

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

食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究

平成 29 年度 総括・分担研究報告書

平成 30 年 3 月

研究代表者

堀内 基広

(北海道大学大学院獣医学研究院)

平成 29 年度 食品の安全確保推進研究事業  
「食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究」  
班員名簿

堀内 基広	北海道大学 大学院獣医学研究院	教授
新 竜一郎	宮崎大学 医学部 感染症学講座	教授
柴田 宏昭	自治医科大学 先端医療技術開発センター	講師
飛梅 実	国立感染症研究所 感染病理部	主任研究官
安富 康宏	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学 学研究センター	センター長
萩原 健一	国立感染症研究所 細胞生化学部	第 1 室室長
福田 茂夫	北海道総合研究機構 畜産試験場 基盤研究部 畜産工学 グループ	研究主任
古岡 秀文	帯広畜産大学 畜産学部 基礎獣医学研究部門	教授
松浦 裕一	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動 物衛生研究部門	主任研究員
山崎 剛士	北海道大学 大学院獣医学研究院	助教
鎌田 洋一	甲子園大学 栄養学部フードデザイン学科	教授
壁谷 英則	日本大学 資源科学部獣医学科	准教授
森田 幸雄	東京家政大学 家政学部	教授

## 目次

I.	総括研究報告書（平成 29 年度）	
	食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究・・・・・・・・・・・・・・・・	2
	研究代表者：堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究院）	
II.	分担研究報告書	
1.	C-, L-, H-BSE 鑑別・高感度検出用 RT-QuIC 法の確立・・・・・・・・・・・・・・・・	1 3
	定型および非定型 BSE 感染マウスのトランスクリプトーム	
	研究代表者 堀内 基広（北海道大学・大学院獣医学研究院）	
	研究分担者 山崎 剛士（北海道大学・大学院獣医学研究院）	
2.	ケミカルバイオロジーによる抗プリオン化合物の作用機序の解析・・・・・・・・	1 9
	研究分担者 新 竜一郎（宮崎大学・医学部）	
3.	カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスク評価・・・・・・・・	2 3
	研究分担者 柴田 宏昭（自治医科大学・先端医療技術開発センター）	
	研究分担者 安富 康宏（国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センター）	
4.	非定型 BSE 感染カニクイザルの病理学的解析・・・・・・・・・・・・・・・・	2 8
	研究分担者 飛梅 実（国立感染症研究所・感染病理部）	
5.	ウシ C-/L-BSE プリオンの生化学的な 判別および霊長類モデルへの伝播後の特性解析・・・・・・・・・・・・・・・・	3 2
	研究分担者 萩原 健一（国立感染症研究所・細胞化学部）	
6.	非定型（H 型）BSE 感染牛の潜伏期間における PrP <sup>Sc</sup> 蓄積・・・・・・・・	3 8
	研究分担者 福田 茂夫（北海道総合研究機構・畜産試験場）	
7.	BSE、非定型 BSE 感染動物の病態解析 - 異種間伝達実験による非定型 BSE の起源に関する研究 - ・・・・・・・・	4 1
	研究分担者 古岡 秀文（帯広畜産大学・畜産学部）	
8.	ウシ型プリオン蛋白質遺伝子発現 トランスジェニックマウスを用いた非定型 BSE 感染牛のプリオン体内分布解析・・・	4 5
	研究分担者 松浦 裕一（農研機構・動物衛生研究部門）	
9.	わが国のと畜場ならびに大規模食鳥処理施設における HACCP システム評価法 の検討とと畜場への HACCP 導入を支援する情報収集・・・・・・・・	4 8
	分担研究者 森田 幸雄（東京家政大学・家政学部）	
	分担研究者 壁谷 英則（日本大学・生物資源科学部）	
	分担研究者 山崎 剛士（北海道大学・大学院獣医学研究院）	
	分担研究者 鎌田 洋一（甲子園大学・栄養学部）	
III.	研究成果に関する刊行一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・	8 3
IV.	その他	

# 1. 総括研究報告書

平成 29 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）  
食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理に関する研究（H29-食品-一般-004）

総括研究報告書

研究代表者 堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究院 教授

**研究要旨**

英国で発生して世界に拡散した定型 BSE (C-BSE) は、飼料規制等の管理措置により発生は制御下にある。しかし、病型が異なる非定型 BSE (L-および H-BSE) が世界各地で 120 例程度摘発され、依然不安視されている。本研究では、食品を介する非定型 BSE の感染拡大を防ぐための安全対策等に貢献することを目標として、非定型 BSE 感染牛の可食部および特定部位に存在するプリオンの定量化、非定型 BSE のヒトへの感染リスクの推定に資する研究を進め以下の成果を得た： 1) シカ組換えプリオンタンパク質 (PrP) とヒツジ組換え PrP-ARQ を基質として、実用に十分な検出感度を保ちつつ、C-, L-, H-BSE を識別可能な RT-QuIC 法を確立した。2) ウシ PrP 過発現マウスを用いたバイオアッセイにより H-BSE プリオンの感染価を測定する用量反応標準曲線を作成した。3) L-BSE 経口投与ザルを投与後 6 年 3 か月経過観察したが発症は確認出来なかったことから、L-BSE のヒトへの経口感染リスクは高くないことが示唆された。4) H-BSE 脳内接種ザルは接種後 2 年 4 ヶ月を経過したが、発症は認められていないことから、H-BSE は L-BSE と比較してヒトへの感染リスクが低い可能性が示唆された。5) BSE 感染モルモットの病理学的特徴は、脳幹部神経核を由来とする苔状線維、顆粒細胞、平行線維の系統変性疾患に類似した病態であった。

我が国のと畜場・食鳥処理場への HACCP 導入義務化をふまえ、我が国の現状に適したと畜場・食鳥処理場の内部・外部検証システムを構築する基礎研究として、施設内に衛生検査スタッフが常駐している大規模と畜場および食鳥処理場の協力を得て拭き取り検査を実施した。牛、豚、および鶏の処理を行うと畜場（牛 2 力所、豚 2 力所、並びに食鳥処理場 2 力所）において枝肉の拭き取り検査を実施し、欧米の HACCP 効果検証法を含めた HACCP 検証プロトコール候補を比較検討した。その結果、牛では、「ともばら」を「冷蔵前」に採材することにより、最も多くの一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群の検出率が最も高かった。豚では、「胸、および頸」を「冷蔵前」に採材することにより、最も多くの一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群のみ検出され、「冷蔵前」に「胸」から採取した検体からのみ検出された。これらのデータは HACCP の内部・外部検証システムを構築する際の重要な知見である。また、と畜場・食鳥処理場への HACCP 導入を促進するため、と畜・食鳥処理工程における危害情報を収集した。本年度は、牛、および豚を対象に、処理工程と、危害を減少させる各種薬剤処置を行っている文献について、調査した部位、細菌の種類と数、制御処置前後の菌数の変化情報を一覧に集積した。

## 研究分担者

新 竜一郎(宮崎大学・医学部・感染症学講座教授)

柴田 宏昭(自治医科大学・先端医療技術開発センター 講師)

安富 康宏(国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・霊長類医科学研究センターセンター長)

飛梅 実(国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官)

萩原 健一(国立感染症研究所・細胞生化学部第1室室長)

福田 茂夫(北海道総合研究機構・畜産試験場・基盤研究部・畜産工学グループ 研究主任)

古岡 秀文(帯広畜産大学・畜産学部・基礎獣医学研究部門 准教授)

松浦 裕一(国立研究開発法人・農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門 主任研究員)

山崎 剛士(北海道大学・大学院獣医学研究院助教)

鎌田 洋一(甲子園大学・栄養学部フードデザイン学科 教授)

壁谷 英則(日本大学・資源科学部獣医学科准教授)

森田 幸雄(東京家政大学・家政学部 教授)

## A. 研究目的

最近、スクレイパーがヒトに伝達する可能性(Cassard et al, 2014)、孤発性 CJD 患者の様々な

末梢組織にプリオンが存在すること(Takatsuki et al, 2016) など、プリオン病の病態の再考を促す知見が集積しているため、プリオン病のリスク管理に資するさらなる知見が必要である。L-BSE は経口ルートでサルに感染するので、食品を介してヒトに感染するリスクがあるが、H-BSE のヒトへの伝達性は明らかでない。また、非定型 BSE のみならず、プリオンが異種動物に伝播する過程で性状が変化してヒトへの感染性を獲得する可能性を含めて、感染リスクを判断する必要がある。

そこで、H-BSE を接種したサルの解析、および BSE プリオン増幅技術による非定型 BSE 感染牛の可食部および特定部位に存在するプリオンの定量化により、感染リスクの推定を行う。また、定量解析に必要な技術の改良と精度管理を行う。さらに、非定型 BSE のヒトへの感染リスクを推定するため、カニクイザル、ヒト PrP 発現マウスなどを用いた動物実験を行う。これらを通じて、プリオンの感染拡大を防ぐためのリスク管理に貢献する。

と畜場における衛生管理システムを科学的に評価する手法は、既に HACCP を導入している施設における HACCP 効果検証手法としても活用でき、また、国内の HACCP 導入の推進につながる。そこで、欧米のと畜場で導入されている衛生指標菌を用いた HACCP 効果検証手法を参考にしつつ、国内の肉牛、豚、ブロイラーのと畜・解体工程における衛生管理を総合的に評価するための採材ポイント、頻度、および手法を、検体の輸送・保管方法を含めて検討し、国内の施設でも技術・コスト面で実施可能な衛生管理システム評価手法を作成する。と畜処理工程における、サルモネラ属菌などの有害微生物汚染の低減法に関する知見を文献検索等により収集し、必要があれば実証実験を行う。これらを通じて、と畜場・食鳥衛処理場の衛生管理対策の高度化に貢献する。

本研究では、と畜場の衛生管理対策とプリオン病に関する研究を進め、食品を介する家畜・家禽疾病のリスク管理の向上に資する知見を得ることを目的とする。

## B. 研究方法

< BSE 等プリオンのヒトへの病原性等に関する科学的知見の収集 >

- 1) 非定型 BSE 感染牛の組織 (可食部および特定部位) のプリオン感染価の測定、ならびに定型 BSE、非定型 BSE 病態の解析

1-1) C-, L-, H-BSE を識別可能な RT-QuIC 法を確立するために、シカ組換えプリオンタンパク質 (rCerPrP)、ヒツジ組換え PrP (rShPrP-ARQ) など を 基 質 と し て RT-QuIC を 行 っ た。

1-2) H-BSE 実験感染牛の可食部におけるプリオン感染価をウシ PrP 発現 Tg マウスを用いるバイオアッセイにより測定した。

1-3) 各種 BSE 感染牛、BSE および他の動物プリオン病の病態モデルの比較から、脳内 PrP<sup>Sc</sup> の蓄積の経時的・空間的变化、および体内伝播様式を解析した。

- 2) カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスクの解析

2-1) H-BSE を脳内または経口接種したカニクイザルの経過観察、高次脳機能試験を実施した。定期的に尿、唾液、および脳脊髄液を採材して PrP<sup>Sc</sup> を調べた。

< と畜場・食鳥処理場の衛生管理システムの評価手法の開発 >

- 1) 食肉処理工程における微生物性危害因子の動態情報収集

と畜場、食鳥処理場への HACCP 導入の際に CCP を設定する際に必要な情報を整理するため、と畜場で処理されるウシおよびブタに関し、各処理行程における微生物性危害因子の分布状況を調査研究した文献情報を収集整理した。

- 2) と畜場における HACCP システムの妥当性検証に関する実地研修会資料作成

米国、および EU ではその妥当性検証試験が実施されているが、我が国では、各導

入施設が各自の判断で実施しているにとどまる。欧米および我が国の妥当性検証に関する現状と、妥当性検証試験の必要性を周知するための資料を作成した。

- 3) と畜場での HACCP システムの妥当性を検証する衛生指標菌を用いた試験法開発

ウシ、ブタ、食鳥それぞれのと体の数カ所についてふき取り検査を行い、一般生菌、大腸菌群、大腸菌、腸内細菌科菌群、およびサルモネラの検出と定量を行い、衛生管理システムの評価手法を構築するための科学的根拠を収集した。

#### (倫理面への配慮)

各々の研究分担者が所属する機関での動物実験委員会等で審査を受けた動物実験プロトコル等に従い、実験動物の福祉および動物実験倫理に十分配慮して動物実験を実施した。感染症病原体等の取り扱いは、各々の機関の病原微生物等安全管理委員会あるいはバイオセーフティ委員会などの承認を得て実施した。

#### C. 研究結果

< BSE 等プリオンのヒトへの病原性等に関する科学的知見の収集 >

- 1) 非定型 BSE 感染牛の組織 (可食部および特定部位) のプリオン感染価の測定、ならびに定型 BSE、非定型 BSE 病態の解析

- 1-1) C-, L-, H-BSE を識別可能な RT-QuIC 法の確立

rCerPrP に加えてヒツジ組換え PrP-ARQ (rShPrP-ARQ) を用いることで、L-BSE と H-BSE を区別可能であることを見出した。H-BSE は rCerPrP でも rShPrP-ARQ でも同様に増幅でき、また終濃度 0.1% 非感染牛脳乳剤存在下でもその反応は阻害されなかった。一方 L-BSE は rCerPrP を基質とした場合と比

べて、rShPrP-ARQ を基質とした場合  $10^1$  乗程度反応が低下するが、終濃度 0.1% 非感染牛脳乳剤存在下では、増幅効率が低下した。また、rShPrP-ARQ を基質として 0.1% 非感染牛脳乳剤存在下で RT-QuIC 反応により産生されるタンパク質分解酵素抵抗性 PrP (PrP-res) の産生量は、L-BSE で明らかに少なかった。以上の結果から、rCerPrP と rShPrP-ARQ を基質とする RT-QuIC 法により、C-, L-, H-BSE が識別可能となった。

また、確立した RT-QuIC 法を用いて、動物衛生研究部門から分与された、L-BSE 実験感染牛 2 頭、H-BSE 実験感染牛 2 頭の特定危険部位となる各種組織、およびその他の組織の感染価を推定するための RT-QuIC を実施している。

#### 1-2) H-BSE 実験感染牛の可食部におけるプリオン感染価の測定

H-BSE 感染牛 10%脳乳剤の  $10^0 \sim 10^{-4}$  希釈液で、すべてのウシ PrP 過発現マウス (TgBov) が BSE 感染陽性であった (図)。 $10^{-5}$  希釈液では 5 頭中 1 頭の Tg マウスが感染陽性であり、潜伏期間は 628 日であった。脳内投与後 800 日まで観察したが、 $10^{-6}$  希釈液では陽性 Tg マウスは確認されなかった。Spearman-Kärber 法により H-BSE 牛脳は 1g 中  $10^{7.4}$  LD<sub>50</sub>/g の感染価であると算出された。また、H-BSE 牛脳の希釈液に相当する感染価の対数 (Y) ごとの TgBov の潜伏期間 (X) の分布から、用量反応標準曲線の変化ポイントを  $10^{-3}$  希釈液 ( $10^{4.4}$  LD<sub>50</sub>/g, Y=4.4) での潜伏期間 (平均 329 日, X<sub>0</sub>) とした。その結果、H-BSE プリオンの用量反応標準曲線は、 $Y_1 = 19.32 + (-0.046) \times X$  ( $1 < X < 329$ ) ;  $Y_2 = 4.4 + (-0.0054) \times X$  ( $329 < X < 800$ ) と算出された (相関係数  $R^2=0.9676$ )。

PMCA 法で PrP<sup>Sc</sup> シード活性陽性の組織を選抜して、TgBov への感染試験を開始した。接種した TgBov は現在経過観察中である。

#### 1-3) 非定型 BSE から C-BSE 様プリオンが出現する可能性の探索

H28 年度までに、L-BSE プリオンを初代伝播 (脳内接種) させたカニクイザルの脳内で、L-BSE プリオンから C-BSE プリオンが出現する可能性は極めて低いことを示した。本年度は、さらにカニクイザルへ 2 代伝播 (脳内接種) を経た場合に C-BSE プリオンが出現するかという点を、研究班のリソースである 2 代継代ザルの前頭葉ホモジネートを C57BL/6J マウスへ脳内接種して調べた。C57BL/6J マウスは C-BSE プリオンに感受性/L-BSE プリオンに非感受性であるので、C-BSE プリオンが存在すればマウスは発症する。実験の結果、C-BSE プリオンを 2 代継代したカニクイザルの脳ホモジネートではマウスは  $287 \pm 10.4$  日で人道的エンドポイントに達した (= 陽性コントロール群) が、L-BSE プリオンを 2 代継代したカニクイザルの脳ホモジネートを接種したマウス (= 試験群) は、接種後 360 日を経過した現時点で健康であり、これまで、L-BSE プリオンから C-BSE プリオンが容易に出現することを示唆する結果は得られていない。

#### 1-4) BSE 感染モルモットの特徴的神経病変

脳内接種による BSE 感染モルモット小脳では、クーラーや sCJD-VV2 における小脳病変に類似した小脳皮質の萎縮がみられる。神経伝達物質トランスポーターを指標として形態学的に検討した。PrP<sup>Sc</sup> が重度に沈着し、顆粒細胞の消失がみられる部位に一致して VGlut1 陽性シナプスの減少・脱落がみられた。脳幹部では、橋小脳路を構成する前庭神経核、橋核の VGlut1 陽性シナプスが減少して



いた。超微形態学的に、顆粒層の軽度病変では苔状線維の脱落、中等度病変では顆粒細胞樹状突起の変性、重度では苔状口ゼットの消失が認められた。BSE 感染モルモット小脳では、PrP<sup>res</sup> の沈着により顆粒細胞の選択的な傷害が生じ、顆粒細胞の減少・脱落が起こる。次いで、顆粒細胞から伸びる平行線維が減少・脱落し、特徴的な神経変性病変を生じたと考えられる。加えて、橋小脳路に選択的なシナプスの脱落がみられたことから、顆粒層型小脳変性症に類似した系統的病変が起こっていることが示唆された。

## 2) カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスクの解析

### 2-1) L-BSE 経口投与群の臨床経過および剖検

L-BSE ウシ脳乳剤経口投与ザル（#18、#19）は投与 6 年 3 ヶ月後に安楽死を行った。両個体とも潜伏期に採取した体液中に PMCA で検出可能な微量の PrP<sup>Sc</sup> が検出されたが（平成 28 年度報告）安楽死時点までに運動障害や自傷行動以外の異常行動はなく、定期的に撮影したビデオ画像を確認しても、神経・精神症状共に見られず、発症は確認出来なかった。安楽死直後に脳の MRI 撮像を行ったが、発症した個体に見られる脳室拡張を伴う脳萎縮等の異常所見は認められなかった。また、剖検時の解剖所見も脳を中心に特に異常は認められなかった。

病理組織学的検索では、中枢組織では空胞変性などのプリオン病に特徴的な所見は認められず、抗プリオン抗体を用いた免疫組織化学的検索においてもプリオンの明らかな沈着は認められなかった。

### 2-2) H-BSE 接種群の臨床経過

H-BSE ウシ脳乳剤脳内接種ザル（#24、#25）経口投与ザル（#26、#27）は共に投与後 2 年 4 ヶ月を経過したが、運動障害、異常行動は認められず、神経および精神症状共に見られなかった。引き続き、経過観察中である。

## < と畜場・食鳥処理場の衛生管理システムの評価手法の開発 >

### 1) 「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料の作成

「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料を作成し研修会で活用した（分担研究 8. わが国のと畜場ならびに大規模食鳥処理施設における HACCP システム評価法の検討とと畜場への HACCP 導入を支援する情報収集の報告書を参照）。

### 2) 牛処理施設の細菌数

#### 2-1) 拭き取り部位の比較

2 施設（B1、B2）で冷蔵前および冷蔵後に、肛門、ともばら、胸から拭き取りを行い、一般細菌数を比較した。施設 B1 では拭き取り部位間で有意差は認められなかった。一方、施設 B2 では、冷蔵前の肛門で 4.1 cfu/cm<sup>2</sup>、ともばらで 1.9x10<sup>1</sup> cfu/cm<sup>2</sup>、胸で 7.5 cfu/cm<sup>2</sup> で、ともばらは、肛門に比べ、有意に高い値を示した。

一方、冷蔵後では、拭き取り部位間で有意差は認められなかった。

## 2-2) 採材ポイントの比較

2 施設ともに、一般細菌数は冷蔵前の検体で有意に高い値を示した。

## 2-3) 施設間の比較

ともばらで一般細菌数が多い傾向が認められたこと、また冷蔵前で一般細菌数が多かったことから、冷蔵前のともばらの検体について一般細菌数が、施設間比較を行ったところ、施設 B1 で  $1.3 \times 10^2$  cfu/cm<sup>2</sup>、同 B2 で  $1.9 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup> となり、施設 B1 の検体で有意に高い値を示した。

## 2-4) 糞便汚染指標細菌等の検出状況

施設 B2 では、何れの糞便汚染指標細菌も検出されなかった。

一方、施設 B1 では冷蔵前の試料で、4 検体 (4.4%) から腸内細菌科菌群が検出された。このうち、1 検体 (1.1% : 肛門) から大腸菌、および大腸菌群が検出された。

*Salmonella* は全ての検体で陰性であった。

## 3) 豚処理施設の細菌数

### 3-1) 拭き取り部位の比較

2 施設 (S1、S2) で冷蔵前および冷蔵後に、肛門、胸、頸から拭き取りを行い、一般細菌数を比較した。その結果、冷蔵前の検体において、施設 S1 で採取した検体の中央値は、肛門で 4.3 cfu/cm<sup>2</sup>、胸で  $4.5 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、頸で  $4.3 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup> で、胸、および頸は、肛門に比べ、有意に高い値を示した。一方、施設 S2 では、部位間で有意差は認められなかった。

### 3-2) 採材ポイントの比較

施設 S1 で採取された検体の中央値は、

冷蔵前後で、採材ポイント間で有意差は認められなかった。一方、施設 S2 では、冷蔵前で  $1.3 \times 10$  cfu/cm<sup>2</sup>、冷蔵後で検出限界未満となり、冷蔵前の検体で有意に高い値を示した。

### 3-3) 施設間の比較

冷蔵前後、および部位別ともに、施設間で一般細菌数に有意差は認められなかった。

### 3-4) 糞便汚染指標細菌等の検出状況

施設 S1 で 1 検体 (1.1%)、および施設 S2 で 2 検体採取されたもののうち、それぞれ 1 および 2 検体 (3.3%) から腸内細菌科菌群が検出された。これらは冷蔵前に採取された胸であった。

また、大腸菌、大腸菌群、ならびに *Salmonella* は陰性であった。

## 4) 鶏処理施設の細菌数

### 4-1) 拭き取り部位の検討

施設 C2 で処理された 10 羽の鶏について、3 カ所 (胸、腹、モモ) から採材し、一般細菌数を比較した。その結果、中央値が、胸で  $4.9 \times 10^3$  cfu/cm<sup>2</sup>、腹で  $5.6 \times 10^3$  cfu/cm<sup>2</sup>、モモで  $5.3 \times 10^3$  cfu/cm<sup>2</sup> と大きな差は認められなかった。

### 4-2) 拭き取り部位の比較

2 施設 (C1、C2) でチラー後に、胸、モモからそれぞれ拭き取りを行い、一般細菌数を比較した。その結果、施設 C1 では拭き取り部位間で有意差は認められなかったが、施設 C2 では、胸で  $3.7 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、モモで  $5.3 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup> で、モモは胸に比べ、有意に高い値を示した。

### 4-3) 施設間の比較

2 施設間で、胸、モモの一般細菌数を比較した。その結果、施設 C1 で採取した検体の中央値は、 $1.9 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、同 C2 で  $4.4 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup> で、施設 C2 は、同 C1 に比べ、有意に高い値を示した。

#### 4-4) 糞便汚染指標細菌等の検出状況

腸内細菌科菌群は、施設 C1 で 16 検体 (53.3%)、C2 で 20 検体 (66.6%) から検出された。

このうち、大腸菌群と大腸菌が検出されたものは、施設 C1 で 3 検体 (10.0%)、同 C2 で 1 検体 (3.3%) であった。

一方、*Salmonella* は施設 C2 の 1 検体 (3.3%) からのみ検出された。

### D. 考察

< BSE 等プリオンのヒトへの病原性等に関する科学的知見の収集 >

- 1) 非定型 BSE 感染牛の組織 (可食部および特定部位) のプリオン感染価の測定、ならびに定型 BSE、非定型 BSE 病態の解析

rCerPrP を基質に用いて、RT-QuIC の反応系に非感染牛脳乳剤を添加することで、C-BSE の異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の増幅は完全に阻害されるが、L-/H-BSE の PrP<sup>Sc</sup> の増幅は阻害されないことから rCerPrP を用いる RT-QuIC で C-BSE と L-/H-BSE は明確に区別可能となった。(平成 28 年度成果)。しかし、L-/H-BSE を区別することができなかった。

本年度、基質として rShPrP-ARQ を用いたところ、H-BSE の PrP<sup>Sc</sup> の増幅は阻害されないが、L-BSE の PrP<sup>Sc</sup> の増幅が完全ではないものの阻害されることを見出した。また、増幅産物中の PrP-res 量が、増幅が阻害されない H-BSE で多く、部分的に増幅が阻害される L-BSE で少ないという傾向を見出した。これらを組み合わせることで、高濃度脳乳剤存在下でも PrP<sup>Sc</sup> を検出可能であり、かつ

C-、L-、H-BSE を識別可能な RT-QuIC 法の実施が可能となった。

H-BSE 感染牛 (発症期) の脳に分布するプリオン感染価  $10^{7.4}$  LD<sub>50</sub>/g は、C-BSE (  $10^{6.6}$  LD<sub>50</sub>/g ) や L-BSE (  $10^{6.9}$  LD<sub>50</sub>/g ) の感染牛と同レベルであると考えられる。また、用量反応標準曲線を用いることで、H-BSE 感染牛の組織に分布するプリオン感染価を脳と比べて 1/100、000 まで測定可能であると考えられた。

また本年度は、カニクイザルの脳内で L-BSE プリオンから C-BSE プリオンが出現・増殖する可能性について調べた。C57BL/6J マウスを用いたバイオアッセイの結果から、L-BSE プリオンがカニクイザルへ 2 代伝播しても C-BSE プリオンが出現する可能性は低いと考えられた。

BSE 感染モルモットの小脳医病変は特徴的な所見を呈した。顆粒層および分子層、さらには脳幹部各神経核における VGlut1 陽性シナプスの減少・消失は、PrP<sup>res</sup> の沈着による苔状線維 顆粒細胞間シナプスの減少あるいは消失を示唆し、顆粒細胞神経突起である平行線維シナプス減少・消失に至ったものと考えられた。小脳失調型 CJD においても顆粒細胞の減少がみられ、苔状線維 顆粒細胞間シナプスにおける PrP<sup>Sc</sup> 沈着によって顆粒細胞が消失した結果、顆粒細胞から伸びる平行線維が消失することが病変形成に関与することが報告されている。

苔状線維は橋核に由来するが、その橋核において、VGlut1 陽性シナプスの減少がみられた。一方、小脳核、オリブ核の VGlut2 陽性シナプスの発現に変化はみられなかった。大脳皮質からの情報は、大脳皮質-橋-小脳系を通じて小脳皮質に伝えられる。このうち、橋小脳路に選択的なシナプスの脱落がみられたことから、系統的変性が起

こっていることが示唆され、顆粒層における変化と合わせると、顆粒層型小脳変性症に類似した病態であると考えられた。

## 2) カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスクの解析

L-BSE 経口投与については、Mestre-Francé らのグループが、カニクイザルなどの真猿類より下等な原猿類であるハイロネズミキツネザルでの伝播を報告したが、ヒトに近い真猿類での論文報告はまだない。今回のカニクイザルへの経口投与による L-BSE 感染実験 (#18、#19) では、6 年 3 ヶ月経過観察をしたが、発症に伴う異常行動、運動障害や神経・精神症状は見られず、剖検所見も異常はなかった。また、剖検直後の脳 MRI 撮像も特に異常所見は認められなかったことから少なくとも 6 年の期間では発症は認められなかった。

しかしながら、剖検時の各組織中の PrP<sup>Sc</sup> の測定をまだ行っていないが、昨年度の報告で、定期的に採材した体液類から一時的に連続 PMCA 法で PrP<sup>Sc</sup> が検出され、特に #19 は投与後 4.5、4.8、5.0 年に採取した CSF から連続して検出されたので、L-BSE は経口により感染はするが、C-BSE に比べ発症するまでの期間が長い可能性も考えられた。

H-BSE 経口投与または脳内接種したサルは共に投与後 2 年 4 ヶ月を経過したが、発症は見られていない。ウシへの脳内接種実験の場合、L-BSE と H-BSE の潜伏・発症期間に大きな差は無いと報告されているが、我々が先に行った L-BSE 脳内接種したサルは 1.6~1.7 年目に発症していたので、サルでは H-BSE は L-BSE に比べ少なくとも伝播しにくい事が示唆されるが、引き続き、経過観察を行っていく。

## < 畜場・食鳥処理場の衛生管理システムの評価手法の開発 >

## 1) 牛処理施設での衛生指標菌検査のための採材部位および採材ポイント

採材部位の検討において、本研究で対象とした、と畜場施設のうち、施設 B2 では、ともばらは肛門に比べて有意に多くの菌数が検出されることが明らかとなった。採材ポイントの検討では、冷蔵前は冷蔵後よりも多くの一般細菌数が検出されたことから、牛では、「ともばら」を「冷蔵前」に採材することと設定した。

本研究では *Salmonella* が全く検出されなかったことから、本研究で対象とした施設では、同菌による牛肉の汚染は非常に少ないものと考えられた。

施設 B1 は B2 に比べ、多くの一般細菌が検出された。さらには、腸内細菌科菌群、および大腸菌群、大腸菌の検出された検体は何れも施設 B1 であった。施設 B2 は対米国・EU 等牛肉輸出認定施設であり、施設 B2 で導入している HACCP システムは毎月、厚生労働省の査察を受けている。また、施設 B2 はゼロトレランスを実施している。これらのことから、施設 B2 では、より衛生度が高く評価された可能性が考えられた。

## 2) 豚処理施設での衛生指標菌検査のための採材部位および採材ポイント

施設 S1 では、胸、および頸からは、肛門に比べて有意に多くの一般細菌数が検出され、また、冷蔵前は冷蔵後よりも多くの一般細菌数が検出されたことから、豚では、「胸、および頸」を「冷蔵前」に採材することと設定した。

施設 S1 および S2 は、いずれも世界食品安全イニシアチブ (GFSI) に所属する同じ HACCP 認証を取得している。施設 S1、ならびに同 S2 で採材された検体を比較したところ、両施設間で一般細菌数に有意差は認められなかった。さらには、腸内細菌科菌群の検出頻度にも差が認められなかった。以上のことから、両施設で処理された豚枝肉の衛生状況は同程度であると考えられた。

### 3) 鶏処理施設での衛生指標菌検査のための採材部位および採材ポイント

採材部位の検討において、胸、腹、モモについて 10 羽からの拭き取り検体について検討したところ、何れの間にも有意差は認められなかった。これは、採材のタイミングが、チラー洗浄直後であることから、チラー水により鶏と体のほぼ全域が浸漬されるため、何れの部位においても同程度の細菌汚染をしているものと考えられた。そこで本研究では、実際の作業実施上より簡便な作業となる「胸」、および「モモ」を拭き取り部位として設定した。

この条件にて、施設 C1、ならびに C2 で採材された検体を比較したところ、モモでは、施設 C2 は C1 に比べて多くの一般細菌数が検出された。施設 C1、C2 ともに大規模食鳥処理施設であり、同じ内臓摘出装置を使用しているが、その他の処理工程は若干異なっている。これらの処理工程の違いが一般細菌数の差にあらわれたのかもしれない。

一方、糞便汚染細菌等（大腸菌群、および *Salmonella* を含む）については、牛や豚に比べ、効率に検出されたが、腸内細菌科菌群が最も高い割合で検出された。また、大腸菌群、大腸菌、ならびに *Salmonella* が検出された検体は、何れも腸内細菌科菌群が検出されたことから、最も感度良く、糞便汚染の指標となるものとして、腸内細菌科菌群が適当であると考えられた。

牛や豚は 1 頭ごとに使用器具等が消毒され個体で処理されるが、鶏の処理工程は連続で処理されている。本報告だけでなく、多くの国々の報告においても、鶏のふき取り検体は牛や豚のふき取り検体に比べ一般細菌、大腸菌群数、大腸菌等の検出割合は高率に、検出菌数は高値を示している。これは、鶏のふき取り検体の特徴であると思われる。

本研究では、HACCP システムの検証を目

的としているため、対象施設における一連の作業工程の衛生管理を評価するために、「最も感度良く」一般細菌、ならびに糞便汚染指標細菌を検出することを指標として、各条件を設定した。このような指標で設定された評価方法により評価された成績は、実際に流通する枝肉の衛生状態を必ずしも反映していないことに留意する必要がある。実際に本研究でも、一般細菌数は、冷蔵前に比べ冷蔵後で少なく、また、一連の糞便汚染指標細菌等においても、牛や豚では冷蔵前からのみ検出された。以上のことから、本研究で検討した方法による成績と、市場で流通する枝肉の状態が乖離している可能性がある。実際に米国では、衛生指標細菌として、大腸菌を採用している。今後、確立する HACCP システム検証方法の目的を明確に設定し、対象とする施設事業者や一般消費者等にも啓蒙する必要がある。

## E. 結論

< BSE 等プリオンのヒトへの病原性等に関する科学的知見の収集 >

- 1) rCerPrP と rShPrP-ARQ を基質として、かつ非感染牛脳乳剤の存在/非存在下で RT-QuIC を行うことで、野外材料の検査として、実用的に十分な検出感度を保ちつつ、C-, L-, H-BSE を識別することが可能となった。
- 2) H-BSE 感染牛（発症期）の脳には、TgBov に対して  $10^{7.4}$  LD<sub>50</sub>/g の感染価があることを明らかにし、H-BSE プリオンの感染価を測定する用量反応標準曲線を樹立した。
- 3) L-BSE 経口投与ザルを 6 年 3 か月経過観察したが、発症は確認出来なかった。L-BSE のヒトへの経口感染リスクは C-BSE と比較して高くないことが示唆された。
- 4) H-BSE 脳内接種ザルは接種後 2 年 4 ヶ月を経過したが、発症は認められていない。

L-BSE と比較して、H-BSE は霊長類へ伝播はしにくい可能性が示唆された。

- 5) BSE 感染モルモットの病理学的特徴は、脳幹部神経核を由来とする苔状線維、顆粒細胞、平行線維の系統変性疾患に類似した病態であった。

#### < と畜場・食鳥処理場の衛生管理システムの評価手法の開発 >

今年度は施設内に衛生検査スタッフが常駐した大規模と畜場および食鳥処理場の協力を得て拭き取り検査を実施した。

牛では、「ともばら」を「冷蔵前」に採材することにより、最も高率に一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群が最も検出率が高く、「冷蔵前」に「肛門」および「ともばら」の検体からのみ検出された。

豚では、「胸、および頸」を「冷蔵前」に採材することにより、最も高率に一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群のみ検出され、「冷蔵前」に「胸」から採取した検体からのみ検出された。

鶏では、採材部位間で一般細菌数に有意差は認められなかった。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群が最も高率に検出された。また、

一般細菌数と腸内細菌科菌群数の間に弱い相関性が認められた。

と畜場に HACCP を導入する際に有効な文献情報を収集整理した。牛および豚と体の処理工程別に文献を整理した。各行程について、汚染細菌種およびその汚染菌数、実施した処理の前後の菌数の変動が読み取り易い一覧表を作成した。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
各研究分担者の報告書を参照
2. 学会発表  
各研究分担者の報告書を参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし

## II. 分 担 研 究 報 告 書

# 1. C-, L-, H-BSE 鑑別・高感度検出用 RT-QuIC 法の確立

分担研究者 堀内 基広 北海道大学・大学院獣医学研究科 教授

研究協力者 鈴木 章夫 (北海道大学・大学院獣医学研究科)

研究協力者 岩丸 祥文 (農研機構・動物衛生部門)

## 研究要旨

定型 BSE (C-BSE) および非定型 BSE (L-BSE および H-BSE) のモニタリングに使用可能な実用的な Reat-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-QuIC) 法として、平成 28 年度、シカ組換え PrP (rCerPrP) を基質として非感染脳乳剤存在下で RT-QuIC を行うことで、検出感度を損なうことなく C-BSE と L-BSE を明瞭に区別できることを見出した。しかし、この方法では H-BSE と L-BSE の非定型 BSE を識別できなかった。本年度は、rCerPrP に加えてヒツジ組換え PrP-ARQ (rShPrP-ARQ) を用いることで、L-BSE と H-BSE を区別可能であることを見出した。L-BSE は rCerPrP を基質とした場合と比べて、rShPrP-ARQ を基質とした場合  $10^2$  乗程度反応が低下するが、H-BSE は反応が低下しなかった。また、rShPrP-ARQ を基質とした T-QuIC 反応により産生されるタンパク質分解酵素抵抗性 PrP (PrP-res) の産生量は、H-BSE で明らかに多かった。以上の結果から、rCerPrP と rShPrP-ARQ を基質とする RT-QuIC 法により、C-, L-, H-BSE が識別可能となった。

## A. 研究目的

英国で発生して世界各地に広がった BSE (定型 BSE, C-BSE) は、飼料規制などの管理措置が有効に機能して、現在その発生は制御下にある。しかし、定型 BSE とは性質が異なる BSE (非定型 BSE) が、主に高齢牛で発見され、ヒトへの感染リスクや定型 BSE の原因となる可能性が指摘されている。非定型 BSE は、主に PrP<sup>Sc</sup> の分子性状から L 型 (L-BSE)、H 型 (H-BSE) に分類され、これまでに 120 例が確認されている。

Reat-Time Quaking-Induced Conversion Reaction (RT-QuIC) 法は、簡便かつ高感度に PrP<sup>Sc</sup> を検出可能な方法である [1, 2]。実際に、スクリーニングで使用されている ELISA よりも 1000 倍以上高い感度で PrP<sup>Sc</sup> を検出でき、バイオアッセイを上回る感度が得られる。しかし、RT-QuIC 反応は夾雑物に影響を受けやすく、高濃度の組織乳剤により反応が阻害されるという欠点があったが、シカ PrP (rCerPrP) を基質として RT-QuIC 法を行うことで、被検脳乳剤が最高濃度でも C-BSE および L-BSE が検出可能であることを報告した (平成 27 年度)。さらに、rCerPrP を基質として非感染脳乳剤存在下で RT-QuIC を行うことで、検出感度を損なうこと

なく C-BSE と L-BSE を明瞭に区別できることを報告した (平成 28 年度)。しかし、L-BSE と H-BSE を識別する RT-QuIC 法の確立には至らなかった。2016 年に舂甚らは、組換え Bank Vole PrP (rBVPrP) とヒツジ PrP-ARR (rSfPrP-ARR) を用いることで、RT-QuIC 法により、C-, L-, H-BSE を区別可能であることを報告した [3]。この方法は増殖効率の差で 3 種の BSE を区別するので、識別精度の視点で改良の余地があると考えられた。そこで、本研究では、より実用的で、かつ C-, L-, H-BSE を識別できる RT-QuIC 法の確立を行った。

## B. 研究方法

1) 組換え PrP (rPrP) タンパク質の精製と RT-QuIC 法

rPrP は平成 27 年度および 28 年度と同様の方法で実施した。rCerPrP に加えて rShPrP-ARQ を使用した。プレートリーダーとして TECAN F200 を用いた。プレートは 96 well optical bottom plate (Thermo Fisher) を使用し、下方測定により蛍光を測定した。反応液は 25 mM PIPES, 500 mM NaCl, 100  $\mu$ M EDTA, 10  $\mu$ M ThT を基本とし、必要に応じて、NaCl



および rPrP の濃度、pH および SDS 濃度を変更した。また攪拌スピードは 432 -218 rpm の範囲で変化させた。

プリオン感染脳材料として、L-BSE (JP24) および C-BSE (JP2) の脳乳剤を用いた。また、H-BSE 感染牛の脳乳剤は農研機構・動物衛生研究部門から分与を受けた。陰性対照として、BSE 非感染牛脳を用いた。

## 2) PrP-res の検出

RT-QuIC 反応の産物を PK 処理し、定法に従いウエスタンブロット (WB) により PrP-res を検出した。

### (倫理面への配慮)

プリオンを用いた実験計画は、北海道大学病原微生物等安全管理委員会にて承認されている (実験番号 2017-1-14)。また、動物実験は北海道大学の実験動物委員会で承認された動物実験計画書(実験番号 13058, 13059)に従って実施した。

## C. 研究結果

1) rCerPrP と rShPrP-ARQ を用いた H-BSE の増幅 (図 1)。

H-BSE の脳乳剤の十倍段階希釈例  $10^{-3}$  (反応系に添加できる脳乳剤の最大濃度)  $\sim 10^{-9}$  を rCerPrP を基質として RT-QuIC を行った場合、 $10^{-3} \sim 10^{-8}$  まで、異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の増幅が陽性となり、この反応液中に終濃度 0.1% となるように非感染牛脳乳剤を加えても、反応は阻害されることなく、若干検出感度が上昇し、 $10^{-9}$  まで陽性となった。rShPrP-ARQ を基質として H-BSE の増幅を行った場合、rCerPrP の場合と同様に  $10^{-8}$  まで陽性となり、この反応は終濃度 0.1% の非感染牛脳乳剤添加によっても阻害されなかった。

2) rCerPrP と rShPrP-ARQ を用いた L-BSE の増幅 (図 2)。

L-BSE の脳乳剤の十倍段階希釈例  $10^{-3}$  ( $\sim 10^{-9}$  を rCerPrP を基質として RT-QuIC を行った場合、 $10^{-3} \sim 10^{-8}$  まで PrP<sup>Sc</sup> の増幅が陽性となり、この反応系に、終濃度 0.1% となるように非感染牛脳乳剤を加えると、L-BSE の検出限界は  $10^{-9}$  と 1 段階上昇した。従って、rCerPrP を用いた RT-QuIC は、L-BSE と H-BSE を区別できなかった。rShPrP-ARQ

を基質として用いた場合、検出限界は  $10^{-7}$  までと 1 段階低下したが、実用レベルの検出感度を有しているとかんがえられ他。この反応系に、終濃度 0.1% となるように非感染牛脳乳剤を加えた場合、反応が阻害され検出限界が  $10^{-6}$  に低下した。C-BSE を rCerPrP で検出する RT-QuIC では、終濃度 0.1% の非感染牛脳乳剤の添加により、RT-QuIC は完全に阻害される (平成 28 年度報告)。このような完全阻害には至らないものの、rCerPrP を基質として終濃度 0.1% 非感染牛脳乳剤存在下で RT-QuIC を実施した場合に比べて、2 Log の反応低下が生じることから、rCerPrP と rShPrP-ARQ の使用により、L-BSE と H-BSE を識別可能な RT-QuIC が実施できると考えられた。

## 3) PrP-res の相違

rShPrP-ARQ を基質とする RT-QuIC により L-BSE と H-BSE を識別可能と考えられたが、C-BSE を rCerPrP で検出する RT-QuIC の場合のような、終濃度 0.1% の非感染牛脳乳剤の添加による、反応の完全な阻害という、明瞭な差異ではないことから、異なる指標による補強が必要と考えられた。そこで、RT-QuIC 産物中の PrP-res を WB により調べた (図 3)。

L-BSE および H-BSE ともに増副産物の蛍光強度が同定度の試料を使用した。rShPrP-ARQ を基質として、終濃度 0.1% の非感染牛脳乳剤存在下で実施した RT-QuIC 産物中の PrP-res 量は、チオフラビンの蛍光強度が同定度であるにもかかわらず、L-BSE で少なく H-BSE で多かった。

この違いは、rShPrP-ARQ を用いた RT-QuIC で認められた L-BSE と H-BSE の反応性の違いを補強する違いとして利用可能と考えられる。

## D. 考察

rCerPrP を基質に用いて、RT-QuIC の反応系に非感染牛脳乳剤を添加することで、C-BSE の異常型プリオンタンパク質 (PrP<sup>Sc</sup>) の増幅は完全に阻害されるが、L-/H-BSE の PrP<sup>Sc</sup> の増幅は阻害されないことから rCerPrP を用いる RT-QuIC で C-BSE と L-/H-BSE は明確に区別可能となった。RT-QuIC は夾雑物の存在により反応が阻害されやすいという欠点を有するが、rCerPrP を用いることで、反応系に添加できる最大濃度の脳乳剤存在下でも微量の PrP<sup>Sc</sup> を検出可能であった (平成 28 年度成

果)。しかし、L-/H-BSE を区別することができなかった。

本年度、基質として rShPrP-ARQ を用いたところ、H-BSE の PrP<sup>Sc</sup> の増幅は阻害されないが、L-BSE の PrP<sup>Sc</sup> の増幅が完全ではないものの阻害されることを見出した。また、増幅産物中の PrP-res 量が、増幅が阻害されない H-BSE で多く部分的に増幅が阻害される L-BSE で少ないという傾向を見出した。これらを組み合わせることで、高濃度脳乳剤存在下でも PrP<sup>Sc</sup> を検出可能であり、かつ C-, L-, H-BSE を識別可能な RT-QuIC 法の実施が可能となった (図 4)。

## E. 結論

rCerPrP と rShPrP-ARQ を基質として、かつ非感染牛脳乳剤の存在/非存在下で RT-QuIC を行うことで、野外材料の検査として、実用的に十分な検出感度を保ちつつ、C-, L-, H-BSE を識別することが可能となった。

### <引用論文>

1. Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S, Yamada M, Mizusawa H, Kitamoto T, Klug G, McGlade A, Collins SJ, Nishida N. Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med.* 17(2): 175-178, 2011. doi: 10.1038/nm.2294.
2. Wilham JM, Orrú CD, Bessen RA, Atarashi R, Sano K, Race B, Meade-White KD, Taubner LM, Timmes A, Caughey B. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog.* 6(12): e1001217, 2010. doi: 10.1371/journal.ppat.1001217
3. Masujin K, Orrú CD, Miyazawa K, Groveman BR, Raymond LD, Hughson AG, Caughey B. Detection of Atypical H-Type Bovine Spongiform Encephalopathy and Discrimination of Bovine Prion Strains by Real-Time Quaking-Induced Conversion. *J Clin Microbiol.* 54(3): 676-686, 2016. doi: 10.1128/JCM.02731-15

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shan Z, Hirai Y, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, and Horiuchi M. Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease. *J. Gen. Virol.*, 98: 2615-2627, 2017. Doi: 10.1099/jgv.0.0.000907
- 2) Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M. Flow Cytometric Detection of PrP<sup>Sc</sup> in Neurons and Glial Cells from Prion-Infected Mouse Brains. *J. Virol.*, 92 (1): e011457-17, 2017. Doi: 10.1128/IJV.01457-17

### 2. 学会発表

- 1) Suzuki A, Yamasaki T, Hasebe R, and Horiuchi M. Unique reactivity of cervid recombinant PrP for the detection of L-BSE and CWD by RT-QuIC. Prion2017 (May 23-26, 2017, Assembly house, Edinburgh, UK)
- 2) Shan Z, Hirai Y, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, and Horiuchi M. Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease. Prion2017 (May 23-26, 2017, Assembly house, Edinburgh, UK)
- 3) Tanaka M, Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, and Horiuchi M. Analyses of neuron-autonomous mechanisms for neurodegeneration in prion diseases on neuron-enriched primary cell cultures. APPS2017 (Oct 20-21, 2017, Melbourne University, Australia)
- 4) Yamasaki T, Iwamaru Y, Matsuura Y, Kuroda M, Hasebe R, Okada H, and Horiuchi M. Characterization of gene expression profiles in brains of mice infected with typical and atypical

BSEs. APPS2017 (Oct 20-21, 2017, Melbourne University, Australia)

Korea)

5) Kuroda M, Yamasaki T, Hasebe R, and Horiuchi M. Activation state of glial cells in prion diseases. APPS2017 (Oct 20-21, 2017, Melbourne University, Australia)

6) Kuroda M, Yamasaki T, Hasebe R, and Horiuchi M. Activation state of glial cells in prion diseases. Joint Symposium between Seoul National University-Hokkaido University “Infection and Immunity” (Nov 15, 2017, Seoul National University, Seoul,

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

1. 特許取得  
該当なし

2. 実用新案登録  
該当なし

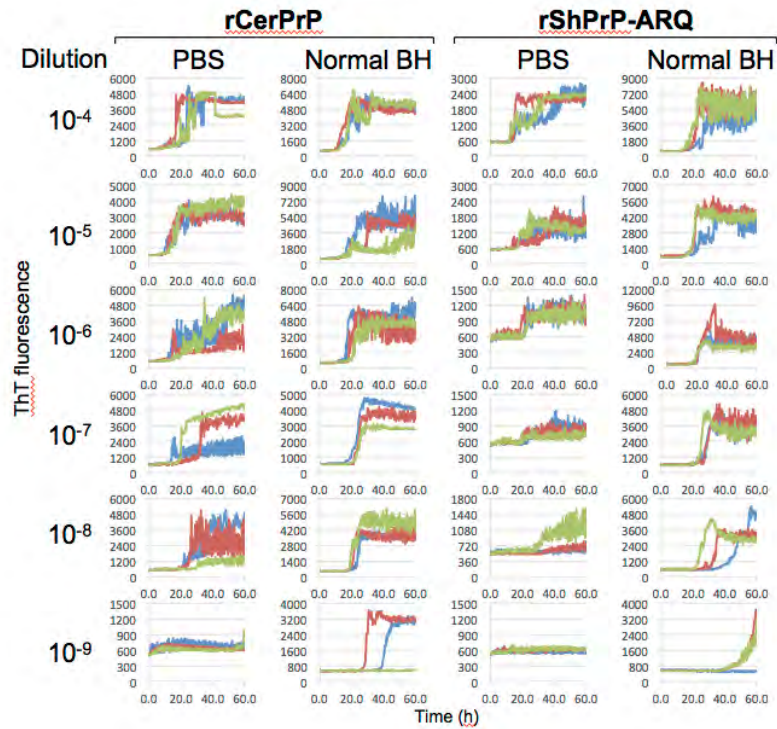


図1 rCerPrP (左) およびお rShPrP-ARQ (右) を基質とした RT-QuIC による H-BSE の検出。Normal BH は終濃度 0.1%非感染牛脳乳剤存在下での RT-QuIC の結果を示す。

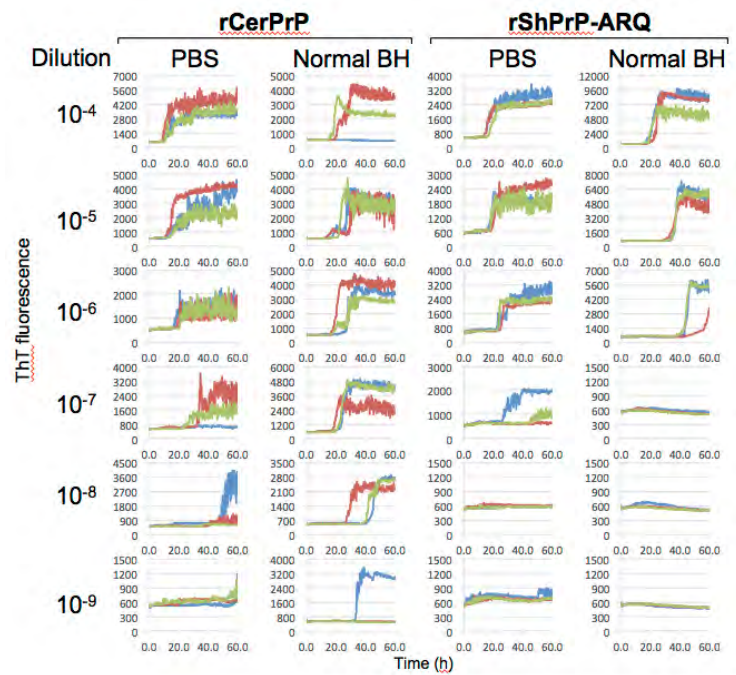


図2 rCerPrP (左) およびお rShPrP-ARQ (右) を基質とした RT-QuIC による L-BSE の検出。Normal BH は終濃度 0.1%非感染牛脳乳剤存在下での RT-QuIC の結果を示す。

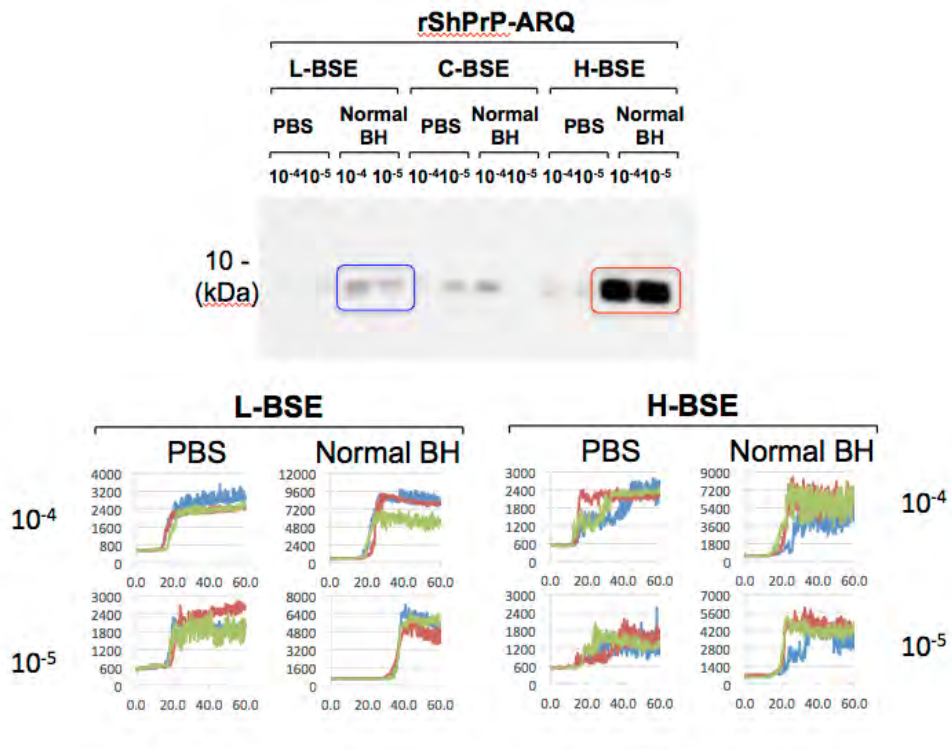


図3 L-BSE および H-BSE の RT-QuIC 増幅産物中に含まれる PrP-res それぞれ、非定型 BSE 感染牛脳乳剤の  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  希釈から増幅された試料中の PrP-res を示す。

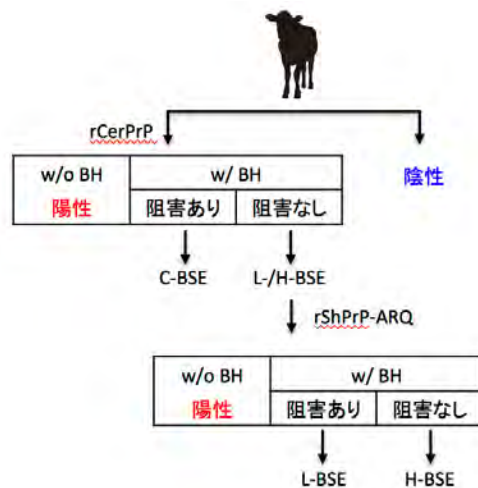


図4 RT-QuIC による C-/L-/H-BSE の識別。w/o BH:非感染脳乳剤非存在下、w/ BH:非感染脳乳剤存在下

## 2. ケミカルバイオロジーによる抗プリオン化合物の作用機序の解析

分担研究者 新 竜一郎 宮崎大学・医学部 教授

研究協力者 高月 英恵 (宮崎大学・医学部・感染症学講座)

研究協力者 宮崎 幸子 (長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科)

### 研究要旨

本研究では、プリオン病予防・治療薬開発を目的として、ドラッグ・リポジショニングの観点から Surface Plasmon Resonance imaging 法を応用し、アメリカ食品医薬品局(FDA) 承認済みの 1200 の薬剤から Prion protein (PrP)に結合する化合物をスクリーニングにより同定した。それら 30 の化合物のうち、さらにプリオン感染培養細胞において異常型 PrP (PrP<sup>Sc</sup>) 生成抑制効果を持つ 3 種の化合物 (Alprenolol、Collistin、Bisoprolol) を見出した。3 種の中で最も抑制効果が高く、血液脳関門を通過しやすい Alprenolol を Fukuoka-1 株感染マウスに自由飲水にて投与したところ、プリオン感染 115 日の段階では PrP<sup>Sc</sup> の減少が観察されたが、最終的な生存期間の延長はもたらさなかった。一方、Docking simulation では、Alprenolol は PrP のホットスポットと呼ばれる Helix B 近傍の領域に結合することが示唆された。

### A. 研究目的

プリオン病では、正常型 PrP(PrP<sup>C</sup>)と異常型 PrP(PrP<sup>Sc</sup>)が結合し、PrP<sup>C</sup> が PrP<sup>Sc</sup> に連続的に構造変換することで PrP<sup>Sc</sup> が脳内に蓄積することで発症すると考えられている。これまでプリオン感染培養細胞レベルで見いだされた PrP<sup>Sc</sup> を減少させる作用を有するいくつかの化合物が治療薬の候補として試されてきたが、臨床レベルで有効性が認定させた予防・治療薬は開発されていない。

近年、これまで医薬品として使用され、安全性に関する情報も豊富である既存の薬剤から新たな作用を見出し、これまでと異なる疾患の治療薬として用いる、「ドラッグ・リポジショニング」の重要性が提唱されている。既存薬剤は、ヒトにおける体内動態が確認されており、開発コストも大幅に抑えられることから、特にプリオン病のような希少疾患の治療薬開発の手法として注目されている。本研究ではこの観点からアメリカ食品医薬品局 (FDA) 承認済みの 1200 の薬剤について Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi)法を用いて抗プリオン作用を持つ薬剤のスクリーニングを行った。

### B. 研究方法

#### 1) Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi)法

による第一スクリーニング

SPRi 法は金属薄膜センサー周辺の濃度変化を表面プラズモン共鳴の原理により、リアルタイムに分子間相互作用を鋭敏にとらえることができ、リガンド (センサーに結合させた分子) とアナライト (流路に流す分子) との解離定数 ( $K_D$ : dissociation constant [単位は M]) を測定可能な系である。本研究ではリガンドとして FDA 承認済みの医薬品ライブラリー1200 種類、アナライトとしてヒト配列 recombinant PrP<sub>90-231</sub>(recHuPrP)を用いた。

#### 2) Fukuoka-1 株感染 N2a 細胞による第二スクリーニング

第一スクリーニングにより解離定数  $10^{-7}$ M 以下の recHuPrP に高い結合性を示した 30 の化合物について、第二スクリーニングとして Fukuoka-1 株感染 N2a 細胞にそれぞれ  $\sim 100\mu\text{M}$  まで投与し、PrP<sup>Sc</sup> 生成抑制作用を示すかどうか Western blotting により測定し検討した。

#### 3) Fukuoka-1 株感染マウス実験による in vivo での抗プリオン作用の検証

第二スクリーニングで PrP<sup>Sc</sup> 生成抑制作用を示した 3 種の化合物のうち、最も効果が高く、血液脳関門の透過性も高いことが知られていた

Alprenolol について、その *in vivo* における効果を検証した。4 週齢の CD-1 マウスに 10%(w/v)の Fukuoka-1 株発症マウス brain homogenate を 20 $\mu$ l を脳内接種し、翌日より Alprenolol (250 mg/あるいは 50 mg/L) の自由飲水による投与を開始した。プリオン接種後 115 日 (115 d.p.i) と発病末期にマウスを解剖し、脳組織を採取した。

#### 4) Docking simulation

AutoDock と呼ばれる分子モデリングシミュレーションソフトウェアを用いて、Alprenolol とマウス配列 PrP 間の Docking simulation を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究課題において、動物実験は長崎大学動物実験委員会に申請し、承認を得て実施した。プリオンに感染している試料を用いるのに対し、すべての実験はバイオハザード実験室にて執り行い、感染性物質の外部への搬出等ないよう細心の注意を払って行った。

### C. 研究結果

1) Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi)法による第一スクリーニングにより、recHuPrP に解離定数  $10^{-7}$ M 以下で結合する 30 種の化合物を見出した。

2) 次に第二スクリーニングとして、30 の化合物の Fukuoka-1 株感染 N2a 細胞に対する PrP<sup>Sc</sup> 生成抑制効果を Western Blotting にて測定した。その結果、3 種の化合物 (Alprenolol, Collistin, Bisoprolol: 図 1 参照) が 100 $\mu$ M までの濃度で抑制効果を示した (図 2 参照)。中でも Alprenolol が最も低い濃度で抑制効果を示すことが判明した。

3) 次に Alprenolol について Fukuoka-1 株感染マウス実験による *in vivo* での抗プリオン作用の検証を行った。115d.p.i では PrP<sup>Sc</sup> の減少が観察され (図 3 参照)、さらに 50 mg/L 投与群の脳領域での空胞変性が有意に低下していた (図 4 参照)。しかし最終的な生存期間の延長はもたらさなかった (図 5 参照)。一方、Docking simulation では、Alprenolol は PrP のホットスポットと呼ばれる Helix B 近傍の領域に結合することが示唆された。

### D. 考察

本研究では、recHuPrP への結合性を指標として、アメリカ食品医薬品局 (FDA) 承認済みの 1200 の薬剤から 30 の化合物を絞り込み、プリオン感染培養細胞 (Fukuoka-1 株感染 N2a 細胞) にて PrP<sup>Sc</sup> 生成抑制作用を示す 3 種の化合物を新たに発見することに成功した。PrP に結合する化合物の一部が、実際に PrP<sup>Sc</sup> 生成抑制作用を持つこと示した今回の結果はこのような戦略的手法が抗プリオン薬の開発の上で有用であることを示していると考えられる。

### E. 結論

Surface Plasmon Resonance imaging (SPRi)法を用いて抗プリオン作用を持つ薬剤である Alprenolol を見出した。

### F. 健康危険情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Satoh K, Atarashi R, Nishida N. Real-Time Quaking-Induced Conversion for Diagnosis of Prion Disease. *Methods Mol Biol.*, 1658: 305-310, 2017
- 2) Kawasaki M, Fuchigami T, Kobashi N, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Nishida N, Nakayama M. Development of radioiodinated acridine derivatives for *in vivo* imaging of prion deposits in the brain. *Bioorg Med Chem.* 25:1085-1093, 2017

#### 2. 学会発表

- 1) Imamura M, Tabeta N, Iwamaru Y, Yokoyama T, Murayama Y, Mori T, Takatsuki H, Atarashi R. Spontaneously-generated baculovirus-derived abnormal recombinant prion protein has infectivity. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会 (Oct, 24-26, 2017, Osaka, Japan)

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録

图 1

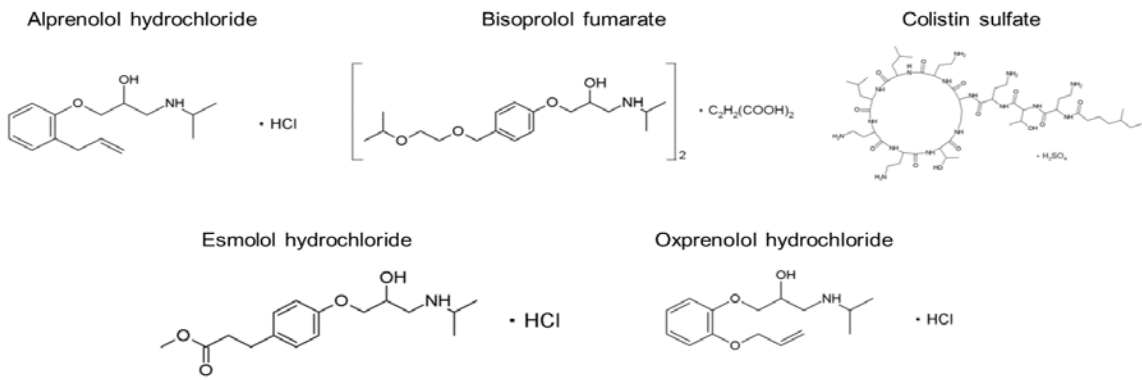


图 2

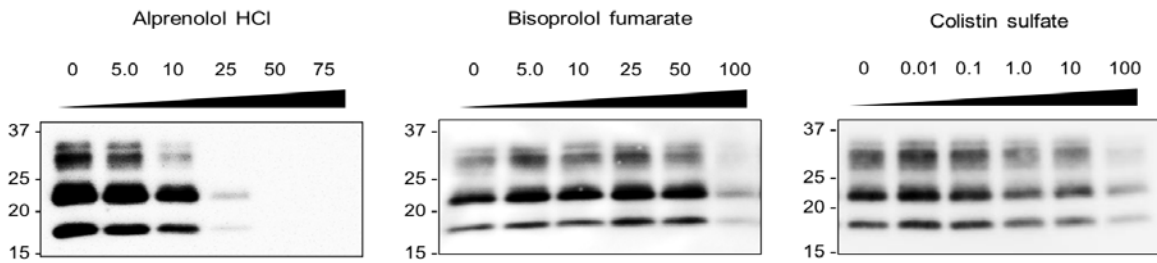


图 3

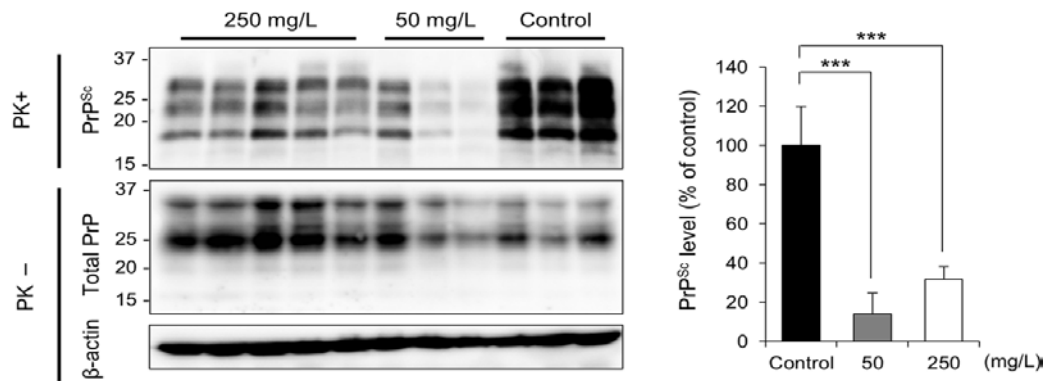




图 4

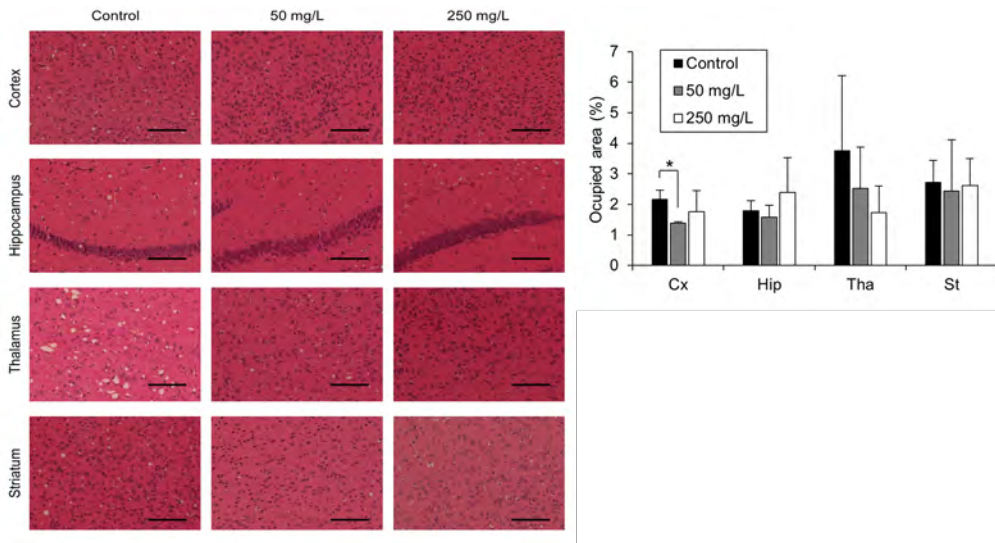
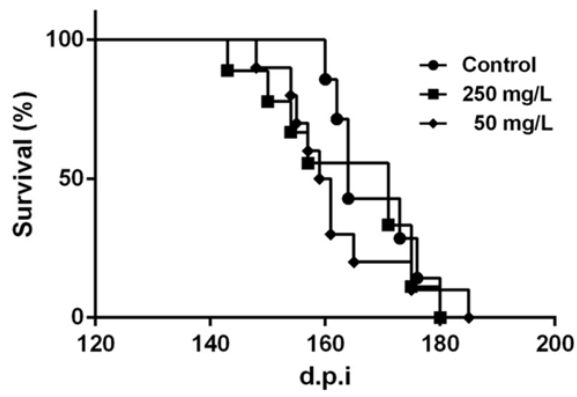


图 5



### 3. カニクイザルを用いた非定型 BSE のヒトへの感染リスク評価

分担研究者 保富 康宏 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所  
霊長類医科学研究センター センター長

分担研究者 柴田 宏昭 自治医科大学・先端医療技術開発センター  
共同利用コーディネーター部門 講師

研究協力者 小野 文子 (千葉科学大学・危機管理学部)

#### 研究要旨

非定型 BSE 由来プリオンの食品を介してのヒトの健康に及ぼすリスクを評価するために、カニクイザルに非定型 BSE 由来プリオンである L-BSE または H-BSE 感染ウシ脳乳剤を経口投与した。L-BSE 由来プリオン経口投与ザル 2 頭は、投与後 6 年 3 ヶ月経過し安楽死をおこなったが、2 頭ともその時点までには発症は認められなかった。安楽死直後の脳 MRI 画像でも異常所見は見られなかった。H-BSE 由来プリオン経口投与ザル 2 頭は、投与後 2 年 4 ヶ月経過したが、発症はみられていない。また H-BSE 由来プリオンが種の壁を越えて霊長類に感染するか否かを確認するためにサル 2 頭に脳内接種したが、こちらも投与後 2 年 4 ヶ月経過した現在、未発症であった。L-BSE 由来プリオンを脳内接種したサルは投与後 2 年以内には発症していたことから、H-BSE 由来プリオンは L-BSE 由来プリオンに比べ、霊長類においては発症しにくい可能性が示唆された。引き続き H-BSE 感染ザルの経過観察を行い、安楽死したサルについては網羅的解析を進めていく。

#### A. 研究目的

定型 BSE (C-BSE) 同様、非定型 BSE (L-BSE、H-BSE) も食品を介してヒトに感染するリスクがある。ヒトに近い霊長類を用いた非定型 BSE の経口感染実験の結果は、食品を介してのヒトへの感染リスク・感受性を評価する上で重要である。既に L-BSE は霊長類に経口感染することが報告されているが、経口投与による H-BSE の霊長類への感染はまだ報告されていない。そこで、霊長類を用いて H-BSE の経口投与実験を行うと共に、H-BSE が霊長類にそもそも感染するか否かを確認するために、H-BSE の脳内接種実験も行い、H-BSE のヒトの健康に及ぼすリスクを評価し、安全対策等に役立てることを目的とする。

#### B. 研究方法

##### 1) 供試動物と接種方法

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センター (茨城県つくば市) で育成された投与時 1.2~2.4 歳の雄カニクイザル 7 頭を用いた。供試動物は、ABSL3 施設内のアイソ

レーターにおいて馴化飼育後、感染実験を開始した。アイソレーター内環境は室温 23-27°C、相対湿度 50-60%、12 時間照明 (7 時~19 時) に設定した。アイソレーターの前面及び側面には窓を設け、前方及び隣のサルとアイコンタクト出来る環境とした。飼料は固形飼料 (Type AS; Oriental Yeast Co.Ltd.) 70g 及びリンゴ 100g を 1 日 1 回給餌した。

##### 2) 実験群および接種材料

実験群について下記に記載する。

##### L-BSE 接種群

BSE (BSE JP/24 佐世保) 感染ウシの 20%脳乳剤をカニクイザル 2 頭 (#18、#19) に経口投与 (脳乳剤 5.0 mL x 8 回) した。

##### H-BSE 接種群

BSE (カナダ由来感染ウシ脳乳剤 (#9458) をウシ脳内に継代接種: 動衛研) 感染ウシの 10%脳乳剤 (0.2 mL) をカニクイザル 2 頭 (#24、#25) に脳内接種、また 20%脳乳剤 (5.0 mL x 8 回) をカニ

クイザル2頭(#26、#27)に経口投与した。

### 3) 接種および材料採取方法

経口接種は塩酸ケタミン麻酔下で、栄養カテーテルを胃内に挿入し、前述の量を投与した。脳内接種は塩酸ケタミンとキシラジンの混合麻酔下において頭部を剃毛後、イソジンで消毒し、頭皮膚切開、側頭部頭蓋骨に直径2 mmの穿孔部を作製し、視床に脳乳剤0.2 mLを注入した。注入後、皮膚を縫合し、手術日より3日間抗生物質の筋肉内投与を行った。

接種前及び接種後は約3ヶ月おきに血液、脳脊髄液(CSF)、唾液及び尿の採取を行った。血液は塩酸ケタミン麻酔下で大腿静脈より採取した。CSFは背部剃毛後イソジンで消毒し、第3～第5腰椎椎間より採取した。鼻腔細胞の採取を試みた。片側鼻腔内を生理食塩水1 mLで3回洗浄を行い、両鼻腔内で計6 mLの洗浄液を回収した。回収した鼻腔洗浄液は2回遠心洗浄を行い、鼻腔洗浄細胞を回収した。

安楽死は塩酸ケタミンにより鎮静後、ヘパリンを静脈内注射し全身血液の凝固防止を行った後、ペントバルビタールナトリウム過剰投与により行った。安楽死後、脳及び主要臓器の組織の一部を摘出し、凍結保存及びホルマリン浸漬を行った。

### 4) 解析方法

#### 1. 行動観察

##### 行動観察(神経・精神症状評価)

定期的にビデオ撮影を行い、スコアリングに必要な症状を抽出し、再評価を行った。ビデオ撮影は15分間実施し撮影開始5分後に給餌を行い、摂食行動の観察を行った。神経・精神症状評価の抽出は、下記のヒトプリオン病指標項目について、サルは行動から客観的にスコアリングできる指標を作成した。

##### プリオン病主要観察項目

- ①神経症状:運動失調、振戦、ミオクロヌス、姿勢反射障害、動作緩慢、痙性歩行、筋力低下、歩行不能
- ②精神症状:抑鬱状態、自傷行為、食欲不振、あくび、驚愕反応、不穏

##### アップルテスト(運動機能評価)

アップルテストは両手指の運動機能障害の程度を評価する試験であり、左右それぞれの手を使

って、トレイ上の報酬をつかみ取る行動をビデオ撮影し前肢運動機能の評価を行った。

### 2. 高次脳機能解析

#### 食物回収試験

食物回収試験は9つの報酬穴の開いたパネルに報酬のリンゴ片を入れて、動物が指先で回転させて開けることができる不透明な蓋で穴を塞ぎ、9つの穴からリンゴ片を回収する行動により、短期記憶能の評価を行う。9つの穴全てにリンゴ片を入れ、全てのリンゴを取り終わるまでの行動を1試行とし、5試行実施した。サルの報酬穴とそれを覆うフタへの反応は、正ストロークと誤ストロークに分類した。正ストロークとは、報酬の入っている報酬穴あるいはその上のフタへ触れ、報酬を回収することである。誤ストロークとは、報酬の入っていない穴に指を入れる、あるいはその上のフタを動かして報酬穴を露出させる行動である。連続して行う正ストローク数と誤ストローク数により、評価を行った。

### 3. BSE感染ザルの体液中のPrP<sup>Sc</sup>動態解析

定期的に採材された体液類(血液、脳脊髄液、尿および唾液)について解析を行った。超音波処理/界面活性剤で可溶化した白血球分画またはリンタングステン酸沈殿法で濃縮した体液類をシードに用い、連続PMCA法で解析した。各ラウンドのPMCA産物をProteinase K消化後、ウェスタンブロット(WB)法によりPrP<sup>Sc</sup>を検出した。

### 4. MRI撮像

P3動物実験区域内で管理されている動物は生存したまま管理区域外への搬出ができないため、MRI撮像は安楽死直後に行った。安楽死したサルはアクリル製密封型コンテナに封じ込めてP2動物実験区域内のMRI室に搬送した。MRI撮像は3T MRI装置(MAGNETOM Allegra [Siemens社])を用いた。カニクイザルの脳撮像に際し、空間分解能・解像度を上げるために撮像視野を小さくし、高いS/Nを持つ撮像条件を設定し、ヒト用ヘッドコイルのCP型コイルを用いてT1-3D、T2、プロトン強調画像、Flair画像を撮像した。

#### (倫理面への配慮)

BSE接種動物はすべてP3アイソレータケージ内に収容した。本アイソレータはサル類が社会的動物であることを考慮して、アイソレータ内で視

覚による相互の社会的コミュニケーションを可能とした。ケージ内にはステンレスの鏡やチェーンを入れると共に、定期的に行うアップルテストや食物回収試験により、ヒトとの触れ合いが福祉向上に有効と考え、ケージ内サルのストレスの軽減に努めた。材料採取及び脳波測定は麻酔下において実施した。臨床症状発現後は症状に応じて、健康状態を維持すべく給餌方法の対応および輸液療法等による維持管理を行った。

安楽死は塩酸ケタミンによる鎮静後、過剰量のペントバルビタールナトリウム静脈内投与により行った。

動物実験の実施に当たっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験棟の実施に関する基本指針」を遵守し、医薬基盤・健康・栄養研究所動物実験委員会の承認を得て行った。病原体の取扱については、医薬基盤・健康・栄養研究所バイオセーフティ委員会の承認を得て行った。

## C. 研究結果

### 1) L-BSE 経口投与群の臨床経過および剖検

L-BSE ウシ脳乳剤経口投与ザル (#18、#19) は投与6年3ヶ月後に安楽死を行った。2頭とも臨床症状とは関係なく自傷行動を取る傾向があったが、安楽死時点までに運動障害や自傷行動以外の異常行動はなく、定期的に撮影したビデオ画像を確認しても、神経・精神症状共に見られず (data not shown)、発症は確認出来なかった。安楽死直後に脳のMRI撮像を行ったが、発症した個体に見られる脳室拡張を伴う脳萎縮等の異常所見は認められなかった (図1)。また、剖検時の解剖所見も脳を中心に特に異常は認められなかった。

### 2) H-BSE 接種群の臨床経過

H-BSE ウシ脳乳剤脳内接種ザル (#24、#25)、経口投与ザル (#26、#27) は共に投与後2年4ヶ月を経過したが、運動障害、異常行動は認められず、神経および精神症状共に見られなかった (data not shown)。引き続き、経過観察中である。

## D. 考察

L-BSE 経口投与については、Mestre-Francéらのグループが、カニクイザルなどの真猿類より下等な原猿類であるハイイロネズミキツネザルでの

伝播を報告したが、ヒトに近い真猿類での論文報告はまだない。今回のカニクイザルへの経口投与によるL-BSE感染実験 (#18、#19) では、6年3ヶ月経過観察をしたが、その間、発症に伴う異常行動、運動障害や神経・精神症状は見られず、剖検所見も異常はなかった。また、剖検直後の脳MRI撮像も特に異常所見は認められなかったことから少なくとも6年の期間では発症は認められなかった。我々の以前の実験では確認出来なかったが、LasmegasらのグループはC-BSE脳乳剤 (5g相当) 経口投与したカニクイザル1頭は60ヶ月目で発症し、もう1頭は76ヶ月未発症であったことを報告している。我々が行った先の感染実験により、L-BSE脳内接種したサルは、C-BSE脳内接種したサルより早く発症し、脳内萎縮が顕著であった。従って、L-BSEはC-BSEに比べ病原性が強いと考えられ、経口投与でもL-BSEはC-BSEより早く発症すると想定していた。しかしながら、我々が経口投与したL-BSE脳乳剤は8g相当であったにもかかわらず、75ヶ月では発症は確認出来なかった。経口によるL-BSEのリスクは、C-BSEに比べると低い可能性が示唆された。しかしながら、剖検時の各組織中のPrP<sup>Sc</sup>の測定をまだ行っていないが、昨年度の報告で、定期的に採材した体液類から一時的に連続PMCA法でPrP<sup>Sc</sup>が検出され、特に#19は投与後4.5、4.8、5.0年に採取したCSFから連続して検出されたので、L-BSEは経口により感染はするが、C-BSEに比べ発症するまでの期間が長い可能性も考えられた。

H-BSE 経口投与または脳内接種したサルは共に投与後2年4ヶ月を経過したが、発症は見られていない。ウシへの脳内接種実験の場合、L-BSEとH-BSEの潜伏・発症期間に大きな差は無いと報告されているが、我々が先に行ったL-BSE脳内接種したサルは1.6~1.7年目に発症していたので、サルではH-BSEはL-BSEに比べ少なくとも伝播しにくい事が示唆された。引き続き、経過観察を行っていく。

## E. 結論

L-BSE 経口投与ザルを6年3か月经過観察したが、発症は確認出来なかった。一方、潜伏期に採取した体液中に僅かにPrP<sup>Sc</sup>が検出された事を考慮すると、感染はしているが発症するまでに更に時間を要する可能性も考えられた。L-BSE 経口投与ザルの剖検時の各組織中のPrP<sup>Sc</sup>の測定を行い、

PrP<sup>Sc</sup>の蓄積の有無を判断する必要があるが、我々が当初想定していた L-BSE の経口による発症リスクは C-BSE と比較して必ずしも高くないことが示唆された。

H-BSE 脳内接種または経口投与ザルは接種後 2 年 4 ヶ月を経過したが、発症は認められていない。L-BSE 脳内接種実験と比較して、H-BSE の霊長類への伝播はしにくい可能性が示唆された。引き続き、経過観察を行い、H-BSE のヒト・サルへの感染リスクを評価する。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

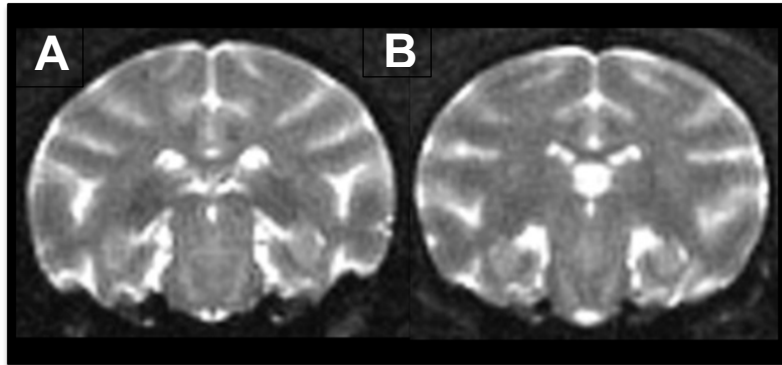


図1 L-BSE 経口投与 75 ヶ月目に安楽死した直後のカニクイザル脳の MRI 画像 (A) #18、(B) #19

## 4. 非定型 BSE 感染カニクイザルの病理学的解析

分担研究者 飛梅 実 国立感染症研究所・感染病理部 主任研究官

研究協力者 佐藤 由子 (国立感染症研究所・感染病理部)

### 研究要旨

定型 BSE は肉骨粉を原因としてウシで蔓延したと考えられており、ヒトへも経口的に感染し vCJD を誘導する。ウシでは定型に加え非定型 BSE の存在も知られており、これらプリオンがヒトへの感染性を有するか否か、また経口感染する可能性について明らかにすることは急務である。本研究班では本邦で確認された非定型 L-BSE (JP24) を経口的にカニクイザルに投与し、経過観察後に安楽殺し各種臓器におけるプリオンの蓄積について病理学的検索を行った。

また、ウシに加え反芻動物であるシカ類においてもプリオン病の存在が報告されている。現在、日本国内ではシカプリオン病である慢性消耗性疾患 (CWD) の発生は報告されていないが、検査体制の構築ならびに清浄確認は必須である。本研究では関東地方に生息する外来種であるキョンについて検査体制の確立ならびにプリオンの存在の有無について検討を行った。

### A. 研究目的

1) ウシにおけるプリオン病は定型 BSE に加え非定型 BSE が存在することが報告されている。定型 BSE は肉骨粉を原因としてウシで蔓延したと考えられており、ヒトへも経口的に感染し vCJD を誘導する。一方、非定型 BSE のヒトへの感染事例は現在報告されていないが、動物モデルを用いた研究から非定型 BSE に分類される L-BSE はヒトへの感染性が示唆される。本研究班においてもカニクイザルへの脳内接種により L-BSE がサルへ伝播することを確認している。本研究では C-BSE と同様に経口での L-BSE の伝播の可能性について検討する。

2) シカではプリオン病として慢性消耗性疾患 (CWD) が存在することが報告されている。日本に生息するシカ類は固有種をはじめ外来種も存在し、生息数の拡大に伴いジビエとして食用となる機会が増えている。国内では CWD の発生は報告されていないが、海外では散発的な発生報告が存在し、国内においても検査体制の構築ならびに清浄確認は必要である。本研究では関東地方に生息する外来種であるキョンに対する検査体制の確立ならびにプリオンの存在の有無について検討を行った。

### B. 研究方法

1) L-BSE プリオン経口投与サルの病理学的解析  
国内で摘発された L-BSE 罹患牛 (JP24) 脳乳剤を経口的に摂取させたサル 2 頭を経過観察の後、安楽殺し各種臓器の病理学的検討を行った。

2) キョン検査体制の確立

関東地方で駆除されたキョンの延髄採取ならびにプリオンたんぱく質遺伝子のシーケンス、使用可能抗体の確認を行った。

#### (倫理面への配慮)

サルを用いた実験については予医薬基盤・健康・栄養研究所 霊長類医科学研究センターの指針を順守するとともに、動物愛護精神に基づき研究を行っている。

キョンの採材に関しては「特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律」に基づき駆除された個体を使用する。

### C. 研究結果

1) L-BSE プリオン経口投与サルの病理学的解析  
L-BSE 罹患牛脳乳剤を経口投与した 2 頭のカニクイザルを 6 年超の経過観察の後、安楽殺を行い各種臓器を採取ならびに病理学的検索を行った。

経過観察過程では2頭にプリオン病に特徴的な臨床症状は認められなかった。解剖前のMRI画像ならびに解剖後に摘出された臓器に肉眼的な変化を認めなかった。中枢組織では空胞変性などのプリオン病に特徴的な所見は認められず、抗プリオン抗体を用いた免疫組織化学的検索においてもプリオンの明らかな沈着は認められなかった(図1)。

#### 2) キョン検査体制の確立

関東地方で捕獲、殺処分されたキョンの延髄組織を採取しプリオンタンパク質遺伝子の配列同定を試みた結果、これまでに報告されている海外のキョンと100%の相同性を有していた(図3)。この細胞性プリオンは抗プリオン抗体であるSAF84により検出が可能であった。

### D. 考察

#### 1) L-BSE プリオン経口投与サル病理学的解析

病理学的な検索の結果、プリオンの明らかな沈着は認められなかった。L-BSE由来プリオンはサルへの脳内接種により短期間の潜伏期と高度の空胞変性を伴うプリオン病を誘導することをこれまでに明らかにしており(図2)、経口摂取による感染成立の可能性は低いことが考えられた。今後PMCAおよびRT-Quicを用いた高感度検出法により微量のプリオン沈着の有無について確認を行う。

#### 2) キョン検査体制の確立

海外での研究機関ではキョンをCDWのモデル動物として用いており、プリオンはキョンに感染することが示されている。国内に生息するキョンも100%相同性を有するプリオンたんぱく質遺伝子を有しており、CWDに感染可能なことが示唆された。今後、検査頭数を拡大し国内の清浄確認を行うとともに、RT-Quic等の高感度検出法への適応を検討する。

### E. 結論

L-BSE由来プリオンは経口投与後6年を超えてプリオン病特徴的な臨床症状を示さなかった。各臓器においても病理学的な変化は認められず、免疫組織的な検索においてもプリオンの沈着は認められなかった。これらより、経口によるL-BSEのサルへの感染の可能性は低いものと考えられた。

#### 2) キョン検査体制の確立

関東地方に生息するキョンのプリオンたんぱく質遺伝子配列はすでに報告されている海外のキョンと同じであった。抗プリオン抗体SAF84によりキョンプリオンたんぱく質の検出が可能でありウエスタンブロット法を用いたCWD検索を行えることが明らかとなった。さらに高感度に検索するためRT-Quic法を用いた試験法へ供出するとともに検査頭数を増やし国内のCWD清浄確認を進める。

### F. 健康危険情報

特記事項なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Okumura A, Saito T, Tobiume M, Hashimoto Y, Sato Y, Umeyama T, Nagi M, Tanabe K, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Hasegawa H, Miyazaki Y, Yamagoe S. Alleviation of lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury in leukocyte cell-derived chemotaxin 2 deficient mice. *Biochem Biophys Rep.* 2017 Oct 13;12:166-171.
- 2) Hagiwara K, Iwamaru Y, Tabeta N, Yokoyama T, Tobiume M. Evaluation of rapid post-mortem test kits for bovine spongiform encephalopathy (BSE) screening in Japan: Their analytical sensitivity to atypical BSE prions. *Prion.* 2017 Mar 4;11(2):113-127.

#### 2. 学会発表

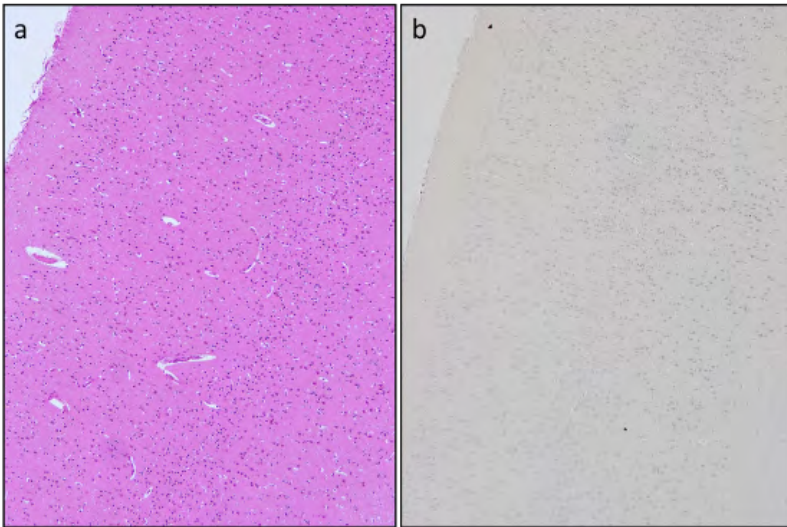
- 1) Tobiume M. Experimental transmission of classical and atypical Bovine Spongiform Encephalopathy to Cynomolgus Macaques, LIKA symposium 2017 UPF/LIKA Recife, Brazil

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. なし
2. 実用新案登録  
なし



図 1

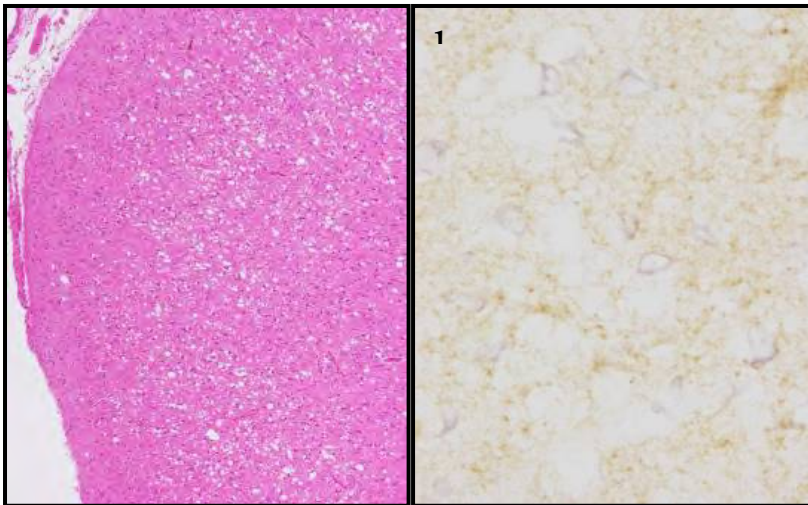


L-BSE プリオン経口投与サル大脳皮質

a) HE 染色 b) プリオン染色 (抗プリオン抗体 T4)

プリオン病に特徴的な空胞形成は認められず、プリオンの沈着も認められなかった。

図 2

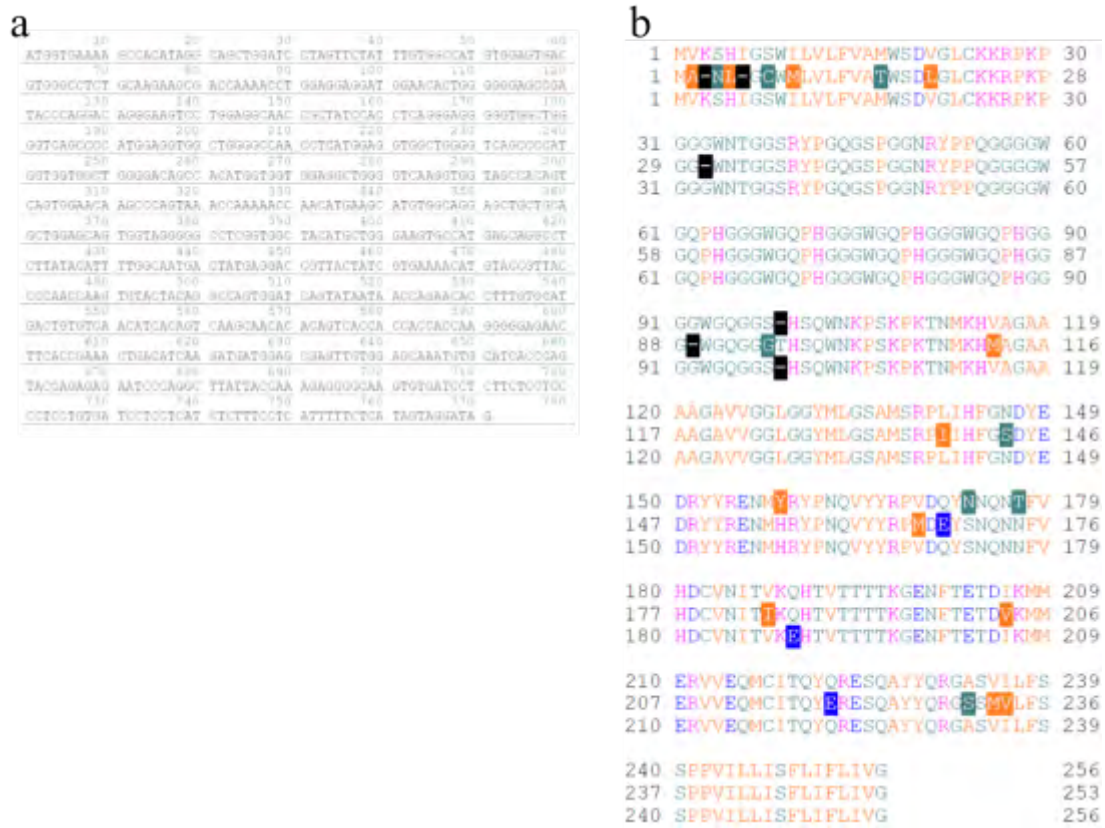


L-BSE 脳内接種サルの大脳皮質

a) HE 染色 b) プリオン染色 (抗プリオン抗体 T4)

L-BSE プリオンの脳内接種により高度の空胞変性が誘導され、シナプスタイプのプリオン沈着が認められる。

図 3



- a) 国内に生息するキョン Prnp cDNA シークエンス。既知の Reeves's muntjac (キョン英名) cDNA 配列と 100%の相同性を有する。
- b) キョン、ヒト、ウシ (ホルスタイン) プリオンたんぱく質アミノ酸配列。  
上: キョン、中: ヒト、下: ウシ

## 5. ウシ C-/L-BSE プリオンの生化学的な判別および霊長類モデルへの伝播後の特性解析

分担研究者 萩原 健一 国立感染症研究所・細胞化学部 第1室室長

研究協力者 柴田 宏昭 (自治医科大学 先端医療技術開発センター)

小野 文子 ((千葉科学大学・危機管理学部)

飛梅 実 (国立感染症研究所 感染病理部)

### 研究要旨

C-BSE プリオンと L-BSE プリオンの PrP<sup>Sc</sup> の生化学特性の違いを探索した結果、耐熱性プロテアーゼであるパパインを用い、pH および温度条件をコントロールすると、BSE 罹患ウシ脳組織に由来する C-BSE プリオンと L-BSE プリオンのパパイン抵抗性に差が認められることを H28 年度に報告した。本年度は追試を重ねて、この特性が再現的であることを確認した。このような PrP<sup>Sc</sup> の生化学特性の相違は、ウシの C-BSE プリオンと L-BSE プリオンの判別法に応用でき、従前の判断指標を相補する有用な方法になると考えられる。また、L-BSE プリオンがウシからヒトへ感染・伝播した場合を想定し、ウシからカニクイザルへ L-BSE プリオンが伝播することにより、伝播宿主 (カニクイザル) において C-BSE プリオンが新たに出現するかという点を調べた。H28 年度までに、L-BSE プリオンを初代伝播 (脳内接種) させたカニクイザルの脳内において、L-BSE プリオンから C-BSE プリオンが出現する可能性は極めて低いことを示した。本年度は、さらにカニクイザルへの 2 代伝播 (脳内接種) を経ても、C-BSE プリオンが出現・増殖する可能性は低いことを示した。

### A. 研究目的

1987 年に Wells らによって報告された従来型 BSE (C-BSE) は英国から欧州各国などへ急速に拡散し、本邦でも食肉牛検査ならびに死亡牛検査により C-BSE 罹患ウシが摘発された。この期間に、ウシ畜産物を介した C-BSE プリオンのヒトへの経口感染により変異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) が発生し、大きな社会問題となったことは周知のとおりである。本邦を含めた各国の BSE スクリーニング/サーベイランス、危険部位の除去、飼料規制、などのその後の対策により C-BSE 罹患ウシの発生頭数は着実に減少し、国際獣疫事務局の集計などによれば直近は各年 5~20 頭で推移している。一方、2000 年代半ばに見出された非定型 L-および H-BSE は、各年で 4~14 頭 (L-および H-BSE の合算数) が継続的に報告されている。非定型 L-および H-BSE の今後の発生推移の予測は不確かだが、散発的な発生が一定頻度で持続するのではないかと推測される。このような今

後の予想される状況では、BSE 罹患ウシが摘発された場合に、C-、L-、H-BSE のどの型に当てはまるのかという判別が以前にも増して重要になってくるだろう。

C-、L-、H-BSE プリオンの判別には、PrP<sup>Sc</sup> の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上での糖鎖型比と泳動度の相違、脳組織の病理像、などの指標が総合的に用いられている。しかし、C-、L-、H-BSE プリオンに該当しない、第四の未知の型がもしかしたら発生するかもしれないという可能性も見据えて、判別のための指標や分析法が多いことが望まれる。C-、L-、H-BSE プリオンに選択的な RT-QuIC 法の開発はこの要求に応えるものであるが、本分担研究では RT-QuIC 法とは別のアプローチとして、C-、L-BSE プリオンの PrP<sup>Sc</sup> の生化学的特徴を検討することで、C-、L-BSE プリオンの判別に資する指標を得ることを目的とした。

また、vCJD と疫学的関連が確立している C-BSE プリオンと比較して、非定型 BSE プリオンが異種

動物へ伝播する場合、その伝播後の特性については未知の点が多い。例えば、L-BSE プリオンをヒツジ [Vet Res, 46, 81 (2015)] や近交系マウス [PLoS Pathogens, 3, e31 (2007)] へ実験的に伝播させると、C-BSE プリオンに相当するような特性を獲得するという報告がある。また、本研究班による L-BSE プリオンのカニクイザルへの伝播実験において伝播後に PrP<sup>Sc</sup> の生化学的特徴が C-, L-BSE プリオン間で判別し難くなった。これらの事象から、L-BSE プリオンがヒトを含む霊長類に伝播すると C-BSE プリオン様の特性を獲得するのではないかという可能性が浮かんた。そこで本分担研究では、L-BSE プリオンがウシからカニクイザルへ伝播を経ることによって C-BSE プリオンが新たに出現するかという点を調べ、L-BSE プリオンについての知見を拡充することを目的とした。

## B. 研究方法

1) BSE 罹患ウシ (JP6, JP10, JP24) の脳ホモジネートを 2% Zwittergent 3-14 / 0.5% sarkosyl / 0.1M NaCl を含む 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5 @24°C) または 50mM PIPES 緩衝液 (pH6.8 @24°C) または 50mM HEPES 緩衝液 (pH8.4 @24°C) 中で、37 ~78°C の温度条件でパパイ (Worthington 社、終濃度 0.4unit/ml) により 30min 間消化した。消化反応液に 0.5 倍容の 10mM PMSF (ブタノール/メタノール (5/1, v/v) に溶解) を添加後、16,000xg で 15min 遠心して得られる沈殿物を SDS ポリアクリルアミド電気泳動にかけ、抗プリオン蛋白質抗体を用いるウエスタンブロット法によりパパイ抵抗性の PrP<sup>Sc</sup> 断片を検出した。また、酸性条件下でのペプシン消化に対する PrP<sup>Sc</sup> の抵抗性を調べるために、BSE 罹患ウシ (JP6, JP24) の脳ホモジネートを 2% Zwittergent 3-14 / 0.5% sarkosyl / 0.1M NaCl を含む 50mM グリシン緩衝液 (pH2.2 @24°C) 中で、ペプシン (Sigma 社) により 40°C、60min 間消化し、ウエスタンブロット法により PrP<sup>Sc</sup> 断片を検出した。

2) C-BSE プリオンあるいは L-BSE プリオンを 2 代継代させたカニクイザル (C-BSE プリオン継代ザル #017 ; L-BSE プリオン継代ザル #022) の大脳前頭葉ホモジネートを C57BL/6J マウスへ脳内接種し、マウスに対する病原性を比較・追跡した。マウスへの接種に際しては、#017 と #022 の前頭葉ホモジネートのプロテアーゼ K 消化物をウエ

スタンブローティングにかけ、接種するホモジネート中の PrP<sup>Sc</sup> のシグナル強度が等しくなるようにホモジネート濃度を調節した。

3) 研究班で新たに着手したカニクイザルへの H-BSE プリオンの感染・伝播実験にあたり、実験に供するカニクイザルのプリオン蛋白質遺伝子 (*prnp*) の塩基配列解析を行った。白血球画分から得たゲノム DNA を鋳型として、センスプライマー: 5'-TTC ATC AAG TCC ATA ACT TAG GGT CAG-3'、アンチセンスプライマー: 5'-CCT ATC AGG GAC AAA GAG AGA AGC AAG-3'、および KOD plus polymerase を用いた PCR により、PrP コード領域を含む (-339~+883) DNA 断片を得た。この DNA 断片 (PCR 産物) から 1 本鎖 DNA を調製し、dideoxy 法により塩基配列解析を行った。

## (倫理面への配慮)

プリオンの取扱いは、国立感染症研究所の「病原体等安全管理規定」を遵守し、「実験室安全操作指針」に従った。マウスへの伝播実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」および「国立感染症研究所動物実験実施規程」および「実験動物の飼養・管理・苦痛の軽減に関する基準」を遵守し、国立感染症研究所の動物実験委員会の審査承認を受けて実施した。

## C. 研究結果

1) 昨年度に、C-および L-BSE 罹患ウシの脳ホモジネートをパパイで消化後、ウエスタンブロット分析により PrP<sup>Sc</sup> を検出すると、高温 (およそ 68°C 以上) かつ弱塩基性 (およそ pH8.0) の消化条件において C-BSE プリオンと L-BSE プリオンの PrP<sup>Sc</sup> のパパイ抵抗性に明らかな差が認められることを見出した。本年度は追試を重ね、このような両プリオンの差異が再現的に観察できることを確認した [図 1 A]。

一方、昨年度に、C-BSE 罹患ウシの脳ホモジネートを高温 (およそ 60°C 以上) でパパイによって消化すると、37~40°C でパパイによって消化した場合よりもウエスタンブロット分析で検出される PrP<sup>Sc</sup> の泳動度が少し高分子量側へシフトするという現象を認めた。この現象がウシ C-BSE プリオンに特徴的であることを確立すべく、本年度に追試を重ねた。ところが、追試を重ねるうちに本現象の再現ができなくなった。再現不能とな

った原因の究明にあたったが、今年度中に特定できなかつた。

また本年度は、プロテアーゼ消化の際の pH レンジを酸性側へ広げ、pH2.2 においてペプシンによる消化を検討した。この背景には、本研究班の L-BSE プリオンのカニクイザルへの経口投与実験において、感染が成立する量であろうと予想した量の L-BSE プリオンを投与したカニクイザルが予想に反して発症しなかつたことから、L-BSE プリオンが胃内で分解される可能性を考えたためである。調べた結果、酸性条件下でのペプシン消化では、C-BSE プリオンに比べて L-BSE プリオン由来の PrP<sup>Sc</sup> が顕著に消化・消失することはないことがわかつた [図 1 B]。(トリプシンやキモトリプシンによって、L-BSE プリオン由来の PrP<sup>Sc</sup> が消失しないことは、以前に調べてある。)

2) H28 年度までに、L-BSE プリオンを初代伝播 (脳内接種) させたカニクイザルの脳内で、L-BSE プリオンから C-BSE プリオンが出現する可能性は極めて低いことを示した。本年度は、さらにカニクイザルへ 2 代伝播 (脳内接種) を経た場合に C-BSE プリオンが出現するかという点を、研究班のリソースである 2 代継代ザルの前頭葉ホモジネートを C57BL/6J マウスへ脳内接種して調べた。C57BL/6J マウスは C-BSE プリオンに感受性/L-BSE プリオンに非感受性であるので、C-BSE プリオンが存在すればマウスは発症する。実験の結果、C-BSE プリオンを 2 代継代したカニクイザルの脳ホモジネートではマウスは 287±10.4 日で人道的エンドポイントに達した (=陽性コントロール群) が、L-BSE プリオンを 2 代継代したカニクイザルの脳ホモジネートを接種したマウス (=試験群) は、接種後 360 日を経過した現時点で健常である [図 2]。

3) 実験に供するカニクイザルの *prnp* の塩基配列解析を行った。その結果、H-BSE プリオンを経口投与した 2 頭のカニクイザルの内の 1 頭 (#026) が、片方のアレルにおいて、PrP のオクタペプチド・リピートをコードする塩基配列部分にリピート 1 回の欠失があることが PCR 分析から推定され [図 3]、さらに DNA シークエンシングによるヌクレオチドレベルでの配列分析により欠失を確認した。この個体の家系について調べたところ、父方の祖父を共通とする複数の個体に同様の変

異が認められた (図 3 には、この家系に属する #028 の PCR 産物を並べて示す)。

#### D. 考察

ウシ L-BSE プリオンは、高温 (およそ 68°C 以上) かつ弱塩基性 (およそ pH8.0) 条件下でのパパイ消化より PrP<sup>Sc</sup> 断片が消失した。パパイ消化は pH8.0 よりも pH6.8 の方が酵素活性が高いが、pH6.8 の高温条件では L-BSE の PrP<sup>Sc</sup> は消失しない。よって、PrP<sup>Sc</sup> の消失はパパイ消化活性の亢進が原因ではなく、高温かつ弱塩基性の条件に L-BSE プリオンが晒されたことによる、L-BSE プリオンに特異的な構造緩和によると推測された。どのような構造緩和が起こるのかという点は、プリオン株の特性や PrP<sup>Sc</sup> の凝集体構造を考える上で、興味深い。

一方、昨年度に再現的に観察できた、C-BSE プリオンの PrP<sup>Sc</sup> 断片の SDS-ポリアクリルアミド電気泳動上での泳動度シフトが、本年度に追試を重ねていくうちに再現的できなくなつた。保管しておいた昨年度のパパイ消化物を並べて電気泳動にかけると、保管しておいた消化物では PrP<sup>Sc</sup> の泳動度シフトが認められるので、再現不能の原因は電気泳動以前のパパイ消化条件が制御できていないことにあると考えられる。

また、C-/L-BSE プリオンを pH2.2 においてペプシンによる消化にかけ、消化後にウエスタンブロット分析にかけたところ両プリオンともに PrP<sup>Sc</sup> が検出された。L-BSE プリオンを経口投与したカニクイザルが外見的には発症しなかつた (今後、採材した神経組織等の PrP<sup>Sc</sup> を詳しく検索する計画) が、L-BSE プリオンが胃内ですみやかに分解されるとは考えにくい結果であつた。なお、カニクイザルへの L-BSE プリオンの経口感染が成立したという情報はワークショップでの発表がある (Workshop on the epidemiology of human and animal TSEs, 30 April 2010, Torino, Italy) が、その詳細に関する論文等は未だ見当たらない。

また本年度は、カニクイザルの脳内で L-BSE プリオンから C-BSE プリオンが出現・増殖する可能性について調べた。C57BL/6J マウスを用いたバイオアッセイの結果から、L-BSE プリオンがカニクイザルへ 2 代伝播しても C-BSE プリオンが出現する可能性は低いと考えられた。

本研究班で用いたカニクイザルについては、*prnp* の塩基配列解析を逐一行っており、アミノ酸置換を伴う変異はこれまで無かった。今回、オクタペプチド・リピートのリピート1回を欠失した heterozygous な個体が初めて見つかった。この個体 (#026) には H-BSE プリオンを経口投与済みであり、同じく H-BSE プリオンを経口投与した他の1頭には欠失はない。この2頭に、プリオンの感受性の差が認められるのか、今後の経過が興味深い。なお過去の文献を調査したところ、カニクイザルについてはこの変異の報告は見当たらなかったが、ヒトでの変異は論文報告があった (Hum Mol Genet, 2: 541 (1993))。論文では、この欠失と CJD との因果関係は無いと結論されている。

#### E. 結論

本年度は以下の成果を得た、

- PrP<sup>Sc</sup> の生化学的解析にパパインを用いることで、ウシ脳に蓄積した L-BSE プリオンに特徴的な性質を再現的に確認した。この PrP<sup>Sc</sup> の生化学特性は、ウシの C-BSE プリオンと L-BSE プリオンの判別に応用でき、従前の判別指標を相補する有用な方法になると考えられた。
- L-BSE プリオンをカニクイザルへ2代伝播(脳内接種)させても、L-BSE プリオンから C-BSE

プリオンが出現する可能性は低いことを示した。

- 本研究班の研究に供したサル個体の中では初めて、オクタペプチド・リピート配列のリピート1回分を片方のアレルで欠失した個体を見つけ、家系の遺伝的背景も追跡できた。文献検索により、この欠失変異はヒトでも既知であることがわかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

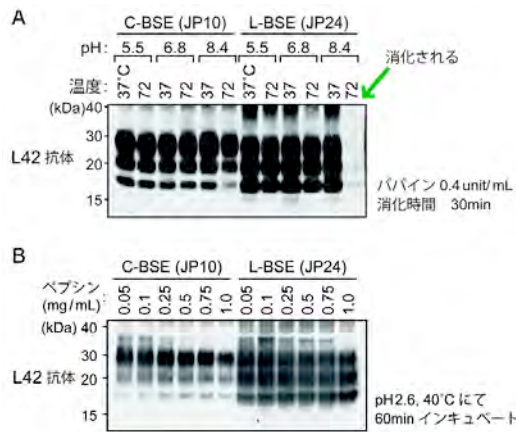


図1 ウシ C-/L-BSE プリオンのパルパイン消化による生化学的な判別 (A) とペプシン消化に対する抵抗性 (B)

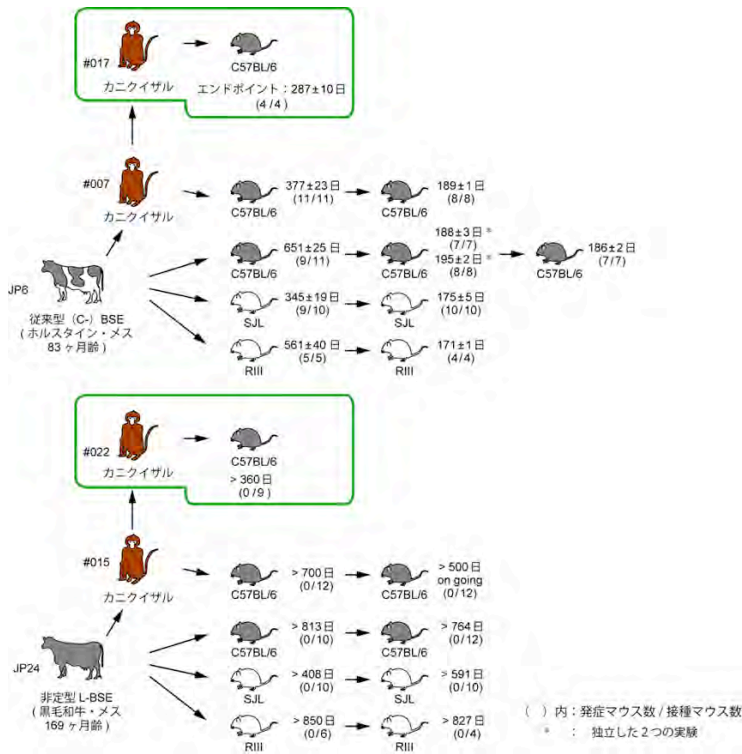


図2 カニクイザルへ2代継代した C-/L-BSE プリオンの病原特性についての C57BL/6J マウスを用いた一連のバイオアッセイの結果。本年度は緑枠内のバイオアッセイを行った。

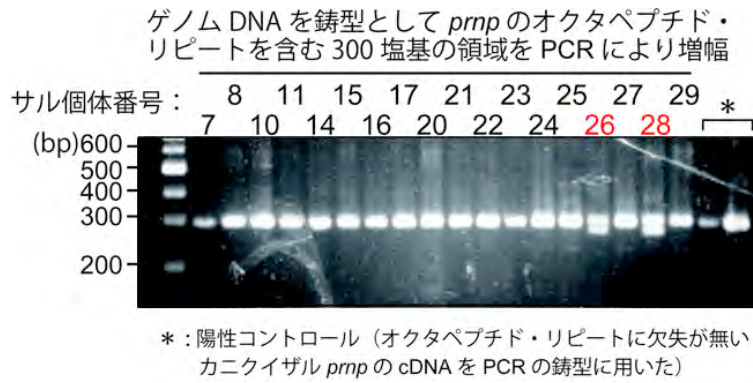


図 3 カニクイザル *prnp* のオクタペプチド・リピート領域の PCR 産物のアガロース電気泳動像。サル個体番号#026 と#028 では、リピート 1 回分の欠失により PCR 産物が 2 本のバンドとなる。



## 6. 非定型（H型）BSE感染牛の潜伏期間におけるPrP<sup>Sc</sup>蓄積

分担研究者 福田 茂夫 北海道立総合研究機構・畜産試験場・基盤研究部

家畜衛生グループ 主査

### 研究要旨

脳内接種によるBSE感染により、非定型（H型）BSE感染牛の潜伏期間でのPrP<sup>Sc</sup>の脳内出現時期と部位を明らかにする。またこれまでに実施した定型および非定型（L型）BSEと比較し、BSEのPrP<sup>Sc</sup>の検出可能な期間を明らかにし、適切な管理措置の策定に貢献する。本年度は、非定型（H型）BSE10%脳乳剤を導入し、ホルスタイン種雌牛に脳内接種し非定型（H型）BSE感染牛（n=2）を作出した（平成29年11月およびH30年1月）。脳内接種前後の比較からは接種による臨床上的影響は見られず、2018年3月現在、非定型（H型）BSE感染牛に音への過剰反応や歩様の変化等のBSEを疑う臨床症状等は観察されていない。次年度に潜伏期間におけるPrP<sup>Sc</sup>蓄積を解析する。

### A. 研究目的

牛海綿状脳症（BSE）は、羊のスクレイピー、鹿の慢性消耗症、人のクロイツフェルト・ヤコブ病などと同様に伝達性海綿状脳症の一つで、感染性蛋白粒子プリオンの感染によって起こることからプリオン病とも呼ばれている。なかでもBSEは、人の変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の原因となる人獣共通感染症で、公衆衛生上重要な疾病である。

1986年に英国で初めて確認されて以来、BSEは1種類のプリオン株（定型BSE）が原因と考えられてきたが、2003年からこれまでに100例以上の非定型BSEが日本を含む世界中で散発的に確認されている。非定型BSE患者は、ほとんどが8歳以上の高齢牛で、定型BSEの発生状況との関連性が低いことから、孤発性（自然発生的）であることが示唆される。道総研畜産試験場では、これまでに脳内接種による定型または非定型（L型）BSEの牛への感染試験を実施し、定型BSEでは、臨床症状と発症時期、異常プリオンタンパク質（PrP<sup>Sc</sup>）の出現部位を明らかにした。また、非定型（L型）BSEは、臨床症状の出現時期が定型BSEよりも早いことから、そのプリオンは牛に対して病原性が強いことが示唆された。しかし、非定型BSEの人へのリスクや発生機序などは未解明な点も多くあり、BSE対策の残された問題として、消費者から原因究明を要望する声が挙がっている。

本研究では牛への脳内接種によるBSE感染実

験により、非定型（H型）BSE感染牛の潜伏期間内でのPrP<sup>Sc</sup>の脳内出現時期および部位を明らかにし、定型および非定型（L型）BSEと比較検討することでBSEの感染および発症機序の解明に資する。

本年度は、非定型（H型）BSE感染牛の脳乳剤を導入し、脳内接種により、非定型（H型）BSE感染牛を作出し、経過を観察した。

### B. 研究方法

1) 非定型（H型）BSE感染牛のPrP<sup>Sc</sup>の脳内出現部位と経時的蓄積量

ホルスタイン種雌牛3頭を用いた。各供試牛は麻酔処置し、直径2mmのピンドリルで前頭骨右側を貫通し、その貫通穴より18Gのカテラン針を用いて中脳を標的に穿刺し、非定型（H型）BSE感染牛の10%脳乳剤（n=2）またはBSE非感染牛の10%脳乳剤（n=1）を1ml脳内接種した。術後はBSE隔離牛舎にて飼養し、経過観察を行った。BSE非感染牛の10%脳乳剤接種牛（BSE陰性対照牛）は接種後5か月で病理解剖し、PrP<sup>Sc</sup>をウエスタンブロット法で解析した。

#### （倫理面への配慮）

サンプル採取および分析は、研究従事者の危険排除に努めた。また動物実験は、北海道立総合研究機構畜産試験場動物実験委員会の承認を得、「地方独立行政法人北海道立総合研究機構にお

けるライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程」を遵守し実施した。感染性試料および感染動物の取り扱いは、「動物の伝達性海綿状脳症の実験指針」を遵守した。

### C. 研究結果

#### 1) 非定型 BSE 感染牛の PrP<sup>Sc</sup> の脳内出現部位と経時的蓄積量

農研機構動物衛生研究部門より非定型 H 型 BSE 感染牛の脳乳剤を導入し、ホルスタイン種雌牛に脳内接種し、非定型 (H 型) BSE 感染牛 2 頭を作出した (平成 29 年 11 月および H30 年 1 月)。脳内接種前後の比較からは接種による臨床上的変化はなかった。これまでに音への過剰反応や歩様の変化等の BSE を疑う臨床症状等は観察されていない。

### D. 考察

非定型 (H 型) BSE 感染牛の脳乳剤の牛への脳内接種では、接種後約 12 か月で発症し、接種後 18 か月で起立不能等飼養困難となると報告されている (Okada ら、2011)。我々のこれまでの研究では、非定型 (L 型) BSE 感染牛の脳乳剤の牛への脳内接種では、接種後約 11 か月以降に発症し、接種後 16 か月で飼養困難となる (Fukuda ら、2011)。また非定型 (L 型) BSE の脳乳剤の牛への脳内接種では、接種後 4.7 か月で脳内 PrP<sup>Sc</sup> を検出している。現在経過を観察中であるが、2018 年 3 月現在、

臨床上的変化は見られず、非定型 (H 型) BSE 接種牛からの脳内 PrP<sup>Sc</sup> 蓄積は、接種後約数ヶ月が見込まれ、次年度に潜伏期間における PrP<sup>Sc</sup> 蓄積を解析する。

### E. 結論

牛への脳内接種による臨床上的影響はなかった。2018 年 3 月現在、音への過剰反応や歩様の変化等の BSE を疑う臨床症状等は観察されていない。次年度に脳を採取し、脳内 PrP<sup>Sc</sup> の出現部位と蓄積量について、ウェスタンブロット法を用いて調査する。

### F. 健康危険情報

特になし

### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

以下に図表を入れて下さい。

表1 非定型 H 型 BSE の牛への感染試験の実施と経過

試験牛	接種材料 (10%脳乳剤)	接種月	解剖	観察月数	症状 (2108/3 現在)		PrP <sup>Sc</sup>
					音への 反応	歩様	
1608	H 型 BSE	H30/1	H30/4 予定	3 か月	-	-	
1610	H 型 BSE	H29/11	H30/4 予定	5 か月	-	-	
1599	BSE 陰性	H29/7	H29/12	5 か月	-	-	-

## 7. BSE、非定型 BSE 感染動物の病態解析 —異種間伝達実験による非定型 BSE の起源に関する研究—

分担研究者 古岡 秀文 帯広畜産大学・獣医学研究部門 教授

研究要旨 非定型 BSE は生化学的性状、病変分布や PrP<sup>res</sup> の沈着様式が BSE とは異なるプリオン株で、由来を含め不明な点が多い。本邦で発生した非定型 BSE の一つである L 型 BSE と BSE の関連について、実験動物による馴化株の異種間伝達により検討することを目的として研究を計画した。本年度は感染成立までに時間を要していること、予定していたハムスターからモルモットへの動物種間に伝達性が確認されなかったことから当初予定していた結果は得られていない。本年度は、本研究の基盤となる BSE 感染モルモットの病理発生機序に関して検討したのでその結果を記載した。脳内接種による BSE 感染モルモット小脳では、クールーや sCJD-VV2 における小脳病変に類似した小脳皮質の萎縮がみられる。神経伝達物質トランスポーターを指標として形態学的に検討した。PrP<sup>res</sup> が重度に沈着し、顆粒細胞の消失がみられる部位に一致して VGlut1 陽性シナプスの減少・脱落がみられた。VGlut2 陽性シナプスに変化はみられなかった。脳幹部では、橋小脳路を構成する前庭神経核、橋核の VGlut1 陽性シナプスが減少していた。超微形態学的に、顆粒層の軽度病変では苔状線維の脱落、中等度病変では顆粒細胞樹状突起の変性、重度では苔状ロゼットの消失が認められた。BSE 感染モルモット小脳では、PrP<sup>res</sup> の沈着により顆粒細胞の選択的な傷害が生じ、顆粒細胞の減少・脱落が起こる。次いで、顆粒細胞から伸びる平行線維が減少・脱落し、特徴的な神経変性病変を生じたと考えられる。加えて、橋小脳路に選択的なシナプスの脱落がみられたことから、顆粒層型小脳変性症に類似した系統の変性が起こっていることが示唆された。

### A. 研究目的

本研究は、プリオン株の異種間伝達実験を継続して実施し、BSE と非定型 BSE の関連、およびその起源に関して検討することを目的としている。

これまでの研究から、プリオン感染では伝達可能な種間において、動物種と伝達されたプリオン株の組み合わせにより、病理学的に特徴的な所見を示すことがあきらかにされている。我々の研究では、BSE が伝達されたモルモットでは、小脳顆粒層の顕著な脱落と分子層の菲薄化による小脳皮質の萎縮を特徴とし、病変部に一致して顕著なプリオン沈着が認められる。また、PrP<sup>res</sup> の沈着パターンとして、微細顆粒状の他、プラーク状の沈着が特徴である。非定型 BSE が伝達されたハムスターでは、大脳皮質軟膜下への PrP<sup>res</sup> の蓄積や微細顆粒状の PrP<sup>res</sup> 沈着パターンを主体とし、プラーク状や放射状の沈着が見られないという報告がされている。これに加え、PrP<sup>res</sup> の海馬への顕著な沈着と血管や神経細胞周囲への小型斑状沈着が特徴として確認されている。

本実験では、これらモルモット、ハムスターにみ

られる特徴的病理所見を指標とし、病理学的所見がどのように変化するかを検索する。BSE、非定型 BSE それぞれに伝達性を示した動物種から伝達性を示さなかった動物種へその馴化株の交差伝達を行い、そこで伝達性が成立した場合には、動物種を元に戻して次の代へさらに感染を行う。その中で見られたプリオン伝達動物の病理像を、先述した特徴的な所見について比較することで、種間伝達によりプリオン株の表現型の変化や一貫性を評価する予定である (図 1)。

本年度は、動物感染実験に時間を要していること、予定していた動物種間において伝達性が確認できなかったことから、本研究の主目的については結論が得られていない (実験 1)。そこで、本研究の基盤となる BSE 感染モルモットにおける小脳病変形成機序について検討したので報告する (実験 2)。

### B. 研究方法

#### 実験 1

1) 供試動物、接種材料および接種方法

シリアンハムスター (Slc:Syrian), モルモット (Slc:Hartley)をそれぞれ6匹(いずれも,日本SLC,雌,4~5週齢)を使用した.陰性対照としてシリアンハムスターおよびモルモットを1匹ずつ使用した.

接種材料は, BSE ウシ (BSE/JP4) 由来の BSE モルモット馴化株 (BSE/gu) をハムスターに接種, 感染させた 10%脳乳剤 BSE/gu/ham および感染研より分与された非定型 BSE 感染ウシの脳材料 (BSE/JP24) 由来の L 型 BSE ハムスター馴化株 (LBSE/ham) を用いて作製した 2.5%脳乳剤を使用した.

BSE/gu/ham 脳乳剤, LBSE/ham 脳乳剤をモルモットに 50  $\mu$ l を接種量とし, イソフルラン吸入麻酔下の動物へ脳内接種を行った.

## 2) 病理学的検索

接種動物は, 臨床症状はみられなかったが, 試験的に接種後 480 日~500 日目にエーテル麻酔下で安楽殺し, 解剖および採材を行った.

採材した臓器は, 10%中性緩衝ホルマリンで固定後, 切り出し, 再固定を行った. 次に 98%ギ酸中で 1 時間振盪し, PrP<sup>res</sup> の感染性を消失させた. その後, 脱水, パラフィン包埋を実施し, 3  $\mu$ m パラフィン切片を作製後, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った.

免疫組織学的検索では, 一次抗体として抗 PrP<sup>res</sup> ウサギポリクローナル抗体である B103 抗体, 二次抗体には HRP 標識ウサギ抗体 (Dako Envision Kit, DAKO, U.S.A.) を用いた. PrP<sup>res</sup> の免疫活性の賦活化には 135DWHA 法を用いた. その他の抗体による免疫染色の前処理には, オートクレーブ法 (121  $^{\circ}$ C, 10 分) を実施した.

## 実験 2

### 1) 供試動物, 接種材料および接種方法

モルモット (Slc:Hartley, 日本 SLC), 雌, 4~5 週齢) を 3 匹使用した. 陰性対照として 1 匹使用した. 接種材料は, BSE ウシ (BSE/JP4) 由来の BSE モルモット馴化株 (BSE/gu) をモルモットに接種した. 接種方法は実験 1 に準ずる.

### 2) 病理学的検索

実験 1 の抗体に加え, VGlut1 抗体, VGlut2 抗体, EAAT4 抗体による検索を実施した.

### 3) 電子顕微鏡学的検索

矢状断にした小脳皮質を 1mm 角に切り出し, 4 $^{\circ}$ C 下でグルタルアルデヒドにより 4 時間固定, さらに四酸化オスミウム固定液で 4 時間固定した. その後 98%ギ酸で 1 時間の処理を行い, 感染性を消失させ, 常法に従い脱水, Resin 包埋を行った. 超薄切片を作成, 電子顕微鏡にて観察した.

## (倫理面への配慮)

動物実験は帯広畜産大学実験動物倫理委員会の承認を得て行った.

## C. 研究結果

実験 1 の病理学的検索結果では, いずれの動物についても, 免疫組織化学的検索で陽性結果は得られなかった.

実験 2 の対照動物, BSE 感染モルモット小脳と脳幹を VGlut1, VGlut2, EAAT4 抗体をマーカーとし, それぞれの陽性シナプスについて免疫組織化学的検索を行った. 対照動物では苔状線維や平行線維には VGlut1、登上線維には VGlut2、プルキンエ細胞樹状突起シナプス後膜には EAAT4 がそれぞれ特異的に発現していた. 歯状核, オリブ核, 橋核, 前庭神経核は いずれも VGlut2 陽性, また, 前庭神経核と橋核は VGlut1 にも陽性を示した. BSE 感染モルモットでは VGlut1 陽性シナプスが分子層と顆粒層において減少していた (図 2). VGlut2 陽性シナプスおよび EAAT4 陽性を示すシナプスについて減少はみられなかった. また, 前庭神経核と橋核の VGlut1 陽性シナプスの減少が選択的に見られた (表 1).

電子顕微鏡による検索では, 陰性対照の顆粒層では, 多数の顆粒細胞に囲まれた苔状ロゼットと呼ばれる顆粒細胞樹状突起爪状終末と苔状線維で形成されるロゼット状シナプスが認められた. 感染動物では, 大部分の顆粒細胞は保存されている一方で, 苔状線維は消失し, 変性した電子密度の増加した顆粒細胞樹状突起爪状終末が散見された (図 3).

## D. 考察

図 1 で示したうちの実験 1 に該当する部分である BSE/gu/ham 株のモルモットへの伝達, 非定型 BSE/ham 株のモルモットへの伝達については確認できなかった. 引き続き経過観察を実施する予定である.

実験 2 で示した BSE 感染モルモットの脳病変の発生機序については図 4 にまとめた.

顆粒層および分子層, さらには脳幹部各神経核における VGlut1 陽性シナプスの減少・消失は, PrP<sup>res</sup> の沈着による苔状線維 - 顆粒細胞間シナプスの減少あるいは消失を示唆し, 顆粒細胞神経突起である平行線維シナプス減少・消失に至ったものと考えられた. プルキンエ細胞樹状突起や登上線維が保存されていることから, PrP<sup>res</sup> は主に顆粒細胞を傷害することで小脳皮質の特徴的な病変を形成するが示唆された. 小脳失調型 CJD においても顆粒細胞の減少がみられ, 苔状線維 - 顆粒細胞間シナプスにおける PrP<sup>res</sup> 沈着によって顆粒細胞が

消失した結果、顆粒細胞から伸びる平行線維が消失することが病変形成に関与することが報告されている。このように BSE 感染モルモットはヒトプリオン病に類似する小脳病変を形成するだけでなく、病変発生機序も類似していると考えられた。

今回経時的な検索結果については省略したが、プリオンは顆粒層に存在する苔状線維、顆粒細胞樹状突起爪状終末、顆粒細胞の順に傷害し、最後に分子層に存在する顆粒細胞神経突起である平行線維を傷害するという経時的な変化をもたらすことが分かった。

苔状線維は橋核に由来するが、その橋核において、VGlut1 陽性シナプスの減少がみられた。一方、小脳核、オリブ核の VGlut2 陽性シナプスの発現に変化はみられなかった。大脳皮質からの情報は、大脳皮質一橋一小脳系を通じて小脳皮質に伝えられる。このうち、橋小脳路に選択的なシナプスの脱落がみられたことから、系統の変性が起こっていることが示唆され、顆粒層における変化と合わせると、顆粒層型小脳変性症に類似した病態であると考えられた。

#### E. 結論

本年度は、BSE/gu/ham および非定型 BSE/ham のモルモットへの異種間伝達試験が確認できなかった。

BSE 感染モルモットの病理学的特徴は、脳幹部神経核を由来とする苔状線維、顆粒細胞、平行線維の系統変性疾患に類似した病態であり、これらの解析結果を踏まえ、次年度以降の異種間伝達試験における病理像の解析に対して有用な知見が得られた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

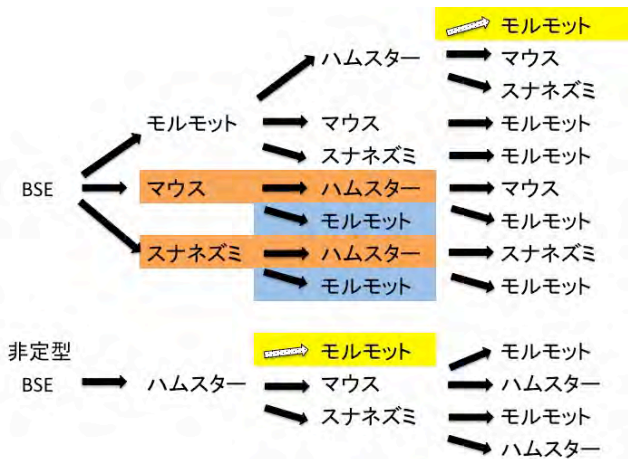
##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

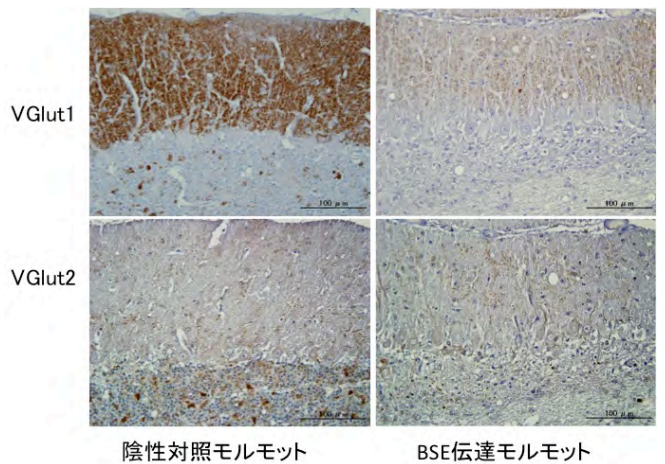
なし

図1. 異種間伝達実験の概要



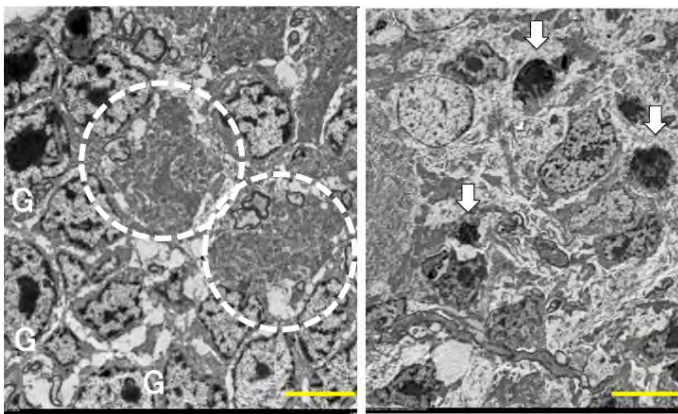
黄色部分については継続して実施していた実験の一部であり、本年度の結果として、ハムスターからモルモットへの伝達性はみられなかった。

図2. 小脳分子層、顆粒層免疫染色結果



感染動物では VGlut1 抗体で標識される平行繊維が減少、VGlut2 抗体で標識される登上繊維は健常。両抗体により標識される顆粒細胞層苔状繊維はいずれも減少がみられた。

図3. 小脳顆粒層電顕像



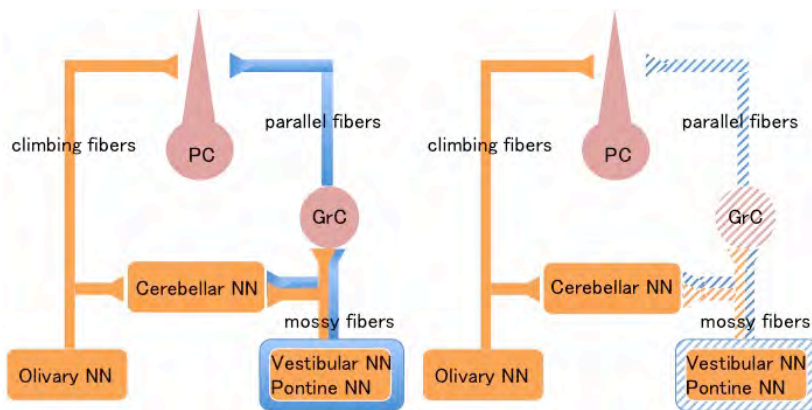
矢印で示した残存している顆粒細胞は萎縮し、核のクロマチン凝縮や細分化がみられる。対照動物に観察された点で囲んだ苔状ロゼットはみられない。

表1. 免疫染色結果

	VGlut1		VGlut2	
	Control	Infected	Control	Infected
Parallel fibers	+	-	-	-
Mossy fibers	+	-	+	-
Climbing fibers	-	-	+	+
Granular cells	-	-	+	-
Cerebellar nucleus	-	-	+	+
Vestibular nucleus	+	+(but weak)	+	+
Pontine nucleus	+	+(but weak)	+	+
Olivary nucleus	-	-	+	+

対照動物で VGlut1 陽性を示す平行繊維、苔状繊維、前庭神経核、橋核で、感染動物は消失ないし減弱を示す。黄色で示す VGlut2 陽性の登上繊維、齒状核、オリーブ核で変化はみられない。

図4. モルモット小脳病変発生機序



水色は VGlut1 陽性、黄色は VGlut2 陽性。斜線部分がプリオンの沈着に伴い、消失あるいは減少を示した部分。プリオンが VGlut1 抗体によりラベルされるシナプスを特異的かつ系統的に傷害する顆粒層型小脳変性症に相当する病態を示す。

## 8. ウシ型プリオン蛋白質遺伝子発現トランスジェニックマウスを用いた非定型 BSE 感染牛のプリオン体内分布解析

分担研究者 松浦 裕一 農研機構動物衛生研究部門 ウイルス・疫学研究領域

主任研究員

研究協力者 岩丸 祥史 (農研機構動物衛生研究部門・越境性感染症研究領域)

宮澤 光太郎 (農研機構動物衛生研究部門・ウイルス・疫学研究領域)

岡田 洋之 (農研機構動物衛生研究部門・病態研究領域)

### 研究要旨

牛海綿状脳症 (BSE) に実験感染した牛の可食部筋肉にプリオン感染性が認められている。本研究課題では、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の原因である従来型 C-BSE プリオンとは性質が異なる非定型 H-BSE について感染牛の組織に分布するプリオン感染価を定量的に求め、食肉を介した BSE のヒトへの感染リスクの評価に資する知見を提供することを最終目的とする。本年度は H-BSE プリオンの終末限界希釈法を行い、脳に  $10^{7.4}$  LD<sub>50</sub>/g の感染価が分布すること、ウシプリオン蛋白質発現トランスジェニックマウスの潜伏期間とプリオン感染価の関係 (用量反応標準曲線) を明らかにした。この基準を用いることで、H-BSE 感染牛の組織に分布するプリオン感染価を脳と比べて 1/100,000 まで測定可能であると考えられた。

### A. 研究目的

牛海綿状脳症 (BSE) は、病態や異常プリオン蛋白質の生化学的性状の違いによって、定型 (C-BSE) と非定型 (L-BSE もしくは H-BSE) に分けられる。3 つともそれぞれ異なるプリオンによる疾病である。C-BSE プリオンは食を介して人に感染し、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病の原因であり、実験的に L-BSE プリオンも人に感染することが示唆される。C-BSE や L-BSE では可食部筋肉から BSE 感染性が検出されたことから、H-BSE についても感染牛の組織に分布するプリオン感染価を定量的に求め、食肉を介した BSE のヒトへの感染リスクの評価に資する知見を提供することを最終目的とする。

本年度は、牛の組織に分布する H-BSE プリオンの感染価を測定する技術、すなわち用量反応標準曲線を算出することを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1) 終末限界希釈法による H-BSE 感染価の測定

H-BSE 牛の 10%脳乳剤 (3 頭プール: 9458, 0782, 7749) を 10 倍段階希釈して、それぞれをウシ型

PrP 発現トランスジェニック Tg マウスの脳内に投与した。Tg マウスを週 3 回観察し、行動異常やふらつきなどの神経症状が観察された時点で安楽死した。ウエスタンブロット法や免疫組織化学染色で脳に異常プリオン蛋白質 (PrP<sup>Sc</sup>) が検出された Tg マウスを BSE 感染陽性として、脳内投与後安楽死までの日数 (潜伏期間) を求めた。また、脳内投与後 800 日以上経過したマウスを安楽死して、異常プリオン蛋白質の有無をウエスタンブロット法や免疫組織化学染色で調べた。

H-BSE 感染牛脳乳剤の希釈液ごとに Tg マウスの BSE 感染陽性率を求め、Spearman-Kärber 法を用いて牛脳 1 g あたりの 50%致死量 (LD<sub>50</sub>/g) を H-BSE プリオン感染価として算出した。

#### 2) H-BSE プリオンの用量反応標準曲線の算出

H-BSE 感染牛脳乳剤の希釈液ごとに H-BSE 感染価の対数 (Y) を求め、GraphPad Prism ver.7.0c for Mac (GraphPad Software, San Diego California USA) で、Curve Fitting の Segmental regression fits 法を用いて、Tg マウスの潜伏期間 (日数) を X とした用量反応標準曲線を算出した。



### (倫理面への配慮)

本実験は動物衛生研究所バイオセーフティ委員会にて承認され、プリオンの取り扱いは、農林水産省農林水産技術会議事務局の「動物の伝達性海綿状脳症実験指針（平成15年10月）」を遵守する。遺伝子改変動物を用いた動物実験は組換え実験委員会ならびに動物実験委員会にて承認され、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月）」を遵守する。

### C. 研究結果

#### 1) 終末限界希釈法による H-BSE 感染価の測定

H-BSE 感染牛 10%脳乳剤の  $10^0 \sim 10^{-4}$  希釈液で、すべての Tg マウスが BSE 感染陽性であった(図)。 $10^{-5}$  希釈液では 5 頭中 1 頭の Tg マウスが感染陽性であり、潜伏期間は 628 日であった。脳内投与後 800 日まで観察したが、 $10^{-6}$  希釈液では陽性 Tg マウスは確認されなかった。Spearman-Kärber 法により H-BSE 牛脳は 1g 中  $10^{7.4}$  LD<sub>50</sub>/g の感染価であると算出された。

#### 2) H-BSE プリオンの用量反応標準曲線の算出

H-BSE 牛脳の希釈液に相当する感染価の対数 (Y) ごとの Tg マウスの潜伏期間 (X) の分布から、用量反応標準曲線の変化ポイントを  $10^{-3}$  希釈液 ( $10^{4.4}$  LD<sub>50</sub>/g、Y=4.4) での潜伏期間 (平均 329 日、X<sub>0</sub>) とした。その結果、H-BSE プリオンの用量反応標準曲線は、 $Y_1 = 19.32 + (-0.046) \times X$  ( $1 < X \leq 329$ ) ;  $Y_2 = 4.4 + (-0.0054) \times X$  ( $329 < X < 800$ ) と算出された (相関係数  $R^2=0.9676$ )。

### D. 考察

H-BSE 感染牛 (発症期) の脳に分布するプリオン感染価  $10^{7.4}$  LD<sub>50</sub>/g は、C-BSE ( $10^{6.6}$  LD<sub>50</sub>/g) や L-BSE ( $10^{6.9}$  LD<sub>50</sub>/g) の感染牛と同レベルであると考えられる。また、用量反応標準曲線を用いることで、H-BSE 感染牛の組織に分布するプリオン感染価を脳と比べて 1/100,000 まで測定可能であると考えられた。

### E. 結論

H-BSE 感染牛 (発症期) の脳には、Tg マウスに対して  $10^{7.4}$  LD<sub>50</sub>/g の感染価があることを明らかにするとともに、Tg マウスを用いた H-BSE プリオンの感染価を測定する基準 (用量反応標準曲線) を樹立した。

### F. 健康危険情報

これまでの研究成果で国民の生命、健康に重大な影響を及ぼす情報は無い。

### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

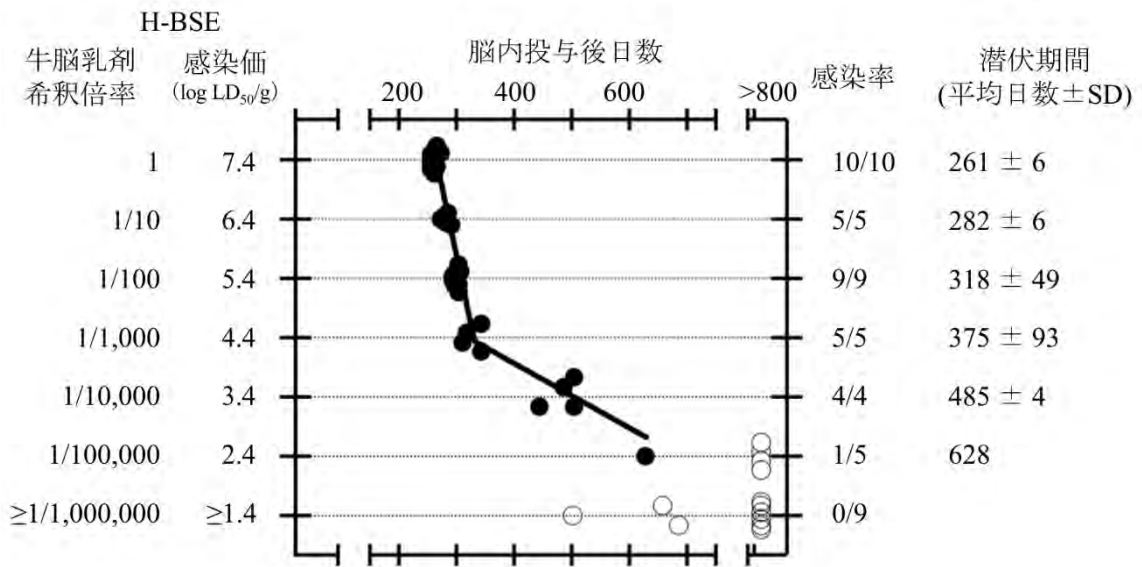


図 Tg マウスへの H-BSE プリオンの感染性

H-BSE 牛脳乳剤の段階希釈液を脳内に投与したのち安楽死までの潜伏期間をプロットした。BSE 感染陽性 Tg マウスを“●”、陰性 Tg マウスを“○”で示し、H-BSE プリオンの用量反応標準曲線を線で表した。

## 9. わが国のと畜場ならびに大規模食鳥処理施設における HACCP システム評価法の検討と と畜場への HACCP 導入を支援する情報収集

分担研究者	森田 幸雄 東京家政大学・家政学部 教授
	壁谷 英則 日本大学・生物資源科学部 准教授
	山崎 剛士 北海道大学大学院・獣医学研究院 助教
	鎌田 洋一 甲子園大学・栄養学部 教授
研究協力者	池田 徹也 (北海道立衛生研究所・感染症部)
	堀内 基広 (北海道大学大学院・獣医学研究院)
	中山 達哉 (国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部)
	野市 哲也、茂原 馨 (スターゼンミートプロセッサー株式会社)
	三浦 和行、富田 昌俊 (スターゼン株式会社)
	宇都 菜央、尾崎 正秀、島原 道範 (株式会社大山どり)
	一川 仁美、吉田 梨花、森田 聡志、宮川 明日香 (日本大学・生物資源科学部)

### 研究要旨

我が国のと畜場・食鳥処理場への HACCP 導入義務化をふまえ、我が国の現状に適したと畜場・食鳥処理場の内部・外部検証システムを構築する基礎研究として、施設内に衛生検査スタッフが常駐している大規模と畜場および食鳥処理場の協力を得て拭き取り検査を実施した。これらの施設では HACCP の構築や内部検証の実施は容易であると思われた。HACCP システムの義務化に際しては、導入と畜場・食鳥処理場側の管理者や従業員の HACCP 教育だけでなく、監査を行うと畜検査員、食鳥検査員の教育も必要であると思われた。また、と畜場・食鳥処理場へ欧米や EU で採用しているゼロトレランスの考え方も HACCP 導入時または導入後には採用するべきであると思われた。

平成 29 年度は、わが国において、牛、豚、および鶏の処理を行うと畜場（牛の処理 2 カ所、豚の処理 2 カ所）、並びに食鳥処理場（2 カ所）において枝肉の拭き取り検査を実施し、欧米の HACCP 効果検証法を含めた HACCP 検証プロトコール候補を比較検討した。その結果、牛では、「ともばら」を「冷蔵前」に採材することにより、最も多くの一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群の検出率が最も高く、「冷蔵前」に「肛門」および「ともばら」の検体から検出された。豚では、「胸」、および「頸」を「冷蔵前」に採材することにより、最も多くの一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群のみ検出され、「冷蔵前」に「胸」から採取した検体からのみ検出された。

と畜場・食鳥処理場への HACCP 導入を促進するため、と畜・食鳥処理工程における危害情報を収集した。本年度は、牛、および豚を対象に、処理工程と、危害を減少させる各種薬剤処置を行っている文献について、調査した部位、細菌の種類と数、制御処置前後の

菌数の変化情報を一覧に集積した。

## A. 研究目的

現在、わが国では、危害分析重要管理点 (HACCP) による食品の製造または加工における衛生管理体制の構築が図られている。HACCP は食品の衛生管理のための国際標準として地位を確立し、実際に欧米を始め多くの国で HACCP の導入が進んでいる。これに対し、わが国における HACCP 普及率は依然低く、将来的な HACCP による工程管理の義務化を見据えた様々な試みがある。食肉においても、平成 26 年 6 月、と畜場法施行規則を改正し、従来の基準に加え、新たに HACCP を用いて衛生管理を行う場合の基準 (HACCP 導入型基準) を規定することにより、段階的な HACCP の普及が図られている。

より効果的に HACCP を普及させるためには、事業者の意識を改善するための普及啓発が必要である。厚生労働省が都道府県等のと畜・食鳥検査員に対して指導的な立場となる人材の要請を目的とする「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料を作成した。

わが国のと畜場・食鳥処理場への HACCP 導入義務化をふまえ、国際的協調性を持ちながらかつ我が国の現状に適したと畜場・食鳥処理場の内部・外部検証システムを構築する必要がある (図 1)。HACCP 導入による「食肉の安全性の向上」効果を評価するための科学的手法の確立が必須となる。欧米では大腸菌などの衛生指標細菌を用いた HACCP 効果検証方法が確立されているが、施設の規模や処理頭数の異なるわが国のと畜場、ならびに食鳥処理場に即した手法の確立が期待される。本研究は、わが国のと畜場 (牛、豚)、および食鳥処理場 (鶏) を対象として、HACCP 導入時および運用期間におけるその効果の科学的検証方法の確立を目的とする。平成 29 年度では、わが国において、牛、豚、および鶏の処理を行うと畜場 (牛の処理 2 カ所、豚の処理 2 カ所)、並びに大規模食鳥処理場 (2 カ所) において枝肉の拭き取り検査を実施し、欧米の HACCP 効果検証法を含めた HACCP 検証プロトコールの候補を比較検討した。特に、採材部位、および採材ポイント、ならびに衛生指標細菌について検討した。

と畜・食鳥処理の工程は多い。と畜場や食鳥処

理場に HACCP を導入する際各行程における危害性微生物に関する情報を分析する必要がある。文献収集とその解説、さらに、導入を計画している施設への適応など、HACCP 導入を困難にしている。欧米では、と畜工程の中に、乳酸やオゾン水を用いて枝肉を殺菌する工程を含めている処理場がある。この行程によって危害性微生物を積極的に減少させ、枝肉の微生物学的な衛生状況を良好にさせる役割を持つ。わが国ではこのような処理が行われていない。以上のことから、本年度は、牛および豚について、各と畜工程ごとの、衛生指標菌の数、また、処理過程における菌数の変化、さらには上述の制御処理の前後の菌数を示している文献を収集し、データベース化、一覧表とした。と畜場への HACCP 導入の支援に用いることができる文献集を構築する。

## B. 研究方法

1) 「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料の作成

厚生労働省は平成 29 年 11 月～平成 30 年 2 月に、北海道・東北ブロック、関東甲信越ブロック、東海・北陸ブロック、近畿ブロック、中国・四国ブロック、九州ブロックので「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」を実施している。また、平成 29 年度食肉衛生技術研修会 (厚生労働省主催)、平成 29 年度微生物部会研修会 (全国食肉衛生検査所協議会主催) 等で使用する資料の一部を作成した。

2) 検査対象施設

わが国の牛、豚をそれぞれ対象とした各 2 カ所のと畜場 (牛: 施設 B1、および B2、豚: 施設 S1、S2)、ならびに大規模食鳥処理場 (C1、C2) を対象とした。各施設の従業員数、ならびに年間処理頭 (羽) 数を表 1 に示す。

3) 採材部位

牛については、3 カ所 (胸部; 以降「胸」、ともばら、および肛門周囲部; 以降「肛門」)、豚については、3 カ所 (胸、頸部; 以降「頸」、肛門) とした (図 2、3)。

鶏については、はじめに採取部位間の比較を実施した。すなわち、施設 C2 で処理された 10 羽の鶏について、3 カ所（胸、腹部；以降「腹」、モモ）からそれぞれ採材し、一般細菌数を比較した。以降の調査については、2 カ所（胸、モモ）を採材部位とした（図 4、5）。

#### 4) 採材ポイント

牛、ならびに豚については、2 時点（冷蔵庫搬入前；以降「冷蔵前」、冷蔵保存後約 24 時間；以降「冷蔵後」とした。鶏については、1 時点（チラー処理後）とした。

#### 5) 採材方法

「枝肉の微生物検査実施要領（平成 26 年度）」（厚生労働省）に従い、市販のキット（GSI クレオス製「BM フキトレール A」）による綿棒を用いた拭き取りを実施した。拭き取り領域は、牛、および豚では 100cm<sup>2</sup>、鶏では 25cm<sup>2</sup>とした。鶏用の拭き取り枠はステンレス板で作製した（図 6）。綿棒が枝肉と平行になるように当て、縦横斜め（計 4 方向）、各方向につき 10 往復させて拭き取りを行った。拭き取り検体は冷蔵（4℃）条件下で日本大学生物資源科学部獣医学科獣医公衆衛生学研究室に運搬し、拭き取り採取後 72 時間以内に下記衛生指標細菌の培養を行った。

#### 6) 調査対象の衛生指標細菌

本研究では、日本において枝肉の微生物検査として、あるいは米国、EU で HACCP 検証方法のいずれかにおいて採用されている 5 種類の衛生指標細菌について検討した。すなわち、一般衛生管理の指標細菌として、一般細菌数（日本、EU）、大腸菌群（日本）、および糞便汚染指標細菌として、大腸菌（米国）、腸内細菌科菌群（日本、EU）、ならびに病原細菌としてサルモネラ属菌（EU）について、それぞれ検討した。

#### 7) 衛生指標細菌数の測定

各検体「枝肉の微生物検査実施要領（平成 26 年度）」（厚生労働省）に従い、各指標細菌数を計測した。すなわち、各拭き取り材料 1ml 量を終量 10ml となるように滅菌 PBS に回収し、10 倍階段希釈液を作成した。各検体の 1 ml 量を、各条件につき 2 枚ずつのペトリフィルム（AC プレート：

一般細菌用、EC プレート：大腸菌群/大腸菌用、EB プレート：腸内細菌科菌群用）にそれぞれ接種した。AC プレートは 35℃で 48 時間、EC、および EB プレートは 35℃で 24 時間培養し、それぞれ形成されたコロニー数を計測した。

サルモネラ属菌については、ペトリフィルムサルモネラ属菌測定システムを用いて測定し、添付のプロトコールに従った。すなわち、拭き取り材料 1ml 量を等量（1ml）の 3M サルモネラ属菌用前増菌基礎培地に接種し、41.5℃で 18 時間培養（前増菌培養）後、培養物 0.1ml 量をラパポート・バシリアディス R10 プロス（R-V R10）10.0ml に加え、41.5℃、24 時間培養（選択増菌培養）した。培養後、SALX プレートに塗抹し、41.5℃で 24 時間した。さらに、選択増菌した後の培養物について、DHL、MLCB 寒天培地にも併せて接種し、37℃で 24 時間培養した。

#### 8) 統計解析

拭き取り部位の比較では、Friedman 検定、並びに Wilcoxon 順位和検定により行った。採材ポイント、ならびに施設間比較には、Mann-Whitney U 検定により行った。本研究では、検出限界未満、および検出限界超となった検体については、それぞれ 0 cfu/cm<sup>2</sup>、および 25,000(<) cfu/cm<sup>2</sup>として扱った。

#### 9) 牛および豚のと畜処理工程における微生物汚染状況文献調査

文献データベースは、Scopus（エルゼビア）および JDreamIII（株式会社ジー・サーチ）を用いた。HACCP 工程の全般を対象とした。また「abattoir、slaughter、carcass、ligat、eviscerat、hide、trim、wash、decontaminat、cool、chill、refrigirat」をキーワードとした。それらを適宜に組み合わせ、日本、米国、カナダ、欧州（英国、フランス、ドイツ、イタリア、スペイン）を対象として文献を収集した。1990 年以降を調査期間とした。

欧文論文は和訳後の要点について、邦文論文はその要点について、各文献の個票を作製した。食道結紮、肛門結紮、剥皮、内臓摘出、トリミング、洗浄・殺菌、冷却、冷蔵・保管」等の処理工程を項目として各文献を整理し、一覧表を作成した。

個票に基づき、各文献の重要点を抽出し、一覧表を作製した。その際、一覧表に記載した抽出部

分が視覚的にわかるよう、個票を作製した。  
調査は東レリサーチセンターに依頼した。

## C. 研究結果

1) 「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料の作成

「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料の一部について掲載する (図 7)。

スライド 1 : 我が国では検証という言葉が Validation、Verification、Audit で使用されている。と畜検査員・食鳥検査員は Audit (監査) の立場として、HACCP に参加するものである。

スライド 2 : と畜場、食鳥処理場はコーデックス HACCP の 7 原則 (12 手順) を実践し、その内容を踏まえた上で、衛生管理計画を作成する基準 A である。よって、HACCP 導入については HACCP を熟知したスタッフがと畜場、食鳥処理場に存在することが必要。

スライド 3 : 加熱工程のないと畜場、食鳥処理場の HACCP はリコールプログラムを備えた一般衛生管理が最も重要である。

スライド 4 : と畜場では一般衛生管理を確実に実施することで微生物制御の効果が上がる。HACCP は衛生度を保証するものである。

スライド 5 : 米国食品安全検査局 (FSIS) では腸管出血性大腸菌 (EHEC) の汚染は「喉差し」、「剥皮」、「肛門結紮」、「内臓摘出」の工程で頻繁するので、注意が必要であるとしている。よって、これらの工程を一般衛生管理や重要管理点 (CCP) によって管理する必要がある。

スライド 6 : 対米輸出、対 EU 輸出認定にあってはこれらの手洗いや前掛け消毒装置が必要であり、獣毛を含む汚物を発見しやすくするためにスポットライトで照度を上げている。

スライド 7 : 施設の一般衛生管理として床と壁の境界は掃除がしやすいように R 構造とすることやホースはホースラックへかけること等を実施しなければならない。

スライド 8 : 米国や EU 諸国等とはと畜場、食鳥処理場では HACCP システムは導入済みであり、次のステップとしてゼロトレランスが実施されている。

スライド 9 : と畜検査員・食鳥検査員のゼロトレ

ランスの実施は枝肉検査時での全頭検査および最終洗浄前の枝肉の抽出検査である。

### 2) 牛処理施設の細菌数

#### 2-1) 拭き取り部位の比較

施設 B1、および B2 でそれぞれ冷蔵前 (図 8)、および冷蔵後 (図 9) に、肛門、ともばら、胸からそれぞれ拭き取りを行い、一般細菌数を比較した。その結果、施設 B1 で採取した冷蔵前の検体の中央値は、肛門で  $8.6 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、ともばらで  $1.3 \times 10^2$  cfu/cm<sup>2</sup>、胸で  $7.8 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup> で、何れも、拭き取り部位間で有意差は認められなかった。一方、施設 B2 では、冷蔵前の検体においては、肛門で 4.1 cfu/cm<sup>2</sup>、ともばらで  $1.9 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、胸で 7.5 cfu/cm<sup>2</sup> で、ともばらは、肛門、胸に比べ、有意 (それぞれ  $p < 0.005$ 、 $p < 0.05$ ) に高い値を示した。

一方、冷蔵後では、施設 B1 では、肛門で 9.0 cfu/cm<sup>2</sup>、ともばらで  $1.5 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、胸で 9.0 cfu/cm<sup>2</sup>、施設 B2 では、肛門で検出限界未満、ともばらで 2.9 cfu/cm<sup>2</sup>、胸で検出限界未満で、いずれも拭き取り部位間で有意差は認められなかった。

#### 2-2) 採材ポイントの比較

施設 B1、および B2 でそれぞれ採取した、胸、ともばら、肛門全ての検体の一般細菌数を、それぞれ採取したポイント毎に比較した (図 10)。その結果、施設 B1 で採取された検体の中央値は、冷蔵前で  $8.7 \times 10$  cfu/cm<sup>2</sup>、冷蔵後で  $1.4 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、施設 B2 の検体の中央値は、冷蔵前で 7.5 cfu/cm<sup>2</sup>、冷蔵後で検出限界未満となり、両施設において、何れも冷蔵前の検体で有意 ( $p < 0.001$ ) に高い値を示した。

#### 2-3) 施設間の比較

冷蔵前、および冷蔵後に施設 B1 および同 B2 でそれぞれ採取した、胸、ともばら、肛門、全ての検体の一般細菌数を、施設毎に比較した (図 11)。その結果、冷蔵前に採取された検体の中央値は、施設 B1 で  $8.7 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、同 B2 で 7.5 cfu/cm<sup>2</sup>、冷蔵後では、施設 B1 で  $1.4 \times 10^1$  個/cm<sup>2</sup>、同 B2 で検出限界未満となり、冷蔵前、および冷蔵後、何れにおいても、施設 B1 の検体で有意 ( $p < 0.001$ ) に高い値を示した。

冷蔵前のともばらの検体についてのみ、施設間

比較を行ったところ、施設 B1 で  $1.3 \times 10^2$  cfu/cm<sup>2</sup>、同 B2 で  $1.9 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup> となり、施設 B1 の検体で有意 ( $p < 0.01$ ) に高い値を示した (図 1 2)。

#### 2-4) 糞便汚染指標細菌等の検出状況

本研究で検討した検体のうち、施設 B2 で採取されたものは、大腸菌群を含め、何れの糞便汚染指標細菌も検出されなかった (表 2)。

一方、施設 B1 で採取された 90 検体のうち、4 検体 (4.4%) から腸内細菌科菌群が検出された。これらは全て冷蔵前に採取されたものであり、肛門、ともばらが各 2 検体であった。このうち、1 検体 (1.1% : 肛門) から大腸菌、および大腸菌群が検出された。

*Salmonella* は全ての検体で陰性であった。

### 3) 豚処理施設の細菌数

#### 3-1) 拭き取り部位の比較

施設 S1 および同 S2 でそれぞれ冷蔵前 (図 1 3)、および冷蔵後 (図 1 4) に、肛門、胸、頸からそれぞれ拭き取りを行い、一般細菌数を比較した。その結果、冷蔵前の検体において、施設 S1 で採取した検体の中央値は、肛門で 4.5 cfu/cm<sup>2</sup>、胸で  $5.8 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、頸で  $6.2 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup> で、胸、および頸は、肛門に比べ、有意 ( $p < 0.001$ ) に高い値を示した。一方、施設 S2 では、肛門で 3.9 cfu/cm<sup>2</sup>、胸で  $3.0 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、頸で  $2.1 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup> で、胸は、肛門に比べ、有意 ( $p < 0.05$ ) に高い値を示した。

冷蔵後では、施設 S1 では、肛門で検出限界未満、胸で  $1.2 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、頸で  $2.5 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup> で、胸、および頸は、肛門に比べ、有意 (それぞれ  $p < 0.01$ ,  $p < 0.005$ ) に高い値を示した。

#### 3-2) 採材ポイントの比較

施設 S1、および同 S2 でそれぞれ採取した、胸、頸、肛門全ての検体の一般細菌数を、それぞれ採取したポイント毎に比較した (図 1 5)。その結果、施設 S1 で採取された検体の中央値は、冷蔵前で  $3.8 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、冷蔵後で 8.4 cfu/cm<sup>2</sup> で、冷蔵前の検体で有意 ( $p < 0.001$ ) に高い値を示した。一方、施設 S2 では、冷蔵前で  $1.5 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、冷蔵後で検出限界未満となり、冷蔵前の検体で有意 ( $p < 0.001$ ) に高い値を示した。

#### 3-3) 施設間の比較

冷蔵前、および冷蔵後に施設 S1、および同 S2 でそれぞれ採取した、胸、頸、肛門全ての検体の一般細菌数を、施設毎に比較した (図 1 6)。その結果、冷蔵前に採取した検体の中央値は、施設 S1 で  $3.8 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup>、同 S2 で  $1.5 \times 10^1$  cfu/cm<sup>2</sup> であった。冷蔵後では、施設 S1 で 8.4 cfu/cm<sup>2</sup>、同 S2 で検出限界未満で、冷蔵前は冷蔵後に比べ、有意 ( $p < 0.001$ ) に高い値を示した。

同様に、冷蔵前の胸、頸の検体についてのみ、施設間比較を行ったところ、施設間で有意差は認められなかった (結果は示さず)。

#### 3-4) 糞便汚染指標細菌等の検出状況

本研究で検討した検体のうち、施設 S1、および同 S2 で採取されたもののうち、それぞれ 2 (2.2%)、および 2 (3.3%) 検体から腸内細菌科菌群が検出された (表 3)。このうち 1 検体は冷蔵後の頸から採取したものであったが、他は全て冷蔵前に採取された胸であった。

全ての検体において、大腸菌、大腸菌群、ならびに *Salmonella* は陰性であった。

### 4) 鶏処理施設の細菌数

#### 4-1) 拭き取り部位の検討

施設 C2 で処理された 10 羽の鶏について、3 カ所 (胸、腹、モモ) からそれぞれ採材し、一般細菌数を比較した (表 4)。その結果、平均値、中央値の順に、胸で  $1.2 \times 10^4$  cfu/cm<sup>2</sup>、 $4.9 \times 10^3$  cfu/cm<sup>2</sup>、腹で  $8.2 \times 10^3$  cfu/cm<sup>2</sup>、 $5.6 \times 10^3$  cfu/cm<sup>2</sup>、モモで  $6.8 \times 10^3$  cfu/cm<sup>2</sup>、 $5.3 \times 10^3$  cfu/cm<sup>2</sup> であった。

#### 4-2) 拭き取り部位の比較

施設 C1、および同 C2 でそれぞれチラー後に、胸、モモからそれぞれ拭き取りを行い、一般細菌数を比較した (図 1 7)。その結果、施設 C1 で採取した検体の中央値は、胸で  $2.3 \times 10^2$  cfu/cm<sup>2</sup>、モモで  $2.2 \times 10^2$  cfu/cm<sup>2</sup> で、拭き取り部位間で有意差は認められなかった。一方、施設 C2 では、胸で  $3.7 \times 10^2$  cfu/cm<sup>2</sup>、モモで  $8.2 \times 10^2$  cfu/cm<sup>2</sup> で、モモは胸に比べ、有意 ( $p < 0.01$ ) に高い値を示した。

#### 4-3) 施設間の比較

施設 C1、および同 C2 でそれぞれ採取した、胸、モモ全ての検体の一般細菌数を、施設毎に比較した (図 1 8)。その結果、施設 C1 で採取した検体

の中央値は、 $2.2 \times 10^2$  cfu/cm<sup>2</sup>、同 C2 で  $4.4 \times 10^2$  cfu/cm<sup>2</sup> で、施設 C2 は、同 C1 に比べ、有意 ( $p < 0.01$ ) に高い値を示した。

#### 4-4) 糞便汚染指標細菌等の検出状況

腸内細菌科菌群は、施設 C1、および同 C2 で採取されたものでは、それぞれ 16 検体 (53.3%)、および 20 検体 (66.6%) から検出された (表 5)。

このうち、大腸菌群と大腸菌が検出されたものは、施設 C1 で 3 検体 (10.0%)、同 C2 で 1 検体 (3.3%) であった。大腸菌群のみ検出されたものは 1 検体 (3.3%) であった。

一方、*Salmonella* は施設 C2 で処理された 1 検体 (3.3%) からのみ検出された。

#### 4-5) 衛生指標細菌間の相関関係

糞便汚染指標細菌間での関連性としては、大腸菌群、および大腸菌が検出された検体は、全て腸内細菌科菌群陽性であった。*Salmonella* の検出された検体は、腸内細菌科菌群は検出されたが、大腸菌群、および大腸菌は検出されなかった (表 5)。

腸内細菌科菌群数と、一般細菌数の相関性を検討したところ、それぞれの相関係数 (ピアソン相関) は胸では、 $r=0.556$ 、モモでは、 $r=0.452$  で、弱い相関性が認められた (図 19)。

#### 5) 牛および豚のと畜処理工程における衛生微生物分布状況に関する文献調査

米国オハイオ大学が公表している Supporting Documentation Materials for HACCP Decisions (<https://meatsci.osu.edu/programs/food-safety/resources/haccp/documentation-materials>) を入手し、本資料の Beef and Pork Slaughter Process のリストに掲載されている文献より選定した 34 報 (表 6) について、論文原報を入手し、概要を日本語でとりまとめた。

文献データベース (JDreamIII) を検索し、日本語文献の情報を収集した。各文献の抄録をもとに選定した文献の原報を入手して内容を確認し、最終的に 16 報 (表 7) について概要をとりまとめた。

英語文献については和訳後、各文献が対象としていると畜場 HACCP 中の工程、対象動物、微生物制御のためのパラメータを付していった (表 8)。

当該キーワードにヒットした文献で、取り上げるべき内容を持つ論文は、牛で 25 報、豚で 19 報だった (表 9)。

文献検索中、有効な食肉処理工程は、「トリミング (汚染物除去)」、「移送」、「枝肉洗浄」、「消毒・殺菌」、「消毒洗浄」、「洗浄 (機)」、「全行程」、「湯はぎ」、「内臓摘出」、「剥皮群」、「冷蔵群」に分類された (表 10)。これらの項目の中で、最も文献数が多かったのは「枝肉洗浄」で、全 44 報のうち、16 報を占めていた。次は「冷蔵群」の 9 報、さらに「剥皮群」の 6 報だった。

本文献調査は、牛・豚のと畜処理工程における有効な制御処置に関しても情報収集できている。表 11 は、枝肉に対しての処置を示す。付着細菌を減少させる処置は、主に海外で研究されていた。付着細菌を軽減するのは、薬剤噴霧処置で、具体的な薬剤は、「乳酸」「オゾン水」「過酸化水素」「酢酸」「次亜塩素酸等の塩素系薬剤」「熱水」「フマル酸」「リン酸三ナトリウム」「クエン酸」「リン酸活性化酸性化亜塩素酸ナトリウム」「クエン酸活性化次亜塩素酸ナトリウム」に分類された。全 44 報のうち、「酢酸」を用いている報告が最も多く、10 報を占めていた。「リン酸三ナトリウム」が 5 報、「塩素系薬剤」が続いた。リン酸あるいはクエン酸活性化亜塩素酸ナトリウムも塩素系薬剤になるが、別に分類した。

個票および一覧表を添付資料とした。

## D. 考察

1) 「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料の作成

HACCP 導入にあっては、と畜場・食鳥処理場側の従業員の教育だけでなく、監査を行うと畜検査員、食鳥検査員の教育が必要である。また、加熱工程のない食肉、食鳥肉の加工・製造では、CCP のモニタリングが目視判定になることが多いことから、明確な基準がなく、HACCP を実施している施設管理者だけでなく検査員も困惑していることが多い。と畜場・食鳥処理場の HACCP システムは一般衛生管理重視でコントロールすべきであることを啓発する必要があると思われた。また、欧米や EU で採用しているゼロトランスも HACCP 導入後には採用するべきであると思われた。



## 2) 牛、豚、鶏と体の衛生指標菌数

### 2-1) 牛処理施設

本研究において、採材部位ならびに採材ポイントについて検討した。これらの条件の設定には、より多くの一般細菌数が認められた条件を候補とすることとした。

採材部位の検討において、本研究で対象とした、と畜場施設のうち、施設 B2 では、ともばらは肛門、および胸に比べて有意に多くの菌数が検出されることが明らかとなった。このため、本研究で検討した採材部位のうち、ともばらから最も多くの一般細菌を検出できるものと考えられた。

採材ポイントの検討では、冷蔵前は冷蔵後よりも多くの一般細菌数が検出されたことから、採材ポイントは、冷蔵前とすることとした。

以上から、牛では、「ともばら」を「冷蔵前」に採材することと設定した。

一方、検討した糞便汚染指標細菌等（大腸菌群、および *Salmonella* を含む）のうち、最も多くの検体が検出されたのは、腸内細菌科菌群であった。これらは、何れも冷蔵前の拭き取り検体からのみ検出されたこと、さらには肛門と、ともばらから同頻度で検出されたことから、牛における糞便汚染指標細菌の検討には、「冷蔵前」に「肛門」および「ともばら」からふきとりを行い、腸内細菌科菌群を指標菌とすることで、最も感度良く、糞便汚染を検出できるものと考えられた。また、本研究では *Salmonella* が全く検出されなかったことから、本研究で対象とした施設では、同菌による牛肉の汚染は非常に少ないものと考えられた。

施設間比較において、施設 B1、ならびに同 B2 で採材された検体を比較したところ、施設 B1 は同 B2 に比べ、多くの一般細菌が検出された。さらには、腸内細菌科菌群、および大腸菌群、大腸菌の検出された検体は何れも施設 B1 であった。施設 B2 は対米国・EU 等牛肉輸出認定施設であり、施設 B2 で導入している HACCP システムは毎月、厚生労働省の査察を受けている。また、施設 B2 はゼロトランス（「わずかな不具合も見逃さず、不良品を徹底的に排除すること」で、と畜検査員は糞便、消化管内容物および乳房内容物が枝肉に付着していないことを目視検査し、汚染が認められた場合は、と畜検査員の監督下で汚染された部位を迅速に除去させ、汚染の無い枝肉を生

産させること）を実施している。これらのことから、施設 B2 では、より衛生度が高く評価された可能性が考えられた。

### 2-2) 豚処理施設

本研究において、採材部位ならびに採材ポイントについて検討した。これらの条件の設定には、より多くの一般細菌数が認められた条件を候補とすることとした。

採材部位の検討において、本研究で対象とした、と畜場施設のうち、施設 S1 では、胸、および頸からは、肛門に比べて有意に多くの一般細菌数が検出されることが明らかとなった。このため、本研究で検討した採材部位のうち、胸、あるいは頸が、より多くの一般細菌を検出できるものと考えられた。

採材ポイントの検討では、冷蔵前は冷蔵後よりも多くの一般細菌数が検出されたことから、採材ポイントは、冷蔵前とすることとした。

以上から、豚では、「胸、および頸」を「冷蔵前」に採材することと設定した。

一方、検討した糞便汚染指標細菌等（大腸菌群、および *Salmonella* を含む）のうち、腸内細菌科菌群のみが検出された。これらは、1 検体を除き何れも冷蔵前に胸を拭き取った検体であったことから、豚における糞便汚染指標細菌の検討には、「冷蔵前」に「胸」からふきとりを行い、腸内細菌科菌群を指標菌とすることで、最も感度良く、糞便汚染を検出できるものと考えられた。また、本研究では *Salmonella* が全く検出されなかったことから、本研究で対象とした施設では、同菌による牛肉の汚染は非常に少ないものと考えられた。

施設 S1、ならびに同 S2 で採材された検体を比較したところ、冷蔵前の検体では、両施設間で一般細菌数に有意差は認められなかった。さらには、腸内細菌科菌群は、各施設から、2 検体ずつ検出された。以上のことから、両施設で処理された豚枝肉の衛生状況は同程度であると考えられた。実際に、施設 S1 および S2 は、いずれも世界食品安全イニシアチブ（GFSI）に所属する同じ HACCP 認証を取得している。これらのことから、本研究においても、両施設は同様な衛生度を示したものと推定された。

### 2-3) 鶏処理施設

本研究において、採材部位の設定には、より多くの一般細菌数が認められた条件を候補とすることとした。

採材部位の検討において、胸、腹、モモについて10羽からの拭き取り検体について検討したところ、何れの間にも有意差は認められなかった。これは、採材のタイミングが、チラー洗浄直後であることから、チラー水により鶏と体のほぼ全域が浸漬されるため、何れの部位においても同程度の細菌汚染をしているものと考えられた。そこで本研究では、実際の作業実施上より簡便な作業となる「胸」、および「モモ」を拭き取り部位として設定した。実際に、施設C1、および同C2で採材された検体について、施設C2では、胸とモモを比較した結果、モモで多くの一般細菌が検出された。

以上から、鶏では、「胸」および「モモ」を採材することと設定した。この条件にて、施設C1、ならびに同C2で採材された検体を比較したところ、モモでは、施設C2は同C1に比べて多くの一般細菌数が検出された。施設C1、同C2ともに大規模食鳥処理施設であり、同じ内臓摘出装置を使用しているが、その他の処理工程は若干、異なっている。これらの処理工程の違いが一般細菌数の差にあらわれたのかもしれない。今後、両施設における一連の作業工程を比較することにより、一般細菌の汚染に関わる要因について検討する必要がある。

一方、糞便汚染細菌等（大腸菌群、および *Salmonella* を含む）については、牛や豚に比べ、効率に検出されたが、腸内細菌科菌群が最も高い割合で検出された。また、大腸菌群、大腸菌、ならびに *Salmonella* が検出された検体は、何れも腸内細菌科菌群が検出されたことから、最も感度良く、糞便汚染の指標となるものとして、腸内細菌科菌群が適当であると考えられた。

牛や豚は1頭ごとに使用器具等が消毒され個体で処理されるが、鶏の処理工程は連続で処理されている。本報告だけでなく、多くの国々の報告においても、鶏のふき取り検体は牛や豚のふき取り検体に比べ一般細菌、大腸菌群数、大腸菌等の検出割合は高率に、検出菌数は高値を示している。これは、鶏のふき取り検体の特徴であると思われた。

また、一般細菌数と腸内細菌科菌群数の間には

弱い相関性が認められた。鶏は、チラー水等により、と体全体が同様に細菌に汚染されるものと考えられる。このため、一般細菌と腸内細菌科菌群数の間にも相関性が認められたものと考えられる。これに対して、牛や豚は、作業工程、ならびに作業そのものにより、それぞれ糞便による汚染、あるいは環境からの汚染が異なる頻度で発生することが予想される。今後、牛や豚についても一般細菌数と腸内細菌科菌群数の相関性を検討する必要がある。

本研究では、HACCP システムの検証を目的としているため、対象施設における一連の作業工程の衛生管理を評価するために、「最も感度良く」一般細菌、ならびに糞便汚染指標細菌を検出することを指標として、各条件を設定した。このような指標で設定された評価方法により評価された成績は、実際に流通する枝肉の衛生状態を必ずしも反映していないことに留意する必要がある。実際に本研究でも、一般細菌数は、冷蔵前に比べ冷蔵後で少なく、また、一連の糞便汚染指標細菌等においても、牛や豚では冷蔵前からのみ検出された。以上のことから、本研究で検討した方法による成績と、市場で流通する枝肉の状態が乖離している可能性がある。実際に米国では、衛生指標細菌として、大腸菌を採用している。今後、確立するHACCP システム検証方法の目的を明確に設定し、対象とする施設事業者や一般消費者等にも啓蒙する必要がある。

平成30年度では、以上の成績について、より検体数を増やし、統計学的な解析をすることにより、各条件等を改めて検討した後、設定された検証方法を実際にわが国のさまざまな規模のと畜場、ならびに食鳥処理場で検証することを計画している。

### 3) と畜場への HACCP 導入を促進するための文献情報

と畜場および食鳥処理場への HACCP 導入を遅延させる原因の一つに、と畜処理工程における危害要因とその危害性の強さ、危害を減少制御するための処置についての情報収集とその整理、活用が難しいこと、そのために多大の手間暇がかかることがあげられる。この対応に基づき、HACCP 導入を計画する施設は CCP の設定を行う。本年度は、牛および豚のと畜処理工程に関わる微生物汚染

状況、その対策について文献収集し、欧文論文は和訳ののち文献個票を作製した。それらをと畜処理工程ごとに区分した一覧表を作成した。

今回の文献調査結果の特徴に、汚染している細菌種と菌数が読み取り易くなっていること、工程内で実施している各種の処置の前後における菌数の変化が明瞭になっていること、さらに、わが国では実施例が少ない、乳酸、酢酸、オゾン水等の殺菌液処理の成績が充実していることがあげられる。これらの特徴はと畜処理工程における CCP 設定に有効に作用すると考える。

本年度にまとめた文献情報は、本研究報告に添付するとともに、今後厚生労働省が実施する各種の研修会に資料として配布する。次年度は食鳥処理工程について、同様の調査を実施する予定である。

## E. 結論

と畜場および食鳥処理場への HACCP システムの義務化に際しては、導入と畜場・食鳥処理場側の管理者や従業員の HACCP 教育だけでなく、監査を行うと畜検査員、食鳥検査員の教育も必要であると思われた。

わが国の現状に適したと畜場・食鳥処理場の内部・外部検証システムを構築する必要がある。その検証システムが整備されている EU および米国の情報を提供し、検証システムの重要性をと畜・食鳥検査員に向かっての研修会資料を作製した。今年度は施設内に衛生検査スタッフが常駐した大規模と畜場および食鳥処理場の協力を得て拭き取り検査を実施した。これらの衛生検査スタッフを備えた施設では HACCP の構築や内部検証の実施は容易であると思われた。また、欧米や EU で採用しているゼロトレランスの考え方も HACCP 導入時または導入後には採用するべきであると思われた。

牛では、「ともばら」を「冷蔵前」に採材することにより、最も高率に一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群が最も検出率が高く、「冷蔵前」に「肛門」および「ともばら」の検体からのみ検出された。

豚では、「胸、および頸」を「冷蔵前」に採材することにより、最も高率に一般細菌数が検出された。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群

のみ検出され、「冷蔵前」に「胸」から採取した検体からのみ検出された。

鶏では、採材部位間で一般細菌数に有意差は認められなかった。糞便汚染指標細菌としては、腸内細菌科菌群が最も高率に検出された。

鶏では、一般細菌数と腸内細菌科菌群数の間に弱い相関性が認められた。

と畜場に HACCP を導入する際に有効な文献情報を収集整理した。牛および豚と体の処理工程別に文献を整理した。各行程について、汚染細菌種およびその汚染菌数、実施した処理の前後の菌数の変動が読み取り易い一覧表を作成した。HACCP 導入を計画する各と畜場施設が、それぞれの施設における CCP の効率よい設定に役立てるため、本情報の利用が望まれる。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 森田幸雄：2017 年 5 月，食肉処理施設における HACCP 導入による輸出促進の後押し—ハード面の施設とソフト面の構築の重要性—，畜産コンサルタント，53(5)，42-47.

### 2. 学会発表等

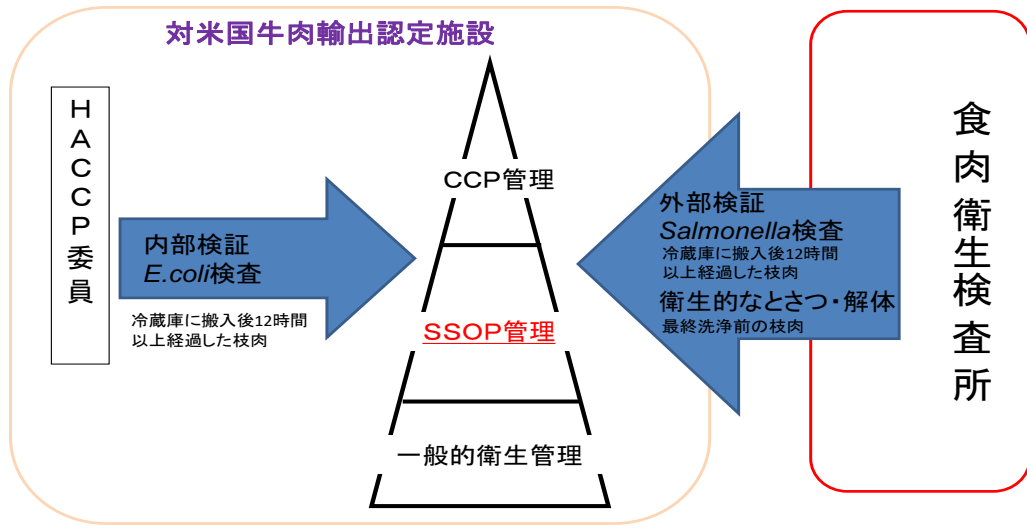
- 1) 森田幸雄：と畜場における HACCP 導入時のポイント および食肉・野生動物における最近の話題、東京都公衆衛生獣医師協議会主催、講演会、平成 29 年 7 月 7 日（東京都港区港南、食肉市場センタービル）
- 2) 森田幸雄：HACCP 手法導入による衛生管理について、（公）日本食肉市場卸売協会主催、経営トップセミナー、平成 29 年 7 月 26 日（東京都千代田区神田駿河台、中央大学駿河台記念館）
- 3) 森田幸雄：HACCP の基本と衛生管理で重要なこと、千葉県食肉流通協議会主催、HACCOP 講習会、8 月 31 日（千葉県旭市、千葉県立東部図書館研修室）
- 4) 森田幸雄：大規模食鳥処理場における微生物制御、一般社団法人岩手県獣医師会主催、第 4 回食鳥肉安全性確保研修会、平成 29 年 9 月 7-8

日（岩手県八幡平市、八幡平ハイツ）

- 5) 森田幸雄: HACCP 導入における指導・検証の平準化・総括、厚生労働省主催、HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会、平成 29 年 11 月 15-16 日（東京都港区港南、東京都芝浦食肉衛生検査所）平成 30 年 2 月 1-2 日（名古屋市港区、名古屋市食肉衛生検査所）、平成 30 年 2 月 22-23 日（兵庫県姫路市、姫路市食肉衛生検査センター）
- 6) 森田幸雄: 微生物学的制御からみた HACCP 導入時のポイント及び食肉・野生獣肉における話題、全国食肉検査所協議会微生物部会主催、平成 29 年度微生物部会研修会、平成 29 年 11 月 29 日（横浜市中区桜木町、横浜市健康福祉総合センター）
- 7) 森田幸雄: と畜場の HACCP について（米国の STEC 対策を中心に）、厚生労働省主催、平成 29 年度食肉衛生技術研修会、平成 30 年 1 月 22 日（東京都中央区日本橋茅場町、東京証券会館 8 階ホール）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし



EU

内部検証: 一般生菌数、腸内細菌科菌群、*Salmonella*  
冷蔵庫に搬入される前の枝肉

USA

外部検証: 衛生的なとさつ・解体  
最終洗浄前の枝肉

図1 米国・EU 食肉輸出施設における内部検証と外部検証

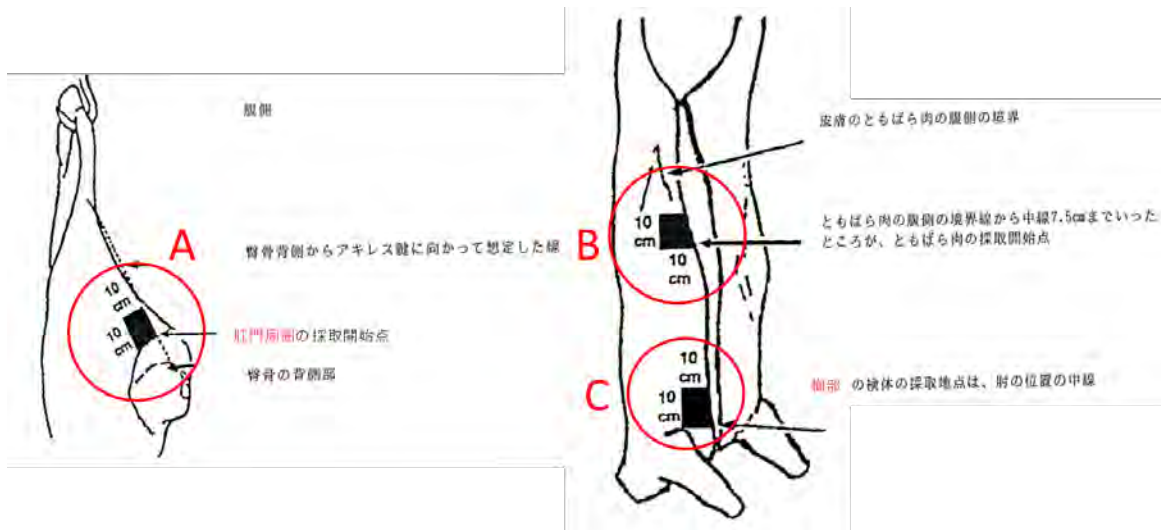


図2 牛の採材部位

○の肛門周囲 (A)、ともばら (B)、胸部 (C) (10cm×10cm) を採取。

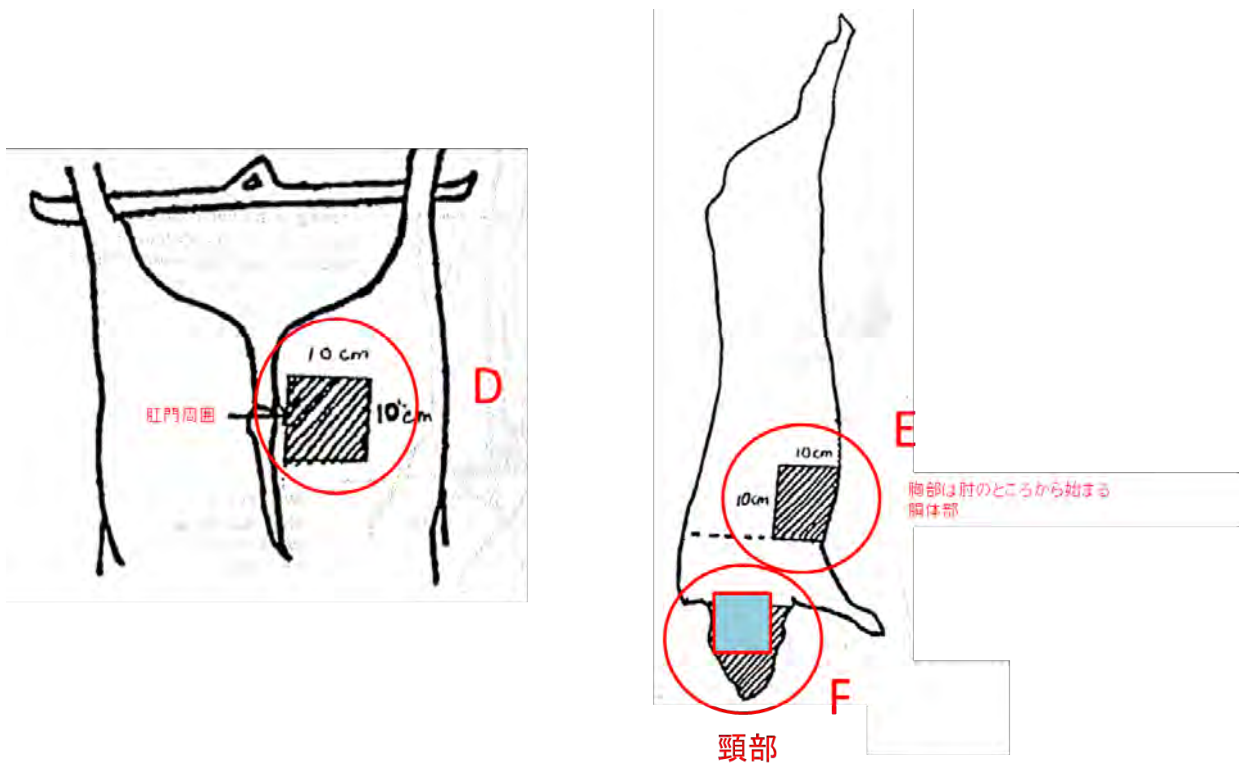


図3 豚の採材部位

○の肛門周囲 (D)、胸部 (E)、頸部 (F) (10cm×10cm) を採取。

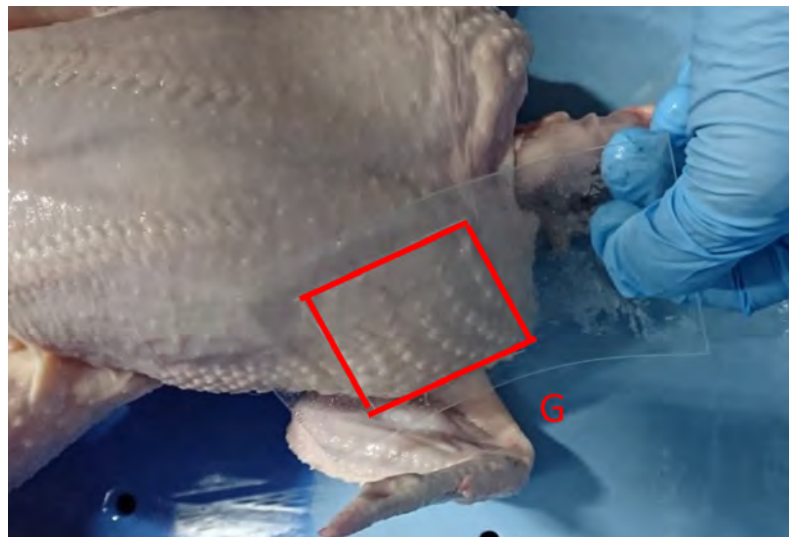


図4-1 鶏の採材部位

□の胸部 (G) (5cm×5cm) を採取。写真ではビニール枠ですが、実際は滅菌ステンレス板 (図4-3) で実施。

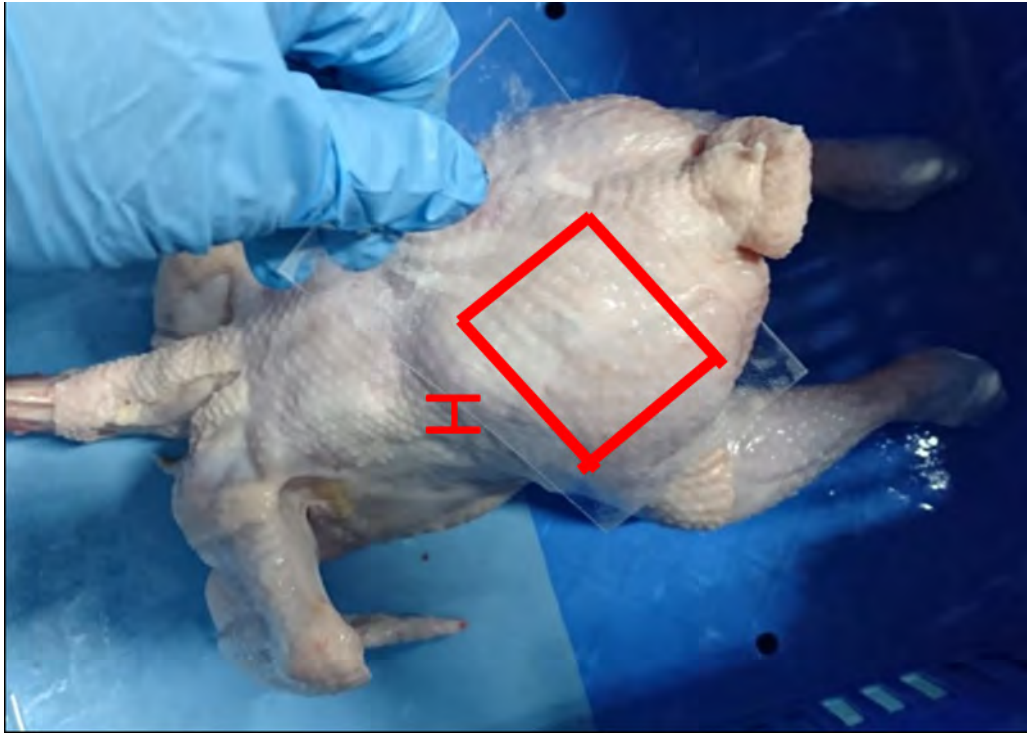


図5 鶏の採材部位

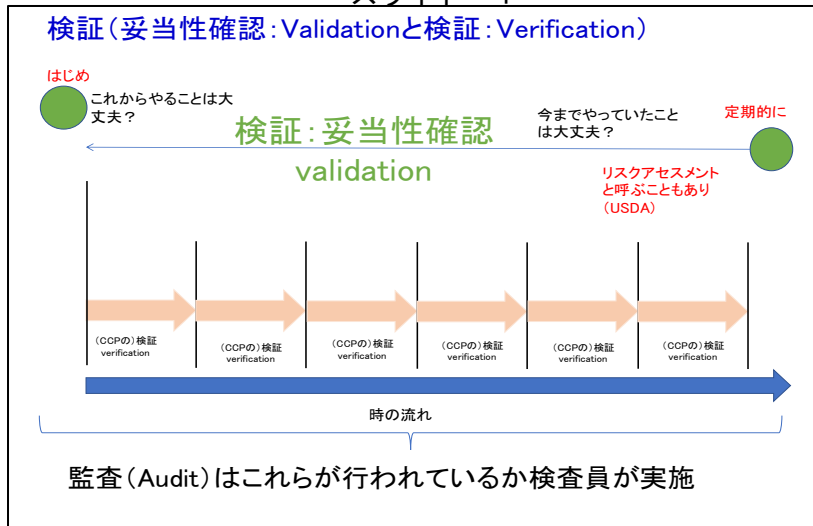
□のモモ部 (H) (5 cm×5 cm) を採取。写真ではビニール枠ですが、実際は滅菌ステンレス板 (図4-3) で実施。



図6 鶏用拭き取り枠

ステンレス板で 5 cm×5 cm を作製した。

スライド 1



スライド 2

**基準 A**  
 コーデックス HACCP の7 原則(12 手順)を実践し、その内容を踏まえた上で、衛生管理計画を作成

一般衛生管理の内容

- ・ 施設・設備の衛生管理
- ・ 使用水の管理
- ・ そ族・昆虫対策
- ・ 廃棄物・排水の取扱い
- ・ 食品等の取扱い
- ・ 回収・廃棄
- ・ 情報の提供
- ・ 食品取扱者の衛生管理・教育訓練等

必要な手順書等も作成

**基準 B**  
 一般衛生管理を基本とし、必要に応じて重要管理点を設けて管理する、**HACCP の考え方に基づく衛生管理**を行う

対象業種 :

小規模事業者  
 当該店舗での小売販売のみを目的とした製造・加工・調理施設  
 例)菓子製造販売業、食肉販売業、魚介類販売業、豆腐製造販売業、弁当調理販売業等  
 提供する食品の種類が多く、変更頻度が頻繁な業種  
 例)飲食店、給食施設、そうざい製造業、弁当製造業等

一般衛生管理による管理で対応が可能な業種  
 例)包装食品の販売業、食品の保管業、食品の運搬業等

スライド 3

**HACCPシステムの導入**

**HACCPによる管理**  
 各製造工程ごとに生物、物理、化学的なハザードを考える(HA)。HAを管理するための重要管理点(CCP)をみつける。そのCCPをしっかり管理して記録する。

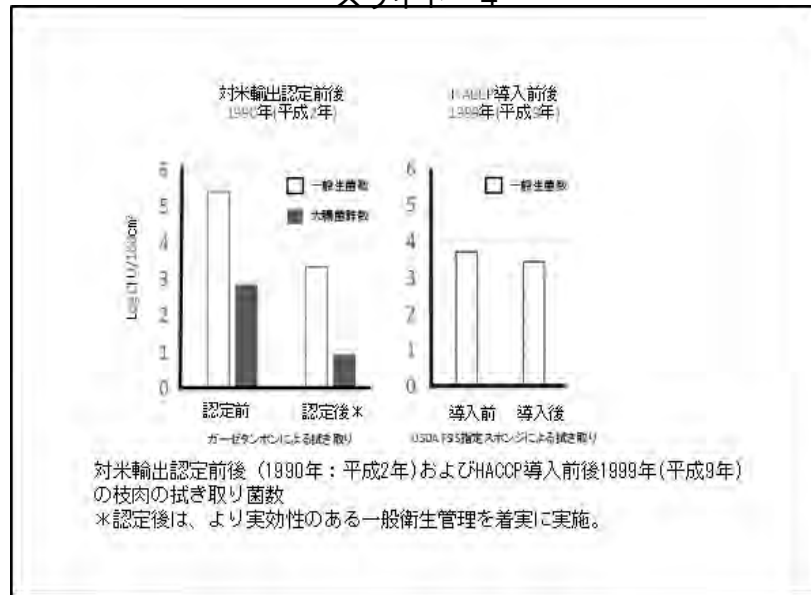
**一般衛生管理＝前提条件プログラム**  
 5S活動:「整理」、「整頓」、「清掃」、「清潔」、「習慣」  
 製造環境の衛生管理  
 施設、器具・機材は清潔に、ネズミやハエが入り込まないように、排水・廃棄物は食品と接触しないようにして、すみやかに外へ、飲用適な水の確認など  
 食品の衛生的な取り扱い  
 衛生的な原材料を仕入れる、二次汚染しないように(作業員から、施設・器具・機材から)  
 従業員衛生管理、従業員教育・訓練、記録

**危機管理  
 リコールプログラム**

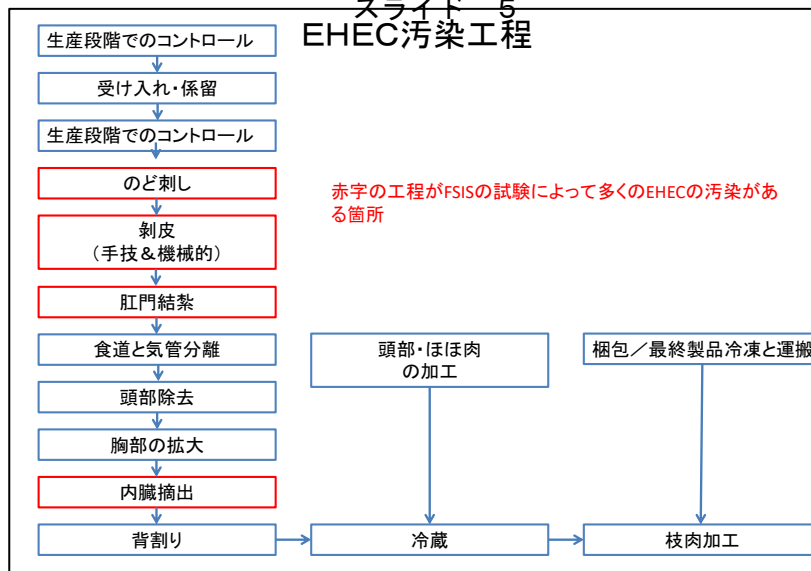
図7 「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料の一部を掲載



スライド 4



スライド 5  
EHEC汚染工程



スライド 6

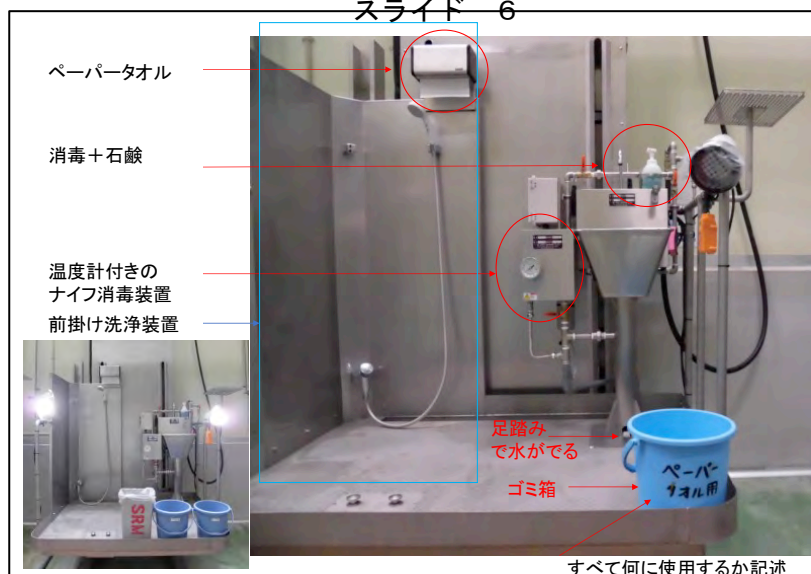


図7 「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料の一部を掲載



### ゼロトレランス(米国やEUで導入)

ゼロトレランスの本来の意味は「わずかな不具合も見逃さず、不良品を徹底的に排除すること」  
(米国の教育現場から現れた発想)

↓

と畜検査員は糞便、消化管内容物および乳房内容物が枝肉に付着していないことを目視検査し、汚染が認められた場合は、と畜検査員の監督下で汚染された部位を迅速に除去させ、汚染の無い枝肉を生産させること。

### オフライン検査員による枝肉ゼロトレランス検証

・ 少なくとも、と畜シフト毎に1回はゼロトレランス検証(枝肉、頭、頬肉、喉肉)を行わなければならない。

搬入 → と畜 → 解体 → 枝肉検査 → 枝肉洗浄

枝肉検査: オンライン検査官 ゼロトレランス検証

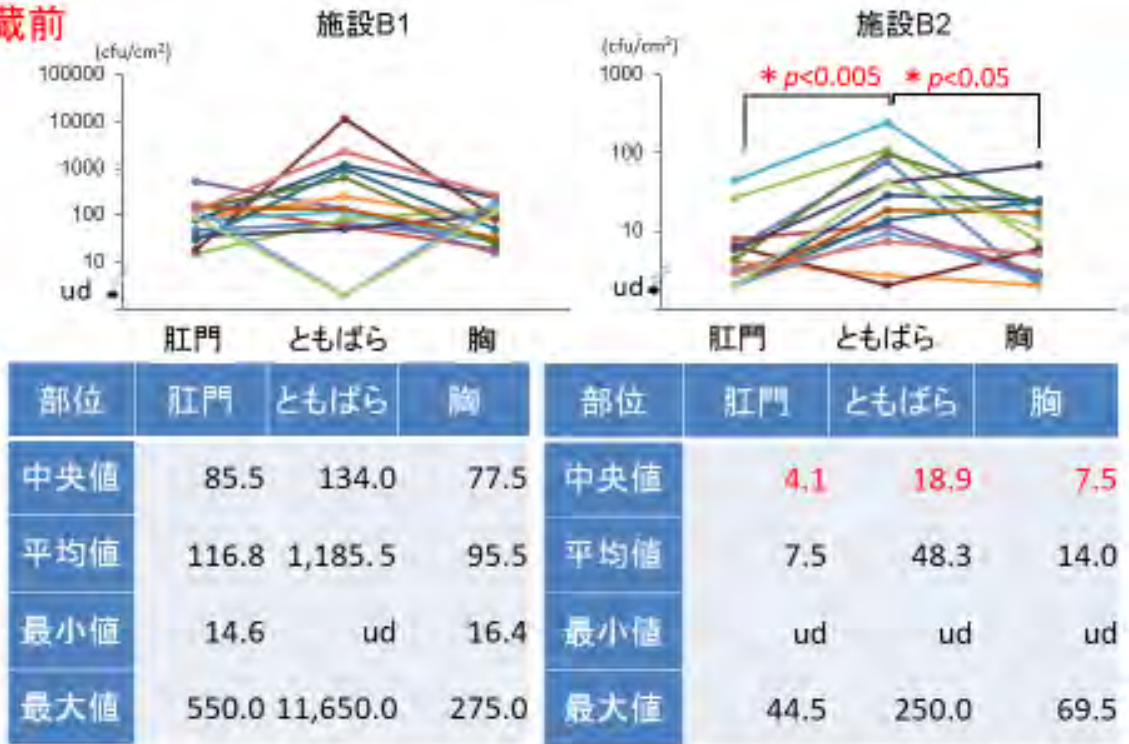
枝肉洗浄: オフライン検査官 ゼロトレランス検証 (抗菌作用反応前)

Slaughter Volume (# of animals per day)	# of Carcass Units (1 Unit = whole carcass)	# of Sides
100 or less	2	4
101 to 250	4	8
251 to 500	7	14
More than 500	11	22

**Note:** For each zero tolerance task performed, it is not necessary to examine all of these units at the same time.

図7 「HACCP 導入における指導・検証の平準化に資する実地研修会」等に使用する資料の一部を掲載

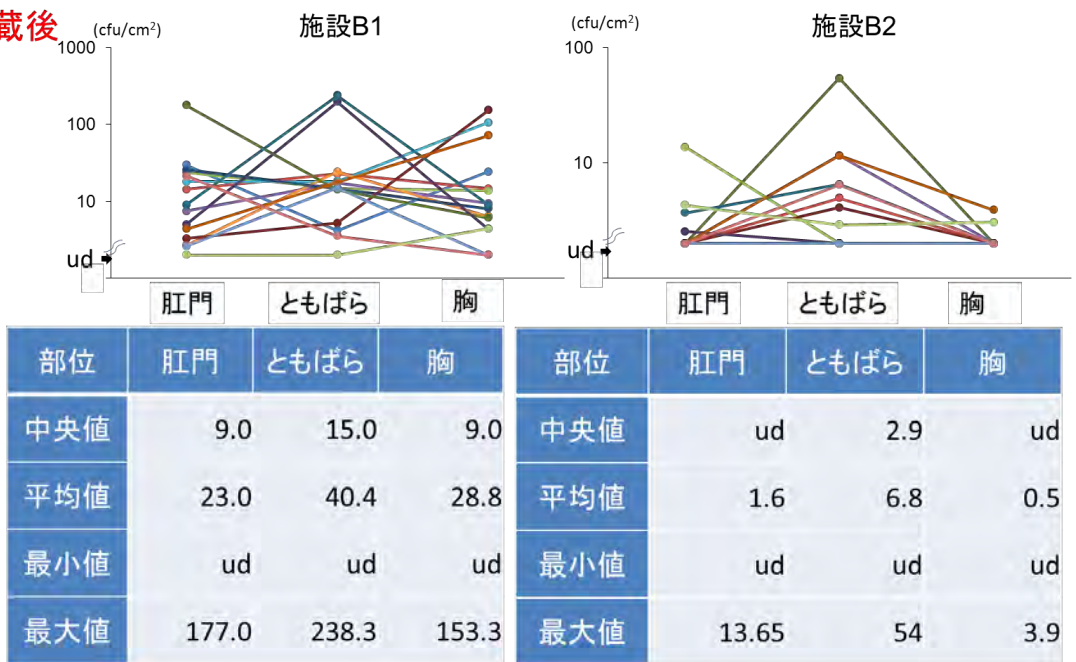
冷蔵前



ud: 検出限界未満

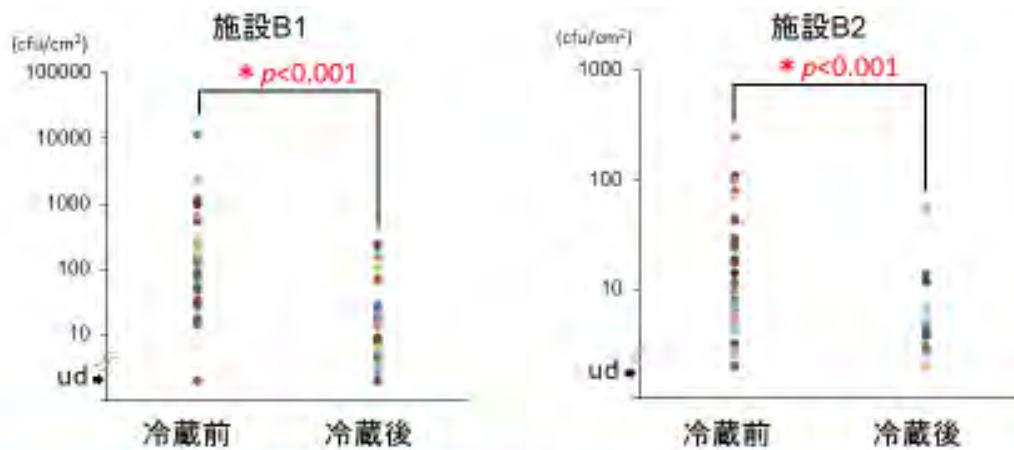
図8 一般細菌数 | 拭き取り部位の比較 | 牛

冷蔵後



(cfu/cm<sup>2</sup>) ud: 検出限界未満

図9 一般細菌数 | 拭き取り部位の比較 | 牛

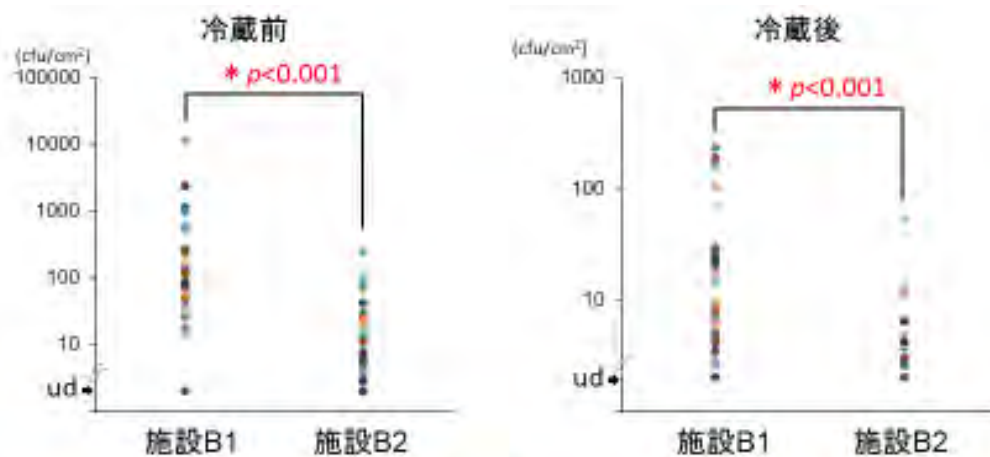


採材ポイント	冷蔵前	冷蔵後
中央値	87.0	14.3
平均値	465.9	30.7
最小値	ud	ud
最大値	11,650	238.3

採材ポイント	冷蔵前	冷蔵後
中央値	7.5	ud
平均値	23.3	3.0
最小値	ud	ud
最大値	250.0	54.0

ud: 検出限界未満

図10 一般細菌数 | 採材ポイントの比較 | 牛



施設	B1	B2
中央値	87.0	7.5
平均値	465.9	23.3
最小値	ud	ud
最大値	11,650.0	250.0

施設	B1	B2
中央値	14.3	ud
平均値	30.7	3.0
最小値	ud	ud
最大値	238.3	54.0

ud: 検出限界未満

図11 一般細菌数 | 施設間の比較 | 牛

- 部位 : ともばら
- タイミング : 洗浄後
- 有意差検定 : Mann-Whitney U検定



図12 牛設定条件による一般細菌数の施設間の比較



図13 一般細菌数 | 拭き取り部位の比較 | 豚



図14 一般細菌数 | 拭き取り部位の比較 | 豚

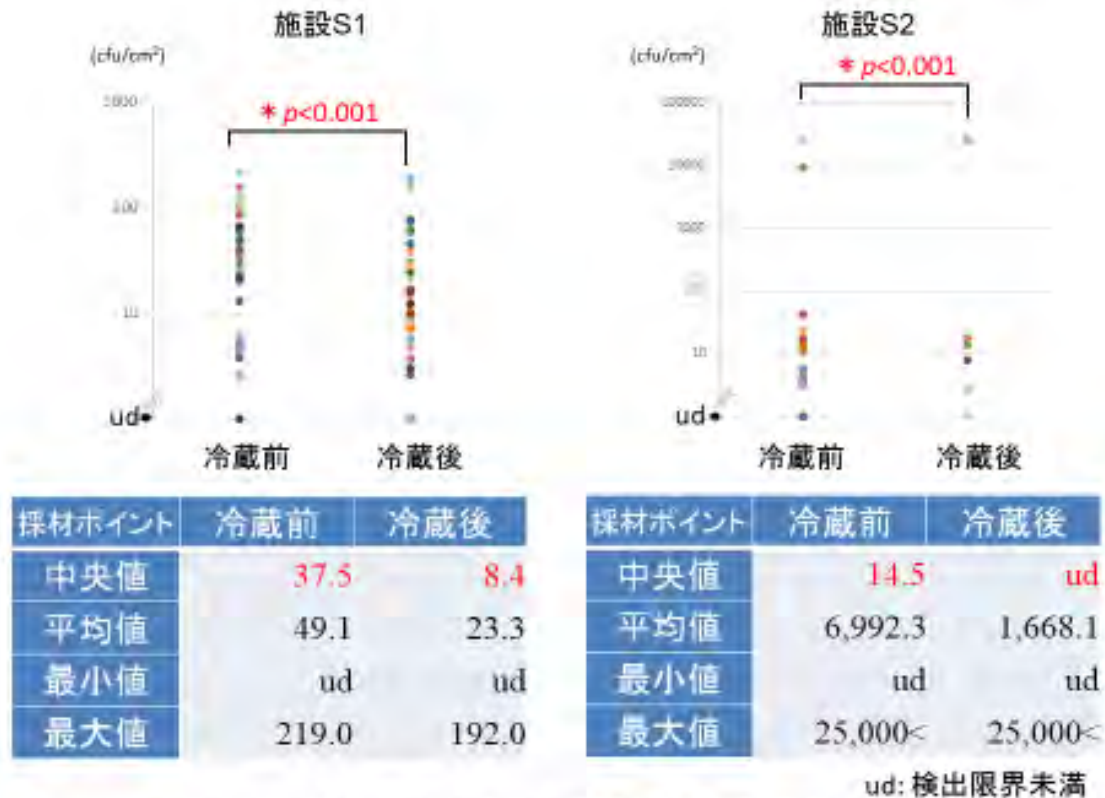


図15 一般細菌数 | 採材ポイントの比較 | 豚

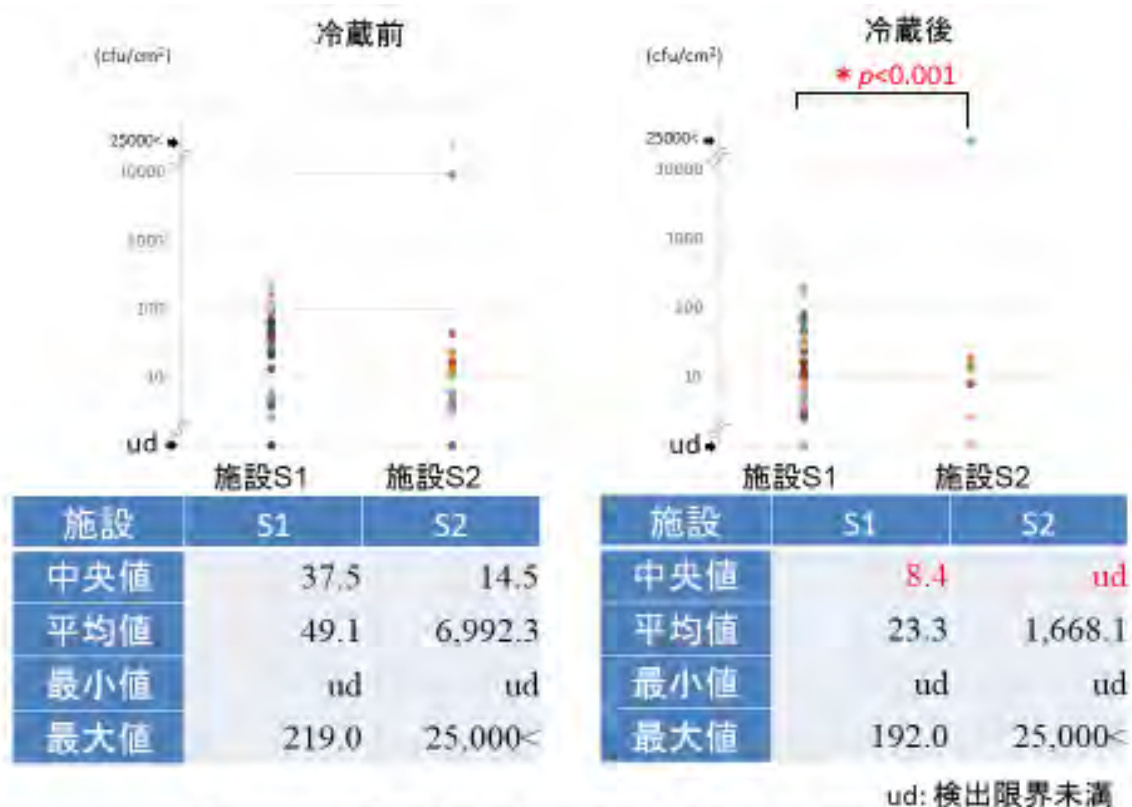


図16 一般細菌数 | 施設間の比較 | 豚

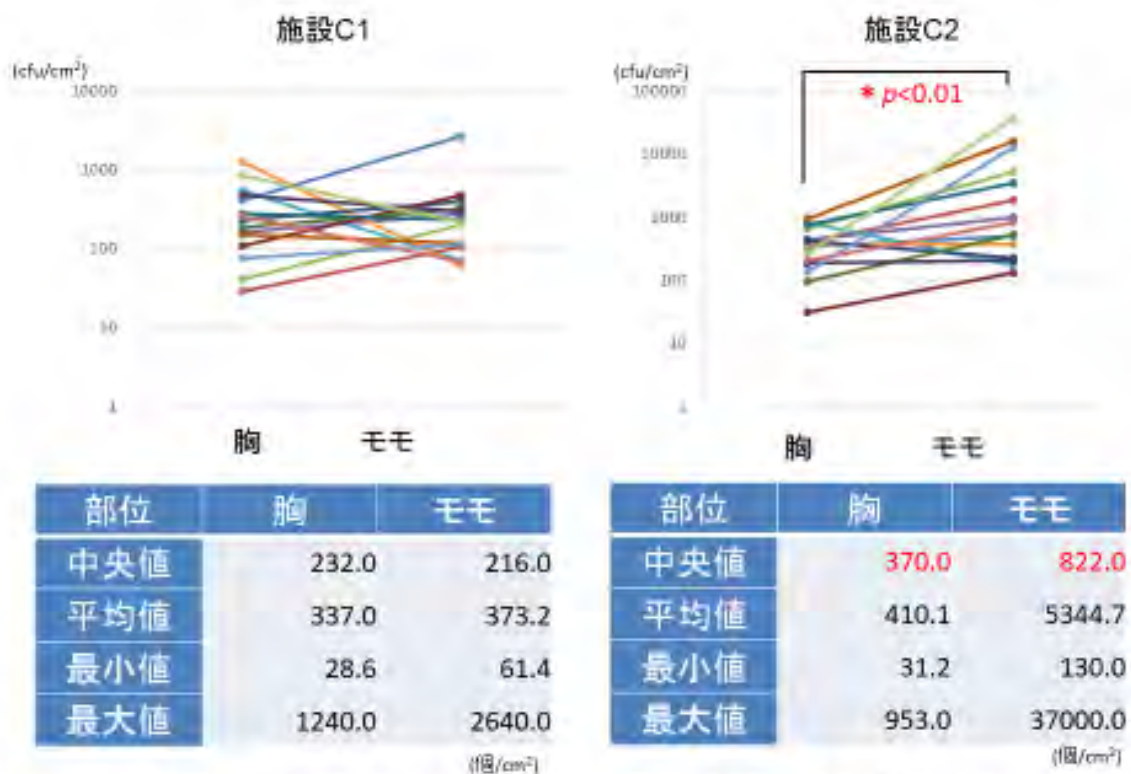


図17 一般細菌数 | 拭き取り部位の比較 | 鶏



図18 一般細菌数 | 施設間の比較 | 鶏

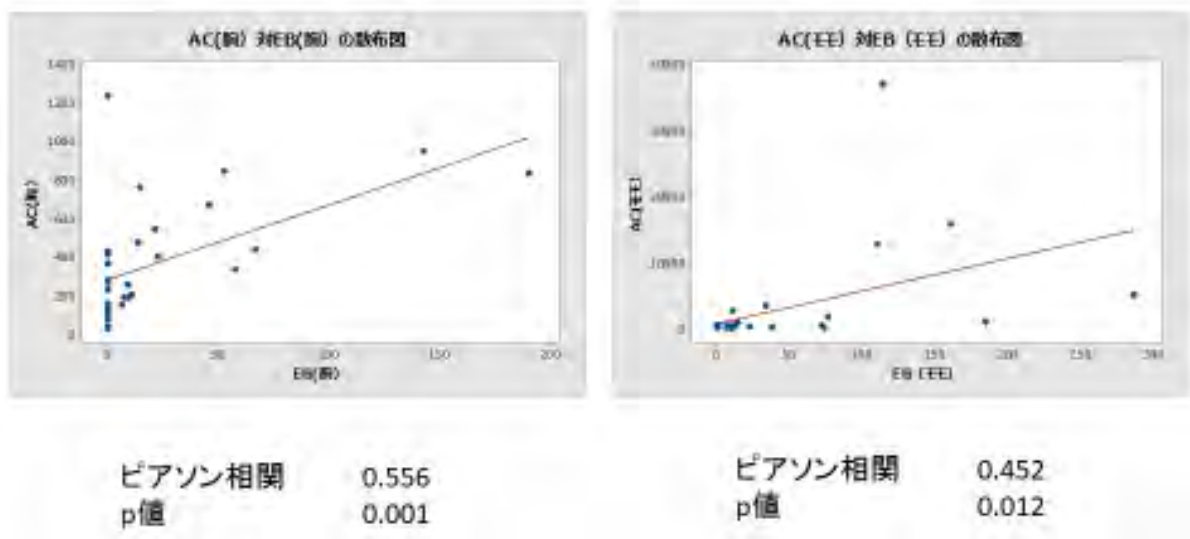


図19 一般細菌数 (AC)と腸内細菌科菌群数(EB)の相関関係 | 鶏



対象家畜	施設名	年間処理頭(羽)数 <sup>*1</sup>	従業員数 <sup>*2</sup>
牛	B1	10,400	80
牛	B2	18,110	330
豚	S1	118,806	124
豚	S2	472,000	240
鶏	C1	1,770万	356
鶏	C2	806.1万	211

\*1: 平成28, あるいは29年度。概算を含む  
\*2: 一部実習生を含む

表2 糞便汚染指標細菌（大腸菌群を含む）の検出された検体の概要（牛）

検体名	施設	採材ポイント	拭き取り箇所	腸内細菌科菌群*1	大腸菌群*1	<i>E. coli</i> *1	<i>Salmonella</i> *3	一般細菌*1
B1-1-01-A	B1	冷蔵前	肛門	1.9	1.9	1.9	—	48.0
B1-1-14-B	B1	冷蔵前	ともばら	2.5	ud*2	ud*2	—	2390.0
B1-1-15-A	B1	冷蔵前	肛門	3.0	ud*2	ud*2	—	87.5
B1-1-15-B	B1	冷蔵前	ともばら	18.6	ud*2	ud*2	—	ud*2
*1：単位：cfu/cm <sup>2</sup>								
*2：ud:検出限界未満								
*3： <i>Salmonella</i> は定性試験								

表3 糞便汚染指標細菌（大腸菌群を含む）の検出された検体の概要（豚）

検体名	施設	採材ポイント	拭き取り箇所	腸内細菌科菌群*1	大腸菌群*1	<i>E. coli</i> *1	<i>Salmonella</i> *3	一般細菌*1
S1-1-05-E	S1	冷蔵前	胸	2.7	ud	ud	—	156.0
S1-2-01-F	S1	冷蔵後	頸	1.9	ud	ud	—	79.5
S2-1-01-E	S2	冷蔵前	胸	4.7	ud	ud	—	42.5
S2-1-04-E	S2	冷蔵前	胸	2.5	ud	ud	—	25,000<
*1：単位：cfu/cm <sup>2</sup>								
*2：ud:検出限界未満								
*3： <i>Salmonella</i> は定性試験								

表4 施設C2で処理された10羽の鶏における拭き取り箇所間の一般細菌数

検体番号	一般細菌数 (cfu/cm <sup>2</sup> )		
	胸	腹	モモ
1	3550	4700	6350
2	4050	28500	2600
3	14650	10850	3250
4	53500	10300	825
5	5300	5750	4750
6	4450	5400	8550
7	24000	5000	5900
8	1265	510	620
9	6800	9400	12500
10	1560	1445	22150
平均	11912.5	8185.5	6749.5
中央値	4875	5575	5325
最小値	1265	510	620
最大値	53500	28500	22150

表5 糞便汚染指標細菌（大腸菌群を含む）の検出された検体の概要（鶏）

検体名	施設	拭き取り箇所	腸内細菌科菌群*1	大腸菌群*1	<i>E.coli</i> *1	<i>Salmonella</i> *3	一般細菌*1
C1-1-01-H	C1	モモ	10.6	ud	ud	—	2640
C1-1-03-H	C1	モモ	37.4	11.4	10.6	—	198
C1-1-04-H	C1	モモ	11.4	ud	ud	—	280
C1-1-05-G	C1	胸	21.4	ud	ud	—	546
C1-1-05-H	C1	モモ	6.8	ud	ud	—	71.4
C1-1-07-H	C1	モモ	11.4	6	ud	—	404
C1-1-09-G	C1	胸	9.6	ud	ud	—	190
C1-1-09-H	C1	モモ	6	ud	ud	—	322
C1-1-10-G	C1	胸	13.6	ud	ud	—	476
C1-1-10-H	C1	モモ	8.8	ud	ud	—	296
C1-1-12-G	C1	胸	6.4	ud	ud	—	152
C1-1-12-H	C1	モモ	6	ud	ud	—	116.6
C1-1-14-G	C1	胸	9.2	ud	ud	—	258
C1-1-14-H	C1	モモ	9	ud	ud	—	69.2
C1-1-15-G	C1	胸	52.6	9.2	8.6	—	848
C1-1-15-H	C1	モモ	22.4	15	15	—	216
C2-1-01-G	C2	胸	57.6	ud	ud	—	336
C2-1-01-H	C2	モモ	72	ud	ud	—	498
C2-1-02-G	C2	胸	22.8	ud	ud	—	406
C2-1-02-H	C2	モモ	76	ud	ud	—	1820
C2-1-03-G	C2	胸	45.8	ud	ud	—	670
C2-1-03-H	C2	モモ	286	ud	ud	—	5140
C2-1-04-G	C2	胸	66.6	ud	ud	—	444
C2-1-04-H	C2	モモ	184	ud	ud	—	973
C2-1-05-G	C2	胸	190	72.9	71.9	—	838
C2-1-05-H	C2	モモ	73.2	ud	ud	—	176
C2-1-06-H	C2	モモ	6.4	ud	ud	—	366
C2-1-10-G	C2	胸	7.2	ud	ud	—	192
C2-1-11-G	C2	胸	14.2	ud	ud	—	764
C2-1-11-H	C2	モモ	33.2	ud	ud	—	3480
C2-1-12-G	C2	胸	142.8	ud	ud	—	953
C2-1-12-H	C2	モモ	160	ud	ud	—	16000
C2-1-13-H	C2	モモ	110	ud	ud	—	12800
C2-1-14-G	C2	胸	11	ud	ud	—	208
C2-1-14-H	C2	モモ	13.6	ud	ud	—	822
C2-1-15-H	C2	モモ	114	ud	ud	+	37000

\*1：単位：cfu/cm<sup>2</sup>  
 \*2：ud:検出限界未満  
 \*3：*Salmonella*は定性試験

表 6 抽出した英語文献

文献 ID	書誌事項
1	Hardin, M.D., G.R. Acuff, L.M. Lucia, J.S. Oman, and J.W. Savell. 1995. Comparison of methods for decontamination from beef carcass surfaces. <i>Journal of Food Protection</i> . 58 (4) 368-374.
2	Kochevar, Sherri L., John N. Sofos, Robert R. Bolin, James O. Reagan, and Gary C. Smith 1997. Steam Vacuuming as a Pre-Evisceration Intervention to Decontaminate Beef Carcasses. <i>Journal of Food Protection</i> . 60 (2) 107-113.
3	FSIS Directive 6420.1 To access on the internet, go to: <a href="http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/FSISDir6420-1.pdf">http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FSISDirectives/FSISDir6420-1.pdf</a>
4	Phebus, R.K., A.L. Nutsch, D.E. Schafer, R.C. Wilson, M.J. Reimann, J.D. Leising, C.L. Kastner, J.R. Wolf, and R.K. Prasai. 1997, Comparison of steam pasteurization and other methods for reduction of pathogens on surfaces of freshly slaughtered beef. <i>Journal of Food Protection</i> . 60 (5) 476-484.
5	Castillo, A., L.M. Lucia, K.J. Goodson, J.W. Savell, and G.R. Acuff. 1999. Decontamination of beef carcass surface tissue by steam vacuuming alone and combined with hot water and lactic acid sprays. <i>Journal of Food Protection</i> . 62 (2) 146-151.
6	Kenney, P.B., R.K. Prasai, R.E. Campbell, C.L. Kastner, and D.Y.C. Fung. 1994. Microbiological Quality of Beef Carcasses and Vacuum-Packaged Subprimals: Process Intervention during Slaughter and Fabrication. <i>Journal of Food Protection</i> . 58 (6) 633-638.
7	Marshall, R.T., M.E. Anderson, H.D. Naumann, and W.C. Stringer. 1977. Experiments in Sanitizing Beef With Sodium Hypochlorite. <i>Journal of Food Protection</i> . 40 (4) 246 - 249.
8	Cabedo, L., J.N. Sofos, and G.C. Smith. 1996. Removal of bacteria from beef tissue by spray washing after different times of exposure to fecal material. <i>Journal of Food Protection</i> . 59 (12) 1284-1287.
9	N. Clayton, 2002. The Efficacy of Various Salmonella Intervention Methods Applied to Pork Carcasses during Slaughter (thesis from U. Kentucky).
10	Gorman, B.M., J.N. Sofos, J.B. Morgan, G.R. Schmidt, and G.C. Smith. 1995. Evaluation of hand-trimming, various sanitizing agents, and hot water spray-washing as decontamination interventions for beef brisket adipose tissue. <i>Journal of Food Protection</i> . 58 (8) 899-907.
11	Smith. M.G., and A. Graham. 1978. Destruction of Escherichia coli and salmonellae on mutton carcasses by treatment with hot water. <i>Meat Science</i> . 2 (2) 119-128.
12	Nettles Cutter, C., and G.R. Siragusa. 1994. Efficacy of Organic Acids Against Escherichia coli O157:H7 Attached to Beef Carcass Tissue Using a Pilot Scale Model Carcass Washer. <i>Journal of Food Protection</i> . 57 (2) 97 - 103.
13	Smith, M. G. 1992. Destruction of bacteria of fresh meat by hot water. <i>Epidemiology and Infection</i> . 109 (3) 491-496.

文献 ID	書誌事項
14	Dickson, J.S., and M.E. Anderson. 1991. Control of Salmonella on Beef Tissue Surfaces in a Model System by Pre- and Post-Evisceration Washing and Sanitizing, With and Without Spray Chilling. <i>Journal of Food Protection</i> . 54 (7) 514 - 518.
15	Cutter, C., G.R. Siragusa. 1994. Application of chlorine to reduce populations of Escherichia coli on beef. <i>Journal of Food Safety</i> . 15. 67-75.
16	Dorsa, W.J., C.N. Cutter, and G.R. Siragusa. 1996. Effects of acetic acid, lactic acid and trisodium phosphate on the microflora of refrigerated beef carcass surface tissue inoculated with Escherichia coli O157:H7, Listeria innocua, and Clostridium sporogenes. <i>Journal of Food Protection</i> . 60 (6) 619-624.
17	Castillo, A., Lucia, L.M. Kemp, G.K., and Acuff, G.R. 1999. Reduction of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium on Beef Carcass Surfaces Using Acidified Sodium Chlorite. <i>Journal of Food Protection</i> . 62 (6) 580 - 584.
18	Van Netten, P., D.A.A. Mossel, and J. Huis In't Veld. 1995. Lactic acid decontamination of fresh pork carcasses: a pilot plant study. <i>International Journal of Food Microbiology</i> . 25 (1) 1-9.
19	Epling, L.K., J.A. Carpenter, and L.C. Blankenship. 1993. Prevalence of Campylobacter spp. and Salmonella spp. on pork carcasses and the reduction effected by spraying with lactic acid. <i>Journal of Food Protection</i> . 56 (6) 536-537
20	Cacciarelli, M.A. W.C. Stringer, M.E. Anderson, and H.D. Naumann. 1983. Effects of washing and sanitizing on the bacterial flora of vacuum-packaged pork loins. <i>Journal of Food Protection</i> . 46 (3) 231 -234.
21	Gill, C.O., D.S. McGinnis, J. Bryant, and B. Chabot. 1995. Decontamination of commercial polished pig carcasses with hot water. <i>Food Microbiology</i> . 12 (2) 143-149.
22	Gill, C.O., and T. Jones. 1992. Assessment of the hygienic efficiencies of two commercial processes for cooling pig carcasses. <i>Food Microbiology</i> . 9 (4) 335-343.
23	Gill, C.O., J.C.L. Harrison, and D.M. Phillips. 1991. Use of a temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a beef carcass cooling process. <i>Food Microbiology</i> . 8 (2) 83-94.
24	Smith, M.G. 1985. The generation time, lag time, and minimum temperature o growth of coliform organisms on meat, and the implications for codes of practice in abattoirs. <i>Journal of Hygiene Cambridge</i> . 94 (1) 289-300.
25	Troller, J.A. 1976. Staphylococcal growth and enterotoxin production factors for control. <i>Journal of Milk and Food Technology</i> . 39: 499-503.
26	Pereira, J.L., S.P. Salsberg, and M.S. Bergdoll. 1982. Effect of temperature, pH and sodium chloride concentrations on production of staphylococcal enterotoxins A and B. <i>Journal of Food Protection</i> . 45: 1306-1309.
27	Hanna, M.O., D.L. Zink, Z.L. Carpenter, and C. Vanderzant. 1976. Yersinia enterocolitica-like organisms from vacuum packaged beef and lamb. <i>Journal of Food Science</i> . 41: 1254-1256.
28	Hanna, M.O., J.C. Stewart, D.L. Zink, Z.L. Carpenter, and C. Vanderzant. 1977. Development of Yersinia enterocolitica on raw and cooked beef and pork at different temperatures. <i>Journal of Food Science</i> . 42: 1180-1184.

文献 ID	書誌事項
30	Palumbo, S.A. 1986. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens? Journal of Food Protection. 49(12) 1003-1009.
31	Angelotti, R., M.J. Foter, and K.H. Lewis, 1961. Time-temperature effects on Salmonella and Staphylococci in foods. 1. Behavior in refrigerated foods. American Journal of Public Health. 51: 76-88.
32	Matches, J.R., and J. Liston. 1968. Low temperature growth of Salmonella. Journal of Food Science. 33: 641-645.
34	Palumbo, Samuel A., Jeffrey E. Call, Frankie J. Schultz, and Aaron C. Williams. 1994. Minimum and Maximum Temperatures for Growth and Verotoxin Production by Hemorrhagic Strains of Escherichia coli. Journal of Food Protection. 58 (4) 352-356.
35	Gill, C.O., and J. Bryant. 1993. The presence of Escherichia coli, Salmonella and Campylobacter in pig carcass dehairing equipment. Food Microbiology 10 (4) 337-344.
36	Kampelmacher, E.H., P.A.M. Guinee, K. Hofstra, and A. Van Keulen. 1961. Studies on Salmonella in slaughter houses. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe. 8:1025-1032.

※欠番 : 29、33

表 7 日本語文献

文献 ID	書誌事項
36 (J29)	森中重雄 他『と畜場におけるデハイダーの汚染状況調査と消毒法の検討』広島県獣医学会雑誌, (28), p.109-112 (2013)
37 (J57)	池田徹也 他『と畜場における塩素洗浄の効果について』北海道立衛生研究所報, (59), p.63-65 (2009)
38 (J87)	齊藤伸明 他『豚枝肉における体表由来汚染のインク着色による検討』日本獣医師会雑誌, 60(10), p.738-741 (2007)
39 (J122)	斉藤聡 他『牛解体処理施設における自主衛生管理の検証について』食品衛生研究, 52(5), p.77-86 (2002)
40 (J134)	尾金宰 他『食肉処理センターにおける大動物処理工程改善による効果』日本獣医師会雑誌, 53(3), p.159-162 (2000)
41 (J135)	品川邦汎 他『と畜場における衛生的な食肉(枝肉)生産に及ぼす豚体表の微生物汚染』食肉に関する助成研究調査成果報告書, 17, p.332-336 (1999)
42 (J138)	板屋民子 他『作業用手袋を介してのと畜場枝肉の汚染』日本獣医師会雑誌, 52(1), p.37-40 (1999)
43 (J140)	原啓二 他『剥ぎ上げ方式縦型スキナー使用時の豚枝肉汚染』日本獣医師会雑誌, 51(11), p.687-691 (1998)
44 (J145)	品川邦汎 他『食肉処理場における豚枝肉の微生物コントロールのためにと殺・解体方法の検討』食肉に関する助成研究調査成果報告書, 15(1996), p.306-312 (1997)
45 (J147)	京都市衛生公害研『牛枝肉の細菌汚染検査について』京都市衛生公害研究所年報, 63(1996), p.120-121 (1997)
46 (J150)	渡辺正基 他『剥ぎ上げ方式縦型スキナーと横型スキナーにより全はく皮した豚と体の微生物汚染』北海道獣医師会雑誌, 41(5), p.111-114 (1997)
47 (J151)	品川邦汎 他『食肉処理場における危害分析重要管理点(HACCP)方式による微生物制御法確立のための基礎的研究』食肉に関する助成研究調査成果報告書, 14(1995), p.281-286 (1996)
48 (J152)	豊福肇『と殺後の温度管理による食肉の微生物制御に関する研究』食肉に関する助成研究調査成果報告書, 14(1995), p.277-280 (1996)
49 (J153)	京都市衛生公害研『牛枝肉の細菌学的汚染検査について』京都市衛生公害研究所年報, 62(1995), p.108-109 (1996)



文献 ID	書誌事項
50 (J157)	京都市衛生公害研 『皮はぎによる豚枝肉の細菌学的汚染検査について』 京都市衛生公害研究所年報, 61(1994), p.93-95 (1995)
51 (J159)	渡辺正基 他 『豚枝肉における豚毛の付着状況と微生物汚染状況』 北海道獣医師会雑誌, 39(6), p.120-124 (1995)
52 (J160)	早船克己 他 『と畜場及び食肉処理場の微生物制御に関する調査について』 北海道獣医師会雑誌, 39(3), p.55-57 (1995)

表 8 各文献が対象とする工程、動物種、病原体、パラメータ

工程	対象動物	病原体	パラメータ	文献 ID
トリミング	ウシ	サルモネラ、 <i>E.coli</i>	水洗浄、乳酸、酢酸	1
トリミング	ウシ	一般生菌数	スチームバキューミング	2
トリミング	ウシ	—	—	3
トリミング	ウシ	リステリア、サルモネラ、 <i>E.coli</i>	スチームバキューミング、ナイフトリミング、熱水	4
トリミング	ウシ	一般生菌数、腸内細菌、大腸菌群、耐熱性大腸菌群、 <i>E.coli</i>	スチームバキューミング、熱水、乳酸	5
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i> 、リステリア、サルモネラ、エルシニア	乳酸	6
枝肉洗浄	ウシ	好気性菌	次亜塩素酸ナトリウム	7
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i>	酢酸、過酸化水素、リン酸三ナトリウム、水洗浄、熱水	8
枝肉洗浄	ブタ	サルモネラ	熱水、焼毛、塩素、乳酸	9
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i>	熱水、酢酸、リン酸三ナトリウム、過酸化水素、オゾン水、市販消毒剤	10
枝肉洗浄	ウシ、ヒツジ	<i>E.coli</i> 、サルモネラ	水洗浄、熱水	11
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i> 、シュードモナス	乳酸、酢酸、クエン酸	12
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i> 、サルモネラ、アエロモナス、エルシニア、シュードモナス、リステリア	水洗浄、熱水	13
枝肉洗浄	ウシ	サルモネラ	滅菌蒸留水、酢酸	14
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i>	次亜塩素酸ナトリウム	15
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i> 、リステリア、クロストリジウム・スポルゲネス	リン酸三ナトリウム、乳酸、酢酸、水洗浄	16
枝肉洗浄	ウシ	<i>E.coli</i> 、サルモネラ	亜塩素酸ナトリウム	17
枝肉洗浄	ブタ	サルモネラ	乳酸	18
冷却冷蔵	ブタ	カンピロバクター	冷蔵、水噴霧冷蔵、乳酸	19
枝肉洗浄	ブタ	好気性菌、嫌気性菌、ラクトバシラス	水洗浄、酢酸、次亜塩素酸ナトリウム	20
枝肉洗浄	ブタ	<i>E.coli</i>	熱水	21
冷却冷蔵	ブタ	<i>E.coli</i> 、シュードモナス	水噴霧冷蔵、冷凍トンネル冷蔵	22
冷却冷蔵	ウシ	<i>E.coli</i>	冷蔵	23
冷却冷蔵	ヒツジ	<i>E.coli</i> 、サルモネラ	冷蔵	24
—	—	ブドウ球菌	(培養)	25
—	—	黄色ブドウ球菌	(培養)	26
—	ウシ、仔羊	エルシニア	(培養)	27
—	ウシ、ブタ	エルシニア	(培養)	28
冷却冷蔵	—	ボツリヌス、エルシニア、リステリア、 <i>E.coli</i> 、アエロモナス	(培養)	30

工程	対象動物	病原体	パラメータ	文献ID
冷却冷蔵	(食品)	サルモネラ、ブドウ球菌	(培養)	31
冷却冷蔵	—	サルモネラ	(培養)	32
冷却冷蔵	—	<i>E.coli</i>	(培養)	34
湯はぎ	ブタ	<i>E.coli</i> 、サルモネラ、カンピロバクター	温湯	35
湯はぎ	ブタ	サルモネラ	温湯	36

動物	報数	文献ID
ウシ群	25	1,2,3,4,5,6,7,8,10,11,12,13,14,15,17,17,23,27,28,37,38,40,41,43,48
ブタ群	19	9,18,19,20,21,22,28,35,36,39,42,44,45,46,47,49,50,51

工程	報数	文献ID
トリミング(汚染物除去)	5	1,2,3,4,5
移送	1	43
枝肉洗浄	16	6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,20,21,38
消毒・殺菌	2	42,45
消毒洗浄	1	44
洗浄(機)	1	51
全行程	2	39,40
湯はぎ	2	35,36
内臓摘出	1	追加
剥皮群	6	37,41,46,47,49,50
冷蔵群	9	19,22,23,24,30,31,32,34,48

殺菌剤	報数	文献ID
乳酸	8	1,5,6,9,12,16,18,19
オゾン水	1	10
過酸化水素水	2	8,10
酢酸	10	1,7,8,10,12,14,16,20,42,45
塩素	3	6,9,51
次亜塩素酸ナトリウム	3	7,15,47
熱水	3	4,5,9
フマル酸	2	42,45
リン酸三ナトリウム	5	8,10,16,17,45
クエン酸	1	12
リン酸活性化－酸性化亜塩素酸ナトリウム	3	17,20,28
クエン酸活性化－酸性化亜塩素酸ナトリウム	1	17

### III. 研究成果に関する刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
古岡秀文	スクレイパー，牛 海綿状脳症	日本獣医病 理学専門家 協会	動物病理カラ ーアトラス第 2版	文永堂出 版	東京	2018	212

欄が不足する場合は追加して下さい

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shan Z, Hirai Y, Hayashi R, Yamasaki T, Hasebe R, Song CH, and Horiuchi M.	Therapeutic effect of autologous compact bone-derived mesenchymal stem cell transplantation on prion disease.	J Gen Virol	98	2615-2627	2017
Satoh K, Atarashi R, Nishida N.	Real-Time Quaking-Induced Conversion for Diagnosis of Prion Disease.	Methods Mol Biol.	1658	305-310.	2017
Kawasaki M, Fuchigami T, Kobashi N, Nakagaki T, Sano K, Atarashi R, Yoshida S, Haratake M, Nishida N, Nakayama M.	Development of radioiodinated acridine derivatives for in vivo imaging of prion deposits in the brain.	Bioorg Med Chem	25	1085-1093.	2017
Yamasaki T, Suzuki A, Hasebe R, Horiuchi M.	Flow Cytometric Detection of PrPSc in Neurons and Glial Cells from Prion-Infected Mouse Brains.	J Virol	92	e011457-17	2017
Okumura A, Saito T, Tobiume M, Hashimoto Y, Sato Y, Umeyama T, Nagi M, Tanabe K, Unoki-Kubota H, Kaburagi Y, Hasegawa H, Miyazaki Y, Yamagoe S.	Alleviation of lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced liver injury in leukocyte cell-derived chemotaxin 2 deficient mice.	Biochem Biophys Rep	12	166-171	2017
森田幸雄	食肉処理施設における HACCP 導入による輸出促進の後押し - ハード面の施設とソフト面の構築の重要性 -	畜産コンサルタント	53	42-47	201

欄が不足する場合は追加して下さい

#### IV. その他

個票：個票 1～54

一覧表：一覧表 1～24



## 個票 目次

文献 ID : 1.....	1
文献 ID : 2.....	3
文献 ID : 3.....	4
文献 ID : 4.....	5
文献 ID : 5.....	6
文献 ID : 6.....	7
文献 ID : 7.....	8
文献 ID : 8.....	9
文献 ID : 9.....	10
文献 ID : 10 .....	11
文献 ID : 11 .....	12
文献 ID : 12 .....	13
文献 ID : 13 .....	15
文献 ID : 14 .....	16
文献 ID : 15 .....	17
文献 ID : 16 .....	18
文献 ID : 17 .....	19
文献 ID : 18 .....	20
文献 ID : 19 .....	21
文献 ID : 20 .....	22

文献 ID : 21 .....	23
文献 ID : 22 .....	24
文献 ID : 23 .....	25
文献 ID : 24 .....	26
文献 ID : 25 .....	28
文献 ID : 26 .....	29
文献 ID : 27 .....	30
文献 ID : 28 .....	31
文献 ID : 30 .....	32
文献 ID : 31 .....	33
文献 ID : 32 .....	34
文献 ID : 34 .....	35
文献 ID : 35 .....	36
文献 ID : 36 .....	38
文献 ID : 37(J29) .....	39
文献 ID : 38(J57) .....	40
文献 ID : 39(J87) .....	41
文献 ID : 40(J122) .....	42
文献 ID : 41(J134) .....	43
文献 ID : 42(J135) .....	44
文献 ID : 43(J138) .....	45

文献 ID : 44(J140).....	46
文献 ID : 45(J145).....	47
文献 ID : 46(J150).....	48
文献 ID : 47(J151).....	49
文献 ID : 48(J152).....	50
文献 ID : 49(J153).....	51
文献 ID : 50(J157).....	52
文献 ID : 51(J159).....	53
文献 ID : 52(J160).....	54

文献 ID : 1

論文タイトル	Comparison of Methods for Decontamination from Beef Carcass Surfaces
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>Salmonella typhimurium</i> 、 <i>Escherichia coli</i> O157:H7
処理工程	トリミング (汚染物除去)
調査目的	(a)冷蔵前のウシ温屠体枝肉の表面からの糞、および関連微生物による汚染を除去する能力を、伝統的な USDA-FSIS トリミング、水洗、水洗後有機酸処理で比較すること。 (b)これらの処理が汚染除去中に枝肉表面の隣接部位に糞由来の微生物汚染を拡大するかどうか検討すること。
試験条件 パラメーター等	滅菌されたステンレスのスパチュラで枝肉表面 400 cm <sup>2</sup> (20 cm×20 cm) に糞便懸濁液を塗り広げた。 a)USDA-FSIS 規定通りに糞便汚染をトリミング (視認できた汚染部位の外側 2.5 cm を 0.5~1 cm カット) b)汚染領域を低圧ハンドスプレーで水洗 (1.5 L、10 psi、35、90 sec、枝肉表面から 5 cm) した後、高圧自動スプレーキャビネットで洗浄 (5 L、250 psi、35、5 sec の後 400 psi、4 sec、汚染表面から約 33 cm) c) b)と同様に水洗した後、2% (v/v) の乳酸 (pH 2.2) を噴霧 (200 mL、40 psi、55、11 sec、枝肉表面から 80 cm) d) b)と同様に水洗した後、2% (v/v) の酢酸 (pH 2.5) を噴霧 (200 mL、40 psi、55、11 sec、枝肉表面から 80 cm)
検体名 サンプルサイズ 採集方法	糞便懸濁液汚染前に汚染部位の外周を 10 cm <sup>2</sup> ×2 mm で採材 (n=3)。 糞便懸濁液汚染後、処理前直ちに 10 cm <sup>2</sup> ×2 mm で採材 (n=3、約 10 <sup>5</sup> CFU/cm <sup>2</sup> )。 処理後、直ちに 10 cm <sup>2</sup> ×2 mm で採材 (n=3)。
検査方法 増菌の有無 培地	0.1%ペプトン 100 mL 中にサンプルを入れ、ストマッカーで 1 分間処理。 ホモジネート 1 mL (0.25 mL/plate×4) 0.1 mL、10 倍希釈液 0.1 mL をそれぞれ rifampicin-tryptic soy agar (rif-TSA) に塗抹。37、24 時間培養。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	全体 <ul style="list-style-type: none"> <li>ウシの 4 つの部位 (inside round, outside round, brisket, clod) で試験。本研究で評価した全ての処理は枝肉表面の病原菌数を有意に減少させた。</li> <li>水だけの洗浄やトリミングに比べ、有機酸を用いた洗浄の方が効果的であった。</li> <li>乳酸は酢酸よりも <i>E. coli</i> O157:H7 のレベルを有意に減少させたが、<i>Salmonella</i> の減少に対しては、はっきりとした違いはなかった。</li> <li>すべての処理で、初期汚染の拡大を最小限にし、汚染拡大後の recovery が有機酸処理によって減少した。</li> </ul> <i>E. coli</i> O157:H7 <ul style="list-style-type: none"> <li>全枝肉表面において、酢酸処理に比べて、乳酸処理で有意に (<math>P &lt; 0.05</math>) 減少した。</li> <li>OR(outside round)と BSKT(brisket)では、乳酸処理によってより効果的に (<math>P &lt; 0.05</math>) 減少した。IR(inside round)と CLOD(clod)では、トリミングと乳酸処理は同等の効果であった。</li> <li>水洗処理のみの場合と、水洗後酢酸処理した場合は同等の効果であった。</li> <li>トリミングは水洗処理や水/酸処理と比較して、一貫して菌数を検出限界以下に減少させた。</li> </ul> <i>E. coli</i> O157:H7 と <i>S. typhimurium</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>OR と BSKT において、水洗処理とトリミングは同等の効果であった。</li> </ul>

	<p><i>S. typhimurium</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 酸の種類による統計学的差はなかった。</li> </ul> <p>汚染領域外からの recover</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ <i>E. coli</i> O157:H7 と <i>S. typhimurium</i> とも、本質的には水洗処理、酸処理とで同等であった。</li> <li>・ 乳酸処理と酢酸処理した汚染領域外の <i>S. typhimurium</i> は検出限界以下まで減少した。</li> <li>・ 水洗処理後の汚染領域外からの <i>S. typhimurium</i> の recover は他の処理に比べて有意に高かった。</li> </ul>
文献書誌事項	<p>Hardin, M.D., G.R. Acuff, L.M. Lucia, J.S. Oman, and J.W. Savell. 1995. Comparison of Methods for Decontamination from Beef Carcass Surfaces. <i>Journal of Food Protection</i>. 58 (4) 368-374.</p>

文献 ID : 2

論文タイトル	Steam Vacuuming as a Pre-Visceration Intervention to Decontaminate Beef Carcasses
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	一般生菌数
処理工程	トリミング (汚染物除去)
調査目的	<p>市販されているスチームバキューミングユニット 2 機種を使用して、</p> <p>(i) 内蔵摘出前の枝肉に局在している糞便、飲食物、その他の汚染と微生物数の減少に対する介入処置としてのスチームバキューミング過程の効果を評価すること。</p> <p>(ii) ゼロトレランス要件を兼ね備える可能性と枝肉上の微生物数をスチームバキューミングとハンドナイフトリミングで比較すること。</p> <p>(iii) さらなるトリミング必要性がないゼロトレランス要件を兼ね備えた表面とスチームバキューミングプロセスにさらした表面の微生物数を比較すること。</p>
試験条件 パラメーター等	<p>スチームバキューミング：5～10 秒、回数と時間は汚染の広がりや除去しやすさに応じて変化させた。</p> <p>Unit A：- 0.0093 bar、ステンレススチール製バキュームヘッドは長さ 10.16 cm、幅 5.08 cm。</p> <p>Unit B：- 0.0093 bar、ステンレススチール製バキュームヘッドは長さ 10.16 cm、幅 2.54 cm。</p> <p>CN：汚染が目に見えない、ナイフトリミングもスチームバキューミングもしない枝肉サンプル。</p> <p>CF：適度に目に見える、糞で汚染された、ナイフトリミングもスチームバキューミングもしない枝肉サンプル。</p> <p>KF：現行の zero tolerance standards に適合するためのトリミングが必要な枝肉表面の、適度に目に見える、糞の汚染を除去するために適用するナイフトリミング。</p> <p>SN：目に見える糞の汚染が枝肉表面になく、ナイフトリミングが必要ない、スチームバキューミング。</p> <p>SF：適度に目に見える糞の汚染がある枝肉表面に適用するナイフトリミング目で見える汚染を除去するためのナイフトリミングは USDA-FSIS ゼロトレランススタンダードに適合するように行った。</p>
検体名 サンプルサイズ 採集方法	検査表面と皮下脂肪を 10.16 cm×10.16 cm×1.27 cm でサンプリング。
検査方法 増菌の有無 培地	total aerobic plate counts (APC) と total coliform counts (TCC) を分析した。リン酸バッファー (pH 7.0) で 10 倍希釈し、ストマッカーで 2 分間処理してから plate count agar (APC 用) と Petrifilm Coliform Count Plate (TCC 用) に塗抹。plate count agar は 25 で 48 時間培養し、レーザーコロニーカウンターでコロニーカウント、Petrifilm Plate は 35 で 24 時間培養し、特徴的な気泡で囲まれた赤いコロニーを数え TCC とした。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ ナイフトリミングは APC を Unit A : 1.38 log CFU/cm<sup>2</sup>、Unit B : 1.64 log CFU/cm<sup>2</sup>、TCC を Unit A : 1.61 log CFU/cm<sup>2</sup>、Unit B : 1.72 log CFU/cm<sup>2</sup> それぞれ減少させた。</li> <li>・ 視認できる汚染された枝肉表面のスチームバキューミングは APC を Unit A : 1.73 log CFU/cm<sup>2</sup>、Unit B : 2.03 log CFU/cm<sup>2</sup>、TCC を Unit A : 1.67 log CFU/cm<sup>2</sup>、Unit B : 2.13 log CFU/cm<sup>2</sup> それぞれ減少させた。</li> <li>・ 視認できない糞便汚染された枝肉表面の APC の平均減少は Unit A : 0.57 log CFU/cm<sup>2</sup>、Unit B : 0.72 log CFU/cm<sup>2</sup>、TCC の平均減少は Unit A : 0.33 log CFU/cm<sup>2</sup>、Unit B : 0.26 log CFU/cm<sup>2</sup> であった。</li> <li>・ 両スチームバキューミングユニットは最大 2.54 cm の視認できる枝肉表面の汚染に対し、少なくともナイフトリミング程度の除染に利用できる。</li> </ul>
文献書誌事項	Kochevar, Sherri L., John N. Sofos, Robert R. Bolin, James O. Reagan, and Gary C. Smith 1997. Steam Vacuuming as a

	Pre-Evisceration Intervention to Decontaminate Beef Carcasses. Journal of Food Protection. 60 (2) 107-113.
--	---

文献 ID : 3

論文タイトル	Verification of Procedures for Controlling Fecal Material, Ingesta, and Milk in Livestock Slaughter Operations
調査国	米国
対象動物	Livestock
調査対象微生物	-
処理工程	トリミング（汚染物除去）
調査目的	この指令は、検査プログラム担当職員（IPP）に、公衆衛生を保護する現行の方法論を、検証、文書化、そして、最終ルール、もしくは直後の家畜枝肉に、目に見えない糞便物質、乳汁、摂取物があり、パッキングにおいて、頭、頬、ウィーザンドミートに糞、飲食物、乳汁が存在しないことを検証するための必要条件の実施によって規定する。この指令のこのバージョンは家禽の指令を削除し、公衆衛生情報システム（PHIS）を使用して家畜の検証手順の結果を文書化するための指令を更新する。
試験条件 パラメーター等	-
検体名 サンプルサイズ 採集方法	-
検査方法 増菌の有無 培地	家畜ゼロトレランス検証作業を行い、糞便物質、摂取物および乳汁がないと確認した時、屠殺ルール検査場後（枝肉単位の選択は添付資料 1 参照）と最終洗浄前に、IPP はオンライン試験のための屠殺ルール検査場で枝肉単位を選択する。 オフライン IPP が家畜ゼロトレランス確認作業を行っている場合、HACCP プロセスが、枝肉生産過程の糞便物質、摂取物、または乳汁汚染を制御している。これらの人員は： 1.その日の予定屠殺量を決定する。 2.一日の屠殺量に基づいて、枝肉数を決定する。（添付資料 1 参照） 3.各シフトの間、適切な枝肉単位をランダムに選択する。 4.屠殺ルール検査場でオンライン IPP が使用する技術を用いて、各選択した枝肉全体を検討する。 5.色と質感の特徴の両方が確認できる場合にのみ、異物を糞便物質または摂取物として識別する。（添付資料 2 参照） 6.色と粘稠度の両方の特性が確認できる場合にのみ、異物を乳汁として識別する。（添付資料 2 参照）
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	-
文献書誌事項	Food Safety and Inspection Service (FSIS) DIRECTIVE

文献 ID : 4

論文タイトル	Comparison of Steam Pasteurization and Other Methods for Reduction of Pathogens on Surfaces of Freshly Slaughtered Beef
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A、 <i>Escherichia coli</i> O157:H7、 <i>Salmonella typhimurium</i>
処理工程	トリミング (汚染物除去)
調査目的	冷蔵していない、新鮮な屠殺ウシ表面の高レベルな病原菌を減少させるため、スチームパストライゼーション(S)、ナイフトリミング(T)、温水洗浄(W)、温水/スチームバキュームスポットクリーニング(V)、2%乳酸噴霧(L)の各種組合せ、または単独で使用した時の効果を比較検討すること。
試験条件 パラメーター等	S 処理：フェーズ 1：15 秒、フェーズ 2：単独の場合 15 秒、2 つを組み合わせる場合 5 秒と 10 秒。 内部が 61.0×76.2×68.6 cm のスチームリザーバーと 30.5×76.2×68.6 cm の肉処理部からなるステンレススチール製キャビネット (91.4×76.2×68.6 cm)。 スチームリザーバー：大気圧以上 (約 2.5 cm water)、スライディングドアを開けて処理中は約 0.6 cm water。 V 処理：市販されている熱水/スチームバキュームスポットクリーニングシステム T 処理：視認できる汚染部位の 1 cm 外側、深さ 0.5 cm。 W 処理：35、38~40 psi、23 秒。 処理の組合せ：TW、TWS、WS、VW、VWS、TWLS、VWLS
検体名 サンプルサイズ 採集方法	汚染表面 11.4 cm <sup>2</sup> ×3、深さ 2 mm、全体で 34.2 cm <sup>2</sup> 。 菌の初期植菌量：5 log CFU/cm <sup>2</sup> 。
検査方法 増菌の有無 培地	処理前のサンプル用にペプトン水 (PW) で段階希釈して、 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 は rifampicin-tryptic soy agar (Rif-TSA)、 <i>Salmonella typhimurium</i> は nalidixic acid-MacConkey Agar (NA-MAC)、 <i>Listeria monocytogenes</i> は colistin methanesulfonate, moxalactam- <i>Listeria</i> Agar Base (MOX) にそれぞれ塗抹。 サンプルを 50 mL の PW に入れ、ストマッカーで 1 分間処理。ホモジネート 1 mL をそれぞれの寒天培地に塗抹 (0.25 mL/plate×4)。 処理後のサンプルは 100 倍希釈したものも塗抹。 <i>Listeria monocytogenes</i> は 35、24 時間培養。 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 と <i>Salmonella typhimurium</i> は 37、24 時間培養。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 組み合わせ処理は病原菌 3 種に対し、3.5~5.3 log CFU/cm<sup>2</sup> の範囲で減少させた。</li> <li>・ TW、TWS、WS、TWLS、VWLS の組合せは、4.2~5.3 log CFU/cm<sup>2</sup> の範囲で減少させ、同等の効果であった。</li> <li>・ 単独処理の場合、T、V、S は 2.5~3.7 log CFU/cm<sup>2</sup> の範囲で減少させた。S 処理は数字上、T 処理や V 処理より大きく減少させた。T 処理、V 処理、S 処理はすべて W 処理より効果的であった。</li> <li>・ 多様な除染方法と組合せたスチームパストライゼーションはウシ肉表面からの病原菌を最大限減少させる効果的な方法である。</li> </ul>
文献書誌事項	Phebus, R.K., A.L. Nutsch, D.E. Schafer, R.C. Wilson, M.J. Reimann, J.D. Leising, C.L. Kastner, J.R. Wolf, and R.K. Prasai. 1997, Comparison of Steam Pasteurization and Other Methods for Reduction of Pathogens on Surfaces of Freshly Slaughtered Beef. <i>Journal of Food Protection</i> . 60 (5) 476-484.



文献 ID : 5

論文タイトル	Decontamination of Beef Carcass Surface Tissue by Steam Vacuuming Alone and Combined with Hot Water and Lactic Acid Sprays
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	aerobic plate counts ( APC )、 <i>Enterobacteriaceae</i> 、 全 coliforms、 耐熱性 coliforms、 <i>Escherichia coli</i>
処理工程	トリミング ( 汚染物除去 )
調査目的	人為的に汚染したウシ枝肉表面上のバクテリアの減少力を、スチームバキューミングのみと熱水または乳酸噴霧との組合せの間で比較すること。
試験条件 パラメーター等	スチームバキューミング処理 : 2 秒×3 ( 処理後の枝肉表面温度は 70 未満が多かった ) スチームバキューミング処理後、(1)熱水噴霧、(2)乳酸噴霧、(3)熱水噴霧後乳酸噴霧、(4)乳酸噴霧後熱水噴霧 熱水噴霧 : 95 、 12.5 cm の距離から 5 秒、166 kPa。 乳酸噴霧 : 2% L-乳酸 200 mL を 55 、 11 秒。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	直径 10 cm の円 ( 78.5 cm <sup>2</sup> ) をマークし、5 cm <sup>2</sup> のテンプレートを円の中心に置き、0.025 g の糞を滅菌スパチュラで塗り拡げた。 処理前後で接種した 5 cm <sup>2</sup> の領域を含む 10 cm <sup>2</sup> サンプルング。 スチームバキューミングによって接種した領域周囲に汚染が広がったかを調べるため、マークした 78.5 cm <sup>2</sup> 内の隣接した接種していない領域から 10 cm <sup>2</sup> サンプルング。
検査方法 増菌の有無 培地	サンプルを 100 mL のペプトン中に入れ、ストマッカーで 1 分間処理。 Petriilm Aerobic Count Plates に塗抹、21 、 48 時間培養 ( APC 用 )、 <i>Enterobacteriaceae</i> Count Plates は 35 で 24 時間培養 ( <i>Enterobacteriaceae</i> 用 )、 <i>E. coli</i> Count Plates を、全 coliforms は 35 、 24 時間培養。熱耐性 coliforms は 44.5 、 24 時間培養。 <i>E. coli</i> は 35 、 24 時間培養。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>すべての処理はウシ枝肉表面の細菌の数を有意に減少させた。しかし、スチームバキューミングで得られた減少はスチームバキューミングとその他の処理との組合せで得られた減少より有意に小さかった。肉の部位の違いによる細菌の減少に差はなかった。</li> <li>スチームバキューミング後の再汚染は、熱水噴霧後、乳酸噴霧をした場合に最も効果的に減少した。この組合せ処理は最初に接種した 5 cm<sup>2</sup> の外側の領域において、<i>Enterobacteriaceae</i>、全 coliforms、熱耐性 coliforms、<i>E. coli</i> を検出限界以下 ( 1.0 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup> ) まで減少させた。</li> </ul>
文献書誌事項	Castillo, A., L.M. Lucia, K.J. Goodson, J.W. Savell, and G.R. Acuff. 1999. Decontamination of Beef Carcass Surface Tissue by Steam Vacuuming Alone and Combined with Hot Water and Lactic Acid Sprays. <i>Journal of Food Protection</i> . 62 (2) 146-151.

文献 ID : 6

論文タイトル	Microbiological Quality of Beef Carcasses and Vacuum-Packaged Subprimals: Process Intervention during Slaughter and Fabrication
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i> O157:H7、 <i>Listeria monocytogens</i> 、 <i>Salmonella enteritidis</i> 、 <i>Yersinia enterocolitica</i>
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	(i)塩素、乳酸、水を単独、あるいは異なる組合せで使用した時、ウシ枝肉の微生物汚染の減少において、付加的な利点があるか検討すること。 (ii)枝肉処理が、4 で 120 日以上保存した時、処理された枝肉由来のサブプライマルにカットした肉片に及ぼす残留効果を持つかどうか評価すること。 (iii)塩素またはマイクロ波照射されたサブプライマルにカットした肉片への介入処置が付加的な除染効果を持つか検討すること。
試験条件 パラメーター等	各 3 半身、脱イオン蒸留水 (W) が 200 ppm 塩素 (C) が 3% (v/v) 乳酸 (L) をレール検査直後、クーラー (2 ) に入れる直前に手動噴霧した。噴霧は (半身につき約 1.3 L) 7.5 L、手動噴霧機を使用。クーラーで保持している間、9 半身は 8 時間自動噴霧冷蔵プロトコールに供した (water 噴霧、15 分毎に 30 秒間、噴霧するサイクルから成る)。冷蔵サイクル直後、各枝肉に再び、W、C、L と 9 つの異なる組合せ、W+W、W+C、W+L、C+W、C+C、C+L、L+W、L+C、L+L で (文字: レール検査直後 + 8 時間噴霧冷蔵サイクル後) 21 の噴霧溶液を約 1.3 L、噴霧した。 3% (v/v) 乳酸溶液は 85% 乳酸と滅菌蒸留水で調製、最終 pH 2.1。200 ppm 塩素溶液は塩素水を滅菌蒸留水で希釈し、最終 pH 2.6。 除染された枝肉を clod、rib、striploin、top butt、inside round、outside round に分けた。これらを介入処理し、さらに 8 つに分け、真空保存 4、10、15、20、30、60、90、120 日に収容した。(1)バキュームパッケージ (VP) (2)200 ppm 塩素手動噴霧 (21 ) (C) して、VP (C+VP) (3)VP + マイクロ波 15 秒 (VP+MW) (4)10 <sup>5</sup> CFU 病原菌接種 (P) して VP (P+VP) (5) (P+C+VP) (6) (P+VP+MW) (2)と(5)は表面が飽和するまで (約 5 秒) 200 ppm 塩素を噴霧した。各菌株 4 種、10 <sup>5</sup> CFU/mL を接種。VP は 599±62 mmHg。MW は出力 112.9W/h、15 秒。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	直径 3.81 cm、深さ約 2 mm でサンプリング。各枝肉から位置と組合せで 2 サンプル、計 11.4 cm <sup>2</sup> サンプリング。 2×直径 3.8 cm のコアをサンプリング。これらのコアは 11.4 cm <sup>2</sup> の領域を含む 45.6 cm <sup>2</sup> となる。
検査方法 増菌の有無 培地	サンプルを 25 mL の Butterfield's phosphate buffer (pH 7.2) に入れ、ストマッカーで 30 秒処理。Butterfield's phosphate buffer で 10 倍希釈液を調製して、plate-count agar で混釈。35、48 時間培養 (APC 用)。 ホモジネート 1 mL を Butterfield's phosphate buffer で段階希釈し、選択培地で混釈平板法。選択培地は、 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 は McConkey sorbitol agar (MSA) <i>Listeria monocytogens</i> は modified oxford medium (MOX) <i>Salmonella enteritidis</i> は xylose lysine deoxycholate (XLD) agar、 <i>Yersinia enterocolitica</i> は cefsulodin irgasan novobiocin (CNN) をそれぞれ使用。これらは 37、48 時間培養。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	塩素処理 and/or 乳酸処理を含む全ての組合せは枝肉の汚染を減少させた。APC のデータにおける平均減少値は 0.4 ~ 1.8 log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> であった。L + L (両噴霧とも乳酸) 処理で最も減少した。乳酸噴霧した枝肉には血液の褐変が観察された。塩素噴霧 (200 ppm) とマイクロ波照射はサブプライマルにカットした肉片の賞味期限と安全性を改善するアプローチであると評価された。 枝肉も介入処理もサブプライマルにカットした肉片の微生物学的品質に及ぼす有益な効果の有意差がなかった (P > 0.05)。
文献書誌事項	Kenney, P.B., R.K. Prasai, R.E. Campbell, C.L. Kastner, and D.Y.C. Fung. 1994. Microbiological Quality of Beef Carcasses and Vacuum-Packaged Subprimals: Process Intervention during Slaughter and Fabrication. Journal of Food Protection. 58 (6) 633-638.

文献 ID : 7

論文タイトル	Experiments in Sanitizing Beef with Sodium Hypochlorite
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	Aerobic bacteria
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	Kotula らは、電解で生産した次亜塩素酸塩を pH 6.0 に調整して使用して、約 5 回消毒し、スワブサンプリングした。Emseiler らは、電解で生産した次亜塩素酸ナトリウムが、同濃度の次亜塩素酸カルシウム、または二酸化塩素より顕著に低下させた。これらの条件での殺菌効果を検証するために、2 つの実験を行った。
試験条件 パラメーター等	(1) 肉を保持枠に置き、水平位置で、市販の次亜塩素酸ナトリウムを 200 ~ 250 mg/L (pH 6.0、酢酸で調整) で消毒した。消毒剤の流速は 0.83 および 3.4 L/min、ライン圧は 3.5 および 14.0 kg/cm <sup>2</sup> 、ノズルを通る肉の通過速度は 2 および 10 cm/sec。ノズルの高さは、肉の上 40 cm。消毒直後、肉は 60 秒間、垂直位置で水気を切った。サンプルは直ちにカバーをせずに 3 、相対湿度 86±6% で保存した。 (2) 肉を保持枠に置き、市販次亜塩素酸ナトリウム (12%)、電解で生成した次亜塩素酸ナトリウム、または水コントロールで消毒した。次亜塩素酸塩の適用速度は 200 ~ 250 mg/L。消毒剤の流速は 1.7、3.4、6.8 L/min、ノズル圧は 14.0 kg/cm <sup>2</sup> 。消毒剤の適用時間は 2、15、30 sec/肉片 (2×15×20 cm)。消毒剤は酢酸で pH 6.0 に調整した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	(1) 3 回のサンプリング時に、肉片を 4 つのコア (直径 2.54 cm、厚さ 3 ~ 5 mm) を摘出することによりサンプリングし、4 隣接領域 (各 1 cm <sup>2</sup> ) をふき取りサンプリングした。 (2) (1) と同じ。
検査方法 増菌の有無 培地	(1) コアを 99 mL の滅菌リン酸緩衝蒸留水に入れ、ブレンダーで 60 秒、処理した。綿棒は線引きアウトラインを線引きした領域を 3 回こすり、滅菌緩衝蒸留水中ですすいだ。サンプルを適切に希釈し、28 で 72±4 時間インキュベートすることを除き、Standard Methods for the Examination of Dairy Products に従って計数した。実験はランダムな完全ブロックデザイン (2×2×2) の 8 回行った。 (2) Aerobic plate counts を logarithms に変換し、差は消毒直後と 48 時間後のサンプルから次式で計算した。 Difference in log counts = Log <sub>10</sub> APC After - Log <sub>10</sub> APC Before
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	牛プレート肉に市販と電解で生成した次亜塩素酸ナトリウム (pH 6.0) を噴霧した。2 つの実験で、消毒剤の流速、ライン圧、スプレーを通る肉の通過速度と方法、および消毒時間の変数について研究した。 ・ 消毒剤の流速 3.4 L/min、ライン圧 14.0 kg/cm <sup>2</sup> 、ノズルを通る肉の通過速度は 2 cm/sec の時が、最も効果的であり、99% 減少させた。 ・ 次亜塩素酸塩の噴霧は同条件で水を適用した時よりも微生物数を有意に減少させたが、次亜塩素酸塩のタイプは重要ではなかった。 ・ 噴霧は 2 cm/sec で肉の上を 1 回通過させるか、約 7 回連続して 10 cm/sec で通過させた時、最も効果的であった。 ・ 消毒直後の最大減少数は、スワブサンプリング法で 97%、コアサンプリング法で 93% であった。 ・ コアリングおよびスワブで集められたサンプルは、3 、48 時間保存された肉を消毒後、サンプル採取された時には、異なる微生物数になっていると推定される。我々の知見に基づいて、コアリング法を推奨する。
文献書誌事項	Marshall, R.T., M.E. Anderson, H.D. Naumann, and W.C. Stringer. 1977. Experiments in Sanitizing Beef With Sodium Hypochlorite. Journal of Food Protection. 40 (4) 246 - 249.

文献 ID : 8

論文タイトル	Removal of Bacteria from Beef Tissue by Spray Washing after Different Times of Exposure to Fecal Material
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11370
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	ウシ枝肉の脂肪筋膜組織の接種された糞ペーストへの曝露時間が及ぼす、ウシ脂肪筋膜からの非病原性大腸菌の除去における、冷水、熱水、化学溶液のうちの1つでのすすぎ、噴霧洗浄の有効性への影響を決定すること。
試験条件 パラメーター等	Triplicate のサンプルは、2%酢酸溶液、5%過酸化水素溶液、12%リン酸三ナトリウム噴霧すすぎか、または 35 水、74 水（脂肪の表面で）による噴霧洗浄した。噴霧洗浄、またはすすぎは、直径 0.3125 cm の上下するノズルを 80 rpm にセットした、サンプル全体を覆う、テストサイズの、コンベア化された、自動キャビネットで行った。適時、洗浄、またはすすぎを 12 秒間、または 300 枝肉/h の食肉処理工場チェーンスピードで行った。35 水または 74 水での洗浄はサンプルの十分な温度のを伴い、20.7 bar であった。化学溶液すすぎ後、35 水で噴霧洗浄（20.7 bar）した。すすぎの溶液は室温（21 ）で、1.38 bar で適用した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	失血後、15 分以内のウシ枝肉から約 20×20×20 cm の brisket 脂肪組織をカットした。脂肪組織は 10×10 cm にカットした。新鮮な糞 0.3 kg に 100 mL の接種懸濁液を加え調製した糞ペースト中のストレプトマイシン耐性菌の数は 10 <sup>8</sup> CFU/g であった。各脂肪サンプルは直径 0.64 cm の白金耳×4、サンプルの中心に接種した。噴霧洗浄、または噴霧洗浄 / すすぎ処理につき 3 サンプルは、接種後直ちに処理し、残りは、2 または 4 時間、処理される前に糞ペーストに接触させた。2 回、繰り返した。
検査方法 増菌の有無 培地	洗浄、またはすすぎ排水後 1~2 時間、接種した場所の中央から、7.92 cm <sup>2</sup> の各脂肪サンプル片を切りとった。0.1%滅菌ペプトン水中で、2 分間、ブレンダーで処理した。適切に段階希釈し、625 □g/mL のジヒドロストレプトマイシンを含む tryptic soy agar にプレーティングした。35 で 24 時間インキュベートしコロニーを計数した。サンプリング時に pH も測定した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	本研究では、ウシ脂肪筋膜と接種された糞ペーストとの曝露時間が及ぼす、噴霧洗浄、またはすすぎへの影響について検討した。死後 15 分以内の brisket の脂肪サンプル（10×10×2 cm）に、ストレプトマイシン耐性 <i>Escherichia coli</i> ATCC 11370（10 <sup>8</sup> CFU/g）を含むウシ糞ペーストを直径 0.64 cm の白金耳で 4 ループ、菌膜表面の中央に接種した。triplicate サンプルは、接種された糞ペーストへの曝露時間 0、2、4 時間後に、自動噴霧洗浄キャビネット内で、水（35、20.7 bar）で噴霧洗浄し、2%酢酸、5%過酸化水素、または 12%リン酸三ナトリウムですすぐか、35 か 74（20.7 bar）の水で噴霧洗浄した。サンプルはストレプトマイシン耐性菌の数で分析した。リン酸三ナトリウム、35 水、過酸化水素、酢酸、74 水で洗浄、または洗浄 / すすぎを 0 時間（接種された糞ペーストに曝露した直後）に行うと、それぞれ、3.04±0.40、3.52±0.55、3.62±0.67、3.69±0.72、4.17±0.55 log CFU/cm <sup>2</sup> 除去した。糞ペースト曝露 2 または 4 時間後の噴霧洗浄処理の適用は、有意に（ <i>P</i> < 0.05）少ない細菌の除去（2 時間後で 1.76~3.89 log CFU/cm <sup>2</sup> 、4 時間後で 0.94~2.58 CFU/cm <sup>2</sup> ）であった。したがって、洗浄処理に関係なく、曝露時間の延長と共に噴霧洗浄により除去される細菌数の減少が示しているように、糞汚染への曝露時間はウシ枝肉組織への細菌の接触に影響を及ぼした。全ての洗浄時間で、最も効果的な洗浄剤は 74 水であった。
文献書誌事項	Cabedo, L., J.N. Sofos, and G.C. Smith. 1996. Removal of Bacteria from Beef Tissue by Spray Washing after Different Times of Exposure to Fecal Material. <i>Journal of Food Protection</i> . 59 (12) 1284-1287.

文献 ID : 9

論文タイトル	The Efficacy of Various <i>Salmonella</i> Intervention Methods Applied to Pork Carcasses during Slaughter
調査国	米国
対象動物	ブタ
調査対象微生物	<i>Salmonella typhimurium</i>
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	脱毛過程の後のブタ枝肉汚染をシミュレートすること。
試験条件 パラメーター等	熱水処理 (53、10 and 20 秒) 焼毛 (炎: 10 and 20 秒) 塩素噴霧 (25、50、100、200 ppm) 乳酸噴霧 (25、1(v/v)%、2(v/v)%) マニュアル噴霧機 (7.6 L、10~15 psi、塩素と乳酸の噴霧に使用) 塩素と乳酸溶液は糞の汚染が見えなくなるまで、接種した場所に使用した。 50、100、200 ppm の塩素溶液は 2、4、8 mL の Clorox® にドデシル硫酸ナトリウムを 1 g 加え、蒸留水で 1 L にメスアップして調製した。1% と 2% 乳酸溶液は 85% 乳酸 12、24 mL を蒸留水で 1 L にメスアップして調製した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	接種前に ham、belly、jowl それぞれに、サンプリング領域として 50 cm <sup>2</sup> × 3 = 計 150 cm <sup>2</sup> を描いた。糞スラリー (1.23 mL) を 3 領域に塗り広げた。脱毛過程後、接種した。ランダムに乳酸 (1、2(v/v)%、25 ) 塩素 (50、100、200 ppm、25 ) 熱水 (53、10、20 秒) 焼毛 (10、20 秒) コントロールの各処理をした。Trial 1 は各介入法における最低有効濃度、適用時間を排除するためにデザインした。50 ppm 塩素噴霧を除く各処理を 8 頭 / 16 半身、コントロール、バックグランドの菌叢分析に 1 頭 / 2 半身に適用した。糞に 5 分間接触させ、冷蔵室に入れる前に最終の熱水すすぎ (53 ) を行った。Trial 2 : 熱水 (10 秒) 焼毛 (10 秒) 塩素噴霧 (50 ppm) 乳酸 (2(v/v)% ) の処理を行った。12 頭 / 24 半身を使用し、5 回、繰り返した。追加で、冷蔵 24 時間後の各半身を集めた。コントロールは未処理、熱水すすぎ後、冷蔵 24 時間後にサンプリングした。コントロールの処理は 4 回、繰り返した。
検査方法 増菌の有無 培地	介入法前後、最終すすぎ後、24 時間冷蔵後に各枝肉サンプルを回収した。全てのサンプルは、50 µg/mL のナリジクス酸を含む Xylose Lysine Deoxicholate (XLD) agar に duplicate でプレーティングし、35 でインキュベートした。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	Kentucky 大学で屠殺された 21 頭の出荷日齢のブタに、ナリジクス酸耐性 <i>Salmonella typhimurium</i> 2 株を含む糞スラリーを、枝肉の各側面の ham、belly、jowl 領域に接種した。Trial 1 では、 <i>S. typhimurium</i> の除去において、数に区別できるほどの差がなかったため、10 秒の熱水噴霧は 20 秒とちょうど同じ効果であることが明らかとなった。より短い焼毛時間 (10 秒) は 20 秒の適用と同様の効果で、2 つの塩素溶液 (100、200 ppm) は同様の結果を示した。2% 乳酸噴霧は、 <i>S. typhimurium</i> 数を 1% 処理より有意に減少させた。Trial 2 では、各介入法の 4 つの最も効率的なレベルを比較した。介入法の有効性は、以下の順序で観察された：熱水 (10 秒) > 塩素 (50 ppm) = 乳酸 (2%) > 炎 (10 秒)。枝肉面積の影響は、熱水すすぎ処理後に有意であった。jowl 領域は、高圧水噴霧によって最もアクセスできなかった。しかし、処理適用後、熱水すすぎ、および 24 時間冷蔵 (2 ) の後、処理、および未処理の枝肉、または枝肉領域間に有意差はなかった。
文献書誌事項	N. Clayton, The Efficacy of Various <i>Salmonella</i> Intervention Methods Applied to Pork Carcasses during Slaughter (thesis from U. Kentucky). 2002.

文献 ID : 10

論文タイトル	Evaluation of Hand-Trimming, Various Sanitizing Agents, and Hot Water Spray-Washing as Decontamination Interventions for Beef Brisket Adipose Tissue
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11370)
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	死後 15 分以内のウシ胸肉 (brisket) 脂肪サンプル上の糞の除去能と微生物汚染の減少能を、種々の消毒液や熱水噴霧洗浄処置とハンドトリミングや噴霧洗浄で比較すること。
試験条件 パラメーター等	水：2.76、6.89、20.68 bar、16、35、66、74±5、12 秒または 36 秒。 消毒液：5%酢酸、12%リン酸三ナトリウム、5%過酸化水素、0.3%市販の消毒剤 (3%デカン酸、3%ノナン酸、8.5%リン酸、9.5%硫酸、10%プロピオン酸、66%不活性成分)、0.5%オゾン水。16、1.38 bar、12 秒または 36 秒。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	死後 15 分未満の脂肪組織片をウシ枝肉の胸肉から切り出し、10 cm×10 cm にカット。プラスチック製白金耳で中心に糞ペーストを接種。0.625 cm <sup>2</sup> の白金耳でトータル 2.5 cm <sup>2</sup> 接種。
検査方法 増菌の有無 培地	サンプルを滅菌リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 10 倍希釈して、ストマッカーで 2 分間処理。dihydrostreptomycin 添加あるいは非添加の nutrient agar にプレーティング。37、48 時間培養。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	様々な化学溶液 (5%過酸化水素、0.5%オゾン、12%リン酸三ナトリウム、2%酢酸、0.3%市販消毒剤)、水 (16~74) 噴霧洗浄介入、ハンドトリミング / 噴霧洗浄処理の、モデルスプレー洗浄キャビネット内での、ウシ brisket 脂肪サンプルにおける糞便を除去し、微生物汚染を除去する能力を比較した。サンプルに、 <i>E. coli</i> (ATCC 11370) と共に、2.5 cm <sup>2</sup> のウシ糞便ペーストを接種した。ハンドトリミングに続き、純水 (サンプルと接触した時 16~74、20.68 bar、36 または 12 秒間) で噴霧洗浄したところ、( $P < 0.05$ ) 接種したコントロールと比較して、微生物数が 1.41~2.50 log CFU/cm <sup>2</sup> 低かった。さらに、化学溶液 (16、1.38 bar、12 または 36 秒) の噴霧と共に、前または後に純水 20.68 bar (16、36 秒) (35、12 秒) (74、12 秒) 噴霧洗浄すると、微生物数がそれぞれ、1.34~2.87、1.18~2.86、0.96~3.42 log CFU/cm <sup>2</sup> 減少した。 数の減少は、水温 (16~74)、薬液の種類、噴霧の順番の影響を受けた。本研究の条件下で、過酸化水素およびオゾン水は、最初、水で洗浄した後に適用すると、リン酸三ナトリウム、酢酸および市販消毒剤より効果的であった ( $P < 0.05$ )。リン酸三ナトリウムは、水で洗浄する前に使用した場合、その活性を維持した。一般に、74 の水は、トリミングと噴霧洗浄で得られたものよりも高い、3.0 log CFU/cm <sup>2</sup> を超える減少を引き起こした ( $P < 0.05$ )。噴霧洗浄後、接種部位の隣接領域に細菌の拡散は検出されなかった。
文献書誌事項	Gorman, B.M., J.N. Sofos, J.B. Morgan, G.R. Schmidt, and G.C. Smith. 1995. Evaluation of Hand-Trimming, Various Sanitizing Agents, and Hot Water Spray-Washing as Decontamination Interventions for Beef Brisket Adipose Tissue. <i>Journal of Food Protection</i> . 58 (8) 899-907.

文献 ID : 11

論文タイトル	Destruction of <i>Escherichia coli</i> and Salmonellae on Mutton Carcasses by Treatment with Hot Water
調査国	オーストラリア
対象動物	ウシ、ヒツジ
調査対象微生物	<i>E.coli</i> 、 Salmonellae ( <i>Salmonella typhimurium</i> 、 <i>S. anatum</i> 、 <i>S. adelaide</i> 、 <i>S. derby</i> 、 <i>S. newport</i> 、 <i>S. havana</i> )
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	水を使用して、異なる温度において牛肉と羊肉上の <i>E. coli</i> とサルモネラ属の死滅を検討すること。ヒツジ枝肉の商用処理のための満足なプロセスの開発可能性を検討すること。
試験条件 パラメーター等	(1) 要求された温度 ( 37 ~ 90 ) に調整した十分な水を要求された時間間隔で接種したサンプルに注いだ。 <i>E. coli</i> とサルモネラ属の存在数は処理前後で推定した。全ての試験は、異なる枝肉から取った牛肉とマトンのサンプルにつき、最低 duplicate で行った。 (2) 蒸気を注入して温められ、設定温度の 1 以内に維持できる 360 L 入るバットにぶらさげ、重石を取り付けた。 (3) ヒツジ枝肉を 80 、 10 秒間、浸した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	(1) 繊維を横切るように 2.5 cm 厚にスライスした牛肉と毛を刈ったヒツジを一辺約 10 cm に切り、室温 ( 20 ~ 22 ) にし、 37 で 24 時間、 nutrient broth で培養した <i>E.coli</i> またはサルモネラ属 ( <i>Salmonella typhimurium</i> 、 <i>S. anatum</i> 、 <i>S. adelaide</i> 、 <i>S. derby</i> 、 <i>S. newport</i> 、 <i>S. havana</i> ) を塗布し、室温で 30 ~ 60 分間、乾燥させることで接種した。この方法で、各サンプルの表面が約 $10^{6.5}/\text{cm}^2$ になった。 (2) ヒツジ枝肉に大腸菌懸濁液を 10 カ所 ( hind leg、 rectal area、 outside midline、 brisket、 neck、 foreleg、 shoulder、 belly flap、 体腔内部 2 カ所 ) に塗布し、 10 分間乾燥させた。細菌懸濁液は十分に生育した 10 TPY プレートに 50 mL の 0.1% ペプトン水で洗うことで調製した。この方法で、約 $1.0 \times 10^8$ cells/mL の懸濁液と枝肉表面に約 $1.0 \times 10^6$ cells/cm <sup>2</sup> 接種できた。
検査方法 増菌の有無 培地	(1) 接種した肉サンプル上に 2 領域、断面 5 cm <sup>2</sup> のコルクボーラーでマークし、無菌的に切りとり、ブレンダージャーに入れ、 90 mL の滅菌した 0.1% ペプトン水の中で 20000 rpm、 30 秒間、ブレンダーで処理した。 0.1 mL のブレンドした液、または 0.1% ペプトン水で 10 倍希釈した液を Tryptone Phytone Yeast Extract Agar に塗抹し、 37 で 24 時間インキュベートした。 (2) ヒツジ枝肉の接種部位 10 カ所を処理前後でサンプリング。各サンプル ( 表面領域 10 cm <sup>2</sup> ) をブレンダーで処理して、TPY agar にプレーティングした。 (3) 5 領域 ( rump、 mid-back、 brisket、 neck、 体腔内部 ) をサンプリングした。サンプル ( 10 cm <sup>2</sup> ) を 0.1% ペプトン水に入れ、ブレンダーで処理した。ブレンドした液、または 10 倍希釈液 0.1 mL を TPY プレートに接種して、 20 で 4 日間インキュベートした。大腸菌群は MacConKey agar を使用した。 37 で 24 時間インキュベートして、直径 1 mm 以上のコロニーを形成し、ラクトース発酵するものを大腸菌群数とした。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	実験室実験では、 37 では 120 秒後もほとんど除菌されず、 60 では 10 秒で 90% が除菌された。 80 、 10 秒の水処理によって、牛肉および羊肉サンプルの表面組織が、不快な程度に永久に変色しないことが示された。この処理により、牛肉サンプルでは 99% 以上、ヒツジ枝肉組織では 99.9% 以上の外表面に接種されたに接種された <i>E. coli</i> とサルモネラが死滅した。洗浄時間より、水温の方が重要であった。商用食肉処理場の屠殺ラインの最後でヒツジ枝肉全体を 80 の水に 10 秒間浸すことで、組織表面に最初から存在していた大腸菌の約 99% と、全好気性細菌の約 96% を死滅させた。食肉処理場におけるヒツジ枝肉へのこのような処理の適用は、肉のサルモネラ汚染を十分に減少させ、貯蔵寿命を改善するであろう。最初は処理によって 0.5 mm の深さまで変色したが、 80 で 10 秒間加熱したヒツジ枝肉は、 1 ~ 4 で冷蔵保存中、数時間以内にほぼ完全に回復した。
文献書誌事項	Smith. M.G., and A. Graham. 1978. Destruction of <i>Escherichia coli</i> and Salmonellae on Mutton Carcasses by Treatment with Hot Water. Meat Science. 2 (2) 119-128.

文献 ID : 12

論文タイトル	Efficacy of Organic Acids Against <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Attached to Beef Carcass Tissue Using a Pilot Scale Model Carcass Washer
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895、ATCC 43889、ATCC 43890、 <i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC 13525
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	死後硬直後のウシ枝肉表面組織における <i>E. coli</i> O157:H7 を減少させるための要因として、有機酸のタイプ、酸の濃度、微生物種、組織型を評価すること。
試験条件 パラメーター等	DL-乳酸、酢酸、クエン酸は蒸留水で 1、3、5% になるように調製し、オートクレーブした。滅菌蒸留水を含む全ての溶液は、使用するまで 24 で保存した。 (1)赤身ウシ枝肉組織における 3 種の酸×3 濃度×4 種の菌と、同様に赤身ウシ枝肉組織における 4 種の菌に対する水の相互作用効果 (2)赤身と脂肪ウシ枝肉組織における 3 種の酸×3 濃度×2 種の菌の相互作用効果と 2 組織に付着した 2 種の菌に対する水の効果 スプレーノズルスピード 80 cycles/min、チェーンスピード 14 m/min、ノズル圧 80 psi、流速 4.8 L/min、サンプルからノズルまでの距離 17.8 cm、溶液の温度 24 。 噴霧処理後、直ちに 5 cm×5 cm×0.5 cm (全表面領域 25 cm <sup>2</sup> ) をウシ枝肉組織から無菌的に切りとり、ストマッカーバッグへ入れ、4 で 24 時間インキュベートした。噴霧後 (day 0) と 4 、24 時間後 (day 1) に pH を測定した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	赤身はウシ枝肉の皮下筋から切り取った。脂肪組織は round、rib、chuck 領域の外側表面を取り除いた。組織を 7.5 cm×7.5 cm×0.5 cm 片にトリミングし、紫外線 (60 W、殺菌バルブ、組織から 51 cm の距離、20 分間) で滅菌し、-20 で保存した。定常期初期の培養液を生理食塩水 (pH 7.0) で 100 倍希釈し、生菌数が 7 log <sub>10</sub> CFU/mL に調製した。室温で融解し、それぞれの赤身と脂肪組織に 10 mL の菌懸濁液に置くことで接種し、25 で 15 分間インキュベートした。この方法で、 <i>E. coli</i> O157:H7 は約 5 log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> 、 <i>P. fluorescens</i> は 6 log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> が得られた。
検査方法 増菌の有無 培地	4 、24 時間後、各 25 cm <sup>2</sup> のウシ枝肉組織片を、50 mL の 0.1% Tween 20 を含む緩衝ペプトン水からなる中性化緩衝液中で、ストマッカーにより 2 分間処理した。希釈液は 2% ペプトン水で調製し、tryptic soy agar にプレーティングした。 <i>E. coli</i> O157:H7 は 37 で 24 時間、 <i>P. fluorescens</i> は 26 で 48 時間インキュベートして計測した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	ウシ枝肉組織に付着した <i>Escherichia coli</i> O157:H7 を制御するための、有機酸の有効性を、パイロット規模のモデル枝肉洗浄機を用いて検討した。ウシ枝肉の赤身、または脂肪組織表面に、3 株の <i>Escherichia coli</i> O157:H7 または <i>Pseudomonas fluorescens</i> を接種した。水、1、3 または 5% の酢酸、乳酸、クエン酸のいずれかを 24 で噴霧した後、組織を 4 で 24 時間インキュベートし、細菌数を計測した。データを統計学的分析したところ、酸のタイプが有意な因子ではないことを示した ( $p > 0.05$ )。しかし、濃度、組織型および細菌株は、赤身または脂肪組織の細菌数の減少に影響を与えた有意な ( $p < 0.0001$ ) 因子であった。赤身組織で試験した濃度のうち、5% の噴霧処理は、 <i>E. coli</i> O157:H7 または <i>P. fluorescens</i> の数を減少させるのに最も効果的であった。 <i>E. coli</i> O157:H7 株の酸洗浄に対する耐性の差も観察された。細菌数減少の規模は、すべての細菌株について、赤身組織より脂肪組織で一貫して大きかった。表面 pH データは、細菌数の減少が酸性 pH の影響によるものである可能性があることを示した。本研究は、有機酸は生肉における <i>E. coli</i> O157:H7 の数を減少させたが、処理は病原体を完全に不活性化しなかったことを示している。
文献書誌事項	Nettles Cutter, C., and G.R. Siragusa. 1994. Efficacy of Organic Acids Against <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Attached to Beef Carcass Tissue Using a Pilot Scale Model Carcass Washer. Journal of Food Protection. 57 (2) 97 - 103.





文献 ID : 13

論文タイトル	Destruction of bacteria on fresh meat by hot water
調査国	オーストラリア
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> 血清型、Enteropathogenic <i>E. coli</i> O157、 <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Yersinia enterocolytica</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	新鮮な肉片に接種し、さまざまな温度の水で処理した微生物の異なる代表的な株の死滅を決定すること。
試験条件 パラメーター等	水 ( 40, 60, 80 ) で 10 秒あるは 20 秒処理。 Brisket を約 10 cm 四方に切り、Oxioid nutrient broth で 24 時間培養した培養液で上部表面を拭くことで接種した。シュードモナスは 25 、それ以外は 37 で培養した。この方法で約 $10^6 \sim 10^7$ c.f.u./cm <sup>2</sup> になった。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	それぞれの処理の効果の、より正確な推定を得るために、各サンプリング時間に 5 サンプル ( 各表面領域 2×5 cm <sup>2</sup> ) をカットした。 繊維を横切るように 2.5 cm 厚にスライスした牛肉を一边約 10 cm に切り、室温 ( 20 ~ 22 ) にし、37 で 24 時間、nutrient broth で培養した <i>E. coli</i> またはサルモネラ属 ( <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>S. anatum</i> , <i>S. adelaide</i> , <i>S. derby</i> , <i>S. newport</i> , <i>S. havana</i> ) を塗布し、室温で 30 ~ 60 分間、乾燥させることで接種した。この方法で、各サンプルの表面が約 $10^{6.5}$ /cm <sup>2</sup> になった。
検査方法 増菌の有無 培地	1 L に対し、グルコース 2 g、yeast extract 2 g を添加した Tryptone Soya Aga にプレーティングした。シュードモナスが含まれている場合は 25 で 72 時間、それ以外は 37 で 24 時間、インキュベートした。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<i>Escherichia coli</i> ( 7 )、 <i>Salmonella</i> 血清型 ( 7 )、腸内病原性大腸菌 O157 ( 2 )、 <i>Aeromonas hydrophila</i> ( 4 )、 <i>Yersinia enterocolytica</i> ( 1 )、 <i>Pseudomonas fragi</i> ( 5 ) および <i>Listeria monocytogenes</i> ( 5 ) を、新鮮な牛肉の表面組織に接種したところ、温水の致死作用の影響を受けやすいことが判明した。平均して、80 の水を 10 または 20 秒間適用すると、 $3 \log_{10}$ ( 99.9% ) 以上が死滅した。60 の水を 10 または 20 秒間適用した場合も、平均で $1 \log_{10}$ 以上が死滅した。したがって、温水汚染除去キャビネットは、新鮮なウシ枝肉の表面組織上に存在し得るこれらの細菌のいかなる生細胞を、その場で死滅させるのに効果的であろう。
文献書誌事項	Smith, M. G. 1992. Destruction of bacteria on fresh meat by hot water. <i>Epidemiology and Infection</i> . 109 (3) 491-496.

文献 ID : 14

論文タイトル	Control of <i>Salmonella</i> on Beef Tissue Surfaces in a Model System by Pre- and Post-Evisceration Washing and Sanitizing, With and Without Spray Chilling
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>Salmonella californica</i>
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	ウシ枝肉上の <i>Salmonella californica</i> の数の減らすための、内蔵摘出処理前後の洗浄と消毒の効果を決定すること。
試験条件 パラメーター等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 枝肉洗浄と消毒は組織サンプルを 20 mL の滅菌蒸留水、または 2% (v/v) 酢酸中でボルテックス (最大速度の 75%、10 秒間) することで、シミュレートした。噴霧冷蔵は組織サンプルを 5 の滅菌蒸留水、または 2% 酢酸に 30 分間隔で 4 時間、一時的にディップすることでシミュレートした。</li> <li>・ 蒸留水、酢酸の温度を変えて (23、40、55) 評価した。</li> <li>・ 蒸留水洗浄と酢酸洗浄を組み合わせで評価した。</li> </ul>
検体名 サンプルサイズ 採集方法	組織は赤身と脂肪に分け、0.5 cm 厚にスライスし、封をした滅菌バッグに入れ凍結し、最低 42 kGy のガンマ線滅菌を行い、使用するまで -20 で保存した。組織のスライスが必要に応じて部分的に融解し、無菌的に 3.0×1.0×0.5 cm (表面が 10 cm <sup>2</sup> ) にカットした。組織サンプルは糞尿に 5 分間、23 で浸すことで接種し、取り出した後、滅菌ペトリ皿に 5 分、置いた。
検査方法 増菌の有無 培地	組織サンプルは最終手順後、直ちに 99 mL の Butterfield's phosphate buffer に入れ、ストマッカーで 2 分間、処理した。リン酸緩衝液で段階希釈して、ナリジクス酸とノボピオシンを添加した tryptic soy agar (TSA)、ナリジクス酸を添加した 10% (w/v) ラクトース含 MacConkey agar base、ナリジクス酸を添加した EF-18 培地に surface plate technique を使用して数えた。 ナリジクス酸の終濃度は 200 mg/mL、ノボピオシンの終濃度は 15 mg/mL。プレートは 37 で 24~48 時間培養し、選択培地で典型的なサルモネラ属のコロニーを数えた。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ ウシ組織にナリジクス酸耐性株である <i>Salmonella californica</i> を接種し、内蔵摘出前後の枝肉の洗浄および消毒の模擬実験条件下で処理した。</li> <li>・ 蒸留水を用いて洗浄し、2% 酢酸で消毒した処理は、蒸留水のみで洗浄したサンプルと比較して、サルモネラ群を 2 log<sub>10</sub> サイクルも減少させた。酸の温度を 55 に上昇させると、細菌数はさらに減少した。</li> <li>・ 内蔵摘出前後洗浄に続けて噴霧冷却をした場合は、噴霧冷却をしなかった場合と比較して残存細菌数が高く、一部の損傷サルモネラの回復が明らかであった。</li> </ul>
文献書誌事項	Dickson, J.S., and M.E. Anderson. 1991. Control of <i>Salmonella</i> on Beef Tissue Surfaces in a Model System by Pre- and Post-Evisceration Washing and Sanitizing, With and Without Spray Chilling. Journal of Food Protection. 54 (7) 514 - 518.

文献 ID : 15

論文タイトル	Application of Chlorine to Reduce Populations of <i>Escherichia coli</i> on Beef
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>E. coli</i>
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	赤身に付着した腸管病原性、および非病原性大腸菌株に対する、次亜塩素酸ナトリウムの塩素の効能を決定すること。
試験条件 パラメーター等	次亜塩素酸ナトリウム（5%）を、塩素の終濃度が 50、100、250、500、800 ppm、になるように希釈し、pH 6.5 になるように塩酸で調整し、調製後、直ちに使用した。噴霧用の水（pH 6.5）は使用するまで 28 で保存した。 MCW : 80 cycles/min、14 m/min、60 psi、4.2 L/min、17.8 cm、28 。 噴霧処理後、BCT は 25 cm <sup>2</sup> にトリミングし、ストマッカーバッグへ入れ、24 時間、4 で保存した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	死後硬直後のウシ枝肉の赤身と脂肪の表面を 7.5×7.5 cm にトリミングし、表面を紫外光で滅菌し、- 20 で保存した。生細胞密度が 9 log <sub>10</sub> CFU/mL になるように、定常期初期の培養液を生理食塩水（pH 7.0）で 100 倍希釈した。25 で解凍し、赤身および脂肪 BCT を 10 mL の菌懸濁液に入れ、25 で 15 分間インキュベートし、水噴霧、または次亜塩素酸噴霧に供した。この方法では、約 5 log <sub>10</sub> CFU/mL が得られた。
検査方法 増菌の有無 培地	各 25 cm <sup>2</sup> の未処理または噴霧処理した BCT を 50 mL の中性化緩衝液（0.1% Tween 20 含チオ硫酸ナトリウム）で 2 分間、ホモジナイズ。ホモジネートは 2% 緩衝ペプトン水で希釈し、trypticase soy agar にプレートングし、37 で 48 時間培養し、集計した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	ウシ枝肉組織（BCT）の表面に付着した 2 株の大腸菌に対する塩素の影響をモデル枝肉洗浄機を用いて調べた。約 5log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> の大腸菌を有する赤身および脂肪 BCT を、水、および塩素濃度が 50、100、250、500 または 800 ppm の次亜塩素酸ナトリウムを噴霧処理し、24 時間、4 でインキュベートして、大腸菌数を計測した。水を用いた噴霧処理は、コントロールと比較して、赤身または脂肪 BCT のいずれかに付着した細菌数を有意に（P< 0.05）減少させた。しかし、減少は 0.60 log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> 未満であった。BCT に付着した <i>E. coli</i> ATCC 25922 に対する 500 および 800 ppm の塩素による処理は、最も減少し、それぞれ 1.22 および 1.28 log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> であった。800 ppm の塩素において、BCT に付着した <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC43895 は、1.04 log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> まで減少したが、50、100、250 および 500 ppm の塩素による噴霧処理は 1 log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> 未満の減少であった。次亜塩素酸ナトリウム溶液からの塩素による噴霧処理は、大腸菌数を減少させたが、これらの減少は、赤身に付着した細菌を完全に不活性化するには十分ではなかった。
文献書誌事項	Cutter, C., G.R. Siragusa. 1994. Application of Chlorine to Reduce Populations of <i>Escherichia coli</i> on Beef. Journal of Food Safety. 15. 67-75.

文献 ID : 16

論文タイトル	Effects of Acetic Acid, Lactic Acid and Trisodium Phosphate on the Microflora of Refrigerated Beef Carcass Surface Tissue Inoculated with <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria innocua</i> , and <i>Clostridium sporogenes</i>
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i> O157:H7、 <i>Listeria innocua</i> 、 <i>Clostridium sporogenes</i>
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	水、リン酸三ナトリウム trisodium phosphate (TSP)、酢酸、または乳酸洗浄が及ぼす、通常の工業的基準下でのウシ枝肉組織取り扱いや保存に関連する非病原菌、病原菌への効果を検討すること。
試験条件 パラメーター等	すべての噴霧：15 秒、約 5.5 bar (80±5 psi) 32±2。 12% (w/v) リン酸三ナトリウム、1.5% (v/v) 乳酸、3% (v/v) 乳酸、1.5% (v/v) 酢酸、3% (v/v) 酢酸、水 それぞれの処理は n = 10。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	処理前、および処理直後に 5×5 cm、深さ 1 mm の組織片をサンプリング、5 のインキュベーターに 48 時間入れた。バキュームシール後、5 で保存し、7、14、21 日に取り出した。
検査方法 増菌の有無 培地	各サンプリング日に、BPW 25 mL に 0.1% の Tween 20 を添加し、サンプルとともにストマッカーバッグに入れ、2 分間、処理。1 mL のホモジネートを BPW で希釈しプレATING。 全中温好気性細菌 (APC) は Trypticase soy agar (TSA)、シュードモナスは pseudomonas isolation agar (PIA)、乳酸菌 (LAB) は Bacto lactobacilli MRS agar で集計した。特異的抗生物質耐性菌は適切な選択培地を使用した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	接種されたウシ枝肉組織 (BCT) の微生物プロファイルを、抗菌処理後、長期冷蔵バキュームパッケージ保存中にモニターした。水 (W)、1.5 および 3.0% 乳酸 (LA) または酢酸 (AA)、または 12% リン酸三ナトリウム (TSP) 洗浄液を送るために工業用スプレー洗浄キャビネットを使用した。 <i>Escherichia coli</i> O157:H7、 <i>Listeria innocua</i> および <i>Clostridium sporogenes</i> の抗生物質耐性株を添加した新鮮な未改変のウシ糞便を、すべての処理の前に BCT に接種するために使用した。中温好気性細菌 (APC)、乳酸菌 (LAB) およびシュードモナス (pseudomonad) と共に、特異的抗生物質耐性 (マークされた) 細菌のレベルを 5 で 21 日間保存することによって、細菌数に及ぼす処理の効果を追跡した。 <ul style="list-style-type: none"> <li>LA、AA、および TSP 処理により、約 5.6 log CFU/cm<sup>2</sup> の初期 APC レベルが 1.3 ~ 2.0 log CFU/cm<sup>2</sup> まで減少した。</li> <li>マークされた細菌は、1.3 log CFU/cm<sup>2</sup> 未満に減少し、21 日間の保存期間を通じてそのままであった。</li> <li>TSP 処理は、大腸菌 O157:H7 および <i>C. sporogenes</i> では酸との有効性は変わらなかったが、APC、<i>L. innocua</i>、LAB に対してはあまり効果的ではなかった。</li> <li>好気性細菌である <i>L. innocua</i> および LAB は、1 例を除いて 7 日までで 7 log CFU/cm<sup>2</sup> 以上で、未処理コントロールおよび水洗浄したサンプルでは 14 日までですべてが 7 log CFU/cm<sup>2</sup> より大きかった。</li> </ul>
文献書誌事項	Dorsa, W.J., C.N. Cutter, and G.R. Siragusa. 1996. Effects of Acetic Acid, Lactic Acid and Trisodium Phosphate on the Microflora of Refrigerated Beef Carcass Surface Tissue Inoculated with <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria innocua</i> , and <i>Clostridium sporogenes</i> . Journal of Food Protection. 60 (6) 619-624.

文献 ID : 17

論文タイトル	Reduction of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 and <i>Salmonella typhimurium</i> on Beef Carcass Surfaces Using Acidified Sodium Chlorite
調査国	米国
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i> O157:H7、 <i>Salmonella typhimurium</i>
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	種々のウシ枝肉表面領域に接種した <i>Escherichia coli</i> O157:H7 と <i>Salmonella typhimurium</i> の減少に対するリン酸、またはクエン酸で活性化した ASC 溶液の効果を評価すること。
試験条件 パラメーター等	<p>接種菌液は、大腸菌とサルモネラがそれぞれ 6.0 log CFU/g になるように糞に添加。枝肉表面に線引きした 400 cm<sup>2</sup> の領域に、接種菌液 10 g をステンレスパチュラで塗り広げた。接種直後の <i>Escherichia coli</i> O157:H7 と <i>Salmonella typhimurium</i> の数はそれぞれ、5.5、5.4 log CFU/cm<sup>2</sup> であった。</p> <p>(1)水洗浄 (コントロール) 1.5 L、69 kPa、90 秒処理後、5 L、初期圧 1.72 MPa、4 秒から 2.76 MPa まで上昇させ、2 秒以内、2.76 MPa、3 秒維持。計 9 秒。</p> <p>(2)水洗浄後、リン酸活性化 - 酸性化亜塩素酸ナトリウム (PASC)</p> <p>(3)水洗浄後、クエン酸活性化 - 酸性化亜塩素酸ナトリウム (CASC) 亜塩素酸 164 mg/L と同等の終濃度 1200 mg/L の抗菌性酸性化亜塩素酸ナトリウム (ASC) 140 mL を 69 kPa、10 秒間、室温 (22.4 ~ 24.7 ) で噴霧。</p>
検体名 サンプルサイズ 採集方法	<p>バックランド用：接種前に 10 cm<sup>2</sup> × 3 サンプルング。</p> <p>追加 3 群：接種した 400 cm<sup>2</sup> から 10 cm<sup>2</sup> × 3 を接種後と各処理後にサンプルリング。接種した 400 cm<sup>2</sup> の外側 (10 ~ 20 cm 以内) も同様に行った。</p> <p>直径 3.6 cm のボーラーで深さ 2 ~ 3 mm カット。</p>
検査方法 増菌の有無 培地	サンプルをストマッカーバッグに入れ、実験前に 0.1% ペプトン水 100 mL を加えた。rifampicin 耐性大腸菌とサルモネラのは、適切な希釈液を lactose-sulfate-phenol red-rifampicin (LSPR) agar にプレーティングし、37、24 時間培養して決定した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<p>独立したさまざまなウシ温枝肉表面領域 (inside round、outside round、brisket、flank および clod) に接種した <i>Escherichia coli</i> O157:H7 と <i>Salmonella typhimurium</i> の減少に対する、水洗浄と組み合わせて室温 (22.4 ~ 24.7 ) で使用した、リン酸活性化した酸性化亜塩素酸ナトリウム噴霧 (PASC)、クエン酸活性化した酸性化亜塩素酸ナトリウム噴霧 (CASC) と水洗浄処理のみの効果を比較した。<i>E. coli</i> O157:H7 と <i>Salmonella typhimurium</i> を接種した後の初期菌数は、それぞれ 5.5 および 5.4 log CFU/cm<sup>2</sup> であった。両病原菌の初期数は、水洗浄に続く PASC 噴霧により 3.8 ~ 3.9 log サイクルまで、および水洗浄に続く CASC 噴霧により 4.5 ~ 4.6 log サイクルまで減少した。噴霧は、適切な消毒剤溶液 140 mL を 69 kPa で 10 秒間使用した。水洗浄のみで得られた対応する減少値は 2.3 log であった。CASC の性能は、PASC の性能よりも一貫して優れているようであった。一般的に、inside round を除き、枝肉表面領域の影響は観察されなかったが、いずれの病原菌の対数減少について、一貫して減少率が低かった。PASC と CASC の両方が、最初の汚染領域を越えた領域に広がった病原菌を、計数方法の検出限界 (0.5 log CFU/cm<sup>2</sup>) に近いレベルまたはそれ以下に効果的に低減することができた。しかし、これらの抗菌剤溶液で処理された枝肉の 30 ~ 50% は、依然として計数できるコロニーを生じた。本研究の結果は、酸性化された亜塩素酸ナトリウム噴霧が、ウシ枝肉表面の汚染除去に有効であることを示している。</p>
文献書誌事項	Castillo, A., Lucia, L.M. Kemp, G.K., and Acuff, G.R. 1999. Reduction of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 and <i>Salmonella typhimurium</i> on Beef Carcass Surfaces Using Acidified Sodium Chlorite. Journal of Food Protection. 62 (6) 580 - 584.

文献 ID : 18

論文タイトル	Lactic acid decontamination of fresh pork carcasses: a pilot plant study
調査国	オランダ
対象動物	ブタ
調査対象微生物	<i>Salmonella typhimurium</i> strain S1
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	サルモネラ接種菌液が検出レベル以下に減少できるかどうか、肉の表面温度が 16~18 と 36~38 の新鮮な屠殺されたブタ枝肉のコールド LAD とホット LAD の噴霧処理を用いて決定した。ホット LAD が及ぼす枝肉の外観への影響についても検討した。
試験条件 パラメーター等	重合した乳酸を加水分解するために、121 で 20 分間オートクレーブした 50% L(+)-乳酸を希釈して調製した。2%乳酸：pH 2.3、5%乳酸：pH 1.9 コールド LAD：11、30、60、120 秒間噴霧 ホット LAD：55、30、60、90、120 秒間噴霧 コントロール：水を 11 or 55、120 秒間噴霧 肉表面の初期温度：21、30~120 秒のホット LAD + 水処理：表面温度 36~38、コールド LAD + 水処理：表面温度 16~18。 噴霧はすべて 20 cm の距離から、400 mL/min で行った。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	サンプリング部位：頬（咀嚼筋付近）、背部（肩甲骨の尾端）、腹部（胸骨の尾端） 内蔵除去後、糞のペプトン生理食塩水懸濁液 500 mL か、または $10^3 \sim 10^5$ cfu/mL の <i>S. typhimurium</i> を含むペプトン生理食塩水を上から下へ注ぐことによって接種した。 糞便懸濁液は死後 30 分以内にブタ結腸の内容物を水で 1000 倍希釈して調製。 それぞれ 3 つのサンプリング部位から、処理前と処理直後に 5 cm <sup>2</sup> の円盤状組織を切り出し、45 mL の B-TSBY 液体培地が入ったバッグに入れ、ストマッカーで 3 分間処理した。
検査方法 増菌の有無 培地	サルモネラは catalase-mediated solid medium に XLD-N を重層して、42 で 24 時間培養して決定した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	糞便懸濁液中の <i>Salmonella typhimurium</i> で人為的に汚染された豚枝肉の乳酸汚染除去 (LAD) を食肉処理場で行った。 <i>S. typhimurium</i> の表面汚染は $1 \sim 2 \log_{10}$ cfu/cm <sup>2</sup> であった。コールド LAD とホット LAD が行われる前に、接種菌液を肉表面に 20 分間付着させた。コールド LAD は、2% (pH 2.3) または 5% (pH 1.9) の乳酸 (LA) で 60 秒処理した。ホット LAD の曝露時間は 30、60、90 および 120 秒であった。噴霧ノズルの温度は、コールド LAD は 11、ホット LAD は 55、処理した肉表面の温度はそれぞれ 16~18、36~38 であった。 2% および 5% のコールド LA での 60 秒間処理は、約 $1 \log_{10}$ cfu/cm <sup>2</sup> 接種したブタ枝肉から <i>S. typhimurium</i> を除去できた。2% および 5% のホット LA の 60~120 秒間噴霧により、約 $2 \log_{10}$ cfu/cm <sup>2</sup> の除去も達成することができた。また、これらのホット LA 溶液を用いて少なくとも 30 秒間曝露すると、 $1 \log_{10}$ cfu/cm <sup>2</sup> 接種したした枝肉から一貫して <i>S. typhimurium</i> を除去した。 すすぎ落としは、汚染の減少にほんのわずかしが寄与しなかった。2% または 5% の LA を 120 秒間適用すると、肉の感覚受容品質が許容できないほど悪化した。噴霧溶液にニコチン酸およびアスコルビン酸を色安定剤として添加すると、2% の LA を使用した場合に、これらの変化は許容できるレベルにまで低下した。
文献書誌事項	Van Netten, P., D.A.A. Mossel, and J. Huis In't Veld. 1995. Lactic acid decontamination of fresh pork carcasses: a pilot plant study. International Journal of Food Microbiology. 25 (1) 1-9.

文献 ID : 19

論文タイトル	Prevalence of <i>Campylobacter</i> spp. and <i>Salmonella</i> spp. on Pork Carcasses and the Reduction Effected by Spraying With Lactic Acid
調査国	米国
対象動物	ブタ
調査対象微生物	<i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp.
処理工程	冷却冷蔵
調査目的	ブタ肉処理工場からのブタ枝肉におけるサルモネラ属とカンピロバクター属の分布と 2%乳酸噴霧を含む屠殺後冷蔵処理が及ぼすサルモネラ属とカンピロバクター属の減少に及ぼす影響を検討すること。
試験条件 パラメーター等	75 枝肉 : 4 、空冷 (通常の冷蔵) 75 枝肉 : 4 、断続的な水冷蔵 (冷蔵の最初の 8 時間、20 分毎に 11 秒間、4 の水を噴霧、噴霧冷蔵) 75 枝肉 : 屠殺後、直ちに 2% (v/v) L-乳酸を噴霧してから通常冷蔵 噴霧は枝肉から 40 cm の距離。20 psi、電極 100 V。 乳酸噴霧の 75 枝肉は半身を 150 mL 噴霧して、反対側の半身は噴霧せずコントロールとした。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	サンプルはあらかじめ Cary and Blair (C-B) transport medium で湿らせた滅菌綿棒で、枝肉の ham か shoulder の皮膚 100 cm <sup>2</sup> を拭き取り得た。冷蔵前の新鮮な屠殺枝肉からサンプリングし、その後、再度枝肉の両側からサンプリングし、4 で 20 時間、冷蔵した。乳酸処理した枝肉は、噴霧 5 分後、冷蔵 20 時間後に拭き取りサンプリングした。 サンプルは C-B transport medium (10 mL/tube) に入れた。
検査方法 増菌の有無 培地	<i>Campylobacter</i> spp.を検出するために、1.0 mL の分注したサンプルを、2.5 mL の Preston enrichment 液体培地に移し、24 時間、42 で微好気性条件でインキュベートした。単離のため、増殖させた液体培地を Skirrow agar にストリークし、42 で 24~48 時間インキュベートした。oxidase、catalase、hippurate の生化学的試験も行った。 <i>Salmonella</i> spp.を検出するために、1.0 mL の分注したサンプルを、9 mL の brilliant green tetrathionate 液体培地に入れ、42 で 24 時間インキュベートした。この一部を brilliant green agar にストリークし、37 で 24 時間インキュベートした。典型的な <i>Salmonella</i> spp.のコロニーを増殖の形式を検討するために、triple sugar iron agar スラントで培養し、さらに、血清学的、生化学的試験を行って、 <i>Salmonella</i> spp.と確認した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	サンプリングした 225 の枝肉のうち、カンピロバクター属は 23 枝肉 (ショルダー : 9、もも : 14) に、サルモネラ属は 63 枝肉 (ショルダー : 29、もも : 34) に存在していた。 ・ 2% 乳酸噴霧はどちらの細菌も減少させた。 ・ 24 時間の冷蔵保管後、乳酸噴霧群のみでサルモネラ属の生存が減少した。 ・ 本研究で分離された全ての <i>Campylobacter</i> spp.は <i>Campylobacter coli</i> と確認された。
文献書誌事項	Epling, L.K., J.A. Carpenter, and L.C. Blankenship. 1993. Prevalence of <i>Campylobacter</i> spp. and <i>Salmonella</i> spp. on Pork Carcasses and the Reduction Effected by Spraying With Lactic Acid. Journal of Food Protection. 56 (6) 536-537



文献 ID : 20

論文タイトル	Effects of Washing and Sanitizing on the Bacterial Flora of Vacuum-Packaged Pork Loins
調査国	米国
対象動物	ブタ
調査対象微生物	aerobic bacteria、anaerobic bacteria、 <i>Lactobacillus</i> spp.
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	噴霧洗浄単独、および噴霧洗浄後、次亜塩素酸ナトリウム (SSCL) または酢酸 (SSAA) 殺菌処理が及ぼす保存期間 28 日を超える真空パッケージされたボンレス豚ロース (pork loin) の微生物数への効果を評価すること。
試験条件 パラメーター等	SW 処理 : 水噴霧 (12.8 、1378 kPa (200 psi)、25.4 L/min) SSAA 処理 : SW 処理後、2% 酢酸噴霧 (12.8 、1378 kPa (200 psi)、6.8 L/min) SSCI 処理 : SW 処理後、200 ppm 次亜塩素酸ナトリウム噴霧 (12.8 、1378 kPa (200 psi)、6.8 L/min、pH はリン酸で 6.0 に調整) 実験的肉洗浄ユニットで噴霧、10 cm/s で通過させ、両側を噴霧した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	54 ボンレスポーク loin を使用。半身を洗浄滅菌処理に、反対の半身は非処理 (乾燥) コントロールとした。 処理直前と処理 1 時間後に、表面のコアサンプルを 2.54 cm×0.5 cm で、14、21、28 日にサンプリング (脂肪×2、赤身×2)。
検査方法 増菌の有無 培地	サンプルを 0.1% ペプトン水 99 mL に入れ、自動シェイカーで 1 分間攪拌。 好気性菌は plate count agar で 21 、3 日間培養。嫌気性菌は anaerobic agar で嫌氣的に 34 、5 日間培養。 <i>Lactobacillus</i> 属は lactobacillus-selection broth: granulated agar = 70: 10 混合物で 37 、5 日間培養。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	処理直後と 14 日、21 日、28 日における好気性菌、嫌気性菌、 <i>Lactobacillus</i> 属の数は、SW 処理と SSCL 処理したロースより SSAA 処理したロースの方が有意に低かった。14 日の保存期間中、SSCL 処理したロースは非処理 (コントロール) より微生物数が低かった。SW 処理したロースは処理直後のみ、コントロールより有意に微生物数が低かった。SSAA 処理は一部、退色を生じさせた。この退色を防げれば、SSAA 処理は、新鮮な豚肉の貯蔵期限を延長することができるであろう。
文献書誌事項	Cacciarelli, M.A. W.C. Stringer, M.E. Anderson, and H.D. Naumann. 1983. Effects of Washing and Sanitizing on the Bacterial Flora of Vacuum-Packaged Pork Loins. Journal of Food Protection. 46 (3) 231 -234.

文献 ID : 21

論文タイトル	Decontamination of commercial, polished pig carcasses with hot water
調査国	カナダ
対象動物	ブタ
調査対象微生物	<i>E. coli</i>
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	つるした枝肉に熱水を適用する時、すべての枝肉表面が覆われて、約 80 まで確実に上昇しなければならない。研磨されたブタ枝肉のオンレールでの加熱殺菌によって実現するかもしれない衛生的な利益を検討するために、装置は、この目的（確実な温度上昇）のために開発された。
試験条件 パラメーター等	水のシートを上下両側から枝肉へ搬送するための装置が開発された。水は、センターラインに対してそれぞれのシートの位置を変えるよう調整できるアウトレットから運ばれる。熱された水はタンクからアウトレットにポンプで吸い上げられ、アウトレットからタンクへ戻ってくる。循環水はポンプに入る前に 2 mm のメッシュでろ過する以外は未処理である。 枝肉は装置の中をチェーンで運ばれ、そのスピードは処理時間を 20 ~ 90 秒の間で変えることができる。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・水温 60、75、80、85、90 で 40 秒間処理。</li> <li>・水温 90、20、60、90 秒間処理。</li> </ul>
検体名 サンプルサイズ 採集方法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・5 つの枝肉から表面の 4 領域それぞれ約 100 cm<sup>2</sup> を拭き取った。1 領域につき、5 つの拭き取りサンプルを枝肉一群から得た。それぞれの領域で得られたサンプルを組合せ、0.1(w/v)% のペプトン水 50 mL で 2 分、ストマッカーで処理した。</li> <li>・5 枝肉をランダムに選び、水温 60、75、80、85、90 で 40 秒間処理した。それぞれの枝肉から拭き取りで非処理枝肉も得た。それぞれの領域で得られたサンプルを再度ストマッキングのため、組合せた。</li> <li>・同様に、90 の水で 20、60、90 秒間処理した。</li> </ul>
検査方法 増菌の有無 培地	それぞれのホモジネートから 10 倍および 100 倍希釈液を調製し、原液と希釈液 0.1 mL を plate count agar に塗抹し、25 で 3 日間インキュベートした。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<p>商業屠殺プラントにおいて、加工レールから吊り下げられ研磨された、中抜きでない豚の胴体を、上下に温水のシートを配置したキャビネットを通過させた。効果的な処理の可能性を同定するために、5 つの枝肉の一群に適用するたびに 60 ~ 90 の温度の水と 20 ~ 90 秒間処理した。</p> <p>4 つの混合サンプルを得るために、各群の 5 つの枝肉の同等の領域からの拭き取りを組み合わせた。各混合サンプルから微生物叢の数および組成を決定した。</p> <p>85 で 20 秒間の水処理により、枝肉表面のすべての領域で、未処理の枝肉と比較して、細菌の総数が 2 桁減少した。非耐熱性の腐敗細菌は約 50% から約 10% に減少した。水温を 85 以上に上げたり、処理時間を 20 秒以上にしても、数をさらに減らすことはできず、また、生存している菌叢の組成が変わった。</p> <p>続いて、800 の枝肉を、85 の水で 20 秒間処理した。拭き取りサンプルは、無作為に選択された 100 の枝肉から回収した。それぞれの枝肉は、以前に選択された領域の 1 つを拭き取られ、各領域について同じ数の拭き取りサンプルが得られた。未処理の 100 の枝肉から同様に試料を回収した。各拭き取りサンプルは、回収された菌叢の計測、および同定、および大腸菌の計測のために別々に処理された。結果は、処理が、各枝肉の全体表面にわたって腐敗細菌および大腸菌の log<sub>10</sub> 数を 2.5 以上一貫して減少させることを示した。</p>
文献書誌事項	Gill, C.O., D.S. McGinnis, J. Bryant, and B. Chabot. 1995. Decontamination of commercial, polished pig carcasses with hot water. Food Microbiology. 12 (2) 143-149.

文献 ID : 22

論文タイトル	Assessment of the hygienic efficiencies of two commercial processes for cooling pig carcass
調査国	カナダ
対象動物	ブタ
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i> , psychrotrophic pseudomonads
処理工程	冷却冷蔵
調査目的	2 つのブタ枝肉冷却の商用過程の衛生的効率、1 つは完全な従来法、もう 1 つは、最初に凍結エアブラストに枝肉をさらす方法、を温度機能統合技術によって、商業的な実用性において、後者の冷却過程が衛生的な利点があるかどうかを評価する。
試験条件 パラメーター等	プラント A : 従来法による冷却。枝肉冷却装置は 30 のレールに約 3500 の枝肉を保持できる。枝肉は冷却装置に入れる前に分割したが、2 面は、剥がした皮膚によりネックでくっつけたまま。冷蔵装置は -1 ~ 2 で操作した。すべてのレールがいっぱいになると、約 5 の水が 10 分 20 秒間、枝肉に噴霧される。 プラント B : 枝肉はコンベンショナルな冷蔵装置に入る前に、冷凍トンネルを通り抜ける (-20、冷凍トンネルは 45 ~ 60 分で通過)。トンネル出口で、枝肉は 80 kg 以上か、80 kg 未満かでソートされる。冷却装置は約 4000 の枝肉を保持できる。冷蔵装置は 0 ~ 2 で操作された。枝肉は冷却過程の間、噴霧されない。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	測定している各枝肉の同じ側の深部と表面温度を同時に記録した。 プラント A : 枝肉が入った冷却装置にロガーを設置した。6 枝肉をそれぞれ 4 日、記録した。初日、最初の 10 のうち 1 つの枝肉に、冷却装置に入れるために、ロガーを設置し、その後、20 分のインターバル後、冷却装置に入れた。 プラント B : 凍結ブラストトンネルに入れた枝肉は、プラント A と同様に選んだ。ロガーは枝肉がトンネルを出るときに回収した。80 kg 以上か、80 kg 未満かをソートした後、さらにロガーを設置した。温度履歴データは 80 kg 以上、80 kg 未満の枝肉のランダムなサンプルから集められた。
検査方法 増菌の有無 培地	好気性大腸菌の 3 相性モデル (x : 温度( ), y : 増殖速度 (h <sup>-1</sup> )) : $y = (0.0513x - 0.71)^2$ (7 x < 30) $y = (0.027x + 0.55)^2$ (30 x < 40) $y = 2.66$ (40 x < 47) $y = 0$ (x < 7 or > 47) シュードモナスの 2 相性モデル (x : 温度( ), y : 増殖速度 (h <sup>-1</sup> )) : $y = (0.033x + 0.27)^2$ (-2 x < 25) $y = 1$ (25 x < 35) $y = 0$ (x < -2 or > 35)
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	温度履歴は、2 つの商用枝肉冷却過程を通過したブタ枝肉のランダムな、ももの深い領域と、最も長い期間、最も高い温度で維持された枝肉表面上の部位のサンプルから収集した。表面温度履歴データは <i>Escherichia coli</i> と耐冷性シュードモナス菌 (psychrotrophic pseudomonads) の生育速度の温度依存性を説明するモデルに関して統合された。 ・ 冷却前に凍結エアブラストを施した枝肉サンプルの最終深部温度、大腸菌の算出された増殖値、およびシュードモナス菌の算出された増殖値のデータは、従来の冷却過程を通過した枝肉のデータと比較して、より低く、より狭い範囲に分布していた。 ・ 商業的環境下では、従来の冷蔵前に凍結エアブラストに枝肉をさらすことは、枝肉冷蔵プロセスの衛生効率を実質的に改善する可能性があることが示された。
文献書誌事項	Gill, C.O., and T. Jones. 1992. Assessment of the hygienic efficiencies of two commercial processes for cooling pig carcass. Food Microbiology. 9 (4) 335-343.

文献 ID : 23

論文タイトル	Use of a temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a beef carcass cooling process
調査国	ニュージーランド
対象動物	ウシ
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i>
処理工程	冷却冷蔵
調査目的	(1)適正な枝肉表面部位の冷却をモニタリングする実用的な方法を同定すること。 (2)受け入れられる冷却過程内で起こりそうな、表面冷却速度のバリエーションが及ぼす、製品衛生への影響を評価すること。 (3) 枝肉冷却過程の衛生的妥当性を保証するために、温度機能統合技術が適用されるかどうかの指針をデータから得ること。
試験条件 パラメーター等	牛肉の冷蔵は 24 時間サイクルで、一般的な方法で行った。屠殺後、切り出しのために取り出す日まで、枝肉の深部温度が 10 °C、もしくはそれ以下になるようにした。枝肉は解体 30 ~ 40 分後、冷却装置に入れる前に分割した。冷却空気の風速は 0.2 ~ 0.7 m/s。戻ってきた空気が 4 °C を超えると冷却装置のスイッチが入り、2 °C を下回るとスイッチが切れる。  大腸菌の潜在的な増殖は、最も長い期間、最高温度で維持された側面の部位から得られた 50 °C の温度履歴から算出した。これらのデータから、推定された大腸菌の増殖に基づいた枝肉冷却過程の衛生的妥当性を定義するための基準が示唆される。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	プローブを設置して、温度を測定開始して、半身が冷却装置に入ってから 10 分以内に全て記録した。冷却装置から外した時に、プローブとロガーを取り外した。プローブを取り外した時間を記録した。
検査方法 増菌の有無 培地	好気性大腸菌の 3 相性モデル ( $x$ : 温度 (°C)、 $y$ : 増殖速度 ( $h^{-1}$ )): $y = (0.0513x - 0.17)^2$ ( $7 < x < 30$ ) $y = (0.027x + 0.55)^2$ ( $30 < x < 40$ ) $y = 2.66$ ( $40 < x < 47$ ) $y = 0$ ( $x < 7$ or $x > 47$ )
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>市販の牛枝肉冷却過程の衛生的性能は、温度機能統合技術によって評価された。</li> <li>枝肉の冷蔵プロセスは、一般に、深部温度を 7 °C 以下に下げるのに必要な時間で説明される。</li> <li>本調査では、ウシ筋肉の深部温度を 7 °C まで冷やすのに必要な時間は、平均で 24.6 時間、最も長いサンプルで約 50 時間であった。</li> <li><i>E. coli</i> 増殖が最も高かったサンプルでは、7 °C まで冷やすのに 30 時間要した。</li> <li>どちらの場合も、表面の温度が 7 °C に冷えるまでに要する時間は 20 時間であった。</li> <li>ウシ筋肉の深部温度を 7 °C まで冷やすのに必要な時間から、現在受け入れられている製造管理、品質管理基準 (GMP) と一致したプロセスであることが示された。</li> </ul>
文献書誌事項	Gill, C.O., J.C.L. Harrison, and D.M. Phillips. 1991. Use of a temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a beef carcass cooling process. Food Microbiology. 8 (2) 83-94.

文献 ID : 24

論文タイトル	The generation time, lag time, and minimum temperature of growth of coliform organisms on meat, and the implications for codes of practice in abattoirs
調査国	オーストラリア
対象動物	ヒツジ
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>
処理工程	冷却冷蔵
調査目的	商用食肉処理場において加工されたヒツジ枝肉に発生するサルモネラ類似菌によって、大腸菌群の最低生育温度、世代時間、lag time の実用的な目的を決定すること。
試験条件 パラメーター等	0~2 で一晩冷蔵
検体名 サンプルサイズ 採集方法	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 肉サンプルは 50 ヒツジ枝肉の首組織から約 5 g ずつサンプリング。</li> <li>・ 過剰な脂肪を取り除き、50 g をブレンダージャーへ入れ、15000 rev./min で 20 秒処理。</li> <li>・ Nutrient broth 中で 37 で一晩培養した <i>E. coli</i> または <i>Salmonella typhimurium</i> を肉組織とブレンディングする。</li> <li>・ <math>10^4</math> cells/g になるように加え、0~2 で一晩冷蔵した(と畜場での冷蔵をシミュレート)。</li> <li>・ 初期大腸菌量は約 <math>10^3</math> cells/g。</li> </ul>
検査方法 増菌の有無 培地	<p>45 mL の 0.1%ペプトン水を加え、15000 rev./min で 20 秒間、処理。0.1 mL を MacConkey agar No. 3 プレートに塗抹し、37 で 18~24 時間、培養。24 時間後、直径 1 mm 以上の赤いコロニーを大腸菌群としてカウントした。コロニーを Kohn's Two Tube Medium に接種し、典型的な大腸菌の反応かを確認した。</p> <p>サルモネラのカウントは 80 g/mL の sulphadiazine を含む Brilliant Green Agar (BGA) プレートを、選択性が低く、阻害性も低い pH 7.2 で使用した。典型的なサルモネラのコロニーを Kohn's Two Tube Medium に接種し、正しい反応かを確認した。</p>
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<p>商用食肉処理場で処理したヒツジからの枝肉組織上の大腸菌群の生育を調べた。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 肉における大腸菌群の生育の最低温度は 8 であった。</li> <li>・ <i>Salmonella typhimurium</i> 株は、15 以下の温度において、より長い世代時間(generation time)と lag time を示した。</li> <li>・ <i>Escherichia coli</i> と <i>Salmonella typhimurium</i> の Lagtime は 10 で 23.35 時間であった。</li> <li>・ 10 での世代時間は 6.68 時間であった。</li> <li>・ Lag time と世代時間は、温度が低くなるにつれて長くなる。</li> </ul> <p>式は生の混合マトンにおける大腸菌群の世代時間、lag time と肉が保持された温度の関係から導き出された。これらの式で得られた生育の推定値は、特に 10 を超える温度での実験結果と密接に一致し、40 までのすべての温度の世代時間および lag time を計算することができた。これらの時間はまた、混合マトン組織に接種された <i>Escherichia coli</i> 株を用いて決定された時間と密接に一致することがわかった。同様にマトン組織に接種された。</p> <p>したがって、この論文の lag time と世代時間の計算値表は、サルモネラ菌数の増加なしに、最低生育温度以上の温度での、冷蔵生肉の保存時間の長さを決定するのに使用でき、これらの時間は各温度で安全の余裕を含むと思われる。</p> <p>本研究は、商用食肉処理場に現在適用されている実施義務規定が厳しすぎることを示している。計算された時間制限内で処理された肉を提供していれば、ポーングルームの温度を 10 以下に維持する必要はないと思われる。ポーングルームの室温の制限を緩和すれば、コストが減り、作業者の快適性と安全性が向上し、生産された肉の細菌学的安全性を損なうことはない。</p>

文献書誌事項	Smith, M.G. 1985. The generation time, lag time, and minimum temperature of growth of coliform organisms on meat, and the implications for codes of practice in abattoirs. Journal of Hygiene Cambridge. 94 (1) 289-300.
--------	--

文献 ID : 25

論文タイトル	Staphylococcal Growth and Enterotoxin Production-Factors for Control
調査国	米国
対象動物	-
調査対象微生物	Staphylococcal
処理工程	-
調査目的	我々の食品と食品加工操作における黄色ブドウ球菌を制御するために使用される、いくつかの要因と条件がある。十分な制御を得るためには、単一の方法のみを信頼すべきでない。黄色ブドウ球菌は速く増殖し、栄養、酸素、pH、水分の要求性に関して、普遍的な好みを持っていると認識されるべきである。この遍在性に付け加えて、ヒトとの強い結びつきと、毒素の安定性の強さがあり、黄色ブドウ球菌が毎年、米国における食物由来の疾患の発生報告の 20 ~ 40% に責任があるのかを理解することは難しくない。
試験条件 パラメーター等	-
検体名 サンプルサイズ 採集方法	-
検査方法 増菌の有無 培地	-
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<p>本文献は総説である。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ Staphylococcal を殺菌する最も効果的な手段の一つは温度であり、温度は増殖にも影響する。</li> <li>・ 毒素産生の至適温度は 35 ~ 39 である。</li> <li>・ 増殖温度域はとても幅広く、7 ~ 48 である。</li> <li>・ エンテロトキシンの生成はやや狭い温度域であり、10 ~ 45 である。</li> </ul> <p>食品における増殖とエンテロトキシンの生産を制御している要因は多く、多様である。至適条件下で、世代時間が 15 分、12 ~ 18 時間以内に到達した最大細胞密度 <math>10^9</math>/g が報告された。自然に汚染された食品において、これらの生育速度にはめったに遭遇しない。なぜなら、さまざまな組合せ、あるいは単独の環境要因が増殖とエンテロトキシン形成に影響を及ぼすからである。増殖と毒素形成を制御しているその他の要因は、培地の栄養完全性、pH、温度、接種量と形式、競合微生物の影響である。さらに、さまざまな源からのブドウ球菌の汚染の可能性は、特定の食品におけるブドウ球菌により示された公衆衛生上のリスクを確認する時、よく考えられなければならない。</p> <p>加工装置の消毒中のブドウ球菌の駆除あるいは除去は、たいてい、第 4 級アンモニウム化合物、塩素、ヨードフォールのような殺菌剤と抗菌薬によって成し遂げられる。時として、これらの化合物は界面活性洗剤との混合物として得られ、それらはたいてい、水ですすいだ後に使用される。これらの材料がブドウ球菌性エンテロトキシンに及ぼす効果は知られていないが、別の方法で証明されない限り、そのような化学的処理の間ずっと、毒素は維持されるであろうと仮定しなければならない。</p>
文献書誌事項	<p>総説</p> <p>Troller, J.A. 1976. Staphylococcal Growth and Enterotoxin Production-Factors for Control. Journal of Milk and Food Technology. 39: 499-503.</p>

文献 ID : 26

論文タイトル	Effect of Temperature, pH and Sodium Chloride Concentrations on Production of Staphylococcal Enterotoxins A and B
調査国	米国
対象動物	-
調査対象微生物	<i>Staphylococcus aureus</i> S-6
処理工程	-
調査目的	同じ株によりエンテロトキシンが生産された時、さまざまな温度、pH、NaCl濃度、およびこの3条件の組合せが、2つのエンテロトキシンの生産にどのような影響を及ぼすかを、enterotoxin A (SEA) と enterotoxin B (SEB) を産生する <i>Staphylococcus aureus</i> S-6 株を使用して決定した。
試験条件 パラメーター等	増殖用基本培地は4% N-Z Amine NAK にナイアシン 10 mg/L、チアミン 0.5 mg/L を添加して使用した。pH は 1.0 N NaOH、または 0.1 N HCl で調整した。NaCl 濃度は適切な量の NaCl を培地に直接加えて調整した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	Donnelly らのバッグ培養法で、異なる培地を使用して培養した。100 mL の培地を加えたセロファンバッグをシールして、300 mL 三角フラスコに置いた。培地 19 mL をフラスコに入れ、121 °C、15 分間、オートクレーブした。滅菌後、外部培地に 10 <sup>7</sup> cells/mL の培養液 1 mL を接種した。温度制御レシプロカルシェイカーを用いて 250 rpm で培養した。
検査方法 増菌の有無 培地	培養液 10 mL を 5000 rpm (2500×g) で 10 分間遠心し、上清を水で透析し、凍結乾燥した。凍結乾燥サンプルはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に、SEB 検出用は元の量、SEA 検出用は 1/5 量に再懸濁した。エンテロトキシンの定量は single gel diffusion 法で行った (感度 1 ng/mL)。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<p><i>Staphylococcus aureus</i> S-6 株は、casein hydrolysate 培地、チアミンとナイアシンを強化した NZ-Amine NAK を用いたバッグ培養法により enterotoxins A (SEA) と B (SEB) を生産するのに、25 ~ 45 °C、pH 4.5 ~ 9.0、NaCl 0 ~ 12.5% の条件で使用される。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ エンテロトキシンの生産が最も高いのは、至適生育条件の 39.4 °C、pH 7.0 である。</li> <li>・ 20 °C、45 °C 以上、pH 4.5、NaCl 12% により 2 つのエンテロトキシンの生産は完全に阻害された。</li> <li>・ NaCl 濃度の上昇はエンテロトキシンの生産を減少させ、SEA より SEB の生産により明白な影響を及ぼした。NaCl 4% におけるエンテロトキシンの生産は、pH 6.0 と 6.5、37 °C で 18 時間インキュベートした後も観察されなかった。</li> </ul> <p>この結果は、それぞれの毒素に異なる株を使用することにより得られた違いはたいしてなく、挙動は特異的なエンテロトキシン固有で、エンテロトキシンを生産した株固有でない事を示している。</p>
文献書誌事項	Pereira, J.L., S.P. Salsberg, and M.S. Bergdoll. 1982. Effect of Temperature, pH and Sodium Chloride Concentrations on Production of Staphylococcal Enterotoxins A and B. <i>Journal of Food Protection</i> . 45: 1306-1309.



文献 ID : 27

論文タイトル	<i>Yersinia enterocolitica</i> -like Organisms from Vacuum-packaged Beef and Lamb
調査国	米国
対象動物	ウシ、仔羊
調査対象微生物	<i>Yersinia enterocolitica</i> -like Organisms
処理工程	-
調査目的	市販されている真空パッケージされた牛肉とラムから <i>Yersinia enterocolitica</i> 様の微生物を分離すること。
試験条件 パラメーター等	市販業者からの、真空パッケージされた新鮮な牛肉 (boneless knuckles、bone-in arm chucks、bone-in hotel style ribs) とラム (loin、leg) の卸売肉を 21~35 日間、1~3 で保存した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	肉は表面 129 cm <sup>2</sup> を 5×5×1.25 cm のセルローススポンジでこすった後、0.1% peptone 液体培地で洗いサンプリング。 耐冷性細菌の数は適切な希釈液 0.1 mL を plate count agar に塗抹して 10 日間、7 で培養して決定した。
検査方法 増菌の有無 培地	微生物型を決定するために、30~40 コロニーを計測可能なプレートからランダムに選び、trypticase soy agar (TSA) スラントに置いて 25 で 48 時間培養した。本研究の <i>Yersinia enterocolitica</i> 様の微生物は、これらの耐冷性細菌の一部である。 <i>Y. enterocolitica</i> の数は耐冷性プレートの総数と計測可能なプレートから選択分離した中の <i>Y. enterocolitica</i> のパーセンテージから算出した。 <i>Enterobacteriaceae</i> 属の生化学的な同定は次の試験を含む。 オキシダーゼ (TSA スラント、24 時間) Christensen's urea (24 時間) 窒素還元 (Nitrate broth、48 時間) アルギニンジヒドロラーゼ (4 日間) リシンデカルボキシラーゼ (4 日間) オルニチンデカルボキシラーゼ (4 日間) フェニルアラニンデアミナーゼ (24 時間) TSI (24 時間) 4 における生育 (TSA、3 日間) チロシン分解 (TSA + 0.4% L-チロシン、3 日間) エスクリン加水分解 (Bile esculin agar、24 時間) ゼラチン溶解 (30 日間) MR-VP (48 時間) Hugh-Leifson (O/F 培地、グルコース、ラクトース、4 日間) カーボヒドラーゼからの酸 (フェノールレッド液体培地 + 1% カーボハイドレーツ、30 日間) グルコースからのガス (フェノールレッド液体培地、30 日間) インドール (24 時間) マロン酸 (マロン酸液体培地、4 日間) Simmon's クエン酸 (12 日間) 運動性 (Motility Medium、24 時間、TSA スラントから懸滴して 25 と 36 でインキュベート) レシチナーゼ (Nutrient agar + 5% 卵黄、7 日間) ONPG (24 時間) Vi 抗原、サルモネラ Vi 抗血清、EMB での金属光沢 (24 時間) Jordan's 酒石酸 (48 時間) Simmon's 酢酸 (12 日間) べん毛。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>1~3 で 21~35 日間保存した、真空パッケージした牛肉とラムから分離した <i>Yersinia enterocolitica</i> 様の微生物の特徴を示した。</li> <li>この微生物の分離は、非真空条件下 (リーカーパッケージ) より、真空条件下で 28 日間保存した場合の方が高頻度であった。</li> <li>高真空条件下パッケージした肉から高発生率で分離された。</li> </ul>
文献書誌事項	Hanna, M.O., D.L. Zink, Z.L. Carpenter, and C. Vanderzant. 1976. <i>Yersinia enterocolitica</i> -like Organisms from Vacuum-packaged Beef and Lamb. Journal of Food Science. 41: 1254-1256.

文献 ID : 28

論文タイトル	Development of <i>Yersinia enterocolitica</i> on Raw and Cooked Beef and Pork at Different Temperatures
調査国	米国
対象動物	ウシ、ブタ
調査対象微生物	<i>Yersinia enterocolitica</i>
処理工程	-
調査目的	<i>Y. enterocolitica</i> が 0、1、5 における生牛肉上、および 7、25 における生、および調理済み牛肉、豚肉上で生育できる可能性を調べる。Bismuth sulfate agar を使用して、肉から <i>Y. enterocolitica</i> を分離できる可能性を評価した。
試験条件 パラメーター等	肉サンプルへの接種は 0.1 mL の BHI 培養液を上部表面に塗り広げた。この接種菌液は多くの場合、肉 1 g あたり $10^2 \sim 10^3$ の <i>Y. enterocolitica</i> が得られる。サンプルは 1、5、7、25 のインキュベーターで保存した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	各サンプル (4×4×1/2 cm) を 10 g 量りフタ付きジャーに入れた。コントロール×2 (非接種) 0 時間×1、実験終了時×1。5 株の <i>Y. enterocolitica</i> を用いた牛肉の試験は、各処理 (調理済み 25 保温、調理済み 7 保温、生 25 保温、生 7 保温) で 2 つのビーフローストを使用した。3 株の <i>Y. enterocolitica</i> を用いた牛肉と豚肉の実験は、処理ごとに 1 つのビーフローストまたは Boston butt を使用した。 サンプルは 90 mL の 0.1% ペプトン水中で 2 分間、ブレンダーで処理。ホモジネートを適切に希釈して、TSA 表面平板法と混釈法で 3~4 日間、25 で培養した。Bismuth sulfate agar へのプレーティングは TSA の表面平板法と同様に行った。
検査方法 増菌の有無 培地	菌叢の分布は計測可能なプレートからランダムに 30~40 コロニーを選び、25 で 2~3 日間、TSA スラントに置いた。診断スキームと方法は Vanderzant らの方法に従った。仮に分離したコロニーを <i>Y. enterocolitica</i> と分類するための確認の生化学的試験は Hanna らの方法に従った。TSA プレートによる <i>Y. enterocolitica</i> の数は総数と計測可能なプレートから選択分離した中の <i>Y. enterocolitica</i> のパーセンテージから算出した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>0~1 で 10 日間以上保存した生牛肉において 3 種の <i>Y. enterocolitica</i> の数は増加した。</li> <li>7 (0~10 日間) または 25 (0~24 時間) で保存した生、または調理済みの牛肉と豚肉において、<i>Y. enterocolitica</i> の数は著しく増大した。</li> <li>25 における <i>Y. enterocolitica</i> の数の増加は、生より調理済みの方がやや大きかった。</li> </ul> <p>これらの計数の違いは(a)肉の物理化学的特性(生 vs 調理済)の違い and/or (b)これらの製品上に発達した菌叢のレベルとタイプの違いに起因しているかもしれない。<i>Y. enterocolitica</i> のほかに、<i>Staphylococcus</i>、<i>Micrococcus</i> spp. は、しばしば、調理済みの製品に存在し、<i>Pseudomonas</i> と <i>Microbacterium</i> spp. は生肉に存在する。</p>
文献書誌事項	Hanna, M.O., J.C. Stewart, D.L. Zink, Z.L. Carpenter, and C. Vanderzant. 1977. Development of <i>Yersinia enterocolitica</i> on Raw and Cooked Beef and Pork at Different Temperatures. Journal of Food Science. 42: 1180-1184.

文献 ID : 30

論文タイトル	Is Refrigeration Enough to Restrain Foodborne Pathogens?
調査国	米国
対象動物	-
調査対象微生物	<i>Clostridium botulinum</i> type E、 <i>Yersinia enterocolitica</i> 、 <i>Listeria monocytogenes</i> 、Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> 、 <i>Aeromonas hydrophila</i>
処理工程	冷却冷蔵
調査目的	5 で生育可能な細菌による毒素産生についてレビューすること。
試験条件 パラメーター等	食物由来病原菌を含む多くの微生物は 5 よりも室温が、室温以上が生存に適していると考えられてきた。米国においてブルセラ症は現代の問題ではないけれども、ブルセラの生存は他の要因と同様に温度により影響をうける。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	-
検査方法 増菌の有無 培地	冷蔵(5 )は食品を安全に保つのに、まったく信頼できない。なぜならば、一部の病原菌が生存可能で、この温度で生育できるからである。第一に動物由来の食品、それゆえ、動物由来の、いかなる新鮮な非加熱(無加工)の食品は冷蔵保存期間の延長とともに危機になりうる。しかしながら、冷蔵保存期間が延びた後、いかなる新鮮な冷蔵保存された食品も疑わしい。なぜならば、取り扱い中にクロスコンタミネーションが起きるからである。微生物は種々の食品で生育可能である。 食品の 5 保存は再評価しなければならない。食品中に腐敗微生物がいれば、冷蔵は生育を遅らせるだけで、多くの病原菌の生育を防げるわけではない。これらのコンセプトは冷蔵製品を定式化するときは覚えておくべきである。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>食品を 5 に保つことは食物由来の病原菌を防ぐのに十分であると伝統的に考えられてきた。しかし、新しい病原菌グループが出現し、その一部は 5 の食品でも競争的に生育できる。<i>Clostridium botulinum</i> type E、<i>Yersinia enterocolitica</i>、Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>、<i>Listeria monocytogenes</i>、<i>Aeromonas hydrophila</i> を含む細菌はこの基準に適合している。</li> <li>2 つ目の議論領域は、低温(5 )が及ぼす食物由来病原菌の生存への効果である。<i>Campylobacter jejuni</i> と <i>Brucella</i> は 25 や 37 と比べて、5の方が長い期間、生存する。</li> <li>3 つ目の検討領域は、ある種の病原菌(サルモネラ、黄色ブドウ球菌、<i>Vibrio parahaemolyticus</i>、<i>Bacillus cereus</i>)の生育は、温度が 5 より少し高く、12 までである。これゆえ、食品の温度の不適切な取り扱いは、食品における危機をたやすく生じさせる。(食品を 5 に保持する)冷蔵庫の使用は、もはや微生物の危機だけでなく、新しい病原菌や生存の増加から食品を守るのに十分ではないと思われる。さらには、短期間の温度の不適切な取り扱いさえ、ある種の細菌から危機を生じさせる。</li> </ul>
文献書誌事項	総説 Palumbo, S.A. 1986. Is Refrigeration Enough to Restrain Foodborne Pathogens? Journal of Food Protection. 49(12) 1003-1009.

文献 ID : 31

論文タイトル	Time-temperature Effects on Salmonellae and Staphylococci in Foods
調査国	?
対象動物	-
調査対象微生物	Salmonellae、Staphylococci
処理工程	冷却冷蔵
調査目的	50 °F 未満におけるサルモネラ属とブドウ球菌の生育応答に関連した食品の冷蔵、調理、保温の必要性
試験条件 パラメーター等	<i>Salmonella senftenberg</i> 775W、 <i>S.enteeritidis</i> 、 <i>S. manhattan</i> 、 <i>Staph. aureus</i> Ms149、MF159、196E の 6 種のストック培養は、nutrient agar スラントで毎日、継代し、95 °F で培養維持した。接種実験に供する時には、24 時間培養したスラントをリン酸緩衝滅菌水で洗い流し、勢いよく攪拌した。サルモネラ懸濁液は 620 nm の透過率が 18% になるように、ブドウ球菌懸濁液は透過率が 10% になるように調整した。調整後、サルモネラの培養液を 1 つにまとめて 3 種混合培養液を調製した。ブドウ球菌も同様に調整した。それぞれの混合培養液の生菌数はプレートカウントで 5,000,000,000/mL であった。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	カスタード、ハムサラダ、チキンアラキングを作って、2 oz.スクリュューカップジャーに 50 g 量り入れ、ハムサラダとチキンアラキングは 252 °F、15 分間、カスタードは 239 °F、15 分間、滅菌した。
検査方法 増菌の有無 培地	混合培養液 0.1 mL をジャーに接種 (約 10,000,000 cells/g)。接種したジャーを手で 50 往復シェイク、5 日間培養。24 時間おきに 10 g のサンプルを取り出し、90 mL の滅菌水で slow speed で 2 分間、ブレンダーで処理し、リン酸緩衝滅菌水で 10 倍希釈して Bacto plate count agar で 24 時間、95 °F で培養し、プレートカウントを行った。 食品が滅菌されているか、最初に接種した食品 1 g にどれだけの菌数がいたかは、50 g のサンプルを 430 mL の滅菌水が入ったブレンダーカップに入れ、追加で 10 mLx2 回、ジャーを共洗いしてカップへ。これを slow speed で 2 分間処理して plate count agar で 24 時間、95 °F で培養。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<i>S. senftenberg</i> 775W、 <i>S.enteeritidis</i> 、 <i>S. manhattan</i> の混合培養と、 <i>Staph. aureus</i> 196E、 <i>Staph. aureus</i> MF159、 <i>Staph. aureus</i> Ms149 の混合培養をカスタード、チキンアラキング、ハムサラダ中で 5 日間、2 °F 間隔で 40 ~ 50 °F と 95 °F で培養した。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ カスタードではブドウ球菌が 44 °F 以上で生育した。</li> <li>・ サルモネラ属は 40 °F から 50 °F にかけて、ゆるやかな減少を経た。</li> <li>・ チキンアラキングでは、サルモネラ属もブドウ球菌も 44 °F 以上で生育した。</li> <li>・ ハムサラダでは 40 °F から 50 °F では、どちらの属の微生物も生育しなかった。</li> <li>・ 95 °F において 3 種すべての食品で両属ともに良好な生育を示した。</li> <li>・ この結果は腐敗しやすい食品におけるサルモネラ属とブドウ球菌の生育は、内部温度が 42 °F 以下の時、防がれている事を示している。</li> </ul>
文献書誌事項	Angelotti, R., M.J. Foter, and K.H. Lewis, 1961. Time-temperature Effects on Salmonellae and Staphylococci in Foods. American Journal of Public Health. 51: 76-88.

文献 ID : 32

論文タイトル	Low Temperature Growth of <i>Salmonella</i>
調査国	米国
対象動物	-
調査対象微生物	<i>Salmonella heidelberg</i> ATCC 8326、 <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 6994、 <i>Salmonella derby</i> ATCC 6966、 <i>Salmonella aertrycke</i> 、 <i>Salmonella montevideo</i> ATCC 8387、 <i>Salmonella newport</i> ATCC 6962、 <i>Salmonella thompson</i> ATCC 8391
処理工程	冷却冷蔵
調査目的	サルモネラ属が寒天上、培養液中で生育できる最低温度を決定すること。
試験条件 パラメーター等	下欄参照
検体名 サンプルサイズ 採集方法	ポリサーモスタットへの接種は 18 時間、Trypticase Soy broth で培養したものを、0.1%ペプトン水へ 660 mμ(原文表記通り) の透過率が 55%になるように加えることで標準化し、収量は 10 <sup>8</sup> cells/mL。温度勾配インキュベーターに、寒天に塗抹して 18 時間、Trypticase Soy broth で培養したものを入れた。温度勾配インキュベーターにおいて、斜光照明により目視で最低生育温度を確認した。
検査方法 増菌の有無 培地	サルモネラ属の計数は Trypticase Soy agar にポリサーモスタットの各チューブの適切な希釈液 0.1 または 0.01 mL を塗抹。室温 (22 ~ 23 ) で培養。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ <i>S. derby</i>、<i>S. heidelberg</i>、<i>S. typhimurium</i> は液体培地中で、1.1 ~ 12.3 の範囲で生存あるいは生育した。</li> <li>・ 19 日間培養した <i>S. heidelberg</i> の最低生育温度は 5.3 であった。</li> <li>・ 19 日間培養した <i>S. typhimurium</i>、<i>S. derby</i> の最低生育温度はそれぞれ、6.2 、 6.9 であった。</li> <li>・ この結果は、サルモネラを低温で長期間培養すると、生育温度がシフトすることを示している。この現象とサルモネラの低温生育可能性は、5 以上で長期間保存した食品において顕著であるかもしれない。</li> </ul>
文献書誌事項	Matches, J.R., and J. Liston. 1968. Low Temperature Growth of <i>Salmonella</i> . <i>Journal of Food Science</i> . 33: 641-645.

文献 ID : 34

論文タイトル	Minimum and Maximum Temperatures for Growth and Verotoxin Production by Hemorrhagic Strains of <i>Escherichia coli</i>
調査国	米国
対象動物	-
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i>
処理工程	冷却冷蔵
調査目的	O157:H7 型を含む一連の大腸菌株の最低生育温度、最高生育温度を決定すること。ベロ毒素生産に及ぼす温度の影響を決定すること。
試験条件 パラメーター等	初期菌数約 log <sub>10</sub> 3 CFU/mL になるようにペプトン水で適当に希釈し、37 で 18 時間、brain heart infusion 液体培地 (BHI) で培養した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	下記参照
検査方法 増菌の有無 培地	BHI が入った温度勾配 L 型チューブに生菌数 log <sub>10</sub> 3 CFU/mL 接種し、温度勾配インキュベーターにて 5 ~ 50 で振盪培養。チューブに濁りが目視で確認できたら、生菌数測定とベロ毒素の定量を行った。生菌数は tryptic soy agar にプレーティング、18 ~ 24 時間、28 で培養して決定した。最低生育温度は 250 mL フラスコに 100 mL の BHI を入れ、150 rpm で 15、12、10、8、5 で培養して決定した。途中で TSA にプレーティングすることで、生菌数を決定した。生育応答は温度と 3-log 単位で生菌数が増加したところで決定した。最高温度は 42 と 45 で BHI と EC 液体培地でダーラム管とともに培養して、培地の濁り (BHI と EC) とガス産生 (EC のみ) を観察した。 Vero-cell アッセイは、5% CO <sub>2</sub> 、37 で 18 ~ 24 時間培養した Vero 細胞とともに培養後、遠心、ろ過した上清を播き、72 時間後、細胞の生死を検討して、50% の Vero 細胞が死んでいれば、陽性毒素と判定した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 調査した全ての大腸菌株は少なくとも 10 ~ 45 で生育し、一部の株は 8 でも生育した。</li> <li>・ ベロ毒素生産は温度と時間の関数で、温度における生産された最も高い力価は、最も速い生育速度と最も高い生菌数を支持している。しかしながら、ベロ毒素産生株にとって、生育を支持するいかなる温度でも毒素生産が検出された。</li> <li>・ テストした 16 株のうち、3 株は 10 で 4 ~ 6 日目における生菌数が 1000 倍増加した。</li> <li>・ 調査した多くの大腸菌は約 10 でも容易に生育したことから、温度管理が不適切な冷蔵食品において生育する可能性が示唆される。</li> </ul>
文献書誌事項	Palumbo, Samuel A., Jeffrey E. Call, Frankie J. Schultz, and Aaron C. Williams. 1994. Minimum and Maximum Temperatures for Growth and Verotoxin Production by Hemorrhagic Strains of <i>Escherichia coli</i> . Journal of Food Protection. 58 (4) 352-356.

論文タイトル	The presence of <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> and <i>Campylobacter</i> in pig carcass dehairing equipment
調査国	カナダ
対象動物	ブタ
調査対象微生物	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i>
処理工程	湯はぎ
調査目的	脱毛装置が豚肉を汚染する中温性病原菌源であるかどうかを確定するために、脱毛装置と装置を通過した枝肉における <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> と <i>Campylobacter</i> の存在を検討した。
試験条件 パラメーター等	2つのプラントにおいて、デトリタス、タンクに戻ってきた水、タンクの中の水の各サンプルを、機器が稼働している間、3日おきに回収。デトリタスは約 50 g 回収。水サンプルは 100 mL 回収。 枝肉は 3 日おきにそれぞれのプラントで回収。腰部皮膚 100 cm <sup>2</sup> 以上を綿棒でこすってサンプリング。脱毛装置、研磨装置を通過した枝肉からサンプリング。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	それぞれのデトリタスサンプルを 10 g 量り、90 mL の 0.1(w/v)% ペプトン水が入ったストマッカーバッグに入れ、2 分間処理。それぞれのホモジネートを 10 倍段階希釈で 10 <sup>5</sup> 倍まで希釈した。水サンプルは 10 <sup>3</sup> 倍、綿棒バッグはストマッカーで 2 分間処理後、10 <sup>3</sup> 倍まで希釈した。
検査方法 増菌の有無 培地	それぞれのサンプル 0.1 mL を plate count agar に塗抹。25℃、2 日間培養。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<p><b>デトリタス</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>両プラントの機械由来のデトリタスの全菌数は <math>8 \times 10^7 \sim 9 \times 10^8</math> cfu/g、<i>E. coli</i> は <math>2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5</math> cfu/g、<i>Campylobacter</i> は <math>3 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6</math> cfu/g であった。<i>Salmonella</i> は約 50% のサンプルで検出され、プラント A では <math>3 \times 10^3 \sim 4 \times 10^5</math> cfu/g、プラント B では <math>1 \times 10^2</math> cfu/g であった。</li> </ul> <p><b>水</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>プラント A で連続使用されている 2 つの機械の中の水温は 50℃ 未満であった。これらの水中の総菌数、<i>E. coli</i>、<i>Campylobacter</i> の数はそれぞれ、<math>2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6</math> cfu/mL、<math>6 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3</math> cfu/mL、<math>5 \times 10 \sim 8 \times 10^2</math> cfu/mL であった。</li> <li>プラント B の機械の水温は 57℃ であった。この水中の総菌数、<i>E. coli</i>、<i>Campylobacter</i> の数はそれぞれ、<math>1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5</math> cfu/mL、<math>1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3</math> cfu/mL、<math>1 \times 10 \sim 5 \times 10^2</math> cfu/mL であった。</li> <li><i>Salmonella</i> は両プラントの水サンプルの約 50% で回収され、プラント A では <math>1 \times 10 \sim 6 \times 10^2</math> cfu/mL、プラント B では <math>1 \times 10</math> cfu/mL であった。</li> </ul> <p><b>枝肉</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>プラント A での二次脱毛機を通過した枝肉の総菌数、<i>E. coli</i>、<i>Campylobacter</i> の数はそれぞれ <math>2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3</math> cfu/cm<sup>2</sup>、<math>9 \times 10 \sim 9 \times 10^2</math> cfu/cm<sup>2</sup>、<math>3 \sim 7 \times 10</math> cfu/cm<sup>2</sup> であった。</li> <li>プラント B で回収された数は同様に、<math>1 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4</math> cfu/cm<sup>2</sup>、<math>4 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3</math> cfu/cm<sup>2</sup>、<math>1 \sim 4</math> cfu/cm<sup>2</sup> であった。焼毛研磨後の枝肉から回収された数は、プラント A では <math>1 \times 10^3</math> cfu/cm<sup>2</sup>、プラント B では <math>4 \times 10^4</math> cfu/cm<sup>2</sup> であった。</li> <li><i>E. coli</i> はプラント A での研磨枝肉は <math>1 \sim 2</math> cfu/cm<sup>2</sup> であったが、プラント B では <math>6 \sim 3 \times 10</math> cfu/cm<sup>2</sup> であった。両プラントの研磨枝肉の <i>Campylobacter</i> は <math>1 \sim 6</math> cfu/cm<sup>2</sup> であった。</li> <li>どちらのプラントの枝肉からも <i>Salmonella</i> は検出されなかった（検出限界 1cfu/cm<sup>2</sup>）。</li> </ul> <p>大規模なと畜場における脱毛装置は、豚肉を汚染している中温性腸管病原菌</p>

	の源であると考えられる。
文献書誌事項	Gill, C.O., and J. Bryant. 1993. The presence of <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> and <i>Campylobacter</i> in pig carcass dehairing equipment. Food Microbiology 10 (4) 337-344



文献 ID : 36

論文タイトル	Studies on <i>Salmonella</i> in slaughter-houses
調査国	オランダ
対象動物	ブタ
調査対象微生物	<i>Salmonella</i>
処理工程	湯はぎ
調査目的	本論文は、4つの研究結果の総括である。本個票では(1)を取り上げた。 (1)いわゆる「ブタ屠殺ライン」におけるサルモネラの存在を検討した。(2)脱毛オープン通過前後のブタのサルモネラについて、及び実験的に感染が誘導されるか検討した。(3)外気温がサルモネラによるブタ皮膚への感染への影響を及ぼすかどうか、夏季と冬季で調査を行った。(4)サルモネラは腸間膜リンパ節に存在し、糞より分離された。どこまでこの状況が変わるかどうか。
試験条件 パラメーター等	約 62 の湯桶に入れて、スクレイピング機またはハンドスクレイピングで処理。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	<ul style="list-style-type: none"> <li>湯桶の残り湯</li> <li>スクレイピング機の削り屑、使用したハンドスクレイピングの削り屑、クリーニングしたスクレイピング機/ハンドスクレイピング</li> <li>ブタの皮膚の屑（焼毛前後の耳の後ろ、側表面、鼠径湾曲部）</li> </ul>
検査方法 増菌の有無 培地	サンプリング 4～12 時間後に、MULLER-KAUFFMANN 法を用いてブリリアントグリーンとウシ胆汁を加えたテトラチオネート液体培地で濃縮した。ブリリアントグリーン-フェノールレッド寒天プレートに塗抹、最初は 18～22 時間培養、2 回目は 64～72 時間培養。37 で 18～24 時間培養後、必要であれば、コロニーを triple sugar iron 寒天培地で培養し、生化学的、血清学的に分析した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>ハンドスクレイパーまたはスクレイピング機から得たサンプルには 17.5%でサルモネラが検出された。</li> <li>スクレイピング機をクリーニングした場合でも、サルモネラはサンプルの 9.2%から分離された。</li> <li>湯桶の残り湯のサンプルでは 15%がサルモネラ陽性であった。</li> <li>湯桶の残り湯の分析結果より、水温が 62 に維持されていたにもかかわらず、すべてのサルモネラが殺菌されないことがわかった。</li> <li>ハンドスクレイピングよりもスクレイピング機のサンプルの方が、サルモネラが多く残存していた。</li> <li>焼毛 (singeing) の効果は、皮膚の汚染率を 16%から 10.8%に減らしたただけであった。</li> </ul>
文献書誌事項	Kampelmacher, E.H., P.A.M. Guinee, K. Hofstra, and A. Van Keulen. 1961. Studies on <i>Salmonella</i> in slaughter-houses. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe. 8:1025-1042.

文献 ID : 37(J29)

論文タイトル	と畜場におけるデハイダーの汚染状況調査と消毒法の検討
調査国	日本(広島)
対象動物	ウシ
調査対象微生物	一般細菌
処理工程	剥皮(器材消毒)
調査目的	構造が複雑で枝肉の広範囲に接触するデハイダー(動力付はく皮ナイフ)の汚染状況を調査し消毒法を検討する。
試験条件 パラメーター等	(1) - (2)デハイダー外部の消毒法の検討:各温度(83、85、90)と時間(1秒、2秒、3秒)温湯消毒(刃を回転させて消毒) (3)デハイダー内部の消毒法の検討:85 温湯消毒(15秒~5分)(刃は静止状態)
検体名 サンプルサイズ 採集方法	(1)はく皮直後に枝肉の拭き取り検査を実施。 (2)はく皮作業時(作業前、作業直後、85 1秒温湯消毒後、7秒温湯消毒後)にデハイダー片面(約50cm <sup>2</sup> )の拭き取りを行い、片面当たりの一般細菌数を測定。 (3)作業終了後のデハイダーを分解し、2枚の刃が重なっている面(約50cm <sup>2</sup> )の拭き取りを行い、片面当たりの一般細菌数を測定。
検査方法 増菌の有無 培地	(1)デハイダーが接触する肩部及び未接触の腰部を100cm <sup>2</sup> 拭き取り、定法により1cm <sup>2</sup> 当たりの一般細菌数を測定。 (2)牛脂肪:PBSを1:2の割合でミキサーにかけた試験液(一般細菌数5×10 <sup>6</sup> CFU/mLに調整)2mLを脱脂綿でデハイダー片面に塗布し、各温度(83、85、90)と時間(1秒、2秒、3秒)ごとの温湯消毒後にデハイダー片面の拭き取りを行い、片面当たりの一般細菌数を測定。 (3)85 温湯消毒(15秒~5分)後に2枚の刃が重なっている面を内側、反対の面を外側として拭き取りを行い、片面当たりの一般細菌数を測定。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	(1)全ての枝肉でデハイダーの接触する肩部から一般細菌が検出され(0.2~9.5CFU/cm <sup>2</sup> )、未接触の腰部からは検出されなかった。 (2)デハイダー外部の片面当たり、作業直後1.7×10 <sup>2</sup> ~3.9×10 <sup>3</sup> CFU、85 1秒温湯消毒後5.0×10 <sup>1</sup> ~1.9×10 <sup>3</sup> CFU、7秒温湯消毒後で0~9.9×10 <sup>1</sup> CFUの一般細菌が検出された。 デハイダーの消毒温度と時間を検討した結果、温度に関わらず1秒及び2秒の温湯消毒後は片面当たり1.5×10 <sup>2</sup> ~6.2×10 <sup>2</sup> CFUの一般細菌が検出されたが、3秒の温湯消毒後は2.2×10 <sup>1</sup> ~4.4×10 <sup>2</sup> CFUまで減少した。 (3)作業終了後のデハイダー内部からは片面当たり4.8×10 <sup>4</sup> ~1.3×10 <sup>6</sup> CFU、高圧洗浄後では2.6×10 <sup>2</sup> ~1.3×10 <sup>4</sup> CFUの一般細菌が検出された。 デハイダー内部の消毒時間を調査した結果、15秒及び30秒の温湯消毒後は片面当たり4.5×10 <sup>0</sup> ~3.5×10 <sup>1</sup> CFUの一般細菌が検出されたが、85 1分以上の温湯消毒後は一般細菌が検出されなかった。
文献書誌事項	森中重雄 他 『と畜場におけるデハイダーの汚染状況調査と消毒法の検討』 広島県獣医学会雑誌, (28), p.109-112 (2013)

文献 ID : 38(J57)

論文タイトル	と畜場における塩素洗浄の効果について
調査国	日本（北海道）
対象動物	ウシ
調査対象微生物	STEC O157、サルモネラ、リステリア、一般生菌数、大腸菌数、大腸菌群数、黄色ブドウ球菌数
処理工程	枝肉洗浄
調査目的	塩素洗浄が STEC O157、サルモネラ、リステリア、一般生菌数等に与える影響について明らかにする。
試験条件 パラメーター等	と畜場 A、B、C：塩素濃度 100 ppm の塩素水（B：カンファ水使用） と畜場 D：塩素濃度 50～60 ppm の塩素水 と畜場 N：水洗浄のみ
検体名 サンプルサイズ 採集方法	最初に、塩素洗浄前の左側枝肉体表側胸部に対し 10×10 cm <sup>2</sup> の拭き取り枠をあて、滅菌生理食塩水を含ませたブースと滅菌ピンセットを用いて拭き取りを行った。これを同一の枝肉に対し、拭き取る箇所をずらしながら 4 回行い、ブースはその都度新しいものを用いた。これら 4 個のブースを洗浄前サンプルとした。次に、塩素洗浄後に冷蔵庫に搬入された同一個体の右側枝肉体表側胸部に対して、同様に拭き取りを行い洗浄後サンプルとした。
検査方法 増菌の有無 培地	STEC O157：ブースを 20 mL の mEC プイヨン培地で 42 24 時間培養した後、シングルパス O157 を用いて判定した。さらに mEC 増菌液に対し、PCR 法、及び磁気ビーズ法も実施した。 サルモネラ：ブースを 20 mL のバッファード・ペプトン水で 37 24 時間培養した後、その増菌液 0.5 mL を 10 mL のテトラチオネート培地に、0.1 mL を 10 mL のラパポート・バシリアディス培地にそれぞれ加え、42 24 時間培養した。それぞれの培養液を DHL 寒天培地及びクロモアガーサルモネラに画線塗抹し、37 24 時間培養した。 リステリア：ブースを 20 mL のハーフ・フレイザー培地で 30 24 時間培養した後、その増菌液 0.1 mL を 10 mL のフレイザー培地に加え、30 24 時間培養した。その増菌液をクロモアガーリステリアに画線塗抹し、37 24 時間培養した。 黄色ブドウ球菌：ブースを 20 mL の 7.5% NaCl 加トリプトソイブイヨン培地で 37 48 時間培養した後、その増菌液を卵黄加マンニット食塩培地と X-SA 培地に画線塗抹し、それぞれ 37 48 時間、37 24 時間培養した。 一般生菌数及び大腸菌数、大腸菌群数：ストマッカー袋にブースと 100 mL の 0.1% ペプトン加生理食塩水を加え、1 分間ストマッキングして試験液とした。これを食品衛生検査指針に基づいて検査した。なお、大腸菌数、大腸菌群数の測定にはトリコロール寒天培地を用いた。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 洗浄前サンプルと洗浄後サンプルの STEC O157、サルモネラ、リステリア、黄色ブドウ球菌は、検出されなかった。したがって、塩素洗浄による評価はできなかった。</li> <li>・ 一般生菌数については、と畜場 A、B、C、N の洗浄後サンプルで洗浄前サンプルの 1.00～1.98 倍の値を示した（すなわち、ほとんど変化していない）。と畜場 D のみで、洗浄処理により一般生菌数が 3/100 に減少（181.6 5.7cfu/cm<sup>2</sup>）していることが認められた。</li> </ul>
文献書誌事項	池田徹也 他 『と畜場における塩素洗浄の効果について』 北海道立衛生研究所報, (59), p.63-65 (2009)

文献 ID : 39(J87)

論文タイトル	豚枝肉における体表由来汚染のインク着色による検討
調査国	日本(岩手)
対象動物	ブタ
調査対象微生物	生菌数
処理工程	全行程
調査目的	豚のと体表面に検印用インクを噴霧して着色し、このと体を用いて解体処理を行い、その工程中でインクがどのように枝肉へ付着するかを調査する。インク付着部と非付着部の細菌汚染を調べ、豚の体表汚染が枝肉を汚染する実態を明らかにする。
試験条件 パラメーター等	-
検体名 サンプルサイズ 採集方法	(1)洗浄後の 2 頭のと体を用い、体表面の水分を十分に拭き取り、検印用インクをと体全面に噴霧して着色した。 (2)インクを噴霧しない豚 10 頭を解体処理し、最終洗浄後、インク検証における枝肉のインク付着部および非付着部のそれぞれ 2 つの部位 (n = 10) について、おのおの 10×10 cm (100 cm <sup>2</sup> ) を滅菌ブースで拭き取った。 (3)工程改善前の通常豚 5 頭を用いた全剥皮直後の枝肉左右胸部 (n = 5) の細菌数および改善後の通常豚 15 頭を用いた全剥皮直後の枝肉右胸部 (n = 15) の細菌数を調べた。
検査方法 増菌の有無 培地	(1)インク着色と体を通常の作業工程(後肢の一部剥皮、肛門抜き、胸腹部切開、前肢の一部剥皮、頭部切除、内蔵摘出、臀部の一部剥皮、胸腹部の一部剥皮および全剥皮)で解体処理し、枝肉へのインク付着(汚染部位)を肉眼的に観察した。 (2)ペトリフィルム AC プレートを用いて細菌数を測定した。 (3)改善策を講じ、1 頭のと体を用いたインク検証による枝肉へのインク付着状況を前述の方法で調べた。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	(1)インク検証における解体処理工程での枝肉へのインク付着の主な原因と付着部位は、一部剥皮工程での最初の切皮(第 1 刀目)部位(大腿部および胸腹部正中線)および肛門抜き工程での肛門周囲部において明瞭に認められた。また、懸垂されたと体上部からインクが流れ、一部剥皮後の前肢内側にインク付着が認められた。さらに、縦型スキナーによる全剥皮工程において、枝肉の右胸腹部、右前肢外側および右頸部の広範囲にインク付着がみられた。この原因として、剥皮時、スキナーの上部排出口からドラム洗浄水が流出し、これにより、と体背部の体表を洗い流した汚染洗浄水が、剥皮終了時の枝肉の右側部を汚染することが明らかになった。 (2)インク検証において明らかになったインク付着部と非付着部の細菌汚染状況は、インク付着部(前肢および右胸部)の細菌数はすべて 10 <sup>2</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以上であったのに対し、非付着部(背部および左胸部)はすべて 10 <sup>2</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 未満であり、両者には有意な差 (P < 0.01) が認められた。 (3)インク検証において、縦型スキナーによる全剥皮工程での枝肉汚染が著しいことから、その改善策として、スキナーのドラム上部および側面の 2 カ所にあるドラム洗浄水の排出口のうち上部を停止し、インク検証を行った結果、停止前では、枝肉右側部の広範囲にインク付着がみられたが、停止後では、インク付着は大きく減少した。また、停止前に通常豚を用いて全剥皮直後の枝肉左右胸部の細菌数を調べた結果、左胸部はすべて 10 <sup>3</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 未満であり、右胸部はすべて 10 <sup>3</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以上で、両者には有意な差 (P < 0.01) が認められた。しかし、停止後では、右胸部の細菌数はすべて 10 <sup>3</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 未満となり、停止前の同部位と比べ汚染は大きく低下し、両者には有意な差 (P < 0.01) が認められた。
文献書誌事項	齊藤伸明 他 『豚枝肉における体表由来汚染のインク着色による検討』 日本獣医師会雑誌, 60(10), p.738-741 (2007)

文献 ID : 40(J122)

論文タイトル	牛解体処理施設における自主衛生管理の検証について
調査国	日本（北海道）
対象動物	ウシ
調査対象微生物	一般生菌、大腸菌、大腸菌群
処理工程	全行程
調査目的	省令改正前と改正後における各処理工程ごとの衛生管理および処理作業について科学的な検証を行う。
試験条件 パラメーター等	-
検体名 サンプルサイズ 採集方法	(1)牛解体作業工程の中で剥皮作業はすべて手作業で行われ、剥皮機（ダウンもしくはアッププラー）は使用していない。作業従事者の手指、器具（ナイフ・デハイダー「エアークナイフ」）および、各剥皮工程直後における枝肉の各部を滅菌ブースで拭き取り、1 cm <sup>2</sup> 当たりの一般生菌・大腸菌および大腸菌群を算出した。その結果をもとに改善策を検討し、改善措置を再度検証した。 (2)省令改正前・省令改正後および上記の改善措置後における、牛の最終枝肉（洗浄後、冷蔵庫内で1時間冷却後）の肛門周囲および胸部をおのおの100 cm <sup>2</sup> 滅菌ブースで拭き取り、1 cm <sup>2</sup> 当たりの一般生菌および腸管出血性大腸菌 O157 の検査成績を日常の衛生管理の指標とした。
検査方法 増菌の有無 培地	一般生菌：標準寒天培地、大腸菌・大腸菌群：トリコロール、腸管出血性大腸菌 O157：mTSB-Broth with Novobiocin で増菌後、Singlepath <sup>®</sup> O157 キットにて判定
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	(1) 各解体作業直後に手指の拭き取りをした結果(A)、内蔵摘出担当者を除き、外皮に接触する作業従事者の手指は、放血直後の牛と体と同様に高い菌数を検出した。また、大腸菌群も8人中4人と高率に検出した。 <b>温湯のみで手指を洗浄した結果</b> (B)、(A)と比較すると、全体の平均で1 オーダー低い値を示した。省令に基づき <b>洗浄消毒液を使用した結果</b> (C)、(B)と比較すると、一般生菌は平均値では高い値であったが、最小値0があること、中央値も低いことから、正しい使用をすることで、ある程度効果があることを検証した。改善措置後、再度検証した結果、大腸菌および大腸菌群はすべて陰性で、8人中4人の手指で確実に消毒できるまでになった。各解体作業直後に器具の拭き取りをした結果、手指と同じく、牛と体と同様に高い菌数を示し、大腸菌群も8人中3人の器具から検出した。省令に基づき83以上の温湯で器具を消毒した結果、ナイフでは平均値 $4.4 \times 10^1$ と概ね消毒されたが、デハイダーでは平均値 $7.1 \times 10^3$ と消毒効果が低いことを検証した。デハイダーを作動させ、刃の付け根も消毒した結果、ナイフでは大腸菌、大腸菌群ともにすべて検出しなかったが、デハイダーでは一部大腸菌群を検出する箇所があった。改善措置後、再度検証した結果、ナイフ・デハイダーすべてにおいて $10^1$ オーダーになった。各剥皮工程直後に枝肉の各部位を拭き取りした結果、胸部腹部は検査の都度、担当従事者と原因を追及し丁寧な作業を実施したが効果が得られなかった。 <b>と殺後吊り上げる前に、正中線付近を丁寧に洗浄し</b> 再度検証した結果、3頭同時に検査した平均は $10^1$ 台と理想的な数値にまで減少した。改善措置後、再度検証した結果、2回検証した枝肉の一般生菌は平均値 $6.2 \times 10^1$ と、どの部位においても概ね安定した結果が得られた。 (2)一般生菌数を対数変換した結果、施行前の $2.91 \pm 0.49 \text{CFU/cm}^2$ から、施行後 $2.65 \pm 0.69 \text{CFU/cm}^2$ へと有意に減少した ( $P < 0.01$ )。さらに施行後と改善措置が終了してからを同様に検定したが、有意差は認めなかった。しかし幾何生菌数平均では $4.5 \times 10^2$ から $2.3 \times 10^2$ に、最大値、最小値および中央値においても減少した。また、腸管出血性大腸菌 O157 は調査期間中検出されなかった。
文献書誌事項	斉藤聡 他 『牛解体処理施設における自主衛生管理の検証について』 食品衛生研究, 52(5), p.77-86 (2002)

文献 ID : 41(J134)

論文タイトル	食肉処理センターにおける大動物処理工程改善による効果
調査国	日本（北海道）
対象動物	ウシ
調査対象微生物	生菌数、大腸菌数
処理工程	剥皮
調査目的	と畜場における衛生管理のモニタリングとして、肉眼的指標である枝肉総合評価ならびに、微生物検査による枝肉の生菌数および大腸菌数を指標として大動物処理工程を見直し、剥皮法を一部改善するとともに、改善効果が認められるかどうかを検討する。
試験条件 パラメーター等	剥皮法の改善：改善前は前肢および胸部剥皮は、放血 と体吊り上げ 食道結紮後に行っていたが、一部改善し、前処理での前肢・胸部の剥皮を廃止し、前肢は皮に切れ目を入れるだけに、乳房切除は胸部剥皮前とし、全剥皮の直前に胸部・腹部の正中線に切れ目を入れ、エアークナイフによる最小限剥皮後、ダウンプラー（縦型剥皮器）にて尾から頭部までを一気に剥皮することにした。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	各モニタリングの頻度は、枝肉総合評価では毎日3頭を行った。生菌数は概ね毎週3頭を行い、改善前125頭および改善後84頭、また大腸菌数は改善前には概ね2週間に1頭を行い28頭、改善後に概ね毎週3頭を行い82頭を検体とした。
検査方法 増菌の有無 培地	改善効果の評価法：枝肉総合評価（汚染度指数） と殺・解体後における牛枝肉の獣毛・腸管内容物による汚染箇所を肉眼的に数え、それを段階的に点数とした。汚染箇所数を0、1～5、6～10、11～15、16～20、21以上と6段階に分け、各々の該当頭数を計算式に代入し算出した。また、枝肉総合評価点は低いほど枝肉の汚染度が低いと評価した。 生菌数 最終洗浄後、冷蔵庫内で約1時間冷却乾燥した後、胸部・肛門周囲をそれぞれ拭き取り棒を用い滅菌したプースで100 cm <sup>2</sup> （10 cm×10 cm）拭き取り、2カ所をまとめて1検体とした。各検体にそれぞれ200 mLの滅菌生理食塩水を加えストマッカー処理したものを試料原液とした。さらにそれを段階希釈し、標準寒天培地で混釈培養後（35、48±2時間）、1 cm <sup>2</sup> 当たりのコロニー数を算出した。 大腸菌数 生菌数と同様の方法で拭き取りし、1 cm <sup>2</sup> 当たりのコロニー数を算出した。培地はペトリフィルムを用いた。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	枝肉総合評価：剥皮法改善前は9.0±4.3点で、月によりバラツキがみられたが、改善後は3.1±0.6点になり有意に向上し（ $P < 0.001$ ）、月によるバラツキもほとんど認められなくなった。 生菌数：年度平均は改善前3.7±3.9CFU/cm <sup>2</sup> から改善後2.0±2.3CFU/cm <sup>2</sup> （ともに対数変換後）へと有意に減少した（ $P < 0.001$ ）。さらに改善前後の生菌数をオーダー別で比較すると、改善前は10 <sup>2</sup> オーダーに最も集中していたが、改善後は10 <sup>1</sup> オーダーが最も多くなった。 大腸菌数：改善前は28検体中8検体で検出され、検出率28.6%と高かったが、改善後は82検体中3検体で、検出率は0.04%に下がり、全検体中の大腸菌数平均も3.0±7.9CFU/cm <sup>2</sup> から0.05±0.26CFU/cm <sup>2</sup> へと有意に減少した（ $P < 0.05$ ）。
文献書誌事項	尾金宰 他 『食肉処理センターにおける大動物処理工程改善による効果』 日本獣医師会雑誌, 53(3), p.159-162 (2000)

文献 ID : 42(J135)

論文タイトル	と畜場における衛生的な食肉（枝肉）生産に及ぼす豚体表の微生物汚染
調査国	日本
対象動物	ブタ
調査対象微生物	生菌数、大腸菌群数
処理工程	消毒・殺菌
調査目的	豚のと殺・解体処理において体表汚染が枝肉に及ぼす影響を、と殺・放血、洗淨後解体処理を行った時（通常処理）と、と殺・放血、洗淨後、体表を各種有機酸または電解水で、各々消毒・殺菌して解体処理した時（衛生的処理）の、枝肉の微生物汚染状況を比較検討する。
試験条件 パラメーター等	以下を用いて 1 分間消毒。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 0.3%フマル酸：消毒後採取した拭き取り材料は、直ちに 0.1 N NaOH で pH を 6.8 ~ 7.0 に中和。</li> <li>・ 2.0%酢酸：採取材料は 0.1 N NaOH で pH を調整。</li> <li>・ 電解水：森永乳業 K.K.製の電解除菌水製造ユニット「ピュアスター」で製した電解機能水（pH 6.3、有効塩素系濃度 11 ppm）。</li> </ul>
検体名 サンプルサイズ 採集方法	胸部および背部を対象とし、ガーゼタンポン（または綿タンポン）でトルクピンセットを用い、300 g 以上の圧力で、一定の方法（10×10 cm の面積を縦横各々 10 回以上拭き取り）により拭き取りを行った。
検査方法 増菌の有無 培地	各拭き取り材料（タンポン）に滅菌リン酸緩衝液（または生理食塩水）100 mL を加え、ストマッカー処理したものを試料原液とし、生菌数（30 ~ 32、48±3 時間培養）および大腸菌群数を検査した。また、成績は 1 cm <sup>2</sup> 当たりの菌数（cfu/cm <sup>2</sup> ）で表した。なお、各薬剤で消毒・殺菌した後の拭き取りタンポンは、薬剤効力を停止するため試料採取後直ちに pH 中和剤を添加した希釈液 100 mL に投入した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	と殺・放血、洗淨後、A：0.3%フマル酸、B：2.0%酢酸、C：電解水グループと陰性対照グループ D：未消毒・殺菌別に、生菌数および大腸菌群汚染を調べた。 <b>胸部の汚染</b> <b>と殺・放血、洗淨後</b> では、いずれのグループも体表（胸部）の汚染はほとんど同程度であり、生菌数 10 <sup>2</sup> ~ 10 <sup>6</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以下、大腸菌群 10 <sup>2</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以下（検出されないものもある）であった。次に、体表を消毒・殺菌した 1 分間後では、A、B では、生菌数は 10 <sup>3</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以下となり、大腸菌群もほとんど検出されなかった。しかし C では、生菌数は 10 <sup>1</sup> オーダー程度の減少しかみられず、大腸菌群もほとんど減少しなかった。また D では、汚染はまったく変わらなかった。 <b>全剥皮後</b> では、A、B では、消毒・殺菌後の汚染より増加の傾向がみられ、生菌数 10 <sup>2</sup> ~ 10 <sup>4</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以下、大腸菌群 10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>2</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以下を示すものが増加した。これに対し C、D では全剥皮することにより生菌数は減少した。 <b>処理工程の最終枝肉汚染</b> については、A、B では C、D に比べ、生菌数は 10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>2</sup> オーダー少なく、大腸菌群汚染も明らかに少ないことが認められた。 <b>背部の汚染</b> <b>と殺・放血、洗淨後</b> では、いずれの体表（背部）も胸部の汚染とほとんど同程度で、生菌数 10 <sup>2</sup> ~ 10 <sup>6</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以下、大腸菌群 10 <sup>3</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以下（検出されないものもある）であった。次に、体表を消毒・殺菌した後、1 分間放置後でも、胸部の汚染と同程度であり、A、B では生菌数 10 <sup>3</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以下、大腸菌群はほとんど検出されなかった。他方、C では、生菌数は 10 <sup>1</sup> オーダー程度の減少で、大腸菌群汚染も著大な減少はみられなかった。さらに <b>全剥皮後</b> では、A、B では 10 <sup>2</sup> ~ 10 <sup>4</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以下、大腸菌群も 10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>2</sup> cfu/cm <sup>2</sup> 以下であった。D では、生菌数は全剥皮により体表の汚染より減少した。 <b>処理工程の最終枝肉（背部）</b> では、枝肉胸部の汚染とほとんど同じであり、フマル酸、および酢酸処理グループは、電解水および未消毒・殺菌グループに比べ、生菌数は 10 <sup>1</sup> ~ 10 <sup>2</sup> オーダー程度少なく、大腸菌群も検出されないものがあった。
文献書誌事項	品川邦汎 他 『と畜場における衛生的な食肉（枝肉）生産に及ぼす豚体表の微生物汚染』 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 17, p.332-336 (1999)

文献 ID : 43(J138)

論文タイトル	作業用手袋を介してのと畜場枝肉の汚染
調査国	日本(埼玉)
対象動物	ウシ
調査対象微生物	一般生菌数
処理工程	-
調査目的	軍手の汚染菌がどの程度枝肉に移行するか調査する。
試験条件 パラメーター等	背割り後、最終洗浄した牛枝肉の胸側部表面に、約 15×20 cm <sup>2</sup> 大の開孔部を 2 カ所隣接して設けたビニールシートを張り付け、拭き取り部位 A、B とした。作業員は軍手、ステンレスワイヤ手袋あるいは塩化ビニール製手袋の着用ならびに素手の 4 種の仕様で、枝肉の A の部位を押えて枝肉を冷蔵庫内へ移送した。各々の仕様につき、3 頭の枝肉の左右のどちらか一方を用いた。枝肉の移送距離は約 14 m、移送時間は約 50 秒であった。なお、最終洗浄後に部位 A を拭き取った後の枝肉は、冷蔵庫内に移送されるまでに 20～50 分間、と室内に放置された。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	各部位の拭き取りは、10×10 cm <sup>2</sup> 大のガーゼで作製したタンポンを用い、10×10 cm <sup>2</sup> を拭き取った：最終洗浄後の A、作業員が A に手を添えて懸吊された枝肉を冷蔵庫内へ移送した後の A、冷蔵庫内へ移送した後の B、冷蔵庫内へ移送した後の作業員の手指。手袋などを使用した場合には、これらを滅菌プラスチックバッグに採取して実験室に持ち帰り、塩化ビニール手袋については五指を含む手掌面をタンポンで拭き取った。また、軍手とステンレスワイヤ手袋については指先 1 g を切り取って試料とした。
検査方法 増菌の有無 培地	一般生菌数の測定は、タンポンあるいは手袋の指先 1 g を 10 mL の滅菌生理食塩水中に振り出し、これを試料原液として 10 倍段階希釈液を作製し、各々 1 mL を生菌数測定用標準寒天培地と混釈した。35℃ で 48±2 時間培養後、菌数を測定した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	軍手着用での移送前後の枝肉表面の生菌数はそれぞれ、 $2.7 \times 10^2 \sim 7.7 \times 10^4$ cfu/cm <sup>2</sup> 、 $6.7 \times 10^3 \sim 5.2 \times 10^4$ cfu/cm <sup>2</sup> であった。これらに対数変換して得た平均はそれぞれ $1.64 \pm 0.26$ cfu/cm <sup>2</sup> 、 $4.38 \pm 0.26$ cfu/cm <sup>2</sup> であり、軍手接触移送後の生菌数は移送前の生菌数より有意に多かった (P < 0.01)。また、軍手の生菌数は $3.3 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^6$ cfu/g で、平均は $5.89 \pm 0.26$ cfu/g であった。 ステンレスワイヤ手袋着用での移送前後の枝肉表面の生菌数はそれぞれ、 $3.8 \times 10^2 \sim 1.5 \times 10^3$ cfu/cm <sup>2</sup> 、 $2.0 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5$ cfu/cm <sup>2</sup> で、平均は $2.27 \pm 0.37$ cfu/cm <sup>2</sup> および $4.68 \pm 0.37$ cfu/cm <sup>2</sup> であり、ステンレスワイヤ手袋接触移送後の生菌数は移送前のそれより有意に多かった (P < 0.01)。ステンレスワイヤ手袋の生菌数は $6.5 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^6$ cfu/g で、平均は $5.55 \pm 0.37$ cfu/g であった。 塩化ビニール手袋着用での移送前後の枝肉表面の生菌数はそれぞれ、 $1.0 \times 10^2 \sim 6.5 \times 10^2$ cfu/cm <sup>2</sup> 、 $2.3 \times 10^3 \sim 5.4 \times 10^3$ cfu/cm <sup>2</sup> で、平均は $2.50 \pm 0.16$ cfu/cm <sup>2</sup> および $3.52 \pm 0.16$ cfu/cm <sup>2</sup> であり、塩化ビニール手袋接触移送後の生菌数は移送前より有意に多かった (P < 0.01)。塩化ビニール手袋の生菌数は $1.5 \times 10^3 \sim 4.2 \times 10^3$ cfu/cm <sup>2</sup> 、平均は $3.43 \pm 0.16$ cfu/cm <sup>2</sup> であった。 素手で移送した場合、移送前後の枝肉表面の生菌数はそれぞれ、 $1.8 \times 10^2 \sim 4.0 \times 10^2$ cfu/cm <sup>2</sup> 、 $2.1 \times 10^2 \sim 1.2 \times 10^2$ cfu/cm <sup>2</sup> で、平均は $1.72 \pm 0.38$ cfu/cm <sup>2</sup> および $1.62 \pm 0.38$ cfu/cm <sup>2</sup> であった。また、作業員手指の生菌数は $1.1 \times 10^0 \sim 3.0 \times 10^1$ cfu/cm <sup>2</sup> で、平均は $0.74 \pm 0.38$ cfu/cm <sup>2</sup> であった。これら相互間に有意差は認められなかった。 枝肉移送中、作業員がまったく触れなかった部位 B の移送後の生菌数は、最終洗浄後に拭き取った部位 A のそれより、やや多い傾向をうかがわれたが、いずれの仕様の場合も、両者の間に有意差は認められなかった。
文献書誌事項	板屋民子 他 『作業用手袋を介してのと畜場枝肉の汚染』日本獣医師会雑誌, 52(1), p.37-40 (1999)



文献 ID : 44(J140)

論文タイトル	剥ぎ上げ方式縦型スキナー使用時の豚枝肉汚染
調査国	日本（北海道）
対象動物	ブタ
調査対象微生物	生菌数、大腸菌群数
処理工程	消毒洗浄
調査目的	剥ぎ上げ方式縦型スキナーを使用した解体処理における豚枝肉の微生物汚染状況と豚毛付着状況を調査する。
試験条件 パラメーター等	改善内容：ナイフ、デハイダー、枝肉をつるすフックおよび胸割りノコを解体処理 1 頭ごとに 83 以上の温湯で洗浄消毒し、さらにと体および枝肉同士の接触を防止した。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	剥皮部位別に、細菌検査と豚毛付着調査を実施した。実態調査は、と殺開始後 1 頭目、101 頭目、201 頭目、301 頭目および 401 頭目の 5 頭の調査を 6 日間、計 30 頭について行った。この実態調査の結果に基づいて、と殺解体工程の実験的改善策を実施し、改善後調査をと殺開始後 1 頭目から 4 頭目または 5 頭目までの調査を 5 日間、計 24 頭について調査した。
検査方法 増菌の有無 培地	(1)拭き取り部位は、剥ぎ上げ方式縦型スキナーで剥皮した左背部（縦型スキナー剥皮部位）、デハイダーで剥皮した左肩部（デハイダー剥皮部位）およびナイフで剥皮した左前肢外側（ナイフ剥皮部位）の 3 カ所とし、それぞれを剥皮直後（剥皮直後枝肉）および解体が終了し冷蔵庫へ搬入された直後（最終枝肉）に拭き取った。縦型スキナー剥皮部位とデハイダー剥皮部位については滅菌プースを用いて $10 \times 10 \text{ cm}^2$ を拭き取り、滅菌生理食塩水 50 mL を加え 30 秒間ストマッカー処理して試料原液とし、 $1 \text{ cm}^2$ 当たりの菌数を求めた。また、ナイフ剥皮部位については $5 \times 5 \text{ cm}^2$ を拭き取り、滅菌生理食塩水 25 mL を加えて 30 秒間ストマッカー処理して試料原液とし、 $1 \text{ cm}^2$ 当たりの菌数を求めた。生菌数については、標準寒天培地を用いて混釈平板法により $30 \sim 32$ 、 $48 \pm 3$ 時間培養後、集落数を計測した。大腸菌群数は、デゾキシコレート培地を用いて $35$ 、 $20 \pm 2$ 時間培養後、定型的集落を計測して求めた。 $1 \text{ cm}^2$ 当たりの菌数は $< 1$ （不検出）、 $1 \sim < 10^1$ 、 $10^1 \sim < 10^2$ 、 $10^2 \sim < 10^3$ 、 $10^3 \sim < 10^4$ 、 $10^4 \sim < 10^5$ 、 $10^5 \sim < 10^6$ と区分表示した。 (2)最終枝肉において、剥ぎ上げ方式縦型スキナーで剥皮した全部位、デハイダーで剥皮した全部位およびナイフで剥皮した全部位について豚毛付着数を紫外線探傷灯装置を用いて調べた。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	(1)実態調査および改善後調査ともに剥皮直後枝肉の縦型スキナー剥皮部位における生菌汚染率は 54 検体中 20 検体（37.0%）と低く、大腸菌群はすべて不検出であった。しかし、実態調査の最終枝肉における生菌汚染（ $10^1 \sim < 10^4 \text{ CFU/cm}^2$ ）は 30 検体すべてに認められ、大腸菌群（ $1 \sim < 10^1 \text{ CFU/cm}^2$ ）は 8 検体に認められた。これに対して、改善後調査の最終枝肉では、24 検体すべてに生菌が少数（ $1 \sim < 10^2 \text{ CFU/cm}^2$ ）ながら認められたが、大腸菌群は検出されなかった。一方、デハイダー剥皮部位およびナイフ剥皮部位では、実態調査および改善後調査ともに、剥皮直後枝肉すべてに生菌汚染（ $1 \sim < 10^4 \text{ CFU/cm}^2$ ）が認められた。この汚染は、実態調査の最終枝肉ではさらに高くなったが、改善後の調査では低下していた。 (2)1 頭当たりの豚毛付着数は、実態調査では平均 47.1 本、改善後調査では平均 50.9 本であり、両者に有意差は認められなかった（ $p < 0.05$ ）。器具別剥皮部位の豚毛付着数は、実態調査と改善後調査の合計（54 頭）でみると、縦型スキナーでは平均 2.8 本（5.8%）、デハイダーでは平均 3.4 本（7.1%）といずれも少なかったが、ナイフでは平均 42.5 本（87.1%）とかなり多かった。 豚毛付着と微生物汚染の関係：ナイフによる剥皮の左前肢における豚毛付着数と剥皮直後の生菌数（ $\log_{10} \text{ CFU/cm}^2$ ）の間には、実態調査では正の相関は認められなかったが、改善後調査では正の相関が認められた（ $p < 0.05$ ）。
文献書誌事項	原啓二 他 『剥ぎ上げ方式縦型スキナー使用時の豚枝肉汚染』 日本獣医師会雑誌, 51(11), p.687-691 (1998)

文献 ID : 45(J145)

論文タイトル	食肉処理場における豚枝肉の微生物コントロールのためのと殺・解体方法の検討
調査国	日本
対象動物	ブタ
調査対象微生物	生菌数、大腸菌群数
処理工程	消毒・殺菌
調査目的	と殺・解体前の豚体表汚染と解体処理された枝肉汚染との関連について、通常処理（と殺・放血、洗浄後）した時と、通常処理後さらに体表を薬剤および熱湯により消毒・殺菌を行った後、解体処理した時の最終処理工程の枝肉の微生物汚染状況を比較検討した。さらに、豚のと殺・解体処理において、と殺・放血、洗浄後、体表の水分を除去し、その後の全剥皮工程までシャワーリングを全く行わない方法（ドライシステム方法）と、通常方法（内蔵摘出後と一部剥皮後にシャワーリングを行っている方法）による枝肉の汚染状況を検討した。
試験条件 パラメーター等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・以下の薬剤で消毒・殺菌</li> <li>0.3%フマル酸：消毒後採取した拭き取り材料は、0.1N NaOH で pH 6.8～7.0 に中和。</li> <li>2.0%酢酸：採取材料は 0.1N NaOH で pH 中和。</li> <li>5.0%リン酸三ナトリウム：採取材料は 0.1N HCl で pH 中和。</li> <li>80 熱湯</li> <li>一頭当たり 10 L。</li> <li>・体表の水分除去後、処理工程中のシャワーを全て停止（ドライシステムの解体処理）</li> </ul>
検体名 サンプルサイズ 採集方法	と殺・放血、洗浄（自動洗浄）後、前処理台上で高圧洗浄機またはブラシを用いて再度水で洗浄、次いで各薬剤液または熱湯で体表を消毒・殺菌した。薬剤処理後、1 分間放置した後、消毒・殺菌効果を調べるため、拭き取りにより試料を採取した。なお、試料は同一と体について、と殺・放血、洗浄後に採取、同様に再洗浄、消毒殺菌後に採取（前に拭き取った部位の隣接部）した。さらに、解体処理した最終工程（背割り、洗浄、水切り後）の枝肉について、拭き取り採取した。
検査方法 増菌の有無 培地	試料採取部位は胸部および背部を対象とし、ガーゼタンポンでトルクピンセットを用い、300 g 以上の圧力で、一定の方法（10×10 cm の面積を縦横各々 10 回以上拭き取り）により拭き取りを行った。細菌検査は各拭き取り材料に滅菌リン酸緩衝液（または生理食塩水）100 mL を加え、ストマッカー処理したものを試料原液とし、生菌数（30～32、48±3 時間培養）および大腸菌群数を測定した。また、成績は各部位 1 cm <sup>2</sup> 当たりの菌数（cfu/cm <sup>2</sup> ）で表した。なお、各薬剤で消毒・殺菌した後の拭き取り材料は、薬剤効力を停止するため材料採取後直ちに、タンポンは pH 中和剤を添加した希釈液 100 mL に投入した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>・と体体表をフマル酸および酢酸で消毒殺菌した場合、生菌数および大腸菌群汚染のいずれも効果的に減少した。さらに、体表の微生物汚染の少ないと体を解体処理した場合、枝肉の汚染を減少させることが認められた。</li> <li>・と殺・放血、洗浄後、体表の水分を除去した後、処理工程中のシャワーを全て停止して解体を行った場合、通常処理（シャワーリング実施）に比べ、全剥皮後のと体の細菌汚染を明らかに減少できることが分かった。</li> </ul>
文献書誌事項	品川邦汎 他 『食肉処理場における豚枝肉の微生物コントロールのためのと殺・解体方法の検討』 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 15(1996), p.306-312 (1997)

文献 ID : 46(J150)

論文タイトル	剥ぎ上げ方式縦型スキナーと横型スキナーにより全はく皮した豚と体の微生物汚染
調査国	日本（北海道）
対象動物	ブタ
調査対象微生物	生菌数、大腸菌群数
処理工程	剥皮
調査目的	剥ぎ上げ方式縦型スキナーを用いた工程における生体および体の外皮、全剥皮されたと体および枝肉の表面における微生物の状態を調べた。その成績と横型スキナー設置時に調査した成績を比較した。
試験条件 パラメーター等	拭き取りした解体処理工程とその部位は、剥ぎ上げ方式縦型スキナーにおいて、生体洗浄後では体表の背部および胸部、と体洗浄後では体表の背部および胸部、一部剥皮後ではと体の胸部、全剥皮後ではと体の背部および胸部、冷蔵庫保管後では枝肉の背部および胸部とした。また、一部剥皮後の胸部はデハイターで一部剥皮した外皮を保持した状態で拭き取りしたので、外皮と胸部の接触はなく、外皮からの汚染を受けていないことを確認した。横型スキナーでは、生体洗浄後では体表の胸部、と体洗浄後では体表の腹部および胸部、全剥皮前ではと体の腹部および胸部、全剥皮後ではと体の腹部および胸部、冷蔵庫保管後では枝肉の腹部および胸部とした。
検体名 サンプルサイズ 採集方法	調査材料は、体表、と体および枝肉の表面 100 cm <sup>2</sup> をブースで拭き取り採取した。拭き取ったブースをストマッカー用ポリ袋に入れ、滅菌生理食塩水 50 mL を加えて、30 秒間ストマッキングしたものを試料原液とした。
検査方法 増菌の有無 培地	試料原液を最初に 20 倍希釈し以降は適宜 10 倍希釈して、表面 1 cm <sup>2</sup> 当たりの生菌数および大腸菌群数を測定した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	剥ぎ上げ方式縦型スキナーにおける全剥皮後背部の生菌数は 8 検体（89%）が 10 未満であり、大腸菌群は全検体が不検出だった。 横型スキナーにおける全剥皮後胸部および腹部では、生菌数は 10 <sup>3</sup> ~ 10 <sup>5</sup> 未満と同程度の汚染を受けていた。厚生科学研究班の成績と比較しても、全剥皮後の背部および胸部は生菌数では 10 <sup>2</sup> ~ 10 <sup>3</sup> 未満が 63% と多く、今回の調査とは汚染の程度に差があり、しかも背部より胸部の汚染が高い傾向にあったが、60% 以上のと体が背部と胸部では同程度の汚染を受けていた。 剥ぎ上げ方式縦型スキナーでの全剥皮胸部と横型スキナーでの全剥皮前胸部において、全剥皮後で 7 検体（78%）が、全剥皮前で 4 検体（67%）が 10 <sup>2</sup> ~ 10 <sup>3</sup> 未満となり同程度の汚染を受けていた。 剥ぎ上げ方式縦型スキナーの全剥皮後および枝肉において、全剥皮後背部では 10 <sup>2</sup> 未満が全検体であったのが、枝肉背部では 10 ~ 10 <sup>4</sup> 未満と、より高い汚染を受けていた。一方、全剥皮後胸部では 10 ~ 10 <sup>3</sup> 未満が 8 検体（88.9%）であったが、枝肉胸部では全検体となり、枝肉洗浄後も同程度の汚染であった。 大腸菌群数については、剥ぎ上げ方式縦型スキナーでは一部剥皮後以後の工程において、不検出が 37 検体（82%）だった。横型スキナーでは、全剥皮前以後の工程において、30 未満が 27 検体（75%）であった。
文献書誌事項	渡辺正基 他 『剥ぎ上げ方式縦型スキナーと横型スキナーにより全はく皮した豚と体の微生物汚染』 北海道獣医師会雑誌, 41(5), p.111-114 (1997)

文献 ID : 47(J151)

論文タイトル	食肉処理場における危害分析重要管理点 (HACCP) 方式による微生物制御法確立のための基礎的研究
調査国	日本
対象動物	ブタ
調査対象微生物	生菌数、大腸菌群数
処理工程	消毒
調査目的	と畜場への搬入段階 ( 繁留所 ) から、と殺・解体および枝肉冷蔵までにおける微生物汚染 ( 源 ) 調査と、その防止対策について検討する。
試験条件 パラメーター等	<ul style="list-style-type: none"> <li>剥皮工程での衛生的処理：処理工程の一部 ( 胸部 ) 剥皮後、全剥皮 ( スキンナーで剥皮後、滑り台を通過するまで ) 工程で、一頭処理 ( 全剥皮 ) ごとにスキンナーおよび滑り台を 50 の 100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムで消毒。</li> <li>水のシャワーリング ( 誤って腸管を損傷し、腸内容物をと体に汚染した場合 )</li> </ul>
検体名 サンプルサイズ 採集方法	胸部および背部を対象とし、ガーゼタンポン ( または綿タンポン ) でトルクピンセットを用い、300 g 以上の圧力で、一定の方法 ( 10×10 cm の面積を縦横各々 10 回以上拭き取り ) により拭き取りを行った。使用機械・器具からの試料採取も基本的には 100 cm <sup>2</sup> ( 小さい器具では 25 cm <sup>2</sup> ) を拭き取った。
検査方法 増菌の有無 培地	各拭き取り材料に滅菌リン酸緩衝液 ( または生理食塩水 ) 100 mL を加え、ストマッカー処理したものを試料原液とし、生菌数 ( 30 ~ 32 、 48±3 時間培養 ) および大腸菌群数を測定 ( cfu/cm <sup>2</sup> ) した。各試験法は常法に従って行った。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<p>枝肉 ( 胸部・背部 ) の主な汚染工程としては、胸部の一部剥皮および全剥皮工程であった。全剥皮の横型スキンナーは、一頭処理ごとに次亜塩素酸ナトリウム ( 100 ppm ) で消毒して用いても、と体 ( 背部 ) の細菌汚染を減少させることはできなかった。他方、縦型スキンナーはと体との接触がなく、と体 ( 背部 ) 汚染も少なかった。</p> <p>全剥皮は、背割り後の最終枝肉洗浄では、汚染の減少はみられず、最終処理工程の枝肉 ( 胸部および背部 ) 汚染は、一部剥皮および全剥皮後と同程度であった。</p> <p>内臓摘出時、腸内容物で汚染されたと体の微生物汚染は高かった ( 生菌数 10<sup>4</sup> ~ 10<sup>7</sup>cfu/cm<sup>2</sup> )。しかし、その汚染は水のシャワーリングにより、約 10<sup>2</sup>cfu/cm<sup>2</sup> オーダーの減少がみられた。また、繁留所の豚体表の微生物汚染はシャワーリングにより、生菌数 10<sup>4</sup> ~ 10<sup>7</sup>cfu/cm<sup>2</sup> から 10<sup>3</sup> ~ 10<sup>5</sup>cfu/cm<sup>2</sup> に減少した。</p>
文献書誌事項	品川邦汎 他 『食肉処理場における危害分析重要管理点(HACCP)方式による微生物制御法確立のための基礎的研究』食肉に関する助成研究調査成果報告書, 14(1995), p.281-286 (1996)

文献 ID : 48(J152)

論文タイトル	と殺後の温度管理による食肉の微生物制御に関する研究
調査国	日本（群馬）
対象動物	ウシ
調査対象微生物	一般生菌数
処理工程	-
調査目的	と殺後の枝肉の表面温度および細菌数の経時変化の実態を調査し、米国によると殺後の枝肉温度に関する規則導入後の対応策を検討するための基礎的な資料を得ること。
試験条件 パラメーター等	冷却中の細菌数の経時変化。と殺直後、5 時間後、24 時間後
検体名 サンプルサイズ 採集方法	処理頭数：1 回目 46 頭、2 回目 29 頭、3 回目 47 頭 第 1 回目と 3 回目に温度計を装着した枝肉胸部を、と殺直後、5 時間後および 24 時間後に拭き取り、検体とした。と殺直後の拭き取りは、予冷室内で枝肉の最終洗浄終了直後に行った。5 時間後の拭き取りは冷却室内で、24 時間後の拭き取りは懸肉室内で行った。 拭き取り枠（10 cm×10 cm）を用い、トルクピンセットで約 300 g/cm <sup>2</sup> の圧力で均等に上下左右各々 10 回、ガーゼタンポンで拭き取った。拭き取ったガーゼタンポンに、滅菌生理食塩水 10 mL を加え、ストマッカーで 30 秒間処理して振り出し、試料原液とした。
検査方法 増菌の有無 培地	試料原液を段階希釈し、標準寒天培地で混釈培養（35、48 時間）後、菌数を測定した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	と殺直後の体表面の温度は若干の個体差が認められたものの、5 時間後（左端平均 0.3、右端 1、中央 0.2）24 時間後（左端平均 - 2、右端 - 1.8、中央 - 1.5）と、冷却室内で左右の端と中央部とでの場所による差は認められなかった。また、3 回の測定日間の目差（5 時間後：1 回目 0.2、2 回目 0.5、3 回目 0.8、24 時間後：1 回目 - 1.8、2 回目 - 1.8、3 回目 - 1.7）も認められなかった。と殺後 5 時間の体表温度は、平均 0.5 で、また 24 時間の体表温度は、平均 - 1.8 で、ともに規則案に示された要件をクリアしていた。 いずれのと体においても、と殺直後、5 時間後、24 時間後において枝肉胸部表面の細菌数の有意な変化はみられなかったが、24 時間後の細菌数（平均 $7.4 \times 10^2 / \text{cm}^2$ ）の方がと殺直後の細菌数（平均 $1.2 \times 10^3 / \text{cm}^2$ ）よりも少なかった。
文献書誌事項	豊福肇 『と殺後の温度管理による食肉の微生物制御に関する研究』 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 14(1995), p.277-280 (1996)

文献 ID : 49(J153)

論文タイトル	牛枝肉の細菌学的汚染検査について
調査国	日本(京都)
対象動物	ウシ
調査対象微生物	一般生菌数、大腸菌群数、黄色ブドウ球菌、カンピロバクター、エルシニア、サルモネラ
処理工程	-
調査目的	枝肉の細菌汚染状況の実態を把握し、食肉の安全性を確保するための資料作成を目的として検査を行った。
試験条件 パラメーター等	
検体名 サンプルサイズ 採集方法	検体は、解体作業開始後 11 頭目以降で、洗浄後冷蔵庫に入る前の牛枝肉を対象とし、検査 1 回当たり 5 頭から 10 頭分ずつを、15 回採取し、合計 125 頭について拭き取り検査を行った。 一般生菌数及び大腸菌群数は、滅菌ガーゼタンポンで胸部及び腰部の枝肉表面 100 cm <sup>2</sup> の細菌数を求めた。食中毒菌については、滅菌綿棒で胸部を拭き取り、原因菌の検索を行った。
検査方法 増菌の有無 培地	一般生菌数及び大腸菌群数：標準寒天及びデソキシコレート寒天培地混釈培養法により定量測定した。 食中毒菌：黄色ブドウ球菌は卵黄加マンニット食塩寒天培地、カンピロバクターはスキロー培地、エルシニアは CIN 培地により分離培養を行い、サルモネラは EEM 培地及びラパポート培地による増菌培養後、DHL 寒天培地により分離培養を行った。また、それぞれの培地に発育した疑わしい集落は生化学的性状検査等で確認を行った。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	一般生菌数は、 $1.1 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^8$ と変動が大きく、また、 $1.0 \times 10^5$ 以上が胸部で 92.9%、腰部で 64.3% であった。平均値は全体で $1.6 \times 10^5$ であり、検査部位別にみると胸部は $2.8 \times 10^6$ 、腰部は $4.6 \times 10^5$ で胸部の方が少し汚染度が高いことが認められた。 大腸菌群数の範囲は $7.8 \times 10^3$ 以下であり、細菌数が $1.0 \times 10^3$ 以上の検体は胸部で 35.7%、腰部で 32.9% であった。平均値は全体で $1.1 \times 10^3$ であり、部位別にみると胸部は $1.1 \times 10^3$ 、腰部は $1.0 \times 10^3$ で差異は認められなかった。 黄色ブドウ球菌は、22 検体 (22%) 検出され、汚染度が高い数値を示した。カンピロバクターは、3 検体 (3%) 検出され、うち 2 検体が <i>C. jejuni</i> (2%) で 1 検体が <i>C. coli</i> (1%) であった。 エルシニア及びサルモネラは、検出されなかった。
文献書誌事項	京都市衛生公害研 『牛枝肉の細菌学的汚染検査について』 京都市衛生公害研究所年報, 62(1995), p.108-109 (1996)

文献 ID : 50(J157)

論文タイトル	皮はぎによる豚枝肉の細菌学的汚染検査について
調査国	日本(京都)
対象動物	ブタ
調査対象微生物	一般生菌数、大腸菌群数、黄色ブドウ球菌数、サルモネラ
処理工程	剥皮
調査目的	皮はぎによる豚枝肉の汚染状況を把握し、食肉の安全性を確保するための資料にすること。
試験条件 パラメーター等	-
検体名 サンプルサイズ 採集方法	検体の採取部位は、解体洗浄後冷蔵庫に入る前の豚枝肉の頸部外側面及び後肢(大腿部)外側面の2カ所で、検査1回当たり5頭分ずつ、6回採取し、合計30頭(延検体数60検体)について検査を行った。なお、皮はぎによる豚の処理方法は、放血後、刀により胸腹部の皮をはぎ(前処理)、内蔵摘出及び頭部切除後自動皮はぎ機により皮を除去し、背割りを行い、最後に自動洗浄機で洗浄され、冷蔵庫に入り枝肉として搬出される。
検査方法 増菌の有無 培地	検体採取は、拭き取り法で行った。滅菌綿棒各々2本を使用し、枝肉表面100cm <sup>2</sup> を上記綿棒で30秒間加圧しながら拭き取った。拭き取り後、綿棒は滅菌生理食塩水10mLの入った中試験管に入れ、これを試料として枝肉100cm <sup>2</sup> 当りの菌数を求めた。 一般生菌数：標準寒天平板培養法による定量 大腸菌群数：デソキシコレート寒天平板培養法による定量 黄色ブドウ球菌数：エッグヨーク食塩寒天培地(卵黄加マンニット食塩寒天培地)に試料0.1mLを塗布し、マンニット分解、卵黄反応陽性の集落数を測定した。その集落5個についてコアグラゼ試験を実施した。 サルモネラ：ラパポート培地による増菌培養後、SS寒天培地により分離し、疑わしい集落はTSI寒天培地で確認を行った。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<ul style="list-style-type: none"> <li>一般生菌数は、<math>3.7 \times 10^3 \sim 2.1 \times 10^6</math> と非常に変動が大きい。この平均値は <math>1.7 \times 10^5</math> であり、検査部位別にみると頸部は <math>1.8 \times 10^5</math>、大腿部は <math>1.6 \times 10^5</math> で差異はほとんど認められなかった。</li> <li>大腸菌群は3検体を除く57検体(95%)から検出され、菌数の範囲は <math>2.7 \times 10^3</math> 以下であった。また、菌数が300以下の検体が62%あった。平均値は <math>3.8 \times 10^2</math> であり、部位別にみると頸部は <math>4.2 \times 10^2</math>、大腿部は <math>3.3 \times 10^2</math> で、あまり差異は認められなかった。</li> <li>黄色ブドウ球菌は、頸部が4検体、大腿部が2検体の計6検体(10%)から検出されたが、菌数は全て300以下であった。</li> <li>サルモネラは、全く検出されなかった。</li> </ul>
文献書誌事項	京都市衛生公害研 『皮はぎによる豚枝肉の細菌学的汚染検査について』 京都市衛生公害研究所年報, 61(1994), p.93-95 (1995)

文献 ID : 51(J159)

論文タイトル	豚枝肉における豚毛の付着状況と微生物汚染状況
調査国	日本（北海道）
対象動物	ブタ
調査対象微生物	<i>E. coli</i> 、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌属
処理工程	剥皮
調査目的	従前から豚と体の剥皮に使用されている横型スキナーと試験的に設置したアッププラーいわゆる縦型スキナーにより剥皮した豚枝肉について、豚毛付着状況と採取した付着豚毛の細菌検索ならびに微生物汚染状況を調査する。
試験条件 パラメーター等	縦型スキナーあるいは横型スキナーによる剥皮
検体名 サンプルサイズ 採集方法	豚毛の付着状況：154 頭（横型スキナー例 7 カ所、縦型スキナー例 8 カ所） 縦型スキナー例のナイフの洗浄頻度による豚毛付着減少の効果を 73 頭中 31 頭、調査した。 全頭より採取した豚毛について、採取日毎にまとめて横型スキナー例 9 検体と縦型スキナー例 30 検体の合計 39 検体。 枝肉の微生物汚染状況：横型スキナーにより剥皮した 81 頭中延べ 4 日間の調査分である 31 頭および縦型スキナーにより剥皮した 73 頭中 11 頭。 拭き取り部位：横型スキナー例ではデハイダーとナイフで剥皮した左前肢外側および横型スキナーで剥皮した右前肢外側と右背部、縦型スキナー例ではナイフで剥皮した左前肢外側、デハイダーにより剥皮した左肩部および縦型スキナーで剥皮した左背部とした。
検査方法 増菌の有無 培地	豚毛の付着状況は紫外線探傷灯により計測した。豚毛の細菌検索は食肉製品の試験法に準拠し検出を試みた。 枝肉の微生物汚染状況は「食鳥処理現場における HACCP 方式による衛生管理指針」に準拠して拭き取りを枝肉保管冷蔵庫内で行い、一般細菌数および大腸菌数について計測した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	豚毛の付着状況は、横型スキナー例では最低 28 本～最高 307 本で、平均 104.1 本であった。縦型スキナー例では最低 11 本～最高 221 本で、平均 82.1 本であった。また、縦型スキナー例における右後肢部分で、ナイフの洗浄頻度が通常である対照群 42 頭では平均 27.4 本で、一頭処理毎にナイフを洗浄した調査群では平均 11.7 本であった。左後肢部分については通常の洗浄頻度なので、対照群では平均 24.2 本であり調査群では平均 23.2 本であった。 採取した豚毛の細菌検索は、 <i>E. coli</i> は 4 検体、黄色ブドウ球菌は 10 検体で検出され、サルモネラ菌属はすべて不検出であった。 微生物汚染状況において、横型スキナー例による左前肢の 1 cm <sup>2</sup> 当たりの一般細菌数（一般細菌数）は平均 $8.7 \times 10^1$ 、また 1 cm <sup>2</sup> 当たりの大腸菌群数（大腸菌群数）は 5 頭で検出され 30 以下、右前肢で一般細菌数は平均 $1.0 \times 10^2$ 、大腸菌群数は 3 頭で検出され 30 以下及び右背部で一般細菌数は平均 $5.8 \times 10^1$ 、大腸菌群数は 3 頭で検出され 30 以下であった。また、縦型スキナー例による左前肢で一般細菌数は平均 $4.8 \times 10^2$ 、大腸菌群数は平均 $2.2 \times 10^2$ 及び左背部で一般細菌数は平均 $2.0 \times 10^2$ 、大腸菌群数は 1 頭から検出され 30 以下であった。横型スキナー例および縦型スキナー例における各部位での一般細菌数と付着豚毛数の相関はなかった。また、各部位の一般細菌数の相関について、横型スキナー例の調査分 31 頭では右前肢と右背部、右前肢と左前肢は危険率 1% で相関し、左前肢と右背部も危険率 5% で相関していた。また、縦型スキナー例の調査分 11 頭においては、左背部と左前肢は危険率 1% で相関し、左背部と左肩部は危険率 5% で相関していた。
文献書誌事項	渡辺正基 他 『豚枝肉における豚毛の付着状況と微生物汚染状況』 北海道獣医師会雑誌, 39(6), p.120-124 (1995)



文献 ID : 52(J160)

論文タイトル	と畜場及び食肉処理場の微生物制御に関する調査について
調査国	日本（北海道）
対象動物	ブタ
調査対象微生物	一般細菌数、大腸菌群数、低温細菌数
処理工程	洗浄
調査目的	A と畜場における洗浄設備変更前後の微生物汚染状況を比較検討し、B と畜場で同等効果が得られるような実験的処理を試み、微生物制御に対する知見を得る。
試験条件 パラメーター等	A: 洗浄水の残留塩素濃度（0.1ppm、1ppm）での高圧洗浄 B: と体の徹底洗浄後、器材や作業者の指を1頭ごとに消毒
検体名 サンプルサイズ 採集方法	A、B、およびその併設食肉処理場において、豚のと体体表（腹部） 枝肉（頸部） 部分肉及び器具器材について拭き取り検査法（25 cm <sup>2</sup> をガーゼタンポンで拭き取る）により一般細菌数、大腸菌群数、低温細菌数を検査した。
検査方法 増菌の有無 培地	一般細菌数は標準寒天培地混釈法（35、48時間培養）、大腸菌群数はデスコキシコレート培地混釈法により赤色集落を計測（35、22時間培養）、低温細菌数はCVT寒天培地塗抹法により、赤色集落数を計測（25、72時間培養）した。
結果 汚染実態 汚染菌の性状 防除対策等	<p>A と畜場における洗浄設備の主な変更内容は、洗浄水の残留塩素濃度が 0.1 ppm から 1 ppm になったことと、1頭ずつ個別に洗浄されることにより、洗浄水による飛沫汚染が軽減されたことである。</p> <p>洗浄機導入前後およびと体洗浄機、枝肉洗浄機の使用前後の微生物汚染状況の変化：一般細菌数はと体体表で洗浄前 <math>10^4 \sim 10^6</math> 台だったものが洗浄後 <math>10^2</math> 台に減少し、枝肉洗浄前後では <math>10^5</math> 台のものは <math>10^2</math> 台に減少したが、<math>10^2</math> 台のものは、洗浄されても変化は見られなかった。洗浄機導入前後の比較では枝肉頸部で <math>10^3</math> 台から <math>10^2</math> 台に減少した。部分肉では導入前後とも <math>10^3</math> 台であった。大腸菌群数はと体洗浄機前後で <math>10^2</math> 台が <math>10^0</math> 台に、枝肉洗浄機前後では、<math>10^2</math> 台が <math>10^0</math> 台に減少した。</p> <p>B と畜場および食肉処理場において、と体、枝肉、部分肉および施設の微生物汚染実態調査：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 通常処理では、一般細菌数はと体体表で <math>10^6</math> 台と著しく高かった。スキンナー後のと体は <math>2.5 \times 10^3</math> で背割り、洗浄、水切り作業後やや増加し <math>7.2 \times 10^3</math> となった。冷蔵および食肉処理場でのカット処理を経た部分肉は <math>2.0 \times 10^3</math> であった。</li> <li>・ 体表の徹底洗浄 + 器材の洗浄：一般細菌数はと体体表で <math>3.1 \times 10^3</math>、枝肉で <math>5.9 \times 10</math>、部分肉は 2.1 であった。</li> <li>・ 体表の徹底洗浄（器材洗浄なし）：一般細菌数はと体体表で <math>1.8 \times 10^3</math>、枝肉で <math>6.2 \times 10^2</math>、部分肉は <math>8.8 \times 10</math> であった。</li> <li>・ 大腸菌群数や低温細菌数は、処理工程によって大きくは変わらなかった。</li> </ul> <p>器具器材の汚染状況：一般細菌数は背割機以外は <math>10^3</math> 以上の値を示した。大腸菌群数は枝押軍手で最も高く、低温細菌数は、背割機以外の器具器材で <math>10^3</math> 以上の値を示した。</p>
文献書誌事項	早船克己 他 『と畜場及び食肉処理場の微生物制御に関する調査について』北海道獣医師会雑誌, 39(3), p.55-57 (1995)

英語文献

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
トリミング 汚染物除去	ウシ	<i>Salmonella typhimurium</i> 、 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	<ul style="list-style-type: none"> <li>USDA-FSIS 規定通りに糞便汚染をトリミング（視認できた汚染部位の外側 2.5 cm を 0.5 ~ 1 cm カット）</li> <li>汚染領域を低圧ハンドスプレーで水洗（1.5 L、10 psi、35 、 90 sec、枝肉表面から 5 cm ）した後、高圧自動スプレーキャビネットで洗浄（5 L、250 psi、35 、 5 sec の後 400 psi、4 sec、汚染表面から約 33 cm ）</li> <li>同様に水洗した後、2% の乳酸（pH 2.2）を噴霧（200 mL、40 psi、55 、 11 sec、枝肉表面から 80 cm ）</li> <li>同様に水洗した後、2% の酢酸（pH 2.5）を噴霧（200 mL、40 psi、55 、 11 sec、枝肉表面から 80 cm ）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ウシの 4 つの部位（inside round, outside round, brisket, clod）で試験。</li> <li>水だけの洗浄やトリミングに比べ、有機酸を用いた洗浄の方が効果的であった。</li> <li>乳酸は酢酸よりも <i>E. coli</i> O157:H7 のレベルを有意に減少させたが、<i>Salmonella</i> の減少に対しては、はっきりとした違いはなかった。</li> </ul>	米国	Comparison of Methods for Decontamination from Beef Carcass Surfaces	Hardin, M.D., G.R. Acuff, L.M. Lucia, J.S. Oman, and J.W. Savell. 1995. Comparison of Methods for Decontamination from Beef Carcass Surfaces. <i>Journal of Food Protection.</i> 58 (4) 368-374.	10.4315/0362-028X-58.4.368	1

対応する内容の記載がないばあいは「 - 」と記載した。

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
トリミング 汚染物除去	ウシ	aerobic plate counts (APC)	スチームバキューミング: 5~10秒、-0.0093 bar、回数と時間は汚染の広がりや除去しやすさに応じて変更。	スチームバキューミングは aerobic plate counts (APC) を 1.73 - 2.03 log CFU/cm <sup>2</sup> 、total coliform counts (TCC) を 1.67 - 2.13 log CFU/cm <sup>2</sup> 減少させた。少なくともナイフトリミング程度の除染効果あり。	米国	Steam Vacuuming as a Pre-Evisceration Intervention to Decontaminate Beef Carcasses	Kochevar, Sherri L., John N. Sofos, Robert R. Bolin, James O. Reagan, and Gary C. Smith 1997. Steam Vacuuming as a Pre-Evisceration Intervention to Decontaminate Beef Carcasses. Journal of Food Protection. 60 (2) 107-113.	10.4315/0362-028X-60.2.107	2
去トリミング 汚染物除	Livestock	-	-	ゼロトレランス検証	米国	Verification of Procedures for Controlling Fecal Material, Ingesta, and Milk in Livestock Slaughter Operations			3
去トリミング 汚染物除	ウシ	<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A、 <i>Escherichia coli</i> O157:H7、 <i>Salmonella typhimurium</i>	スチームパストライゼーション: 単独の場合 15 秒、2 つを組み合わせる場合 5 秒と 10 秒。 ナイフトリミング: 視認できる汚染部位の 1 cm 外側、深さ 0.5 cm。 熱水/スチームバキュームスポットクリーニング:	2.5~3.7 log CFU/cm <sup>2</sup> の範囲で減少させた。	米国	Comparison of Steam Pasteurization and Other Methods for Reduction of Pathogens on Surfaces of Freshly Slaughtered	Phebus, R.K., A.L. Nutsch, D.E. Schafer, R.C. Wilson, M.J. Reimann, J.D. Leising, C.L. Kastner, J.R. Wolf, and R.K. Prasai. 1997, Comparison of Steam Pasteurization and Other Methods for Reduction of Pathogens	10.4315/0362-028X-60.5.476	4

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
			組み合わせ処理 (TW、TWS、WS、TWLS、VWLS)	3種の病原菌を 4.2 ~ 5.3 log CFU/cm <sup>2</sup> の範囲で減少させた。		Beef	on Surfaces of Freshly Slaughtered Beef. Journal of Food Protection. 60 (5) 476-484.		
トリミング 汚染物除去	ウシ	aerobic plate counts (APC) <i>Enterobacteriaceae</i> , 全 coliforms、耐熱性 coliforms、 <i>Escherichia coli</i>	スチームバキューミング処理 (2秒×3、処理後の枝肉表面温度は 70 未満が多かった) その後、熱水噴霧 (95 °C、12.5 cm の距離から 5 秒、166 kPa) その後、乳酸噴霧 (2% L-乳酸 200 mL を 55 °C、11 秒)	最初に接種した 5 cm <sup>2</sup> の外側の領域において、 ・ <i>Enterobacteriaceae</i> 、 ・ 全 coliforms、 ・ 耐熱性 coliforms、 ・ <i>E. coli</i> を、検出限界値以下 (1.0 log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> ) まで減少した。	米国	Decontamination of Beef Carcass Surface Tissue by Steam Vacuuming Alone and Combined with Hot Water and Lactic Acid Sprays	Castillo, A., L.M. Lucia, K.J. Goodson, J.W. Savell, and G.R. Acuff. 1999. Decontamination of Beef Carcass Surface Tissue by Steam Vacuuming Alone and Combined with Hot Water and Lactic Acid Sprays. Journal of Food Protection. 62 (2) 146-151.	10.4315/0362-028X-62.2.146	5
枝肉洗浄	ウシ	<i>Escherichia coli</i> O157:H7、 <i>Listeria monocytogenes</i> 、 <i>Salmonella enteritidis</i> 、 <i>Yersinia enterocolitica</i>	ウシ半身に、レール検査直後、クーラー (2 °C) に入れる直前に 3% (v/v) 乳酸を手動噴霧 (1.3L)。その後、水噴霧 (15 分毎に 30 秒間、8 時間自動噴霧) その後、21 °C の 3% (v/v) 乳酸を噴霧 (1.3 L)。	3種の噴霧溶液 (脱イオン蒸留水、200 ppm 塩素、3% (v/v) 乳酸) の組み合わせで比較した結果、2回の噴霧とも乳酸を用いた場合に、APC が最も減少した。	米国	Microbiological Quality of Beef Carcasses and Vacuum-Packaged Subprimals: Process Intervention during Slaughter and Fabrication	Kenney, P.B., R.K. Prasai, R.E. Campbell, C.L. Kastner, and D.Y.C. Fung. 1994. Microbiological Quality of Beef Carcasses and Vacuum-Packaged Subprimals: Process Intervention during Slaughter and Fabrication. Journal of Food Protection. 58 (6) 633-638.	10.4315/0362-028X-58.6.633	6

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
枝肉洗浄	ウシ	Aerobic bacteria	次亜塩素酸ナトリウム 200 ~ 250 mg/L (pH 6.0、酢酸で調整)で消毒。消毒剤の流速: 0.83 および 3.4 L/min ライン圧: 3.5 および 14.0 kg/cm <sup>2</sup> ノズルを通る肉の通過速度: 2 および 10 cm/sec。	<ul style="list-style-type: none"> <li>消毒剤の流速 3.4 L/min、ライン圧 14.0 kg/cm<sup>2</sup>、ノズルを通る肉の通過速度は 2 cm/sec の時が、最も効果的であり、99%減少させた。</li> <li>噴霧は 2 cm/sec で肉の上を 1 回通過させるか、約 7 回連続して 10 cm/sec で通過させた時、最も効果的であった。</li> </ul>	米国	Experiments in Sanitizing Beef with Sodium Hypochlorite	Marshall, R.T., M.E. Anderson, H.D. Naumann, and W.C. Stringer. 1977. Experiments in Sanitizing Beef With Sodium Hypochlorite. Journal of Food Protection. 40 (4) 246 - 249.	10.4315/0362-028X-40.4.246	7
枝肉洗浄	ウシ	<i>Escherichia coli</i>	ウシ枝肉の脂肪筋膜組織に糞ペーストを接種し、曝露時間 0、2、4 時間後に、自動噴霧洗浄キャビネット内で、水 (35、20.7 bar) で噴霧洗浄。その後、以下の 5 種の洗浄を実施 a) 2% 酢酸ですすぐ b) 5% 過酸化水素ですすぐ c) 12% リン酸三ナトリウムですすぐ d) 35 (20.7 bar) の水で噴霧洗浄 e) 74 (20.7 bar) の水で噴霧洗浄	<p>0 時間後 (糞ペースト曝露直後)</p> <p>a) 3.04±0.40、b) 3.52±0.55、c) 3.62±0.67、d) 3.69±0.72、e) 4.17±0.55 log CFU/cm<sup>2</sup> 除去。</p> <p>2, 4 時間後 洗浄処理に関係なく、曝露時間の延長と共に噴霧洗浄により除去される細菌数は減少</p> <p>全ての洗浄時間で、最も効果的な洗浄剤は 74 水であった。</p>	米国	Removal of Bacteria from Beef Tissue by Spray Washing after Different Times of Exposure to Fecal Material	Cabedo, L., J.N. Sofos, and G.C. Smith. 1996. Removal of Bacteria from Beef Tissue by Spray Washing after Different Times of Exposure to Fecal Material. Journal of Food Protection. 59 (12) 1284-1287.	10.4315/0362-028X-59.12.1284	8

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
枝肉洗浄	ブタ	<i>Salmonella typhimurium</i>	以下を比較 <ul style="list-style-type: none"> <li>・熱水処理( 53 、10 and 20 秒)</li> <li>・焼毛 ( 炎 : 10 and 20 秒)</li> <li>・塩素噴霧 ( 25 、50、100、200 ppm )</li> <li>・乳酸噴霧 ( 25 、1%、2% )</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・以下の順序で有効 : 熱水( 10 秒 ) &gt; 塩素( 50 ppm ) = 乳酸 ( 2% ) &gt; 炎 ( 10 秒)</li> <li>・熱水、焼毛 : 処理時間による差異なし</li> <li>・塩素噴霧 : 濃度による差異なし</li> <li>・乳酸噴霧 : 2 %の方が効果あり</li> </ul>	米国	The Efficacy of Various <i>Salmonella</i> Intervention Methods Applied to Pork Carcasses during Slaughter	N. Clayton, The Efficacy of Various <i>Salmonella</i> Intervention Methods Applied to Pork Carcasses during Slaughter (thesis from U. Kentucky). 2002.		9
枝肉洗浄	ウシ	<i>Escherichia coli</i>	水 : 2.76、6.89、20.68 bar、16、35、66、74±5 、12 秒または 36 秒。  消毒液 : 1.38 bar、16 、12 秒または 36 秒。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・5%酢酸</li> <li>・12%リン酸三ナトリウム</li> <li>・5%過酸化水素</li> <li>・0.3%市販の消毒剤</li> <li>・0.5%オゾン水</li> </ul> ハンドトリミング	<ul style="list-style-type: none"> <li>・74 の水による洗浄が最も効果的であり、3.0 log CFU/cm<sup>2</sup> 以上の減少。</li> <li>・過酸化水素およびオゾン水は、最初に水で洗浄した後に適用すると、リン酸三ナトリウム、酢酸および市販消毒剤より効果的であった</li> </ul>	米国	Evaluation of Hand-Trimming, Various Sanitizing Agents, and Hot Water Spray-Washing as Decontamination Interventions for Beef Brisket Adipose Tissue	Gorman, B.M., J.N. Sofos, J.B. Morgan, G.R. Schmidt, and G.C. Smith. 1995. Evaluation of Hand-Trimming, Various Sanitizing Agents, and Hot Water Spray-Washing as Decontamination Interventions for Beef Brisket Adipose Tissue. Journal of Food Protection. 58 (8) 899-907.	10.4315/0362-028X-58.8.899	10

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
枝肉洗淨	ウシ、ヒツジ	<i>E.coli</i> , <i>Salmonella</i> <i>e</i>	水 ( 37, 55, 60, 65, 70, 80, 90 120 秒まで	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 37 では 120 秒後もほとんど除菌されない。</li> <li>・ 60 では 10 秒で 90% が除菌された。</li> <li>・ 80 では、牛肉サンプルで 99% 以上、ヒツジ肉サンプルで 99.9% 以上の菌が死滅した。</li> <li>・ 洗淨時間より、水温の方が重要であった。</li> </ul>	オーストラリア	Destruction of <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonellae</i> on Mutton Carcasses by Treatment with Hot Water	Smith. M.G., and A. Graham. 1978. Destruction of <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonellae</i> on Mutton Carcasses by Treatment with Hot Water. Meat Science. 2 (2) 119-128.	10.1016/0309-1740(78)90012-8	11
枝肉洗淨	ウシ	<i>Escherichia coli</i> O157:H7、 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	DL-乳酸、酢酸、クエン酸 ( 1、3、5% ) スプレーノズルスピード 80 cycles/min、チェーンスピード 14 m/min、ノズル圧 80 psi、流速 4.8 L/min、サンプルからノズルまでの距離 17.8 cm、溶液の温度 24 。	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 赤身組織では、5% の噴霧処理は最も効果的であった。</li> <li>・ 有機酸は生肉における <i>E. coli</i> O157:H7 の数を減少させたが、完全に不活性化しなかった。</li> <li>・ 細菌数減少の規模は、赤身組織より脂肪組織で大きかった。</li> </ul>	米国	Efficacy of Organic Acids Against <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Attached to Beef Carcass Tissue Using a Pilot Scale Model Carcass Washer	Nettles Cutter, C., and G.R. Siragusa. 1994. Efficacy of Organic Acids Against <i>Escherichia coli</i> O157:H7 Attached to Beef Carcass Tissue Using a Pilot Scale Model Carcass Washer. Journal of Food Protection. 57 (2) 97 - 103.	10.4315/0362-028X-57.2.97	12

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
枝肉洗淨	ウシ	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> 血清型、 Enteropathogenic <i>E. coli</i> O157、 <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Yersinia enterocolytica</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	水 (40, 60, 80 ) で処理 10 秒あるは 20 秒	<ul style="list-style-type: none"> <li>80 の水を 10 または 20 秒間適用した場合、3 log<sub>10</sub> (99.9%) 以上が死滅。</li> <li>60 水を 10 または 20 秒間適用した場合も、平均で 1 log<sub>10</sub> 以上が死滅。</li> </ul>	オーストラリア	Destruction of bacteria on fresh meat by hot water	Smith, M. G. 1992. Destruction of bacteria on fresh meat by hot water. <i>Epidemiology and Infection</i> . 109 (3) 491-496.	10.1017/S0950268800050482	13



工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
枝肉洗浄	ウシ	<i>Salmonella californica</i>	<p>滅菌蒸留水、2%酢酸を用いて、洗浄および噴霧冷蔵</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・洗浄：20 mLの滅菌蒸留水、または2%(v/v)酢酸中でボルテックス（最大速度の75%、10秒間）することで、シミュレート</li> <li>・噴霧冷蔵：組織サンプルを5の滅菌蒸留水、または2%酢酸に30分間隔で4時間、一時的にディップすることでシミュレート</li> </ul> <p>蒸留水、酢酸の温度を変えて(23、40、55)評価。さらに、洗浄と噴霧洗浄を組み合わせ評価。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・蒸留水洗浄後に2%酢酸で消毒した場合、蒸留水のみで洗浄したサンプルと比較して、サルモネラ群を2 log<sub>10</sub>も減少させた。</li> <li>・酢酸の温度を55に上昇させると、細菌数はさらに減少した。</li> <li>・内蔵摘出前後洗浄に続けて噴霧冷却をした場合は、噴霧冷却をしなかった場合と比較して残存細菌数が高く、一部の損傷サルモネラの回復が明らかであった。</li> </ul>	米国	Control of <i>Salmonella</i> on Beef Tissue Surfaces in a Model System by Pre- and Post-Evisceration Washing and Sanitizing, With and Without Spray Chilling	Dickson, J.S., and M.E. Anderson. 1991. Control of <i>Salmonella</i> on Beef Tissue Surfaces in a Model System by Pre- and Post-Evisceration Washing and Sanitizing, With and Without Spray Chilling. Journal of Food Protection. 54 (7) 514 – 518.	10.4315/0362-028X-54.7.514	14

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
枝肉洗浄	ウシ	<i>E. coli</i>	約 5log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> の大腸菌を有する赤身および脂肪枝肉組織を、次亜塩素酸ナトリウム（塩素の終濃度が 50、100、250、500、800 ppm になるよう調整）で噴霧洗浄。28 。噴霧後、4 で 24 時間インキュベート。	<ul style="list-style-type: none"> <li>水：0.60 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup> 未満の減少。</li> <li>塩素の終濃度 50、100、250、500 ppm の次亜塩素酸ナトリウム：1 log<sub>10</sub>CFU/cm<sup>2</sup> 未満の減少。</li> <li>塩素の終濃度 500、800 ppm の次亜塩素酸ナトリウム：最も減少し、それぞれ 1.22 および 1.28 log<sub>10</sub> CFU/cm<sup>2</sup>。</li> <li>ただし、上記は赤身に付着した細菌を完全に不活性化するには不十分。</li> </ul>	米国	Application of Chlorine to Reduce Populations of <i>Escherichia coli</i> on Beef	Cutter, C., G.R. Siragusa. 1994. Application of Chlorine to Reduce Populations of <i>Escherichia coli</i> on Beef. Journal of Food Safety. 15. 67-75.	10.1111/j.1745-4565.1995.tb00121.x	15
枝肉洗浄	ウシ	<i>Escherichia coli</i> O157:H7、 <i>Listeria innocua</i> 、 <i>Clostridium sporogenes</i>	以下の薬剤による噴霧洗浄（15 秒、約 5.5 bar、32±2 ） <ul style="list-style-type: none"> <li>12%リン酸三ナトリウム (TSP)</li> <li>1.5%乳酸</li> <li>3%乳酸</li> <li>1.5%酢酸</li> <li>3%酢酸</li> <li>水</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>LA、AA、および TSP 処理により、約 5.6 log CFU/cm<sup>2</sup> の初期 APC レベルが 1.3 ~ 2.0 log CFU/cm<sup>2</sup> まで減少した。</li> <li>TSP 処理は、大腸菌 O157:H7 および <i>C. sporogenes</i> では酸との有効性は変わらなかったが、APC、<i>L. innocua</i>、LAB に対してはあまり効果的ではなかった。</li> </ul>	米国	Effects of Acetic Acid, Lactic Acid and Trisodium Phosphate on the Microflora of Refrigerated Beef Carcass Surface Tissue Inoculated with <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria innocua</i> , and <i>Clostridium sporogenes</i>	Dorsa, W.J., C.N. Cutter, and G.R. Siragusa. 1996. Effects of Acetic Acid, Lactic Acid and Trisodium Phosphate on the Microflora of Refrigerated Beef Carcass Surface Tissue Inoculated with <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria innocua</i> , and <i>Clostridium sporogenes</i> . Journal of Food Protection. 60 (6) 619-624.	10.4315/0362-028X-60.6.619	16

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
枝肉洗淨	ウシ	<i>Escherichia coli</i> O157:H7、 <i>Salmonella typhimurium</i>	水洗浄後、以下の溶液を噴霧。 ・リン酸活性化 - 酸性化亜塩素酸ナトリウム (PASC) ・クエン酸活性化 - 酸性化亜塩素酸ナトリウム (CASC)  69 kPa、10 秒間、室温 (22.4 ~ 24.7 )	・枝肉表面への糞接種直後の大腸菌とサルモネラの数はいずれも、5.5、5.4 log CFU/cm <sup>2</sup> であった。 ・PASC 噴霧：3.8 ~ 3.9 log サイクルまで減少 ・CASC 噴霧：4.5 ~ 4.6 log サイクルまで減少 ・水洗浄のみで得られた対応する減少値は 2.3 log であった。 ・CASC が PASC より優れているようであった。	米国	Reduction of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 and <i>Salmonella typhimurium</i> on Beef Carcass Surfaces Using Acidified Sodium Chlorite	Castillo, A., Lucia, L.M. Kemp, G.K., and Acuff, G.R. 1999. Reduction of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 and <i>Salmonella typhimurium</i> on Beef Carcass Surfaces Using Acidified Sodium Chlorite. Journal of Food Protection. 62 (6) 580 - 584.	10.4315/0362-028X-62.6.580	17
枝肉洗淨	ブタ	<i>Salmonella typhimurium</i>	2%乳酸：pH 2.3 5%乳酸：pH 1.9 ・コールド LAD：11 ・ホット LAD：55  30、60、120 秒間噴霧 20 cm の距離から、400 mL/min で噴霧。	・ <i>S. typhimurium</i> の表面汚染は 1 ~ 2 log <sub>10</sub> cfu/cm <sup>2</sup> であった。 ・ホット LAD、30 秒間で、1 log <sub>10</sub> cfu/cm <sup>2</sup> 接種枝肉からサルモネラを除去した。 ・2%および5%のコールド LA の 60 秒間処理は、約 1 log <sub>10</sub> cfu/cm <sup>2</sup> 接種枝肉からサルモネラを除去した。 ・2%および5%のホット LA の 60 ~ 120 秒間噴霧により、約 2 log <sub>10</sub> cfu/cm <sup>2</sup> の除去も達成することができた。	オランダ	Lactic acid decontamination of fresh pork carcasses: a pilot plant study	Van Netten, P., D.A.A. Mossel, and J. Huis In't Veld. 1995. Lactic acid decontamination of fresh pork carcasses: a pilot plant study. International Journal of Food Microbiology. 25 (1) 1-9.	10.1016/0168-1605(94)00039-9	18

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
冷却冷蔵	ブタ	<i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>4、空冷(通常の冷蔵)</li> <li>4、断続的な水噴霧冷蔵(冷蔵の最初の8時間、20分毎に11秒間、4の水を噴霧)</li> <li>屠殺後、直ちに2% L-乳酸を噴霧してから通常冷蔵</li> </ul> <p>噴霧は枝肉から40 cmの距離。20 psi、電極100 V。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2%乳酸噴霧はどちらの細菌も減少させた。</li> <li>24時間の冷蔵保管後、乳酸噴霧群のみでサルモネラ属の生存が減少した。</li> </ul>	米国	Prevalence of <i>Campylobacter</i> spp. and <i>Salmonella</i> spp. on Pork Carcasses and the Reduction Effected by Spraying With Lactic Acid	Epling, L.K., J.A. Carpenter, and L.C. Blankenship. 1993. Prevalence of <i>Campylobacter</i> spp. and <i>Salmonella</i> spp. on Pork Carcasses and the Reduction Effected by Spraying With Lactic Acid. <i>Journal of Food Protection.</i> 56 (6) 536-537	10.4315/0362-028X-56.6.536	19
枝肉洗浄	ブタ	aerobic bacteria, anaerobic bacteria, <i>Lactobacillus</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>SW処理:水噴霧(25.4 L/min)</li> <li>SSAA処理:SW処理後、2%酢酸噴霧(6.8 L/min)</li> <li>SSCI処理:SW処理後、200 ppm 次亜塩素酸ナトリウム噴霧(6.8 L/min)</li> </ul> <p>12.8、1378 kPa (200 psi)。 実験的肉洗浄ユニットで噴霧、10 cm/sで通過させ、両側を噴霧した。</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>処理直後と14日、21日、28日における好気性菌、嫌気性菌、<i>Lactobacillus</i>属の数は、SSAA処理で有意に低かった。</li> <li>14日の保存期間中、SSCI処理はコントロール群より微生物数が低かった。</li> <li>SW処理は処理直後のみ、コントロールより有意に微生物数が低かった。</li> </ul>	米国	Effects of Washing and Sanitizing on the Bacterial Flora of Vacuum-Pack aged Pork Loins	Cacciarelli, M.A. W.C. Stringer, M.E. Anderson, and H.D. Naumann. 1983. Effects of Washing and Sanitizing on the Bacterial Flora of Vacuum-Packaged Pork Loins. <i>Journal of Food Protection.</i> 46 (3) 231-234.	10.4315/0362-028X-46.3.231	20

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
枝肉洗浄	ブタ	<i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>水温 60、75、80、85、90 で 40 秒間処理。</li> <li>水温 90、20、60、90 秒間処理。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>85 で 20 秒間の水処理により、枝肉表面のすべての領域で、未処理の枝肉と比較して、細菌の総数が 2 桁減少した。</li> <li>非耐熱性の腐敗細菌は約 50% から約 10% に減少した。</li> <li>水温を 85 以上に上げたり、処理時間を 20 秒以上にしても、数をさらに減らすことはできず、また、生存している菌叢の組成が変わった。</li> </ul>	カナダ	Decontamination of commercial, polished pig carcasses with hot water	Gill, C.O., D.S. McGinnis, J. Bryant, and B. Chabot. 1995. Decontamination of commercial, polished pig carcasses with hot water. Food Microbiology. 12 (2) 143-149.	10.1016/S0740-0020(95)80090-5	21
			枝肉 800 サンプルに対し、85 の水で 20 秒間処理	<ul style="list-style-type: none"> <li>腐敗細菌および大腸菌の log<sub>10</sub> 数を一貫して 2.5 以上減少させた。</li> </ul>					
冷却冷蔵	ブタ	<i>Escherichia coli</i> , <i>psychrotrophic pseudomonads</i>	<p>A: 冷蔵装置 (-1~2℃) にて、約 5% の水を 10 分 20 秒間噴霧</p> <p>B: -20℃ の冷凍トンネルは 45~60 分で通過後、冷蔵</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>冷却前に凍結エアブラストを施した枝肉サンプルの最終深部温度、大腸菌の算出された増殖値、およびシュードモナス菌の算出された増殖値のデータは、従来の冷却過程を通過した枝肉のデータと比較して、より低く、より狭い範囲に分布していた。</li> </ul>	カナダ	Assessment of the hygienic efficiencies of two commercial processes for cooling pig carcass	Gill, C.O., and T. Jones. 1992. Assessment of the hygienic efficiencies of two commercial processes for cooling pig carcass. Food Microbiology. 9 (4) 335-343.	10.1016/0740-0020(92)80041-2	22

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
冷却冷蔵	ウシ	<i>Escherichia coli</i>	一般的な冷蔵 (空気が4を超えると冷却装置のスイッチが入り、2を下回るとスイッチが切れる)	<ul style="list-style-type: none"> <li>ウシ筋肉の深部温度を7まで冷やすのに必要な時間は、平均で24.6時間、最も長いサンプルで約50時間であった。</li> <li><i>E.coli</i> 増殖が最も高かったサンプルでは、7まで冷やすのに30時間要した。</li> <li>どちらの場合も、表面の温度が7に冷えるまでに要する時間は20時間であった。</li> </ul>	ニュージーランド	Use of a temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a beef carcass cooling process	Gill, C.O., J.C.L. Harrison, and D.M. Phillips. 1991. Use of a temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a beef carcass cooling process. Food Microbiology. 8 (2) 83-94.	10.1016/0740-0020(91)90001-1	23
冷却冷蔵	ヒツジ	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	<i>E. coli</i> または <i>Salmonella typhimurium</i> とヒツジ肉組織をプレディング。 <ul style="list-style-type: none"> <li><math>10^4</math> cells/g</li> <li>0~2で一晩冷蔵</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>大腸菌群の生育の最低温度は8であった。</li> <li><i>Escherichia coli</i> と <i>Salmonella typhimurium</i> の Lagtime は10で23.35時間であった。</li> <li>10での世代時間は6.68時間であった。</li> <li>Lag time と世代時間は、温度が低くなるにつれて長くなる。</li> </ul>	オーストラリア	The generation time, lag time, and minimum temperature of growth of coliform organisms on meat, and the implications for codes of practice in abattoirs	Smith, M.G. 1985. The generation time, lag time, and minimum temperature of growth of coliform organisms on meat, and the implications for codes of practice in abattoirs. Journal of Hygiene Cambridge. 94 (1) 289-300.	10.1017/S0022172400061519	24
-	-	Staphylococcal	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>毒素産生の至適温度は35~39である。</li> <li>増殖温度域はとても幅広く、7~48である。</li> <li>エンテロトキシンの生成はやや狭い温度域であり、10~45である。</li> </ul>	米国	Staphylococcal Growth and Enterotoxin Production-Factors for Control	T Troller, J.A. 1976. Staphylococcal Growth and Enterotoxin Production-Factors for Control. Journal of Milk and Food Technology. 39: 499-503.	10.4315/0022-2747-39.7.499	25

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
-	-	<i>Staphylococcus aureus</i> S-6	<ul style="list-style-type: none"> <li>増殖用基本培地は4% N-Z Amine NAK にナイアシン 10 mg/L、チアミン 0.5 mg/L を添加して使用。</li> <li>pH は 1.0 N NaOH、または 0.1 N HCl で調整した。</li> <li>NaCl 濃度は適切な量の NaCl を培地に直接加えて調整。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>エンテロトキシンの生産が最も高いのは、至適生育条件の 39.4 °C、pH 7.0 である。</li> <li>20 °C、45 °C 以上、pH 4.5、NaCl 12% により、2 つのエンテロトキシン (A と B) の生成は完全に阻害された。</li> <li>NaCl 濃度の上昇はエンテロトキシンの生産を減少させ、SEA より SEB の生産により明白な影響を及ぼした。</li> </ul>	米国	Effect of Temperature, pH and Sodium Chloride Concentrations on Production of Staphylococcal Enterotoxins A and B	Pereira, J.L., S.P. Salsberg, and M.S. Bergdoll. 1982. Effect of Temperature, pH and Sodium Chloride Concentrations on Production of Staphylococcal Enterotoxins A and B. Journal of Food Protection. 45: 1306-1309.	10.4315/0362-028X-45.14.1306	26
-	ウシ、仔羊	<i>Yersinia enterocolitica</i> -like Organisms	<ul style="list-style-type: none"> <li>市販業者からの、真空パッケージされた新鮮な牛肉とラムの卸売肉を 21 ~ 35 日間、1 ~ 3 °C で保存した。</li> <li>耐冷性細菌の数は適切な希釈液 0.1 mL を plate count agar に塗抹して 10 日間、7 °C で培養して決定した。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>分離された <i>Yersinia enterocolitica</i> 様の微生物は、非真空条件下より、真空条件下で 28 日間保存した場合の方が高頻度であった。</li> <li>高真空条件下パッケージした肉から高発生率で分離された。</li> </ul>	米国	<i>Yersinia enterocolitica</i> -like Organisms from Vacuum-pack aged Beef and Lamb	Hanna, M.O., D.L. Zink, Z.L. Carpenter, and C. Vanderzant. 1976. <i>Yersinia enterocolitica</i> -like Organisms from Vacuum-packaged Beef and Lamb. Journal of Food Science. 41: 1254-1256.	10.1111/j.1365-2621.1976.tb14436.x	27

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
-	ウシ、ブタ	<i>Yersinia enterocolitica</i>	肉サンプルへの接種は0.1 mLのBHI培養液を上部表面に塗り拡げた。この接種菌液は多くの場合、肉1gあたり $10^2 \sim 10^3$ の <i>Y. enterocolitica</i> が得られる。サンプルは1、5、7、25のインキュベーターで保存した。	<ul style="list-style-type: none"> <li>0~1 で10日間以上保存した生牛肉において3種の<i>Y. enterocolitica</i>の数は増加した。</li> <li>7 (0~10日間)または25 (0~24時間)で保存した生、または調理済みの牛肉と豚肉において、<i>Y. enterocolitica</i>の数は著しく増大した。</li> <li>25における<i>Y. enterocolitica</i>の数の増加は、生より調理済みの方がやや大きかった。</li> </ul>	米国	Development of <i>Yersinia enterocolitica</i> on Raw and Cooked Beef and Pork at Different Temperatures	Hanna, M.O., J.C. Stewart, D.L. Zink, Z.L. Carpenter, and C. Vanderzant. 1977. Development of <i>Yersinia enterocolitica</i> on Raw and Cooked Beef and Pork at Different Temperatures. Journal of Food Science. 42: 1180-1184.	10.1111/j.1365-2621.1977.tb14455.x	28
冷却冷蔵	-	<i>Clostridium botulinum</i> type E、 <i>Yersinia enterocolitica</i> 、 <i>Listeria monocytogenes</i> 、Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> 、 <i>Aeromonas hydrophila</i>	(5で生育可能な細菌による毒素産生についてのレビュー文献である)	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Clostridium botulinum</i> type E、<i>Yersinia enterocolitica</i>、Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>、<i>Listeria monocytogenes</i>、<i>Aeromonas hydrophila</i>を含む細菌は、5の食品でも競争的に生育できる。</li> <li><i>Campylobacter jejuni</i>と<i>Brucella</i>は25や37と比べて、5の方が長い期間、生存する。</li> <li>ある種の病原菌(サルモネラ、黄色ブドウ球菌、<i>Vibrio parahaemolyticus</i>、<i>Bacillus cereus</i>)の生育は、温度が5より少し高く、12までである。</li> </ul>	米国	Is Refrigeration Enough to Restrain Foodborne Pathogens?	Palumbo, S.A. 1986. Is Refrigeration Enough to Restrain Foodborne Pathogens? Journal of Food Protection. 49(12) 1003-1009.	10.4315/0362-028X-49.12.1003	30



工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
冷却冷蔵	(食品)	Salmonella e、Staphylococci	S. senftenberg 775W、S. enteeritidis、S. manhattan の混合培養と、Staph. aureus 196E、Staph. aureus MF159、Staph. aureus Ms149 の混合培養を、カスタード、チキンアラキング、ハムサラダ中で5日間、2 °F 間隔で 40 ~ 50 °F と 95 °F で培養	腐敗しやすい食品におけるサルモネラ属とブドウ球菌の生育は、内部温度が 42 °F 以下の時、防がれる。	-	Time-temperature Effects on Salmonellae and Staphylococci in Foods	Angelotti, R., M.J. Foter, and K.H. Lewis, 1961. Time-temperature Effects on Salmonellae and Staphylococci in Foods. American Journal of Public Health. 51: 76-88.		31
冷却冷蔵	-	Salmonella	温度勾配インキュベーターに、サルモネラ属菌を寒天に塗抹して 18 時間、Trypticase Soy broth で培養したものを入れた。温度勾配インキュベーターにおいて、斜光照明により目視で最低生育温度を確認した	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ S. derby、S. heidelberg、S. typhimurium は液体培地中で、1.1 ~ 12.3 の範囲で生存あるいは生育した。</li> <li>・ 19 日間培養した S. heidelberg の最低生育温度は 5.3 であった。</li> <li>・ 19 日間培養した S. typhimurium、S. derby の最低生育温度はそれぞれ、6.2 、6.9 であった。</li> </ul>	米国	Low Temperature Growth of Salmonella	Matches, J.R., and J. Liston. 1968. Low Temperature Growth of Salmonella. Journal of Food Science. 33: 641-645.	10.1111/j.1365-2621.1968.tb09092.x	32

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
冷却冷蔵	-	<i>Escherichia coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>温度勾配 L 型チューブに生菌数 log<sub>10</sub>3 CFU/mL を接種し、温度勾配インキュベーターにて 5 ~ 50 で振盪培養。</li> <li>最低生育温度は 250 mL フラスコに 100 mL の BHI を入れ、150 rpm で 15、12、10、8、5 で培養して決定した。</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>調査した全ての大腸菌株は少なくとも 10 ~ 45 で生育し、一部の株は 8 でも生育した。</li> <li>テストした 16 株のうち、3 株は 10 で 4 ~ 6 日目における生菌数が 1000 倍増加した。</li> </ul>	米国	Minimum and Maximum Temperatures for Growth and Verotoxin Production by Hemorrhagic Strains of <i>Escherichia coli</i>	Palumbo, Samuel A., Jeffrey E. Call, Frankie J. Schultz, and Aaron C. Williams. 1994. Minimum and Maximum Temperatures for Growth and Verotoxin Production by Hemorrhagic Strains of <i>Escherichia coli</i> . Journal of Food Protection. 58 (4) 352-356.	10.4315/0362-028X-58.4.352	34
湯はぎ	ブタ	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter</i>	<p>2つのプラントにおいて、以下をサンプリングし微生物量を測定。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>脱毛機器のデトリタス、タンクに戻ってきた水、タンクの中の水</li> <li>枝肉のふき取りサンプル（脱毛装置、研磨装置を通過した枝肉）</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>両プラントの機械由来のデトリタスの、タンク水(50、57)のすべてから <i>E. coli</i>, <i>Salmonella</i>, <i>Campylobacter</i> が検出された。</li> <li>脱毛装置、研磨装置を通過した枝肉からは、<i>E. coli</i>, <i>Campylobacter</i> は検出されたが、どちらのプラントの枝肉でも <i>Salmonella</i> は検出限界以下だった。</li> <li>大規模なと畜場における脱毛装置は、豚肉を汚染している中温性腸管病原菌の源であると考えられる。</li> </ul>	カナダ	The presence of <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> and <i>Campylobacter</i> in pig carcass dehairing equipment	Gill, C.O., and J. Bryant. 1993. The presence of <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> and <i>Campylobacter</i> in pig carcass dehairing equipment. Food Microbiology 10 (4) 337-344	10.1006/fmic.1993.1039	35

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
湯はぎ	ブタ	<i>Salmonella</i>	約 62 の湯桶に入れて、スクレイピング機またはハンドスクレイピングで処理。	水温が 62 に維持されていたにもかかわらず、すべてのサルモネラが殺菌されなかった。	オランダ	Studies on <i>Salmonella</i> in slaughter-houses	Kampelmacher, E.H., P.A.M. Guinee, K. Hofstra, and A. Van Keulen. 1961. Studies on <i>Salmonella</i> in slaughter-houses. Zentralbl. Veterinaermed. Reihe. 8:1025-1042.	10.1111/j.1439-0442.1961.tb00679.x	36

\* 効果があったとする実験の条件など

日本語文献

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
剥皮 (器材消毒)	ウシ	一般細菌	デハイダー外部の消毒： 各温度（83、85、90）と時間（1秒、2秒、3秒）温湯消毒（刃を回転させて消毒）	温度に関わらず、3秒の温湯消毒後、 $2.2 \times 10^1 \sim 4.4 \times 10^2$ CFUまで減少。	日本 (広島)	と畜場におけるデハイダーの汚染状況調査と消毒法の検討	森中重雄 他 『と畜場におけるデハイダーの汚染状況調査と消毒法の検討』 広島県獣医学会雑誌, (28), p.109-112 (2013)		37 J29
			デハイダー内部の消毒： 85 温湯消毒（15秒～5分）（刃は静止状態）	85 1分以上の温湯消毒後は一般細菌が検出されなかった。					
枝肉洗浄	ウシ	一般生菌数	塩素洗浄： 100 ppm の塩素水（と畜場 ABC） 50～60 ppm の塩素水（と畜場 D）	塩素水による洗浄は、必ずしも菌の減少につながらない、という結果。 一般生菌数： と畜場 A、B、C：洗浄前後で菌数に大きな変化なし。 と畜場 D：洗浄処理により一般生菌数が 3/100 に減少。（ $181.6 \sim 5.7 \text{cfu/cm}^2$ ）	日本 (北海道)	と畜場における塩素洗浄の効果について	池田徹也 他 『と畜場における塩素洗浄の効果について』 北海道立衛生研究所報, (59), p.63-65 (2009)		38 J57
全行程	ブタ	生菌数	スキンナーのドラム上部および側面の2カ所にあるドラム洗浄水の排出口のうち上部を停止	体表面インクを噴霧したブタと体を用いて解体処理することにより、体表のインクがどのように枝肉に付着するかを調査。 縦型スキンナーによる全剥離工程での枝肉汚染が著しいことがわかった。  インク付着部（前肢および右胸部）の細菌数はすべて $10^2 \text{cfu/cm}^2$ 以上であったのに対し、非付着部（背部および左胸部）はすべて $10^2 \text{cfu/cm}^2$ 未満。	日本 (岩手)	豚枝肉における体表由来汚染のインク着色による検討	齊藤伸明 他 『豚枝肉における体表由来汚染のインク着色による検討』 日本獣医師会雑誌, 60(10), p.738-741 (2007)	10.12935/jvma1951.60.738	39 J87

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
全行程	ウシ	一般生菌、大腸菌、大腸菌群	<ul style="list-style-type: none"> <li>・省令改正前</li> <li>・省令改正後</li> <li>・改善後（手指の洗浄、デバイダーの消毒、生体洗浄・デバイダーの使用方法についての改善）での比較</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・一般生菌は省令改正前後で有意に減少。 改正前： 2.91±0.49CFU/cm<sup>2</sup> 改正後： 2.65±0.69CFU/cm<sup>2</sup></li> <li>・改善措置終了後のさらなる有意な減少なし。</li> <li>・大腸菌の検出なし</li> </ul>	日本（北海道）	牛解体処理施設における自主衛生管理の検証について	斉藤聡 他『牛解体処理施設における自主衛生管理の検証について』食品衛生研究, 52(5), p.77-86 (2002)		40 J122
剥皮	ウシ	生菌数、大腸菌数	剥皮法の改善（前処理での前肢・胸部の剥皮を廃止し、前肢は皮に切れ目を入れるだけに、乳房切除は胸部剥皮前とし、全剥皮の直前に胸部・腹部の正中線に切れ目を入れ、エアナイフによる最小限剥皮後、ダウンプレーヤー（縦型剥皮器）にて尾から頭部までを一気に剥皮する）	<ul style="list-style-type: none"> <li>・生菌数：改善前 3.7 ± 3.9CFU/cm<sup>2</sup> から改善後 2.0 ± 2.3CFU/cm<sup>2</sup> へと有意に減少（<i>P</i> &lt; 0.001）。</li> <li>・大腸菌数：改善前は 28 検体中 8 検体で検出（検出率 28.6%）、改善後は 82 検体中 3 検体（検出率 0.04%）に下がった。全検体中の大腸菌数平均も 3.0 ± 7.9 CFU/cm<sup>2</sup> から 0.05 ± 0.26CFU/cm<sup>2</sup> へと有意に減少（<i>P</i> &lt; 0.05）。</li> </ul>	日本（北海道）	食肉処理センターにおける大動物処理工程改善による効果	尾金宰 他『食肉処理センターにおける大動物処理工程改善による効果』日本獣医師会雑誌, 53(3), p.159-162 (2000)	10.12935/jvma1951.53.159	41 J134
消毒・殺菌	ブタ	生菌数、大腸菌群数	以下を用いて 1 分間消毒 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 0.3% フマル酸 (A)</li> <li>・ 2.0% 酢酸 (B)</li> <li>・ 電解水 (C)</li> <li>・ 未消毒 (D)</li> </ul>	と殺・放血、洗浄後： <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 胸部・背部とも：生菌数 10<sup>2</sup> ~ 10<sup>6</sup>cfu/cm<sup>2</sup> 以下、大腸菌群 10<sup>2</sup>cfu/cm<sup>2</sup> 以下であったものが、AB では、生菌数 10<sup>3</sup>cfu/cm<sup>2</sup> 以下となり、大腸菌群もほとんど検出されなかった。C では、生菌数 10<sup>1</sup> オーダー程度の減少しかみられず、大腸菌群もほとんど減少しなかった。D は変化</li> </ul>	日本	と畜場における衛生的な食肉（枝肉）生産に及ぼす豚体表の微生物汚染	品川邦汎 他『と畜場における衛生的な食肉（枝肉）生産に及ぼす豚体表の微生物汚染』食肉に関する助成研究調査成果報告書, 17, p.332-336 (1999)		42 J135

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
				なし。 全剥離後： ・胸部：AB では消毒殺菌後より生菌数増加、CD では減少。 ・背部：ABC ともやや増加。D は減少。 処理工程の最終枝肉： ・胸部・背部とも： A、B ではC、D に比べ、生菌数は $10^1 \sim 10^2$ オーダー少なく、大腸菌群汚染も明らかに少ない。					
移送	ウシ	一般生菌数	軍手・ステンレスワイヤ手袋、塩化ビニール手袋、素手での移送 ・移送距離：約 14m ・移送時間：約 50 秒	素手で移送した場合のみ、移送前後の枝肉表面の生菌に有意な増加は認められず、軍手・ステンレスワイヤ手袋・塩化ビニール手袋を用いた場合は枝肉表面の生菌数は有意に増加。	日本(埼玉)	作業用手袋を介してのと畜場枝肉の汚染	板屋民子 他 『作業用手袋を介してのと畜場枝肉の汚染』 日本獣医師会雑誌, 52(1), p.37-40 (1999)	10.12935/jvma1951.52.37	43 J138
消毒洗浄	ブタ	生菌数、大腸菌群数	実態調査に基づく改善：ナイフ、デハイダー、枝肉をつるすフックおよび胸割りノコを、解体処理1頭ごとに83以上の温湯で洗浄消毒し、さらにと体および枝肉同士の接触を防止。	・剥皮直後枝肉：改善前後ともに、縦型スキンナー剥皮部位における生菌汚染率は低く(54検体中20検体)、大腸菌群はすべてで不検出。 ・最終枝肉：改善前は、30頭中8検体で認められた大腸菌汚染が、改善後は24頭中0頭であった。生菌汚染率は大きく変わらなかった。	日本(北海道)	剥ぎ上げ方式縦型スキンナー使用時の豚枝肉汚染	原啓二 他 『剥ぎ上げ方式縦型スキンナー使用時の豚枝肉汚染』 日本獣医師会雑誌, 51(11), p.687-691 (1998)	10.12935/jvma1951.51.687	44 J140
消毒・殺菌	ブタ	生菌数、大腸菌群数	体表を以下の薬剤および熱湯により消毒・殺菌(1分間) ・0.3%フマル酸 ・2.0%酢酸	・生菌数：フマル酸および酢酸で消毒殺菌した場合、生菌数および大腸菌群汚染のいずれも効果的に減少(消毒なし： $10^2 \sim 10^5$ cfu/cm <sup>2</sup> のところ、	日本	食肉処理場における豚枝肉の微生物コントロールのためにと食肉処理場の	品川邦汎 他 『食肉処理場における豚枝肉の微生物コントロールのためにと食肉処理場の		45 J145

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
			<ul style="list-style-type: none"> <li>・5.0%リン酸三ナトリウム</li> <li>・80 熱湯 (一頭当たり 10 L)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・<math>10^2</math>cfu/cm<sup>2</sup>以下に低下)</li> <li>・大腸菌：消毒なしの場合は 40～60%が汚染されていたが、どの薬剤による消毒でも 77～95%が検出限界以下となった。</li> </ul>		検討	成果報告書, 15(1996), p.306-312 (1997)		
			体表の水分除去後、処理工程中のシャワーを全て停止 (ドライシステムの解体処理)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・通常処理 (シャワーリング実施) に比べ、全剥皮後のと体の細菌汚染 (生菌数、大腸菌群数) は明らかに低下。</li> </ul>					
剥皮	ブタ	生菌数、大腸菌群数	剥ぎ上げ方式縦型スキナーと横型スキナーの比較	<ul style="list-style-type: none"> <li>・剥ぎ上げ方式縦型スキナーにおける全剥皮後の背部の生菌数は 8 検体 (89%) が 10 未満であり、大腸菌群は全検体が不検出だった。</li> <li>・横型スキナーにおける全剥皮後の胸部および腹部では、生菌数は <math>10^3 \sim 10^5</math> 未満と同程度の汚染を受けていた。</li> </ul>	日本 (北海道)	剥ぎ上げ方式縦型スキナーと横型スキナーにより全はく皮した豚と体の微生物汚染	渡辺正基 他 『剥ぎ上げ方式縦型スキナーと横型スキナーにより全はく皮した豚と体の微生物汚染』 北海道獣医師会雑誌, 41(5), p.111-114 (1997)		46 J150
剥皮	ブタ	生菌数、大腸菌群数	全剥皮 (スキナーで剥皮後、滑り台を通過するまで) 工程で、一頭処理 (全剥皮) ごとにスキナーおよび滑り台を 50 の 100 ppm 次亜塩素酸ナトリウムで消毒。	<ul style="list-style-type: none"> <li>・全剥皮の横型スキナーは、と体 (背部) の細菌汚染を減少させることはできなかった。</li> <li>・縦型スキナーは、と体との接触がなく、と体 (背部) 汚染も少なかった。</li> </ul>	日本	食肉処理場における危害分析重要管理点 (HACCP) 方式による微生物制御法確立のための基礎的研究	品川邦汎 他 『食肉処理場における危害分析重要管理点 (HACCP) 方式による微生物制御法確立のための基礎的研究』 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 14(1995), p.281-286 (1996)		47 J151
内臓摘出	ブタ		水のシャワーリング (誤って腸管を損傷し、腸内容物をと体に汚染した場合)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・腸管損傷による汚染 (生菌数 <math>10^4 \sim 10^7</math>cfu/cm<sup>2</sup>) は、約 <math>10^2</math>cfu/cm<sup>2</sup> オーダーの減少。</li> <li>・繁留所の豚体表の微生物汚染 (生菌数 <math>10^4 \sim 10^7</math>cfu/cm<sup>2</sup>) は、シャワーリングにより、<math>10^3 \sim 10^5</math>cfu/cm<sup>2</sup> に減少。</li> </ul>					

工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
冷蔵	ウシ	一般生菌数	冷却中の細菌数の経時変化。 ・と殺直後 ・5時間後(0.5 ) ・24時間後(-1.8 )	いずれのと体においても、と殺直後、5時間後、24時間後において枝肉胸部表面の細菌数の有意な変化はみられなかったが、24時間後の細菌数(平均 $7.4 \times 10^2 / \text{cm}^2$ )の方がと殺直後の細菌数(平均 $1.2 \times 10^3 / \text{cm}^2$ )よりも少なかった。	日本(群馬)	と殺後の温度管理による食肉の微生物制御に関する研究	豊福肇 『と殺後の温度管理による食肉の微生物制御に関する研究』 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 14(1995), p.277-280 (1996)		48 J152
剥皮 洗淨	ブタ	一般生菌数、大腸菌群数、黄色ブドウ球菌数、サルモネラ	<実態調査> 解体洗淨後、冷蔵庫に入る前の豚枝肉をサンプリング (放血後、刀により胸腹部の皮をはぎ(前処理)内蔵摘出及び頭部切除、その後自動皮はぎ機により皮を除去、背割り、自動洗淨機で洗淨)	<ul style="list-style-type: none"> <li>一般生菌数は、<math>3.7 \times 10^3 \sim 2.1 \times 10^6</math>と非常に変動が大きい。(京都)</li> <li>大腸菌群は3検体を除く57検体(95%)から検出された。菌数の範囲は<math>2.7 \times 10^3</math>以下、菌数が300以下の検体は62%。</li> <li>黄色ブドウ球菌は、頸部4検体、大腿部2検体の計6検体(10%)から検出された。菌数は全て300以下。</li> <li>サルモネラは、全く検出されなかった。</li> </ul>	日本(京都)	皮はぎによる豚枝肉の細菌学的汚染検査について	京都市衛生公害研 『皮はぎによる豚枝肉の細菌学的汚染検査について』 京都市衛生公害研究所年報, 61(1994), p.93-95 (1995)		49 J157



工程	対象動物	微生物	工程のパラメータ*	概要	国	論文タイトル	書誌事項	Doi	文献ID
剥皮	ブタ	<i>E. coli</i> , 黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌属	縦型スキナーあるいは横型スキナーによる剥皮  一般細菌数：1 cm <sup>2</sup> 当たりの一般細菌数 大腸菌群数：1 cm <sup>2</sup> 当たりの大腸菌群数	横型スキナー： 一般細菌数： 左前肢：平均 $8.7 \times 10^1$ 右背部：平均 $5.8 \times 10^1$ 大腸菌群数： 左前肢：5 頭で検出、30 以下 右背部：3 頭で検出、30 以下。  縦型スキナー： 一般細菌数： 左前肢：平均 $4.8 \times 10^2$ 左背部：平均 $2.0 \times 10^2$ 大腸菌群数： 左前肢：平均 $2.2 \times 10^2$ 右背部：1 頭で検出、30 以下  横型スキナー例および縦型スキナー例における各部位での一般細菌数と付着豚毛数の相関はなかった。	日本(北海道)	豚枝肉における豚毛の付着状況と微生物汚染状況	渡辺正基 他 『豚枝肉における豚毛の付着状況と微生物汚染状況』 北海道獣医師会雑誌, 39(6), p.120-124 (1995)		50 J159
洗浄	ブタ	一般細菌数、大腸菌群数、低温細菌数	洗浄水の残留塩素濃度 (0.1ppm、1ppm) での 高圧洗浄 1 頭ずつの個別洗浄  と体の徹底洗浄後、器材や作業者の指を 1 頭ごとに消毒	洗浄機導入前後の比較 一般細菌数：枝肉頸部で $10^3$ 台から $10^2$ 台に減少。部分肉では導入前後とも $10^3$ 台であった。 大腸菌群数： $10^2$ 台が $10^0$ 台に減少。  通常処理と比較して、器材や指の消毒をしなかった場合と比較して、一般細菌数は減少。	日本(北海道)	と畜場及び食肉処理場の微生物制御に関する調査について	早船克己 他 『と畜場及び食肉処理場の微生物制御に関する調査について』 北海道獣医師会雑誌, 39(3), p.55-57 (1995)		51 J160

\*効果があったとする実験の条件など