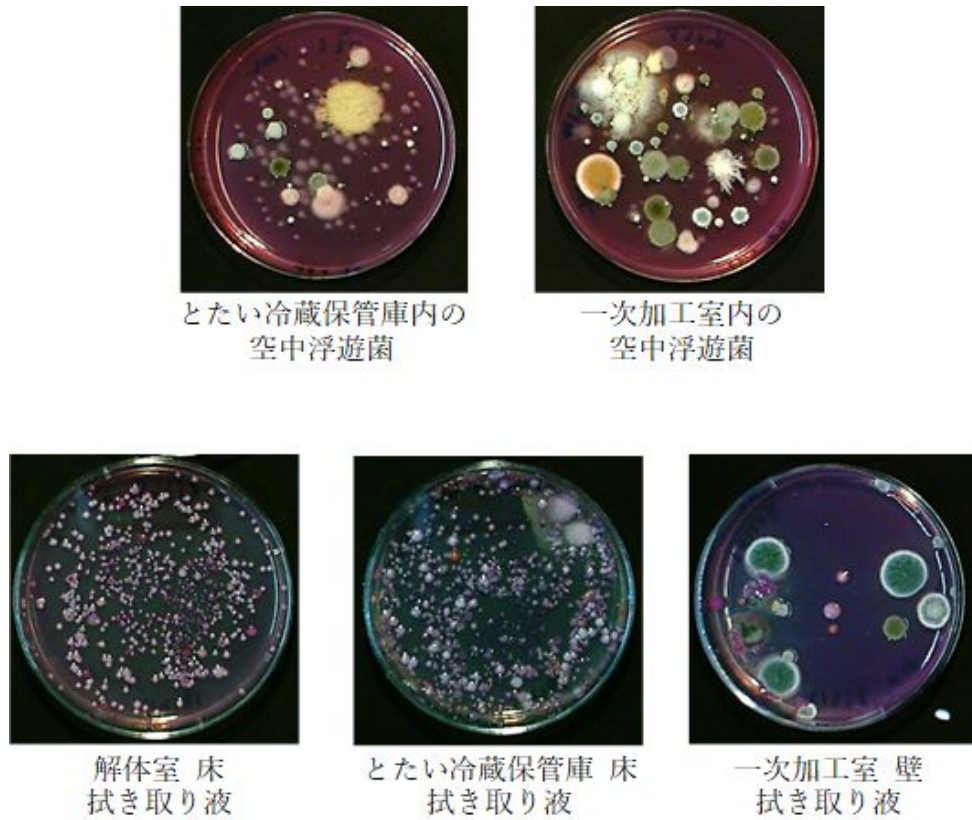


図 3 . 猪解体処理施設 C 由来代表検体の DRBC 寒天平板上での真菌発育像

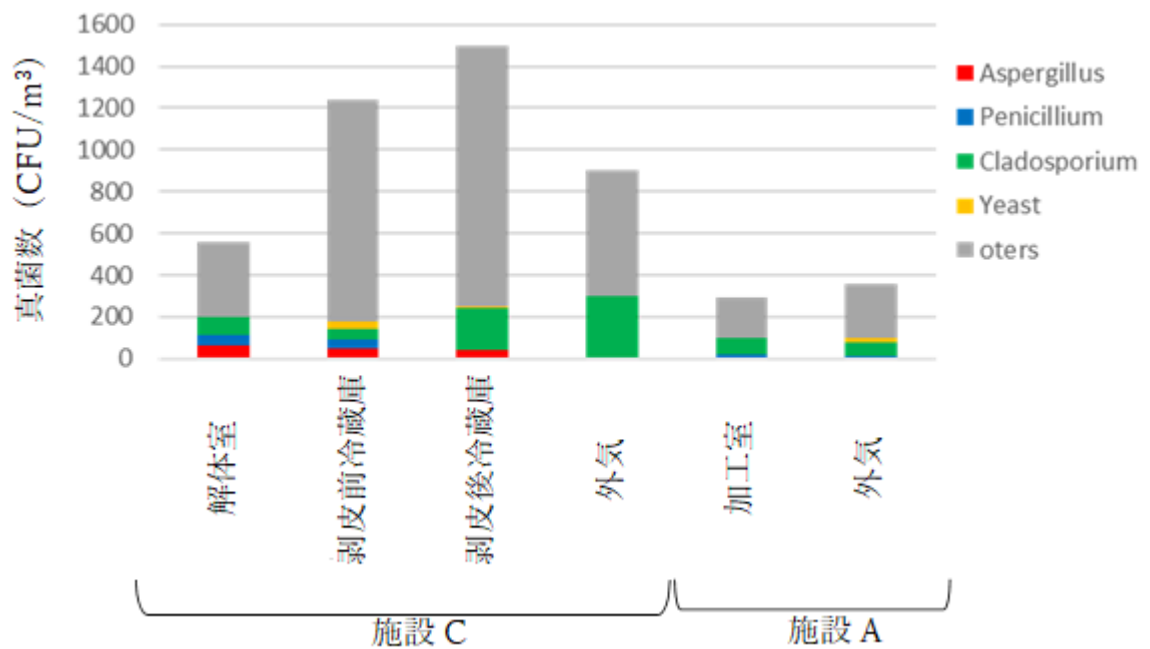
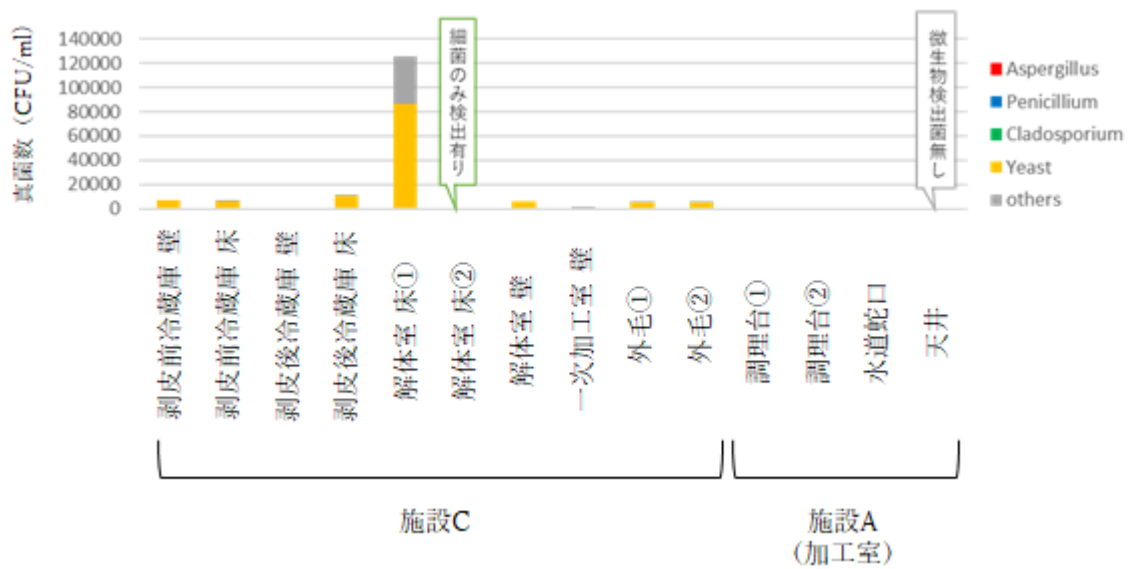


図 4 . 施設 C および施設 A における空中浮遊真菌数と真菌叢の比較

(A)



(B)

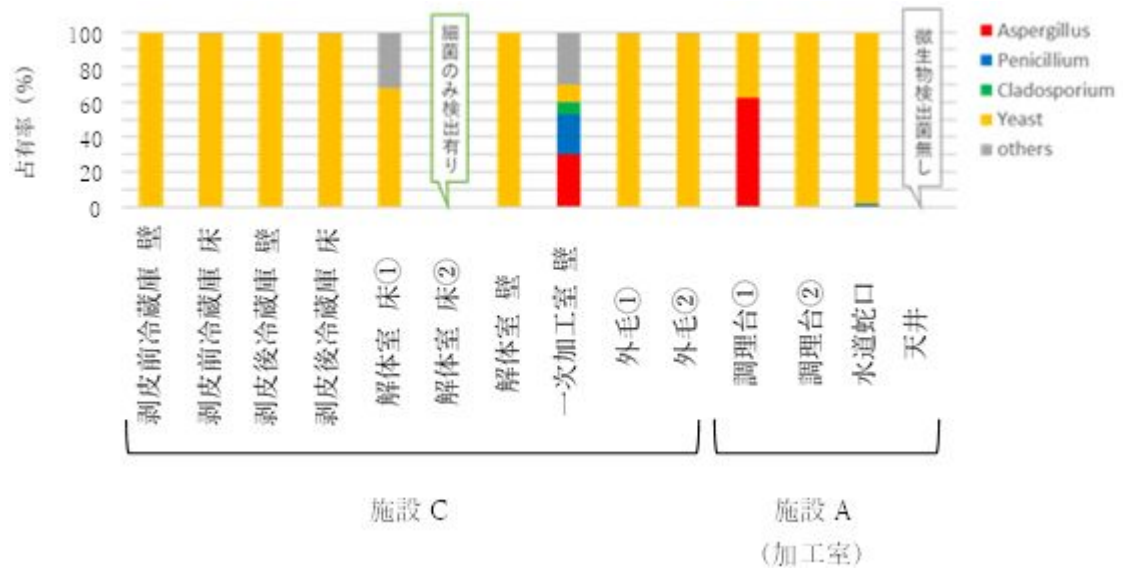
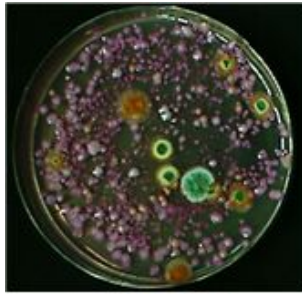


図5. 施設C及び施設Aの拭き取り検体から検出された真菌数及びその構成



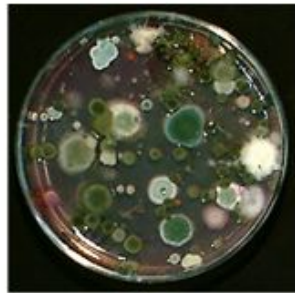
解体室 床
拭き取り液



解体室 壁
拭き取り液



冷却保管室 壁
拭き取り液



一次加工室
空中浮遊菌



外気

図6. 猪解体処理施設 D 由来代表検体の DRBC 寒天平板上での真菌発育像

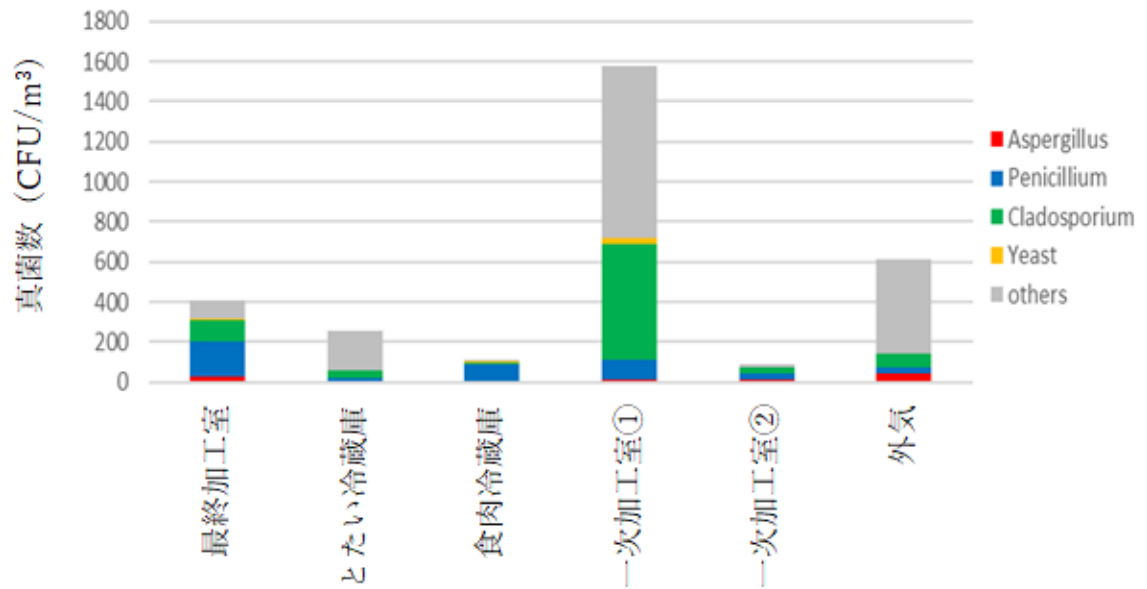
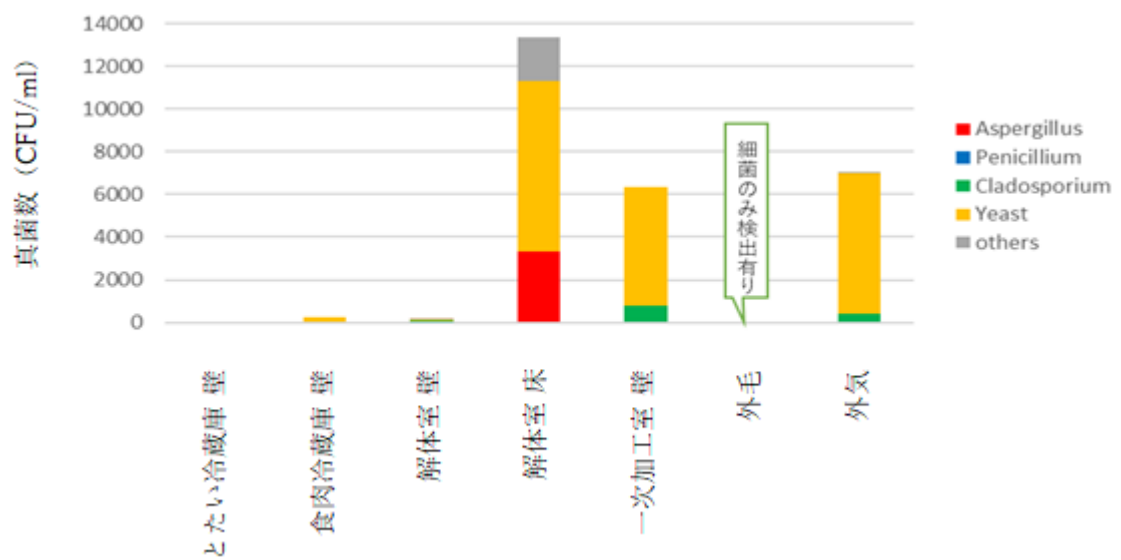


図7. 猪解体処理施設 D における空中浮遊真菌数と真菌叢の比較

(A)



(B)

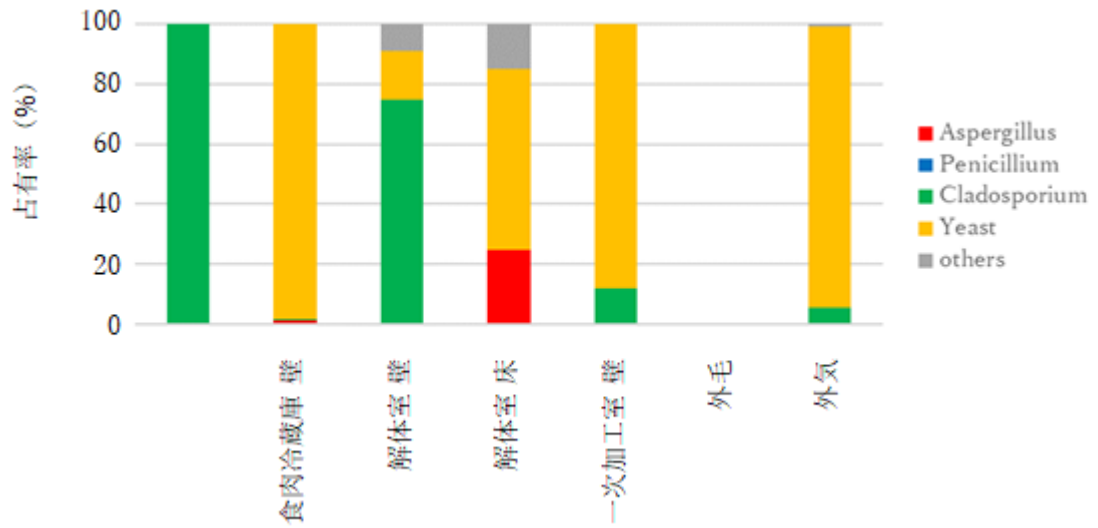
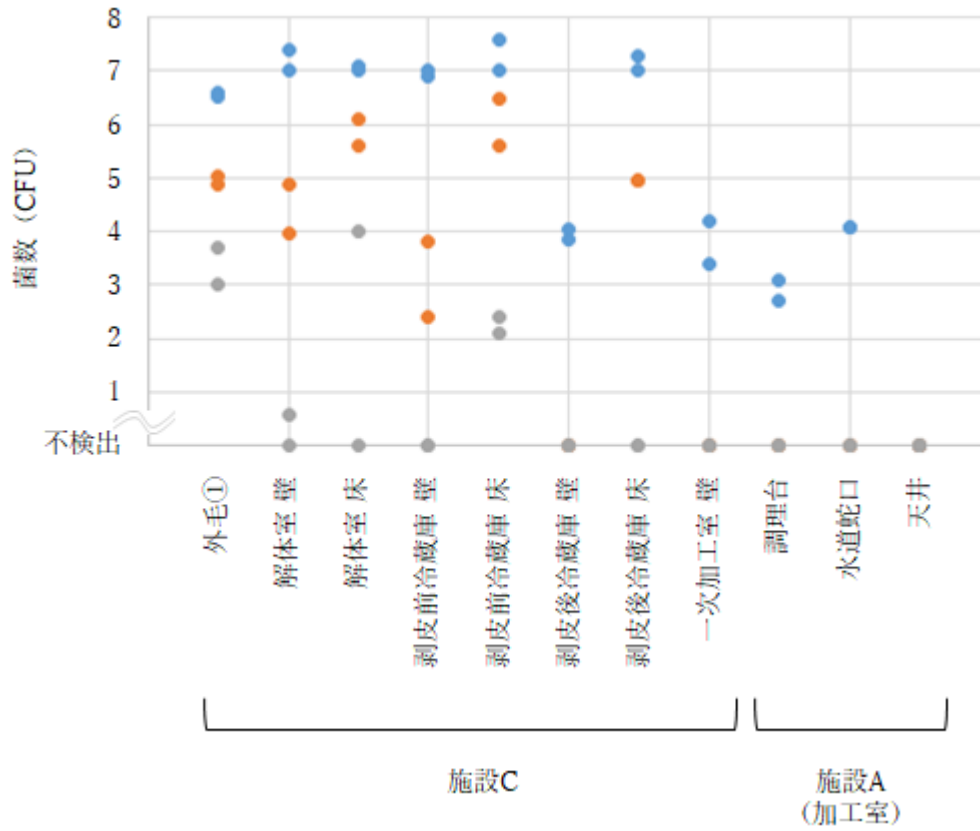


図 8 . 施設 D の拭き取り検体から検出された真菌数及びその構成

(A)



(B)

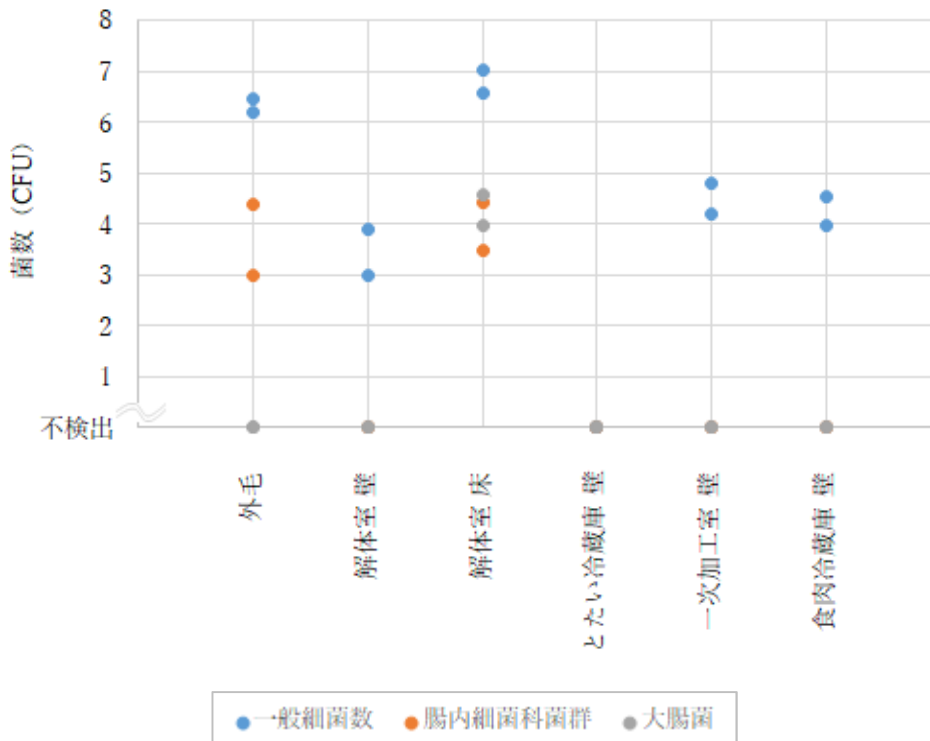


図9. 施設 C, D, A 由来拭き取り検体からの衛生指標菌検出状況
(A) 施設 C 及び A、(B) 施設 D 由来検体を示す。

表 1. 猪缶詰製造工程を通じた細菌動態に関する検討成績概要









検体種別	検体番号	検体画像	施設	部位・品名	衛生指標菌 (CFU/g)					サルモネラ属菌	腸管出血性大腸菌	
					一般細菌数	腸内細菌科菌群	大腸菌群	大腸菌	黄色ブドウ球菌			
原料肉	1		A	モモスライス	5.0.E+01	<5	<5	<5	<5	-	-	
	2				0.0.E+00	<5	<5	<5	<5	-	-	
	3				1.0.E+02	<5	<5	<5	<5	-	-	
	4				0.0.E+00	<5	<5	<5	<5	-	-	
	5				5.5.E+02	<5	<5	<5	<5	-	-	
	6				2.0.E+02	<5	<5	<5	<5	-	-	
	7			ローズスライス	2.6.E+03	5.0E+01	<5	<5	5.0.E+00	-	-	
	8				5.1.E+03	5.0E+01	<5	<5	<5	-	-	
	9				5.0.E+01	<5	<5	<5	<5	-	-	
	10				5.0.E+01	<5	<5	<5	<5	-	-	
	11				1.0.E+02	<5	<5	<5	<5	-	-	
	12				0.0.E+00	<5	<5	<5	<5	-	-	
	13		B	モモスライス	1.2.E+06	<5	1.5.E+03	<5	5.0.E+00	-	-	
	14				5.2.E+05	<5	1.6.E+03	<5	<5	-	-	
	15				5.4.E+05	2.9.E+04	4.5.E+02	<5	3.1.E+02	-	-	
	16				3.7.E+05	2.3.E+04	1.0.E+02	<5	2.1.E+02	-	-	
	17				1.4.E+03	<5	<5	<5	<5	-	-	
	18				1.4.E+03	<5	<5	<5	<5	-	-	
	19				カタスライス	2.0.E+06	<5	2.3.E+03	<5	5.0.E+00	-	-
	20					1.6.E+06	<5	9.5.E+02	<5	<5	-	-
	21					2.9.E+04	3.0.E+02	<5	<5	1.6.E+02	-	-
	22					2.4.E+04	5.0.E+02	1.0.E+02	<5	3.5.E+01	-	-
	23					5.4.E+03	<5	<5	<5	7.5.E+01	-	-
	24					8.4.E+03	<5	<5	<5	8.0.E+01	-	-
中間製品	25		A	ポトフ煮	<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	26				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	27				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	28				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	29				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	30				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	31				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	32				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	33				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	34				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	35			ビール煮	<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	36				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	37				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	38				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	39				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	40				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	41				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	42				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	43				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	44				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
最終製品 (加圧加熱殺菌後)	45		A	ポトフ煮	<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	46				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	47				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	48				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	49				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	50				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	51				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	52				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	53				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	54				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	55			ビール煮	<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	56				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	57				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	58				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	59				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	60				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	61				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	62				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	63				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	
	64				<5	<5	<5	<5	<5	-	-	

表 2 . 真菌分布調査に供した検体一覧

施設	検体種類	採取場所
施設C	空気	外気
		剥皮前とたい冷蔵庫
		剥皮後とたい冷蔵庫
		一次加工室
	拭取り	猪外毛
		解体室の壁・床
		剥皮前とたい冷蔵庫の壁・床
		剥皮後とたい冷蔵庫の壁・床
一次加工室壁		
施設A	空気	外気
		加工室
	拭取り	調理台表面
		水道管蛇口
		天井板
施設D	空気	外気
		解体室
		とたい冷蔵庫
		一次加工室
		食肉冷蔵庫
		最終加工室
	拭取り	猪外毛
		解体室の壁・床
		とたい冷蔵庫の壁
		一次加工室の壁
		食肉冷蔵庫の壁
		加工肉の冷却保管庫壁

表 3 . 主な真菌属の施設・採材箇所別検出状況

真菌属	施設					
	施設C		施設A		施設D	
	空気浮遊	拭取り	空気浮遊	拭取り	空気浮遊	拭取り
<i>Acromonium</i>			加工室			
<i>Alternaria</i>					外気	解体室床
<i>Arthrospium</i>			外気			
<i>Aspergillus</i>		外毛、剥皮前とたい冷蔵庫床、剥皮後とたい冷蔵庫壁		調理台	外気、解体室、一次加工室、食肉冷蔵庫、最終加工室	解体室床、とたい冷蔵庫壁
<i>Aureobasidium</i>		剥皮前冷却保管庫床壁	外気		とたい冷蔵庫、食肉冷蔵庫	解体室床、とたい冷蔵庫壁
<i>Cladosporium</i>	剥皮前とたい冷蔵庫	剥皮前とたい冷蔵庫壁・床、剥皮後とたい冷蔵庫壁	加工室空気、外気		外気、解体室、とたい冷蔵庫、一次加工室、食肉冷蔵庫、最終加工室	外毛、解体室壁・床、とたい冷蔵庫壁、一次加工室壁
<i>Geotrichum</i>		外毛、剥皮前とたい冷蔵庫床、剥皮後とたい冷蔵庫床	加工室空気			
<i>Fusarium</i>					外気	
<i>Mucor</i>	剥皮前とたい冷蔵庫	外毛、剥皮前とたい冷却保管庫床	加工室空気			
<i>Penicillium</i>		剥皮後とたい冷蔵庫				
<i>Penicillium</i>	剥皮前とたい冷蔵庫、剥皮後とたい冷蔵庫	外毛、剥皮前とたい冷蔵庫床・壁、剥皮後とたい冷蔵庫壁	加工室	調理台	外気、解体室、とたい冷蔵庫、一次加工室、食肉冷蔵庫、最終加工室	
<i>Phoma</i>	剥皮後とたい冷蔵庫				外気	解体室床
<i>Trichoderma</i>			加工室空気			
<i>Trichosporon</i>		解体室壁、剥皮後とたい冷蔵庫床・壁				
<i>Ulocladium</i>	剥皮後とたい冷蔵庫	外毛				

平成 30 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「野生鳥獣由来食肉の安全性確保とリスク管理のための研究」

分担研究報告書

野生鳥獣由来食肉の加熱調理条件に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	永田文宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	山田 研	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
	秋本真一郎	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
	迫井千晶	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
	小山瑞季	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校
	五領田小百合	学校法人辻料理学館辻調理師専門学校

研究要旨

野生鳥獣由来食肉の加熱調理にあたっては、近年低温加熱調理が多用される傾向にある。一方で、同加熱条件の妥当性に関する知見は十分に得られていない。本研究では、鹿肉及び猪肉を対象として、スチームコンベクションオーブを用いた低温加熱調理による病原微生物汚染低減効果を検討した。芯温測定記録を基に加熱殺菌量を求め、63℃・30分との同等性を評価したところ、約 80g のブロック肉検体の芯温が 65℃～75℃ となった場合の加熱時間は 65℃ で 19 分、68℃ で 12 分、70℃ で x x 分、75℃ で 1 分と厚生労働省 Q&A で示される条件とほぼ同等であった。腸管出血性大腸菌 0157:H7 (NIHS208 株, NIHS470 株)、サルモネラ属菌 (*S. Enteritidis* NIHS562, *S. Typhimurium* LT2)、及びコクサッキー B5 ウイルス (CB5 株, ノロウイルスの近縁で同等の耐熱性を有するウイルス) について、添加回収試験を通じた汚染低減効果を検証したところ、2 種の細菌については 10^6 オーダー以上、ウイルスについては 10^4 オーダー以上の低減を認め、十分な加熱殺菌効果を有する条件であることが実証された。また、猪肉をフライパンでポワレ調理し中心部を 75℃ で 1 分間加熱した際にも同等以上の加熱殺菌効果が得られ、その適切性が示された。以上の成績は、微生物危害低減をはかるための加熱調理条件例として、今後調理施設で各自が検証により条件を設定する際に活用されることが期待される。

A. 研究目的

近年の農林水産業をめぐる鳥獣被害の増加

を受けて、野生鳥獣の食用としての利活用に

よる鳥獣被害対策や地域活性化への取り組み

が薦められている。農林水産省では、本年度に国産ジビエ認証制度を設け、ジビエの衛生的な利活用を推進している。食品の衛生管理確保については、厚生労働省が平成26年11月に野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドラインを策定し、とちく場

に倣った衛生的な取り扱いを定め、周知したほか、本年度に入り、ジビエ振興協会により、HACCP手引書の作成も検討されている¹⁾。一方、野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドラインでは、解体から調理に至るフードチェーン全体での衛生的な取り扱い方法について、詳細に例示されてはならず、各事業者が衛生的な取り扱いを行う上では、科学的根拠に基づく実態の把握並びに衛生確保に資する情報の提供が求められている。

こうした背景を踏まえ、本分担研究では、野生鳥獣肉の加工調理段階における衛生管理の在り方を示す一例として、鹿肉及び猪肉を対象とした場合の、低温加熱調理を通じた微生物汚染挙動について、調理専門家を含めた形で検討を行ったので報告する。

F. 研究方法

1. 食品検体及び加熱調理条件

(i) 無包装状態での検証

本研究では、鹿ロース肉、猪ロース肉、猪外モモ肉を供試した。同検体は、解体加工後、冷凍保存・輸送されたものを、4 下で一晩自然解凍させた後、試験に供した。検体の別による、加熱条件は以下のとおりである(図2)。

1) 鹿ロース肉：45 g～63 g重量に整形した鹿ブロック肉を、65、68、75 (設定温度)に予熱したスチコンベクションオープン(ホシザキ MIC-5TB3、以下スチコンと記載)内での加熱調理に供した。検体芯温が各設定温度に達した時点より、65 では15分、68 では5分、75 では1分を経過した時点で氷冷

した。

2) 猪ロース肉(ロースト調理)：約230 g-290 g重量に整形した猪ロースブロック肉をスチコンに入れ、160 設定温度で加熱した。検体芯温が60 に達した時点で取り出し、アルミホイルで包み、スチコン上部に静置し余熱で加温し、検体芯温が68 で5分間を満たした時点で氷冷した。

3) 猪外モモ肉(ポワレ調理)：約73 g - 93 g重量に整形した猪外モモブロック肉をIH用フライパン上で加熱調理に供した。強火で加熱を開始し、検体表面に焼き色がついてきた時点で中火に調整した。検体芯温が75 1分を満たした時点で氷冷した。

2. 殺菌加熱量の算出

項1-1)~3)の加熱調理を行った際の検体中心部における温度推移をHiTemp140-PT (Madge Tech社)を用いて1分毎に測定記録した。測定記録値を下式にインプットし、部分的殺菌価 $[L]$ 及び全体殺菌価 $[L]$ を求めた²⁾。

$$[L] = (L_i + L_{i-1}) / 2 \times t_i$$

($L_i + L_{i-1}$ ：連続したL値の合計(L値は各時間での加熱殺菌価、 t_i は測定時間間隔(分)を示す)

3. 病原性微生物を用いた添加回収試験(図1)

腸管出血性大腸菌 0157:H7 2株(266株及び470株)、サルモネラ属菌 2株(*S. Typhimurium* NIHS553株及び*S. Enteritidis* NIHS562株)及びコクサッキーウイルス B型5群(CB5株)の混合微生物懸濁液を調整後、26G ニードル及びゴムシールを用いて各検体の中心部に接種した。同検体は、上記1. 1) - 3)に示した各条件に従って加熱調理後、滅菌ストマッカー袋(セントラル科学貿易)内で氷冷させた。滅菌袋で検体全量を細切した後、検体の3倍重量の緩衝ペプトン水(BPW、Oxoid)を加え、1

分間ストマッキング処理を行った。これを試験原液として、以下の衛生指標菌及び添加病原細菌の定量試験、ウイルス力価測定試験に供した。

(i) 衛生指標菌、STEC 0157、及びサルモネラ属菌定量試験

上記 3. で調整した懸濁溶液 100 μ L を、標準寒天培地、Violet Red Bile Glucose (VRBG) 寒天培地、クロモアガーSTEC、クロモアガーサルモネラ各 2 枚 (検体あたり) に接種し、各培地の条件に従って (衛生指標菌については ISO 法が定める条件に従って) 培養を行い、それぞれの対象菌を定量検出した。

(ii) ウイルス力価測定

上記 3. で調整した懸濁溶液を遠心分離し、上清 2 ml を 0.45 μ m フィルターろ過した。同ろ液を用いて、50%感染終末点法による感染価の測定に供した。

G. 研究結果

1. 加熱調理を通じた検体芯温挙動

63 30 分間加熱により得られる加熱殺菌価 L は 30.0 と試算された。これを指標として、鹿ロース肉、猪ロース肉、猪外モモ肉の加熱調理を通じた加熱殺菌価を求めた。各条件下での温度変化及び検体剖面像は図 3 に示した通りであり、設定温度が高いほど、検体芯温は速やかに上昇する傾向が認められた。

1) 鹿ロース肉 (図 4)

スチコンを用いた加熱調理を通じて得られた殺菌加熱量は中心温度 65 15 分加熱で 91.0 ± 19.2 、68 5 分で 154.1 ± 6.5 、75 1 分で 5410.4 ± 310.0 と試算され、63 30 分間の加熱と同等以上であった。

2) 猪肉 (図 4)

猪ロース肉をスチコンで芯温が 60 に到達した後、余熱調理により芯温が 68 5 分間となるよう、保持した際の殺菌加熱量は 4939.1

であった。また、猪外モモ肉をポワレ調理により、芯温 75 で 1 分間保持した際の加熱殺菌量は 10196.1 ± 8900.0 となり、63 30 分間の加熱条件と同等以上と試算された。

2. 添加回収試験による各加熱調理条件の検証

各加熱調理を通じた微生物汚染低減効果を評価するため、腸管出血性大腸菌 0157、サルモネラ属菌、及びコクサッキーウイルス B 型 5 群混合懸濁液を検体中心部に接種し、項 1-1)~3) に示す加熱調理を通じた微生物挙動を定量的に求めた。併せて、自然汚染を顕す一般細菌数及び腸内細菌科菌群数についても同時に求めた (図 5)。

1) 鹿ロース肉

加熱前検体 (無加熱群) における一般細菌数、腸内細菌科菌群、腸管出血性大腸菌 0157、サルモネラ属菌数、ウイルス感染価の平均 (接種) 値はそれぞれ 8.2×10^7 CFU/g、 6.8×10^7 CFU/g、 2.4×10^6 CFU/g、 2.1×10^7 CFU/g、 7.1×10^4 TCID₅₀/ml であった。65 15 分及び 68 5 分加熱後の一般細菌数平均値はそれぞれ 4.8×10^3 CFU/g 及び 4.5×10^3 CFU/g であったが、両条件の加熱調理後には、他の微生物はいずれも検出されなかった。また、75 1 分間加熱群では、一般細菌数を含む全ての対象微生物が不検出であった。

2) 猪肉

$1.6 \sim 9.9 \times 10^6$ CFU/g の腸管出血性大腸菌 0157、及び $1.7 \sim 6.1 \times 10^6$ CFU/g のサルモネラ属菌を実験的に中心部に接種した猪肉検体について、項 1-2) ~ 3) に示す条件で加熱調理を行ったところ、すべての対象微生物は不検出であった。

H. 考察

本研究では、加熱処理工程における殺菌効

果を比較評価するための指標の一つとして、検体芯温推移に基づく殺菌加熱量の考え方を採用し、野生鳥獣由来食肉の代表的な加熱調理法を実施した際の同値を求めることで、63 30分加熱と同等以上の加熱殺菌量が、厚生労働省がQ&Aとして提示する、65 15分、68 5分、75 1分が妥当であることを検証した。加熱殺菌の妥当性評価には他の推定手法も存在するため、今回求めた温度推移データを用いた評価も継続して実施する必要があると思われる。

微生物汚染低減効果が期待できるとした複数の加熱調理条件の適切性は、添加回収試験により実証された。微生物汚染実態として、先行研究において、我々は鹿肉製品 120 検体のうち、1 検体で腸管出血性大腸菌を検出したことを報告している⁴⁾。当該病原菌の汚染菌数については明確ではないものの、直接培養では検出されないことを踏まえると、1g 当たりの汚染菌数は 10CFU 未満と推察され、本研究で示した汚染低減効果により十分な安全性確保が図られると推察される。一方で、本研究で対象とした検体はあくまでも例示であり、野生鳥獣由来食肉のフードチェーン実態を踏まえると、例えば真空包装された当該食肉を直接加熱調理に供した際の微生物挙動に関する知見等は今後検討が必要な事項と考えられる。また、現在は家庭用調理器具としても、低温加熱調理法は広がりを見せているため、より幅広い調理手法を視野に入れた適切な調理法についても今後検討を進めることは、野生鳥獣由来食肉の加工調理段階における安全性確保の推進に寄与すると思われる。

本研究で示した殺菌加熱量に基づく加熱調理条件の妥当性推定法は今後、野生鳥獣由来食肉を取り扱う加工調理施設等において加熱調理条件を設定する際の有効な補助的ツールとなるものと期待される。一方で、使用する

調理器具・機器の性質や検体の種別・大きさ、更には温度測定機器の精度・管理等によっても差異が生じる可能性があることに十分な留意が必要であることも併せて周知することが必要であろう。

I. 結論

本研究では、野生鳥獣由来食肉の適切な加熱調理条件の例示を目的として、加熱調理条件の妥当性推定法を示すと共に、添加回収試験を通じた検証を行い、具体的な条件を例示した。本研究の成績は、HACCP 手引書等を作成する上での関連事業者の参考知見として活用されることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 山本詩織、関 享子、朝倉 宏：低温加熱調理を通じた鶏肉における微生物汚染低減効果及び検体中心温度推移に関する検討 . 日本食品衛生学会第 114 回学術講演会、広島、2018 年 11 月 15 日 .
- 2) 永田文宏、上間 匡：低温加熱によるシカ肉中のウイルス感染価の変化 . 日本食品衛生学会第 114 回学術講演会、広島、2018 年 11 月 15 日 .
- 3) 山本詩織、川瀬 遵、池田徹也、上間 匡、迫井千晶、秋元健一郎、山田 研、朝倉 宏：野生鳥獣由来食肉の微生物学的品質と志賀毒素産生性大腸菌の汚染実態に関する検討 . 第 22 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、東京、2018 年 11 月 8 日 .

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

- 1) 一般社団法人日本ジビエ振興協会、
http://www.gibier.or.jp/damage/
- 2) 芝崎 勲、新・食品殺菌工学、1998

- 3) Fidel Toldrá、Safety of Meat and Processed Meat, Springer, 2009

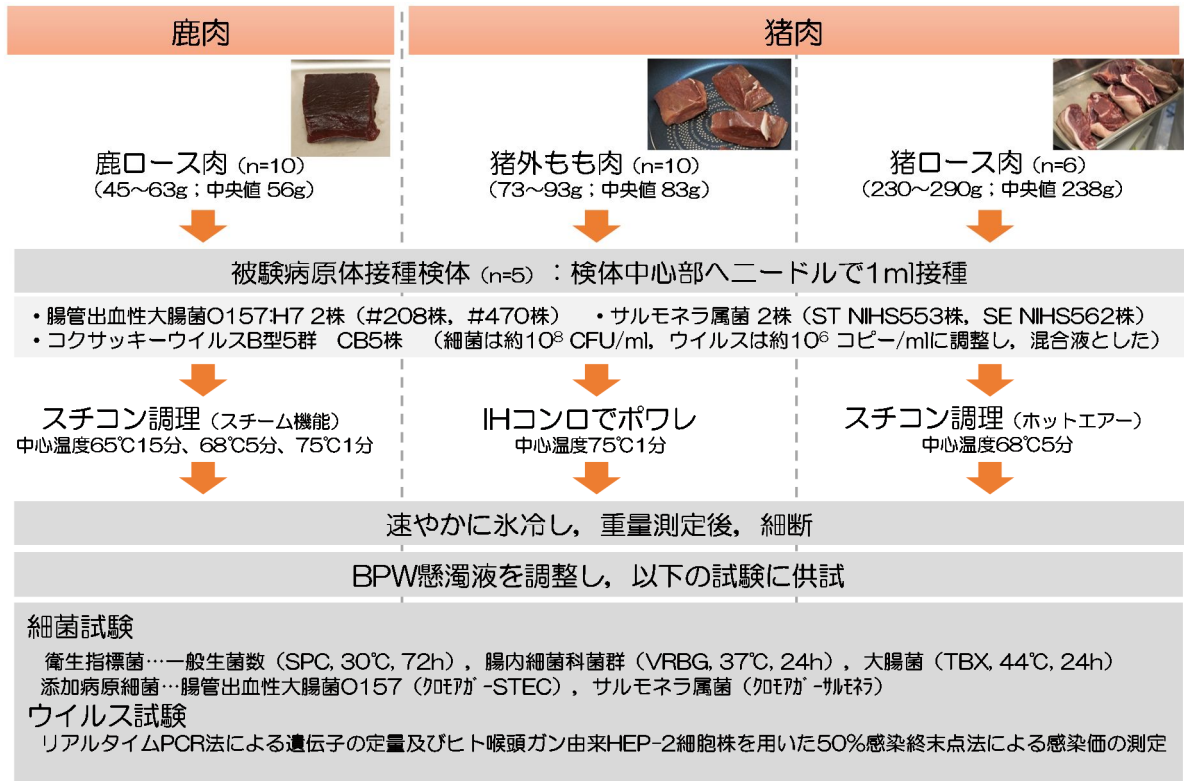


図1. 加熱調理を通じた微生物汚染低減効果検証フロー

〔ポワレ〕

- 温度ロガーを検体中心部に穿刺
- フライパンに猪外もも肉，バターを入れ，加熱開始



- 強火で焼き、焼き色がついてきた段階で中火に調整



- 検体中心が75℃1分加熱した時点で加熱終了
- 温度記録を回収及び微生物試験を実施

〔ロースト〕

- 160℃でスチコンを予熱
- 猪ロース肉を庫内に入れ，加熱開始



- 検体中心温度が60℃に達した段階で取り出し
- アルミホイルで包み，スチコンの上で余熱加温



- 検体中心温度が68℃で5分間加熱を満した段階で終了
- 温度記録を回収及び微生物試験を実施

図2．猪肉検体の加熱調理概要

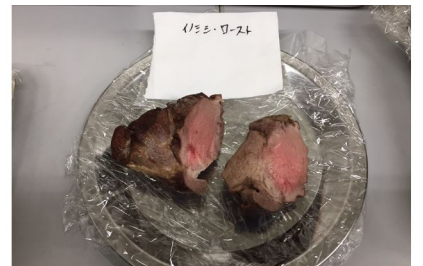
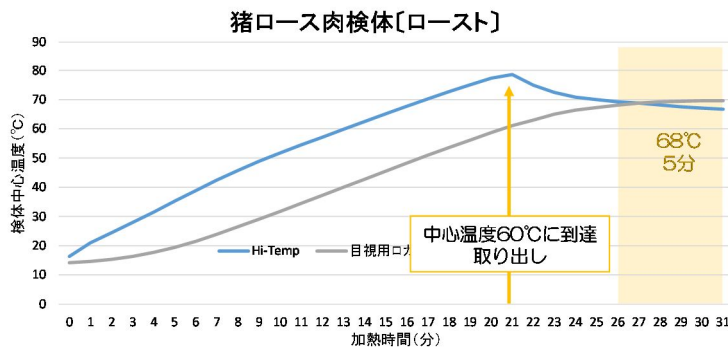
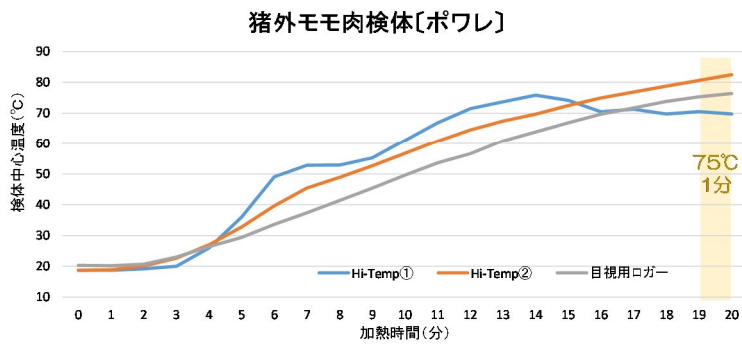
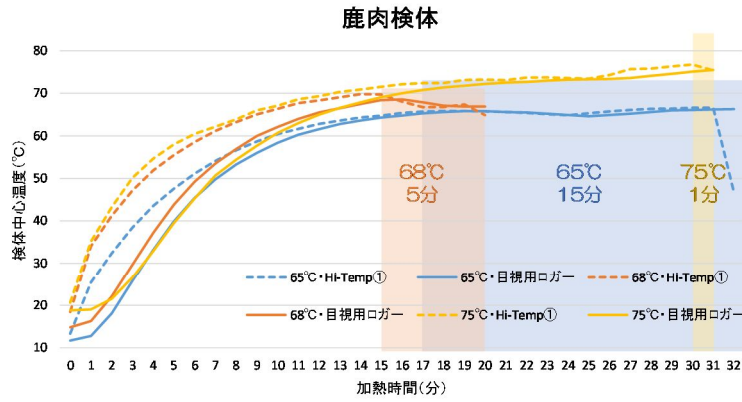


図3. 検体中心部位における温度推移と断面所見

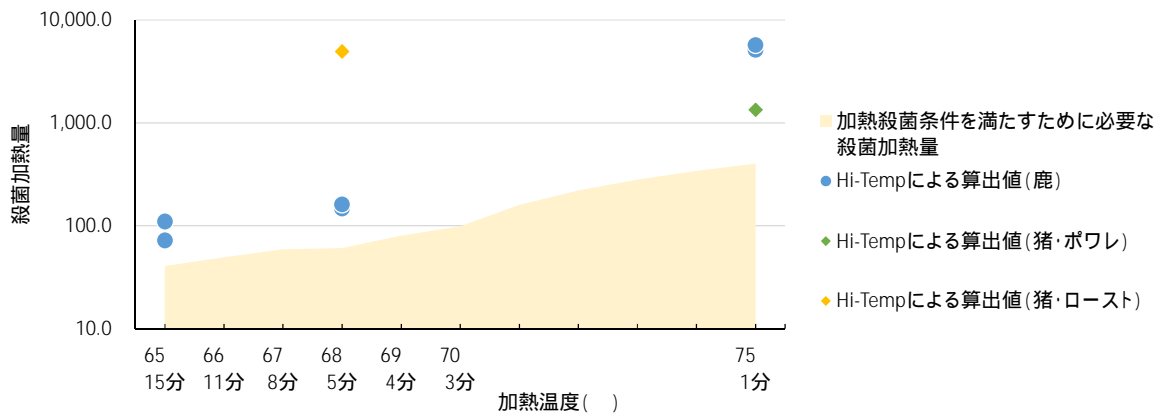
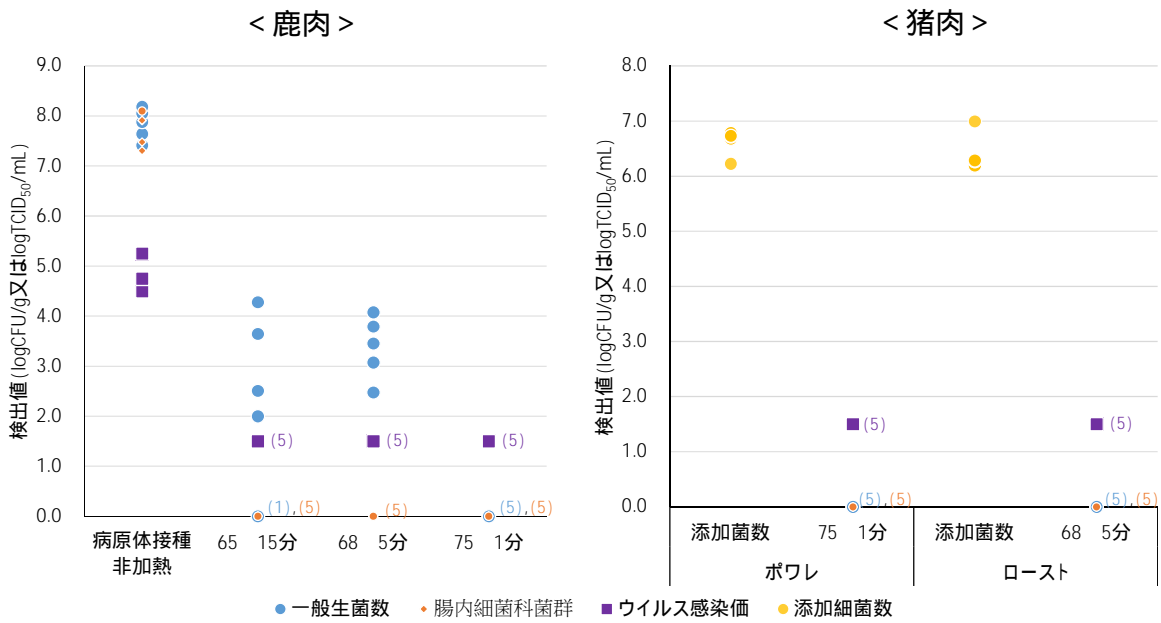


図4. 各加熱調理条件を通じて得られた殺菌加熱量



ウイルス感染価は、1.5 logTCID₅₀/mLで検出限界以下である。

図5. 鹿肉、猪肉の加熱調理工程を通じた微生物汚染低減効果の検証（添加回収試験）