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

と畜・食鳥処理場における HACCP 検証手法の確立と食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究

令和２～４年度　総合・分担研究報告書

研究代表者　　朝倉　宏

令和５（2023）年　３月

と畜・食鳥処理場における HACCP 検証手法の確立と食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究

研究代表者　　朝倉　宏

令和 5（2023）年　3 月

目　次

Ⅰ．総合研究報告

と畜・食鳥処理場における HACCP 検証手法の確立と
食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究
朝倉　宏
---------- 3

Ⅱ．分担研究報告

1. と畜場におけるHACCP外部検証に関する研究
と畜場における HACCP 外部検証・内部検証に関する研究
森田　幸雄　　他
---------- 61
馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究
朝倉　宏　　他
---------- 73
外部検証プロトコルの妥当性評価に関する研究
大屋　賢司　　他
---------- 79
と畜場におけるリステリア属菌の汚染実態とリスク管理に関する研究
朝倉　宏　　他
---------- 90
2. 食鳥処理場における HACCP 外部検証に関する研究
朝倉　宏　　他
---------- 94
3. 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究
生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究
中馬　猛久　　他
---------- 103
生食用食鳥肉の微生物汚染実態調査及びその製造工程管理に関する情報調査
朝倉　宏　　他
---------- 109
4. と畜場・食鳥処理場の内部検証に関する研究
山崎　栄樹
---------- 117
5. 国際動向を踏まえた情報の収集整理
廣井　豊子
---------- 127
6. HACCP 検証の評価方法に関する研究
小関　成樹
---------- 138

Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表
---------- 143

令和２～４年度　研究代表者・研究分担者及び研究協力者

研究代表者

朝倉　宏	国立医薬品食品衛生研究所

研究分担者

森田　幸雄	麻布大学
中馬　猛久	鹿児島大学
小関　成樹	北海道大学
山崎　栄樹	帯広畜産大学
大屋　賢司	国立医薬品食品衛生研究所
廣井　豊子	至学館大学

研究協力者

安達　悠太	麻布大学
有田　佳子	国立医薬品食品衛生研究所
安藤　瑞恵	三重県松阪食肉衛生検査所
池田　晃	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
池田　徹也	北海道立衛生研究所
石井　弘祐	麻布大学
石沢　由起子	青森県十和田食肉衛生検査所
伊豆　一郎	熊本県食肉衛生検査所
稲田　和也	北海道早来食肉衛生検査所
岩城　多佳子	三重県松阪食肉衛生検査所
大石　和樹	麻布大学
大城　哲也	沖縄県中央食肉衛生検査所
大西　広輔	旭川市保健所
大野　祐太	北海道立衛生研究所
大畑　克彦	静岡県食肉衛生検査所
岡谷　友三	麻布大学
奥村　香世	国立感染症研究所
尾島　康世	高知市食肉衛生検査所
小野寺　仁	JA 飛騨ミート
小畑　麗	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
楓　龍治	岐阜県中央食肉衛生検査所
笠井　潔	茨城県県西食肉衛生検査所
片桐　謙	山形県庄内食肉衛生検査所
加藤　峰史	沖縄県中央食肉衛生検査所
苅和　俊宏	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
河合　浩二	豊橋市食肉衛生検査所
菊池　貴子	スターゼン㈱
葛岡　功弥子	豊橋市食肉衛生検査所
倉園　久生	徳島大学
黒木　重孝	スターゼンミートプロセッサー㈱
黒田　伸彦	山形県庄内食肉衛生検査所
小池　史晃	JA 飛騨ミート
小西　世津香	金沢市保健所食肉衛生検査所
小林　光士	JA 飛騨ミート
坂上　友康	青森県十和田食肉衛生検査所
佐々木　治美	青森県十和田食肉衛生検査所
里麻　美喜子	富山県食肉衛生検査所
佐藤　妃恵	麻布大学
佐藤　要介	茨城県県西食肉衛生検査所
品川　邦汎	岩手大学
清水　香南	麻布大学
清水　俊一	北海道早来食肉衛生検査所
下郷　晶子	日水製薬㈱
鈴木　このみ	麻布大学
高田　信子	神戸市食肉衛生検査所
田内　春香	麻布大学
田辺　美弥子	青森県十和田食肉衛生検査所
塚本　真由美	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
辻　芳裕	JA 飛騨ミート
土屋　健次	岐阜県中央食肉衛生検査所
寺地　真弓	JA 飛騨ミート
富永　正哉	沖縄県中央食肉衛生検査所
中江　優貴	静岡県食肉衛生検査所
中込　就子	麻布大学
永田　栞	麻布大学
奈須　正知	スターゼンミートプロセッサー㈱
成田　静香	スターゼン㈱
花田　千晴	山梨県食肉衛生検査所
花田　博	スターゼンミートプロセッサー㈱
馬場　俊行	スターゼンミートプロセッサー㈱
濱崎　隼人	とりさし協会
原　理洋	スターゼン㈱

久永　崇宏	静岡県食肉衛生検査所
平本　裕子	富山県食肉衛生検査所
廣瀬　絵美香	麻布大学
藤田　景清	北九州市保健福祉局保健衛生部食肉センター
藤平　裕子	北海道早来食肉衛生検査所
藤巻　勤	山梨県食肉衛生検査所
古内　功二	JA 飛騨ミート
町田　李香	国立医薬品食品衛生研究所
松岡　和代	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
南川　総子	神戸市食肉衛生検査所
三好　円	スターゼンミートプロセッサー㈱
向島　幸司	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
森越　真梨恵	旭川市食肉衛生検査所
村瀬　繁樹	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
八重森　恵子	山梨県食肉衛生検査所
安江　智雄	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
柳沼　千春	郡山市保健所食肉衛生検査所
山﨑　翔矢	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
山本　詩織	国立医薬品食品衛生研究所
渡辺　哲史	麻布大学

（敬称略、五十音順）

I. 総括研究報告

令和 2-4 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
総括研究報告書

と畜・食鳥処理場における HACCP 検証手法の確立と食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究

研究代表者　　朝倉　宏　　国立医薬品食品衛生研究所　食品衛生管理部

研究要旨：本研究では、国内全てのと畜場・食鳥処理場において衛生管理システムが適切に構築されていることを検証する手法を構築し、国産食肉・食鳥肉の更なる安全性確保の向上を図ることを目的として以下の検討を進めた。(1)と畜場における HACCP 外部検証に関する研究では、①黒毛和種牛枝肉に付着する異物について微生物学的・遺伝学的検討を進め、糞便・消化管内容物に加え、獣毛もゼロトレランスを求める必要性を示した。②馬枝肉、めん羊枝肉を対象とした外部検証微生物試験用検体の部位選定に向けた検討を進め、牛枝肉又は豚枝肉と同様の採材部位設定が妥当との知見を得た。③牛豚枝肉での外皮等から志賀毒素産生性大腸菌由来遺伝子が検出される割合を求めた上で、衛生管理にあたっての剥皮工程の重要性を示した。また、洗浄工程前後での糞便中での細菌汚染実態を調査した。④欧米のと畜場施設環境で危害要因とされるリステリアの汚染状況を国内と畜場で調査し、冷却室環境でリステリア属菌が検出され評価対象工程と考えられた一方、処理室は一般に処理後に熱温水洗浄が行われており、同菌が処理工程環境に持続汚染を呈する可能性は低いと考えられた。(2)食鳥処理場における HACCP 外部検証に関する研究では、成鶏（採卵鶏）の食鳥とたいにおける細菌汚染実態を調査し、肉用鶏に比べ、カンピロバクター汚染菌数が相対的に低いと思われる知見を得た。また、一般に CCP と位置付けられる冷却工程に着目し、冷却水中の物性・微生物的な時系列挙動を評価し、冷却工程のモニタリング指標には一般細菌数を原則としつつ、食中毒菌を対象とする際にはロットや中抜き処理工程での逸脱割合等を考慮してサンプリングを行う必要性を提起した。(3)生食用食鳥肉の衛生確保に関する研究では、①南九州地方の小規模事業者の協力を得て、処理工程の詳細情報の収集及び同工程を通じたカンピロバクター汚染挙動を評価し、製品では概ね支障ないレベルに制御できている実態を確認した。また、汚染事例に対する改善措置例を提示した。②南九州地方で製造加工された生食用食鳥肉製品の細菌汚染実態を調査し、その工程管理にあたっては食鳥処理から加工販売までを生食専用として取り扱う必要があること、中抜き・外剥ぎ方式の別による管理体制の区分化を行う必要性を提起した。また、「とりさし協会」の協力を得て、南九州地方で「とりさし」を取り扱う小規模事業者におけるアンケート調査を行い、これまでの成績を踏まえて、生食用食鳥肉の衛生管理に関するガイドライン原案を作成した。(4)と畜場・食鳥処理場の内部検証に関する研究では、外部検証との連携をとりうる事業者向けの内部検証手順書最終案を作成した。(5)国際動向を踏まえた情報の収集整理では、諸外国の関連法規やガイドライン等を収集し、特に微生物試験に関する内容の要点を纏め、検体採取方法、検体採取頻度等は国間で相違が認められる状況を把握した。(6)サンプリングプランに関する研究では、自治体より提出された外部検証データを整理・解析し、経時的な対比を行った上で、今後の課題と思われる事項を抽出した。本研究により得られた科学的知見は、我が国のと畜場・食鳥処理場の衛生管理体制をより持続性を伴った効果的・効率的なものへと発展させるために活用されうことが期待される。また、生食用食鳥肉に特化したガイドライン等の策定は、依然として加熱用食鳥肉を転用することにより多発しているカンピロバクター食中毒の発生低減へと資することが期待される。

研究分担者

森田　幸雄　麻布大学
中馬　猛久　鹿児島大学
小関　成樹　北海道大学
山崎　栄樹　帯広畜産大学
大屋　賢司　国立医薬品食品衛生研究所
廣井　豊子　至学館大学

研究協力者

安達　悠太　麻布大学
有田　佳子　国立医薬品食品衛生研究所
安藤　瑞恵　三重県松阪食肉衛生検査所
池田　晃　岐阜県飛騨食肉衛生検査所
池田　徹也　北海道立衛生研究所
石井　弘祐　麻布大学
石沢　由起子　青森県十和田食肉衛生検査所
伊豆　一郎　熊本県食肉衛生検査所
稲田　和也　北海道早来食肉衛生検査所
岩城　多佳子　三重県松阪食肉衛生検査所
大石　和樹　麻布大学
大城　哲也　沖縄県中央食肉衛生検査所
大西　広輔　旭川市保健所
大野　祐太　北海道立衛生研究所
大畑　克彦　静岡県食肉衛生検査所
岡谷　友三　麻布大学
奥村　香世　国立感染症研究所
尾島　康世　高知市食肉衛生検査所
小野寺　仁　JA 飛騨ミート
小畑　麗　岐阜県飛騨食肉衛生検査所
楓　龍治　岐阜県中央食肉衛生検査所
笠井　潔　茨城県県西食肉衛生検査所
片桐　謙　山形県庄内食肉衛生検査所
加藤　峰史　沖縄県中央食肉衛生検査所
苅和　俊宏　岐阜県飛騨食肉衛生検査所
河合　浩二　豊橋市食肉衛生検査所
菊池　貴子　スターゼン㈱
葛岡　功弥子　豊橋市食肉衛生検査所
倉園　久生　徳島大学
黒木　重孝　スターゼンミートプロセッサー㈱
黒田　伸彦　山形県庄内食肉衛生検査所
小池　史晃　JA 飛騨ミート
小西　世津香　金沢市保健所食肉衛生検査所
小林　光士　JA 飛騨ミート
坂上　友康　青森県十和田食肉衛生検査所
佐々木　治美　青森県十和田食肉衛生検査所
里麻　美喜子　富山県食肉衛生検査所
佐藤　妃恵　麻布大学
佐藤　要介　茨城県県西食肉衛生検査所
品川　邦汎　岩手大学
清水　香南　麻布大学
清水　俊一　北海道早来食肉衛生検査所
下郷　晶子　日水製薬㈱
鈴木　このみ　麻布大学
田内　春香　麻布大学
田辺　美弥子　青森県十和田食肉衛生検査所
塚本　真由美　岐阜県飛騨食肉衛生検査所
辻　芳裕　JA 飛騨ミート
土屋　健次　岐阜県中央食肉衛生検査所
寺地　真弓　JA 飛騨ミート
富永　正哉　沖縄県中央食肉衛生検査所
中江　優貴　静岡県食肉衛生検査所
中込　就子　麻布大学
永田　栞　麻布大学
奈須　正知　スターゼンミートプロセッサー㈱
成田　静香　スターゼン㈱
花田　千晴　山梨県食肉衛生検査所
花田　博　スターゼンミートプロセッサー㈱
馬場　俊行　スターゼンミートプロセッサー㈱
濱崎　隼人　とりさし協会
原　理洋　スターゼン㈱
久永　崇宏　静岡県食肉衛生検査所
平本　裕子　富山県食肉衛生検査所
廣瀬　絵美香　麻布大学
藤田　景清　北九州市保健福祉局保健衛生部食肉センター
藤平　裕子　北海道早来食肉衛生検査所
藤巻　勤　山梨県食肉衛生検査所
古内　功二　JA 飛騨ミート
町田　李香　国立医薬品食品衛生研究所
松岡　和代　岐阜県飛騨食肉衛生検査所

南川　総子　　神戸市食肉衛生検査所
三好　円　　スターゼンミートプロセッサー㈱
向島　幸司　　岐阜県飛騨食肉衛生検査所
森越　真梨恵　旭川市食肉衛生検査所
村瀬　繁樹　　岐阜県飛騨食肉衛生検査所
八重森　恵子　山梨県食肉衛生検査所
安江　智雄　　岐阜県飛騨食肉衛生検査所
柳沼　千春　　郡山市保健所食肉衛生検査所
山﨑　翔矢　　岐阜県飛騨食肉衛生検査所
山本　詩織　　国立医薬品食品衛生研究所
渡辺　哲史　　麻布大学

（敬称略、五十音順）

A．研究目的

平成30年の「食品衛生法の一部を改正する法律」の公布に伴い、と畜場・食鳥処理場については「HACCPに基づく衛生管理」が求められることとなり、令和2年5月に施行通知が出された後、令和3年6月より本格施行するはこびとなった。同体制は事業者が行う内部検証に加え、自治体等が行う外部検証も要件とされる。本研究では、国内全てのと畜場・食鳥処理場において衛生管理システムが適切に構築されていることを検証する手法を構築し、国産食肉・食鳥肉の更なる安全性確保の向上を図ることを目的として検討を行った。欧米のと畜場・食鳥処理場では従前よりHACCPシステムの科学的評価手法が導入・運用されているが、国内では大規模施設の一部、並びに食肉・食鳥肉を輸出する施設に限定的であった。一方、昨年には食鳥肉の対EU輸出も認められる等、輸出を行うと畜場・食鳥処理場数は増加傾向にあり、国産当該食品の輸出拡大を推進する上でわが国の食肉・食鳥肉の安全性を国際標準的に示すことは極めて重要な課題である。

上記の課題解決にあたり、現在事業者団体等が衛生管理に関する手引書を作成し、その普及啓発にあたっている一方、その導入・運用の適切性を判断するための検証法は未だ確立していない。検証法の構築には、採材条件（部位、頻度、工程等）や微生物試験法等を定めた上で、実効性評価や、内部・外部検証との関連性解析、工程管理目標値の設定等が求められる。これらのうち採材条件や試験方法は先行研究班で検討が進められ、牛・豚・鶏それぞれについて一定条件が設定された。一方、施設の構造・工程は多様であるため、その実効性を速やかかつ可能な限り網羅的に評価することが必要不可欠である。本研究では全国の自治体（食肉衛生検査所等）や大手事業者の協力を広く求め、多様な施設を対象に検証データを集積し、国内施設全体を対象とした実効的なHACCP外部検証法を構築提示しようとするところに特色がある。

更に、南九州地方では生食用食鳥肉が製造加工されており、管轄自治体は衛生管理に関するガイドラインを発出している。これ迄に大規模食鳥処理場・加工施設での衛生管理実態等については検討が進められ、望ましい衛生管理手法が提案されている。一方、同食品を取扱う施設の多くは小規模であることに着目し、本研究では認定小規模食鳥処理場・加工施設での衛生管理高度化に資する改善点の抽出、対策の提示と検証から成る独創的な研究項目を設定して検討を進めた。以下に、分担研究毎に研究目的等を記す。

(1) と畜場における HACCP 外部検証に関する研究

① と畜場の HACCP 外部検証・内部検証に関する研究

と畜場への HACCP 導入の制度化に伴い、と畜検査員による外部検証が行われるようになった。外部検証については、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」(生食発 0528 第 1 号、令和 2 年 5 月 28 日）により、その実施に関する手順、評価方法等に示されている。微生物試験を用いた外部検証法については、同通知により牛及び豚の検査法は示されている。しかし、と畜場法の対象となる獣畜のうち、めん羊、山羊、馬については示されていない。そこで、めん羊、山羊、馬の糞便や枝肉の細菌検査結果等の入手を試みた。

2018(平成 30)年 7 月 10 日、厚生労働省は、米国農務省食品安全局（以下「FSIS」と略）からの要請を受け、食肉処理施設において製造される冷蔵トリミング肉を検体とした志賀毒素産生性大腸菌（以

下「STEC」と略）検査の実施をアメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱に定めた。これにより、検査所および対米牛肉輸出処理施設は STEC 検査を開始した。FSIS のガイドラインにより、と畜解体より前の段階に着目した製品のロットの設定が求められる。厚生労働省は、農家単位で製品のロットを設定する方法の一例を事務連絡で示した。この設定は当面の間、論文等の既存データの活用が可能とされており、JA 飛騨ミート(GI-1 施設)は、「同一農家かつ同一と畜解体作業日の枝肉群を 1 ロットと設定する」こととした。GI-1 施設独自の成績を収集するため、体表の拭取りを行い、農家ごとに 1 検体とし STEC・O157・O26 のリアルタイム PCR 検査および細菌検査を実施した。

また、「アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱（令和 2 年 4 月 1 日財務大臣・厚生労働大臣・農林水産大臣決定別紙)」により、以前から対米牛肉輸出施設はゼロトレランス検証（目視できる糞便、消化管内容物、乳房内容物に汚染されていないことを検証すること）を実施している。さらに、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」においても、ゼロトレランス検証が明記されており臨場すると畜検査の際に、と畜検査員は計画的にゼロトレランス検証を実施している。枝肉に付着している異物は、糞便、消化管内容物、乳房内容物に加え、獣毛、レールダスト等様々である。そこで、危害分析の一助とするとともに、検証技術の向上を目的として、GI-1 施設でと畜・解体処理され、整形・トリミングから最終洗浄前の枝肉に付着する異物の肉眼像及び実体顕微鏡像の観察及びこれら異物について微生物検査を実施した。

② 馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究

国内のと畜場では HACCP に基づく衛生管理が求められることとなり、令和 2 年 5 月 28 日には厚生労働省より、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（生食発 0528 第 1 号、生活衛生・食品安全審議官通知）が発出され、各自治体の検査員はと畜場における「HACCP に基づく衛生管理」の状況を検証することが技術的助言として示された。同通知ではと畜検査員が実施する微生物試験法も示されているが、その対象は牛及び豚のみであった。周知のとおり、と畜場では牛及び豚のほか、馬やめん羊、山羊等も解体処理されており、これらを取り扱う施設における HACCP 外部検証微生物試験の在り方として、牛豚と同様でよいかを明示する根拠が見当たらない状況にあったため、馬とたいを対象とした微生物試験を行う際に、採材対象とすべき箇所の選定に係る知見を収集することを目的として検討を行った。

③ 外部検証プロトコルの妥当性評価に関する研究

国産食肉・食鳥肉の輸出が拡大され輸出を行うと畜場・食鳥処理場数が増加傾向にある中、我が国の食肉・食鳥肉の安全性を国際標準的に示すことは極めて重要である。本研究では、と畜場において実施している HACCP 外部検証法を、科学的根拠を伴った形で検証することを目的とした。

令和 2 年度には、特定の農場の牛と体拭き取り検体における衛生指標菌数と腸管出血性大腸菌（STEC)、サルモネラ属菌検出状況を検討した。

令和 3 年度から 4 年度には、複数のと畜場で豚及び牛と体の外皮拭き取り検体と枝肉切除検体における衛生指標菌数及び病原細菌（STEC 及びサルモネラ属菌）検出状況を指標に外部検証プロトコルの実効性を評価した。令和 4 年度には、上述の成果を踏まえ、剥皮前後の工程における衛生管理の重要性について、「剥皮前」と剥皮後の「枝肉」工程間の衛生指標菌数の推移と病原細菌関連遺伝子検出状況を評価した。

④ と畜場でのリステリア属菌の汚染実態と管理すべき工程に関する研究

と畜場及び大規模食鳥処理場では、HACCP に基づく衛生管理が必要とされ、自治体のと畜検査員、食鳥検査員が行う検証（外部検証）として、現場検査、微生物検査及び記録の確認等が技術的助言として厚生労働省より発出されている。このうち、微生物試験については、最終洗浄後から冷蔵迄の間にある枝肉表面を切除し、衛生指標菌（生菌数及び腸内

細菌科菌群数）の検出試験を行うこととなっている。

また、関連事業者団体が作成した、と畜場における HACCP に基づく衛生管理のための手引書では、枝肉の冷蔵庫内温度の管理が重要管理点（CCP）として例示されている。冷蔵庫内温度の管理不備は微生物の増殖を招くおそれがあるためであるが、特にリステリア・モノサイトゲネス（以下、LM）等の低温菌の増殖を招きうるリスクが、欧米では従前より懸念されており、と畜場での工程管理指標として施設環境での生残をモニタリングすることも多い状況にある。しかしながら、国内のと畜場施設環境における当該菌の汚染実態等に関する知見は乏しい状況であった。以上の背景を踏まえ、本分担研究では、あると畜場の協力を得て、牛と畜処理工程中での施設環境試料を拭き取り、LM 及びリステリア属菌の汚染実態並びに菌叢変動に関する検討を行ったので報告する。

(2) 食鳥処理場における HACCP 外部検証に関する研究

と畜場と同様、大規模食鳥処理場においても HACCP に基づく衛生管理が求められ、関連事業者である日本成鶏処理流通協会により「親鶏製品製造事業者（大規模食鳥処理場）向け HACCP に基づく衛生管理のための手引書」が 2021 年 5 月に発行された。同手引書では、冷却工程を代表的な重要管理点（CCP）として例示し、残留塩素濃度及び温度を主要な管理基準項目としている。上述の手引書の発行を受け、その後、厚生労働省は、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（令和 2 年 5 月 28 日付、生食発 0528 第 1 号）を発出し、自治体の検査員による外部検証により、各施設の衛生管理状況を HACCP に基づいてモニタリングし、必要に応じて改善指導へと繋げることを主な命題とする技術的助言を行った。

上述の手引書において示された冷却工程の管理基準としては残留塩素濃度が 30ppm、モモ中心温度が 10°C以下となっている。このうち、残留塩素濃度については、2 時間毎に測定し、30ppm 以上を維持していることを記録することを推奨している。一方でその効果については明確に示されていない状況であった。加えて、処理羽数や冷却槽の容量等により、同管理に求められる条件は異なってくるものと考えられたこと等から、本分担研究では、これまでに食鳥肉に係る重要な危害要因であるカンピロバクターが最終製品からほぼ検出されない状況にあった事業所の協力を得て、同事業所における冷却槽内の冷却水に焦点を当て、衛生に係る試験項目の挙動を経時的に検討したので報告する。

(3) 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

① 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

南九州地方では多くの認定小規模食鳥処理場及び食肉加工場で生食用の食鳥肉が製造加工されており、高度な衛生管理が望まれているが、その処理工程は小規模であるがゆえに極めて多様な方法がとられており、適切な処理方法が確立していない。そこで、本分担研究では、様々な認定小規模食鳥処理場での多様な処理工程における衛生管理実態を把握しその問題点を抽出することによって、国産食鳥肉の更なる安全性確保に資することを目的として検討を行った。

② 生食用食鳥肉製品の製造工程管理に関する情報調査

南九州地方では従前より「とりさし」と呼称される生食用食鳥肉製品が製造加工、販売・消費されている。これらは一般的に生食用に食鳥処理された食鳥とたい、または食鳥肉の皮部分をバーナー等で処理後速やかに焼烙し、短時間のうちに消費されるものとされる。一方、大都市圏の飲食店でしばしばカンピロバクター食中毒の原因食品とされる「とりさし」の多くは、加熱用食鳥肉を飲食段階で生食用に転用されたものであり、両者は製造段階から大きく異なるものであることから、南九州地方の生食用食鳥肉製品は食鳥処理段階から加工、販売に至る過程で生食用として総合的に衛生管理されている実態をこれまで調査してきた。先行研究では、当該地方の自治体の協力を得てアンケート調査を行い、当該製品の多くが小規模事業者により製造加工、販売等が行われている実態を確認してきた。更に本研究で

は、令和 2 年度より小規模事業者が製造加工、販売する「とりさし」製品における微生物学的品質を評価し、先行研究で得られた工程管理実態と紐づけることで特に留意すべき管理要件を抽出してきた。

以上の背景を踏まえ、本研究では生食用食鳥肉製品の衛生管理のために更に充実させるべき事項を整理することを目的に、「とりさし協会」の協力を得て、小規模事業者を対象としたアンケート調査を行ったので報告する。

(4) と畜場・食鳥処理場の内部検証に関する研究

と畜場・食鳥処理場において効果的な外部検証を実施するためには、検証活動の独立性を保ちながらも、事業者が自ら実施する内部検証の結果を有効活用することが望まれる。と畜場法施行規則および食鳥検査法施行規則においても事業者に対し、と畜場・食鳥処理場の管理及びと畜・食鳥処理作業の衛生的な実施に加え、それぞれの活動の効果等について検証の実施を求めている。

本研究では、自治体等が行う外部検証の効率的な実施が可能となるよう、外部検証通知との関連性並びに事業者の実行性の両面を担保した形となるよう、内部検証の手順書案の作成を目的として検討を行ったので報告する。

(5) 国際動向を踏まえた情報の収集整理

本研究では、国内のと畜場・食鳥処理場における「HACCP に基づく衛生管理」の実効的な外部検証法を構築するために有用となる情報の収集整理に向けて、既に「HACCP に基づく衛生管理」を実施している諸国の関連法規、ガイドラインや科学的知見等の情報を検索・収集することを目的として検討を行ったので報告する。

(6) HACCP 検証の評価方法に関する研究

本分担研究課題では，と畜場・食鳥処理場における「HACCP に基づく衛生管理」の実施状況の妥当性を検証するための評価検証方法を，国際的な動向を踏まえて構築することを目的として検討を進めた。令和 4 年度においては，全国のと畜場・食鳥処理場の通年での細菌検査データを収集精査して、と畜場・食鳥処理場の衛生管理状態を把握可能とするデータ評価の素案を作成することを目的とした。

B．研究方法

(1) と畜場における HACCP 外部検証・内部検証に関する研究

① と畜場の HACCP 外部検証・内部検証に関する研究

1) 食肉衛生検査所で実施されためん羊、山羊、馬の糞便、枝肉拭き取り検査集計

令和 2 年 9 月、全国食肉衛生検査所協議会微生物部会、部会長あて、めん羊、山羊及び馬の公表可能な糞便検査結果や枝肉の衛生検査結果の提供依頼を実施した。

2) めん羊枝肉表面の切除法による細菌汚染状況調査

2022(令和 4)年 11 月、通常の解体処理を行い、と畜検査を合格し、冷蔵庫に入る前のめん羊枝肉を購入した。体表を 30 か所、5×5 ㎠切り取り、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数を求めた。また、サルモネラ、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌（STEC）については定性検査を実施した。

3) スワブ法に代わると畜場内牛枝肉および豚枝肉の内部検証法の検討

令和 2 年 10 月～11 月、Ａ・Ｂの 2 つのと畜場でと畜解体され、冷却前の各 11 頭の牛・豚枝肉の左右の胸部（各 22 検体ずつ）を検体とした。検査は胸部の 25 ㎠のついて 1) 切除法、2)ふき取り法、3)スタンプ法を実施した。なお、EU の規定では、牛の洗浄後冷却前の枝肉の切除法の一般細菌数の優良レベルは 3.5 log 個/㎠未満、許容レベルは 3.5～5.0 log 個/㎠、不適合レベルは 5.0 log 個/㎠以上である。また、腸内細菌科菌群数の優良レベルは 1.5 log 個/㎠未満、許容レベルは 1.5～2.5 log 個/㎠、不適合レベルは 2.5 log 個/㎠以上である。EU の規定での一般細菌数による評価では、A と畜場の牛枝肉は、最良レベル、B と畜場の牛枝肉は許容レベル、腸内細菌科菌群による評価では、A と畜場、B と畜場ともに、最良レベルであった。A と畜場は

対米牛肉輸出処理認定施設、Bと畜場の豚の処理は湯剥き方式である。
切除法は、外部検証通知に従い、滅菌メス・ピンセット・ステンレス枠(5×5cm：25 ㎠)を用いて切除した。ふき取り法は市販拭き取り検査キット・フキトレールを用い、約 600g 圧で実施した。スタンプ法は特別に作製した 25 ㎠のスタンプ生菌数用・標準寒天とスタンプ腸内細菌科菌群用・VRBG 寒天を 600-700 g 圧で 10 秒間、枝肉の胸部に押し付ける方法で実施した。

4) 生産農家ごとの和牛の体表の STEC O157・O26 の汚染状況

令和 3 年 5 月 25 日、6 月 15 日、7 月 8 日、8 月 5 日、9 月 2 日、10 月 14 日に GI-1 施設に搬入された全ての牛について、生体の体表（肛門周囲）をスポンジで拭取り、農場ごとに 1 検体とした。拭取り採取実施農家は 72 農家のべ 185 検体 341 頭である。検体をノボビオシン加 mEC 培地で 41 ± 1 °C、18〜24 時間増菌培養し、NucleoSpin® Tissue を用いて DNA 抽出を行った。それを CycleavePCR O-157（VT gene） Screening Kit Ver. 2.0 を用いて、Thermal Cycler Dice® Real Time System Ⅲ により、VT（*stx*）遺伝子のスクリーニング検査を実施した。加えて、7 月からは CycleavePCR™ EHEC (O157/O26)Typing Kit を用いて、O157 及び O26 遺伝子のスクリーニング検査を実施した。全検体の増菌培養液を CT-クロモアガーSTEC 培地にて培養後、典型的コロニーを 3〜5 個釣菌し、純培養を行った。その後、確認検査として生化学的性状試験と血清型別試験を実施し、両者とも陽性のものについて、DNA の熱抽出を実施し、病原因子遺伝子（*stx*、*eae*）検査を実施した。

5) 黒毛和種牛の体表の汚染状況の把握

令和 2 年 11 月 10 日、GI-1 施設の係留所内で、5 頭の黒毛和種牛の糞便および体表を採取した。糞便は、1 頭について 25g 以上の排泄便を採取した。体表検体は、体表 15 か所（頸部正中、肘外側左右、胸部正中、腹部正中、くるぶし外側左右、内もも左右、もも後左右、肛門左右、頸左右)をフードスタンプ生菌数用・標準寒天を 600-700 g 圧で 10 秒間体表に押し付けた。糞便ならびに体表検体は、4°C で冷蔵保存にて輸送し、11 月 13 日より検査を実施した。

体表検体の検査方法：体表に押し付けたフードスタンプの寒天部分をストマッカー袋に入れ、計量後、90mL の PBS を加え、ストマッカー処理（30 秒間）を実施したものを試料原液とし、試料原液および適宜希釈液を作製した。一般細菌数は、AC プレート、腸内細菌科菌群数は EB プレート、大腸菌群・大腸菌数は EC プレートを用いて測定した。サルモネラは試料原液 5mL を 45mL の BPW に加え、42°C、24 時間、好気培養後、1mL を 9mL のハーナテトラチオネート培地に加え 42°C、24 時間好気培養を実施した。その後、クロモアガーサルモネラ培地に塗抹し、37°C、24 時間好気培養を行った。カンピロバクターは試料原液 5mL を 45mL のプレストン培地に加え、42°C、24 時間、微好気培養を実施後、クロモアガーカンピロバクター培地に塗抹し、42°C、48 時間、微好気培養を行った。STEC は、試料原液 5mL を 45mL のノボビオシン加mEC 培地に加え、42°C、24 時間、好気培養した。その後、クロモアガーSTEC に塗抹し、37°C、24 時間培養を行った。

ペトリフィルムを用いた菌数測定法等：一般細菌数の検出限界値は 500 個/㎠、腸内細菌科菌群数は 50 個/㎠、大腸菌群・大腸菌数は 5 個/㎠であることから、陰性の場合は各々の菌の検出限界値の 1/2 である、250 個/㎠、25 個/㎠、2.5 個/㎠とした。
糞便検体の病原体検査方法：サルモネラは糞便 1 g を 10mL の BPW に加え、42°C、24 時間、好気培養後、9mL のハーナテトラチオネート培地に 1mL 加え 42°C、24 時間、好気培養を実施した。その後、クロモアガーサルモネラ培地に塗抹し、37°C、24 時間好気培養を行った。カンピロバクターは糞便 1 g を 9mL のプレストン培地に加え、42°C、24 時間、微好気培養を実施後、クロモアガーカンピロバクター培地に塗抹し、42°C、48 時間、微好気培養を行った。STEC は、糞便 1 g を 9mL のノボビオシン

加mEC 培地に加え、42°C、24 時間、好気培養した。その後、CT 加クロモアガーSTEC に塗抹し、37°C、24 時間培養を行った。

6) 枝肉に付着する異物による微生物汚染実態と菌叢解析

2021(令和 3)年 4 月から 8 月まで、GI-1 施設のトリミング工程、枝肉検査工程及び検査所の枝肉検証時に確認された異物(獣毛 5 検体、糞便 8 検体、消化管内容物 6 検体、レールダスト 5 検体、フットカッターの汚れ 5 検体、その他(肉眼で判別できないもの)2 検体：検体 A と検体 B）が付着した肉表面(2×2 ㎠)を採取し、肉眼及び実体顕微鏡で、色調及び質感を観察し、写真撮影を実施した。また、採取した検体は、ペトリフィルムを用いて一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数を算出した。更に同検体については菌叢解析を実施した。

② 馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究

1) と畜場における処理工程等の情報収集

馬を解体処理すると畜場 3 施設の協力を得て、工程フローを書面及び実地にて確認した。

2) 微生物試験

冷却前の馬とたいについて、豪州の関連ガイドラインに示される S1（胸部）、S2（腹部）、及び S3（臀部）の 3 部位について、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（生食発 0528 第 1 号、生活衛生・食品安全審議官通知）に示される切除法により採材し、切除片 1 ㎝^{2}あたりの一般生菌数及び腸内細菌科菌群数をそれぞれ求めた。また、施設 A 及び B では馬とたい関連検体と同一個体の馬糞便検体を同時に採材し、冷凍状態で弊所に輸送し、後述の菌叢解析に供した。

3) 統計解析

採材部位・指標菌の別に、得られた菌数成績より、「平均+2SD 値」及び「80 パーセンタイル値」を求めた。

4) 菌叢解析

上項 2.で微生物試験を行った際の検体懸濁液を遠心分離し、得られた沈渣より total DNA を抽出した。これを鋳型として、PCR により 16S rRNA V5-V6 領域を増幅し、Ion CHEF/Ion Torrent PGM を用いた菌叢解析に供した。取得配列から、不要配列を除去後、RDP classifier pipeline を用いて階層分類を行った。

③外部検証プロトコルの妥当性評価に関する研究

1)牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と病原細菌検出状況の調査

(1) 検体

東海地方の 5 農場から食肉衛生検査所に搬入された牛と体外皮拭き取り検体 12 検体を対象とした。採材後の検体は冷蔵便にて搬入され、採材後 48 時間以内に試験に供した。

(2) 衛生指標菌の検査

滅菌 PBS を用いて、送付された検体の 10 倍階段希釈系列を作製し、通知（生食発 0528 第 1 号）「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」に従い、検体中の生菌数及び腸内細菌科菌群数を混釈法にて計測した。

(3) サルモネラ属菌の検査

検体中のサルモネラ属菌は、ISO6579-1 に従い分離培養を行った。

(4) 腸管出血性大腸菌の検査

検体中の腸管出血性大腸菌（STEC）は、ISO/TS13136 に従いスクリーニング及び分離培養を行った。リアルタイム PCR によるスクリーニングを行った。*stx* 及び *eae* どちらも陽性となった検体は、STEC 主要 7 血清群の O 抗原遺伝子を標的としたリアルタイム PCR に供した。いずれかの血清群に陽性を示した検体は、陽性となった血清群の免疫磁気ビーズを用いて増菌培養液中の STEC を濃縮し、選択分離培養を行った。

(5) 腸管出血性大腸菌の性状解析

STEC と同定された菌株は、病原大腸菌免疫血清「生研」の H 血清を用いた試験管凝集法により H 型を決定した。STEC 菌株の関連性は、腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック（2018 年 11 月編、地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成ワーキンググループ編）に従い、反復配列多型解析法

（MLVA）を行い解析した。

(6) 衛生指標菌数と STEC 分離状況の関連性解析

検体を STEC の分離陽性及び陰性の 2 群に分類し、衛生指標菌数を比較した。2 群間の差の検定は、Welch 法により行った。統計解析及び、蜂群図・箱ひげ図によるデータの可視化には統計解析システム・環境 R（version 4.0.4）を用いた。

２）豚及び牛と体の外皮拭き取り検体と枝肉切除検体における衛生指標菌数及び病原細菌検出状況の評価

(1) 検体

北陸～東海地方の 3 食肉衛生検査所の協力を得て、管轄すると畜場に搬入された豚及び牛の外部検証用検体の残余検体及び外部検証用検体と同一個体（もしくは同一農場）の外皮拭き取り検体について、令和 3 年 9 月～令和 4 年 2 月の 6 ヶ月間に各月 5 検体ずつの提供を受けた。外部検証の残余検体は、通知法で示される方法（切除法）で採材され、前調整された検体懸濁液として提供を受けた。更に、外皮の拭き取り検体として、以下のように採材された検体の提供を受けた。採材部位を 100 cm2 の拭き取り検査枠及び拭き取りスポンジを用いて 300 g/cm^2 以上の圧をかけながら、30 秒間縦、横、斜め（左右）の順に各 10 回拭き取りを行った。外部検証残余検体の懸濁液及び拭き取り後のスポンジは、冷蔵便でへ送付し、採材後 48 時間以内に試験に供した。

(2) 衛生指標菌の試験

検体中の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は、通知法に従い、上記と同様に調製した 10 倍階段希釈系列を、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の定量試験性能が、ISO 法と同等であると国際的な第三者認証機関において確認された代替法を用いて測定した。切除法により採材された外部検証用検体（枝肉）における衛生指標菌の計測結果は、各施設から提供を受けた。

(3) サルモネラ属菌の試験

検体中のサルモネラ属菌は、上記と同様の方法で試験した。また、培養法と平行して、前増菌培養液からアルカリ熱抽出法により調製した DNA を用いた、*invA* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR を補助的試験として行った。

(4) 腸管出血性大腸菌の試験

上記と同様の方法で行った。

３）豚と体及び牛と体の解体工程における衛生指標菌と病原菌関連遺伝子検出状況の評価

(1) 検体

1 食肉衛生検査所から、豚及び牛と体拭き取り検体の提供を受けて用いた。豚と体からは洗浄前、洗浄後（剥皮前）及び枝肉の 3 工程において腹部から採材した。牛と体からは、剥皮前及び枝肉の 2 工程において腹部から採材した。拭き取り後のスポンジは、冷蔵便で送付し、採材後 48 時間以内に試験に供した。各工程 3 検体ずつ採材し、試験は 2 回実施した。

(2) 衛生指標菌の試験

通知法に従い、上記と同様に実施した。結果は常用対数で表したが、負の値となった場合は「0」として集計した。

(3) 病原菌由来遺伝子の検出

上記と同様に調製した。

④ と畜場でのリステリア属菌の汚染実態と管理すべき工程に関する研究

1） 検体

令和 4 年 6 月～ 9 月の間、と畜場の牛処理工程中の外皮、施設等の環境 20 検体を月あたり 20 検体、同年 10 月～11 月の間には、 4 検体(No.21～24)を追加し、月あたり 24 検体を採材した（計 128 検体）。採材にあたっては、スポンジスワブを用いて拭き取り、試料とした。

2） リステリア定性試験

採材スポンジスワブ試料に 100mL の half-fraser broth を加え、2 分間のストマッキング処理を行った後、37±1°Cで 24-30 時間前培養した。リステリア・モノサイトゲネスの検出には、ISO 法との妥当性確認がなされ、我が国でも検疫所で活用されている MDS2 Listeria monocytogenes を用いた。また、

上記培養液をクロモアガー・リステリアに塗抹し、37±1℃にて培養後、発育した集落のうち、ハローの有無に関係なく青色を呈した代表集落を無作為に釣菌し、VITEK2 を用いて生化学性状に基づく菌種同定を行った。

3) リステリア定量試験

9～11 月に採材した検体については、上項の定性試験で調製した懸濁液を 10 倍階段希釈後、クロモアガー・リステリアに直接塗抹し、37±1℃にて培養した。発育した集落のうち、色調が青色を呈した集落数を推定リステリア属菌数として求めると共に、ハローを伴う青色集落の有無を確認し、ハローを伴うものについては VITEK2 システムを用いて、LM であるかを確認した。

4) 菌叢解析

令和 4 年 9 月に採材した検体より、DNA を抽出し、16SrRNA 部分配列を PCR により増幅させた後、次世代シークエンサー（Ion PGM）を用いて塩基配列データを取得し、RPD Classifier を用いて階層毎に構成菌叢を解析した

(2) 食鳥処理場における HACCP 外部検証に関する研究

1) 衛生指標菌定量検出試験

令和 2 年 5 月 28 日付の厚生労働省通知「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（生食発 0528 第 1 号）別添に示される一般細菌数及び腸内細菌科菌群数を求めるための定量検出試験法を参照法として、全ての対象施設で用いた。また、一部施設では一般細菌数及び腸内細菌科菌群数測定用として販売されるフィルム培地製品（ペトリフィルム、コンパクトドライ、MC メディアパッド）及び最確数法を基礎としたテンポを並行的に用いて検討した。いずれも使用方法は製造者の使用説明書によった。

2) カンピロバクター定量試験法

2 自治体では、上述の衛生指標菌試験に加え、カンピロバクター定量検出試験を行った。同試験の実施にあたり、1 自治体では、上記通知別添で示される試験法を行った。また、残り 1 自治体では同様の方法に加え、最確数法に基づく簡易迅速キット（テンポ・カンピロバクター）を用いて試験を実施した。

3) 食鳥処理場における処理実態調査

研究協力を得た、大規模食鳥処理場にて、処理工程フロー、並びに年間処理羽数、年間稼働日を確認した。また、冷却工程に係る情報としては管理基準を確認すると共に、前工程にあたる中抜き工程において、食鳥検査員による 5 分間の目視確認を行い、同工程での総処理とたい数及び腸切れが生じたとたい数を記録した。

4) 微生物試験

冷却後食鳥とたい首皮試料の採材については外部検証通知に従って行った。また、その後の微生物試験については、AFNOR 等で ISO 法との同等性が確認されている、自動定量検出装置 TEMPO を用いて、一般生菌数、腸内細菌科菌群数、カンピロバクター菌数をそれぞれ並行的に求めた。

5) 統計解析

各時系列間での菌数分布の評価には Mann-Whitney 検定による比較解析を行い、$p<0.05$ を有意差ありと判定した。

6) 冷却水検体及び前処理

ある大規模食鳥処理場にて、冷却槽中の冷却水を処理開始直後（0 時間後）より、1、2、4、5 及び 6 時間後にそれぞれ採水した。採水後、直ちに残留塩素濃度を測定し、次亜塩素酸ナトリウムの中和剤の一つであるチオ硫酸ナトリウムを採水検体 1 L へ添加し、冷蔵温度帯で保存・輸送した。また、残液についてはチオ硫酸ナトリウムを添加せず、理化学試験用検体として採水から 10 分以内に測定を行った。

7) 理化学試験

冷却水検体の理化学試験項目としては、pH、残留塩素濃度、遊離塩素濃度、濁度、ATP 値、TDS 値及び水温を設定した。

8) 微生物学的試験

冷却水検体は採水から 24 時間以内に一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌（β-グルクロニダーゼ産

生大腸菌）の定量試験のほか、カンピロバクターとサルモネラ属菌の定性試験に供した。これらのうち、一般細菌数については30°Cにて3日間培養を行い、結果を求めた。

9）菌叢解析

水検体残液を遠心分離し、得られた沈査より全DNAを抽出した。これを鋳型として、16s rRNA部分配列をPCR増幅し、Ion Torrent PGMを用いたシーケンス反応を行った。取得データはトリミング後、階層分類等に供した。

(3) 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

① 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

1） 調査した処理施設

鹿児島県内の認定小規模食鳥処理場のうち処理工程の異なる6箇所の処理場（A～K）を対象として調査を行った。それぞれの処理場の主な特徴を挙げ、処理工程の概略と調査回数を表1に示す。また、それぞれの処理工程の詳細は図1～11にも示す。なお、処理場Jは購入したヒナを自家農場で飼育していることを考慮し農場における鶏の保菌状況の調査も実施した。また、処理場Bは加熱用鶏肉を取り扱う施設であり、と体表面加熱は行っていない。

2） 供試材料

処理場搬入鶏のクロアカスワブ、処理工程における鶏の皮または肉を材料として25g採取した。クロアカ（総排泄腔）スワブは滅菌綿棒によって採取した。解体加工工程から，脱羽後，チラー後，焼烙後，解体後にそれぞれ皮または肉を、また最終製品も採取した。さらに，それぞれの鶏の盲腸を結紮して採取した。解体処理工程におけると体のカンピロバクター汚染調査に加え、必要に応じてまな板などのふき取りによる環境調査や農場における保菌状況調査も実施した。J処理場に付属した飼育鶏舎（図10-2）における調査では、A、B、Cの3鶏舎から雌雄のクロアカスワブ4検体ずつ計２４検体、環境検体として、供給される餌と水および飼育後の堆肥と敷料からそれぞれ2検体ずつ計8検体を得た。

3） カンピロバクターの分離・同定および定量

採取したクロアカスワブについて、カンピロバクターの存在の有無を調べるため、プレストン液体培地（Oxoid，Ltd.）10mlに接種し、増菌培養後、1検体につき1白金耳量をバツラー寒天培地（Oxoid, Ltd.）に画線塗布した。バツラー寒天培地上に発育したカンピロバクター様コロニーについて、位相差顕微鏡を用いてらせん状桿菌の性状を確認した上で、Mueller-Hinton（MH）寒天培地（Oxoid）に1検体につき1コロニーを画線塗布し、純培養した。一連の菌分離にあたって、培養はすべて微好気条件下、42°C，48時間で実施した。菌種の同定には、*C. jejuni*及び*C. coli*の特異的プライマーを用いたPCR法により実施した。反応液組成は、計4種のプライマー保存溶液（各2pmol/μl）をそれぞれ2μlずつ、EmeraldAmp PCR Master Mix 10μl、滅菌蒸留水2μlと合わせ、 20μl総量とし、これに1白金線量のコロニーを直接添加した後、反応を開始した。陽性コントロールには、*C. jejuni* ATCC 33560株、*C. coli* ATCC 33559株由来DNAを用いた。PCRは、94°C30秒、56°C30秒、72°C30秒の35サイクルで実施した。反応後のPCR産物は、1.5%アガロースゲルで100V、60分電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後に増幅断片の有無及び分子量を確認した。

採取した鶏肉については、最確数（MPN） 3本法を用いて、カンピロバクター菌数を推定した。鶏皮または肉25 gとプレストン液体培地225mlを1分間ストマッキング処理し、検体懸濁液を調整した。その後、同懸濁液10mlを3本作成したほか、同懸濁溶液1ml、0.1mlをそれぞれ3本ずつプレストン液体培地9ml、9.9mlに接種し、10mlの10倍、100倍希釈液として培養した。その後、培養液より1白金耳をとり、バツラー寒天培地に画線塗布し培養に供した。同定はクロアカスワブの場合と同様に実施した。

盲腸内容物におけるカンピロバクター菌数算定には平板希釈法を用いた。盲腸内容物0.5gを4.5mlのチオ硫酸ナトリウム緩衝ペプトン水で10倍希釈

後、5 段階の希釈液を作成した。各希釈液は各 2 枚ずつの mCCDA 培地に平板培養した。微好気条件下で、42°C48 時間で培養後、培地上の菌数を算定した。分離・同定は MPN3 本法と同様に実施した。環境材料のスワブサンプルはクロアカスワブと同様にプレストンブロスにて増菌培養、バツラー寒天培地によって分離、PCR で同定を行った。

②生食用食鳥肉の衛生実態把握と製造工程管理に関する情報調査

1） 生食用食鳥肉製品検体

南九州地方で生食用食鳥肉を加工販売する小規模施設のうち、昨年度工程管理実態調査対象となった 19 施設及び大規模 2 施設より、生食用食鳥モモ肉製品を購入し、冷凍状態で当所に搬入した。

2）生食用食鳥肉製品に対する微生物試験

1. 衛生指標菌定量検出試験

各検体の皮部分 25g を採材し細切後、緩衝ペプトン水（BPW）225ml に加え、1 分間ストマッキング処理を行った。同懸濁液（検体懸濁原液）及び同 10 倍階段希釈液各 1ml をペトリフィルムに接種し、使用説明書に従い、定量検出試験を行った。

2. 主要病原菌の定性検出試験

上項と同一検体を MDS カンピロバクター及び MDS サルモネラに供し、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ及びサルモネラ属菌の定性検出試験をそれぞれ行った。

3. 食鳥とたいの保存過程を通じた微生物動態試験

大規模食鳥処理場において処理された同一ロットの食鳥中抜きとたい計 30 検体を、異なる時間軸で当該施設の保管温度条件（5°C以下）で保存し、その後個別包装を行い、温度ロガーを同封して冷蔵状態で当所に輸送した。到着後は速やかに 1 とたいあたり 25g の首皮を採材し、上項 2.に示す微生物試験に供した。

4. 小規模加工施設における食鳥とたい受入れ後の温度管理実態に関する調査

鶏の生食加工業者協議会（現とりさし協会）の協力を得て、外部の食鳥処理場より食鳥とたいを受入れ、生食用食鳥肉を加工する小規模事業者に対し、とたい受入れ後の温度管理等に関する実態をアンケート形式で調査した。

5. 統計解析

微生物検出成績と工程管理実態情報との関連性は Kruskal-Wallis 検定を用いて解析した。

6. アンケート調査項目の作成

食鳥処理段階では①生鳥の湯漬け温度及び湯漬け時間、②脱羽後とたいの洗浄と冷却の有無及び状況、③冷却水中の次亜塩素酸濃度の管理方法を、食鳥肉加工段階では、焼烙工程の条件を、販売段階では、生食用食鳥肉製品の 1 包装あたりの重量を調査項目として、とりさし協会を通じて小規模事業者に対し、アンケート形式にて調査を行った。

(4) と畜場・食鳥処理場の内部検証に関する研究

1）調査対象施設

衛生管理に関する外部認証等の状況が異なる複数の事業者（と畜事業者 2 社、食鳥処理事業者 1 社）及び、食肉衛生検査所（4 所）に聞き取り調査を実施した。うち、と畜事業者 1 社は国内流通製品工場、対米輸出向け製品対応工場、対 EU 輸出向け製品対応工場を有しており、と畜事業者 1 社及び食鳥処理事業者は SQF 認証施設（国内流通製品工場）を運営していた。

2） 内部検証の実施状況についての調査

各事業所で自主検査として実施する微生物検査項目について実施頻度、採材方法、試験方法及び管理基準を調査した。微生物検査以外の項目については、外部検証通知別表 1 に示された項目の実施状況及び頻度を書面アンケートとして送付し、回答を得た。加えて、外部検証への対応状況について電話等によるインタビューにより聞き取り調査を実施した。

3） 衛生指標菌の検出状況と病原微生物汚染の比較検証

と畜事業者 1 社の国内流通製品工場において 2020 年 10 月～2021 年 2 月の期間に 2～3 週間隔で計 7 回（各採取日において、牛・豚各 1 と体づつ）のサンプリングを実施した。サンプリングでは

同一と体に由来する外皮拭き取り試料、枝肉拭き取り試料、枝肉切除試料の 3 検体を 1 セットとし、生菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、大腸菌群数、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌数をペトリフィルムを用いて、腸管出血性大腸菌（STEC）（「アメリカ合衆国向け輸出食肉認定施設における牛肉からの腸管出血性大腸菌 O26、O45、O103、O111、O121、O145 及び O157 の検査法について」（最終改正日：令和 2 年 4 月 1 日の方法）に示されるクリオバックス TM システム Q7 を用いてそれぞれの微生物検査を実施した。

4） HACCP に関する海外規格の調査

The Code of Federal Regulation Title 21 （以下、CFR Title 21）、ISO22000:2018 食品安全マネジメントシステム、及び製造の SQF 食品安全コードで示される検証に関わる要求事項を整理した。

(5) 国際動向を踏まえた情報の収集整理

令和 2 年度は牛や豚など獣畜のと畜を実施していると畜場に、令和 3 年度は食鳥の解体を行う食鳥処理場に焦点を当て、処理施設における衛生管理や検証に関する情報を収集した。令和 4 年度はと畜場・食鳥処理場の衛生管理・検証に関する最新情報を継続して収集し、追加等を行うと共に、国内の状況との違いを踏まえ要点を整理した。

(6) HACCP 検証の評価方法に関する研究

1） 国際動向の調査

と畜場・食鳥処理場において HACCP に基づく衛生管理が先行実施されている、欧州、米国、オーストラリア、ニュージーランドでの取り組みについて文献調査した。

2) Moving window 方式での評価の検討

と畜場・食鳥処理場の日本における検査体制の実態を考慮して、HACCP に基づく衛生管理が先行実施されている、欧州、米国、オーストラリア、ニュージーランドで採用が進んでいる Moving window 方式での衛生管理状態の評価方法を実現するための検討をした。

3) 国内施設での現状の検査状況の把握とその解析

各自治体から報告がなされた国内のと畜場・食鳥処理場における微生物検査データの傾向を分析し、適切な衛生管理の実施状況を推定した。

C．研究成果

(1) と畜場における HACCP 外部検証に関する研究

① と畜場の HACCP 外部検証・内部検証に関する研究

1） 食肉衛生検査所で実施されためん羊、山羊、馬の糞便、枝肉拭き取り検査集計

A から I の 9 つの食肉衛生検査所から情報提供を得た。

① めん羊、山羊、馬からの各種病原体検出状況

・サルモネラ：めん羊は A と H 検査所から情報提供があった。A 検査所では、33.3%（20/60 検体）の糞便から検出され、亜種群IIIb（*diarizonae*）O61:-:1,5,7 が 20 検体、亜種群 I（*enterica*）O4:i:- が 1 検体であった。H 検査所では、胆汁と糞便各 1 検体を実施したが、未検出であった。山羊は I 検査所から情報提供があり、直腸スワブ 100 検体、直腸スワブ 100 検体の検査結果は陰性であった。馬は D 検査所から情報提供があり、枝肉のスワブ 41 検体の検査結果は陰性であった。

・STEC：めん羊は A、D、H 検査所から情報提供があった。A 検査所では、31.67%（19/60 検体）の糞便から検出され、OUT:NM（O 抗原が型別不能、H 抗原が陰性）が 14 検体、OUT:HUT（O 抗原が型別不能、H 抗原が型別不能）が 2 検体、O91:NM が 2 検体、O103：H2 が 2 検体、O146:NM が 1 検体であった。D 検査所では、枝肉スワブ 8 検体を実施したが、未検出であった。H 検査所では、胆汁と糞便各 1 検体を実施したが、未検出であった。馬は G 検査所から情報提供があり、枝肉胸部及び肛門周囲のスワブ各 2 検体を実施したが、未検出であった。

カンピロバクター：めん羊は H 検査所から情報提供があった。胆汁と糞便各 1 検体を実施したが、未検出であった。

②めん羊、山羊、馬枝肉拭き取り検体の一般細菌

数・大腸菌群数・大腸菌数

枝肉からの検体採取法は、全てスワブ法であった。

・一般生菌数：めん羊枝肉の結果は 4 施設から情報提供があり、264/268 検体(98.5%)から分離された。各施設の陽性検体の対数一般細菌数は 4.02-100.88 個/㎠(最高値は 1,450 個/㎠)であった。山羊枝肉の結果は 1 施設から情報提供があり、124/128 検体(96.9%)から分離された。本施設の陽性検体の対数一般細菌数は 5.62-12.98 個/㎠(最高値は 1,335 個/㎠)であった。馬枝肉の結果は 4 施設から情報提供があり、440/469 検体(93.8%)から分離された。各施設の陽性検体の対数一般細菌数は 0.52-191.00 個/㎠(最高値は 21,900 個/㎠)であった。

・大腸菌群数：めん羊枝肉の結果は 3 施設から情報提供があり、56/262 検体(21.4%)から分離された。各施設の陽性検体の対数大腸菌群数は 0.10-0.51 個/㎠(最高値は 19.50 個/㎠)であった。山羊枝肉の結果は 1 施設から情報提供があり、23/128 検体(18.0%)から分離された。本施設の陽性検体の対数大腸菌群数は 0.21-0.25 個/㎠(最高値は 19.50 個/㎠)であった。馬枝肉の結果は 2 施設から情報提供があり、77/424 検体(18.2%)から分離された。各施設の陽性検体の対数大腸菌群数は 4.95-11.00 個/㎠(最高値は 910 個/㎠)であった。

・大腸菌数：めん羊枝肉の結果は 3 施設から情報提供があり、33/262 検体(12.6%)から分離された。各施設の陽性検体の対数大腸菌数は 0.10-0.26 個/㎠(最高値は 3.00 個/㎠)であった。山羊枝肉の結果は無く、馬枝肉の結果は 1 施設から情報提供があり、14/24 検体(58.3%)から分離された。各施設の陽性検体の対数大腸菌数は 11.03-31.59 個/㎠(最高値は 640 個/㎠)であった。

2) めん羊枝肉表面の切除法による細菌汚染状況調査

一般生菌数は調査 30 カ所のうち全部から検出され対数平均は 3,063.5 個/㎠（3.49 log 個/㎠)であった。最高値は検体 27(右肘部内側)の 400,000 個/㎠(5.60 log 個/㎠)、最低値は検体 8(大腿部右側)の 19 個/㎠(1.28 log 個/㎠)であった。腸内細菌科菌群数は調査 30 カ所のうち 23 カ所から検出され対数平均は 68.3 個/㎠（1.83 log 個/㎠)であった。最高値は検体 27(右肘部内側)の 48,000 個/㎠(4.68 log 個/㎠)、7 カ所は検出限界値以下であった。大腸菌群数は調査 30 カ所のうち 22 カ所から検出され対数平均は 41.4 個/㎠（1.62 log 個/㎠)であった。最高値は検体 27(右肘部内側)の 4,600 個/㎠(3.66 log 個/㎠)、8 カ所は検出限界値以下であった。大腸菌数は調査 30 カ所のうち 9 カ所から検出され対数平均は 3.3 個/㎠（0.52 log 個/㎠)であった。最高値は検体 27(右肘部内側)の 4,000 個/㎠(3.60 log 個/㎠)、21 カ所は検出限界値以下であった。大腸菌が検出された部位で 9 か所存在した．検体 27（右肘部内側）が最も多く 4,000 個/㎠(3.60 log 個/㎠)、次いで検体 25(頸部右側)が 250 個/㎠(2.40 log 個/㎠)、検体 5(腕基部)が 150 個/㎠(2.18 log 個/㎠)、検体 14（胸部右側)が 90 個/㎠(1.95 log 個/㎠)、検体 15(後大腿部右側)が 38 個(1.58 log 個/㎠)であった。検体 27（右肘部内側）は調査した 30 カ所の中で一般生菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌数共に最高値を示した。枝肉 30 カ所の検体からは STEC, カンピロバクター、サルモネラは未検出であった。

3)スワブ法に代わると畜場内牛枝肉および豚枝肉の内部検証法の検討

・A と畜場牛枝肉：切除法の平均一般細菌数は 87.90 個/㎠(1.94 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは 45.13 個/㎠(1.65 log 個/㎠)であった。X 軸を切除法の対数値、Y 軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線は Y＝0.4926X＋0.6968（決定係数=0.3919）であった。スタンプ法の平均一般細菌数は 4.26 個/㎠(0.63 log 個/㎠)であり、X 軸を切除法の対数値、Y 軸をスタンプ法の対数値とした時の、回帰直線は Y＝0.6206X－0.5773（決定係数=0.297）であった。腸内細菌科菌群は切除法、ふき取り法、スタンプ法ともに検出限界値以下であった。

・B と畜場牛枝肉：切除法の平均一般細菌数は 406.42 個/㎠(2.61 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは 95.64 個/㎠(1.98 log 個/㎠)であった。X 軸を切除法の対数値、Y 軸をふき取り法の対数値とした時

の、回帰直線はY＝0.3027X＋1.191（決定係数=0.1202）であった。スタンプ法の平均一般細菌数は1.99個/㎠(0.30 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をスタンプ法の対数値とした時の、回帰直線はY＝0.5327X－1.0869（決定係数=0.3743）であった。切除法の平均腸内細菌科菌群数は2.14個/㎠(0.33 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは0.45個/㎠(-0.35 log 個/㎠)であった。X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝0.5675X－0.5325（決定係数=0.1285）であった。スタンプ法の平均腸内細菌科菌群数は0.11個/㎠(-0.96 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝0.121X－0.9893（決定係数=0.0115）であった。

・Aと畜場豚枝肉：切除法の平均一般細菌数は247.73個/㎠(2.39 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは35.57個/㎠(1.55 log 個/㎠)であった。X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝0.3331X＋0.7537（決定係数=0.0584）であった。スタンプ法の平均一般細菌数は2.26個/㎠(0.35 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝-0.2281X－0.2075（決定係数=0.1159）であった。切除法の平均腸内細菌科菌群数は2.66個/㎠(0.42 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは0.43個/㎠(-0.37 log 個/㎠)であった。X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝0.0221X－0.3526（決定係数=0.0004）であった。スタンプ法の平均腸内細菌科菌群数は0.11個/㎠(-0.96 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝-0.13X－0.8884（決定係数=0.0098）であった。

・Bと畜場豚枝肉：切除法の平均一般細菌数は1,709.79個/㎠(3.23 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは1,334個/㎠(3.13 log 個/㎠)であった。X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝0.5403X＋1.3784（決定係数=0.283）であった。スタンプ法の平均一般細菌数は3.02個/㎠(0.48 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝0.439X－0.9398（決定係数=0.3079）であった。切除法の平均腸内細菌科菌群数は1.20個/㎠(0.08 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは0.17個/㎠(-0.77 log 個/㎠)であった。X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝0.874X－0.8334（決定係数=0.1984）であった。スタンプ法の平均腸内細菌科菌群数は0.03個/㎠(-1.52 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝-0.272X－1.5545（決定係数=0.0563）であった。

4)生産農家ごとの和牛の体表のSTEC O157・O26の汚染状況

スクリーニング検査結果においてVT遺伝子は185検体中184検体（99.5%）、O157遺伝子は122検体中77検体（63.1%）、O26遺伝子は35検体（29%）が陽性となった。また、確認検査で陽性となったのはO157が185検体中15検体(8.1%)、O26は5検体(2.7%)であった。1検体からはO157及びO26の両集落が検出された。確認検査で陽性となったものは、スクリーニング検査でも陽性となっていた。

STEC陽性となった農家は、72農家中17農家(22.1%)であった。2回以上検体を採取した農家は52農家であり、2回陽性となった農家は2農家、陽性1回の農家は13農家であった。農家Bは6回連続陰性であったが、農家BOは2回中2回陽性となった。1回採取農家は20農家で、そのうち陽性となったのは2農家であった。牛のSTEC陽性率は複数頭で1検体のものもあるため差があるが、O157は341頭中15～23頭陽性(4.4～6.7%)、O26は5～7頭陽性（1.5～2.1%）となった。

5） 黒毛和種牛の体表の汚染状況の把握

①サルモネラ、カンピロバクター、STEC検出状況

黒毛和種牛5頭の糞便検体から、カンピロバクターは全頭から分離され分離菌種はC. jejuniであった。

STEC は 1 頭(検体番号 2)から分離され、2 型毒素産生株であった。サルモネラは検出されなかった。5 頭の 15 か所の体表検体からは、供試した病原体は検出されなかった。

②黒毛和種牛体表の部位別一般細菌数

供試した 5 頭の体表の全ての部位の平均菌数は 4.18 log 個/㎠(15,018 個/㎠)であった。部位別にみると⑥胸部正中が最も多く 5.06 log 個/㎠(115,280 個/㎠)、次いで、⑦腹部正中(4.94 log 個/㎠:87,848 個/㎠)、⑧踝外側左(4.94 log 個/㎠:86,990 個/㎠)であった。

③黒毛和種牛体表の部位別腸内細菌科菌群数

供試した 5 頭の体表の全ての部位の平均菌数は 1.62 log 個/㎠(42 個/㎠)であった。部位別にみると⑫もも後側左が最も多く 1.91 log 個/㎠(81 個/㎠)、次いで、⑦腹部正中(1.90 log 個/㎠:79 個/㎠)、⑭肛門左(1.89 log 個/㎠:77 個/㎠)であった。

④黒毛和種牛体表の部位別大腸菌群数

供試した 5 頭の体表の全ての部位の平均菌数は 0.90 log 個/㎠(8.0 個/㎠)であった。部位別にみると⑥胸部正中が最も多く 1.45 log 個/㎠(28.0 個/㎠)、次いで、⑦腹部正中(1.26 log 個/㎠:18.4 個/㎠)、⑭肛門左(1.24 log 個/㎠:17.4 個/㎠)であった。

⑤黒毛和種牛体表の部位別大腸菌数

供試した 5 頭の体表の全ての部位の平均菌数は 0.79 log 個/㎠(6.2 個/㎠)であった。部位別にみると⑥胸部正中が最も多く 1.14 log 個/㎠(13.8 個/㎠)、次いで、⑭肛門左(1.16 log 個/㎠:14.4 個/㎠)、⑫もも後側左(1.11 log 個/㎠:13.0 個/㎠)であった。

6)枝肉に付着する異物による微生物汚染実態と菌叢解析

獣毛検体は，黒く，長さや本数は様々で，肉眼でも容易に判別できた. 糞便検体及び消化管内容物検体は，どちらも黄又は褐色が肉眼で観察され，実態顕微鏡像では繊維質の異物を含むものからそうでないものまで様々であった．レールダスト検体は，灰色で，薄い乾質の異物で，長さ，幅共に 2～3mm 程度のものが多く肉眼で容易に判別できた. フットカッター汚れ検体は，後肢切断面に付着しており，色調が黒く, 肉眼では一見糞便のように観察された. その他 A 検体、その他 B 検体ともに肉眼では由来が不明であったが、その他 A 検体は「レールダストと潤滑油が混ざったもの」，その他 B 検体は「背割り屑の中に繊維質の消化管内容物又は糞便が混じたもの」と実体顕微鏡での色調および質感から推察した.

・一般細菌数結果：獣毛，糞便，消化管内容物，レールダスト, フットカッター汚れ検体の一般細菌数は各々3.27±1.23 log 個/㎠，4.37±1.83 log 個/㎠，4.20±0.90 log 個/㎠，1.04±0.58 log 個/㎠，1.70±0.23 log 個/㎠であった．その他 A 検体は 2.26 log 個/㎠，その他 B 検体は 5.73 log 個/㎠であった．獣毛，糞便及び消化管内容物検体間の値については Tukey の多重比較検定，レールダストとフットカッター汚れ検体間の値については t 検定を実施したところ, それぞれの間の統計学上の差はなかった($p \geqq 0.05$)．また，獣毛-糞便-消化管内容物検体の一般細菌数はレールダスト-フットカッター汚れ検体のそれと比べて高値(t 検定：t 値=6.97，自由度＝27，$p<0.05$)であった.

・腸内細菌科菌群数結果：獣毛，糞便，消化管内容物検体の腸内細菌科菌群数は各々1.40±0.73 log 個/㎠，2.22±0.93 log 個/㎠，2.12±1.35 log 個/㎠であった．レールダスト，フットカッター汚れ検体は調査した全ての検体において腸内細菌科菌群数は検出限界値(-0.3 log 個/㎠)以下であった．その他 A 検体も検出限界値以下, その他 B 検体は 3.22 log 個/㎠であった．獣毛，糞便及び消化管内容物検体間の値について Tukey の多重比較検定を実施したところ，統計学上の差($p<0.05$)はなかった.

菌叢解析：構成割合で 1%以上を示すものは *Proteobacteria* 門，*Firmicutes* 門，*Actinobacteria* 門，*Bacteroidetes* 門，*Fusobacteria* 門，*Thermi* 門，*Spirochaetes* 門，*Euryarchaeota* 門，*Fibrobacteres* 門であった．消化管内容物は *Firmicutes* 門，獣毛，レールダスト，フットカッター汚れは *Proteobacteria* 門の比率が高く，糞便は *Firmicutes* 門と *Proteobacteria* 門の双方合わせ

て高い比率を示す菌叢であった．その他 A 検体は *Bacteroidetes* 門と *Fusobacteria* 門の構成割合が高いという特徴を有していた．その他 B 検体は *Proteobacteria* 門が多く，次いで *Actinobacteria* 門，*Firmicutes* 門が検出され，菌叢の構成は糞便や獣毛と類似していた．

② 馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究

1） 馬とたいの解体処理工程フロー

3 施設（A -C）における馬とたいの解体処理工程フローを確認し、聴取された情報を基に工程フロー概略図を作成した。施設 A 及び B で処理された馬とたいの多くは、生食用馬肉製品として加工される状況であった。一方、施設 C で処理された馬とたいは加熱用馬肉として加工されていた。上述の背景との関連性は定かではないものの、枝肉が交叉汚染を受けた場合の措置として、施設 A 及び C ではトリミング、施設 B では火炎焼烙殺菌を行う体制にあった。施設 B は馬のみを取り扱う施設であったのに対し、施設 A 及び C は牛も処理していた。但し、牛の解体処理とは時間帯で区分化を行う運用体制にあった。

各施設の管理基準を設定している工程を確認したところ、いずれの施設も冷却工程で用いる冷蔵庫内温度及び冷却保持時間を採用していた。このうち、施設 C では冷却工程で用いる冷蔵庫の庫内温度（10°C以下）及び冷却時間（10 時間以上）を管理基準とし、そのモニタリングは自記温度記録計を用いた 1 時間ごとの記録取得、作業前後に工程担当者による目視での表示温度確認、最後の枝肉を入庫した時間と次の稼働日の最初の枝肉出庫時間の確認及び記録等で運用を行っていた。

2） 馬とたいにおける衛生指標菌検出結果

施設 A では 6 頭・18 検体、施設 B では 9 頭・27 検体、施設 C では 6 頭・18 検体の馬枝肉を対象として、冷蔵庫入庫前段階で、3 部位の衛生指標菌検出状況を解析した。結果として、施設 A の馬枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差値は S1（胸部）、S2（腹部）、S3（臀部）でそれぞれ 1.41±0.21 log CFU/cm^2、2.04±1.23 log CFU/cm^2、2.66±0.59 log CFU/cm^2、腸内細菌科菌群数の同値は S1 が 0.81±0.31log CFU/cm^2、S3 が 0.71±0.24 log CFU/cm^2 であった。なお、S2 は全 6 検体で検出限界未満を示した。

施設 B の馬枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差値は S1、S2、S3 でそれぞれ 0.93±0.42 log CFU/cm^2、0.97±0.51 log CFU/cm^2、0.74±0.26 log CFU/cm^2 であった。なお、同施設由来検体における腸内細菌科菌群は全て検出限界未満であった。

施設 C の馬枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差値は S1（胸部）、S2（腹部）、S3（臀部）でそれぞれ 3.16±0.77 log CFU/cm^2、2.41±0.72 log CFU/cm^2、3.07±1.37 log CFU/cm^2 であったほか、各部位の腸内細菌科菌群数は 0.72±0.36 log CFU/cm^2、0.71±0.51 log CFU/cm^2、1.02±0.71 log CFU/cm^2 であった。

衛生指標菌検出結果の評価にあたり、厚生労働省及び米国 USDA FSIS が参考値として例示する「平均+2SD」、及び欧州で解析指標として例示する「80 パーセンタイル値」を施設別・指標菌の別に求めたところ、一般細菌数の両値は施設 A 由来検体では、S1 が 1.81 log CFU/cm^2 及び 1.61 CFU/cm^2、S2 が 4.29 log CFU/cm^2 及び 2.71 log CFU/cm^2、S3 が 3.78 log CFU/cm^2 及び 3.13 log CFU/cm^2 であった。これらのうち、「平均+2SD 値」を超過した検体は S2 で 1 検体のみが認められた一方、「80 パーセンタイル値」を超過した検体は S1、S2、S3 で各 1 検体認められた。同様に、腸内細菌科菌群数に関する両値は S1 が 1.39 log CFU/cm^2 及び 1.21 CFU/cm^2、S2 が 0.62 log CFU/cm^2 及び 0.61 log CFU/cm^2、S3 が 1.17 log CFU/cm^2 及び 0.80 log CFU/cm^2 であった。これらのうち、「平均+2SD 値」を超過した検体は S3 で 1 検体のみを認めたが、「80 パーセンタイル値」を超過した検体は S1 及び S3 で各 1 検体であった。

施設 B 由来検体における一般生菌数の「平均+2SD 値」及び「80 パーセンタイル値」はそれぞ

れ S1 が 1.69 log CFU/cm^2 及び 1.25 CFU/cm^2、S2 が 1.90 log CFU/cm^2 及び 1.22 log CFU/cm^2、S3 が 1.24 log CFU/cm^2 及び 1.02 log CFU/cm^2 であった。これらのうち、「平均+2SD 値」を超過した検体は S1 及び S2 で 1 検体認められたほか、「80 パーセンタイル値」を超過した検体は S1、S2、S3 で各 2 検体認められた。

施設 C 由来検体における一般生菌数の「平均+2SD 値」及び「80 パーセンタイル値」はそれぞれ S1 が 4.70 log CFU/cm^2 及び 3.96 CFU/cm^2、S2 が 3.85 log CFU/cm^2 及び 2.85 log CFU/cm^2、S3 が 5.81 log CFU/cm^2 及び 4.23 log CFU/cm^2 であった。これらのうち、「平均+2SD 値」を超過した検体は認められなかったが、「80 パーセンタイル値」を超過した検体は S1、S2、S3 で各 1 検体認められた。同様に腸内細菌科菌群数に関する両値は S1 が 1.44 log CFU/cm^2 及び 1.10 log CFU/cm^2、S2 が 1.73 log CFU/cm^2 及び 0.88 log CFU/cm^2、S3 が 2.44 log CFU/cm^2 及び 1.61 log CFU/cm^2 であった。これらのうち、「平均+2SD 値」を超過した検体は S2 で 1 検体、「80 パーセンタイル値」を超過した検体は S1、S2、S3 で各 1 検体認められた。

なお、全体の「平均+2SD 値」及び「80 パーセンタイル値」は一般生菌数がそれぞれ 4.06 log CFU/cm^2 及び 2.85 log CFU/cm^2 であり、「平均+2SD 値」を超過した検体は施設 A の 1 検体と施設 C の 3 検体であった。また、腸内細菌科菌群数については、それぞれの値が 1.33 log CFU/cm^2 及び 0.62 log CFU/cm^2 であり、「平均+2SD 値」を超過した検体は施設 C の 2 検体であった。

3) 馬枝肉切除検体の菌叢解析結果

馬枝肉切除検体では、牛に比べて相対的に低い腸内細菌科菌群数であったことから、当該検体の構成菌叢探知に向け、16S rRNA 菌叢解析を行った。

全体を通じ、最も優勢であった菌群は、*Oxalobacteriaceae* であり、最も高い占有率を示した検体では 90%を超過した。同菌群の構成を確認したところ、Telluria 属及び *Naxibacter* 属等の土壌由来菌が占める割合が高い状況であった。一方、腸内細菌科菌群の占有率は総じて低く、同菌群の構成菌属を確認したところ、*Enterobacter* 属及び *Yokonella* 属が最も高頻度に検出され、*Cedecea* 属がこれに続いた。腸内細菌科菌群に属し、牛肉の危害要因の一つとされる *Salmonella* 属は認められなかった。なお、部位別では S1（胸部）の検体が最も菌叢多様性に富んでいた。

4) 馬糞便検体の菌叢解析結果

馬枝肉切除検体での腸内細菌科菌群の低い占有率が示されたことを踏まえ、次に馬糞便検体を対象とした菌叢解析を実施した。結果として、馬糞便検体では *Clostridiaceae*、*Ruminococcaceae* 等が占める割合が高く、*Oxalobacteriaceae* や *Enterobacteriaceae* の占有率は総じて低い値を示し、馬枝肉検体とは大きく異なる菌叢構成であることが確認された。

③ 外部検証プロトコルの妥当性評価に関する研究（含考察）

1) 牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と病原細菌検出状況の調査

リアルタイム PCR の結果、3 農場から搬入された 5 検体が *stx* 及び *eae* 陽性であった。これら 5 検体について、主要 7 血清群の O 抗原遺伝子を標的としたリアルタイム PCR を実施し、陽性となった O 抗原の免疫磁気ビーズを用いて STEC の分離培養を試みたところ、O157 免疫磁気ビーズを用いた検体から STEC が疑われるコロニーを得、性状解析の結果いずれの STEC O157 であることが確認された。H 型別試験の結果、分離された菌株はいずれも O157:H7 であった。特定の農場からは 3 検体から O157:H7 が分離されたが、2 検体からの菌株は MLVA 法において、全 17 遺伝子座のリピート数が一致し、もう 1 検体からの菌株とは 12 遺伝子座のリピートが異なっていた。STEC 汚染の進んだ農場は、由来の異なる複数の菌株に汚染されていることが示された。STEC が分離された検体が飼育されていた農場と STEC が分離された検体が飼育されていなかった農場の間で、衛生指標菌数との関連を検

討した。STEC 分離陰性の農場で飼育されていた検体における一般細菌数の平均値は 6.29 log cfu/cm2、STEC 分離陽性の農場で飼育されていた検体では 7.27 log cfu/cm^2 であった。2 群間の差を Welch 法で検定したところ、p 値は 0.015 であり、有意な差が認められた。同様に腸内細菌科菌群数を比較したところ、STEC 分離陰性の農場で飼育されていた検体の平均値は 4.19 log cfu/cm^2 であり、STEC 分離陽性農場で飼育されていた検体の平均値は 4.65 log cfu/cm^2 であった。2 群間の差を Welch 法で検定したところ、p 値は 0.187 であった。衛生指標菌数は、STEC を始めとする病原微生物汚染と高い関連性があることが示された。サルモネラ属菌はいずれの検体からも分離されなかった。

2)豚及び牛と体の外皮拭き取り検体と枝肉切除検体における衛生指標菌数及び病原細菌検出状況の評価

(1)豚外皮拭き取り検体及び枝肉における衛生指標菌及び病原細菌試験結果

各施設から提供された切除検体重量について 95%信頼区間を算出し、逸脱した検体がどの程度存在したかを検証したところ、どの施設においても 95%信頼区間から逸脱した検体はなく、適切に採材されていたと考えられた。

施設 A では、2021 年 9 月～2022 年 2 月（11 月と 12 月は 1 度の採材であった）にかけて月あたり 5 と体（各枝肉及び外皮拭き取り検体）計 50 検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は 2.40±0.66 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 1.50±2.92 cfu/cm^2 であった。枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は 2.40±0.49 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 22.88±107.78 cfu/cm^2 であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及び STEC は分離されなかったが、外皮拭き取り検体では 5 検体（20.0%）で病原性大腸菌関連遺伝子が陽性であった。

施設 B では、2021 年 9 月～2022 年 2 月にかけて月あたり 5 と体（各枝肉及び外皮拭き取り検体）計 60 検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は 2.30±0.84 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 4.20±6.87 cfu/cm^2 であった。枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は 1.88±0.62 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 5.53±4.23 cfu/cm^2 であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及び STEC は分離されなかったが、外皮拭き取り検体では 2 検体（6.7%）で病原性大腸菌関連遺伝子が陽性であった。

施設 C では、2021 年 9 月～2022 年 2 月にかけて月あたり 5 と体（各枝肉及び外皮拭き取り検体）計 60 検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は 2.42±0.83 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 2.07±4.34 cfu/cm^2 であった。枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は 2.57±0.54 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 6.97±10.81 cfu/cm^2 であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌は分離されなかったが、外皮拭き取り検体 1 検体（3.3%）から O103 STEC が分離され、3 検体（10.0%）で病原性大腸菌関連遺伝子が陽性であった。

3 施設いずれにおいても、外皮拭き取り検体の 1 例を除いて、サルモネラ属及び STEC が分離されなかったことから、豚と体の衛生管理は適切に行われていると思われた。いずれの施設においても、外皮拭き取り検体及び枝肉間で一般細菌数に有意な差を認めなかったが、これは外皮拭き取りをと体洗浄後に行ったためであると考えられた。しかしながら、病原性大腸菌関連遺伝子は、枝肉からは検出されず、外皮拭き取り検体のみから検出された。このことは、外皮拭き取り検体採取後の枝肉洗浄の工程が、検体からの病原体の除去に一定の効果を及ぼしていることを示唆している。

次に、各施設の外皮拭き取り検体及び枝肉検体を、病原性大腸菌関連遺伝子検出の有無で 2 群に分け、衛生指標菌数との関係について検討した。施設 A 及び施設 B の病原性大腸菌関連遺伝子の検出され

た外皮拭き取り検体では、病原性大腸菌関連遺伝子陰性検体に比べて、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数共に多い傾向にあった。また、豚と体の腸内細菌科菌群数は、検体毎のばらつきが大きく計測された菌数も小さいため、一般細菌数に比べて衛生状態を適切に評価できていないように見受けられた。
また、本研究では、いずれの検体からもサルモネラ属は分離されず、遺伝子も検出されなかった。後述する牛と体に比べ、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数も低い値を示し、検体の衛生状態が的確に評価されているか疑問が残った。外皮拭き取りの方法の検証及びサルモネラ属以外の病原細菌を衛生状態の指標として検討することの必要性も示唆された。
(2)牛外皮拭き取り検体及び枝肉における衛生指標菌及び病原細菌試験結果

各施設から提供された切除検体重量について95%信頼区間を算出し、逸脱した検体がどの程度存在したかを検証したところ、どの施設においても95%信頼区間から逸脱した検体はなく、適切に採材されていたと考えられた。

施設Aでは、2021年9月～2022年2月（11月と12月は1度の採材であった）にかけて月あたり5と体（各枝肉及び外皮拭き取り検体）計50検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は4.95±0.61 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は2.28±0.58 log cfu/cm^{2}であった。枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は2.30±0.47 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は0.46±0.55 log cfu/cm^{2}であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及びSTECは分離されなかったが、外皮拭き取り検体では22検体（88.0%）で病原性大腸菌関連遺伝子が陽性であった。

施設Bでは、2021年9月～2022年2月にかけて月あたり5と体（各枝肉及び外皮拭き取り検体）計60検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は4.25±1.57 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は1.15±1.80 log cfu/cm^{2}であった。枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は4.03±0.66 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は1.26±0.41 log cfu/cm^{2}であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及びSTECは分離されなかったが、外皮拭き取り検体では10検体（33.3%）及び枝肉では1検体（3.3%）で病原性大腸菌関連遺伝子が陽性であった。

施設Cでは、2021年9月～2022年2月にかけて月あたり5と体（各枝肉及び外皮拭き取り検体）計60検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は4.84±1.02 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は1.61±1.29 log cfu/cm^{2}であった。枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は3.03±0.87 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は0.87±0.47 log cfu/cm^{2}であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及びSTECは分離されなかったが、外皮拭き取り検体では16検体（53.3%）及び枝肉では2検体（6.7%）で病原性大腸菌関連遺伝子が陽性であった。

豚と体と同様に、3施設いずれにおいても、サルモネラ属及びSTECが分離されず、外皮拭き取り検体に比べて枝肉では病原性大腸菌関連遺伝子の陽性率が減少していることから、牛と体の衛生管理は適切に行われていると思われた。牛と体では、施設毎に外皮拭き取り検体の採材タイミング及び採材部位が異なっていたが、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数いずれも施設間の有意な差は認められなかった。施設Aでは、外皮拭き取りをと体洗浄後に行ったにも関わらず、と体洗浄前に採材した他の2施設の検体に比べて病原性大腸菌関連遺伝子陽性率が高値を示した。このことから、当該施設においては、病原細菌は分離されなかったものの、洗浄等の工程の見直しが、より適切な衛生管理のために必要であることが示唆された。

次に、牛と体においても、各施設の外皮拭き取り検体及び枝肉検体を、病原性大腸菌関連遺伝子検出の有無で2群に分け、衛生指標菌数との関係について検討した。3施設とも同様の傾向が認められ、病

原性大腸菌関連遺伝子が陽性となった検体では、一般細菌数が 5 log cfu/cm^2 以上、及び腸内細菌科菌群数が 2 log cfu/cm^2 以上であり、枝肉では衛生指標菌数の減少と共に病原性大腸菌関連遺伝子が殆ど検出されなくなることが示された。

3)豚と体及び牛と体の解体工程における衛生指標菌と病原菌関連遺伝子検出状況の評価

豚と体解体工程の中で、剥皮前の工程としての、と体洗浄機前の「洗浄前」から洗浄機通過後の「洗浄後（剥皮前）」間の拭き取り検体における一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は、1 回目の試験では「洗浄後（剥皮前）」で減少傾向にあったが、一般細菌数では $p > 0.55$ 及び腸内細菌科菌群数では $p > 0.41$ でありどちらも有意水準 5%での差は認められなかった。

洗浄後（剥皮前）」と剥皮後の「枝肉」工程間では、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数いずれも減少傾向にあり、一般細菌数では $p < 0.02$ であり有意水準 5%で差が認められた（腸内細菌科菌群数に関しては負の値を「0」として集計しているため有意差検定は行っていない。）。

病原菌関連遺伝子検出状況は、「洗浄前」では 33.3%（1/3）、「洗浄後（剥皮前）」では 33.3%（1/3）、「枝肉」では 0%（0/3）であり衛生指標菌の減少と共に病原菌関連遺伝子陽性率は減少し枝肉では検出されなくなることが示された。2 回目の試験においても同様の傾向が認められたが、「洗浄前」と「洗浄後（剥皮前）」の間で減少傾向にあった一般細菌数の差について、$p < 0.03$ となり有意水準 5%で差が認められた。

牛と体の解体工程では、2 回の試験いずれにおいても、「剥皮前」と剥皮後の「枝肉」の間では、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数共に減少傾向であり、有意水準 5%で差が認められた。この間の病原菌関連遺伝子陽性率は衛生指標菌数と並行して 100%（3/3）から 0%（0/3）に減少した。

以上により、対象の施設での豚と体及び牛と体解体工程において、剥皮前後の工程における衛生管理の重要性が示された。

④ と畜場でのリステリア属菌の汚染実態と管理すべき工程に関する研究

1） リステリア属菌の定性及び定量試験

リステリア属菌は 9 月に採材した外皮及び 7 ～ 9 月に採材した枝肉冷蔵最終室床から検出されたが、すべてリステリア・モノサイトゲネス以外の菌種であった。また、クロモアガー上で多数の青色集落を認めた外皮、枝肉冷蔵室等からはリステリア属菌以外の菌種も検出された。これを裏付けるように、9 ～11 月に行った同属菌の定量試験では、外皮、前後肢落し工程の床、シンク、排水溝から多くの菌数が検出された。6 月に採材した検体からリステリア属菌の検出は認められなかった。

2） 菌叢解析

細菌科（family）階層での占有率が 20%を超えたものを確認した結果、外皮や解体処理周辺環境ではモラクセラ科が最も優勢であり、一部の外皮ではコリネバクテリウム科も優勢であった。枝肉洗浄下にある排水溝からはキサントモナス科等、他検体と異なる構成が認められ、当検体からは腸内細菌科菌群も多く検出された。枝肉冷蔵室では壁、枝肉表面においてバシラス科が最も優勢な状況にあった。リステリア科は外皮及び冷蔵室床から、各 1 リードのみが検出された。

(2) 食鳥処理場における HACCP 外部検証に関する研究

・令和 2 年度

1)成鶏とたいにおける衛生指標菌検出状況

中抜き方式で成鶏（採卵鶏）を処理する大規模食鳥処理場 2 施設（A 施設、B 施設）での衛生指標菌検出状況について、時系列を追って検討したところ、以下の知見を得た。

① A 施設では、2020 年 9 月～2021 年 1 月にかけて、月あたり 5 検体（25 とたい分の胸皮）計 25 検体を採材し、微生物試験に供した結果、一般細菌数の平均は 3.97 log CFU/ g、平均+2SD は 4.75 log CFU/ g、平均+3SD は 5.14 log CFU/

g となり、最大値 5.08 log CFU/ g を示した 1 検体を除く全ての検体は平均+2SD の範囲に収束した。また、腸内細菌科菌群数については、平均が 2.16 log CFU/ g、平均+2SD が 3.06 log CFU/ g、平均+3SD が 3.51 log CFU/ g となり、全 25 検体で平均+2SD 以内に収束した。

② B 施設では、2020 年 7 月～2020 年 11 月にかけて、6 回の採材で計 30 検体を採材し、微生物試験に供した結果、一般細菌数の平均は 3.52 log CFU/ g、平均+2SD は 4.25 log CFU/ g、平均+3SD は 4.61 log CFU/ g となり、全検体は平均+3SD の範囲に収束した。また、腸内細菌科菌群数については、平均が 2.32 log CFU/ g、平均+2SD が 3.63 log CFU/ g、平均+3SD が 4.29 log CFU/ g となり、全 25 検体で平均+2SD 以内に収束した。

③ B 施設では上述の衛生指標菌試験と並行して、カンピロバクター定量検出試験も実施した。計 30 検体のうち、25 検体ではカンピロバクター不検出（1.0 log CFU/ g 未満）であった。一方、残り 5 検体からはカンピロバクターが検出されたが、培地上に発育した集落数が多く正確な菌数把握が困難であった。なお、これらの施設で検討対象とした食鳥とたいはいずれも丸とたいで冷蔵或いは冷凍保管することなく、受け入れ後、同日中に処理されたものであった。

2）食鳥とたい検体を対象とした微生物試験法の同等性について

微生物試験法として、通知法で示される試験法に比べ、近年では複数の簡易迅速法に該当する製品が開発され、一部製品ではその妥当性も第三者認証機関によって評価され、国内に普及している。外剥ぎ方式で成鶏を処理する C 施設及び D 施設で採材された食鳥とたい（首皮）計 39 検体を対象に、ISO 法及び迅速簡易試験法（キット A または B）を並行的に使用し、衛生指標菌数を求めたところ、試験法間の R2 値は一般細菌数で 0.92、腸内細菌科菌群数では 0.90 となり、各 2 キットを用いた試験成績は通知法で得られた試験成績との間で高い同等性を認めた。なお、当該 2 施設での衛生指標菌検出成績は、A 施設及び B 施設での成績に比べ、有意に高い状況であった。工程管理情報の一つとして、当該施設ではオゾン殺菌が行われていることが確認されたが、その詳細な管理条件は得ることができなかった。こうした微生物汚染低減に資すると目される工程の詳細な情報把握は、当該施設での衛生指標菌数低減に向けた活動として、今後必要と思われる。

なお、C 施設及び D 施設で採材された 39 検体については同時にカンピロバクター定量検出試験も行われた。カンピロバクター不検出となった検体数は 11 検体認められ、残り 28 検体は陽性を示した。但し、同菌数の最大値は 3.54 log CFU/g であり、うち 20 検体は 2.0 log CFU/g 未満の菌数を示した。

・令和 3 年度

1)対象施設における食鳥処理状況並びに微生物試験結果概要

まず、大規模食鳥処理場に対し、食鳥処理の状況を確認したところ、前年度実績としての年間処理羽数は 5,609,695 羽、年間稼働日数は 280 日であり、稼働日あたりの平均処理羽数は約 2 万羽と試算された。また、同施設では冷却水中の残留塩素濃度 50 ppm を管理基準（CL）としており、また冷却水は槽内で循環させつつ、オーバーフロー式循環を行いつつ、点滴法で次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加する一般的な処理方式をとっていた。また、中抜き工程での腸切れ頻度について、1 稼働日において、5 分間の目視確認を行ったところ、195 羽中 30 羽で腸切れの発生が確認された。2 稼働日にわたり、冷却工程後の食鳥とたいを時系列を追って採材し、微生物試験に供したところ、処理直後（0 時間後）の時点で採材した食鳥とたい首皮 1 g あたりの平均菌数は、一般生菌数が 4.74 log CFU/g、腸内細菌科菌群数が 2.99 log CFU/g、カンピロバクター菌数が 1.09 log CFU/g であったが、処理半ばにおける各菌数はそれぞれ 5.29 log CFU/g、3.23 log CFU/g、1.35 log CFU/g となり、いずれも処理開始直後の検体に比べ、有意な増加を示した。更に処

理が進んだ処理終盤の食鳥とたい首皮における菌数は、一般細菌数が 5.42 log CFU/g、腸内細菌科菌群数が 3.15 log CFU/g、カンピロバクター菌数は 1.80 log CFU/g となり、一般生菌数及びカンピロバクター菌数はやや増加傾向を示したが、処理半ばに比べ、有意な差異は認められなかった。

・令和 4 年度

1）処理工程を通じた冷却水の理化学性状

(i) 塩素濃度

残留塩素濃度は処理 0 時間後の時点で 65 ppm であり、処理 2、4，6、7 時間後の同値はそれぞれ 55 ppm、49 ppm、56 ppm、51 ppm、60 ppm であった。

一方、遊離塩素濃度は処理 0 時間後の時点で 5.10 ppm であったが、処理 1 時間後には 0.07 ppm へと著減し、処理 2、4、6 時間後の同値もそれぞれ 0.05、0.40、＜0.01 ppm を示した。処理 7 時間後には再び 4.26 ppm へと上昇した。

(ii) pH

pH は処理 0 時間後の時点で 8.54 であった。処理 1 時間後には 8.66、処理 2 時間後には 8.74 を示し、処理 4、6、7 時間後の同値はそれぞれ 8.92、8.96、8.99 であった。

(iii) 濁度

濁度は処理 0 時間後には 1.38 であったが、処理 1 時間後には 9.68 へと上昇し、処理 2、4、6、7 時間後にはそれぞれ 13.76、39.63、35.70、43.60 となった。

(iv) ATP 値

ATP 値は処理 0 時間後には 3 であったが、処理 1 時間後には 29,126、処理 2 時間後には 38,248、処理 4 時間後には 74,062 を示した。処理 6 時間後には 65,192 とやや減少を呈したが、処理 7 時間後には 87,888 と再び上昇を示した。

(v) TDS 値

TDS（総溶解固形物）値は処理 0 時間後には 391 μS であったが、処理 1 時間後には 617 μS、2 時間後には 801 μS、4 時間後には 1,176 μS、6 時間後には 1,516 μ S、7 時間後には 2,020 μS を示した。

(vi) 水温

水温は処理 0 時間後では 8.50°Cであり、処理が進むにつれてわずかに上昇傾向を認めたが、最大値は 9.40°Cであり、測定期間を通じて 10°Cを上回ることはなかった。

2）処理工程を通じた冷却水の微生物性状

(i) 一般細菌数

一般細菌数は処理 0 時間後で 2.1 cfu/mL、処理 1 時間後ではすべて不検出（<1.0 cfu/mL）であり、処理 2 時間後においても 3 検体中 2 検体が不検出であった。処理 4 時間後には、26～33 cfu/mL と増加したが、処理 6 時間後には一時的に 7.1~13 cfu/mL へと減少した。但し、処理 7 時間後には 23~48 cfu/mL へと再び増加傾向を示した。

(ii) 腸内細菌科菌群及び大腸菌

腸内細菌科菌群及び大腸菌は全ての検体で不検出であった。

(iii) カンピロバクター及びサルモネラ

カンピロバクター・ジェジュニ／コリ及びサルモネラ属菌は全ての検体より検出されなかった。

3）処理工程を通じた冷却水中の菌叢変動

処理 0、1、2、4、6、7 時間後の各時点における冷却水中の細菌叢構成の変動について検討するため、16s rRNA を標的とした菌叢解析を行った。処理 0 時間後においては、環境水との関連性の高い *Phyllobacterium* 属が全体の約 84.5%を占めたが、同菌属の占有率は処理 1 時間後以降、0.01%未満となった。これに対し、廃水との関連性が報告されている *Cloacibacterium* 属や、土壌や水との関連性が報告されている *Methylobacterium* 属、*Escherichia* 属並びに *Salmonella* 属の占有率は処理 0 時間後には低かったものの、処理の経過に伴い、一過性あるいは持続性の増加を認めた。直接的な糞便汚染指標である *Escherichia* 属については、処理 2 時間後には約 12.2%の一過性の高い占有率を示したほか、*Salmonella* 属菌は処理 6 時間後に約 9.9%と占有率の一過性亢進を示した。

(3) 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

① 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究（含

考察）

A 処理場では、1 回につき 6 羽、5 回の調査を実施した。結果は表 2 に示す。第 1 回、第 2 回の調査ではカット後の肉および生食用製品からカンピロバクターが分離されることはなかった。しかしながら、第 1 、2 回ともに焼烙後の皮の 1 検体からわずかな量の菌が検出された。盲腸内容物のカンピロバクター菌数は 102〜106 程度と幅広い数値を示したが、クロアカスワブは第 1 回で 6 羽中 2 羽、第 2 回で 6 羽中 3 羽のみが陽性であり、全体的に糞便によるとたいの汚染が低レベルであった可能性がある。第 3 、4 回でも盲腸内容物の菌数は幅広い数値を示し、クロアカスワブは 6 羽全てが陽性であり、脱羽後の皮、中抜き後の皮で第 1 、2 回に比較して高い菌数による汚染が認められた。解体当初よりとたいの糞便汚染が高かったものと思われる。また、第 3 回調査の焼烙後の皮からは 3 検体全てから 75〜240MPN/10g のカンピロバクターが検出され、カット後および生食用製品からも 3 羽分 6 検体全てで 4〜240MPN/10g のレベルで菌が検出された。第 4 回でも焼烙後の皮から菌が検出され生食用製品からも 3 検体中 1 検体からわずかながら菌が検出された。第 3 回以降では、それぞれの工程でそれまでとは別の担当者が処理を行なっていたことから、内臓摘出や解体加工の手技およびと体の取り扱いなどの細かい指導が必要であろうと思われた。これらの結果を機に解体工程の環境改善と、とたいの取り扱いに対する注意喚起と衛生指導を行なった。内臓摘出時に糞便汚染を阻止するよう流しを配置し、とたい移動時には排泄腔を下部におき首を上にしてできるだけ立てるよう心がけた。内臓の摘出法も熟練者と保健所担当獣医師の両者から丁寧に指導を行った。指導後に行った第 5 回の調査結果では焼烙後とカット後の肉は全てカンピロバクター陰性であった。しかしながら、生食用製品の 1 検体からわずかなカンピロバクターが検出された。この処理場の工程では更なる衛生管理の徹底が必要であろうと思われた。

B、C 処理場では、それぞれ 6 羽 1 回ずつ調査した。B 処理場は加熱用製品を出荷しており、脱羽、内臓摘出、解体室の区分け、バブル式チラー槽の導入などをはじめ衛生の行き届いた処理場であったが、調査の結果から表面焼烙を実施しないと製品からは菌が検出されることが確認された。

C 処理場は表面加熱工程を取り入れ、外剥ぎ式の解体を行い糞便汚染の阻止を意識しながら解体していることから、加熱後の皮、解体後の肉、生食用製品のいずれからもカンピロバクターが検出されることはなかった。

D 処理場では、懸吊焼烙、外剥、解体の順で処理されていた。この処理場では鶏を自家飼育しており、農場の事前調査で、鶏直腸スワブ 1 2 検体、落下糞便、飲水、いずれからもカンピロバクターが分離されることはなかったことから、飼育段階からカンピロバクター陰性と判断し、処理工程は調査しなかった。

E 処理場は、網上焼烙、外剥、解体の手順をとっていた。1 回目の調査では、鶏個体を 6 羽識別して汚染状況を調べたところ、表面焼烙後の皮や肉からカンピロバクターが検出されることはなかった。しかしながら、2 、3 回目の調査では、個体を識別することなく多数羽処理工程で無作為に皮または肉を得て調査したところ、焼烙後の皮、肉、及び製品から微量ながらカンピロバクターが検出された。このことから、処理工程中の人為的交差汚染の可能性が示唆された。すなわち、多くの鶏を一度に多数処理する場合、放血脱羽処理室と食肉解体室との間での人や物の不適切な移動が問題となるものと思われる。

F 処理場は、内臓中抜、網上焼烙後、トラックでと体を運搬移動、別棟で解体製品化し販売を行う形であった。1 回目の調査では、焼烙後の皮と肉、及び製品にわずかながらカンピロバクターが検出された。焼烙直後にと体内腔から交差汚染しないよう取り扱いを指導したところ、2 回目の調査では、表面焼烙後の検体から菌が検出されることはなかった。

G 処理場では、内臓中抜後にチラー処理し、その

後、個別に水道水で腹腔内を洗浄、網上焼烙、解体、製品化をいう手順をとっていた。調査の結果、チラー洗浄後の皮からわずかに菌が検出されたが、表面焼烙後ではいずれの検体からも菌は検出されなかった。中抜きによる処理法でも適切にと体を取り扱えば表面焼烙により汚染を阻止できるかもしれない。

H 処理場は、チラー槽で冷却したと体をチェーンに掛けて移動させながら表面焼烙を行い、冷水シャワーによる再冷却した後、外剥ぎで解体製品化する工程であった。表面焼烙直後の皮は陰性であったが、シャワー冷却後に 1 検体微量ながら陽性が見られた。解体後の肉、製品は陰性であった。表面焼烙後の交差汚染を阻止することが課題となると思われる。

I 処理場は、搬入、放血、湯漬の工程からチェーンによる懸吊を行い大規模処理場とほぼ同じ方法によって、脱羽、内蔵中抜き、チラー処理を行っていた。その後、と体を再度チェーン懸吊して風乾、表面焼烙、氷冷、解体、製品化していた。この処理場では、鶏個体の追跡調査を行うことはできなかったため、1 回目に拭き取り調査を行った。その結果、焼烙後のと体の腹腔内スワブ１０検体中 8 検体がカンピロバクター陽性であった。また、解体室におけると体表面及びブロック肉の皮それぞれ１０検体中 2 検体ずつ陽性例が見られた。まな板などの環境拭き取り検体は全て陰性であった。2 回目調査における定量的検査においては、焼烙直後の皮は全て陰性であったものの焼烙後氷冷中の皮や解体後の肉から微量ながらカンピロバクターが検出された。中抜き後のと体腹腔内面は焼烙されないため、交差汚染の原因になりかねないと考えられる。生食用食鳥肉の生産過程でと体表面焼烙は、その過程でのカンピロバクター汚染阻止に有効ではあるが、焼烙後の交差汚染及び食肉部分への汚染を防ぐ措置も必要と考えられた。

J 処理場は購入したヒナを自家農場で飼育していたことから、処理工程調査の前に農場における鶏の保菌状況の調査を実施した。 3 つの鶏舎 A、B、C で飼育される雌雄それぞれ 4 羽のスロアカスワブを培養した結果、すべての鶏舎の鶏からカンピロバクターが分離された。分離された菌種には偏りがみられ、A 鶏舎では *C. jejuni* が優勢、C 鶏舎では *C. coli* が優勢、B 鶏舎はその中間であった。これらの農場で使用される餌、水、排出される堆肥、敷料は調査した 8 検体すべて陰性であった。J 処理場は自家農場の敷地内に位置しており、鶏搬入後、放血・湯漬・脱羽を行っていたが、チラー槽による冷却を行わず、と体を水洗するのみであった。と体は、その後、網上で表面焼烙、外剥によって解体、処理された肉は店舗へ運搬移動され一時保管された。そこで再度部分肉の表面焼烙が行われた後、スライスされて製品として販売されるという工程がとられていた。6 羽の鶏を用いて処理工程におけるカンピロバクター菌数の動きを追跡した。6 羽のうちクロアカスワブがカンピロバクター陽性だったのは 1 例のみであった。盲腸内容物中のカンピロバクター数を算定したところ、最小で $2.0X10^2$ CFU/g、最大で $1.2X10^5$ CFU/g であった。脱羽後の皮 3 検体のカンピロバクター菌数は 460〜1100 MPN/10g と比較的高い値であった。通常食鳥処理場ではチラー処理が行われ次亜塩素酸ナトリウム添加により一般的にはカンピロバクター菌数は低く抑えられるのであるが、この処理場では水道水のみで脱羽後のと体洗浄を行っているため菌数があまり下がっていないと思われる。焼烙後の皮の菌数は 93〜1100 CFU/10g であり、表面焼烙の効果が得られていなかった。外剥ぎ後の皮、解体後の肉からも少数ながらカンピロバクターが検出された。しかしながら、店舗へ移動後スライスの前に再度焼烙を行っているため、最終製品から MPN 法でカンピロバクターが検出されることはなかった。この処理場では、解体前の表面焼烙では十分な効果が得られていないが、スライス前の再焼烙でカンピロバクター汚染を阻止しているものと考えられる。

K 処理場は、一般的な内臓中抜き工程をとる処理場であった。異なる工程は解体後の肉をスライス販売するまで十分に冷却する点であった。まず、最終

製品の汚染状況を調査したところ、10g 当たり 23 MPN 以下と概ね少数ではあったが菌汚染は認められ、特にモモ肉の汚染率が高いことがわかった。工程ごとのカンピロバクター汚染菌数を調べたところ、クロアカスワブは 6 羽中 1 羽のみがカンピロバクター陽性であった。盲腸内容物中のカンピロバクター数は、最小で $1.6X10^4$ CFU/g、最大で $2.6X10^7$ CFU/g であった。脱羽後の皮 3 検体の菌数は 1 検体が 93 MPN/10g、2 検体が 2400 MPN/10g 以上であった。チラー処理後では 2 検体が 150 MPN/10g、1 検体が 9 MPN/10g と大幅に菌数が低下した。と体の表面焼烙後では 2 検体が陰性、1 検体が 4 MPN/10g であり、表面焼烙後でありながらカンピロバクター陽性例が認められた。焼烙後に一時と体を並べ置く棚での交差汚染が疑われたため、と体腹腔と棚のスワブを 3 検体ずつ追加調査した結果、それぞれ 1 検体がカンピロバクター陽性を示した。このことから、と体を並べる棚で交差汚染が起こっていることがわかった。焼烙されていない腹腔から漏れ出る液体にわずかに含まれる菌が他のと体表面を汚染していると考えられた。生食用食鳥肉のカンピロバクター汚染阻止に対して、と体表面焼烙は、それのみで完全に阻止できるものではなく、焼烙後の交差汚染及び食肉部分への汚染を防ぐ措置も必要であり、またそれ以外の工程でも可能な限りカンピロバクター菌数を低減させる必要があると考えられた。

② 生食用食鳥肉の製造工程管理に関する情報調査

1）生食用食鳥肉製品における微生物検出状況

生食用食鳥肉を製造加工する計 21 の小規模施設及び大規模 2 施設より、生食用食鳥肉製品計 230 検体を入手し、微生物試験に供した。何れも病原菌であるサルモネラ属菌、カンピロバクター・ジェジュニ/コリは不検出であった。衛生指標菌数試験を通じ、全体の平均菌数は一般細菌数が 3.52±1.16 logCFU/g であったほか 、腸内細菌科菌群数は 1.52±1.26 logCFU/g、大腸菌数は 0.48±0.71 logCFU/g であった。一般細菌数を含め、何れの指標菌も菌数分布に対数正規性は認められなかった。大腸菌については、不検出（5 CFU/ g 未満） が全体の 75.2%（173/230）を占めた。大腸菌が検出された 57 検体（24.8%）のうち、40 検体（70.2%）は 1.0-2.0 logCFU/g の菌数分布を示し、2.0 logCFU/g 以上は 5 施設で製造加工された 11 検体（4.8%、うち 3 施設では各 1 検体）に留まっていた。

腸内細菌科菌群数については 、不検出（5 CFU/ g 未満）が全体の 31.7%（73/230）に留まった。腸内細菌科菌群が検出された 157 検体（68.3%）のうち、109 検体（69.4%）は 1.0-3.0 logCFU/g の菌数分布を示し、3.0 logCFU/g 以上は 7 施設で製造加工された 34 検体（21.7%）であった。3.0 logCFU/g 以上の腸内細菌科菌群数を示した検体より代表集落を釣菌し、菌種同定のための生化学性状試験に供したところ、4 施設由来製品検体では *Pantoea* 等の環境由来と思われる細菌であることが確認されたが、*E. coli* が寡占する施設由来検体も認められた。

また、一般細菌数と腸内細菌科菌群数との間での関連性を解析したところ、相関係数は 0.67 となり、正の相関が確認された。一方、一般細菌数と大腸菌数の間での相関係数は 0.44 であった。

以上の成績より、生食用食鳥肉製品検体における衛生指標菌分布は総じて加熱用食鳥肉製品に比べ低い状況にあることが確認された。但し、一部の施設由来検体では糞便汚染指標菌が高頻度に検出され、各施設の工程管理実態との関連性をより詳細に検討すべきと考えられた。

2）微生物試験成績と各施設での工程管理実態等との関連性の探索

①焼烙面

本研究で検討対象とした生食用食鳥肉製品検体はいずれも加工工程で焼烙が施されていた。まず、各製品検体の焼烙面を目視確認したところ、表裏両面が焼烙されていた製品は、5 製品（うち 1 製品は大規模施設由来）に留まり、残り 18 製品は表面のみが焼烙されていた。焼烙面の差異と微生物検出結果との関連性を探索したところ、何れの指標菌につい

ても、両面焼烙検体は片面焼烙検体に比べ、有意に低い菌数分布を示し（P< 0.001）、特に大腸菌については、両面焼烙検体では 3 検体のみが陽性を示し、その最大値は 1.0 log CFU/g であった。これらの成績より、両面焼烙処理は微生物制御に有用であることが数的に示された。

②焼烙時間及び距離

各小規模施設における焼烙処理はバーナーを用いて行われていた。一方、バーナー口径や焼烙時間、焼烙距離等については多様であることが先行研究により明らかになっている。これらの要素と微生物検出成績との関連性を解析した結果、大規模 2 施設を除く計 21 の小規模施設全体で用いられているバーナー口径が 35 ㎜から 60 ㎜の範 囲にある施設は全体の約 76.2%（16/21 施設）を占めた。このうち 11 施設由来 59 検体（うち 6 施設で 51 検体を占有）からは大腸菌が検出されたが、口径がより小さな（15-30mm）或いは、より大きなバーナー（90 ㎜）を用いていた 5 施設由来の 50 検体中 49 検体、並びにバーナー口径が 35-60 ㎜の 5 施設由来の 50 検体全てでは大腸菌不検出であった。

焼烙に関わるその他の要素として、焼烙時間及び焼烙距離（火炎長、バーナー口からとたい表面までの平均距離）を含め、三次元散布図を作成したところ、対象とした 21 施設の焼烙条件は分散を呈した。大腸菌不検出または 1 検体のみ陽性となった施設（大腸菌低汚染群）と、大腸菌が 2 検体以上で陽性を示した施設（大腸菌高汚染群）の間で、ロジスティック回帰分析を行ったところ、各要素のうち、加熱時間が最も群間で有意差を持つ要素として抽出され（P=0.0013）、大腸菌低汚染群の平均が 3.27 分であったのに対し、大腸菌高汚染群の平均は 1.83 分であった。なお、バーナー口径は大腸菌低汚染群では平均 43.97mm、大腸菌高汚染群では平均 40.83mm であった。

焼烙距離は、大腸菌低汚染群の施設では平均 21.96cm、大腸菌高汚染群の施設では平均 23.08cm であった。これらのうち、例えば小口径のバーナーを使用する場合であっても、相対的に長い焼烙時間を取ることで、大腸菌陰性となっている施設が確認されたほか、大口径のバーナーを使用する場合には焼烙距離を短くとることにより、単位時間あたりの焼烙面積を抑え、とたい全周を焼烙するために十分な焼烙時間をとることで大腸菌陰性となっている施設も存在した。

以上より、焼烙処理にあたって焼烙距離は上述の指標を目安に可能な限り短くとり、焼烙時間を例えば 2 分以上に延長させること等が焼烙による微生物汚染低減に有効な対策と考えられた。

③内臓摘出手順

先行研究で行ったアンケート調査において、内臓摘出手順については、頸部を切開後、総排泄口を切開するとした施設と総排泄口を切開後、頸部を切開するとした施設に大別されていた。また、前者については、頸部切開後、同切開部よりそ嚢及び食道を摘出する場合と、頸部を切開した場合も、剥離のみを行い、食道より下部の消化管等を総排泄口から摘出する場合がみられていた。本研究の対象とした検体を処理していた施設では、いずれも頸部を先に切開する取り扱いではあったが、摘出方法を含めて大腸菌検出結果を比較したところ、食道以降を総排泄口から摘出した群の平均±SD 値が 1.26±0.95 log CFU/g であったのに対し、そ嚢及び食道を頸切開部より摘出後、筋胃以降を総排泄口から摘出した群の同値は 0.95±0.34 log CFU/g となり、両群間で有意な差異が認められた（P ＜0.001）。

以上の成績より、内臓摘出手順としては、頸部を切開後、そ嚢及び食道を同切開部より摘出した後、総排泄口切開部より、筋胃以降の消化管等を摘出する手順を取ることが、大腸菌汚染低減に有効と考えられた。

3)大規模食鳥処理場において生食用として処理された食鳥中抜きとたいの保管条件に関する評価

近年、食鳥処理場の集約化に伴い、食鳥中抜きとたいを受入れ、生食用食鳥肉製品を加工する小規模施設の割合が増加傾向にある。これらの小規模施設が受け入れる食鳥中抜きとたいは概して大規模食鳥処理場で処理されたものであることを踏まえ、生

食用の食鳥とたいを処理する大規模食鳥処理場の協力を得て、当該施設で処理された食鳥中抜きとたいについて、異なる時間、当該施設の保管条件である 5°C以下で保管した後の微生物挙動を評価した。

食鳥中抜きとたいの首皮部位における一般細菌数は、保存 2 日後の中央値として 4.20 log CFU/g であったが、時間経過に伴い、保存 5 日後の中央値は 5.70 logCFU/ g、保存 7 日後の中央値は 7.50 logCFU/g へと有意な増加を示した。これに対し、腸内細菌科菌群数及び大腸菌数は時間経過に伴う増加を認めず、同糞便汚染指標菌数の中央値は保存 2 日後でそれぞれ 2.90 log CFU/ g、2.90 log CFU/ g、保存 7 日後ではそれぞれ 2.50 log CFU/ g、2.25 log CFU/ g であった。

食鳥肉の主要な危害要因であるカンピロバクター・ジェジュニ/コリ及びサルモネラ属菌について定性試験により検出を試みたところ、カンピロバクター・ジェジュニ/コリは全ての検体で不検出となったが、サルモネラ属菌については、保存 7 日後の 1 検体より検出された。

以上の成績より、生食用に処理された食鳥中抜きとたいを生食用食鳥肉として加工に供する際の冷蔵保管期間としては、5°C以下で 5 日以内が妥当と考えられた。

4) 小規模施設における受入後の食鳥中抜きとたいの保存条件に関する調査

とりさし協会の協力を得て、同協会加盟会員のうち、認定小規模食鳥処理場を営む 24 事業者に対し、原料（食鳥とたい）、製品、販売ショーケースにおける冷蔵温度管理実態に関するアンケート調査を依頼し、うち 9 事業者から回答が得られた。回答事業者における冷蔵庫内実測温度は保存対象の別を問わず、いずれも 10°C以下を満たし、特に 4 事業者では、各冷蔵庫の実測温度は全て 4°C以下であった。一方、3 事業者からは、原料冷蔵庫の情報のみが得られ、製品冷蔵庫、販売ショーケースの情報については回答がなかった。

5)小規模事業者における食鳥処理段階での衛生管理

南九州地方で生食用食鳥肉を取り扱う事業者の多くが小規模である実態を鑑み、とりさし協会の協力を得て、同協会に加盟する小規模事業者宛に工程管理に関する追加アンケート調査を行った。

①生鳥の湯漬け条件

生鳥の湯漬け条件に関する問いに対し、計 9 事業者から回答が得られた。湯漬け温度の最低値は 60°Cであったが、当該事業者の処理時間は 60～120 秒と他事業者に比べ、相対的に長い傾向を認めた。また、温度の最高値は 75°Cであった。

回答があった 7 事業者の平均湯漬け処理時間は約 64 秒、最短時間は 25 秒であった。

②脱羽後とたいの洗浄の有無

脱羽後とたいについては、9 事業者中 6 事業者で「洗浄している」との回答があり、1 事業者は「汚れている場合には洗浄している」との回答であった。残り 2 事業者については「洗浄していない」との回答であった。

③冷却水の種類、温度及び塩素濃度管理

本項目については 7 事業者から回答があり、脱羽後とたいの冷却にあたり使用している冷却水の種類としては、4 事業者が「氷水」、2 事業者が「流水」、1 事業者が「チラー水」との回答が得られた。

次に、「氷水」の温度管理状況を確認したところ、2 事業者は 3°C～8°C、4°C～10°Cと 10°C以下の回答であったが、残り 2 事業者では 10～15°C、または氷がなくならないように管理（温度測定は実施していない）との回答であった。このうち、1 事業者は中抜き処理方式をとっており、食鳥中抜きとたいを洗浄・消毒しているとのコメントが付されていた。なお、「流水」を用いた冷却を行うと回答のあった事業者の水温は 12°C～18°C、または 15～20°Cであった。これに対し、「チラー水」を用いている事業者では 6°C～9°Cに水温を管理しているとの回答があった。

④焼烙条件

「とりさし協会」では、「脚：２０秒以上、体：４０秒以上、焦げ目がつき、水分がなくなるまで」

を推奨すべき焼烙条件として例示している。食鳥処理業に併設して食肉処理業を営む小規模事業者に対し、加工時の当該条件を満たしているかについて回答を求めたところ、すべての事業者より条件を満たしているとの回答があった。

6）小規模事業者における食肉加工段階での衛生管理

上述の「とりさし協会」推奨ガイドラインで示される焼烙条件を満たしているかを、生食用食鳥肉の加工を営む小規模事業者に照会したところ、計 6 事業者から回答が得られ、うち 5 事業者では「満たしている」と回答があった。1 事業者では「満たしていない」との回答であったが、当該事業者は正肉を外部の処理事業者より受け入れ、塩素濃度 100ppm で 30 分間攪拌浸漬して殺菌し、流水タンク内で洗浄した後、上下ガスバーナーコンベアを 15 秒間通過させることで焼烙工程を管理しており、製品について数回のふき取り検査を実施し、一般細菌が陰性であることを確認しているとのコメントがあった。

7)小規模事業者が製造加工するとりさし製品重量

とりさし製品を販売する小規模事業者に 1 包装あたりの最少重量について調査を行ったところ、いずれも 100 g 以下との回答が得られた。

(4) と畜場・食鳥処理場の内部検証に関する研究

1)内部検証（微生物試験）の実施状況について

各事業者が自主検査として実施している微生物試験の項目について書面アンケート形式での調査を実施し回答を得た。生菌数に関しては同項目に対する自主検査が必須となっている対 EU 向け製品のみならず、国内向け製品等についても広く自主検査が実施されている事が確認された。他方で、外部検証通知で微生物検査項目として指定されている腸内細菌科菌群検査については事業者による自主検査実施項目として一般的ではない実態が明らかとなった。また、大腸菌数については「と畜場法施行規則の一部を改正する省令等の施行について」（平成 9 年 1 月 28 日衛乳第 25 号）において必須項目として指定されているため、国内向け製品工場では広く実施されており、加えて大腸菌群数についても国内での衛生指標菌としての認知度が高いことから、比較的広く実施されている事が確認された。病原微生物検査については営業形態により検査対象微生物は多様であり、輸出向け製品工場の併設等、特段の理由がない限りはその実施実績は低い傾向が見られた。

2)衛生指標菌の検出状況と病原微生物汚染の比較検証

微生物汚染状況と衛生指標菌の検出状況の相関について考察する目的で枝肉を対象とした微生物試験を行った。内部検証モデルとして枝肉拭き取りサンプルを、外部検証モデルとして枝肉切除サンプルを同一と体から採取し、また、比較対照として枝肉サンプリングを行なった牛及び豚の屠畜前（生体洗浄後、スタンニング直前）の外皮より拭き取りサンプルを採取した。各サンプルに対して、衛生指標菌として生菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、大腸菌群数を、病原微生物汚染の指標として STEC（牛のみ）、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌について検査を実施し、7 回の独立した採取日のそれぞれにおいてと畜前後の汚染状況について比較したところ、と畜前には病原微生物汚染の指標とした STEC（牛のみ）及び黄色ブドウ球菌（牛及び豚）が検出された一方で、と畜後の枝肉においては拭き取り試験及び切除試験のいずれにおいてもこれらの病原微生物は検出されなかった。この時、生菌数についてはと畜前に牛で 5 log10 cfu/cm2 程度、豚で 4 log10 cfu/cm2 程度であったものが、と畜解体後には牛豚ともに拭き取り試験で 2 log10 cfu/cm2 以下程度、切除試験で 3 log10 cfu/cm2 以下程度まで低減されていた。腸内細菌科菌群及び大腸菌群については、と畜前に牛で 2.5 log10 cfu/cm2 程度、豚で 1 log10 cfu/cm2 程度であったものが、と畜解体後には拭き取り試験及び切除試験のいずれにおいても多くのもので検出限界以下まで低減されていた。大腸菌についても、と畜前に牛で 1.5 log10 cfu/cm2 程度、豚で 0.5 log10 cfu/cm2 程度であっ

たものが、と畜解体後には拭き取り試験及び切除試験のいずれにおいても多くのもので検出限界以下まで低減されていた。

3)内部検証（微生物試験以外）の実施状況及び外部検証への対応について

外部検証通知においては同通知内別表１及び２の項目について、月一回以上の記録確認及び、原則毎日の現場検査を実施する事となっている。別表１及び２に示された確認項目は膨大なものであり、これらの外部検証を効率的に実施するためにはと畜事業者が自ら行う内部検証活動の結果を有効活用することが不可欠であると考えられる。そこで本研究では外部検証通知と内部検証実施状況の整合性について検証を行う目的で、各事業者に対して内部検証の実施状況及び頻度について書面アンケート及びインタビュー形式での調査を行った。

と畜場法施行規則においては第３条第１項及び第７条第１項においてと畜場の衛生管理及び衛生的なとさつ・解体に関する要求事項が、食鳥検査法施行規則においては別表第三において食鳥処理場の衛生管理及び食鳥、食鳥とたい、食鳥中抜とたい及び食鳥肉等の衛生的な取扱に関する要求事項が示されている。外部検証通知の別表１及び２に示される各項目については上記の施行規則内の要求事項とよく一致しており、施行規則に則った適切な事業所運営を行う事で外部検証通知の別表１及び２に示された全ての確認事項への対応が可能な仕組みとなっている。一方で、衛生管理等に対する検証については、と畜場法施行規則では第３条第１項２６号及び第５項４号に加え第７条第１項２０号及び第４項４号において、食鳥検査場法施行規則では別表第３第４号ハに加え第４条第３項４号において要求事項として示されている。事業者への聞き取り調査の結果、施設の衛生管理及びと体等の衛生的な処理作業（と畜場法施行規則第３条第１項及び第７条第１項関連及び、食鳥検査法施行規則別表第三関連）についての理解は非常に進んでおり、各工程の管理記録も十分に作成されていることが確認された。一方で、検証（と畜場法施行規則第３条第１項２６号及び第５項４号、及び第７条第１項２０号及び第４項４号関連及び、食鳥検査法施行規則別表第３第４号ハ及び第４条第３項４号関連）については、事業者によってその理解度が様々であり、この事が原因で内部検証に対する取り組み状況（方法及び頻度）が多様であることが明らかとなった。

食肉衛生検査所に対しても聞き取り調査を実施し、外部検証の実施方法について確認するとともに、現状の問題点について抽出を行なった。各食肉衛生検査所では外部検証通知に従った外部検証活動が実施され、ウォークスルー方式での現場確認に加え、事業者が作成した記録の検査も実施されていることが確認された。外部検証通知においては別表１及び２の項目について月一回以上の記録確認及び、原則毎日の現場確認を実施する事となっており、各食肉衛生検査所では基本的にこれらの頻度に従った検証活動が実施されていたが、別表１及び２に示された確認項目は膨大なものであり、原則毎日実施する現場確認と併せてその作業量が膨大なものとなっていることも明らかとなった。また、内部検証と外部検証との間の連携も弱く、この事が原因でと畜・食鳥検査員による外部検証の負担が大きくなっている事も明らかとなった。

４．内部検証の手順書案の作成

検証活動に関する聞き取り調査の結果、事業者においては検証に関する理解が進んでいないこと、及び外部検証との連携がなされていないことが明らかとなり、事業者に対する内部検証実施支援の必要性が抽出された。そこで本研究では、事業者が参照可能な内部検証の手順書案の作成を行った。内部検証の手順書案の作成にあたっては、事業者及びと畜・食鳥検査員への聞き取り調査の結果を踏まえ、以下の作成方針を設定した。

・検証の目的について事業者の理解促進を図る

・施行規則と内部検証の関連性について明確化する

・外部検証通知との整合性を図り、内部検証と外部検証の連携を強化することで外部検証の効率化に資するものとする

・検証の頻度等について海外の HACCP に係る規格

との整合性を考慮する
・事業者の負担軽減のために、チェックシート方式を基本とする
　上記の方針に従って手順書原案を作成後、と畜・食鳥検査員及び事業者からの意見聴取を行い、実行性を高めた形での内部検証の手順書の最終案を作成した。

(5) 国際動向を踏まえた情報の収集整理
　各国の情報を以下に取りまとめた。
<< 牛、豚等獣畜の食肉 >>
< 英国 UK >
欧州連合(EU)の規則に準拠し、さらに一部は国内法で細部を規定している。

A: 検査対象菌と対象動物
・検査対象項目(菌)：一般生菌数, 腸内細菌科菌群, サルモネラ属菌
・対象動物種：牛, 緬羊, 山羊, 馬, 豚
＊サルモネラ属菌の存在に関する基準及び条件は、サルモネラ属菌の有病率に見られる変化に照らして改訂される。

B: 検体採取頻度
と畜場は、年間の処理動物数に応じて、①-⑤の 5 つに分類（*1）され、各区分で検体採取頻度及び検査対象菌株が異なる。
①　一般と畜場
1) 初期の検体採取頻度及び試験項目：
　一般生菌数, 腸内細菌科菌群, サルモネラ属菌：動物種毎に 1 週毎 1 回 5 検体
＊1 週間の各曜日が網羅するように、検体採取の曜日は毎週変更する。

2) 結果が優良で採取頻度を下げる場合：
・一般生菌数, 腸内細菌科菌群を対象とし、5 検体/週, 6 週間連続（30 検体/種)して優良結果が得られた場合には、動物種毎に 2 週毎 1 回 5 検体としてもよい。
・サルモネラ属菌
5 検体/週, 30 週間連続（150 検体/種）して優良結果が得られた場合には動物種毎に 2 週毎 1 回 5 検体としてもよい。

②　小規模と畜場 A
1) 初期の検体採取頻度及び試験項目
・一般生菌数, 腸内細菌科菌群：動物種毎に 1 週毎 1 回 5 検体
・サルモネラ属菌：動物種毎に 4 週毎 1 回 5 検体

2) 結果が優良で採取頻度を下げる場合：
・一般生菌数, 腸内細菌科菌群：5 検体/週, 2 週間連続（10 検体/種）して優良結果が得られた場合には動物種毎に 4 週毎 1 回 5 検体としてもよい。
・サルモネラ属菌：頻度の削減無し。

③　小規模と畜場 B
1) 初期の検体採取頻度：
・一般生菌数, 腸内細菌科菌群：動物種毎に 1 週毎 1 回 5 検体
・サルモネラ属菌：不要。
2) 結果が優良で採取頻度を下げる場合：
・一般生菌数, 腸内細菌科菌群：5 検体/週, 2 週間連続（10 検体/種）して優良結果が得られた場合には、動物種毎に 12 週毎に 1 回 5 検体としてもよい。

④　小規模と畜場 C
1) 初期の検体採取頻度：
・一般生菌数, 腸内細菌科菌群：動物種毎に連続 5 検体
・サルモネラ属菌：必要無し
2) 結果が優良で採取頻度を下げる場合：
・一般生菌数 腸内細菌科菌群：動物種毎に優良となった最後の検査から 1 年後に連続 5 検体としてもよい。

⑤　小規模と畜場 D
・一般生菌数 腸内細菌科菌群, サルモネラ属菌：必要無し

(*1) と畜場の分類

と畜場は、年間の処理動物数によって、以下の 5 つに分類する

① 一般と畜場

年間処理数：20,000 頭超の牛もしくは馬、又は 100,000 頭超の豚，緬羊もしくは山羊

（1 週間に 400 頭超の牛，馬、又は 2,000 頭超の豚，緬羊，山羊）

② 小規模と畜場 A

年間処理数：7500 頭超 20,000 頭未満の牛もしくは馬、又は 37,500 頭超 100,000 頭未満の豚，緬羊もしくは山羊

（1 週間に 150 頭超 400 頭未満の牛，馬、又は 750 頭超 2,000 頭未満の豚，緬羊，山羊）

③ 小規模と畜場 B

年間処理数：1,500 頭超 7,500 頭未満の牛もしくは馬、又は 7,500 頭超 37,500 頭未満の豚，緬羊もしくは山羊

（1 週間に 30 頭超 150 頭未満の牛，馬、又は 150 頭超 750 頭未満の豚，緬羊，山羊）

④ 小規模と畜場 C

年間処理数：500 頭超 1,500 頭未満の牛もしくは馬、又は 2,500 頭超 7,500 頭未満の豚，緬羊もしくは山羊（1 週間に 10 頭超 30 頭未満の牛,馬、又は 50 頭超 150 頭未満の豚，緬羊，山羊）

⑤ 小規模と畜場 D

年間処理数：500 頭未満の牛もしくは馬、又は 2,500 頭未満の豚，緬羊もしくは山羊（1 週間に 10 頭未満の牛，馬、または 50 頭未満の豚，緬羊，山羊）

C1: 検体採取場所　ISO 17604 に準拠

冷却前の枝肉から採取する。

C2: 検体採取方法　ISO 17604 に準拠

汚染されている可能性が最も高い場所を選択。

(ISO 17604 で、牛 12 箇所，豚 10 箇所，緬羊 6 個所が示されている。図 1)

＜一般生菌数、腸内細菌科菌群＞

1 回の検査: 1 個体の枝肉から 1 検体，動物種毎に 5 個体，　計 5 検体採取

採取方法：切除法（1 検体から 4 箇所 総計 20 cm2）又はスワブもしくはスポンジ法　（1 検体から 4 箇所，各 100 cm2，小型反芻獣は各 50 cm2）

判定：5 検体の平均 log をとる

＜サルモネラ属菌＞

１回の検査: 1 個体の枝肉から 1 検体，動物種毎に 5 個体，計 5 検体採取

採取方法：スポンジ法（最低でも 1 検体 400 cm2 の面積),

判定：連続した 10 回の検査の検体（50 検体）中の陽性数

D: 試験方法

一般生菌数: ISO 4833 に準拠

腸内細菌科菌群: ISO 21528-2 に準拠

サルモネラ属菌: ISO 6579 に準拠

E: 判定基準

規則に示された限界値と比較して判定

・牛，緬羊，山羊，　馬

一般生菌数　　単位：　log cfu/cm^2

優良	3.5 (2.8) 以下
許容	3.5-5.0 (2.8-4.3)
不適合	5.0 (4.3) 超

スワブもしくはスポンジ法では()内の値

腸内細菌科菌群　単位：log cfu/cm^2

優良	1.5 (0.8) 以下
許容	1.5-2.5 (0.8-1.8)
不適合	2.5 (1.8) 超

スワブまたはスポンジ法では()内の値

サルモネラ属菌　50 検体中の陽性数

優良	陰性
許容	2 未満

不適合　　2 超

・豚
一般生菌数　　単位： log cfu/cm^2
優良　　4.0 (3.3) 以下
許容　　4.0-5.0 (3.3-4.3)
不適合　　5.0 (4.3) 超
スワブまたはスポンジ法では()内の値
腸内細菌科菌群　単位： log cfu/cm2
優良　　2.0 (1.3) 以下
許容　　2.0-3.0 (1.3-2.3)
不適合　　3.0 (2.3) 超
スワブまたはスポンジ法では()内の値
サルモネラ属菌　50 検体中の陽性数
優良　　陰性
許容　　3 以下
不適合　　3 超
＊サルモネラ属菌の判定基準に関しては、EU 規定では以下の表記となっていた。
・牛，緬羊，山羊，　馬
優良　　2 以下
不適合　　2 超
・豚
優良　　3 以下
不適合　　3 超

F: その他
　食肉の温度管理: 施設において、以下の温度を超えないように保管管理する。
- 　牛肉(枝肉を含む)　　：7 ℃
- 　内臓　　：3 ℃

＜ アメリカ合衆国　USA ＞
I: 大腸菌（Biotype 1)：工程管理検証
A: 対象動物種：牛，緬羊，山羊，　馬，　ラバ，その他の馬科動物，豚（*1）
2 種類以上の対象動物をと殺する施設は、最も多くと殺する対象動物を検査しなければならない。

(*1)：豚に関しては、事業者が複数の指標菌（一般生菌数，腸内細菌科菌群，大腸菌群，大腸菌(Biotype 1)など)から 1 つ以上の指標菌を選ぶことを認めている。

B: 検体採取頻度
・牛，緬羊，山羊，馬，ラバ，その他の馬科動物: 300 と体毎に 1 回。
・豚: 1,000 と体毎に 1 回（*2）
　上記ともに、と畜場の稼働期間中は、各週，最低 1 回を採取すること。但し、小規模と畜場（*3)は、以下の通り。
- 　スポンジ法の場合：毎年 6 月 1 日以降の 1 週間完全稼働日以降、週に最低 1 回を採取し、翌年の 6 月 1 日まで継続する、もしくは 13 検体が採取されるまで継続する（いずれか早い方)。
- 　切除法の場合：毎年 6 月 1 日以降の 1 週間完全稼働日以降、週に最低 1 回は採取し、一連の 13 回の検査で基準を満たすまで継続する。

（*2)：豚のと畜場では、 1 回の採取で内蔵摘出前前と冷却後の工程それぞれで 1 検体ずつを採取する。(1,000 頭ごとに 2 検体)。冷却は最低 12 時間行い、冷却の最大時間の制限はない。
冷却前に脱骨を行う施設では、内蔵摘出前に 1 検体、脱骨前の最終洗浄後に 1 検体を採取する。枝肉の冷却を行う施設では、内蔵摘出前に 1 検体、冷却後に 1 検体を採取する。これらの 2 検体は、同じ枝肉から採取する必要はない。
　豚の小規模と畜場(*3) では、冷却後の工程で 1 検体を採取する。13 回連続して検体を検査した後、効果的に工程管理を維持していることを証明できる場合、その事業所は検体採取の頻度を減らすように変更するか、検体採取を中止することができる。

（*3)：小規模と畜場
・牛，緬羊，山羊，馬，ラバ，その他の馬科動物：年間処理数が牛 6,000 頭、緬羊 6,000 頭、山羊 6,000 頭、馬、ラバ若しくはその他の馬科動物 6,000 頭を

超えない、又は、牛 6,000 頭及び全家畜の合計が 20,000 頭を超えない。
・ 豚：年間の豚処理数が 20,000 頭以下、もしくは、牛の処理数が 6,000 頭を超えずかつ全家畜の合計処理数が年間 20,000 頭を超えない。

以下のいずれかに該当する事業者は、豚の小規模と畜場としての上記の検体採取条件を適応しない。

- 豚の年間処理数が 20,000 頭超える場合。
- 全家畜の年間合計処理数が 20,000 頭を超える場合。
- 全家畜の年間合計処理数が 20,000 頭を超えていない場合でも牛、緬羊もしくは山羊の処理数が 6,000 頭を超えている場合。

C: 検体採取方法

・牛の枝肉：事業者は、ともばら flank、胸部 brisket、臀部の 3 箇所から、切除法あるいはスポンジ法で採取する。剥皮をしていない仔牛の場合、事業者は、ともばらの内側、胸部の内側、臀部の内側の 3 箇所からスポンジ法で採取する。

・緬羊、山羊、馬、ラバ、またはその他の馬科動物の枝肉：事業者は、ともばら、胸部、臀部の 3 箇所からスポンジ法で採取する。剥皮をしていない場合、事業者は、ともばらの内側、胸部の内側、臀部の内側の 3 箇所からスポンジ法で採取する。

・豚の枝肉：施設は、もも ham、腹部 belly、頚部 jowl の 3 箇所から切除法あるいはスポンジ法で採取する。

・スポンジ法を用いた場合は、統計的工程管理の手法を用いて検査結果を評価する。

＜切除法＞

以下のサイズを 1 枚片として切り取る、

・牛

ともばら　：長さ 8 インチ（20.3 cm）、幅 6 インチ（15.2 cm）、厚さ 1/2 インチ（1.3 cm）

胸部　：長さ 8 インチ（20.3 cm）、幅 6 インチ（15.2 cm）、厚さ 4 インチ（10.2 cm）

臀部　：長さ 8 インチ（20.3 cm）、幅 6 インチ（15.2 cm）、厚さ 4 インチ（10.2 cm）

・豚（表皮を切り取る）

-もも　：長さ 10 インチ（25.4 cm）、幅 5 インチ（12.7 cm）、 厚さ 1/2 インチ（1.3 cm）

- 腹部　：長さ 10 インチ（25.4 cm）、幅 5 インチ（12.7 cm）、厚さ 1/2 インチ（1.3 cm）

- 頚部　：両側からそれぞれ長さ 5 インチ（12.7 cm）、幅 5 インチ（12.7 cm）、 厚さ 1/2 インチ(1.3 cm)

上記の検体から、試験室で直径 3.6 cm 表面積約 10cm^2 の円形の組織を 2 枚ずつ切り取り、検査に用いる。

＜スポンジ法＞

・牛，馬，豚: 1 箇所の面積は 100 cm^2

・緬羊，山羊: 1 箇所の面積は 50 cm^2

D: 試験方法

AOAC International の AOAC Official Method として承認されているもの、もしくは、最確数（MPN）法 （適切な MPN 指数の 95%上下信頼区間を満たし、外部学術団体によって評価試験が実施され、承認、公表されているもの)。

E: 判定基準

・直近の検体数（n) 13 検体中の結果で判定する。

・合格判定値（m）以下の場合、合格とする。

・合格判定値（m）から条件付き合格判定値（M）までの条件付き合格範囲（m~M)を示す検体数（c）が 3 検体の場合、合格とする。

・(m~M）の値を示す検体数（c）が 4 検体の場合、不合格とする。

M 以上の値を示す検体が 1 検体以上ある場合、不合格。

・牛，緬羊，山羊， 馬， ラバ，その他馬科動物

合格判定値（m）	陰性（*4）
条件付き合格判定値（M)	100　cfu/cm^2
検体数（n）	13

条件付き合格範囲の検体数（C）　3

(*4) 陰性：検出限界 5 cfu/cm^2 以下

・豚（*5)

合格判定値（m）　10 cfu/cm^2

条件付き合格判定値(M) 10,000 cfu/cm^2

検体数（n）　13

条件付き合格範囲の検体数（C ）　3

(*5)　米国農務省食品安全検査局（FSIS）は、豚における大腸菌の性能基準を規則から削除している。しかし、継続して大腸菌を測定している小規模事業者等が、この基準に満たすことで、米国農務省食品安全検査局（FSIS)の要求事項への適合証明に使用することを選択することができる、と記載されている情報もある。

II サルモネラ属菌：病原体低減性能評価

A: 対象動物種：牛

＊豚のサルモネラ属菌の検査は 2011 年に廃止

B: 検体採取頻度

上記　I 大腸菌と同じ,

検査員は、抜き打ちで検体採取を行う。

C: 検体採取方法

上記　I 大腸菌のスポンジ法と同じ

D: 試験方法

米国農務省食品安全検査局（FSIS)監修の微生物試験室ガイドブックで示された方法（MLG 4.10）

もしくは、当該方法と同等以上の方法。

E: 結果判定基準

サルモネラ属菌の達成目標値

検体数（n)中、最大許容検体数（c）以上の検体数が、達成規格値（サルモネラ陽性率）を超えてはならない。

・去勢牛/未経産牛

達成目標値（サルモネラ陽性率）　1.0%

検体数（n）　82

最大許容検体数（c）　1

・廃用牛/ 種雄牛

達成目標値（サルモネラ陽性率）　2.7%

検体数（n）　58

最大許容検体数（c）　2

III: STEC (志賀毒素産生性大腸菌)：HACCP システム検証

(対象の血清型：O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121 並びに O145)

A: 対象動物種

牛（仔牛も含む）

B:検体採取頻度

1 週間あたりの牛肉生産量に応じて以下の頻度で行う。

- 113,400 kg 以上: 少なくとも月 1 回(年 12 回)
- 2,268～113,400kg: 少なくとも 2 ヶ月に 1 回（年 6 回）
- 2,268 kg 未満 ： 少なくとも 3 ヶ月に 1 回(年 4 回)

但し、4 月から 10 月は、採取頻度を 2 倍以上にするべきである。

C: 検体採取方法

N60 法：不適切な衛生的な処理により牛肉表面が汚染される可能性から、薄切り肉片を採取することが重要。牛肉外表面から 60 枚の薄切り検体を採取する。各検体スライス片は、長さ約 3 インチ（7.6 cm)、幅約 1 インチ（2.5 cm)、厚さ約 1/8 インチ(0.3 cm)。肉生産ロットが 60 個未満である場合を除き、 1 個体から 1 つの検体スライス片のみを採取する。

3 枚の滅菌済袋（Whirl-Pak バッグ)を使用し、2 枚の滅菌サンプリング袋にそれぞれ検体スライスを 30 枚ずつ入れる。3 枚目の滅菌サンプリング袋

には、予備として同じ生産ロットから検体を無菌的に採取する。

D: 試験方法

米国農務省食品安全検査局（FSIS）監修の微生物試験室ガイドブックで示された方法（MLG 5C.01） あるいは当該方法と同等以上の方法。

MLG 5C.01 法の概略：液体培地での増菌培養後、培養液を用いてスクリーニングとして *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の PCR での検出を行う。スクリーニング PCR で陽性であった検体は、PCR での血清型別および磁気ビースを用いて培養液の濃縮後、分離培地を用いて菌の分離を行う。分離培地で単離された集落を用い、O 抗原の存在を凝集試験で確認するとともに、PCR で *stx* 遺伝子および *eae* 遺伝子の存在を確認する。最終的に 5%の羊血を含むトリプティック大豆寒天培地に接種し、生育した単離集落を用いて、再度、O 抗原の存在、*stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、対象となる血清群のいずれかを有する大腸菌であることを確認し、STEC 陽性と確定する。

E: 結果判定

陽性の場合、製品が STEC に汚染されていると判定し、適正に管理し記録するとともに適正に処分を行う。陽性の製品は、加熱調理用とするか廃棄する。

< オーストラリア AU >

A: 検査対象項目

(1) 工程管理の検証: 一般生菌数（好気性平板菌数 APC)、(一般)大腸菌

(2) 病原体削減の検証: サルモネラ属菌

B: 検体採取頻度

・毎日、少なくとも 1 検体/日は採取する。

・検体採取を行う枝肉は無作為に選択する。

・検体採取の頻度は、食肉処理区分、作業ラインごとに個別に決める。

1） 一般生菌数及び大腸菌

・去勢牛，未経産牛,廃用牛，種雄牛: 300 枝肉につき 1 検体

・馬，ラバ，ロバ: 300 枝肉につき、1 検体

・豚: 1,000 枝肉につき、1 検体

・緬羊，仔羊，仔牛，山羊: 1,000 枝肉につき 1 検体

※大腸菌と一般生菌数の検査は、同一検体から行うことができる。

2) サルモネラ属菌

・去勢牛，未経産牛,廃用牛,種雄牛: 1,500 枝肉につき 1 検体

・馬，ラバ，ロバ: 1,500 枝肉につき 1 検体

・豚: 5,000 枝肉につき 1 検体

・緬羊，仔羊，仔牛，山羊: 5,000 枝肉につき 1 検体

C1: 検体採取する場所

・冷却後の枝肉

・検体採取する枝肉の冷却時間

-牛，豚，馬，ラバ，ロバ，ラクダ ：12 時間以上

-緬羊，山羊，その他の小型動物 ：4 時間以上

＊冷凍設備の性能評価を検証することも微生物検査の重要な要素の一つであることから、検体を採取する枝肉はすべての冷凍設備から選択する （1 つの冷凍設備からのみ選択されるべきではない）

C2: 検体採取方法

スポンジ法 （希釈液の約 10mL を用いてスポンジを湿らせ、採取前には余分な液体を絞る。）

科学的に汚染が最も高いと確認されている部位(以下に示す）から検体を採取する。

以下に示す部位が個々の施設で汚染される可能性の高い部位ではないという証拠がある場合には、施設が代替部位を指名することができる。

<u>採取部位と面積</u>

・牛、馬、ラバ、ロバ

部位：ともばら、胸部、尻肉の 3 箇所。ともばら、胸部、尻肉の順に採取する。

（スポンジの片面を使い ともばら、胸部を採取し、もう片面で尻肉を採取する。）

各部位の面積は、10 cm 四方 100 cm^2 (総面積 300 cm^2)

・緬羊、山羊、仔牛
部位：ともばら、胸部、腰中位の 3 箇所。ともばら、胸部、腰中位の順に採取する。（スポンジの片面を使い、ともばら、胸部を採取し、もう片面で腰中位を採取する。）
各部位の面積は、5 cm 四方 25 cm^2 (総面積 75cm^2)
・豚
部位：腹部、もも、頚部の 3 箇所。腹部、もも、頚部の順に採取する。(スポンジの片面を使い、腹部、ももを採取し、もう片面で頚部を採取する。)
各部位の面積は、10 cm 四方 100 cm^2 (総面積 300 cm^2)

検体調整
・一般生菌数及び大腸菌検査：3 箇所の検体採取後、希釈液（緩衝ペプトン水等）を約 15 mL 加え、最終的にスポンジに添加する希釈液総量は 25 mL とする。
・サルモネラ属菌検査：増菌培養中スポンジが確実に希釈液で覆われるように、最終的な希釈液（緩衝ペプトン水）の量は 60～100 mL とする。
・採取した検体は、0～7 °Cで輸送・保存し、凍結させてはいけない。なお、一般生菌数の試験を行う場合は、0～5 °Cの温度範囲とする。

D: 試験方法
試験は、監督省庁が承認した方法を使用しなければならない。以下に承認済の方法の一部を示す。
・一般大腸菌: AS 5013.5-2016, AOAC 990.12, AOAC 2008.10, AOAC010404, AOAC 091702
・大腸菌：AS 5013.15-2006 (ISO 7251:2005), AOAC 991.14, AOAC 998.08, AOAC 110402, AOAC 070901
・サルモネラ属菌：AS 5013.10-2009 (modified ISO 6579:2002) , MLG4, AOAC 2003.09
※採取後 24 時間以内に検査を開始する。（遅くとも採取日から 2 日目までに開始する）
※一般大腸菌と大腸菌の結果は、枝肉表面の CFU/cm^2 として報告する。サルモネラ属菌の検査の結果は、「陰性」または「陽性」として報告する。

E: 判定基準
1） 一般生菌数及び大腸菌
・検体数（n）連続した 15 検体中の結果で判定する。
・許容値（m）以下の場合、合格とする。
・許容値（m）超から許容上限値（M）以下までの値を示す検体が、条件付き合格範囲の検体数（c）以下の場合 合格とする。
・許容上限値（M）より大きい場合、不合格。
・許容上限値（M)より大きい値を示す検体が 1 検体以上ある場合、不合格。
※大腸菌検査で不合格の場合：10 営業日以内にと体処理手順の見直しを開始し、考えられる要因の調査、再発を防止するための是正措置及び予防措置の実施を施設に要求する。
2） サルモネラ属菌
検査結果を性能基準に照らして評価する。検体数(n)中、サルモネラ属菌が検出された陽性検体数が最大許容検体数（c）を超えた場合、基準を満たしていないと判断する。
サルモネラ属菌の性能基準を満たさない場合、施設は 10 営業日以内に考えられる原因を調査し、不衛生または衛生的な服装の証拠が得られた場合は、是正措置及び予防措置を取らなければならない。また、サルモネラ属菌陽性検体は、サルモネラ菌参照検査機関で血清型別試験を行わなければならない。

<< 食鳥肉 >>
< 欧州連合 EU >
A: 検査対象項目と対象動物
(1) 衛生管理の指標
検査対象項目（菌）：サルモネラ属菌（肉用鶏、七面鳥）, カンピロバクター属菌（肉用鶏）
(2) 管理基準
検査対象項目：サルモネラ属菌 血清型 Typhimurium 及び Enteritidis）（肉用鶏）
＊サルモネラ菌の存在に関する管理基準及び条件

は、サルモネラ菌の有病率に見られる変化に照らして改訂されるもの
B: 検体採取頻度
少なくとも週 1 回 5 検体。曜日に偏りがないこと。以下の結果の場合、検体採取を隔週に変更できる。
・サルモネラ属菌：連続した 30 週間の結果が全て適合レベルであった場合
・カンピロバクター属菌：連続した 52 週間の結果が全て適合レベルであった場合

C1: 検体採取場所
冷却後の食鳥中抜きとたい

C2: 検体採取方法、採取量
採取方法：切除法
採取部位：頸皮（頸皮のみで重量が不足する場合はその他の部位の皮及び表層筋肉を含めても良い）
a: サルモネラ属菌とカンピロバクター属菌を同一試験室で検査する場合
　1 回の検体採取で少なくとも 15 羽を選定。少なくとも 3 羽分の頸皮計 26 g をまとめて 1 検体とし、5 検体（= 15 羽分)を試験に用いる。
b: サルモネラ属菌とカンピロバクター属菌を別の試験室で検査する場合
　1 回の検体採取で少なくとも 20 羽を選定。少なくとも 4 羽分の頸部の皮計 35 g をまとめて 1 検体とし、5 検体（= 20 羽分)を試験に用いる。検体は分割し、25 g (25 g x 5 検体）をサルモネラ属菌の検査に使用し、10 g (10 g x 5）をカンピロバクター属菌の検査に使用する。
　いずれも、採取から検査開始迄の輸送時の検体温度は 1-8 °Cとし、0°C以下になったものは用いない。採取後 48 時間以内に検査を開始する。

D: 試験方法
　サルモネラ属菌：EN/ISO 06579- 1 (あるいはこれと同等と認められた方法）
・サルモネラ属菌血清型の判定：
White-Kauffmann-Le Minor scheme の方法
・カンピロバクター属菌：EN/ISO 10272-2 （あるいはこれと同等と認められた方法）

E: 判定
<衛生管理指標として>
・サルモネラ属菌：連続 10 回の検体採取で得た 50 検体において、検出されないこと。但し、サルモネラ属菌が検出されたものが 50 検体中 5 検体以下であれば許容。肉用鶏、七面鳥からサルモネラ属菌が検出された場合は、血清型の判定を行う。
・カンピロバクター属菌：連続 10 回の検体採取で得た 50 検体において、1,000 cfu/g 以下であること。ただし、1,000 cfu/g を超えて検出されたものが 50 検体中 15 検体（*）以下であれば許容。
(*: 2025 年 1 月 1 日以降は 10 検体に変更)

F: その他
　食肉の温度管理: 中抜きと体及び内臓が 4°Cを超えないように管理する。

<管理基準>
・サルモネラ属菌（血清型 Typhimurium 及び Enteritidis)：25g を 1 検体とした定性検査により、5 検体から当該菌が不検出であること。

< 英国 >
　EU 規則に準拠し、一部は国内法で細部を規定。欧州連合 EU にない部分のみ以下に記載。
B: 検体採取頻度
食鳥処理場は、年間の処理動物数に応じて、①-③の 3 つに分類（*1）され、各区分で検体採取頻度及び検査対象菌株が異なる。
①　一般食鳥処理場
1） 初期の検体採取頻度：
・サルモネラ属菌：動物種毎に 1 週毎 1 回 5 検体
・カンピロバクター属菌　：1 週毎 1 回 5 検体（肉用鶏のみ）
2） 結果が優良で採取頻度を下げる場合：
・サルモネラ属菌: 5 検体/週, 30 週間連続（150 検

体/種)して優良結果の場合: 動物種毎に 2 週毎 1 回 5 検体
・カンピロバクター属菌:5 検体/週, 52 週間連続 (260 検体) して優良結果の場合: 2 週毎 1 回 5 検体
② 小規模食鳥処理場 A
1) 初期の検体採取頻度：
・サルモネラ属菌：動物種毎に 4 週毎 1 回 5 検体
カンピロバクター属菌： 1 週毎 1 回 5 検体（肉用鶏のみ)
2) 結果が優良で採取頻度を下げる場合：
・サルモネラ属菌：頻度の削減無し
・カンピロバクター属菌: 5 検体/週, 52 週間連続 (260 検体) して優良結果の場合: 2 週毎 1 回 5 検体
② 小規模食鳥処理場 B
1) 初期の検体採取頻度：
サルモネラ属菌：必要無し
カンピロバクター属菌： 1 週毎 1 回 5 検体（肉用鶏のみ)
2) 結果が優良で採取頻度を下げる場合：
カンピロバクター属菌: 5 検体/週, 52 週間連続 (260 検体) して優良結果の場合: 2 週毎 1 回 5 検体

(*1) 食鳥処理場の分類
食鳥処理場は、年間の処理羽数によって、以下の 5 つに分類する。
① 食鳥処理場
年間処理羽数：7,500,000 羽超の肉用鶏, 七面鳥（1 週間に 150,000 羽超の肉用鶏, 七面鳥）
② 小規模食鳥処理場 A
年間処理羽数：1,000,000 羽超 7,500,000 羽未満の肉用鶏, 七面鳥（1 週間に 20,000 羽超 150,000 羽未満の肉用鶏, 七面鳥）
③ 小規模食鳥処理場 B
年間処理数：1,000,000 羽未満の肉用鶏, 七面鳥（1 週間に 20,000 羽未満の肉用鶏, 七面鳥）

<米国>
ダチョウなど平胸類（走鳥類）の食鳥処理施設を除くすべての食鳥処理施設を、事業規模に応じて以下の①-④の 4 つに区分し、検査の項目等が異なる。
1) 事業所の区分
① 処理数が非常に少ない施設（VLV）
年間のと殺羽数が、鶏 44 万羽、七面鳥 6 万羽、アヒル 6 万羽、ガチョウ 6 万羽、
ホロホロ鳥 6 万羽、またはひな鳥 6 万羽以下
② 超小規模施設（Very Small）
従業員 10 名未満、あるいは年間売上高が 250 万ドル未満
③ 小規模施設（Small）
従業員数が 10 名～499 名。ただし年間売上高が 250 万ドル未満である場合を除く。
④ 大規模施設（Large）
従業員数 500 人以上

A: 微生物試験の対象項目と目的
対象：サルモネラ属菌, カンピロバクター属菌
目的：腸内病原体および糞便物質による汚染防止工程の管理を維持しているかを評価
＊従来の検査で操業している超小規模施設（Very Small）及び処理数が非常に少ない事業者（VLV）では、従来の検査項目である一般大腸菌（大腸菌バイオタイプ I）の検査を選択することが可能。一般大腸菌は糞便汚染に特化したモニタリングであるため、腸内病原体を監視するための追加検査を実施することも選択できる。

B: 検体採取頻度
① 処理数が非常に少ない施設（VLV）
毎年 6 月 1 日から少なくとも操業各週に 1 回。連続 13 回検体採取後、効果的な工程管理を実証した場合、検体採取計画を変更することができる。
② 超小規模施設, ③ 小規模施設, ④大規模施設
- 鶏：とたい 2.2 万羽につき 1 回。ただし最低でも操業各週に 1 回。
- 七面鳥、アヒル、ガチョウ、ホロホロ鳥、ひな鳥：とたい 3 千羽につき 1 回。ただし、最低でも操業各週に 1 回。

C1: 検体採取場所
① 処理数が非常に少ない施設（VLV): 冷蔵後
② 超小規模施設（Very Small) : 冷蔵後
③ 小規模施設（Small): 冷蔵前及び冷蔵後の 2 回
③ 大規模施設（Large): 冷蔵前及び冷蔵後の 2 回
※冷蔵前、冷蔵後について
・冷蔵前: 吊り換えから食鳥とたいが冷蔵室に入る直前までの間の時点を指す。冷蔵前検体は、生体が保有していた微生物及び処理工程でとたいを汚染した腸内病原体や糞便の汚染を反映していると判断される。
・冷蔵後: 全ての処理工程が完了し、とたいが冷却装置から出た時点を指す。水浸漬冷却の場合は、検体を採取する前に適切な滴下時間（60 秒以上)を確保する。冷蔵前と冷蔵後の間に殺菌剤の介入がある場合、冷蔵後の検体は、介入による制御効果の判断に有用とされる。（多くの施設が 1 種以上の殺菌剤を用いた介入を実施している）

C2: 検体採取方法
非破壊的手法
・鶏肉：枝肉全体を滅菌済袋に入れ 400 mL の溶液を加えてリンス
・七面鳥：枝肉の背中と大腿部の 2 箇所で 40 cm^2 (50 cm^2)の区画を拭き取る

D: 試験方法
・大腸菌：AOAC 17.2.01 三管最確数（MPN）法
・サルモネラ属菌：MLG4.11、MLG4 Appendix 2.06
・カンピロバクター属菌: MLG 41.05
採取後できるだけ早く分析する必要があり、遅くとも採取日の翌日には分析する必要がある。検体を輸送する場合は、冷蔵保存する。

E: 評価
以下に示した性能基準（*)に基づき、施設を 3 つに区分（区分 1-区分 3）し、区分に応じた指導を実施
・サルモネラ菌
- ブロイラーとたい

性能基準	5 羽/51 羽
最大許容陽性率	9.8 %

- 七面鳥とたい

性能基準	4 羽/56 羽
最大許容陽性率	7.1 %

・カンピロバクター属菌
- ブロイラーとたい

性能基準	8 羽/51 羽
最大許容陽性率	5.7 %

- 七面鳥とたい

性能基準	3 羽/56 羽
最大許容陽性率	5.4 %

＊性能基準: 52 週間の期間で収集・分析された目標検体数に対する最大許容陽性数の割合。施設を評価し分類するために、1 回の 52 週間の期間で少なくとも以下の数の検体を分析する必要がある。

ブロイラーとたい	11 羽
七面鳥とたい	14 羽

1) 区分 1：直近の 52 週間の検査期間において、最大許容陽性率の 50%以下を達成した事業所。
2) 区分 2：最大許容陽性率を満たしているが、直近の 52 週間の検査期間において最大許容陽性率の 50%以上の結果を示した事業所。
3) 区分 3：直近の 52 週間の検査期間の結果が最大許容陽性率を超えている事業所。

区分に応じた指導例（抜粋）
1) 事業所が区分 2 に指定された場合。
：病原体の制御が不安定であることを示しており、その事業所は性能基準に不合格となる可能性があることを説明。製品が性能基準の 50%を超過した警告を送るなどの措置を実施。
2) 事業所が区分 3 に指定された場合
：性能基準の不履行であったことを伝える警告を送る。事業所が是正措置を講じていることを確認し、（必要であれば）HACCP システムの再評価を行うことを説明するなどの措置を取る

< 平胸類を食肉処理する施設の微生物検査 >

一般大腸菌（大腸菌バイオタイプ I）を試験対象とする。平胸類および家畜をと殺する施設は、と殺する平胸類または家畜の種類が最も多いものを検査する。

平胸類の年間と殺羽数が 6 千羽以下の施設は、処理数が非常に少ない施設（VLV)とし、検体採取は、毎年 6 月 1 日から翌年 6 月まで、または 13 回検体採取を行うまでのいずれか早い方まで、事業所の営業週に最低 1 回を継続。

< カナダ >

A: 微生物試験の対象

・サルモネラ属菌

・カンピロバクター属菌

・一般大腸菌バイオタイプ 1

< オーストラリア >

A: 検査対象項目

・サルモネラ属菌

・カンピロバクター属菌

C2: 検体採取方法

・リンス法

(6) HACCP 検証の評価方法に関する研究

1） 国際動向の調査

欧州での食鳥処理におけるカンピロバクターを対象としたサンプリングプランは以下の基準で運用されている。

n = 50、 c = 15、 m = 1000 CFU/g

ここで、n はサンプル数、c は基準を超えてしまうサンプル数の上限、m は基準菌数である。ただし、想定している n は「連続した」もの、すなわち、週に 1 回ずつで 50 週を想定して、その中での変動を「moving window」と呼ばれる、一定期間毎での変動をずらしつつ検証していく方法を採用している。これによって、衛生管理の実施体制が妥当であるかを、検査実施時点だけでなく、長期的、日常的な視点から検証することを目指してる。現行の基準では c = 15 となっているが、2025 年 1 月からはさらに基準を高めて、c = 10 へと移行することが決定している（EU、2017)。

米国でも欧州と同様の管理検証体制がとられており、moving window 方式での 52 週間の連続したサンプル分析の実施が行われている。ただし、サンプリンプランの基準設定は施設の規模毎に異なり、一律の基準は設定されていない。しかし、moving window 方式でのデータ推移を検証して、中長期的な視点での評価を行うことを目指している点は欧州と同様である（USDA-FSIS、2018)。

オーストラリア、ニュージーランドでの食品安全規格を所管する Food Standards Australia New Zealand (FSANZ)ではより細かな評価手法が検討されている。方向性としては欧州、米国と同様であるが、サンプリングプランがより細かく規定されいてる。すなわち、n = 45、 c = 6、 m = 3.78 CFU/carcass が規定されている。基準だけをみても、c = 6 であるとともに、m が g あたりではなく、1 と体あたりの菌数であることからも、欧州基準よりも厳格である。また、moving window 方式もより細かく規定されていて、期間の最初の 15 サンプル分の変動を初期 window として、その後 5 サンプルずつずらした各 window での許容サンプル数を検証していく方法を用いている（Lee et al.、2016)。

諸外国の動向を考慮すれば、年間を通じての検査データの傾向を分析する moving window 方式で、サンプリングを設定した上で検証していくことが妥当であることを確認した。その場合に考慮しなければならない点としては、サンプリングプランにおける基準設定が非常に重要である。しかし、現時点では日本国内での HACCP に基づく衛生管理体制でのターゲットとする危害要因（病原体）の年間を通じてのベースラインデータが十分に存在しないことから、基準設定には、今後蓄積されていく検査データの結果を考慮して策定となる。さらに、日本国内での実態を考慮しつつ、国際的な基準との整合性も加味した基準設定が求められる。

2） Moving window 方式での評価の検討

と畜場・食鳥処理場における牛、豚、鶏肉の一般生菌数、腸内細菌科数あるいはカンピロバクター数の検査結果は、HACCP に基づく衛生管理が適切に実行されているかを評価するための基礎データとなる。検査体制の実態を考慮すると、現状では月に一回程度の検査が現実的であることから、この検査間隔を基準にして、moving window 方式での評価を実施するためのエクセルのスプレッドシートを構築した。moving window 方式を採用する場合には、window 幅（間隔）の設定が問題になるが、現状の日本の検査体制を考慮すれば、月に一回の検査で 6 ヶ月ごと、あるいは 12 ヶ月を一つの評価 window として検討するのが妥当かと考えられる。

検査結果データを入力していくと、グラフが生成されて、上限値を 2 回連続で超えるような事態が発生した場合には、処理工程の異常を疑い、作業工程の点検を実施する、といった意思決定の支援ツールとして活用することができる。

3）国内施設での現状の検査状況の把握

① 牛とたいにおける外部検証の結果

厚生労働省に報告があった 121 施設の検査データの解析を行った。121 施設で 3306 検体が採材され、微生物試験に供された。採材部位の内訳はともばらが 22 施設 563 検体、胸部が 78 施設 2179 検体、頸部が 20 施設 534 検体であった。一般生菌数の全体の平均値は 2.34± 0.97 log CFU/cm^2 であり、全体で+3SD 超過は 8 検体（0.2%）、+2SD 超過は 96 検体（2.9%）で認められた。腸内細菌科群数の全体平均は 0.79±0.43 log CFU/cm^2 であり、全体で+3SD 超過は 104 検体（3.2%）、+2SD 超過は 220 検体 （6.7%）で認められた。

採材部位の内訳は、「ともばら」が 22 施設 563 検体、「胸部」が 78 施設 2179 検体、「頸部」が 20 施設 534 検体であった。一般細菌数の分布は、「胸部」が「ともばら」および「頸部」に比べ統計的には有意に高値を示した。腸内細菌科菌群数の分布は、「胸部」及び「頸部」が「ともばら」に比べ統計的には有意に高値を示した（$p < 0.05$）。

季節変動を検討したが、一般生菌数および腸内細菌科群数ともに変動は認められず、ほぼ一定の値を示した。

牛とたいに関して、仮に平均値+2SD（一般生菌数が 4.28 log CFU/cm^2、腸内細菌科菌群数が 1.65 log CFU/cm^2）を達成目標とした場合、一般生菌数では 97.3%（3218/3306）、腸内細菌科菌群数では 93.3%（3071/3291）が適合する状況にあった。また、平均値+2SD を全検体で満たした施設数は 52（43.0%）であった。このほか、同値を超過した検体数が供試検体数の 20％以内であった施設数は 56（46.3%）、平均値+3SD （一般生菌数が 5.25 log CFU/cm^2、腸内細菌科菌群数が 2.08 log CFU/cm^2）を超過した検体を含み、かつ平均値+2SD 以上の検体が供試検体数の 20%以上であった施設数は 13（10.7%）であった。

② 豚とたいにおける外部検証の結果

厚生労働省に報告があった 128 施設の検査データの解析を行った。128 施設で 3448 検体が採材され、微生物試験に供された。採材部位の内訳は、胸部が 77 施設 2040 検体、頸部が 48 施設 1343 検体、肩部が 1 施設 5 検体であった。一般生菌数の全体平均値は 2.74±0.80 log CFU/cm^2 であり、+3SD 超過は 3 検体（0.09%）、+2SD 超過は 62 検体（1.8%）で認められた。腸内細菌科群数の全体平均値は 0.96±0.53 log CFU/cm^2 であり、+3SD 超過は 55 検体（1.6%）、+2SD 超過は 181 検体（5.3%）で認められた。

採材部位の内訳は、胸部が 77 施設 2040 検体、頸部が 48 施設 1343 検体と、施設数では全体の 97.7%、検体数では一般生菌数成績として 98.1%（3383/3448）と多くを占めたことから、両部位間での試験成績を比較した。一般生菌数分布は、「胸部」が「頸部」に比べて統計的には有意に高い傾向を示した（$p < 0.05$）が、その差は微生物試験結果としては無視できる範囲であった。。腸内細菌科菌群数分布についても「頸部」が「胸部」に比べて統計的には有意に高い傾向を示した（$p < 0.05$）が、こちらも実際上は無視できる範囲であった。

年間の季節変動を検討したが、一般生菌数および腸内細菌科群数ともに変動は認められず、ほぼ一定の値を示した。

豚とたいに関して、仮に平均値+2SD（一般生菌数が 4.34 log CFU/cm^2、腸内細菌科菌群数が 2.02 log CFU/cm^2）を達成目標とした場合、一般生菌数では 98.2%（3386/3448）、腸内細菌科菌群数では 94.7%（3252/3433）が適合する状況にあった。平均値+2SD を全検体で満たした施設数は 58（45.3%）であった。このほか、同値を超過した検体数が供試検体数の 20%以内であった施設数は 64（50.0%）、平均値+3SD（一般生菌数が 5.14 log CFU/cm^2、腸内細菌科菌群数が 2.55 log CFU/cm^2）を超過した検体を含み、かつ平均値+2SD 以上の検体が供試検体数の 20%以上であった施設数は 6（4.5%）であった。

④　食鳥とたいにおける衛生指標菌試験の結果

厚生労働省に報告があった 131 施設の検査データの解析を行った。31 施設で 2492 検体が採材され、微生物試験に供された。採材部位の内訳は、首皮が 71 施設 1443 検体、胸皮が 62 施設 1034 検体であった。全体の一般生菌数の平均値は 3.98±0.98 log CFU/g であり、+3SD 超過は 31 検体（1.2%）、+2SD 超過は 93 検体（3.7%）で認められた。腸内細菌科群数の全体平均値は 2.56±1.03 log CFU/g であり、+3SD 超過は 22 検体 (0.9%)、+2SD 超過は 75 検体　(3.0%）で認められた。採材部位の内訳は、①首皮が 71 施設 1443 検体、②胸皮が 62 施設 1034 検体であり、③1 施設由来の検体を除き、両部位のいずれかに属した。③を除く検体の微生物試験成績を部位間で比較したところ、以下の知見が得られた。

一般生菌数及び腸内細菌科菌群数の分布は、「首皮」が「胸皮」に比べて有意に高い傾向を示した（$p < 0.05$）。季節変動を検討したが、一般生菌数および腸内細菌科群数ともに変動は認められず、ほぼ一定の値を示した。

⑤　食鳥とたいのカンピロバクター定量試験成績結果

厚生労働省に報告があった 18 自治体 53 施設の検査データの解析を行った。53 施設で 895 検体が採材され、カンピロバクター定量試験に供された。カンピロバクター定量試験対象施設の処理方式/鶏種の内訳は中抜き/ブロイラーが 47 施設、中抜き/成鶏が 2 施設、外剥ぎ/ブロイラーが 2 施設、外剥ぎ/成鶏が 1 施設、中抜き/あひるが 1 施設であった。

カンピロバクターは 33.1%（296/895 検体）より検出され、全体の平均菌数+SD は 0.94±0.74 log CFU/g、最大菌数は 3.75 log CFU/g であった。22 検体は欧州で達成目標値とされる 3.0 log CFU/g を超過しており、うち 15 検体は特定の処理場由来であった。2 施設では欧州の達成目標値を超過した検体の割合が 10%を超過していた。年間を通じてのカンピロバクター数の変動は認められなかった。

D. 考察

(1) と畜場における HACCP 外部検証に関する研究

①と畜場における HACCP 外部検証・内部検証に関する研究

1)食肉衛生検査所で実施されためん羊、山羊、馬の糞便、枝肉拭き取り検査集計

①めん羊、山羊、馬からの各種病原体検出状況

平成 30 年度食肉検査等情報還元調査のと畜場内でのと畜頭数によると、めん羊は 5,233 頭、山羊は 3,677 頭、馬は 9,763 頭で、豚（16,411,331 頭）、牛（1,056,661 頭）と比較し、きわめて少ない。また、細菌検査成績を保有している検査所も限られていると思われた。

めん羊の糞便からはサルモネラ（33.3%）、STEC(31.7%)を高率に保菌していることが判明した。サルモネラも亜種群 I は 1 検体、亜種群 IIIb が 20 検体、STEC も O157 のように牛や患者から分離されるものとは異なる血清型が多かった。この成績は A 検査所のみのものであり、日本で飼育されているめん羊の保菌状況であるか、A 検査所が検査していると畜場に搬入されるめん羊に固有なものであるか、調査する必要があると思われた。山羊につ

いては、I 検査所によって 100 検体の直腸と盲腸スワブでのサルモネラ検査をしたが、陰性であった、STEC やカンピロバクターの成績は得られなかった。馬糞便の成績は得られなかった。STEC については、海外において保菌している報告はあるが、国内における検出事例は認められなかった。その他、国内のサルモネラやカンピロバクターの検査結果も見つけることができなかった。

②めん羊、山羊、馬枝肉拭き取り検体の一般細菌数・大腸菌群数・大腸菌数

今回の成績は全てスワブ法であり、切除法の成績は無いと思われる。EU 規定では、めん羊、山羊、馬の洗浄後冷却前の枝肉の切除法であるが、一般生菌数の優良レベルは 3.5 log 個/㎠未満、許容レベルは 3.5～5.0 log 個/㎠、不適合レベルは 5.0 log 個/㎠を超える値である。今回はスワブ法であり、単純に比較はできないが、今回のめん羊、山羊、馬のスワブ法の成績は EU の規定の許容レベル範囲内であった。それらの腸内細菌科菌群の優良レベルは 1.5 log 個/㎠未満、許容レベルは 1.5～2.5 log 個/㎠、不適合レベルは 2.5 log 個/㎠（316 個/㎠）を超える値である。スワブ法と切除法、大腸菌群と腸内細菌科菌群の違いはあるが、今回のめん羊と山羊のスワブ法の成績は EU の規定の許容レベルにあったが、馬は洗浄前の枝肉であるが不適合レベルに該当する値を示すものが認められた。統一的な検査法や検体採取を実施する場所を設定する必要があるかもしれない。

大腸菌数はめん羊枝肉において 33/262 検体(12.6%)から、馬枝肉は 4/24 検体(58.3%)から分離されることから、さらに検査データを蓄積する必要があると思われた。

③めん羊枝肉表面の切除法による細菌汚染状況調査

1 つのめん羊枝肉の細菌検査結果であったが、と畜検査終了し、冷蔵庫に入る前のめん羊枝肉の表面の細菌汚染状況について調査したところ、汚染が多い部位と少ない部位が存在した。検体 27（右肘部内側）は調査した 30 カ所のなかで一般生菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌数ともに最高値を示した、また、大腸菌が検出された 9 カ所は臀部[検体 2(臀部前)、検体 15(後大腿部右側)]と胸部から頸部[検体 5(脇部前)、検体 14(胸部右側)、検体 22(後胸部右側)、検体 23(後肩部右側)、検体 26(前頸部右側)、検体 25(頸部右側)、検体 27(右肘部内側)]であった。

本と畜場のめん羊の処理においては、大腸菌が検出された部位については、ゼロトレランス検証（目視できる糞便、消化管内容物、乳房内容物に汚染されていないことを検証すること）をより慎重に実施するとともに、枝肉の消毒工程を加える必要であると思われた.

今回は枝肉からは STEC,カンピロバクター、サルモネラは未検出であったが、これらの細菌の本来の住処（レゼルボア）は腸管内であることから、搬入されるめん羊の糞便を検査し、保菌率などを把握しておくことは重要であると思われた。

めん羊枝肉の流通は限定されていることが多く、トレーサビリティは容易にできていると思われる。また、処理頭数も豚や牛に比べて少ない。これらのことから、各自のと畜場で処理される枝肉の汚染状況を把握し、必要に応じて枝肉の消毒を実施することを作業工程に加える等、と畜場に助言することが必要と思われた。

3)スワブ法に代わると畜場内牛枝肉および豚枝肉の内部検証法の検討

A と畜場牛枝肉：切除法とふき取り法との一般細菌数の平均値の差は約 2 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.3919 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、ふき取りでも良いかもしれない。切除法とスタンプ法との一般細菌数の平均値の差は約 20 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.297 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、スタンプでも良いかもしれない。

B と畜場牛枝肉：切除法とふき取り法との一般細菌数の平均値の差は約 4 倍あり、切除法が高値であっ

た。回帰直線の決定係数は 0.1202 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、ふき取りでも良いかもしれない。切除法とスタンプ法との一般細菌数の平均値の差は約 200 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.3743 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、スタンプでも良いかもしれない。切除法とふき取り法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 5 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.1285 で、関連性は少ないと思われた。切除法とスタンプ法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 20 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.0115 で、関連性は少なかった。

A と畜場豚枝肉：切除法とふき取り法との一般細菌数の平均値の差は約 7 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.0584 で、関連性は少ない。切除法とスタンプ法との一般細菌数の平均値の差は約 110 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.1159 で、関連性は少なかった。切除法とふき取り法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 6 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.0004 で、関連性は少なかった。切除法とスタンプ法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 24 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.0098 で関連性は少なかった。

B と畜場豚枝肉：切除法とふき取り法との一般細菌数の平均値の差は約 1.3 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.283 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、ふき取りでも良いかもしれない。切除法とスタンプ法との一般細菌数の平均値の差は約 565 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.3079 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、ふき取りでも良いかもしれない。切除法とふき取り法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 7 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.1984 で、関連性は少なかった。切除法とスタンプ法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 40 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.0563 で、関連性は少ないと思われた。

切除法とふき取り法、切除法とスタンプ法の一般細菌数、腸内細菌科菌群数で平均値の差が、と畜場ごとに異なっていた。これはと畜方法や検体採取場所の枝肉の状況（水分量）等によって変わるものと思われた。

EU 規定で最良レベルを示している、衛生的な牛枝肉を生産していると畜場では、スタンプの一般細菌数を用いること、スタンプやふき取りでの腸内細菌科菌群陰性を確認することで、牛枝肉の細菌検査の内部検証が可能かもしれない。

B と畜場は湯剥ぎ方式の処理であり、EU 規定では最良レベルの衛生的な豚枝肉を生産している。ふき取り法およびスタンプの一般細菌数を用いることで豚枝肉の細菌検査の内部検証が可能かもしれない。

4)生産農家ごとの和牛の体表の STEC O157・O26 の汚染状況

GI-1 施設の黒毛和種牛体表の拭取り検体の O157 の陽性率は 8.1%(15/185 検体)、O26 の陽性率は 2.7%(5/185 検体)であった。別途、本調査期間と同じ時期に実施した盲腸内容物から分離した STEC 検査では、STEC の分離率は 16.7%(15/90 検体)、STEC O157 の分離率は 15.6%(14/90 検体)、STEC O26 の分離率は 1.1%(1/90 検体)であった。黒毛和種牛の体表の STEC O157 の拭取り検査結果(8.1%)と別途実施した盲腸内容物の検査結果(15.6%)の有意差は認められなかった。体表の STEC O26 の拭取り検査結果(2.7%)と盲腸内容物の検査結果(1.1%)の有意差は認められなかった。糞便中に保菌していると体表にも同様に付着していることが判明した。

農家ごとの保有率の違いは、6 ヶ月連続で陰性の農家 B、4 回のうち 2 回陽性の農家 A、2 回中 2 回

連続陽性になった農家 BO といった農家もあることから、保有状況は農家ごとに異なっていることが判明した。また、陽性となった農家も採取した月によっては陰性となること、農家 B と農家 G は以前の調査で STEC が検出された農家であるが、今年度は全て陰性であったことから、と畜日により搬入される牛の STEC 保有状況も異なっていると考えられた。一方、7 月の農家 W と農家 AY、9 月の農家 A、農家 X、農家 BJ は同じ運搬車で搬入されることが多い農家であり、係留所でも隣に繋がれていたことから、運搬車又は係留所での交差汚染の可能性を疑った。しかし、5 月に農家 A は陽性であり、同じ運搬車での搬入が多い農家 X、農家 Z は陰性であったこと、10 月に陽性であった農家 BO と同じ運搬車で搬入されている農家 C は陰性であったことから、運搬車内での交差汚染は頻度としては高くないと推測される。また、係留所での交差汚染が原因であるならば、陽性農家数はさらに多くなりうるため、この可能性も低いと考えられた。

現時点での STEC 検査のロット設定は「同一農家かつ同一と畜解体作業日の枝肉群を 1 ロットとする」ことが妥当であると考える。しかし、農家により採取回数の違いがあることから、今後もデータを蓄積していく必要がある。

培養法で陽性となったものは、スクリーニング検査でも陽性となったものであり、導入した PCR 装置でスクリーニング検査陽性のものを菌分離したときと培養法で実施した場合とで、検出率の違いは無かった。コストと時間の面からも VT 遺伝子の PCR 検査を行わず、最初から O 抗原遺伝子検査をし、陽性であった検体のみ分離培養に進むのが効率的であると思われた。

5)黒毛和種牛の体表の汚染状況の把握

衛生的な枝肉を生産するための一助として、黒毛和種牛の体表の汚染状況検査を実施した。

黒毛和種牛は高率に *C. jejuni* を、20%(1/5 頭)は STEC を保菌していた。よって、糞便が枝肉表面に付着することは、これらの病原菌に汚染される可能性があるので、ゼロトレランス(目に見える糞便、腸内容物をトリミングすること)が有効であることが再確認された。

今回、黒毛和種牛体表を、フードスタンプ生菌数用・標準寒天を 600-700 g 圧で 10 秒間押し当てる採取法（フードスタンプ法）を実施した。5 頭の体表検体、計 75 検体からカンピロバクター、STEC、サルモネラを体表から分離できなかった。 体表を採取する方法としては簡易な方法であったが、検出限界値に問題があるかもしれない。

フードスタンプ法を用いた体表の検査においても、一般細菌は 4.18 log 個/㎠、腸内細菌科菌群は 1.62 log 個/㎠、大腸菌群は 0.90 log 個/㎠、大腸菌数は 0.79 log 個/㎠が検出された。また、今回の調査では、一般細菌数では⑥胸部正中、⑦腹部正中、⑧踝外側左が多かった。大腸菌群数および大腸菌数も⑥胸部正中が最も高値を示した。正中はと畜処理では必ず刀を入れる部位である。よって、と畜処理においては、体表は高度に汚染しているものと理解し、特に正中に刀を入れるときには、消毒したナイフの刃を手前に向け、皮を内側から外側に切開することが、食品衛生学的に有効であると思われた。

6)枝肉に付着する異物による微生物汚染実態と菌叢解析

本調査において、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は、獣毛、糞便及び消化管内容物それぞれの間で差がなく、同等の汚染があることが細菌学的に示された。レールダスト及びフットカッター汚れは、両者とも腸内細菌科菌群数は検出限界値以下であり、一般細菌数は差がなかった。これらは最終洗浄後の枝肉の微生物汚染状況にただちに影響をあたえるものではないが異物であり付着させないことが重要であると思われた。獣毛検体は *Proteobacteria* 門，消化管内容物は *Firmicutes* 門の構成比率が多く，糞便は両者の中間のような菌叢であった．消化管内容物は *Firmicutes* 門の構成比率が高いことは，第一胃内容を調査した報告と一致しており，異物同定のうち糞便による汚染か消化管内容物による汚染かの判断は正しいものと思われた．レールダスト及びフットカッター汚れ検体は *Proteobacteria* 門

が多い傾向があった. 付着する異物の種類ごとに菌叢も異なることが判明した.

と畜におけるゼロトレランスは多くの国で取り入れられている手法である．GI-1 施設では，各工程において，枝肉をよく観察し，糞便，消化管内容物及び乳房内容物に加え, 獣毛等の異物の付着が認められた場合もトリミングをすることとしている. 本調査により, 枝肉に付着した異物ごとの細菌学的な汚染状況が把握できた．そして，ゼロトレランスが食肉衛生上, 大変重要であることが科学的に証明できたと思われる.

② 馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究

本研究ではと畜場で解体処理を受ける馬を対象とした際の HACCP 外部検証微生物試験の円滑な実施に向け、牛豚を対象とする既出試験法の適用可能性を、特に採材部位選定に係る知見の創出を図ることを主たる目的として検討を進めた。

計 3 施設の処理工程を踏まえた上で行った微生物試験成績を基に、「平均+2SD 値」を超過した検体の採材部位を確認した結果、S1（胸部）または S2（腹部）が該当したことから、これらの部位を採材箇所として設定することが、馬とたいの工程管理の適切性を判断するための微生物試験成績の集積を図る上で有用と考えられた。

また、本研究では、腸内細菌科菌群が施設 B 由来検体ではいずれも不検出であったことから、菌叢解析を進め、結果として腸内細菌科菌群の占める割合が牛等に比べて極めて少ない状況にあることが確認された。

次いで行った馬糞便検体における菌叢解析結果からも、腸内細菌科菌群の占有率は低い状況にあった。このことは、腸内細菌科菌群に属するサルモネラ属菌や病原大腸菌を馬の解体処理工程における危害要因として想定する意義が低いようにも思われるが、欧米では馬肉を介したサルモネラ食中毒事例が報告されていること（Epidemiol. Infect. 2005. 133:373-376.等）を踏まえると、そのおそれを否定できる状況にはなく、馬とたいの HACCP 外部検証を行う上では牛豚と同様に、腸内細菌科菌群試験を含めることが妥当と考えられた。

また、菌叢解析結果からは土壌由来細菌が馬枝肉における構成菌叢となっている状況が確認された。このことは、腸管内容物の管理に加え、体表から枝肉への交叉汚染を管理するための対策を講じることで衛生管理上の更なる向上に繋がる可能性を示唆していると考えられる。今後、馬体表における菌叢解析や指標菌定量試験を行うことで、外皮の衛生的取り扱いが馬とたいの解体処理工程における衛生管理の向上に資する可能性を指し示すことが可能となるものと期待される。

④ と畜場でのリステリア属菌の汚染実態と管理すべき工程に関する研究

海外での先行研究では、と畜場でのリステリア属菌の主要な汚染源として牛外皮が指摘されている。今回の成績から、解体処理工程の環境試料からリステリア属菌は検出されず、枝肉洗浄までの工程で、体表に由来する生物的危害の多くを適切に管理できていると解された。 9 ～11 月に行った定量試験成績からも、処理工程が前肢落しから友バラ皮剥ぎ、そして背割りへと進むに従い、推定リステリア属菌数の減少が確認できた。当該と畜場では従前より作業後に施設設備環境を熱温水を用いて洗浄するよう、管轄する食肉衛生検査所のと畜検査員による指導がなされており、このことが解体処理工程の環境試料からリステリア属菌が検出されなかった背景と想定される。こうした熱温水を用いた作業後洗浄は、他のと畜場においても、食肉衛生検査所への電話インタビューを通じ、同様の対応がとられている場合が複数確認されたことから、国内のと畜場において実施されている牛解体処理施設環境で LM の常在化が生じる可能性は総じて低い状況にあると思われる。一方、水が常にたまった状態であるシンクや排水溝では推定リステリア属菌数が増加を示した場合も見受けられたほか、枝肉冷蔵室床は、枝肉搬出時に作業者が頻繁に往来する場所であり、長

靴等を介した交叉汚染のおそれも排除できないため、今後、これらの内容に係る一般衛生管理状況を改めて再点検する必要性が考えられた。

菌叢解析を通じ、背割り機ではバシラス科が優位となっており、剥皮後の枝肉汚染につながっている可能性も示唆された。当該菌は広く自然環境中に存在していることから、背割り機への汚染経路の確認や洗浄方法も含め、管理の在り方を今後検討すべき事項と考えられた。

牛枝肉におけるリステリア汚染要因としては、腸管破損による内容物の汚染、機材や人の手を介した２次汚染、洗浄水の跳ね上げによる汚染の可能性がこれまでに示唆されている。当該と畜場でも枝肉洗浄下の排水溝からは腸内細菌科菌群由来遺伝子が相対的に多く検出されており、枝肉の更なる衛生確保に向けた課題を見出すことができた。なお、当該と畜場を管轄する食肉衛生検査所では、枝肉の更なる細菌汚染低減に向けて、これまでも外部検証等を通じて、衛生管理指導に取り組んでいるが、と畜処理工程には加熱殺菌工程がないため、細菌汚染のゼロトレランスを成立させることは現実的ではない。今回、ヒト・リステリア症の原因となる LM は全検体より検出されなかったが、本調査結果をもとに、HACCP システムの更なる効果的・効率的な運用に向けて、衛生指導や助言を進めていくことが食肉の更なる安全性確保に向けての重要な課題と思われる。

(2) 食鳥処理場における HACCP 外部検証に関する研究

・令和２年度

1)成鶏とたいにおける衛生指標菌検出状況

中抜き方式であっても、成鶏（採卵鶏）由来とたいは対象施設では大きな逸脱を見ることなく処理されており、検出菌数についても、一般的な大規模食鳥処理場で処理される肉用若鳥に比べ同等もしくはそれ以下であることが確認された。

2)食鳥とたい検体を対象とした微生物試験法の同等性について

国際的な第三者認証機関による妥当性確認を受けた迅速簡易試験法の食鳥とたい検体への適用は可能と思われた。また、対象施設における定量検出成績より、多くの成鶏とたいにおけるカンピロバクター汚染菌数は相対的に低い状況にある可能性が示唆された。

・令和３年度

食鳥検査員が実施する外部検証微生物試験における採材時点を処理半ばとする妥当性を評価することを目的として、一般的な処理工程を有する大規模食鳥処理場における冷却後食鳥とたいを試料とした微生物試験を行い、それらの時系列挙動を解析した。本研究結果から、処理開始直後の食鳥とたいを採材することが望ましくなく、半ば以降での試料確保が望ましいことが確認された。また、採材時点を検討するにあたり、当該施設では中抜き工程での腸切れ頻度を目視確認することで、腸切れの発生頻度に関する情報収集につとめた。冷却工程前における腸切れ発生は糞便等の交叉汚染に直接的な影響を及ぼす要因と考えられることから、HACCP に基づく衛生管理を更に向上させていく上では、処理工程を通じた実態把握とその情報に基づいた形での工程管理の改善措置の設定が有効な手立てとなるものと期待される。特にＣＣＰ工程とする場合の多い冷却工程については、換水頻度や殺菌剤の有効持続時間をはじめとする不明な点が多いため、令和４年度の検討課題として設定するに至った。

・令和４年度

食鳥処理場における冷却水の性状に係る時系列動態として、水温や pH、更には残留塩素濃度は測定期間を通じて著変なく推移した。残留塩素濃度が比較的安定的に維持された背景として、対象施設では塩素注入が断続的に行われていたためと想定される。一方、遊離塩素濃度は処理１時間後から明確な減少を示した。遊離塩素は殺菌効果の主体であるが、有機物との接触により速やかに分解されることが知られている。それにもかかわらず、一般細菌数が大きく上昇しなかった主な理由としては、上述の断続的な塩素注入と十分な攪拌、並びに冷却槽内に

一定数以上の食鳥とたいを貯留させていなかったこと等があると目される。

他の物性試験項目のうち、濁度及び TDS 値は経時的な上昇を認めた。また、ATP 値も経時的な上昇を認めたが、処理 6 時間後には若干の減少を示した。採水を行った施設での処理経過として、処理 4 時間後では 1 ロット目の食鳥とたいの処理が終わったところであり、その後、処理 6 時間後の時点までの間には処理が行われない時間帯が設けられていた。この間の塩素の断続的な注入が ATP 値の一時的ながらも減少を導いた可能性が推察される。

微生物試験では、一般細菌数を除き、糞便汚染指標菌並びにカンピロバクター・ジェジュニ／コリ及びサルモネラ属菌は検出されなかった。本成績から、微生物試験により冷却水をモニタリングする際には一般細菌数を対象とすることが妥当と考えられた。一方、菌叢解析結果からは、*Escherichia* 属及び *Salmonella* 属由来遺伝子が一過性ながらも検出された。従って、これらの健康被害をもたらす可能性のある細菌をモニタリング対象とする際には、中抜き等の前処理工程の状況やロットの差異等を踏まえつつ、複数の時系列で評価を行う必要があると考えられる。

外部検証の試験対象部位である冷却後食鳥とたいの鶏皮試料で安定性を欠く、或いは高い数値が微生物試験により認められる場合に検討すべき事項の一つとして冷却工程の適切な管理を確認することは既に認知されつつあるが、本研究の成績がその確認手段を見定める一助となることを期待する。

(3) 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

本分担研究では、南九州地方で製造加工、販売・消費される、生食用食鳥肉製品の衛生管理実態と更なる安全確保に向けて、特に実効性の観点から検討を進めてきた。

先行研究では大規模食鳥処理場及び併設される食肉加工施設における生食用食鳥肉の工程管理に関する検討を進め、事業者が定めた管理要件に従って適切に製造加工された生食用食鳥肉及び食鳥中抜きとたいについては、カンピロバクター汚染リスクは極めて低い状況にあることを確認した。一方、南九州地方で生食用食鳥肉を取り扱う事業者の多くは小規模である実態を管轄自治体及び関連業界団体から聴取した上で、小規模事業者における工程管理実態について調査を進めた。これらの活動を通じて得られた情報として、特に加工段階で用いられる焼烙の条件については、「とりさし協会」が定める内容に従うこと、そして温度管理や食鳥とたいの洗浄・冷却を徹底すること等について、実効性並びに一定の統一性を踏まえた内容として提案するに至った。

また、カンピロバクター食中毒の最少発症菌数が 500 個と認知されている状況を踏まえて行った製品あたりの重量から、カンピロバクターについては、1g あたり 5 個未満の汚染状況となるよう担保していくことが、当該食中毒の発生防止に資すると目された。なお、製品の成分規格目標の項目としてはこのほかにサルモネラ属菌及び糞便汚染指標としての大腸菌（β-グルクロニダーゼ産生大腸菌）を用いることが妥当と考えられる。これまでに管轄自治体により作成されたガイドラインの成分規格目標としては、糞便汚染指標菌として糞便系大腸菌群が示されているが、令和 2 年度調査結果では、これに類似する腸内細菌科菌群が多くの事業者由来製品から検出され、代表製品検体から単離された菌株の同定試験を行った結果、製品由来の腸内細菌科菌群は原料由来ばかりではなく、施設環境由来と思われるものも一定の割合で検出されており、ヒトへの病原性がない、或いは不明な菌属種も複数検出される状況にあった。国際動向として、食品等の直接的な糞便汚染指標菌としてはβ-グルクロニダーゼ産生大腸菌が多くの国で採用されている一方、糞便系大腸菌群は他国では殆ど採用されていない現況、更には微生物検査実施にあたっての効率性や細菌分類学上との整合性等を踏まえると、生食用として製造加工、販売される「とりさし製品」の成分規格目標としてはβ-グルクロニダーゼ産生大腸菌を採用し、陰性を担保できているかを検証することが合理性

に富むと思料される。

更にサンプリングプランについて、「とりさし協会」では少なくとも年に 2 回以上検査の実施を推奨しており、これに沿って微生物試験を実施することで検証は実効性あるものとなると思料される。但し、小規模事業者の中には、これを自身で実施することが困難な事業者も相当数あると見込まれることから、食鳥検査員が現在実施している食鳥処理場における外部検証と平行する形で、自治体が収去検査として実施し、陰性を確認することをもって適切と判断することも可能と考えられる。なお、微生物試験にあたっては、採材部位はこれまでの汚染状況に係る知見を踏まえ、皮部位を原則とし、かつカンピロバクターは冷凍により死滅しやすいため、須く冷凍出荷している製品を除き、冷凍していない製品を試験対象とすることが妥当と考えられる。

以上の知見を踏まえ、本分担研究では、生食用食鳥肉の製造加工等における衛生管理ガイドライン案を作成し、厚生労働省担当官に共有した。これらの知見の活用を通じたガイドライン発出等は、生食用食鳥肉は、食鳥処理場から販売・消費に至る過程で生食用の工程管理がなされたもののみが流通販売消費される必要性が我が国全体に浸透し、加熱用鶏肉を飲食店等で生食に転用することで多発するカンピロバクター食中毒の発生低減へと繋がる事が期待される。

(4) と畜場・食鳥処理場の内部検証に関する研究

本研究では外部検証通知で示された外部検証の実効性及び円滑な導入手法について検討することを目的として調査を行い、調査により抽出された内部検証と外部検証の連携不足の問題に対して外部検証の円滑な実施に資する内部検証の手順書案を作成した。加えて、病原微生物汚染実態と衛生指標菌検出状況の比較検証により、外部検証及び内部検証における微生物試験の評価指標についても検討を行った。

事業者が自主検査として実施する微生物検査については、生菌数及び大腸菌数検査が一般的な実施項目であり、輸出向け工場併設等の特段の理由がない限りは病原微生物についての検査は実施されてはいない事が調査により明らかとなった。製品の安全性確保の観点からは病原微生物汚染のモニタリングは非常に有効である。このため、病原微生物汚染状況を推察可能な衛生指標菌数の基準値を示していく事は、より高度な衛生管理の実現に資するものと考える。 衛生指標菌数と病原微生物汚染の相関解析のパイロットスタディとして本研究で行った比較検証実験の結果からは、内部検証（枝肉拭き取り検査）成績が生菌数 2 log10 cfu/cm2 以下かつ大腸菌陰性程度まで低減されていれば病原微生物汚染の可能性は低いと見込まれ、自主検査結果を評価する際にはこれらの値が一定の目安となるものと考えられた。加えて、外部検証（枝肉切除法）成績においては生菌数 3 log10　cfu/cm2 以下かつ腸内細菌科菌群陰性程度まで低減されていれば病原微生物汚染の可能性は低いと見込まれ、これらの値が外部検証で実施する微生物検査を評価する際の目安になるものと考えられた。これらの値は Commission Regulation (EC) No 2073/2005 に示される衛生指標菌に対する基準とも合致しており、国際整合性を考慮する上でも妥当な目安であると考えられる。今後、各施設にて外部検証で実施される微生物試験においても同様の相関解析を行い、それらの結果からより信頼性の高い基準値が提示されることを期待する。

微生物試験の方法に関して、外部検証通知においては国際整合性の確保の目的で切除法による検査が採用された。一方で、事業者による自主検査においては現在でも拭き取り法が利用されている。と畜・食鳥検査員及び事業者に対する聞き取り調査からは、微生物試験について方法の統一化に関する意見も多く抽出された。しかしながら、本研究で提案した手順書案においては、事業者の負担軽減を意図して、微生物試験の方法として従前より事業者が参照している厚生労働省通知を提案し、外部検証通知とは異なった拭き取り法による検査方法を示した。外部検証における微生物試験結果については全国的

な解析が既に開始されており、今後、その結果が衛生管理状況の評価に利用される事となる。一方で、自主検査結果の全国的な解析は現実的には実現困難である。そのため、個々の事業者において外部検証と内部検証の微生物試験結果を比較しつつ検証を進めることが望まれる。内部検証の手順書案においては外部検証通知と同様に、検証結果の評価は結果の絶対値の短期的な評価ではなくトレンド解析が重要であることを説明した。手順書案にて提案した自主検査におけるトレンド解析の導入は食品衛生管理の高度化を図る上で重要な提案であるのみならず、外部検証結果と自主検査結果の比較解析において有効なツールになると期待している。外部検証と内部検証における微生物試験法の整合性確保については今後の課題とし、有効なシステムの構築を目指したいと考えている。

と畜場及び食鳥処理場の外部検証については本格的実施の開始から約 2 年を迎え、と畜・食鳥検査員にて外部検証通知に沿った形で詳細な検証活動を実施頂いているところである。一方で、外部検証通知に示される作業は膨大なものとなっており、持続可能な外部検証実施体制の整備のためには今後、外部検証作業の効率化に関する取り組みが求められるものと考える。本研究では外部検証の効率化に向けた取り組みの一つとして、外部検証と内部検証の連携強化を目的とした内部検証手順の提案を起案した。事業者に対する聞き取り調査においては、外部検証に対する協力姿勢は強いものの、外部検証通知の内容については事業者側では意識しておらず、このことが外部検証と内部検証の連携の大きな障害となっていることが明らかとなった。本研究で作成した手順書案では外部検証において確認される記録について事業者側での確実な取得を主たる目的の一つとして設定している。内部検証の手順書案の中で示す記録の取得・確認作業においては、外部検証通知の別表にて示される確認項目を引用し、外部検証で行う各検証作業の意図について事業者側でも共有し、それをもって外部検証の確実性の上昇も見込んでいる。今後、内部検証の手順書案を参照することで事業者側においても外部検証の意図を理解していただき、その意図に沿った形での記録の取得をして頂けるように期待している。これらの意識の共有は外部検証の効率化に繋がるのみならず、内部検証の効率化も期待され、事業者側にとっても大きなメリットを提供するものであると考える。

CFR Title 21 にも示される様に検証は妥当性確認と継続的検証の 2 つの工程に大きく分けられる。内部検証の手順書案ではこのうち継続的検証に多くの解説を割き、妥当性確認については簡潔な説明のみを記載した。妥当性確認には科学的かつ専門的な知識が要求されるため、妥当性確認（衛生管理計画及び手順書の妥当性確認）についてはと畜・食鳥検査員との連携が推奨されるものと考える。内部検証の手順書案は外部検証通知との整合性を持たせることで、記録確認に係る検証を簡略化する事が可能となるよう企図した。事業者による本手引書案の活用により、外部検証における継続的検証に関すると畜・食鳥検査員の負担軽減へと繋がり、その分、専門的知識を有する検査員による妥当性確認活動の重点化へと波及することが期待される。

(5) 国際動向を踏まえた情報の収集整理

と畜場での HACCP 方式での衛生管理の評価や検証として、牛、豚等の獣畜の枝肉に対して実施されている微生物試験について、英国（欧州連合）、米国、オーストラリア、日本の 4 カ国を比較した場合、対象微生物としては、代表的な衛生指標菌である一般細菌数，腸内細菌科菌群，大腸菌群，大腸菌のうち少なくとも 1 種類は必ず実施されている状況を確認できた。これに加え、英国（欧州連合）、米国、オーストラリアでは、サルモネラ属菌が検査対象となっていた。しかし、英国の小規模と畜場では、サルモネラ属菌の検査は要求されておらず、また、欧州連合は「サルモネラ菌の存在に関する基準及び条件は、サルモネラ菌の有病率に見られる変化に照らして改訂されるもの」としている。米国においても、豚とたいに対して、サルモネラ属菌検査は現在は廃止されている。日本では、現在サルモネラ

属菌を検査項目に含めていない。サルモネラ属菌の検査の必要性の有無は、今後のさらに他国における実施状況の動向に加え、国内の獣畜枝肉のサルモネラ属菌による汚染状況や衛生指標菌数とサルモネラ属菌数の関連性等の検討によって、判断するのが望ましいと考えられる。更に、検体採取の工程に関して、欧州連合と日本は冷却前の枝肉としている一方、米国，オーストラリアは一定時間冷却後の枝肉としている。米国，オーストラリアでは、冷却後の枝肉を用いることで、微生物検査の結果をと畜工程の衛生評価（枝肉の汚染度）に加え冷却設備の評価（増殖)も含めた総合的な評価としていると考えられる。

枝肉からの検体採取部位に関しては、英国（欧州連合)、米国、オーストラリアでは、１つの枝肉から複数箇所を選び検体を採取している。日本、米国も同じあるいは類似部位を採取しており、枝肉における採取部位にはどの国も大きな差はないと考えて良いと思われた。検体採取方法は、日本を含めいずれの国も切除法、スポンジ法のどちらかあるいは両方を採用されている。試験の頻度は、日本以外は週に１回以上あるいは毎日としている。しかし英国の場合、「週１回以上」としつつも、一定期間検査結果が優良であった場合検査頻度を「2 週間１回」あるいは「4 週間１回」に減らすことを可能としており、衛生管理が優良な事業者に対するインセンティブと捉えられる。日本では、通知(生食発 0528 第１号)において、月１回以上としつつ、管轄自治体が各と畜場の衛生管理状況に応じて、検査頻度を考慮することも今後、効率的・効果的な検証を進める上で有用かもしれない。

食鳥肉においては、腸管系病原体のうちサルモネラ属菌、カンピロバクター属菌の汚染頻度が高いことは世界共通で周知であり、食鳥肉の安全性確保には、これらの病原体を考慮した微生物の制御・モニタリングは欠かせない。英国（欧州連合)、米国、カナダ、オーストラリアのいずれの国でもサルモネラ属菌、カンピロバクター属菌を検査対象としていた。日本は、衛生指標菌である一般細菌と腸内細菌科菌群の定量試験を基本とし、カンピロバクター属菌については任意としている点が他国と異なっている。カンピロバクター属菌やサルモネラ属菌の検査の必要性の有無は、国内の食鳥とたいでのカンピロバクター属菌やサルモネラ属菌の検出頻度、検出菌数に加え、衛生指標菌の菌数とカンピロバクター属菌やサルモネラ属菌の菌数との相関性の検討などを実施した上で判断することが適切であると考える。鶏のとたいからの検体の採取方法に関しては、欧州と日本が首皮の切除法を採用し、米国とオーストラリアではリンス法を採用していた。

国内のと畜場において牛・豚枝肉を対象とした外部検証微生物試験の平均菌数は、一般細菌数、腸内細菌科菌群数ともに、海外諸国の基準に暫定的に当てはめた場合、優良に値するものであった。このことから、国内のと畜場で行われている HACCP に基づく衛生管理は多くの施設では適切に運用されていると予測される。但し、それらの結果の最小・最大菌数間には大きな幅があり、国内での最大菌数は海外諸国の基準で不適合に値するものもあった。このことから、国内においても適切な判定基準を設けると共に牛豚以外の獣畜を含めて実態を反映させた検査手法を構築していくことが、国際標準的な観点で、不適合に関わる衛生的課題を検知し、更なる改善指導に資するものと思われる。

食鳥とたいに関しては、検査項目が海外諸国と異なるため、日本における衛生指標菌での結果を諸外国の判定基準に当てはめることはできなかった。一部の国内食鳥とたいで実施されたカンピロバクター菌の検査結果では、欧州連合の基準値である 3 log cfu/g を超えた検体が 22 検体（2.45％）存在していた。国内では、カンピロバクター菌の検査は任意であることを踏まえ、このような衛生的に問題がある食鳥とたいを検知し適切に衛生管理状態を評価および指導するためには、現行の検査項目の適切性およびカンピロバクター菌の検査の必要性の有無についてさらなる検討を行い、より実効性のある検証手法の構築が必要と考えられた。

(6) HACCP 検証の評価方法に関する研究

食鳥肉の直接的な危害要因であるカンピロバクターの定量的汚染状況は衛生指標菌定量試験成績によっては判断できないことが相関性解析を通じて示され、カンピロバクター定量試験を実施する必要性が提起されたと考えられる。

欧州の食鳥処理場で工程管理の達成目標とされるカンピロバクターが鶏皮 1 g あたり 3.0 log CFU/g を超過した検体が供試検体数の 20%以上を占めた施設も認められた。こうした施設の衛生管理実態は微生物試験を実施して確認を継続的に行いつつ、改善指導を進める必要があると考えられる。

微生物試験報告様式については、カンピロバクター試験成績報告様式に含まれる鶏種や処理方式、更に年間処理羽数の情報を含めていくことで、施設毎の試験検体数や試験頻度の設定を検討することが可能になると思われる。

E. 結論

(1) と畜場における HACCP 外部検証に関する研究

① と畜場における HACCP 外部検証・内部検証に関する研究

1) 食肉衛生検査所で実施されためん羊、山羊、馬の糞便、枝肉拭き取り検査集計

めん羊、山羊、馬は牛や豚のと畜頭数に比べて少なく、細菌検査成績を得ている検査所は少ない。めん羊はサルモネラや STEC を約 3 割保菌していることが判明した。しかし、保有しているサルモネラや STEC は患者から分離される血清型とは異なることが判明した。現在、実施している検査法はスワブ法であった。

2) めん羊枝肉表面の切除法による細菌汚染状況調査

切除法による我が国のめん羊枝肉の成績が初めて示された。めん羊の枝肉表面の部位ごとに細菌汚染が異なることが判明した。と畜場ごとに枝肉表面汚染の程度は異なると思われることから、と畜場ごとに汚染箇所を把握し、その汚染箇所のゼロトレランス検証をより慎重に実施することが必要と思われた。また、必要に応じて枝肉の消毒を実施することを作業工程に加える等、と畜場に助言することが必要と思われた。

3)スワブ法に代わると畜場内牛枝肉および豚枝肉の内部検証法の検討

切除法は、ふき取り法にくらべて、一般細菌数、腸内細菌科菌群数ともに、常に高値を示した。EU 規定で最良レベルの衛生的な牛枝肉・豚枝肉を生産していると畜場では、スタンプの一般細菌数を用いること、または、スタンプやふき取りでの腸内細菌科菌群陰性を確認することで、牛枝肉・豚枝肉の細菌検査の内部検証が可能かもしれない。

4)生産農家ごとの和牛の体表の STEC O157・O26 の汚染状況

GI-1 施設に搬入された黒毛和種牛の体表の STEC O157 の拭取り検査結果(8.1%:15/185 検体)と別途実施した盲腸内容物の検査結果(15.6%：14/90 検体)の有意差は認められなかった。体表の STEC O26 の拭取り検査結果(2.7%：5/185 検体)と盲腸内容物の検査結果(1.1%：1/90 検体)の有意差は認められなかった。黒毛和種牛の STEC 保有状況は農家ごと、そして、と畜日により搬入される牛の STEC 保有状況も異なっていた。現時点での STEC 検査のロット設定は「同一農家かつ同一と畜解体作業日の枝肉群を 1 ロットとする」ことが妥当であると考えられた。運搬の車両内や係留所内での交差汚染の可能性も低いと考えられた。スクリーニング検査のリアルタイム PCR 検査は VT 遺伝子ではなく、O 抗原遺伝子検査を実施し、陽性であった検体のみ分離培養に進むのが効率的であることが判明した。

5)黒毛和種牛の体表の汚染状況の把握

黒毛和種牛は、糞便から高率に C. jejuni が、20%から STEC を保菌していることから、糞便が枝肉に付着しないようにと畜処理し、付着した場合は、その個所をトリミングすることにより汚染を除去することが食肉衛生学的に重要である。

と畜処理においては、体表は高度に汚染しているものと理解し、獣毛等による汚染を防ぐため、必要な

最小限度の切開をした後、ナイフを消毒し、ナイフの刃を手前に向け、皮を内側から外側に切開する操作が衛生的に重要であり、特に正中に刀を入れるときは、消毒したナイフの刃を手前に向け、皮を内側から外側に切開することが、食肉衛生学的に有効であると思われた。

6）枝肉に付着する異物による微生物汚染実態と菌叢解析

ゼロトレランス検証に示されている糞便、消化管内容物だけでなく、獣毛からも糞便や消化管内容物と同程度の一般細菌数や腸内細菌科菌群数が検出されることからゼロトレランス検証に加え、獣毛についても、体表に付着していた場合は、トリミングすることが必要であると思われた。また、菌叢解析の結果から、肉眼で実施されているゼロトレランス検証においても、糞便、消化管内容物は的確に判断されていると思われた。ゼロトレランス検証を実施することは食肉衛生上, 大変重要であることが確認された.

② 馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究

と畜場 3 施設で処理される馬とたいを対象とした衛生指標菌定量試験を実施し、「平均+2SD 値」の超過を指し示す検体の採材部位としては胸部または腹部であったことから、これらを採材部位として微生物試験に供することで馬の解体処理工程における衛生管理の検証を合理的に行えると考えられる知見を得た。また、菌叢解析を通じ、馬枝肉においては土壌由来細菌が多くを占めたことから、体表から枝肉への細菌汚染が対象施設での衛生確保に重要な意義を示すと推察された。

③外部検証プロトコルの妥当性評価に関する研究

1） 牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と病原細菌検出状況の調査

特定のと畜場に搬入される牛と体外皮拭き取り検体の衛生指標菌数、病原細菌検出状況を調査した。特定の農場から搬入される検体が STEC に高度に汚染されている状況が明らかとなった。

2） 豚及び牛と体の外皮拭き取り検体と枝肉切除検体における衛生指標菌数及び病原細菌検出状況の評価

国内の 3 施設で豚と体及び牛と体の外部検証用枝肉切除検体及び外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と病原体検査結果の関連を検討した。豚と体では、全検体サルモネラ属陰性であり、STEC も一例を除いて分離陰性となり、これら施設では豚と体の衛生管理が適切に行われていることが確認された。病原細菌の分離が陰性であったため、病原性大腸菌関連遺伝子検出状況と衛生指標菌数の関連を検討したところ、これら遺伝子の検出された外皮拭き取り検体では、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数共に、病原性大腸菌関連遺伝子の検出されなかった検体に比べて多い傾向が認められた。しかしながら、豚と体の外皮拭き取り検体では、牛と体に比べ一般細菌数及び腸内細菌科菌群数共に低い値であり、更にサルモネラ属が全検体で陰性であったことからも、衛生状態を適切に評価できているか疑問が残った。豚と体の拭き取り法の検証、更にサルモネラ属以外の病原細菌を衛生状態の指標として検討することの必要性が示唆された。

牛と体では、サルモネラ属及び STEC いずれも分離陰性であり、牛と体の衛生管理が適切に行われていることが確認された。病原体分離陰性であったものの、外皮拭き取り検体では病原性大腸菌関連遺伝子が高い割合で検出され、一方枝肉では殆ど検出されなかったことから、これら遺伝子の検出が衛生管理の検証に有用であることが示唆された。病原性大腸菌関連遺伝子陽性となった外皮拭き取り検体では、一般細菌数が 5 log cfu/cm2 以上及び腸内細菌科菌群数で 2 log cfu/cm2 以上であり、枝肉では衛生指標菌数の減少とともに病原性大腸菌関連遺伝子が殆ど検出されなくなることが示された。

3） 豚と体及び牛と体の解体工程における衛生指標菌と病原菌関連遺伝子検出状況の評価

前年度までに実施した検証結果を踏まえ、1 施設の協力の元、剥皮前後の工程における衛生管理の

重要性について、衛生指標菌と病原菌関連遺伝子検出状況を指標に評価した。豚と体及び牛と体の解体工程における「剥皮前」と剥皮後の「枝肉」工程間の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は剥皮後に大きく減少し病原菌関連遺伝子陽性率も「0」になることが明らかとなった。以上により、対象施設の豚と体及び牛と体解体工程では、剥皮前後の工程における衛生管理が重要であることが示された。

④ と畜場でのリステリア属菌の汚染実態と管理すべき工程に関する研究

本分担研究では、牛と畜工程におけるリステリアの常在化のリスクを探知することを主な目的として、令和 4 年 6 月から 11 月の間、と畜場内の施設環境におけるリステリア属菌及び LM の汚染状況を調査研究した。結果として、LM は検出されず、リステリア属菌が牛外皮及び牛枝肉冷蔵室内で見いだされた。これらの結果より、外皮等を通じ施設への LM の持ち込みの可能性が示唆されるとともに、特に枝肉冷蔵工程では洗浄消毒の励行を行うことがリスク管理策として重要と考えられた。なお、牛解体処理を行う施設環境では作業終了後に熱温水を用いた洗浄が毎回行われており、このことが同属菌の常在化の予防策となっているものと推察された。

(2) 食鳥処理場における HACCP 外部検証に関する研究

本分担研究では、衛生的な鶏肉製品を提供していた大規模食鳥処理場の協力を得て、重要管理点として手引書等で例示される冷却工程に焦点を当て、冷却水の物性及び微生物の動態を経時的に評価した。結果として、断続的な塩素注入や処理速度を安定的に設定・運用していることにより、塩素濃度や pH、水温、更には一般細菌数を安定的に制御されている状況を確認することができた。

(3) 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

① 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

南九州地方の認定小規模食鳥処理場の協力を得て、処理工程を通じたカンピロバクターの汚染挙動を調査し、必要に応じ、管轄自治体の検査員等と共に施設の衛生管理に係る改善指導へとつなげた。生食用食鳥肉のカンピロバクター汚染阻止に対して、と体表面焼烙は、それのみで完全に阻止できるものではなく、焼烙後の交差汚染及び食肉部分への汚染を防ぐ措置も必要であり、またそれ以外の工程でも可能な限りカンピロバクター菌数を低減させる必要があると考えられた。

② 生食用食鳥肉の製造工程管理に関する情報調査

南九州地方で「とりさし」を取り扱う、小規模な食鳥処理業及び食鳥肉加工業を営む事業者が製造加工する生食用食鳥肉製品の衛生調査を行い、施設の管理実態を踏まえ、改善に資すると思われる事項を抽出した。また、これらの小規模事業者を対象としたアンケート調査を行い、焼烙条件については、「とりさし協会」が推奨するガイドラインに示される条件が実効性に富む状況にあることが確認された。成分規格目標を含め、生食用食鳥肉の衛生管理ガイドライン作成にあたって重要と思われる事項を整理し、原案を策定した。

(4) と畜場・食鳥処理場の内部検証に関する研究

本研究では、衛生指標菌汚染と病原微生物汚染の相関解析のパイロットスタディを行った上で、外部検証通知の有効性を高める目的で外部検証通知と連携可能な内部検証の手順書案を作成した。同手順書案は、検証の目的・重要性についての事業者の理解不足の解消、及び内部検証と外部検証の連携の強化を主たる目的としており、その活用は内部検証の確実な実施と高度化による外部検証の円滑化と有効性の強化へと繋がることが期待される。

(5) 国際動向を踏まえた情報の収集整理

本研究では、と畜場・食鳥処理場の衛生管理に、日本より先行して HACCP 方式を取り入れている

諸外国の情報を収集し整理した。地域間及び日本との間で相違が見られた点に関しては、さらに根拠や背景を踏まえた考察が必要であるものの、本研究で得られた知見は、国際標準に対応し、かつ国内における HACCP 方式によると畜場の衛生管理及びその検証法（内部検証，外部検証)の改訂整備にあたっての基礎情報として活用される事が期待される。

(6) HACCP 検証の評価方法に関する研究

汚染実態調査結果を踏まえた、牛、豚、食鳥とたいにおける一般生菌数、腸内細菌科群数の工程管理目標値としては通年平均＋2SD を基準値として提案しうると考えられた。また、食鳥とたいにおいては、カンピロバクター数の工程管理目標案として、通年平均＋2SD(2.4 log)あるいは 欧州基準 3.0 log が妥当であると考えられた。今後の運用のなかで、検査データを蓄積しつつ長期的な観察の中で、HACCP の運用効果が評価されていくことになろう。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 書籍

1) 森田幸雄.（2023）牛肉. 生食のはなしーリスクを知って、おいしく食べるー(朝倉書店). P30-35.
2) 中馬猛久.（2023）豚肉. 生食のはなしーリスクを知って、おいしく食べるー(朝倉書店). P41-46.
3) 朝倉宏.（2023）鶏肉. 生食のはなしーリスクを知って、おいしく食べるー（朝倉書店）. P46-51.
4) 朝倉宏.（2023）カンピロバクター. 生食のはなしーリスクを知って、おいしく食べるー（朝倉書店）. P69-70.

2. 論文

1) Kumagai Y, Pires SM, Kubota K, Asakura H. (2020) Attributing human foodborne diseases to food sources and water in Japan using analysis of outbreak surveillance data. J. Food Prot. 83: 2087-2094.
2) Yamasaki E, Matsuzawa S, Takeuchi K, Morimoto Y, Ikeda T, Okumura K, Kurazono H. (2020) Rapid Serotyping of *Salmonella* Isolates Based on Single Nucleotide Polymorphism-Like Sequence Profiles of a *Salmonella*- Specific Gene. Foodborne Pathog. Dis., 18(1): 31-40.
3) Okumura K, Kaido M, Yamasaki E, Akai Y, Kurazono H, Yamamoto S (2020) Genomic Sequences of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains with Various Fluoroquinolone Resistance Profiles. Microbiol. Resour. Announc. 9(38): e00199-20.
4) Yamamoto S, Kitagawa W, Nakano M, Asakura H, Iwabuchi E, Sone T, Asano K. (2020) Plasmid sequences of four large plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle in Japan. Microbiol. Resour. Announc. 9: e00219-20.
5) 朝倉宏.（2021）食肉・食鳥肉製品のハザードとその管理. 保健医療科学. 70: 100-106.
6) Asakura H, Nakayama T, Yamamoto S, Izawa K, Kawase J, Torii Y, Murakami S. (2021) Long-term grow-out affects *Campylobacter jejuni* colonization fitness in coincidence with altered microbiota and lipid composition in the cecum of laying hens. Front. Vet. Sci. 8: 675570.
7) Duc VM, Kakiuchi R, Obi T, Asakura H, Chuma T. (2022) The incidence of *Campylobacter* contamination levels through chicken-sashimi processing steps in a small-scale poultry processing plant applying the external stripping method. J. Vet. Med. Sci. 84(3): 414-419.
8) Asakura H, Yamamoto S, Sasaki Y, Okada Y, Katabami, Fujimori A, Munakata K, Shiraki Y, Nishibu H, Hisamoto C, Kawase J, Ojima Y,

Kiyoshima A, Shiroma K. (2022) Bacterial distribution and community structure in beef cattle liver and bile at slaughter. J. Food Prot. 85: 424-434.

9) Ogawa A, Nagaoka H, Asakura H. Draft genome sequence of *Campylobacter jejuni* ST-508 strain Shizu21005, isolated from an asymptomatic food handler in Japan, 2021. Microbiol Resour Announc. 2022: e0031622.

10) Yamasaki E and Fukumoto S (2022) Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Yezo sika deer *Cervus nippon yesoensis* in the Tokachi sub-prefecture of Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci. 84(6): 770-776.

11) 塚本真由美、苅谷俊宏、山﨑翔矢、小畑麗、向島幸司、村瀬繁樹、朝倉宏、森田幸雄. (2023) 黒毛和種牛枝肉表面に付着する異物の細菌学的汚染状況, 日本獣医師会雑誌. 76: e11-e17.

3. 学会発表等

1) 朝倉宏、山本詩織、町田李香、中馬猛久. 南九州で製造加工される生食用食鳥肉製品における衛生指標菌汚染分布と工程管理との関連性に関する検討. 第 42 回日本食品微生物学会学術総会.

2) 朝倉宏. 食肉および食鳥肉の衛生管理における定量的微生物モニタリング. 第 42 回日本食品微生物学会学術総会.

3) 朝倉宏、山本詩織、吉冨真理、中馬猛久、森田幸雄. 馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験法の設定に向けた検討. 第 42 回日本食品微生物学会学術総会.

4) 朝倉宏. カンピロバクターの汚染実態と遺伝性状に基づく制御に向けた研究. 第 118 回日本食品衛生学会学術講演会

5) 朝倉宏. 生食用食鳥肉の製造加工を通じたリスク管理について. 第 58 回獣医疫学会学術集会シンポジウム.

6) 朝倉宏. 生食用食鳥肉製造加工の高度衛生管理に関する研究について. 厚生労働省令和 3 年度食肉及び食鳥肉衛生技術研修並びに研究発表会.

7) 朝倉宏. 外部検証の微生物試験の分析結果について. 厚生労働省令和 3 年度食肉及び食鳥肉衛生技術研修並びに研究発表会.

8) 津留優、宗安祥佳、Vu Minh Duc、城間萌子、栗脇良太、山元三保子、中馬猛久. 鶏から分離されたカンピロバクターの型別とギラン・バレー症候群関連遺伝子. 第 13 回日本カンピロバクター研究会総会.

9) 朝倉宏, 中山達哉, 山本詩織, 伊澤和輝, 川瀬遵, 鳥居恭司, 村上覚史. 長期飼育を通じた, 採卵鶏における *Campylobacter jejuni* の腸管定着の経時変動並びに腸内菌叢・脂質組成との関連性探索. 第 164 回日本獣医学会学術集会.

10) 中村寛海, 秋吉充子, 山本香織, 梅田薫, 平井佑治,朝倉宏, 阿部仁一朗. mP-BIT 法による食中毒起因カンピロバクターの流行動態解析. 第 14 回日本カンピロバクター研究会総会.

11) 朝倉宏. 最近の食中毒の傾向と対策. 文部科学省 学校給食の衛生管理等に関する指導者講習会.

12) Asakura H. (2022) Surface-burn process immediate after slaughter for the improvement of microbiological quality in poultry meat. 54th Korean Society for Food Science of Animal Resources (KoSFA) International Sympodium and Annual Meeting.

13) 山崎栄樹、福本晋也. 北海道十勝地方におけるエゾシカの腸管出血性大腸菌保有状況調査. 第 24 回腸管出血性大腸菌感染症研究会.

14) 中江優貴、久永崇宏、筆谷麻未、國井菜那子、松橋平太、寺井克哉、大畑克彦、朝倉宏. 牛と畜処理工程別のリステリア属菌の汚染実態について. 令和 4 年度静岡県衛生発表会.

15) 朝倉宏. 外部検証の微生物試験の分析結果に

ついて. 厚生労働省令和 4 年度食肉及び食鳥肉衛生技術研修並びに研究発表会.

H. 知的財産権取得状況

該当なし

II. 分担研究報告

令和 2-4 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）
分担総合研究報告書
と畜・食鳥処理場における HACCP 検証方法の確立と
食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究

と畜場の HACCP 外部検証・内部検証に関する研究

分担研究者　森田幸雄　麻布大学

研究協力者　小林光士、古内功二、小野寺 仁、小池史晃、辻 芳裕、寺地真弓　JA 飛騨ミート

塚本真由美、苅谷俊宏、山崎翔矢、池田　晃、松岡和代、小畑 麗、向島幸司　安江智雄、村瀬繁樹　岐阜県飛騨食肉衛生検査所

藤平裕子、清水俊一、稲田和也　北海道早来食肉衛生検査所

森越真梨恵　旭川市食肉衛生検査所

大西広輔　旭川市保健所

石沢由起子　青森県十和田食肉衛生検査所

柳沼千春　郡山市保健所食肉衛生検査所

小西世津香　金沢市保健所食肉衛生検査所

八重森恵子、花田千晴、藤巻 勤　山梨県食肉衛生検査所

尾島康世　高知市食肉衛生検査所

藤田景清　北九州市保健福祉局保健衛生部食肉センター

加藤峰史　沖縄県中央食肉衛生検査所

成田静香、菊池貴子、原 理洋　スターゼン㈱

三好 円、花田 博、奈須正知、黒木重孝、馬場俊行　スターゼンミートプロセッサー㈱

下郷晶子　日水製薬㈱

片桐 謙、黒田伸彦　山形県庄内食肉衛生検査所

岡谷友三アレシャンドレ、中込就子、佐藤妃恵、大石和樹、安達悠太、永田 栞、田内春香、渡辺哲史、廣瀬絵美香、清水香南、石井弘祐、鈴木このみ　麻布大学

朝倉 宏　国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

と畜場の HACCP 外部検証・内部検証に用いるめん羊、山羊、馬および黒毛和種牛に関する成績を収集した。めん羊、山羊、馬の枝肉の衛生状況を把握するため、全国食肉衛生検査所協議会微生物部会に依頼し、各食肉衛生検査所で実施した、めん羊、山羊、馬の糞便検査並びに枝肉拭き取り検査成績を収集した。8 所属のデータが得られた。めん羊はサルモネラや腸管出血性大腸菌(STEC)を約 3 割保菌しているが、保有しているサルモネラや STEC は患者から分離される血清型とは異なっていることが判明した。馬の病原体検査については、少数の検査が実施されているにすぎなかった。枝肉からの検体採取法はすべてスワブ法であり、切除法の成績は見当たらなかった。そこで、めん羊の枝肉を購入し、枝肉の表面 30 カ所を切除法によって採取し細菌汚染状況を調査した。大腸菌が検出された部位は 9 か所存在した. 検体 27（右肘部内側）が最も多く 3.60 log 個/㎠、次いで検体 25(頸部右側)が 2.40 log 個/㎠、検体 5(腕基部)が 2.18 log 個/㎠、検体 14 (胸部右側)が 1.95 log 個/㎠、検体 15(後大腿部右側)が 1.58 log 個/㎠であった。枝肉の検体からは STEC,カンピロバクター、サルモネラは未検出であった。解体時には、めん羊においても、ゼロトレラ

ンス検証とともに、必要に応じて枝肉の消毒を作業工程に加える必要であると思われた．と畜場が実施する簡易的な内部検証法を検討するため、2 つのと畜場でと畜解体された各 11 頭の牛豚枝肉の左右の胸部について、切除法、スワブ法およびスタンプ法を実施し、それらの結果を比較した。スタンプ法は希釈をしないことから、高度に汚染している検体には不向きであったが、衛生的な牛枝肉(一般細菌数 : 3.5 log 個/㎠未満、腸内細菌科菌群数 : 1.5 log 個/㎠未満)や豚枝肉(一般細菌数：4.0 log 個/㎠未満、腸内細菌科菌群数：2.0 log 個/㎠未満)を生産していると畜場では、スタンプ法で一般細菌数や腸内細菌科菌群陰性を確認することで、牛枝肉・豚枝肉の細菌検査の内部検証が可能かもしれないことが判明した。米国向け輸出食肉の取扱要綱に従い、食肉処理施設において製造される冷蔵トリミング肉を検体とした STEC 検査のロットの設定を試みた。5 月から 10 月に月ごとに 1 日を定め、JA 飛騨ミートに搬入された全ての黒毛和種牛について、生体の体表（肛門周囲）をスポンジで拭取り検査に供した。農場ごとに 1 検体とし、72 農家のべ 185 検体 341 頭を実施した。リアルタイム PCR 法をスクリーニング検査としたところ、VT 遺伝子は 185 検体中 184 検体（99%）、O157 遺伝子は 122 検体中 77 検体（63%）、O26 遺伝子は 35 検体（29%）が陽性となった。細菌分離検査で陽性となったのは O157 が 185 検体中 15 検体（8.1%）、O26 は 5 検体（2.7%）であった。1 検体からは O157 及び O26 の両集落が検出されたものは、スクリーニング検査でも陽性であった。72 農家中 17 農家が STEC 陽性で、2 回以上検体を採取した農家は 52 農家であり、2 回陽性となった農家は 2 農家、陽性 1 回の農家は 13 農家であった。と畜日ごとに農家から搬入される牛の STEC 保有状況は異なっていることから、現時点での STEC 検査のロット設定は「同一農家かつ同一と畜解体作業日の枝肉群を 1 ロットとする」ことが妥当であると思われた。衛生的なと畜処理を実施するため、5 頭の黒毛和種牛の糞便の食中毒菌保菌調査および 1 頭につき 15 か所の体表をフードスタンプを用いて採取し、食中毒菌検査と衛生指標菌（一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数）検査を実施し、体表の汚染を把握した。100%(5/5 頭)の黒毛和種牛の糞便から *C. jejuni* が、20%(1/5 頭)から STEC が検出された。供試した 5 頭の牛の体表からはカンピロバクターならびに STEC は分離できなかった。フードスタンプを用いた体表の検査においても、一般細菌は 4.18 log 個/㎠、腸内細菌科菌群は 1.62 log 個/㎠、大腸菌群は 0.90 log 個/㎠、大腸菌数は 0.79 log 個/㎠が検出された。また、一般細菌数では⑥胸部正中、⑦腹部正中、⑧踝外側左が多かった。大腸菌群数および大腸菌数も⑥胸部正中が最も高値を示した。正中はと畜処理では必ず刀を入れる部位である。と畜処理においては、体表は高度に汚染しているものと理解し、特に正中に刀を入れるときには、消毒したナイフの刃を手前に向け、皮を内側から外側に切開することが、食肉衛生学的に有効であると思われた。ゼロトレランス検証の有用性を確認するため，獣毛(5)，糞便(8)，消化管内容物(6)，レールダスト(5)，フットカッター汚れ(5)が付着した黒毛和種牛枝肉を採材した．獣毛，糞便，消化管内容物間の一般細菌数と腸内細菌科菌群数に有意差がなかった．獣毛-糞便-消化管内容物検体の一般細菌数はレールダスト-フットカッター汚れ検体のそれと比べ高値であった．消化管内容物は *Firmicutes* 門，獣毛・レールダスト・フットカッター汚れは *Proteobacteria* 門の比率が高く，糞便は *Firmicutes* 門と *Proteobacteria* 門が高い比率の菌叢であった．付着異物ごとに菌叢の違いが確認された．食肉衛生上，糞便及び消化管内容物だけでなく獣毛が付着したと体表面はトリミングすることが必要であると思われた．

A．研究目的

と畜場への HACCP 導入の制度化にともない、と畜検査員による外部検証が行われる。外部検証については、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（生食発0528 第 1 号、令和 2 年 5 月 28 日）により、その実施に関する手順、評価方法等に示されている。微生物試験を用いた外部検証法については、同通知によって、牛及び豚の検査法は示されている。しかし、と畜場法の対象となる獣畜のうち、めん羊、山羊、馬については示されていない。そこで、めん羊、山羊、馬の糞便や枝肉の細菌検査結果等の入手を試みた。

2018(平成 30)年 7 月 10 日、厚生労働省は、米国農務省食品安全局（以下「FSIS」と略）からの要請を受け、食肉処理施設において製造される冷蔵トリミング肉を検体とした志賀毒素産生性大腸菌（以下「STEC」と略）検査の実施をアメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱に定めた。これにより、検査所および対米牛肉輸出処理施設は STEC 検査を開始した。FSIS のガイドラインにより、と畜解体より前の段階に着目した製品のロットの設定が求められる。厚生労働省は、農家単位で製品のロットを設定する方法を一例を事務連絡で示した。この設定は当面の間、論文等の既存データの活用が可能とされており、JA 飛騨ミート(GI-1 施設)は、「同一農家かつ同一と畜解体作業日の枝肉群を 1 ロットと設定する」こととした。GI-1 施設独自の成績を収集するため、体表拭取りを行い、農家ごとに 1 検体とし STEC・O157・O26 のリアルタイム PCR 検査および細菌検査を実施した。

また、「アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱（令和 2 年 4 月 1 日財務大臣・厚生労働大臣・農林水産大臣決定別紙）」により、以前から対米牛肉輸出施設はゼロトレランス検証（目視できる糞便、消化管内容物、乳房内容物に汚染されていないことを検証すること）を実施している。さらに、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」においても、ゼロトレランス検証が明記されており臨場すると畜検査の際に、と畜検査員は計画的にゼロトレランス検証を実施している。枝肉に付着している異物は、糞便、消化管内容物、乳房内容物に加え、獣毛、レールダスト等様々である。そこで、危害分析の一助とするとともに、検証技術の向上を目的として、GI-1 施設でと畜・解体処理され、整形・トリミングから最終洗浄前の枝肉に付着する異物の肉眼像及び実体顕微鏡像の観察及びこれら異物について微生物検査を実施した。

本分担研究では、上述の課題から、以下の 1～6 までの研究を実施した。

B．研究方法

1．食肉衛生検査所で実施されためん羊、山羊、馬の糞便、枝肉拭き取り検査集計

令和 2 年 9 月、全国食肉衛生検査所協議会微生物部会、部会長あて、めん羊、山羊及び馬の公表可能な糞便検査結果や枝肉の衛生検査結果の提供依頼を実施した。

2．めん羊枝肉表面の切除法による細菌汚染状況調査

2022(令和 4)年 11 月、通常の解体処理を行い、と畜検査を合格し、冷蔵庫に入る前のめん羊枝肉を購入した。体表を 30 か所、5×5 ㎠切り取り、一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数を求めた。また、サルモネラ、カンピロバクター、腸管出血性大腸菌（STEC）については定性検査を実施した。

3．スワブ法に代わると畜場内牛枝肉および豚枝肉の内部検証法の検討

令和 2 年 10 月～11 月、A・B の 2 つのと畜場でと畜解体され、冷却前の各 11 頭の牛・豚枝肉の左右の胸部（各 22 検体ずつ）を検体とした。検査は胸部の 25 ㎠のついて 1) 切除法、2) ふき取り法、3) スタンプ法を実施した。なお、EU の規定では、牛の洗浄後冷却前の枝肉の切除法の一般細菌数の優良レベルは 3.5 log 個/㎠未満、許容レベルは 3.5～5.0 log 個/㎠、不適合レベルは 5.0 log 個/㎠以上である。また、腸内細菌科菌群数の優良レベルは 1.5 log 個/㎠未満、許容レベルは 1.5～2.5 log 個/㎠、不適合レベルは 2.5 log 個/㎠以上である。EU の規定での一般細菌数による評価では、A と畜場の牛枝肉は、最良レベル、B と畜場の牛枝肉は許容レベル、腸内細菌科菌群による評価では、A と畜場、B と畜場ともに、最良レベルであった。A と畜場は対米牛肉輸出処理認定施設、B と畜場の豚の処理は湯剥き方式である。

切除法は、外部検証通知に従い、滅菌メス・

ピンセット・ステンレス枠(5×5cm:25 ㎠)を用いて切除した。2) ふき取り法は市販拭き取り検査キットであるフキトレール（関東化学㈱）を用いた。ふき取り法での拭き取り方は図３－１に示す方法で、約 600g 圧で実施した。3)スタンプ法は特別に作製した 25 ㎠のスタンプ生菌数用・標準寒天とスタンプ腸内細菌科菌群用・VRBG 寒天（以上、日水製薬㈱）を 600-700ｇ圧で 10 秒間、枝肉の胸部に押し付ける方法で実施した。

４．生産農家ごとの和牛の体表の STEC 0157・026 の汚染状況

2021(令和 3)年 5 月 25 日、6 月 15 日、7 月 8 日、8 月 5 日、9 月 2 日、10 月 14 日に GI-1 施設に搬入された全ての牛について、生体の体表（肛門周囲）をスポンジで拭取り、農場ごとに 1 検体とした。拭取り採取実施農家は 72 農家のべ 185 検体 341 頭である。

検体をノボビオシン加 mEC 培地で 41±１℃、18～24 時間増菌培養し、NucleoSpin® Tissue（マッハライ・ナーゲル）を用いて DNA 抽出を行った。それを CycleavePCR O-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0（タカラバイオ）を用いて、Thermal Cycler Dice® Real Time System Ⅲ により、VT（*stx*）遺伝子のスクリーニング検査を実施した。これに加え、7 月からは CycleavePCR™ EHEC (O157/026)Typing Kit（タカラバイオ）を用いて、0157 及び 026 遺伝子のスクリーニング検査を実施した。

全検体の増菌培養液を CT-クロモアーガー STEC 培地にて培養後、典型的コロニーを 3～5 個釣菌し、純培養を行った。その後、確認検査として生化学的性状試験と血清型別試験を実施し、両者とも陽性のものについて、DNA の熱抽出を実施し、病原因子遺伝子（*stx*、*eae*）検査を実施した。

５．黒毛和種牛の体表の汚染状況の把握

2020(令和 2)年 11 月 10 日、GI-1 施設の係留所内で、5 頭の黒毛和種牛の糞便および体表を採取した。糞便は、1 頭について 25g 以上の排泄便を採取した。体表検体は、体表 15 か所（頸部正中、肘外側左右、胸部正中、腹部正中、くるぶし外側左右、内もも左右、もも後左右、肛門左右、頸左右)をフードスタンプ生菌数用・標準寒天（日水製薬㈱）を 600-700ｇ圧で 10 秒間体表に押し付けた。糞便ならびに体表検体は、4℃で冷蔵保存にて輸送し、11 月 13 日より検査を実施した。

体表検体の検査方法:体表に押し付けたフードスタンプの寒天部分をストマッカー袋に入れ、計量後、90mL の PBS を加え、ストマッカー処理（30 秒間）を実施したものを試料原液とし、試料原液および適宜希釈液を作製した。一般細菌数は、AC プレート、腸内細菌科菌群数は EB プレート、大腸菌群・大腸菌数は EC プレート（以上、ペトリフィルム、3M㈱）を用いて測定した。サルモネラは試料原液 5mL を 45mL の BPW に加え、42℃、24 時間、好気培養後、1mL を 9mL のハーナテトラチオネート培地に加え 42℃、24 時間好気培養を実施した。その後、クロモアーガー　サルモネラ培地に塗抹し、37℃、24 時間好気培養を行った。カンピロバクターは試料原液 5mL を 45mL のプレストン培地に加え、42℃、24 時間、微好気培養を実施後、クロモアーガー　カンピロバクター培地に塗抹し、42℃、48 時間、微好気培養を行った。STEC は、試料原液 5mL を 45mL のノボビオシン加mEC 培地に加え、42℃、24 時間、好気培養した。その後、クロモアーガーSTEC に塗抹し、37℃、24 時間培養を行った。

ペトリフィルムを用いた菌数測定法等:一般細菌数の検出限界値は 500 個/㎠、腸内細菌科菌群数は 50 個/㎠、大腸菌群・大腸菌数は 5 個/㎠であることから、陰性の場合は各々の菌の検出限界値の 1/2 である、250 個/㎠、25 個/㎠、2.5 個/㎠とした。

糞便検体の病原体検査方法:サルモネラは糞便 1ｇを 10mL の BPW に加え、42℃、24 時間、好気培養後、9mL のハーナ　テトラチオネート培地に 1mL 加え 42℃、24 時間、好気培養を実施した。その後、クロモアーガー　サルモネラ培地に塗抹し、37℃、24 時間好気培養を行った。カンピロバクターは糞便 1ｇを 9mL のプレストン培地に加え、42℃、24 時間、微好気培養を実施後、クロモアーガー　カンピロバクター培地に塗抹し、42℃、48 時間、微好気培養を行った。STEC は、糞便 1ｇを 9mL のノボビオシン加mEC 培地に加え、42℃、24 時間、好気培養した。その後、CT 加クロモアーガーSTEC に塗抹し、37℃、24 時間培養を行った。

６．枝肉に付着する異物による微生物汚染実

態と菌叢解析

2021(令和3)年4月から8月まで、GI-1施設のトリミング工程、枝肉検査工程及び検査所の枝肉検証時に確認された異物(獣毛5検体、糞便8検体、消化管内容物6検体、レールダスト5検体、フットカッターの汚れ5検体、その他(肉眼で判別できないもの)2検体：検体Aと検体B)が付着した肉表面(2×2㎠)を採取し、肉眼及び実体顕微鏡で、色調及び質感を観察し、写真撮影を実施した。また、採取した検体は、ペトリフィルムを用いて一般細菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌群数、大腸菌数を算出した。さらに、同検体については菌叢解析を実施した。

C．研究結果

1.食肉衛生検査所で実施されためん羊、山羊、馬の糞便、枝肉拭き取り検査集計

AからIの9つの食肉衛生検査所から情報提供を得た。

①めん羊、山羊、馬からの各種病原体検出状況（表１－１）

サルモネラ：めん羊はAとH検査所から情報提供があった。A検査所では、33.3%(20/60検体)の糞便から検出され、亜種群Ⅲb(*diarizonae*) 061:-:1,5,7が20検体、亜種群Ⅰ(*enterica*) 04:i:-が1検体であった。H検査所では、胆汁と糞便各1検体を実施したが、未検出であった。山羊はI検査所から情報提供があり、直腸スワブ100検体、直腸スワブ100検体の検査結果は陰性であった。馬はD検査所から情報提供があり、枝肉のスワブ41検体の検査結果は陰性であった。

STEC：めん羊はA、D、H検査所から情報提供があった。A検査所では、31.67%(19/60検体)の糞便から検出され、OUT:NM(O抗原が型別不能、H抗原が陰性)が14検体、OUT:HUT(O抗原が型別不能、H抗原が型別不能)が2検体、091:NMが2検体、0103：H2が2検体、0146:NMが1検体であった。D検査所では、枝肉スワブ8検体を実施したが、未検出であった。H検査所では、胆汁と糞便各1検体を実施したが、未検出であった。馬はG検査所から情報提供があり、枝肉胸部及び肛門周囲のスワブ各2検体を実施したが、未検出であった。

カンピロバクター：めん羊はH検査所から情報提供があった。胆汁と糞便各1検体を実施したが、未検出であった。

②めん羊、山羊、馬枝肉拭き取り検体の一般細菌数・大腸菌群数・大腸菌数

枝肉からの検体採取法は、すべてスワブ法であった。

一般生菌数：めん羊枝肉の結果は4施設から情報提供があり、264/268検体(98.5%)から分離された。各施設の陽性検体の対数一般細菌数は4.02-100.88個/㎠(最高値は1,450個/㎠)であった。山羊枝肉の結果は1施設から情報提供があり、124/128検体(96.9%)から分離された。本施設の陽性検体の対数一般細菌数は5.62-12.98個/㎠(最高値は1,335個/㎠)であった。馬枝肉の結果は4施設から情報提供があり、440/469検体(93.8%)から分離された。各施設の陽性検体の対数一般細菌数は0.52-191.00個/㎠(最高値は21,900個/㎠)であった。

大腸菌群数：めん羊枝肉の結果は3施設から情報提供があり、56/262検体(21.4%)から分離された。各施設の陽性検体の対数大腸菌群数は0.10-0.51個/㎠(最高値は19.50個/㎠)であった。山羊枝肉の結果は1施設から情報提供があり、23/128検体(18.0%)から分離された。本施設の陽性検体の対数大腸菌群数は0.21-0.25個/㎠(最高値は19.50個/㎠)であった。馬枝肉の結果は2施設から情報提供があり、77/424検体(18.2%)から分離された。各施設の陽性検体の対数大腸菌群数は4.95-11.00個/㎠(最高値は910個/㎠)であった。

大腸菌数：めん羊枝肉の結果は3施設から情報提供があり、33/262検体(12.6%)から分離された。各施設の陽性検体の対数大腸菌数は0.10-0.26個/㎠(最高値は3.00個/㎠)であった。山羊枝肉の結果は無く、馬枝肉の結果は1施設から情報提供があり、14/24検体(58.3%)から分離された。各施設の陽性検体の対数大腸菌数は11.03-31.59個/㎠(最高値は640個/㎠)であった。

２．めん羊枝肉表面の切除法による細菌汚染状況調査（図２－１、図２－２）

一般生菌数は調査30カ所のうち全部から検出され対数平均は3,063.5個/㎠(3.49 log個/㎠)であった。最高値は検体27(右肘部内側)の400,000個/㎠(5.60 log個/㎠)、最低値は検体8(大腿部右側)の19個/㎠(1.28 log個/㎠)であった。腸内細菌科菌群数は調査30カ所のうち23カ所から検出され対数平均は68.3

個/㎠（1.83 log 個/㎠）であった。最高値は検体27(右肘部内側)の48,000個/㎠(4.68 log個/㎠)、7カ所は検出限界値以下であった。大腸菌群数は調査 30 カ所のうち 22 カ所から検出され対数平均は41.4個/㎠（1.62 log個/㎠）であった。最高値は検体 27(右肘部内側)の4,600個/㎠(3.66 log個/㎠)、8カ所は検出限界値以下であった。大腸菌数は調査30カ所のうち9カ所から検出され対数平均は3.3個/㎠(0.52 log 個/㎠)であった。最高値は検体27(右肘部内側)の 4,000 個/㎠(3.60 log 個/㎠)、21カ所は検出限界値以下であった。大腸菌が検出された部位で9か所存在した．検体27（右肘部内側）が最も多く4,000個/㎠(3.60 log個/㎠)、次いで検体25(頸部右側)が250個/㎠(2.40 log 個/㎠)、検体5(腕基部)が150個/㎠(2.18 log 個/㎠)、検体14（胸部右側）が90個/㎠(1.95 log 個/㎠)、検体15(後大腿部右側)が38個(1.58 log 個/㎠)であった。

検体27（右肘部内側）は調査した30カ所のなかで一般生菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌数ともに最高値を示した。

枝肉 30 カ所の検体からは STEC,カンピロバクター、サルモネラは未検出であった。

３．スワブ法に代わると畜場内牛枝肉および豚枝肉の内部検証法の検討

畜種別・と畜場別の切除法、ふき取り法、スタンプ法による対数平均菌数を表３－１に示す。

Aと畜場牛枝肉：切除法の平均一般細菌数は87.90個/㎠(1.94 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは45.13個/㎠(1.65 log 個/㎠)であった。X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線は Y＝0.4926X＋0.6968（決定係数=0.3919）であった。スタンプ法の平均一般細菌数は4.26個/㎠(0.63 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をスタンプ法の対数値とした時の、回帰直線はY＝0.6206X－0.5773（決定係数=0.297）であった。腸内細菌科菌群は切除法、ふき取り法、スタンプ法ともに検出限界値以下であった。

Bと畜場牛枝肉：切除法の平均一般細菌数は406.42個/㎠(2.61 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは95.64個/㎠(1.98 log 個/㎠)であった。X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線は Y＝0.3027X＋1.191（決定係数=0.1202）であった。スタンプ法の平均一般細菌数は 1.99 個/㎠(0.30 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をスタンプ法の対数値とした時の、回帰直線はY＝0.5327X－1.0869（決定係数=0.3743）であった。切除法の平均腸内細菌科菌群数は2.14個/㎠(0.33 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは0.45個/㎠(-0.35 log 個/㎠)であった。X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線は Y＝0.5675X－0.5325（決定係数=0.1285）であった。スタンプ法の平均腸内細菌科菌群数は 0.11 個/㎠(-0.96 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝0.121X－0.9893（決定係数=0.0115）であった。

Aと畜場豚枝肉：切除法の平均一般細菌数は247.73個/㎠(2.39 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは35.57個/㎠(1.55 log 個/㎠)であった。X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線は Y＝0.3331X＋0.7537（決定係数=0.0584）であった。スタンプ法の平均一般細菌数は2.26個/㎠(0.35 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝-0.2281X－0.2075（決定係数=0.1159）であった。切除法の平均腸内細菌科菌群数は 2.66個/㎠(0.42 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは0.43個/㎠(-0.37 log 個/㎠)であった。X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線は Y＝0.0221X－0.3526（決定係数=0.0004）であった。スタンプ法の平均腸内細菌科菌群数は 0.11 個/㎠(-0.96 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY＝-0.13X－0.8884（決定係数=0.0098）であった。

Bと畜場豚枝肉：切除法の平均一般細菌数は1,709.79個/㎠(3.23 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは1,334個/㎠(3.13 log 個/㎠)であった。X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線は Y＝0.5403X＋1.3784（決定係数=0.283）であった。スタンプ法の平均一般細菌数は3.02個/㎠(0.48 log 個/㎠)であり、X軸を切除法の対数値、Y軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線はY

＝0.439X－0.9398（決定係数=0.3079）であった。切除法の平均腸内細菌科菌群数は 1.20 個/㎠(0.08 log 個/㎠)、ふき取り法のそれは 0.17 個/㎠(-0.77 log 個/㎠)であった。X 軸を切除法の対数値、Y 軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線は Y＝0.874X－0.8334（決定係数=0.1984）であった。スタンプ法の平均腸内細菌科菌群数は 0.03 個/㎠(-1.52 log 個/㎠)であり、X 軸を切除法の対数値、Y 軸をふき取り法の対数値とした時の、回帰直線は Y＝-0.272X－1.5545（決定係数=0.0563）であった。

４．生産農家ごとの和牛の体表の STEC 0157・026 の汚染状況

スクリーニング検査結果において VT 遺伝子は 185 検体中 184 検体（99.5%）、0157 遺伝子は 122 検体中 77 検体（63.1%）、026 遺伝子は 35 検体（29%）が陽性となった。また、確認検査で陽性となったのは 0157 が 185 検体中 15 検体（8.1%）、026 は 5 検体（2.7%）であった。1 検体からは 0157 及び 026 の両集落が検出された。確認検査で陽性となったものは、スクリーニング検査でも陽性となっていた。

STEC 陽性となった農家は、72 農家中 17 農家(22.1%)であった。2 回以上検体を採取した農家は 52 農家であり、2 回陽性となった農家は 2 農家、陽性 1 回の農家は 13 農家であった。農家 B は 6 回連続陰性であったが、農家 BO は 2 回中 2 回陽性となった。1 回採取農家は 20 農家で、そのうち陽性となったのは 2 農家であった。牛の STEC 陽性率は複数頭で 1 検体のものもあるため差があるが、0157 は 341 頭中 15～23 頭陽性（4.4～6.7%）、026 は 5～7 頭陽性（1.5～2.1%）となった。

５．黒毛和種牛の体表の汚染状況の把握

①サルモネラ、カンピロバクター、STEC 検出状況

黒毛和種牛 5 頭（検体番号 1～5）の糞便検体から、カンピロバクターは全頭から分離され分離菌種は *C. jejuni* であった。STEC は 1 頭(検体番号 2)から分離され、2 型毒素産生株であった。サルモネラは検出されなかった。5 頭の 15 か所の体表検体からは、供試した病原体は検出されなかった。

②黒毛和種牛体表の部位別一般細菌数

供試した５頭の体表の全ての部位の平均菌数は 4.18 log 個/㎠(15,018 個/㎠)であった。部位別にみると⑥胸部正中が最も多く 5.06 log 個/㎠(115,280 個/㎠)、次いで、⑦腹部正中(4.94 log 個/㎠:87,848 個/㎠)、⑧踝外側左(4.94 log 個/㎠:86,990 個/㎠)であった。

③黒毛和種牛体表の部位別腸内細菌科菌群数

供試した５頭の体表の全ての部位の平均菌数は 1.62 log 個/㎠(42 個/㎠)であった。部位別にみると⑫もも後側左が最も多く 1.91 log 個/㎠(81 個/㎠)、次いで、⑦腹部正中(1.90 log 個/㎠:79 個/㎠)、⑭肛門左(1.89 log 個/㎠:77 個/㎠)であった。

④黒毛和種牛体表の部位別大腸菌群数

供試した５頭の体表の全ての部位の平均菌数は 0.90 log 個/㎠(8.0 個/㎠)であった。部位別にみると⑥胸部正中が最も多く 1.45 log 個/㎠(28.0 個/㎠)、次いで、⑦腹部正中(1.26 log 個/㎠:18.4 個/㎠)、⑭肛門左(1.24 log 個/㎠:17.4 個/㎠)であった。

⑤黒毛和種牛体表の部位別大腸菌数

供試した５頭の体表の全ての部位の平均菌数は 0.79 log 個/㎠(6.2 個/㎠)であった。部位別にみると⑥胸部正中が最も多く 1.14 log 個/㎠(13.8 個/㎠)、次いで、⑭肛門左(1.16 log 個/㎠:14.4 個/㎠)、⑫もも後側左(1.11 log 個/㎠:13.0 個/㎠)であった。

６．枝肉に付着する異物による微生物汚染実態と菌叢解析

獣毛検体は，黒く，長さや本数は様々で，肉眼でも容易に判別できた．糞便検体及び消化管内容物検体は，どちらも黄又は褐色が肉眼で観察され，実態顕微鏡像では繊維質の異物を含むものからそうでないものまで様々であった．レールダスト検体は，灰色で，薄い乾質の異物で，長さ，幅共に 2～3㎜ 程度のものが多く肉眼で容易に判別できた．フットカッター汚れ検体は，後肢切断面に付着しており，色調が黒く，肉眼では一見糞便のように観察された．その他 A 検体、その他 B 検体ともに肉眼では由来が不明であったが、その他 A 検体は「レールダストと潤滑油が混ざったもの」，その他 B 検体は「背割り屑の中に繊維質の消化管内容物又は糞便が混じたもの」と実体顕微鏡での色調および質感から推察した．

一般細菌数結果:獣毛，糞便，消化管内容物，

レールダスト,フットカッター汚れ検体の一般細菌数は各々3.27±1.23 log 個/㎠, 4.37±1.83 log 個/㎠, 4.20±0.90 log 個/㎠, 1.04±0.58 log 個/㎠, 1.70±0.23 log 個/㎠であった. その他A検体は2.26 log 個/㎠,その他B検体は5.73 log 個/㎠であった. 獣毛,糞便及び消化管内容物検体間の値についてはTukeyの多重比較検定,レールダストとフットカッター汚れ検体間の値については t 検定を実施したところ,それぞれの間の統計学上の差はなかった(p≧0.05). また, 獣毛-糞便-消化管内容物検体の一般細菌数はレールダスト-フットカッター汚れ検体のそれと比べて高値(t検定:t値=6.97, 自由度=27, p<0.05)であった.

腸内細菌科菌群数結果:獣毛, 糞便, 消化管内容物検体の腸内細菌科菌群数は各々1.40±0.73 log 個/㎠, 2.22±0.93 log 個/㎠, 2.12±1.35 log 個/㎠であった. レールダスト,フットカッター汚れ検体は調査した全ての検体において腸内細菌科菌群数は検出限界値(-0.3 log 個/㎠)以下であった.その他A検体も検出限界値以下,その他B検体は3.22 log 個/㎠であった. 獣毛, 糞便及び消化管内容物検体間の値について Tukey の多重比較検定を実施したところ,統計学上の差(p<0.05)はなかった.

菌叢解析:構成割合で1%以上を示すものは *Proteobacteria* 門, *Firmicutes* 門, *Actinobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門, *Fusobacteria*門,*Thermi*門,*Spirochaetes*門, *Euryarchaeota*門,*Fibrobacteres*門であった. 消化管内容物は *Firmicutes*門, 獣毛, レールダスト, フットカッター汚れは *Proteobacteria* 門の比率が高く, 糞便は *Firmicutes*門と *Proteobacteria*門の双方合わせて高い比率を示す菌叢であった.その他A検体は *Bacteroidetes* 門と *Fusobacteria*門の構成割合が高いという特徴を有していた.その他B 検体は *Proteobacteria* 門が多く, 次いで *Actinobacteria*門,*Firmicutes*門が検出され, 菌叢の構成は糞便や獣毛と類似していた.

D. 考察

1.食肉衛生検査所で実施されためん羊、山羊、馬の糞便、枝肉拭き取り検査集計

①めん羊、山羊、馬からの各種病原体検出状況

平成30年度食肉検査等情報還元調査のと畜場内でのと畜頭数によると、めん羊は5,233頭、山羊は 3,677 頭、馬は 9,763 頭で、豚(16,411,331頭)、牛(1,056,661頭)と比較し、きわめて少ない。また、細菌検査成績を保有している検査所も限られていると思われた。

めん羊の糞便からはサルモネラ(33.3%)、STEC(31.7%)を高率に保菌していることが判明した。サルモネラも亜種群Ⅰは1検体、亜種群Ⅲbが20検体、STECも0157のように牛や患者から分離されるものとは異なる血清型が多かった。この成績は A 検査所のみのものであり、日本で飼育されているめん羊の保菌状況をであるか、A検査所が検査していると畜場に搬入されるめん羊に固有なものであるか、調査する必要があると思われた。

山羊については、I検査所によって100検体の直腸と盲腸スワブでのサルモネラ検査をしたが、陰性であった、STECやカンピロバクターの成績は得られなかった。

馬についての糞便の成績は得られなかった。STEC については、海外において保菌している報告はあるが、国内における検出事例は認められなかった。その他、国内のサルモネラやカンピロバクターの検査結果も見つけることができなかった。

②めん羊、山羊、馬枝肉拭き取り検体の一般細菌数・大腸菌群数・大腸菌数

今回の成績は全てスワブ法であった。日本では切除法の成績は無いと思われる。

EUの規定では、めん羊、山羊、馬の洗浄後冷却前の枝肉の切除法であるが、一般生菌数の優良レベルは3.5 log 個/㎠未満、許容レベルは3.5～5.0 log 個/㎠、不適合レベルは5.0 log 個/㎠を超える値である。今回は、スワブ法であり、単純に比較はできないが、今回のめん羊、山羊、馬のスワブ法の成績はEUの規定の許容レベル範囲内であった。それらの腸内細菌科菌群の優良レベルは1.5 log 個/㎠未満、許容レベルは 1.5～2.5 log 個/㎠、不適合レベルは2.5 log 個/㎠(316個/㎠)を超える値である。スワブ法と切除法、大腸菌群と腸内細菌科菌群の違いはあるが、今回のめん羊と山羊のスワブ法の成績はEUの規定の許容レベルにあったが、馬は洗浄前の枝肉であるが不適合レベルに該当する値を示すものが認められた。統一的な検

査法や検体採取を実施する場所を設定する必要があるかもしれない。

大腸菌数はめん羊枝肉において 33/262 検体(12.6%)から、馬枝肉は 4/24 検体(58.3%)から分離されることから、さらに検査データを蓄積する必要があると思われた。

２.めん羊枝肉表面の切除法による細菌汚染状況調査

1 つのめん羊枝肉の細菌検査結果であったが、と畜検査終了し、冷蔵庫に入る前のめん羊枝肉の表面の細菌汚染状況について調査したところ、汚染が多い部位と少ない部位が存在した。検体 27（右肘部内側）は調査した 30 カ所のなかで一般生菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌群、大腸菌数ともに最高値を示した、また、大腸菌が検出された 9 カ所は臀部[検体 2(臀部前)、検体 15(後大腿部右側)]と胸部から頸部[検体 5(脇部前)、検体 14(胸部右側)、検体 22(後胸部右側)、検体 23(後肩部右側)、検体 26(前頸部右側)、検体 25(頸部右側)、検体 27(右肘部内側)]であった。

本と畜場のめん羊の処理においては、大腸菌が検出された部位については、ゼロトレランス検証（目視できる糞便、消化管内容物、乳房内容物に汚染されていないことを検証すること）をより慎重に実施するとともに、枝肉の消毒工程を加える必要であると思われた.

今回は枝肉からは STEC,カンピロバクター、サルモネラは未検出であったが、これらの細菌の本来の住処（レゼルボア）は腸管内であることから、搬入されるめん羊の糞便を検査し、保菌率などを把握しておくことは重要であると思われた。

めん羊枝肉の流通は限定されていることが多く、トレーサビリティは容易にできていると思われる。また、処理頭数も豚や牛に比べて少ない。これらのことから、各自のと畜場で処理される枝肉の汚染状況を把握し、必要に応じて枝肉の消毒を実施することを作業工程に加える等、と畜場に助言することが必要と思われた。

３．スワブ法に代わると畜場内牛枝肉および豚枝肉の内部検証法の検討

A と畜場牛枝肉：切除法とふき取り法との一般細菌数の平均値の差は約 2 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.3919 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、ふき取りでも良いかもしれない。切除法とスタンプ法との一般細菌数の平均値の差は約 20 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.297 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、スタンプでも良いかもしれない。

B と畜場牛枝肉：切除法とふき取り法との一般細菌数の平均値の差は約 4 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.1202 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、ふき取りでも良いかもしれない。切除法とスタンプ法との一般細菌数の平均値の差は約 200 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.3743 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、スタンプでも良いかもしれない。切除法とふき取り法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 5 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.1285 で、関連性は少ないと思われた。切除法とスタンプ法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 20 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.0115 で、関連性は少なかった。

A と畜場豚枝肉：切除法とふき取り法との一般細菌数の平均値の差は約 7 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.0584 で、関連性は少ない。切除法とスタンプ法との一般細菌数の平均値の差は約 110 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.1159 で、関連性は少なかった。切除法とふき取り法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 6 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.0004 で、関連性は少なかった。切除法とスタンプ法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 24 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.0098 で関連性は少なかった。

B と畜場豚枝肉：切除法とふき取り法との一般細菌数の平均値の差は約 1.3 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.283 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、ふき取りでも良いかもしれない。切除法とスタン

プ法との一般細菌数の平均値の差は約 565 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.3079 で関連性は少ないが、例数を重ねることでと畜場の衛生管理を把握する内部検証としては、ふき取りでも良いかもしれない。切除法とふき取り法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 7 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.1984 で、関連性は少なかった。切除法とスタンプ法との腸内細菌科菌群数の平均値の差は約 40 倍あり、切除法が高値であった。回帰直線の決定係数は 0.0563 で、関連性は少ないと思われた。

切除法とふき取り法、切除法とスタンプ法の一般細菌数、腸内細菌科菌群数で平均値の差が、と畜場ごとに異なってた。これはと畜方法や検体採取場所の枝肉の状況（水分量）等によって変わるものと思われた。

EU 規定で最良レベルを示している、衛生的な牛枝肉を生産していると畜場では、スタンプの一般細菌数を用いること、スタンプやふき取りでの腸内細菌科菌群陰性を確認することで、牛枝肉の細菌検査の内部検証が可能かもしれない。

B と畜場は湯剥ぎ方式の処理であり、EU 規定では最良レベルの衛生的な豚枝肉を生産している。ふき取り法およびスタンプの一般細菌数を用いることで豚枝肉の細菌検査の内部検証が可能かもしれない。

４．生産農家ごとの和牛の体表の STEC 0157・026 の汚染状況

GI-1 施設の黒毛和種牛体表の拭取り検体の 0157 の陽性率は 8.1%(15/185 検体)、026 の陽性率は 2.7%(5/185 検体)であった。別途、本調査期間と同じ時期に実施した盲腸内容物から分離した STEC 検査では、STEC の分離率は 16.7%(15/90 検体)、STEC 0157 の分離率は 15.6%(14/90 検体)、STEC 026 の分離率は 1.1%(1/90 検体)であった。黒毛和種牛の体表の STEC 0157 の拭取り検査結果(8.1%)と別途実施した盲腸内容物の検査結果(15.6%)の有意差は認められなかった。体表の STEC 026 の拭取り検査結果(2.7%)と盲腸内容物の検査結果(1.1%)の有意差は認められなかった。糞便中に保菌していると体表にも同様に付着していることが判明した。

農家ごとの保有率の違いは、6 ヶ月連続で陰性の農家 B、4 回のうち 2 回陽性の農家 A、2 回中 2 回連続陽性になった農家 BO といった農家もあることから、保有状況は農家ごとに異なっていることが判明した。また、陽性となった農家も採取した月によっては陰性となること、農家 B と農家 G は以前の調査で STEC が検出された農家であるが、今年度は全て陰性であったことから、と畜日により搬入される牛の STEC 保有状況も異なっていると考えられた。一方、7 月の農家 W と農家 AY、9 月の農家 A、農家 X、農家 BJ は同じ運搬車で搬入されることが多い農家であり、係留所でも隣に繋がれていたことから、運搬車又は係留所での交差汚染の可能性を疑った。しかし、5 月に農家 A は陽性であり、同じ運搬車での搬入が多い農家 X、農家 Z は陰性であったこと、10 月に陽性であった農家 BO と同じ運搬車で搬入されている農家 C は陰性であったことから、運搬車内での交差汚染は頻度としては高くないと推測される。また、係留所での交差汚染が原因であるならば、陽性農家数はさらに多くなりうるため、この可能性も低いと考えられた。

現時点での STEC 検査のロット設定は「同一農家かつ同一と畜解体作業日の枝肉群を 1 ロットとする」ことが妥当であると考える。しかし、農家により採取回数の違いがあることから、今後もデータを蓄積していく必要がある。

培養法で陽性となったものは、スクリーニング検査でも陽性となったものであり、導入した PCR 装置でスクリーニング検査陽性のものを菌分離したときと培養法で実施した場合とで、検出率の違いは無かった。コストと時間の面からも VT 遺伝子の PCR 検査を行わず、最初から O 抗原遺伝子検査をし、陽性であった検体のみ分離培養に進むのが効率的であると思われた。

５．黒毛和種牛の体表の汚染状況の把握

衛生的な枝肉を生産するための一助として、黒毛和種牛の体表の汚染状況検査を実施した。

黒毛和種牛は高率に *C. jejuni* を、20%(1/5 頭)は STEC を保菌していた。よって、糞便が枝肉表面に付着することは、これらの病原菌に汚染される可能性があるので、ゼロトレランス（目に見える糞便、腸内容物をトリミングすること）が有効であることが再確認された。

今回、黒毛和種牛体表を、フードスタンプ生菌数用・標準寒天を 600-700 g 圧で 10 秒間押

し当てる採取法（フードスタンプ法）を実施した。5 頭の体表検体、計 75 検体からカンピロバクター、STEC、サルモネラを体表から分離できなかった。 体表を採取する方法としては簡易な方法であったが、検出限界値に問題があるかもしれない。

フードスタンプ法を用いた体表の検査においても、一般細菌は 4.18 log 個/㎠、腸内細菌科菌群は 1.62 log 個/㎠、大腸菌群は 0.90 log 個/㎠、大腸菌数は 0.79 log 個/㎠が検出された。また、今回の調査では、一般細菌数では⑥胸部正中、⑦腹部正中、⑧踝外側左が多かった。大腸菌群数および大腸菌数も⑥胸部正中が最も高値を示した。正中はと畜処理では必ず刀を入れる部位である。よって、と畜処理においては、体表は高度に汚染しているものと理解し、特に正中に刀を入れるときには、消毒したナイフの刃を手前に向け、皮を内側から外側に切開することが、食品衛生学的に有効であると思われた。

６．枝肉に付着する異物による微生物汚染実態と菌叢解析

本調査において、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は、獣毛、糞便及び消化管内容物それぞれの間で差がなく、同等の汚染があることが細菌学的に示された。

レールダスト及びフットカッター汚れは、両者とも腸内細菌科菌群数は検出限界値以下であり、一般細菌数は差がなかった。これらは最終洗浄後の枝肉の微生物汚染状況にただちに影響をあたえるものではないが異物であり付着させないことが重要であると思われた。

獣毛検体は *Proteobacteria* 門，消化管内容物は *Firmicutes* 門の構成比率が多く，糞便は両者の中間のような菌叢であった. 消化管内容物は *Firmicutes* 門の構成比率が高いことは，第一胃内容を調査した報告と一致しており，異物同定のうち糞便による汚染か消化管内容物による汚染かの判断は正しいものと思われた. レールダスト及びフットカッター汚れ検体は *Proteobacteria* 門が多い傾向があった. 付着する異物の種類ごとに菌叢も異なることが判明した.

と畜におけるゼロトレランスは多くの国で取り入れられている手法である. GI-1 施設では，各工程において，枝肉をよく観察し，糞便，消化管内容物及び乳房内容物に加え，獣毛等の異物の付着が認められた場合もトリミングをすることとしている. 本調査により，枝肉に付着した異物ごとの細菌学的な汚染状況が把握できた. そして，ゼロトレランスが食肉衛生上，大変重要であることが科学的に証明できたと思われる.

Ｅ．結論

1. 食肉衛生検査所で実施されためん羊、山羊、馬の糞便、枝肉拭き取り検査集計

めん羊、山羊、馬は牛や豚のと畜頭数に比べて少なく、細菌検査成績を得ている検査所は少ない。めん羊はサルモネラや STEC を約 3 割保菌していることが判明した。しかし、保有しているサルモネラや STEC は患者から分離される血清型とは異なることが判明した。現在、実施している検査法はスワブ法であった。

２. めん羊枝肉表面の切除法による細菌汚染状況調査

切除法による我が国のめん羊枝肉の成績が初めて示された。めん羊の枝肉表面の部位ごとに細菌汚染が異なることが判明した。と畜場ごとに枝肉表面汚染の程度は異なると思われることから、と畜場ごとに汚染箇所を把握し、その汚染箇所のゼロトレランス検証をより慎重に実施することが必要と思われた。また、必要に応じて枝肉の消毒を実施することを作業工程に加える等、と畜場に助言することが必要と思われた。

３．スワブ法に代わると畜場内牛枝肉および豚枝肉の内部検証法の検討

切除法は、ふき取り法にくらべて、一般細菌数、腸内細菌科菌群数ともに、常に高値を示していた。EU 規定で最良レベルの衛生的な牛枝肉・豚枝肉を生産していると畜場では、スタンプの一般細菌数を用いること、または、スタンプやふき取りでの腸内細菌科菌群陰性を確認することで、牛枝肉・豚枝肉の細菌検査の内部検証が可能かもしれないことが判明した。

４. 生産農家ごとの和牛の体表の STEC O157・O26 の汚染状況

GI-1 施設に搬入された黒毛和種牛の体表の STEC O157 の拭取り検査結果(8.1％：15/185 検体)と別途実施した盲腸内容物の検査結果

(15.6%:14/90 検体)の有意差は認められなかった。体表の STEC O26 の拭取り検査結果(2.7%:5/185 検体)と盲腸内容物の検査結果(1.1%:1/90 検体)の有意差は認められなかった。黒毛和種牛の STEC 保有状況は農家ごと、そして、と畜日により搬入される牛の STEC 保有状況も異なっていた。現時点での STEC 検査のロット設定は「同一農家かつ同一と畜解体作業日の枝肉群を 1 ロットとする」ことが妥当であると考えられた。運搬の車両内や係留所内での交差汚染の可能性も低いと考えられた。スクリーニング検査のリアルタイム PCR 検査は VT 遺伝子ではなく、O 抗原遺伝子検査を実施し、陽性であった検体のみ分離培養に進むのが効率的であることが判明した。

５．黒毛和種牛の体表の汚染状況の把握

黒毛和種牛は、糞便から高率に *C. jejuni* が、20%から STEC を保菌していることから、糞便が枝肉に付着しないようにと畜処理し、付着した場合は、その個所をトリミングすることにより汚染を除去することが食肉衛生学的に重要である。

と畜処理においては、体表は高度に汚染しているものと理解し、獣毛等による汚染を防ぐため、必要な最小限度の切開をした後、ナイフを消毒し、ナイフの刃を手前に向け、皮を内側から外側に切開する操作が衛生的に重要であり、特に正中に刀を入れるときは、消毒したナイフの刃を手前に向け、皮を内側から外側に切開することが、食肉衛生学的に有効であると思われた。

６．枝肉に付着する異物による微生物汚染実態と菌叢解析

ゼロトレランス検証に示されている糞便、消化管内容物だけでなく、獣毛からも糞便や消化管内容物と同程度の一般細菌数や腸内細菌科菌群数が検出されることからゼロトレランス検証に加え、獣毛についても、体表に付着していた場合は、トリミングすることが必要であると思われた。また、菌叢解析の結果から、肉眼で実施されているゼロトレランス検証においても、糞便、消化管内容物は的確に判断されていると思われた。ゼロトレランス検証を実施することは食肉衛生上, 大変重要であることが確認された.

Ｆ．健康危険情報

特になし。

Ｇ．研究発表

１．論文発表

塚本真由美、苅谷俊宏、山﨑翔矢、小畑　麗、向島幸司、村瀬繁樹，朝倉　宏，森田幸雄. 2023 年 3 月. 黒毛和種牛枝肉表面に付着する異物の細菌学的汚染状況，日本獣医師会雑誌, 76,e11-e17.

２．学会発表等

1) 山﨑翔矢、池田　晃、松岡和代、小畑　麗、苅谷俊宏、向島幸司、塚本真由美、村瀬繁樹、令和３年度　岐阜県食肉衛生検査技術研修会、令和４年３月新型コロナウイルスの流行により書面開催、35 名、岐阜県中央食肉衛生検査所、「令和３年度生産農家ごとの牛の志賀毒素産生性Ｏ157 保有状況調査」
2) 塚本真由美、苅谷俊宏、山﨑翔矢、小畑　麗、向島幸司、村瀬繁樹、令和３年度食肉及び食鳥肉衛生研究発表会、令和 4 年 1 月 15 日～31 日、厚生労働省（東京都千代田区）、一般演題（Web）、「枝肉に付着する異物による微生物汚染実態調査」
3) 森田幸雄、岡谷友三アレシャンドレ、中込就子、佐藤妃恵、小林光士、塚本真由美、朝倉宏、第 164 回日本獣医学会学術集会、令和 3 年 9 月 4 日～6 日、酪農学園大学、一般演題、「黒毛和種牛の体表の汚染状況」
4) 森田幸雄、岡谷友三アレシャンドレ、成田静香、菊池貴子、原　理洋、三好　円、花田　博、黒木重孝、奈須正知、馬場俊行、下郷晶子、第 165 回日本獣医学会学術集会、令和 4 年 9 月 6 日～8 日、麻布大学、一般演題、「ふき取りに代わると畜場内枝肉、市販牛肉・豚肉の内部検証法の検討」

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和２－４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）
「と畜・食鳥処理場における HACCP 検証方法の確立と
食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究」
分担総合研究報告書

馬とたいに対するHACCP外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究

研究分担者　朝倉　宏　　国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者　伊豆一郎　　熊本県食肉衛生検査所
　　坂上友康　　青森県十和田食肉衛生検査所

研究要旨：国内のと畜場では、令和３年６月より HACCP に基づく衛生管理が本格施行されている。厚生労働省による HACCP 外部検証に係る通知別添で示される微生物試験では牛及び豚とたいが対象として例示されているが、と畜場で処理される獣畜にはめん羊、山羊、馬も含まれる。本分担研究では、馬とたいを対象とした微生物試験の実施にあたり、適切な採材箇所の選定に係る根拠を集積することを目的として検討を進めた。3 施設で処理された計 21 頭の馬とたいを対象に枝肉 3 部位の衛生指標菌分布を解析したところ、胸部または腹部で「平均+2SD 値」を超過した検体が確認され、馬とたいの解体処理工程における HACCP 外部検証を進める上で、これらの部位を採材箇所として微生物試験を行うことが妥当と判断される知見を得た。また、菌叢解析の結果より馬枝肉表面から検出された細菌として、腸内細菌科菌群の占有率は総じて低い一方、土壌由来細菌が多くを占めたことから、当該獣畜の解体処理にあたっては、特に体表からの交叉汚染を重点的に管理する必要性が示唆された。

Ａ. 研究目的

平成30年に公布された「食品衛生法等の一部を改正する法律」を受け、国内のと畜場及び大規模食鳥処理場ではHACCPに基づく衛生管理が求められることとなった。その後、令和２年５月28日には、厚生労働省より、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（生食発0528第1号、生活衛生・食品安全審議官通知）が発出され、各自治体の食鳥検査員は大規模食鳥処理場における「HACCPに基づく衛生管理」の状況を検証することが技術的助言として示された。同通知ではと畜検査員が実施する微生物試験法も示されているが、その対象としては牛及び豚とたいが例示されている状況であった。一方、周知のとおり、と畜場では、牛及び豚のほか、馬やめん羊、山羊等も解体処理されており、これらを取り扱う施設におけるHACCP外部検証微生物試験の在り方として、牛豚と同様でよいかを明示する根拠が見当たらない状況にあった。昨年度は、めん羊及び山羊とたいを対象とした検討を進めたことを受け、本年度は、馬とたいを対象とした微生物試験を行う際に、採材対象とすべき箇

所の選定に係る知見を収集することを目的として検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. と畜場における処理工程等の情報収集

馬を解体処理すると畜場 3 施設の協力を得て、工程フローを書面及び実地にて確認した。

2. 微生物試験

冷却前の馬とたいについて、豪州の関連ガイドラインに示される S1（胸部）、S2（腹部）、及び S3（臀部）の 3 部位について、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（生食発 0528 第 1 号、生活衛生・食品安全審議官通知）で示される切除法により採材を行い、切除片 1 cm^2 あたりの一般生菌数及び腸内細菌科菌群数をそれぞれ求めた。

また、施設 A 及び B では馬とたい関連検体と同一個体の馬糞便検体を同時に採材し、冷凍状態で弊所に輸送し、後述の菌叢解析に供した。

3. 統計解析

採材部位・指標菌の別に、得られた菌数成績より、「平均+2SD 値」及び「80 パーセンタイル値」を求めた。

4. 菌叢解析

上項 2.で微生物試験を行った際の検体懸濁液を遠心分離し、得られた沈渣より total DNA を抽出した。これを鋳型として、PCR により 16S rRNA V5-V6 領域を増幅し、Ion CHEF/Ion Torrent PGM を用いた菌叢解析に供した。取得配列から、不要配列を除去後、RDP classifier pipeline を用いて階層分類を行った。

C. 研究結果

1. 馬とたいの解体処理工程フロー

3 施設（A-C）における馬とたいの解体処理工程フローを確認し、聴取された情報を基に工程フロー概略図を作成した。

施設 A 及び B で処理された馬とたいの多くは、生食用馬肉製品として加工される状況であった。一方、施設 C で処理された馬とたいは加熱用馬肉として加工されていた。

上述の背景との関連性は定かではないものの、枝肉が交叉汚染を受けた場合の措置として、施設 A 及び C ではトリミング、施設 B では火炎焼烙殺菌を行う体制にあった。

施設 B は馬のみを取り扱う施設であったのに対し、施設 A 及び C は牛も処理していた。但し、牛の解体処理とは時間帯で区分化を行う運用体制にあった。

各施設の管理基準を設定している工程を確認したところ、いずれの施設も冷却工程で用いる冷蔵庫内温度及び冷却保持時間を採用していた。このうち、施設 C では冷却工程で用いる冷蔵庫の庫内温度（10°C以下）及び冷却時間（10 時間以上）を管理基準とし、そのモニタリングは自記温度記録計を用いた 1 時間ごとの記録取得、作業前後に工程担当者による目視での表示温度確認、最後の枝肉を入庫した時間と次の稼働日の最初の枝肉出庫時間の確認及び記録等で運用を行っていた。

2. 馬とたいにおける衛生指標菌検出結果

施設 A では 6 頭・18 検体、施設 B では 9 頭・27 検体、施設 C では 6 頭・18 検体の馬枝肉を対象として、冷蔵庫入庫前段階で、3 部位の衛生指標菌検出状況を解析した。結果として、施設 A の馬枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差値は S1（胸部）、

S2（腹部）、S3（臀部）でそれぞれ 1.41±0.21 log CFU/cm^2、2.04±1.23 log CFU/cm^2、2.66±0.59 log CFU/cm^2、腸内細菌科菌群数の同値は S1 が 0.81±0.31log CFU/cm^2、S3 が 0.71±0.24 log CFU/cm^2 であった。なお、S2 は全 6 検体で検出限界未満を示した。

施設 B の馬枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差値は S1、S2、S3 でそれぞれ 0.93±0.42 log CFU/cm^2、0.97±0.51 log CFU/cm^2、0.74±0.26 log CFU/cm^2 であった。なお、同施設由来検体における腸内細菌科菌群は全て検出限界未満であった。

施設 C の馬枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差値は S1（胸部）、S2（腹部）、S3（臀部）でそれぞれ 3.16±0.77 log CFU/cm^2、2.41±0.72 log CFU/cm^2、3.07±1.37 log CFU/cm^2 であったほか、各部位の腸内細菌科菌群数は 0.72±0.36 log CFU/cm^2、0.71±0.51 log CFU/cm^2、1.02±0.71 log CFU/cm^2 であった。

衛生指標菌検出結果の評価にあたり、厚生労働省及び米国 USDA FSIS が参考値として例示する「平均+2SD」、及び欧州で解析指標として例示する「80 パーセンタイル値」を施設別・指標菌の別に求めたところ、一般細菌数の両値は施設 A 由来検体では、S1 が 1.81 log CFU/cm^2 及び 1.61 CFU/cm^2、S2 が 4.29 log CFU/cm^2 及び 2.71 log CFU/cm^2、S3 が 3.78 log CFU/cm^2 及び 3.13 log CFU/cm^2 であった。これらのうち、「平均+2SD 値」を超過した検体は S2 で 1 検体のみが認められた一方、「80 パーセンタイル値」を超過した検体は S1、S2、S3 で各 1 検体認められた。同様に、腸内細菌科菌群数に関する両値は S1 が 1.39 log CFU/cm^2 及び 1.21 CFU/cm^2、S2 が 0.62 log CFU/cm^2 及び 0.61 log CFU/cm^2、S3 が 1.17 log CFU/cm^2 及び 0.80 log CFU/cm^2 であった。これらのうち、「平均+2SD 値」を超過した検体は S3 で 1 検体のみを認めたが、「80 パーセンタイル値」を超過した検体は S1 及び S3 で各 1 検体であった。

施設 B 由来検体における一般生菌数の「平均+2SD 値」及び「80 パーセンタイル値」はそれぞれ S1 が 1.69 log CFU/cm^2 及び 1.25 CFU/cm^2、S2 が 1.90 log CFU/cm^2 及び 1.22 log CFU/cm^2、S3 が 1.24 log CFU/cm^2 及び 1.02 log CFU/cm^2 であった。これらのうち、「平均+2SD 値」を超過した検体は S1 及び S2 で 1 検体認められたほか、「80 パーセンタイル値」を超過した検体は S1、S2、S3 で各 2 検体認められた。

施設 C 由来検体における一般生菌数の「平均+2SD 値」及び「80 パーセンタイル値」はそれぞれ S1 が 4.70 log CFU/cm^2 及び 3.96 CFU/cm^2、S2 が 3.85 log CFU/cm^2 及び 2.85 log CFU/cm^2、S3 が 5.81 log CFU/cm^2 及び 4.23 log CFU/cm^2 であった。これらのうち、「平均+2SD 値」を超過した検体は認められなかったが、「80 パーセンタイル値」を超過した検体は S1、S2、S3 で各 1 検体認められた。同様に腸内細菌科菌群数に関する両値は S1 が 1.44 log CFU/cm^2 及び 1.10 log CFU/cm^2、S2 が 1.73 log CFU/cm^2 及び 0.88 log CFU/cm^2、S3 が 2.44 log CFU/cm^2 及び 1.61 log CFU/cm^2 であった。これらのうち、「平均+2SD 値」を超過した検体は S2 で 1 検体、「80 パーセンタイル値」を超過した検体は S1、S2、S3 で各 1 検体認められた。

なお、全体の「平均+2SD 値」及び「80パーセンタイル値」は一般生菌数がそれぞれ 4.06 log CFU/cm^2 及び 2.85 log CFU/cm^2 であり、「平均+2SD 値」を超過した検体は施設 A の 1 検体と施設 C の 3 検体であった。また、腸内細菌科菌群数については、それぞれの値が 1.33 log CFU/cm^2 及び 0.62 log CFU/cm^2 であり、「平均+2SD 値」を超過した検体は施設 C の 2 検体であった。

3. 馬枝肉切除検体の菌叢解析結果

馬枝肉切除検体では、牛に比べて相対的に低い腸内細菌科菌群数であったことから、当該検体の構成菌叢探知に向け、16S rRNA 菌叢解析を行った。

全体を通じ、最も優勢であった菌群は、*Oxalobacteriaceae* であり、最も高い占有率を示した検体では 90%を超過した。同科内の構成を確認したところ、*Telluria* 属及び *Naxibacter* 属等の土壌由来菌が占める割合が高い状況であった。一方、腸内細菌科菌群の占有率は総じて低く、同菌群の構成菌属を確認したところ、*Enterobacter* 属及び *Yokonella* 属が最も高頻度に検出され、*Cedecea* 属がこれに続いた。腸内細菌科菌群に属し、牛肉の危害要因の一つとされる *Salmonella*属は認められなかった。なお、部位別では S1（胸部）の検体が最も菌叢多様性に富んでいた。

4. 馬糞便検体の菌叢解析結果

馬枝肉切除検体での腸内細菌科菌群の低い占有率が示されたことを踏まえ、次に馬糞便検体を対象とした菌叢解析を実施した。結果として、馬糞便検体では *Clostridiaceae*、*Ruminococcaceae* 等が占める割合が高く、*Oxalobacteriaceae* や *Enterobacteriaceae* の占有率は総じて低い値を示し、馬枝肉検体とは大きく異なる菌叢構成であることが確認された。

D. 考察

本研究ではと畜場で解体処理を受ける馬を対象とした際の HACCP 外部検証微生物試験の円滑な実施に向け、牛豚を対象とする既出試験法の適用可能性を、特に採材部位選定に係る知見の創出を図ることを主たる目的として検討を進めた。

計 3 施設の処理工程を踏まえた上で行った微生物試験成績を基に、「平均+2SD 値」を超過した検体の採材部位を確認した結果、S1（胸部）または S2（腹部）が該当したことから、これらの部位を採材箇所として設定することが、馬とたいの工程管理の適切性を判断するための微生物試験成績の集積を図る上で有用と考えられた。

また、本研究では、腸内細菌科菌群が施設 B 由来検体ではいずれも不検出であったことから、菌叢解析を進め、結果として腸内細菌科菌群の占める割合が牛等に比べて極めて少ない状況にあることが確認された。次いで行った馬糞便検体における菌叢解析結果からも、腸内細菌科菌群の占有率は低い状況にあった。これらの知見は、腸内細菌科菌群に属するサルモネラ属菌や病原大腸菌を馬の解体処理工程における危害要因として想定する意義が低いようにも思われるが、欧米では馬肉を介したサルモネラ食中毒事例が報告されていること（Epidemiol. Infect. 2005. 133:373-376.等）を踏まえると、そのおそれを否定できる状況にはなく、従って馬とたいの HACCP 外部検証を行う上では牛豚と同様に、腸内細

菌科菌群試験を含めることが妥当と考えられた。

また、菌叢解析結果からは土壌由来細菌が馬枝肉における構成菌叢となっている状況が確認された。このことは腸管内容物に加え、体表から枝肉への交叉汚染を管理するための対策を講じることで衛生管理上の更なる向上に繋がる可能性を示唆していると考えられる。今後、馬体表における菌叢解析や指標菌定量試験を行う事で外皮の衛生的取り扱いが馬とたいの解体処理工程における衛生管理の向上に資する可能性を指し示す事が可能となるものと期待される。

E. 結論

と畜場 3 施設で処理される馬とたいを対象とした衛生指標菌定量試験を実施し、「平均+2SD 値」の超過を指し示す検体の採材部位としては胸部または腹部であったことから、これらを採材部位として微生物試験に供することで馬の解体処理工程における衛生管理の検証を合理的に行えると考えられる知見を得た。また、馬枝肉における構成菌叢として腸内細菌科菌群が占める割合は牛等に比べて低く、対して土壌由来細菌が多くを占める結果が得られたことから、体表から枝肉への細菌汚染が対象施設での衛生確保に重要な意義を示すと推察された。引き続き、その検証を行っていきたい。

F.　研究発表

論文発表

1. Asakura H, Yamamoto S, Sasaki Y, Okada Y, Katabami, Fujimori A, Munakata K, Shiraki Y, Nishibu H, Hisamoto C, Kawase J, Ojima Y, Kiyoshima A, Shiroma K. (2022) Bacterial distribution and community structure in beef cattle liver and bile at slaughter. J. Food Prot. 85:424-34.

学会発表

1. 朝倉宏、山本詩織、吉冨真理、中馬猛久、森田幸雄. 馬とたいに対するHACCP 外部検証微生物試験法の設定に向けた検討. 第 42 回日本食品微生物学会学術総会.

G.　知的財産権の出願・登録状況

該当なし

令和 2-4 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）
と畜・食鳥処理場における HACCP 検証方法の確立と
食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究

総合分担研究報告書
外部検証プロトコルの妥当性評価に関する研究

研究分担者	大屋　賢司	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者*	平本　裕子、里麻　美喜子	富山県食肉衛生検査所
	土屋　健次、楓　龍治	岐阜県中央食肉衛生検査所
	岩城　多佳子、安藤　瑞恵	三重県松阪食肉衛生検査所

(*研究実施期間における所属)

研究要旨

本研究では、と畜場において実施している HACCP 外部検証法を、科学的根拠を伴った形で検証することを目的とし３つに大別される調査及び検証を行った。１）牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と病原細菌検出状況の調査では、STEC に高度に汚染された農場から搬入される検体を解析した。２）豚及び牛と体の外皮拭き取り検体と枝肉切除検体における衛生指標菌数及び病原細菌検出状況の評価では、豚及び牛と体外皮拭き取り検体と外部検証用切除検体を対象として衛生指標菌と病原菌由来遺伝子検出状況との関連を探索し、牛外皮では一般細菌数が 5 log cfu/cm^2 以上、腸内細菌科菌群数が 2 log cfu/cm^2 以上を示した検体では腸管出血性大腸菌関連遺伝子が検出される状況が確認された。２）の結果を踏まえ実施した３）豚と体及び牛と体の解体工程における衛生指標菌と病原菌関連遺伝子検出状況の評価では、豚と体及び牛と体の解体工程における「剥皮前」と剥皮後の「枝肉」工程間の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は剥皮後に大きく減少し病原菌関連遺伝子陽性率も「0」になることが明らかとなった。以上により、対象施設の豚と体及び牛と体解体工程では、剥皮前後の工程における衛生管理が重要であることが示された。

A．研究目的

国産食肉・食鳥肉の輸出が拡大され輸出を行うと畜場･食鳥処理場数が増加傾向にある中、我が国の食肉･食鳥肉の安全性を国際標準的に示すことは極めて重要である。本研究では、と畜場において実施しているHACCP外部検証法を、科学的根拠を伴った形で検証することを目的とした。

令和2年度には、特定の農場の牛と体拭き取り検体における衛生指標菌数と腸管出血性大腸菌(STEC)、サルモネラ属菌検出状況を検討した。

令和3年度から4年度には、複数のと畜上で豚及び牛と体の外皮拭き取り検体と枝肉切除検体における衛生指標菌数及び病原細菌(STEC及びサルモネラ属菌)検出状況を指標として外部検証プロトコルの実効性を評価した。

令和4年度には、上述の成果を踏まえ、剥皮前後の工程における衛生管理の重要性について、「剥皮前」と剥皮後の「枝肉」工程間の衛生指標菌数の推移と病原細菌関連遺伝子検出状況を指標に評価した。

B.研究方法

（1）牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と病原細菌検出状況の調査

1）検体

東海地方の5農場から食肉衛生検査所に搬入された牛と体外皮拭き取り検体12検体を対象とした。採材後の検体は冷蔵便にて搬入され、通知（生食発0528第1号）「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」に従い、採材後48時間以内に試験に供した。

2）衛生指標菌の検査

滅菌PBSを用いて、送付された検体の10倍階段希釈系列を作製し、通知(生食発0528第1号)「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」に従い、検体中の生菌数及び腸内細菌科菌群数を混釈法にて計測した。一般生菌数は、検体希釈液を混釈した標準寒天培地を37℃、48±3時間培養し、生育したコロニー数を計測し算出した。腸内細菌科菌群数は、検体希釈液を混釈したViolet Red Bile Glucose寒天培地（VRBG、OXOID）を37℃、24±2時間培養し、生育したコロニー数を計測した。オキシダーゼ試験及び糖発酵試験にて腸内細菌科菌群の確認試験を行い、腸内細菌科菌群数を算出した。

3）サルモネラ属菌の検査

検体中のサルモネラ属菌は、

ISO6579-1 に従い分離培養を行った。送付された検体を 9 倍量の緩衝ペプトン水 (BPW)に加え、37℃、18±2 時間、前増菌培養を行った。さらに、Rappaport Vassiliadis 培地（RVS）及び Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin 培地（MKTTn）を用いて選択増菌培養を行った。RVS 培地に接種した検体は 42℃、24±3 時間、MKTTn 培地に接種した検体は 37℃、24±3 時間培養した。選択分離培養として、選択増菌培養液を Xylose Lysine Deoxycholate 寒天培地（XLD、関東化学)及びクロモアガーサルモネラ寒天培地に画線塗抹し 37℃、24±3 時間培養した。

４）腸管出血性大腸菌の検査

検体中の腸管出血性大腸菌(STEC)は、ISO/TS13136 に従いスクリーニング及び分離培養を行った。送付された検体を 9 倍量のノボビオシン加 mTSB 培地に加え 37℃、18 から 24 時間増菌培養を行った。増菌培養液からアルカリ熱抽出法により DNA を調製し、*stx* 及び *eae* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR によるスクリーニングを行った。*stx* 及び *eae* どちらも陽性となった検体は、STEC 主要 7 血清群の O 抗原遺伝子を標的としたリアルタイム PCR に供した。いずれかの血清群に陽性を示した検体は、陽性となった血清群の免疫磁気ビーズを用いて増菌培養液中の STEC を濃縮し、選択分離培養を行った。7 血清群の免疫磁気ビーズは、デンカ株式会社のものを用いた。選択分離培養には Tryptone Bile X‐glucuronide 寒天（TBX）及びクロモアガーSTEC 寒天培地を用い、免疫磁気ビーズ濃縮液を塗抹し 37℃、18 から 24 時間培養した。選択分離培地上に生育した STEC が疑われるコロニーは、*stx* を標的としたリアルタイム PCR、O 抗原に対する血清を用いた凝集試験及び Triple Sugar Iron（TSI）培地、Lysine Indole Motility（LIM）培地を用いた生化学性状試験により確認試験を行った。

５）腸管出血性大腸菌の性状解析

STEC と同定された菌株は、病原大腸菌免疫血清「生研」の H 血清を用いた試験管凝集法により H 型を決定した。分離された STEC 菌株の関連性は、腸管出血性大腸菌 MLVA ハンドブック（2018 年 11 月編、地研協議会 保健情報疫学部会 マニュアル作成 WG 編）に従い、反復配列多型解析法（MLVA）を行い解析した。

６）衛生指標菌数と STEC 分離状況の関連性の解析

検体を STEC の分離陽性及び陰性

の２群に分類し、衛生指標菌数を比較した。2群間の差の検定は、Welch法により行った。統計解析及び、蜂群図・箱ひげ図によるデータの可視化は統計解析システム・環境R(ver 4.0.4) を用いて行った。

（２)豚及び牛と体の外皮拭き取り検体と枝肉切除検体における衛生指標菌数及び病原細菌検出状況の評価

１）検体

北陸～東海地方の 3 食肉衛生検査所の協力を得て、管轄すると畜場に搬入された豚及び牛の外部検証用検体の残余検体及び外部検証用検体と同一個体(もしくは同一農場)の外皮拭き取り検体について、令和3年9月～令和4年2月までの6ヶ月間に各月 5 検体ずつの提供を受けた。外部検証の残余検体は、通知法で示される方法（切除法）で採材され、前調整された検体懸濁液として提供を受けた。更に、外皮の拭き取り検体として、以下のように採材された検体の提供を受けた。採材部位を 100 cm^2 の拭き取り検査枠（CRF-1010)及び拭き取りスポンジ（ふき取り用ドライスポンジスティック SSL100) を用いて 300 g/cm^2 以上の圧をかけながら、30秒間縦、横、斜め（左右）の順に各 10 回拭き取りを行った。外部検証残余検体の懸濁液及び拭き取り後のスポンジは、冷蔵便で国立医薬品食品衛生研究所へ送付し、採材後 48 時間以内に試験に供した。

２）衛生指標菌の試験

検体中の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は、通知法に従い、B.（１）２）と同様に調製した 10 倍階段希釈系列を、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の定量試験性能が、ISO 法と同等であると国際的な第三者認証機関において確認された代替法を用いて測定した。一般細菌数の計測には AC プレート及び腸内細菌科菌群数の計測には EB プレートを用い、製造事業者が定める方法に従って試験を実施した。切除法により採材された外部検証用検体（枝肉）における衛生指標菌の計測結果は、各施設から提供を受けた。

３）サルモネラ属菌の試験

検体中のサルモネラ属菌は、B.（１）３)と同様の方法で試験した。また、培養法と平行して、前増菌培養液からアルカリ熱抽出法により調製した DNA を用いた、*invA* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR を補助的試験として行った。

４）腸管出血性大腸菌の試験

B.（１）４）と同様の方法で行った。

（３）豚と体及び牛と体の解体工程における衛生指標菌と病原菌関連遺伝子検出状況の評価

１）検体

1食肉衛生検査所から、豚及び牛と体拭き取り検体の提供を受けて用いた。豚と体からは洗浄前、洗浄後（剥皮前）及び枝肉の3工程において腹部から採材した。牛と体からは、剥皮前及び枝肉の2工程において腹部から採材した。拭き取りはB.（２）１）と同様に行った。拭き取り後のスポンジは、冷蔵便で国立医薬品食品衛生研究所へ送付し、採材後48時間以内に試験に供した。各工程3検体ずつ採材し、試験は2回実施した。

２）衛生指標菌の試験

通知法に従い、B.（２）２）と同様に実施した。結果は常用対数で表したが、負の値となった場合は「0」として集計した。

３）病原菌由来遺伝子の検出

B.（２）３）と同様に調製した、増菌培養液から抽出したDNAを用いて、腸管出血性大腸菌のスクリーニングに使用される*stx*及び*eae*遺伝子を標的としたリアルタイムPCRを行った。

Ｃ．研究結果及び考察

（１）牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と病原細菌検出状況の調査

*stx*及び*eae*遺伝子を標的としたリアルタイムPCRの結果、3農場から搬入された5検体が*stx*及び*eae*陽性であった。これら5検体について、主要7血清群の0抗原遺伝子を標的としたリアルタイムPCRを実施し、陽性となった0抗原の免疫磁気ビーズを用いてSTECの分離培養を試みたところ、0157免疫磁気ビーズを用いた検体からSTECが疑われるコロニーを得、性状解析の結果いずれのSTEC 0157であることが確認された。H型別試験の結果、分離された菌株はいずれも0157:H7であった。特定の農場からは3検体から0157:H7が分離されたが、2検体からの菌株はMLVA法において、全17遺伝子座のリピート数が一致し、もう1検体からの菌株とは12遺伝子座のリピートが異なっていた。STEC汚染の進んだ農場は、由来の異なる複数の菌株に汚染されていることが示された。STECが分離された検体が飼育されていた農場とSTECが分離された検体が飼育されていなかった農場の間で、衛生指標菌数との関連を検討した。STEC分離陰性の農場で飼育されていた検体における一般細菌数の平均値は6.29 log cfu/cm^2、STEC分

離陽性の農場で飼育されていた検体では 7.27 log cfu/cm^{2}であった。2群間の差をWelch法で検定したところ、p値は 0.015 であり、有意な差が認められた。同様に腸内細菌科菌群数を比較したところ、STEC 分離陰性の農場で飼育されていた検体の平均値は 4.19 log cfu/cm^{2}であり、STEC 分離陽性農場で飼育されていた検体の平均値は 4.65 log cfu/cm^2 であった。2 群間の差をWelch 法で検定したところ、p値は 0.187 であった。衛生指標菌数は、STEC を始めとする病原微生物汚染と高い関連性があることが示された。

サルモネラ属菌はいずれの検体からも分離されなかった。

（２）豚及び牛と体の外皮拭き取り検体と枝肉切除検体における衛生指標菌数及び病原細菌検出状況の評価

１）豚外皮拭き取り検体及び枝肉における衛生指標菌及び病原細菌試験結果

各施設から提供された切除検体重量について 95%信頼区間を算出し、逸脱した検体がどの程度存在したかを検証したところ、どの施設においても 95%信頼区間から逸脱した検体はなく、適切に採材されていたと考えられた。

施設 A では、2021 年 9 月～2022 年 2 月（11 月と 12 月は 1 度の採材であった）にかけて月あたり 5 と体（各枝肉及び外皮拭き取り検体）計 50 検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は 2.40±0.66 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 1.50±2.92 cfu/cm^{2}であった。枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は 2.40±0.49 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 22.88±107.78 cfu/cm^{2}であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及び STEC は分離されなかったが、外皮拭き取り検体では 5 検体（20.0%）で病原性大腸菌関連遺伝子（*stx* もしくは *eae*）が陽性であった。

施設 B では、2021 年 9 月～2022 年 2 月にかけて月あたり 5 と体（各枝肉及び外皮拭き取り検体）計 60 検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は 2.30±0.84 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 4.20±6.87 cfu/cm^{2}であった。枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は 1.88±0.62 log cfu/cm^2、腸

内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 5.53±4.23 cfu/cm^{2}であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及び STEC は分離されなかったが、外皮拭き取り検体では 2 検体(6.7%)で病原性大腸菌関連遺伝子（*stx* もしくは *eae*）が陽性であった。

施設 C では、2021 年 9 月～2022 年 2 月にかけて月あたり 5 と体(各枝肉及び外皮拭き取り検体）計 60 検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は 2.42±0.83 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 2.07±4.34 cfu/cm^{2}であった。枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は 2.57±0.54 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 6.97±10.81 cfu/cm^{2}であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌は分離されなかったが、外皮拭き取り検体 1 検体（3.3%）から O103 STEC が分離され、3 検体（10.0%）で病原性大腸菌関連遺伝子（*stx* もしくは *eae*）が陽性であった。

3 施設いずれにおいても、外皮拭き取り検体の 1 例を除いて、サルモネラ属及び STEC が分離されなかったことから、豚と体の衛生管理は適切に行われていると思われた。いずれの施設においても、外皮拭き取り検体及び枝肉間で一般細菌数に有意な差を認めなかったが、これは外皮拭き取りをと体洗浄後に行ったためであると考えられた。しかしながら、病原性大腸菌関連遺伝子は、枝肉からは検出されず、外皮拭き取り検体のみから検出された。このことは、外皮拭き取り検体採取後の枝肉洗浄の工程が、検体からの病原体の除去に一定の効果を及ぼしていることを示唆している。

次に、各施設の外皮拭き取り検体及び枝肉検体を、病原性大腸菌関連遺伝子検出の有無で 2 群に分け、衛生指標菌数との関係について検討した。施設 A 及び施設 B の病原性大腸菌関連遺伝子の検出された外皮拭き取り検体では、病原性大腸菌関連遺伝子陰性検体に比べて、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数共に多い傾向にあった。また、豚と体の腸内細菌科菌群数は、検体毎のばらつきが大きく計測された菌数も小さいため、一般細菌数に比べて衛生状態を適切に評価できていないように見受けられた。

また、本研究では、いずれの検体からもサルモネラ属は分離されず、遺伝子も検出されなかった。後述する牛と体に比べ、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数も低い値を示し、検体の衛生状態が的確に評価されて

いるか疑問が残った。外皮拭き取りの方法の検証及びサルモネラ属以外の病原細菌を衛生状態の指標として検討することの必要性も示唆された。

２)牛外皮拭き取り検体及び枝肉における衛生指標菌及び病原細菌試験結果

各施設から提供された切除検体重量について 95%信頼区間を算出し、逸脱した検体がどの程度存在したかを検証したところ、どの施設においても 95%信頼区間から逸脱した検体はなく、適切に採材されていたと考えられた。

施設 A では、2021 年 9 月～2022 年 2 月（11 月と 12 月は 1 度の採材であった）にかけて月あたり 5 と体（各枝肉及び外皮拭き取り検体）計 50 検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は 4.95±0.61 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 2.28±0.58 log cfu/cm^2 であった。枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は 2.30±0.47 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 0.46±0.55 log cfu/cm^2 であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及び STEC は分離されなかったが、外皮拭き取り検体では 22 検体（88.0%）で病原性大腸菌関連遺伝子（*stx* もしくは *eae*）が陽性であった。

施設 B では、2021 年 9 月～2022 年 2 月にかけて月あたり 5 と体（各枝肉及び外皮拭き取り検体）計 60 検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は 4.25±1.57 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 1.15±1.80 log cfu/cm^2 であった。枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は 4.03±0.66 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 1.26±0.41 log cfu/cm^2 であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及び STEC は分離されなかったが、外皮拭き取り検体では 10 検体（33.3%）及び枝肉では 1 検体（3.3%）で病原性大腸菌関連遺伝子（*stx* もしくは *eae*）が陽性であった。

施設 C では、2021 年 9 月～2022 年 2 月にかけて月あたり 5 と体（各枝肉及び外皮拭き取り検体）計 60 検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体における一般細菌数の平均±標準偏差は 4.84±1.02 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 1.61±1.29 log cfu/cm^2 であった。

枝肉における一般細菌数の平均±標準偏差は 3.03±0.87 log cfu/cm^2、腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は 0.87±0.47 log cfu/cm^{2}であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及びSTECは分離されなかったが、外皮拭き取り検体では16検体（53.3%）及び枝肉では2検体（6.7%）で病原性大腸菌関連遺伝子（*stx*もしくは*eae*）が陽性であった。

豚と体と同様に、3施設いずれにおいても、サルモネラ属及びSTECが分離されず、外皮拭き取り検体に比べて枝肉では病原性大腸菌関連遺伝子の陽性率が減少していることから、牛と体の衛生管理は適切に行われていると思われた。牛と体では、施設毎に外皮拭き取り検体の採材タイミング及び採材部位が異なっていたが、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数いずれも施設間の有意な差は認められなかった。施設Aでは、外皮拭き取りをと体洗浄後に行ったにも関わらず、と体洗浄前に採材した他の2施設の検体に比べて病原性大腸菌関連遺伝子陽性率が高値を示した。このことから、当該施設においては、病原細菌は分離されなかったものの、洗浄等の工程の見直しが、より適切な衛生管理のために必要であることが示唆された。

次に、牛と体においても、各施設の外皮拭き取り検体及び枝肉検体を、病原性大腸菌関連遺伝子検出の有無で2群に分け、衛生指標菌数との関係について検討した。3施設とも同様の傾向が認められ、病原性大腸菌関連遺伝子が陽性となった検体では、一般細菌数が5 log cfu/cm^{2}以上、及び腸内細菌科菌群数が2 log cfu/cm^{2}以上であり、枝肉では衛生指標菌数の減少と共に病原性大腸菌関連遺伝子が殆ど検出されなくなることが示された。

（３）豚と体及び牛と体の解体工程における衛生指標菌と病原菌関連遺伝子検出状況の評価

豚と体解体工程の中で、剥皮前の工程としての、と体洗浄機前の「洗浄前」から洗浄機通過後の「洗浄後（剥皮前）」間の拭き取り検体における一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は、1回目の試験では「洗浄後（剥皮前）」で減少傾向にあったが、一般細菌数では$p > 0.55$及び腸内細菌科菌群数では$p > 0.41$でありどちらも有意水準5%での差は認められなかった。

洗浄後（剥皮前）」と剥皮後の「枝肉」工程間では、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数いずれも減少傾向にあり、一般細菌数では$p < 0.02$であり有意水準5%で差が認められた（腸内細菌科菌群数に関しては負の値を「0」として集計しているため有意差検定は行っていない。）。

病原菌関連遺伝子検出状況は、「洗浄前」では33.3%(1/3)、「洗浄後(剥皮前)」では33.3%(1/3)、「枝肉」では0%(0/3)であり衛生指標菌の減少と共に病原菌関連遺伝子陽性率は減少し枝肉では検出されなくなることが示された。2回目の試験においても同様の傾向が認められたが、「洗浄前」と「洗浄後(剥皮前)」の間で減少傾向にあった一般細菌数の差について、$p < 0.03$となり有意水準5%で差が認められた。

牛と体の解体工程では、2回の試験いずれにおいても、「剥皮前」と剥皮後の「枝肉」の間では、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数共に減少傾向であり、有意水準5%で差が認められた。この間の病原菌関連遺伝子陽性率は衛生指標菌数と並行して100%(3/3)から0%(0/3)に減少した。

以上により、対象の施設での豚と体及び牛と体解体工程において、剥皮前後の工程における衛生管理の重要性が示された。

D.結論

(1)牛と体外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と病原細菌検出状況の調査

特定のと畜場に搬入される牛と体外皮拭き取り検体の衛生指標菌数、病原細菌検出状況を調査した。特定の農場から搬入される検体がSTECに高度に汚染されている状況が明らかとなった。

(2)豚及び牛と体の外皮拭き取り検体と枝肉切除検体における衛生指標菌数及び病原細菌検出状況の評価

国内の3施設で豚と体及び牛と体の外部検証用枝肉切除検体及び外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と病原体検査結果の関連について検討した。

豚と体では、全検体サルモネラ属陰性であり、STECも一例を除いて分離陰性となり、これら施設では豚と体の衛生管理が適切に行われていることが確認された。病原細菌の分離が陰性であったため、病原性大腸菌関連遺伝子(*stx*及び*eae*)検出状況と衛生指標菌数の関連を検討したところ、これら遺伝子の検出された外皮拭き取り検体では、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数共に、病原性大腸菌関連遺伝子の検出されなかった検体に比べて多い傾向が認められた。しかしながら、豚と体の外皮拭き取り検体では、牛と体に比べ一般細菌数及び腸内細菌科菌群数共に低い値であり、更にサルモネラ属が全検体で陰性であったことからも、衛生状態を適切に評価できているか疑問が残った。豚と体の拭き取り法の検証、更にサルモネラ属以外の病原細菌を衛生状態の

指標として検討することの必要性が示唆された。

牛と体では、サルモネラ属及びSTECいずれも分離陰性であり、牛と体の衛生管理が適切に行われていることが確認された。病原体分離陰性であったものの、外皮拭き取り検体では病原性大腸菌関連遺伝子が高い割合で検出され、一方枝肉では殆ど検出されなかったことから、これら遺伝子の検出が衛生管理の検証に有用であることが示唆された。病原性大腸菌関連遺伝子陽性となった外皮拭き取り検体では、一般細菌数が5 log cfu/cm^2以上及び腸内細菌科菌群数で2 log cfu/cm^2以上であり、枝肉では衛生指標菌数の減少とともに病原性大腸菌関連遺伝子が殆ど検出されなくなることが示された。

（３）豚と体及び牛と体の解体工程における衛生指標菌と病原菌関連遺伝子検出状況の評価

前年度までに実施した検証結果を踏まえ、1施設の協力の元、剥皮前後の工程における衛生管理の重要性について、衛生指標菌と病原菌関連遺伝子検出状況を指標に評価した。豚と体及び牛と体の解体工程における「剥皮前」と剥皮後の「枝肉」工程間の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は剥皮後に大きく減少し病原菌関連遺伝子陽性率も「0」になることが明らかとなった。以上により、対象施設の豚と体及び牛と体解体工程では、剥皮前後の工程における衛生管理が重要であることが示された。

E.健康危険情報

なし

F.研究発表

（誌上発表）

なし

（学会等発表）

なし

G.知的所有権の取得状況・登録状況

なし

令和 2-4 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）
「と畜・食鳥処理場における HACCP 検証手法の確立と
食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究」
分担総合研究報告書

と畜場におけるリステリア属菌の汚染実態とリスク管理に関する研究

研究分担者	朝倉　宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	有田佳子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	中江優貴	静岡県食肉衛生検査所
	久永崇宏	静岡県食肉衛生検査所
	大畑克彦	静岡県食肉衛生検査所

研究要旨：欧米ではと畜・食鳥処理工程並びに同加工工程における生物的危害要因としてリステリア・モノサイトゲネス（以下、LM）が認知されており、そのモニタリングも推奨されている。一方、国内のと畜場等における LM の汚染実態は十分に把握されていない。本分担研究では、あると畜場の協力を得て、令和 4 年 6 月から 11 月の期間、同施設環境における牛と畜処理工程を通じた LM 汚染状況を検討した。1 月あたり 20～24 検体の施設環境ふき取り検体を採材し、LM 及びリステリア属菌を対象とした試験を行った結果、7 月～9 月の間に枝肉冷蔵室床より LM 以外のリステリア属菌が検出されたほか、9 月には剥皮前の牛外皮からもリステリア属菌が検出され、外皮等が当該菌の施設内侵入経路となっている可能性が示唆された。これらの結果を事業者に逐次共有するとともに、枝肉冷蔵室の洗浄徹底等の指導がと畜検査員により段階的に行われた。また、9 月から 11 月にかけては推定リステリア属菌数を調査したが、処理工程が進むにつれて、同指標菌数は減少傾向を示した。また、解体処理室内環境では上述の外皮を除き、リステリア属菌は検出されなかった。国内のと畜場の多くは、作業終了後に熱温水やスチーム等を用いてと畜解体工程施設環境を洗浄しており、この作業が LM の常在化に予防的に寄与していると想定される。一方で、枝肉冷蔵以降の工程では低温増殖性を示す当該菌の増殖可能性を完全には排除できないことから、それ以降の加工を含む工程を中心として、今後更なる情報の蓄積と対策の創出を図る必要があると考えられる。

A．研究目的

と畜場及び大規模食鳥処理場においては、HACCPに基づく衛生管理が必要とされ、自治体のと畜検査員、食鳥検査員が行う検証（外部検証）として、現場検査、微生物検査及び記録の確認等が技術的助言として厚生労働省より発出されている。このうち、微生物試験については、最終洗浄後から冷蔵までの間にある枝肉表面を切除し、衛生指標菌（生菌数及び腸内細菌科菌群数）の検出試験を行うこととなっている。

このほか、関連事業者団体が作成したと畜場におけるHACCPに基づく衛生管理のための手引書では、枝肉の冷蔵庫内温度の管理を重要管理点（CCP）として例示され

ている。冷蔵庫内温度の管理不備は微生物の増殖を招くおそれがあるためであるが、特にリステリア・モノサイトゲネス（以下、LM）等の低温菌の増殖を招きうるリスクが、欧米では従前より懸念されており、と畜場での工程管理指標として施設環境での生残をモニタリングすることも多い状況にある。しかしながら、国内のと畜場施設環境等における当該菌の汚染実態等に関する知見は乏しい状況であった。

以上の背景を踏まえ、本分担研究では、牛と畜処理工程中での施設環境試料を拭き取り、LM及びリステリア属菌の汚染実態並びに菌叢変動に関する検討を行ったので報告する。

B．研究方法

１．検体

令和４年６月～９月の間、と畜場の牛処理工程中の外皮、施設等の環境 20 検体を月あたり 20 検体、同年 10 月～11 月の間には、月あたり 24 検体を採材した（計 128 検体）。採材にあたっては、スポンジスワブを用いて拭き取り、試料とした。

２．リステリア定性試験

採材スポンジスワブ試料に 100mL の half-fraser broth を加え、2 分間のストマッキング処理を行った後、37±1°Cで 24-30 時間前培養した。リステリア・モノサイトゲネスの検出には、ISO 法との妥当性確認がなされ、我が国でも検疫所で活用されている MDS2 Listeria monocytogenes を用いた。また、上記培養液をクロモアガー・リステリアに塗抹し、37±1°Cにて培養後、発育した集落のうち、ハローの有無に関係なく青色を呈した代表集落を無作為に釣菌し、VITEK2 を用いて生化学性状に基づく菌種同定を行った。

３．リステリア定量試験

９～11 月に採材した検体については、上項の定性試験で調製した懸濁液を 10 倍階段希釈後、クロモアガー・リステリアに直接塗抹し、37±1°Cにて培養した。発育した集落のうち、色調が青色を呈した集落数を推定リステリア属菌数として求めると共に、ハローを伴う青色集落の有無を確認し、ハローを伴うものについては VITEK2 を用いて、LM であるかを確認した。

４．菌叢解析

令和４年９月に採材した検体より、DNA を抽出し、16SrRNA 部分配列を PCR により増幅させた後、次世代シークエンサー（Ion PGM）を用いて塩基配列データを取得し、RPD Classifier を用いて階層毎に構成菌叢を解析した。

C．結果

１．リステリア属菌の定性及び定量試験

リステリア属菌は９月に採材した外皮及び７～９月に採材した枝肉冷蔵最終室床から検出されたが、すべてリステリア・モノサイトゲネス以外の菌種であった。また、クロモアガー上で多数の青色集落を認めた外皮、枝肉冷蔵室等からはリステリア属菌以外の菌種も検出された。

これを裏付けるように、９～11 月に行った同属菌の定量試験では、外皮、前後肢落し工程の床、シンク、排水溝から多くの菌数が検出された。６月に採材した検体から

リステリア属菌の検出は認められなかった。

２．菌叢解析

細菌科階層での占有率を確認したところ、外皮や解体処理周辺環境ではモラクセラ科が最も優勢であり、一部の外皮ではコリネバクテリウム科も優勢であった。枝肉洗浄下にある排水溝はキサントモナス科等、他検体と異なる構成が認められ、当検体からは腸内細菌科菌群も多く検出された。枝肉冷蔵室では壁、枝肉表面においてバシラス科が最も優勢な状況にあった。

リステリア科は外皮及び冷蔵室床から、各1リードのみが検出された。

D．考察

先行研究では、と畜場でのリステリア属菌の主要な汚染源として牛外皮が指摘されている。今回の成績から、解体処理工程の環境試料からリステリア属菌は検出されず、枝肉洗浄までの工程で、体表に由来する生物的危害の多くを適切に管理できていると解された。9～11月に行った定量試験成績からも、処理工程が前肢落しから友バラ皮剥ぎ、そして背割りへと進むに従い、推定リステリア属菌数の減少が確認できた。当該と畜場では従前より作業後に施設設備環境を熱温水を用いて洗浄するよう、管轄する食肉衛生検査所のと畜検査員による指導がなされており、このことが解体処理工程の環境試料からリステリア属菌が検出されなかった背景となっている可能性が想定される。こうした熱温水を用いた作業後洗浄は、他のと畜場においても、食肉衛生検査所への電話インタビューを通じ、同様の対応がとられている場合が複数確認されたことから、牛解体処理工程における施設環境でLMの常在化が生じる可能性は総じて低い状況にあると思われる。一方で、水が常にたまった状態であるシンクや排水溝では推定リステリア属菌数が増加を示した場合も見受けられたほか、枝肉冷蔵室床は、枝肉搬出時に作業者が頻繁に往来する場所であり、長靴等を介した交叉汚染のおそれも排除できないため、今後、これらの内容に係る一般衛生管理状況を改めて再点検する必要性が考えられた。

菌叢解析を通じ、背割り機ではバシラス科が優位となっており、剥皮後の枝肉汚染につながっている可能性も示唆された。当該菌は広く自然環境中に存在していることから、背割り機への汚染経路の確認や洗浄方法も含め、管理の在り方を今後検討すべき事項と考えられた。

牛枝肉におけるリステリア汚染要因としては、腸管破損による内容物の汚染、機材や人の手を介した2次汚染、洗浄水の跳ね上げによる汚染の可能性がこれまでに示唆されている。当該と畜場でも枝肉洗浄下の排水溝からは腸内細菌科菌群由来遺伝子が相対的に多く検出されており、枝肉の更なる衛生確保に向けた課題を見出すことができた。

なお、当該と畜場を管轄する食肉衛生検査所では、枝肉の更なる細菌汚染低減に向けて、これまでも外部検証等を通じて、衛生管理指導に取り組んでいるが、と畜処理工程には加熱殺菌工程がないため、細菌汚染のゼロトレランスを成立させることは現実的ではない。今回、ヒト・リステリア症の原因となるLMは全検体より検出されなかったが、本調査結果をもとに、HACCP

システムの更なる効果的・効率的な運用に向けて、衛生指導や助言を進めていくことが食肉の更なる安全性確保に向けての重要な課題と思われる。

E．結論

本分担研究では、牛と畜工程におけるリステリアの常在化のリスクを探知することを主な目的として、令和 4 年 6 月から 11 月の間、と畜場内の施設環境におけるリステリア属菌及び LM の汚染状況を調査研究した。結果として、LM は検出されず、リステリア属菌が牛外皮及び牛枝肉冷蔵室内で見いだされた。これらの結果より、外皮等を通じ施設への LM の持ち込みの可能性が示唆されるとともに、特に枝肉冷蔵工程では洗浄消毒の励行を行うことがリスク管理策として重要と考えられた。なお、牛解体処理を行う施設環境では作業終了後に熱温水を用いた洗浄が毎回行われており、このことが同属菌の常在化の予防策となっているものと推察された。

F． 研究発表

１．論文発表

なし

２．学会発表

１）　中江優貴、久永崇宏、筆谷麻未、國井菜那子、松橋平太、寺井克哉、大畑克彦、朝倉宏. 牛と畜処理工程別のリステリア属菌の汚染実態について.　令和 4 年度静岡県衛生発表会.

G． 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和 2～4 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）
「と畜・食鳥処理場における HACCP 検証手法の確立と
食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究」
分担総合研究報告書

食鳥処理場における HACCP 外部検証に関する研究

研究分担者	朝倉　宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	山本詩織、町田李香、有田佳子	国立医薬品食品衛生研究所
	大城哲也、富永正哉	沖縄県中央食肉衛生検査所
	佐藤要介、笠井　潔	茨城県県西食肉衛生検査所
	葛岡功弥子、河合浩二	豊橋市食肉衛生検査所
	中江優貴、大畑克彦	静岡県食肉衛生検査所
	田辺美弥子、佐々木治美、坂上友康	青森県十和田食肉衛生検査所

研究要旨：国内の大規模食鳥処理場については、令和 2 年 5 月に「HACCP に基づく衛生管理」のための外部検証通知が発出され、各施設及び管轄自治体はこれに対する対応を行っている。令和 2 年度は成鶏を処理する大規模食鳥処理場 4 施設及びこれを管轄する自治体（食肉衛生検査所）の協力を得て、経時的な微生物試験成績の集積を図ることとした。また、そのうちの一部の施設由来検体については、カンピロバクターを含め、複数の試験法を同時に平行実施し、国内に流通する第三者認証を取得している製品間での成績比較を行った。結果として、中抜き方式であっても、成鶏（採卵鶏）由来とたいは対象施設では概ね適切に処理されており、検出菌数も一般的な大規模食鳥処理場で処理される肉用若鳥に比べて同等もしくはそれ以下であることが確認された。自治体の食鳥検査員による HACCP 外部検証のための微生物試験について、現行通知では処理半ばの食鳥とたいを冷却工程後に採材することとなっている。一方、採材時点の根拠となる知見は明確には示されていない状況であったことから、令和 3 年度には、ある大規模食鳥処理場の協力を得て、異なる時系列で冷却工程を経た食鳥とたいを微生物試験に供し、その数値変動を解析した。結果として、衛生指標菌数（一般生菌数、腸内細菌科菌群数）及びカンピロバクター属菌数はそれぞれ処理開始直後に比べ、処理半ばでは増加傾向が見受けられ、処理の半ばを採材時点とする現行の HACCP 外部検証通知で示される採材時期の妥当性を裏付ける知見を得た。また、令和 4 年度には、食鳥処理を通じた冷却水の時系列微生物・物性動態を評価し、冷却水の衛生状況をモニタリングする際には一般細菌数を対象とすることが妥当と考えられる知見を得た。また、食中毒菌をモニタリング対象とする際には、中抜き等の前工程の状況やロットの差異等を踏まえつつ、複数の時系列で評価を行う必要があると考えられた。

外部検証の試験対象部位である冷却後食鳥とたいの鶏皮試料で安定性を欠く、或いは高い数値が微生物試験により認められる場合に検討すべき事項の一つとして冷却工程の適切な管理を確認することは既に認知されつつあるが、本研究の成績がその確認手段を見定める一助となることを期待する。

A．研究目的

令和 2 年 5 月 28 日付の厚生労働省通知「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（生食発 0528 第 1 号）では、と畜場及び大規模食鳥処理場における HACCP の考え方に基づく衛生管理を実施する上で、と畜検査員や食鳥検査員による外部検証を行うことが技術的助言として示された。本通知別添には、食鳥とたいの首皮または胸皮を採材し、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数を対象として、年間を通じて定量検出するための試験法が示されている。当該通知で示される試験法としては、ISO 法のほか、参照法との同等性が国際的な第三者認証機関によって確認された試験法を用いることとなっている。現在、国内では、一般細菌数、腸内細菌科菌群数を求めるための簡易迅速法として市販されるキット類は複数流通しており、それらの適切性は使用者の実情にあわせて選択することが妥当と考えられる。一方で、これまで食鳥処理場で行われてきた微生物試験の多くは拭取り検体を対象とするものであり、上述の第三者認証を得たキット類についての同等性を鶏皮で評価された事例は乏しい状況にある。

また、国内で通知法発出以降に検討されている食鳥とたいの多くは中抜き方式により処理された肉用若鳥とたいであり、成鶏とたいに関する微生物試験成績は更に集積すべき状況にあると考えられた。

以上の背景を踏まえ、令和 2 年度には、成鶏を処理する大規模食鳥処理場4施設及びこれを管轄する自治体（食肉衛生検査所）の協力を得て、経時的な微生物試験成績の集積を図ることとした。また、そのうちの一部の施設由来検体については、カンピロバクターを含め、複数の試験法を同時に平行実施し、国内に流通する第三者認証を取得している製品間での成績比較を行った。

令和 3 年度から 4 年度にかけては、食鳥処理場においてHACCPに基づく衛生管理の実施にあたり、関連業界団体により作成された手引書にも記載されている通り、冷却工程が重要管理点(CCP)とされる状況にはあるが、当該工程において一般的な殺菌剤として用いられれる次亜塩素酸ナトリウムは有機物への接触により殺菌効果が速やかに不活化される性質を有すると解されている。上述の手引書では冷却工程の管理基準として、2時間毎に残留塩素濃度を測定し、30ppm以上を維持していることを記録することを推奨している。一方でその効果については明確に示されていない状況であった。加えて、処理羽数や冷却槽の容量等により、同管理に求められる条件は異なってくるものと考えられたこと等から、令和 3 年度にはある大規模食鳥処理場の協力を得て、冷却後の微生物学的評価を行い、令和 4 年度には、これまでに食鳥肉に係る重要な危害要因であるカンピロバクターが最終製品からほぼ検出されない状況にある事業所の協力を得て、冷却水中の衛生に関わる試験項目の時系列動態を評価したので報告する。

B．研究方法

①令和 2 年度

1）衛生指標菌定量検出試験

令和 2 年 5 月 28 日付の厚生労働省通知「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（生食発 0528 第 1 号）別添に示される一般細菌数及び腸内

細菌科菌群数を求めるための定量検出試験法を参照法として、全ての対象施設で用いた。また、一部施設では、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数測定用として販売されるフィルム培地製品（ペトリフィルム、コンパクトドライ、MC メディアパッド）及び最確数法を基礎としたテンポを並行的に用いて検討した。いずれも使用方法は製造者の使用説明書によった。

2）カンピロバクター定量試験法

2 自治体では、上述の衛生指標菌試験に加え、カンピロバクター定量検出試験を行った。同試験の実施にあたり、1 自治体では、上記通知別添で示される試験法を行った。また、残り 1 自治体では同様の方法に加え、最確数法に基づく簡易迅速キット（テンポ・カンピロバクター）を用いて試験を実施した。

②令和 3 年度

1）食鳥処理場における処理実態調査

研究協力を得た、大規模食鳥処理場において、処理工程フロー、並びに年間処理羽数、年間稼働日を確認した。また、冷却工程に係る情報としては管理基準を確認すると共に、前工程にあたる中抜き工程において、食鳥検査員による 5 分間の目視確認を行い、同工程での総処理とたい数及び腸切れが生じたとたい数を記録した。

2）微生物試験

冷却後食鳥とたい首皮試料の採材については外部検証通知に従って行った。また、その後の微生物試験については、AFNOR 等で ISO 法との同等性が確認されている、自動定量検出装置 TEMPO を用いて、一般生菌数、腸内細菌科菌群数、カンピロバクター菌数をそれぞれ並行的に求めた。

3）統計解析

各時系列間での菌数分布について、Mann-Whitney 検定により比較解析を行い、$p<0.05$ を有意差ありと判定した。

③令和 4 年度

1）冷却水検体及び前処理

ある大規模食鳥処理場にて、冷却槽中の冷却水を処理開始直後（0 時間後）より、1、2、4、5 及び 6 時間後にそれぞれ採水した。採水後、直ちに残留塩素濃度を測定し、次亜塩素酸ナトリウムの中和剤の一つであるチオ硫酸ナトリウムを採水検体 1 L へ添加し、冷蔵温度帯で保存・輸送した。また、残液についてはチオ硫酸ナトリウムを添加せず、理化学試験用検体として採水から 10 分以内に測定を行った。

2）理化学試験

冷却水検体の理化学試験項目としては、pH、残留塩素濃度、遊離塩素濃度、濁度、ATP 値、TDS 値及び水温を設定した。

3）微生物学的試験

冷却水検体は採水から 24 時間以内に一般細菌数、腸内細菌科菌群、大腸菌（β-グルクロニダーゼ産生大腸菌）の定量試験のほか、カンピロバクターとサルモネラ属菌の定性試験に供した。これらのうち、一般細菌数については 30℃にて 3 日間培養を行い、結果を求めた。

4）菌叢解析

水検体残液を遠心分離し、得られた沈査より全 DNA を抽出した。これを鋳型として、16s rRNA 部分配列を PCR 増幅し、Ion Torrent PGM を用いたシーケンス反応を行った。得られたデータはトリミング後、階層分類等に供した。

C．結果

①令和２年度

1)成鶏とたいにおける衛生指標菌検出状況

中抜き方式で成鶏（採卵鶏）を処理する大規模食鳥処理場 2 施設（A 施設、B 施設）での衛生指標菌検出状況について、時系列を追って検討したところ、以下の知見を得た。

① A 施設では、2020 年 9 月～2021 年 1 月にかけて、月あたり 5 検体（25 とたい分の胸皮）計 25 検体を採材し、微生物試験に供した結果、一般細菌数の平均は 3.97 log CFU/ g、平均+2SD は 4.75 log CFU/ g、平均+3SD は 5.14 log CFU/ g となり、最大値 5.08 log CFU/ g を示した 1 検体を除く全ての検体は平均+2SD の範囲に収束した。また、腸内細菌科菌群数については、平均が 2.16 log CFU/ g、平均+2SD が 3.06 log CFU/ g、平均+3SD が 3.51 log CFU/ g となり、全 25 検体で平均+2SD 以内に収束した。

② B 施設では、2020 年 7 月～2020 年 11 月にかけて、6 回の採材で計 30 検体を採材し、微生物試験に供した結果、一般細菌数の平均は 3.52 log CFU/ g、平均+2SD は 4.25 log CFU/ g、平均+3SD は 4.61 log CFU/ g となり、全検体は平均+3SD の範囲に収束した。また、腸内細菌科菌群数については、平均が 2.32 log CFU/ g、平均+2SD が 3.63 log CFU/ g、平均+3SD が 4.29 log CFU/ g となり、全 25 検体で平均+2SD 以内に収束した。

③ B 施設では上述の衛生指標菌試験と並行して、カンピロバクター定量検出試験も実施した。計 30 検体のうち、25 検体ではカンピロバクター不検出（1.0 log CFU/ g 未満）であった。一方、残り 5 検体からはカンピロバクターが検出されたが、培地上に発育した集落数が多く正確な菌数把握が困難であった。なお、これらの施設で検討対象とした食鳥とたいはいずれも丸とたいで冷蔵或いは冷凍保管することなく、受け入れ後、同日中に処理されたものであった。

2）食鳥とたい検体を対象とした微生物試験法の同等性について

微生物試験法として、通知法で示される試験法に比べ、近年では複数の簡易迅速法に該当する製品が開発され、一部製品ではその妥当性も第三者認証機関によって評価され、国内に普及している。外剥ぎ方式で成鶏を処理する C 施設及び D 施設で採材された食鳥とたい（首皮）計 39 検体を対象に、ISO 法及び迅速簡易試験法（キット A または B）を並行的に使用し、衛生指標菌数を求めたところ、試験法間の R2 値は一般細菌数で 0.92、腸内細菌科菌群数では 0.90 となり、各 2 キットを用いた試験成績は通知法で得られた試験成績との間で高い同等性を認めた。なお、当該 2 施設での衛生指標菌検出成績は、A 施設及び B 施設での成績に比べ、有意に高い状況であった。工程管理情報の一つとして、当該施設ではオゾン殺菌が行われていることが確認されたが、その詳細な管理条件は得ることができなかった。こうした微生物汚染低減に資すると目される工程の詳細な情報把握は、当該施設での衛生指標菌数低減に向けた活動として、今後必要と思われる。

なお、C 施設及び D 施設で採材された 39 検体については同時にカンピロバクター定量検出試験も行われた。カンピロバク

ター不検出となった検体数は 11 検体認められ、残り 28 検体は陽性を示した。但し、同菌数の最大値は 3.54 log CFU/g であり、うち 20 検体は 2.0 log CFU/g 未満の菌数を示した。

②令和 3 年度

1) 対象施設における食鳥処理状況並びに微生物試験結果概要

大規模食鳥処理場に対し、食鳥処理の状況を確認したところ、年間処理羽数は 5,609,695 羽、年間稼働日数は 280 日（前年度実績）であり、稼働日あたりの平均処理羽数は約 2 万羽と試算された。また、同施設では冷却水中の残留塩素濃度 50 ppm を管理基準（CL）としており、また冷却水は槽内で循環させつつ、オーバーフロー式循環を行いつつ、点滴法で次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加する一般的な処理方式をとっていた。また、中抜き工程での腸切れ頻度について、1 稼働日において、5 分間の目視確認を行ったところ、195 羽中 30 羽で腸切れの発生が確認された。

2 稼働日にわたり、冷却工程後の食鳥とたいを時系列を追って採材し、微生物試験に供したところ、処理直後（0 時間後）の時点で採材した食鳥とたい首皮 1 g あたりの平均菌数は、一般生菌数が 4.74 log CFU/g、腸内細菌科菌群数が 2.99 log CFU/g、カンピロバクター菌数が 1.09 log CFU/g であったが、処理半ばにおける各菌数はそれぞれ 5.29 log CFU/g、3.23 log CFU/g、1.35 log CFU/g となり、いずれも処理開始直後の検体に比べ、有意な増加を示した。更に処理が進んだ処理終盤の食鳥とたい首皮における菌数は、一般細菌数が 5.42 log CFU/g、腸内細菌科菌群数が 3.15 log CFU/g、カンピロバクター菌数は 1.80 log CFU/g となり、一般生菌数及びカンピロバクター菌数はやや増加傾向を示したが、処理半ばに比べ、有意な差異は認められなかった。

③令和 4 年度

1) 処理工程を通じた冷却水の理化学性状

(i) 塩素濃度

残留塩素濃度は処理 0 時間後の時点で 65 ppm であり、処理 2、4, 6、7 時間後の同値はそれぞれ 55 ppm、49 ppm、56 ppm、51 ppm、60 ppm であった。

一方、遊離塩素濃度は処理 0 時間後の時点で 5.10 ppm であったが、処理 1 時間後には 0.07 ppm へと著減し、処理 2、4、6 時間後の同値もそれぞれ 0.05、0.40、＜0.01 ppm を示した。処理 7 時間後には再び 4.26 ppm へと上昇した。

(ii) pH

pH は処理 0 時間後の時点で 8.54 であった。処理 1 時間後には 8.66、処理 2 時間後には 8.74 を示し、処理 4、6、7 時間後の同値はそれぞれ 8.92、8.96、8.99 であった。

(iii) 濁度

濁度は処理 0 時間後には 1.38 であったが、処理 1 時間後には 9.68 へと上昇し、処理 2、4、6、7 時間後にはそれぞれ 13.76、39.63、35.70、43.60 となった。

(iv) ATP 値

ATP 値は処理 0 時間後には 3 であったが、処理 1 時間後には 29,126、処理 2 時間後には 38,248、処理 4 時間後には 74,062 を示した。処理 6 時間後には 65,192 とやや減少を呈したが、処理 7 時間後には 87,888 と再び上昇を示した。

(v) TDS 値

TDS（総溶解固形物）値は処理 0 時間後には 391 μS であったが、処理 1 時間後には 617μS、2 時間後には 801μS、4 時間後には 1,176μS、6 時間後には 1,516μ S、7 時間後には 2,020μS を示した。

(vi) 水温

水温は処理 0 時間後では 8.50℃であり、処理が進むにつれてわずかに上昇傾向を認めたが、最大値は 9.40℃であり、測定期間を通じて 10℃を上回ることはなかった。

2) 処理工程を通じた冷却水の微生物性状

(i) 一般細菌数

一般細菌数は処理 0 時間後で 2.1 cfu/mL、処理 1 時間後ではすべて不検出（<1.0 cfu/mL）であり、処理 2 時間後においても 3 検体中 2 検体が不検出であった。処理 4 時間後には、26～33 cfu/mL と増加したが、処理 6 時間後には一時的に 7.1~13 cfu/mL へと減少した。但し、処理 7 時間後には 23~48 cfu/mL へと再び増加傾向を示した。

(ii) 腸内細菌科菌群及び大腸菌

腸内細菌科菌群及び大腸菌は全ての検体で不検出であった。

(iii) カンピロバクター及びサルモネラ

カンピロバクター・ジェジュニ／コリ及びサルモネラ属菌は全ての検体より検出されなかった。

3) 処理工程を通じた冷却水中の菌叢変動

処理 0、1、2、4、6、7 時間後の各時点における冷却水中の細菌叢構成の変動について検討するため、16s rRNA を標的とした菌叢解析を行った。処理 0 時間後においては、環境水との関連性の高い *Phyllobacterium* 属が全体の約 84.5%を占めたが、同菌属の占有率は処理 1 時間後以降、0.01%未満となった。これに対し、廃水との関連性が報告されている *Cloacibacterium* 属や、土壌や水との関連性が報告されている *Methylobacterium* 属、*Escherichia* 属並びに *Salmonella* 属の占有率は処理 0 時間後には低かったものの、処理の経過に伴い、一過性あるいは持続性の増加を認めた。直接的な糞便汚染指標である *Escherichia* 属については、処理 2 時間後には約 12.2%の一過性の高い占有率を示したほか、*Salmonella* 属菌は処理 6 時間後に約 9.9%と占有率の一過性亢進を示した。

D. 考察

①令和 2 年度

1)成鶏とたいにおける衛生指標菌検出状況

中抜き方式であっても、成鶏（採卵鶏）由来とたいは対象施設では大きな逸脱を見ることなく処理されており、検出菌数についても、一般的な大規模食鳥処理場で処理される肉用若鳥に比べ同等もしくはそれ以下であることが確認された。

2) 食鳥とたい検体を対象とした微生物試験法の同等性について

国際的な第三者認証機関による妥当性確認を受けた迅速簡易試験法の食鳥とたい検体への適用は可能と思われた。また、対象施設における定量検出成績より、多くの成鶏とたいにおけるカンピロバクター汚染菌数は相対的に低い状況にある可能性が示唆された。

②令和 3 年度

食鳥検査員が実施する外部検証微生物試験における採材時点を処理半ばとする妥当性を評価することを目的として、一般的な処理工程を有する大規模食鳥処理場における冷却後食鳥とたいを試料とした微生物試

験を行い、それらの時系列挙動を解析した。本研究結果から、処理開始直後の食鳥とたいを採材することが望ましくなく、半ば以降での試料確保が望ましいことが確認された。また、採材時点を検討するにあたり、当該施設では中抜き工程での腸切れ頻度を目視確認することで、腸切れの発生頻度に関する情報収集につとめた。冷却工程前における腸切れ発生は糞便等の交叉汚染に直接的な影響を及ぼす要因と考えられることから、HACCP に基づく衛生管理を更に向上させていく上では、処理工程を通じた実態把握とその情報に基づいた形での工程管理の改善措置の設定が有効な手立てとなるものと期待される。特にＣＣＰ工程とする場合の多い冷却工程については、換水頻度や殺菌剤の有効持続時間をはじめとする不明な点が多いため、令和４年度の検討課題として設定するに至った。

③令和４年度

食鳥処理場における冷却水の性状に係る時系列動態として、水温や pH、更には残留塩素濃度は測定期間を通じて著変なく推移した。残留塩素濃度が比較的安定的に維持された背景として、対象施設では塩素注入が断続的に行われていたためと想定される。一方、遊離塩素濃度は処理１時間後から明確な減少を示した。遊離塩素は殺菌効果の主体であるが、有機物との接触により速やかに分解されることが知られている。それにもかかわらず、一般細菌数が大きく上昇しなかった主な理由としては、上述の断続的な塩素注入と十分な攪拌、並びに冷却槽内に一定数以上の食鳥とたいを貯留させていなかったこと等があると目される。

他の物性試験項目のうち、濁度及び TDS 値は経時的な上昇を認めた。また、ATP 値も経時的な上昇を認めたが、処理６時間後には若干の減少を示した。採水を行った施設での処理経過として、処理４時間後では１ ロット目の食鳥とたいの処理が終わったところであり、その後、処理６時間後の時点までの間には処理が行われない時間帯が設けられていた。この間の塩素の断続的な注入が ATP 値の一時的ながらも減少を導いた可能性が推察される。

微生物試験では、一般細菌数を除き、糞便汚染指標菌並びにカンピロバクター・ジェジュニ／コリ及びサルモネラ属菌は検出されなかった。本成績から、微生物試験により冷却水をモニタリングする際には一般細菌数を対象とすることが妥当と考えられた。一方、菌叢解析結果からは、*Escherichia* 属及び *Salmonella* 属由来遺伝子が一過性ながらも検出された。従って、これらの健康被害をもたらす可能性のある細菌をモニタリング対象とする際には、中抜き等の前処理工程の状況やロットの差異等を踏まえつつ、複数の時系列で評価を行う必要があると考えられる。

外部検証の試験対象部位である冷却後食鳥とたいの鶏皮試料で安定性を欠く、或いは高い数値が微生物試験により認められる場合に検討すべき事項の一つとして冷却工程の適切な管理を確認することは既に認知されつつあるが、本研究の成績がその確認手段を見定める一助となることを期待する。

E．結論

食鳥とたいを対象とした HACCP 外部検証のための微生物試験成績の集積を特に成鶏について検討し、中抜き方式の ２ 施

設では衛生指標菌検出成績は一般的な施設と同等もしくはそれ以下であり、一定の衛生確保が行われている状況が確認された。また、カンピロバクターについては 30 検体中 25 検体が不検出となる等、成鶏とたいにおけるカンピロバクター汚染頻度は相対的に低い可能性が示唆された。一方、陽性検体の多くは突発的に高菌数を示した可能性も考えられるため、工程管理の中でカンピロバクター制御に有効となる対策を講じる必要性が示された。

大規模食鳥処理場での冷却工程後の食鳥とたいにおける微生物汚染実態を処理の進捗に応じて時系列比較し、処理半ば以降での検出菌数は処理開始直後に比べて有意な増加を認め、処理半ば以降での採材が対象施設での外部検証を行う上で妥当なタイミングであることを裏付ける知見を得た。

また、衛生的な鶏肉製品を提供していた、大規模食鳥処理場の協力を得て、重要管理点として手引書等で例示される冷却工程に焦点を当て、冷却水の物性及び微生物の動態を経時的に評価した。結果として、断続的な塩素注入や処理速度を安定的に設定・運用することで、塩素濃度や pH、水温、更には一般細菌数を安定的に制御することが可能となっている可能性が示唆された。

F． 研究発表

１．論文発表

1） Asakura H, Nakayama T, Yamamoto S, Izawa K, Kawase J, Torii Y, Murakami S. Long-term grow-out affects *Campylobacter jejuni* colonization fitness in coincidence with altered microbiota and lipid composition in the cecum of laying hens. Front. Vet. Sci. 2021. 8: 675570.

2） Kumagai Y, Pires SM, Kubota K, Asakura H. (2020) Attributing human foodborne diseases to food sources and water in Japan using analysis of outbreak surveillance data. J. Food Prot. 83: 2087-2094.

3） Yamamoto S, Kitagawa W, Nakano M, Asakura H, Iwabuchi E, Sone T, Asano K. Plasmid sequences of four large plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle in Japan. Microbiol Resour Announc. 2020. 9(20):e00219-20.

4） Ogawa A, Nagaoka H, Asakura H. Draft genome sequence of *Campylobacter jejuni* ST-508 strain Shizu21005, isolated from an asymptomatic food handler in Japan, 2021. Microbiol Resour Announc. 2022: e0031622.

2. 学会発表

1） 朝倉宏．食肉及び食鳥肉の衛生管理における定量的微生物モニタリングについて．第 42 回日本食品微生物学会学術総会.

2） 朝倉宏．カンピロバクターの汚染実態と遺伝性状に基づく制御に向けた研究．第 118 回日本食品衛生学会学術講演会.

3） 朝倉宏．外部検証の微生物試験の分析結果について．厚生労働省令和 3 年度食肉及び食鳥肉衛生技術研修並びに研究発表会.

4） 朝倉宏，中山達哉，山本詩織，伊澤和輝，

川瀬遵, 鳥居恭司, 村上覚史. 長期飼育を通じた, 採卵鶏における *Campylobacter jejuni* の腸管定着の経時変動並びに腸内菌叢・脂質組成との関連性探索. 第 164 回日本獣医学会学術集会.

5) 中村寛海, 秋吉充子, 山本香織, 梅田薫, 平井佑治,朝倉宏, 阿部仁一朗. mP-BIT 法による食中毒起因カンピロバクターの流行動態解析. 第 14 回日本カンピロバクター研究会総会.

6) 朝倉宏. 最近の食中毒の傾向と対策. 文部科学省 学校給食の衛生管理等に関する指導者講習会

7) 朝倉宏. 外部検証の微生物試験の分析結果について. 厚生労働省令和 4 年度食肉及び食鳥肉衛生技術研修並びに研究発表会.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

令和 2-4 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）
分担総合研究報告書

と畜・食鳥処理場における HACCP 検証方法の確立と食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究

分担研究項目：生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

分担研究者　中馬猛久　　鹿児島大学共同獣医学部

研究要旨

南九州地方では生食用の食鳥肉が製造加工されており、管轄自治体は衛生管理に関するガイドラインを発出している。これまで大規模食鳥処理場・加工施設での衛生管理実態等については検討が進められ、望ましい衛生管理手法が提案されてきているが、同食品を取扱う施設の多くは認定小規模食鳥処理場であり、その処理工程には高度な衛生管理が望まれている。本分担研究では、認定小規模食鳥処理場における工程管理実態を把握しその問題点を抽出することによって、国産食鳥肉の更なる安全性確保の向上を図ることを目的とした。処理場搬入鶏のクロアカスワブ、脱羽後，チラー後，焼烙後，解体後の皮または肉、および最終製品、さらに，鶏盲腸内容物中のカンピロバクターを定量的に調査した。また必要に応じ、搬入鶏のカンピロバクター保菌状況調査、処理工程における環境、器具機材の汚染状況調査も実施した。本研究期間の調査では 10 形態の認定小規模食鳥処理場を調査することができ、それぞれの衛生管理状況が明らかになりカンピロバクターによる汚染実態が明らかになった。小規模食鳥処理場における解体工程は一様でなく衛生管理状況もそれぞれ異なることがわかった。生食用食鳥肉生産処理過程でのカンピロバクター汚染阻止のためにはと体表面焼烙が有効であることが判明し、その上で焼烙後の交差汚染及び食肉部分への汚染を防ぐ措置も重要となることがわかった。それぞれの処理形態に則した適切な衛生管理手法の適用が生食用食鳥肉の高度衛生管理につながっていくものと思われる。

A 研究目的

平成 30 年の「食品衛生法」一部改正時に、と畜場・食鳥処理場における「HACCP に基づく衛生管理」が求められ、令和 2 年に施行されることになった。事業者団体等が衛生管理に関する手引書の作成にあたりが、その管理手法の構築が進んでいる。これまで、牛・豚・鶏それぞれについて、採材条件や試験方法については一定条件が設定されてきたが、検証を速やかかつ網羅的に評価するには多様な構造や工程を有する多くの施設を対象にしたデータの集積が不可欠である。南九州地域では多くの認定小規模食鳥処理場で生食用の食鳥肉が加工生産されており高度な衛生管理が望まれているが、その処理工程は小規模であるがゆえに極めて多様な方法がとられており、適切な処理方法が確立していない。そこで、本分担研究では、様々な認定小規模食鳥処理場での多様な処理工程における衛生管理実態を把握しその問題点を抽出することによって、国産食鳥肉の更なる安全性確保に資することを目的とする。

B 研究方法

1、 調査した処理施設

鹿児島県内の認定小規模食鳥処理場のうち処理工程の異なる 10 箇所の処理場（A～J）を対象として調査を行った。それぞれの処理場の主な特徴を挙げ、処理工程の概略と調査回数を表1に示す。また、それぞれの処理工程の詳細は図1～10 にも示す。なお、処理場 I は購入したヒナを自家農場で飼育していることを考慮し農場における鶏の保菌状況の調査も実施した。また、処理場 B は、加熱用鶏肉を取り扱う施設であり、と体表面加熱は行っていない。

2、供試材料

処理場搬入鶏のクロアカスワブ、処理工程における鶏の皮または肉を材料として 25g 採取した。クロアカ（総排泄腔）スワブは滅菌綿棒によって採取した。解体加工工程から，脱羽後，チラー後，焼烙後，解体後にそれぞれ皮または肉を、また最終製品も採取した。さらに，それぞれの鶏の盲腸を結紮して採取した。解体処理工程におけると体のカンピロバクター汚染調査に加え、必要に応じてまな板などのふき取りによる環境調査や農場における保菌状況調査も実施した。I 処理場に付属した飼育鶏舎（図 9-2）における調査では、A、B、C の3鶏舎から雌雄のクロアカスワブ4検体ずつ計24検体、環境検体として、供給される餌と水および飼育後の堆肥と敷料からそれぞれ2検体ずつ計8検体を得た。

3、カンピロバクターの分離・同定および定量

採取したクロアカスワブについて、カンピロバクターの存在の有無を調べるため、プレストン液体培地（Oxoid, Ltd. ）10ml に接種し、増菌培養後、1 検体につき 1 白金耳量をバツラー寒天培地（Oxoid, Ltd. ）に画線塗布した。バツラー寒天培地上に発育したカンピロバクター様コロニーについて、位相差顕微鏡を用いてらせん状桿菌の性状を確認した上で、Mueller-Hinton（MH）寒天培地（Oxoid）に 1 検体につき 1 コロニーを画線塗布し、純培養した。一連の菌分離にあたって、培養はすべて微好気条件下、42℃, 48 時間で実施した。菌種の同定には、*C. jejuni* の特異的プライマー（VS15/VS16）、*C. coli* の特異的プライマー（CC18F/CC519R）を用いた PCR 法により実施した。反応液組成は、計 4 種のプライマー保存溶液（各 2pmol/μl）をそれぞれ 2μl ずつ、EmeraldAmp PCR Master Mix（TAKARA BIO, Shiga, Japan）10μl、滅菌蒸留水 2μl と合わせ、20μl 総量とし、これに 1 白金線量のコロニーを直接添加した後、反応を開始した。陽性コントロールには、*C. jejuni* ATCC 33560 株、*C. coli* ATCC 33559 株由来 DNA を用いた。PCR は、94℃30 秒、56℃30 秒、72℃30 秒の 35 サイクルで実施した。反応後の PCR 産物は、1.5%アガロースゲル（AMRESCO, Ohio, US）で 100V、60 分電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後に増幅断片の有無及び分子量を確認した。採取した鶏肉については、最確数（MPN） 3 本法を用いて、カンピロバクター菌数を推定した。鶏皮または肉 25gとプレストン液体培地（Oxoid, Hampshire, UK）225ml を 1 分間ストマッキング処理し、検体懸濁液を調整した。その後、同懸濁液 10ml を 3 本作成したほか、同懸濁溶液 1ml、0.1ml をそれぞれ 3 本ずつプレストン液体培地 9ml、9.9ml に接種し、10ml の 10 倍、100 倍希釈液として培養した。その後、培養液より1白金耳をとり、バツラー寒天培地（Oxoid）に画線塗布し培養に供した。同定はクロアカスワブの場合と同様に実施した。

盲腸内容物におけるカンピロバクター菌数算定には平板希釈法を用いた。盲腸内容物 0.5g を 4.5ml のチオ硫酸ナトリウム緩衝ペプトン水で 10 倍希釈後、5 段階の希釈液を作成した。各希釈液は各 2 枚ずつの mCCDA 培地に平板培養した。微好気条件下で、42℃48 時間で培養後、

培地上の菌数を算定した。分離・同定は MPN3 本法と同様に実施した。

環境材料のスワブサンプルはクロアカスワブと同様にプレストンブロスにて増菌培養、バツラー寒天培地によって分離、PCR で同定を行った。

C. 研究結果

A 処理場では、1回につき6羽、5回の調査を実施した。結果は表 2 に示す。第1回、第2回の調査ではカット後の肉および生食用製品からカンピロバクターが分離されることはなかった。しかしながら、第1、2回ともに焼烙後の皮の1検体からわずかな量の菌が検出された。盲腸内容物のカンピロバクター菌数は 10^2～10^6 程度と幅広い数値を示したが、クロアカスワブは第1回で6羽中2羽、第2回で6羽中3羽のみが陽性であり、全体的に糞便によるとたいの汚染が低レベルであった可能性がある。第3、4回でも盲腸内容物の菌数は幅広い数値を示し、クロアカスワブは6羽全てが陽性であり、脱羽後の皮、中抜き後の皮で第1、2回に比較して高い菌数による汚染が認められた。解体当初よりとたいの糞便汚染が高かったものと思われる。また、第3回調査の焼烙後の皮からは3検体全てから 75～240MPN/10g のカンピロバクターが検出され、カット後および生食用製品からも3羽分6検体全てで 4～240MPN/10g のレベルで菌が検出された。第4回でも焼烙後の皮から菌が検出され生食用製品からも3検体中1検体からわずかながら菌が検出された。第3回以降では、それぞれの工程でそれまでとは別の担当者が処理を行なっていたことから、内臓摘出や解体加工の手技およびと体の取り扱いなどの細かい指導が必要であろうと思われた。これらの結果を機に解体工程の環境改善とと体の取り扱いに対する注意喚起と衛生指導を行なった。内臓摘出時に糞便汚染を阻止するよう流しを配置し、とたい移動時には排泄腔を下部におき首を上にしてできるだけ立てるよう心がけた（図1−2）。内臓の摘出法も熟練者と保健所担当獣医師の両者から丁寧に指導を行った。指導後に行った第5回の調査結果では焼烙後とカット後の肉は全てカンピロバクター陰性であった。しかしながら、生食用製品の1検体からわずかなカンピロバクターが検出された。この処理場の工程では更なる衛生管理の徹底が必要であろうと思われた。

B、C 処理場では、それぞれ6羽1回ずつ調査し、結果は表 3、4 に示す。B 処理場は加熱用製品を出荷しており、脱羽、内臓摘出、解体室の区分け、バブル式チラー槽の導入（図2）などをはじめ衛生の行き届いた処理場であったが、調査の結果から表面焼烙を実施しないと製品からは菌が検出されることが確認された。C 処理場は図3に示すように表面加熱工程を取り入れ、外剥ぎ式の解体を行い糞便汚染の阻止を意識しながら解体していることから、加熱後の皮、解体後の肉、生食用製品のいずれからもカンピロバクターが検出されることはなかった。しかしながら、2、3回目の調査では、個体を識別することなく多数羽処理工程で無作為に皮または肉を得て調査したところ、焼烙後の皮、肉、及び製品から微量ながらカンピロバクターが検出された（表 4−2,−3）。このことから、処理工程中の人為的交差汚染の可能性が示唆された。すなわち、多くの鶏を一度に多数処理する場合、放血脱羽処理室と食肉解体室との間での人や物の不適切な移動が問題となるものと思われる。

D 処理場では、懸吊焼烙、外剥、解体の順で処理されていた。この処理場では鶏を自家飼育しており、農場の事前調査で、鶏直腸スワブ12検体、落下糞便、飲水、いずれからもカンピロバクターが分離されることはなかったことから、飼育段階からカンピロバクター陰性と判断し、処理工程は調査しなかった。

処理場 E は、内臓中抜、網上焼烙後、トラックでと体を運搬移動、別棟で解体製品化し販売を行う形であった。1回目の調査では、焼烙後の皮と肉、及び製品にわずかながらカンピロバクタ

ーが検出された（表 5-1）。焼烙直後にと体内腔から交差汚染しないよう取り扱いを指導したところ、2回目の調査では、表面焼烙後の検体から菌が検出されることはなかった（表 5-2）。

処理場 F では、内臓中抜後にチラー処理し、その後、個別に水道水で腹腔内を洗浄、網上焼烙、解体、製品化をいう手順をとっていた。調査の結果、チラー洗浄後の皮からわずかに菌が検出されたが、表面焼烙後ではいずれの検体からも菌は検出されなかった（表 6）。中抜きによる処理法でも適切にと体を取り扱えば表面焼烙により汚染を阻止できるかもしれない。

処理場 G は、チラー槽で冷却したと体をチェーンに掛けて移動させながら表面焼烙を行い、冷水シャワーによる再冷却した後、外剥ぎで解体製品化する工程であった。表面焼烙直後の皮は陰性であったが、シャワー冷却後に1検体微量ながら陽性が見られた（表 7）。解体後の肉、製品は陰性であった。表面焼烙後の交差汚染を阻止することが課題となると思われる。

処理場 H は、搬入、放血、湯漬の工程からチェーンによる懸吊を行い大規模処理場とほぼ同じ方法によって、脱羽、内蔵中抜き、チラー処理を行っていた。その後、と体を再度チェーン懸吊して風乾、表面焼烙、氷冷、解体、製品化していた。この処理場では、鶏個体の追跡調査を行うことはできなかったため、1回目に拭き取り調査を行った（表 8-1）。その結果、焼烙後のと体の腹腔内スワブ１０検体中８検体がカンピロバクター陽性であった。また、解体室におけると体表面及びブロック肉の皮それぞれ１０検体中２検体ずつ陽性例が見られた。まな板などの環境拭き取り検体は全て陰性であった。2回目調査における定量的検査においては、焼烙直後の皮は全て陰性であったものの焼烙後氷冷中の皮や解体後の肉から微量ながらカンピロバクターが検出された（表 8-2）。中抜き後のと体腹腔内面は焼烙されないため、交差汚染の原因になりかねないと考えられる。生食用食鳥肉の生産過程でと体表面焼烙は、その過程でのカンピロバクター汚染阻止に有効ではあるが、焼烙後の交差汚染及び食肉部分への汚染を防ぐ措置も必要と考えられた。

I 処理場は購入したヒナを自家農場で飼育していたことから、処理工程調査の前に農場における鶏の保菌状況の調査を実施した。その結果を表 9-1 に示す。3つの鶏舎 A、B、C で飼育される雌雄それぞれ4羽のスロアカスワブを培養した結果、すべての鶏舎の鶏からカンピロバクターが分離された。分離された菌種には偏りがみられ、A 鶏舎では *C. jejuni* が優勢、C 鶏舎では *C. coli* が優勢、B 鶏舎はその中間であった。これらの農場で使用される餌、水、排出される堆肥、敷料は調査した8検体すべて陰性であった。I 処理場は自家農場の敷地内に位置しており、鶏搬入後、放血・湯漬・脱羽を行っていたが、チラー槽による冷却を行わず、と体を水洗するのみであった。と体は、その後、網上で表面焼烙、外剥によって解体、処理された肉は店舗へ運搬移動され一時保管された。そこで再度部分肉の表面焼烙が行われた後、スライスされて製品として販売されるという工程がとられていた。6羽の鶏を用いて処理工程におけるカンピロバクター菌数の動きを追跡した結果を表 9-2 に示す。6羽のうちクロアカスワブがカンピロバクター陽性だったのは1例のみであった。盲腸内容物中のカンピロバクター数を算定したところ、最小で $2.0X10^2$ CFU/g、最大で $1.2X10^5$ CFU/g であった。脱羽後の皮3検体のカンピロバクター菌数は 460～1100 MPN/10g と比較的高い値であった。通常食鳥処理場ではチラー処理が行われ次亜塩素酸ナトリウム添加により一般的にはカンピロバクター菌数は低く抑えられるのであるが、この処理場では水道水のみで脱羽後のと体洗浄を行っているため菌数があまり下がっていないと思われる。焼烙後の皮の菌数は 93～1100 CFU/10g であり、表面焼烙の効果が得られていなかった。外剥ぎを行った後の皮、解体

後の肉からも少数ながらカンピロバクターが検出された。しかしながら、店舗へ移動後スライスの前に再度焼烙を行っているため、最終製品から MPN 法でカンピロバクターが検出されることはなかった。この処理場では、解体前の表面焼烙では十分な効果が得られていないが、スライス前の再焼烙でカンピロバクター汚染を阻止しているものと考えられる。

J 処理場は、表1に示すように一般的な内臓中抜き工程をとる処理場であった。異なる工程は解体後の肉をスライス販売するまで十分に冷却する点であった。まず、最終製品の汚染状況を調査したところ、表 10-1 に示すように 10g 当たり 23 MPN 以下と概ね少数ではあったが菌汚染は認められ、特にモモ肉の汚染率が高いことがわかった。表 10-2 には処理場 J の工程ごとのカンピロバクター汚染菌数を示す。クロアカスワブは6羽中1羽のみがカンピロバクター陽性であった。盲腸内容物中のカンピロバクター数は、最小で $1.6X10^4$ CFU/g、最大で $2.6X10^7$ CFU/g であった。脱羽後の皮3検体の菌数は1検体が 93 MPN/10g、2 検体が 2400 MPN/10g 以上であった。チラー処理後では 2 検体が 150 MPN/10g、1 検体が 9 MPN/10g と大幅に菌数が低下した。と体の表面焼烙後では 2 検体が陰性、1 検体が 4 MPN/10g であり、表面焼烙後でありながらカンピロバクター陽性例が認められた。焼烙後に一時と体を並べ置く棚での交差汚染が疑われたため、と体腹腔と棚のスワブを3検体ずつ追加調査した結果、それぞれ1検体がカンピロバクター陽性を示した。このことから、と体を並べる棚で交差汚染が起こっていることがわかった。焼烙されていない腹腔から漏れ出る液体にわずかに含まれる菌が他のと体表面を汚染していると考えられた。生食用食鳥肉のカンピロバクター汚染阻止に対して、と体表面焼烙は、それのみで完全に阻止できるものではなく、焼烙後の交差汚染及び食肉部分への汚染を防ぐ措置も必要であり、またそれ以外の工程でも可能な限りカンピロバクター菌数を低減させる必要があると考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表

The incidence of *Campylobacter* contamination levels through chicken-sashimi processing steps in a small-scale poultry processing plant applying the external stripping method. Journal of Veterinary Medical Science. 84 (3): 414-419. (2022) Vu Minh Duc, Rina Kakiuchi, Takeshi Obi, Hiroshi Asakura, and Takehisa Chuma

2. 学会発表

第13回日本カンピロバクター研究会 川崎市 2020 年 10 月 1～2 日 国立医薬品食品衛生研究所（Zoom）「鶏から分離されたカンピロバクターの型別とギラン・バレー症候群関連遺伝子」 ◯津留優、宗安祥佳、Vu Minh Duc、城間萌子、栗脇良太、山元三保子、中馬猛久

第 164 回日本獣医学会学術集会 On Line 2021 年 9 月 7 日（火）から 13 日（月） 酪農学園大学 「Decontamination of Campylobacter through chicken-sashimi processing steps in a small- scale poultry processing plant applying the outer stripping method」 〇Vu Minh Duc、柿内梨那、小尾岳士、朝倉宏、中馬猛久

第 15 回日本カンピロバクター研究会総会 2022 年 10 月 29 日 東京都健康安全研究センター（リモート）「ギラン・バレー症候群誘発リスクの高い *Campylobacter jejuni* 検出法の開発」 〇坂田淳子、梅川奈央、中馬猛久、川津健太郎

E. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

表１　調査した処理施設の主な特徴と件数

施設	処理工程の概略	調査回数
A	脱羽→内臓中抜→冷却→乾燥→網上焼烙→解体→製品	5
B	脱羽→内臓中抜→冷却→解体→製品（加熱用食鳥肉）	1
C	脱羽→冷却→網上焼烙→外剥→解体→製品	3
D	脱羽→冷却→懸吊焼烙→外剥→解体→製品	事前
E	脱羽→冷却→内臓中抜→網上焼烙→運搬移動→解体→製品	2
F	脱羽→内臓中抜→冷却→個別洗浄→網上焼烙→解体→製品	1
G	脱羽→冷却→チェーン懸吊焼烙→シャワー冷却→外剥→解体→製品	1
H	脱羽→内蔵中抜→冷却→乾燥→チェーン懸吊焼烙→氷冷→解体→製品	2
I	脱羽→洗浄→網上焼烙→外剥→解体→運搬移動→スライス→製品	1
J	脱羽→冷却→内臓中抜→網上焼烙→解体→冷却→製品	1

表２　処理場Aの調査結果

１回目

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物 (cfu/g)	脱羽後の皮 (MPN/10g)	中抜き後の皮 (MPN/10g)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物 (cfu/g)	焼烙後の皮 (MPN/10g)	カット後の肉 (MPN/10g)
1	—	$6.3x10^2$	15	23	4	—	$5.5x10^3$	4	—
2	+	$2.2x10^6$	—	23	5	—	$3.3x10^3$	—	—
3	—	$7.0x10^4$	—	9	6	+	$3.1x10^4$	—	—

２回目

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物 (cfu)	脱羽後の皮 (MPN)	中抜き後の皮 (MPN)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物 (cfu)	焼烙後の皮 (MPN)	カット後の肉 (MPN)	生食用製品 (MPN)
1	—	$1.0x10^5$	15	23	4	+	$2.5x10^3$	4	—	—

2	+	$3.3x10^6$	—	23	5	—	$1.4x10^4$	—	—	—
3	—	$4.3x10^4$	—	9	6	+	$1.0x10^3$	—	—	—

3 回目

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu)	脱羽後の皮(MPN)	中抜き後の皮(MPN)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu)	焼烙後の皮(MPN)	カット後の肉(MPN)	生食用製品(MPN)
1	+	$1.2x10^4$	460	23	4	+	$6.4x10^5$	75	4	240
2	+	$4.7x10^2$	1100	23	5	+	$2.8x10^5$	240	43	23
3	+	$1.9x10^3$	>1400	9	6	+	$1.0x10^1$	240	4	23

4 回目

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu)	脱羽後の皮(MPN)	中抜き後の皮(MPN)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu/)	焼烙後の皮(MPN)	カット後の肉(MPN)	生食用製品(MPN)
1	+	$1.2x10^5$	93	93	4	+	$8.4x10^5$	—	4	—
2	+	$2.2x10^5$	240	93	5	+	$1.2x10^7$	240	—	4
3	+	$1.5x10^7$	240	460	6	+	$2.4x10^6$	4	—	—

5 回目

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu)	脱羽後の皮(MPN)	中抜き後の皮(MPN)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu)	焼烙後の皮(MPN)	カット後の肉(MPN)	生食用製品(MPN)
1	+	$4.2x10^6$	93	—	4	+	$2.8x10^5$	—	—	—
2	+	$2.4x10^6$	4	4	5	+	$1.3x10^7$	—	—	—
3	+	$8.8x10^3$	4	—	6	+	$1.3x10^4$	—	—	4

表 3　加熱用食鳥肉を生産する認定小規模処理場Bの調査結果

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu)	脱羽後の皮(MPN)	中抜き後の皮(MPN)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu)	チラー後の皮(MPN)	解体後の肉(MPN)	加熱用製品(MPN)
1	+	$1.1x10^5$	>1400	>1400	4	+	$8.9x10^3$	23	240	23
2	+	$5.5x10^3$	1100	460	5	+	$1.9x10^3$	—	23	4
3	—	$2.5x10^3$	—	460	6	—	$0.5x10^3$	4	4	9

表 4　処理場Cの調査結果

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu)	脱羽後の皮(MPN)	チラー後の皮(MPN)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu)	加熱後の皮(MPN)	解体後の肉(MPN)	生食用製品(MPN)
1	+	$3.2x10^5$	240	240	4	+	$1.1x10^5$	—	—	—
2	+	$1.7x10^5$	1100	240	5	+	$1.5x10^5$	—	—	—
3	+	$6.8x10^5$	23	150	6	+	$6.4x10^4$	—	—	—

表４−２　処理場Cの調査結果（２回目：MPN/10g）

解体工程 むね	解体工程 もも	解体工程 ささみ	製品 むね	製品 もも
4	>1400	93	4	—
4	23	23	—	—
—	—	9	—	—

表４−３　処理場Cの調査結果（３回目：MPN/10g）

焼烙後 皮	解体工程 むね	解体保存 むね	製品 1	製品 2
240	—	4	240	9
4	—	4	15	4
4	—	4	—	3

表５−１　処理場Eの調査結果（１回目）

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu/g)	脱羽後の皮(MPN/10g)	チラー後の皮(MPN/10g)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu/g)	焼烙後の皮(MPN/10g)	解体後の肉(MPN/10g)	製品(MPN/10g)
1	+	$6.6x10^3$	>1400	43	4	+	$4.1x10^6$	—	—	23
2	+	$3.8x10^5$	460	240	5	+	$7.3x10^5$	93	23	4
3	+	LA	>1400	460	6	+	$7.7x10^5$	—	—	—

表５−２　処理場Eの調査結果（２回目）

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu/g)	脱羽後の皮(MPN/10g)	チラー後の皮(MPN/10g)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu/g)	焼烙後の皮(MPN/10g)	解体後の肉(MPN/10g)	製品(MPN/10g)
1	+	$8.0x10^2$	460	43	4	+	$3.8x10^3$	—	—	—
2	+	$4.8x10^5$	75	150	5	+	$7.9x10^3$	—	—	—
3	+	$3.5x10^5$	>1400	75	6	+	$2.9x10^5$	—	—	—

表6　処理場Fの調査結果

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu/g)	脱羽後の皮(MPN/10g)	チラー後の皮(MPN/10g)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu/g)	焼烙後の皮(MPN/10g)	解体後の肉(MPN/10g)	製品(MPN/10g)
1	+	$1.7x10^6$	460	23	4	+	$2.0x10^5$	—	—	—

2	+	$1.3x10^7$	1100	23	5	+	$2.2x10^4$	—	—	—
3	+	$4.4x10^5$	93	9	6	+	$5.2x10^4$	—	—	—

表７　処理場Gの調査結果

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu/g)	脱羽後の皮(MPN/10g)	チラー後の皮(MPN/10g)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物(cfu/g)	焼烙後の皮(MPN/10g)	解体後の肉(MPN/10g)	製品(MPN/10g)
1	+	$8.4x10^4$	43	—	4	+	$6.1x10^4$	—	—	—
2	+	$2.1x10^4$	93	—	5	+	$5.4x10^6$	—	—	—
3	+	$4.5x10^5$	93	—	6	+	$2.3x10^4$	15	—	—

表８－１　処理場Hの調査結果（１回目）

検体	拭取場所	検体数	陽性数	検体	拭取場所	検体数	陽性数
チラー後風乾前と体	表面	10	1	氷冷後分割前と体	表面	10	2
チラー後風乾前と体	腹腔内	10	1	分割後ブロック肉	皮面	10	2
風乾後焼烙前と体	表面	10	0	冷蔵庫保管ブロック肉	皮面	5	0
風乾後焼烙前と体	腹腔内	10	0	冷蔵庫保管ブロック肉	皮面	5	0
焼烙後と体	腹腔内	10	8	環境	まな板など	10	0

表８－２　処理場Hの調査結果（２回目：MPN/10g）

チラー前の皮	チラー後の皮	焼烙直後の皮	焼烙後氷冷中の皮	解体後の肉	製品
23	9	—	4	4	—
23	9	—	9	23	—
43	23	—	—	—	—
93	93	—	—	—	—

表９－１　処理場Iの飼育農場における鶏クロアカスワブの調査結果

鶏舎	雌雄	検体数	*C.jejuni*陽性数	*C. coli*陽性数
A	♀	4	2	1
A	♂	4	3	0
B	♀	4	1	2
B	♂	4	1	3
C	♀	4	0	4
C	♂	4	0	3

* 同農場の餌、水、堆肥、敷料は８検体全て陰性であった。

表９－２　処理場Iにおける工程ごとのカンピロバクター菌数

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物 (cfu/g)	脱羽後の皮 (MPN/10g)	焼烙後の皮 (MPN/10g)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物 (cfu/g)	外剥ぎ後の皮 (MPN/10g)	解体後の肉 (MPN/10g)	再焼烙後の製品(MPN/10g)
1	—	$1.8x10^4$	1100	1100	4	—	$1.2x10^5$	9	—	—
2	+	$1.6x10^4$	1100	460	5	—	$4.0x10^2$	9	9	—
3	—	$1.7x10^4$	460	93	6	—	$2.0x10^2$	43	43	—

表１０－１　処理場Jの最終製品カンピロバクター汚染菌数（MPN/10g）

材料番号（各５検体）	1	2	3	4	5
もも肉	23	23	23	4	23
むね肉	23	9	9	—	—
ささみ	4	4	—	—	—

表１０－２　処理場Jにおける工程ごとのカンピロバクター菌数

鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物 (cfu/g)	脱羽後の皮 (MPN/10g)	チラー後の皮 (MPN/10g)	鶏番号	クロアカスワブ	盲腸内容物 (cfu/g)	焼烙後の皮 (MPN/10g)	解体後の肉 (MPN/10g)	製品(MPN/10g)
1	—	$6.0x10^5$	93	150	4	—	$2.6x10^7$	—	4	4
2	+	$1.7x10^7$	>2400	150	5	—	$1.6x10^4$	—	—	4
3	—	$3.1x10^4$	>2400	9	6	—	$8.7x10^5$	4	4	9

搬入

放血

湯漬け

脱羽

手動脱羽

中抜き

チラー

乾燥

焼烙

焼烙後

解体室

解体

解体

カット

製品

図１－１、A処理場の解体処理工程

脱羽後

内蔵摘出

内蔵摘出

チラー後

焼烙後

焼烙後

図１－２、A処理場における衛生指導箇所

搬入

クロアカスワブ

脱羽

解体室
（中抜き）

中抜き
作業中

チラー
（バブル）

図２、B処理場の解体処理工程

搬入

放血

湯漬

脱羽

チラー

焼烙

焼烙

外剥ぎ解体

解体

内蔵

カット

製品

図３、C処理場の解体処理工程

放血

湯漬

脱羽

洗浄冷却

懸吊焼烙

外剥

解体

図4、D処理場の解体処理工程

放血

湯漬

脱羽

冷却

内臓中抜き

焼烙

店舗へ移動

解体

製品

図5、E処理場の解体処理工程

放血

湯漬

脱羽

内臓中抜き

冷却

個別洗浄

網上焼烙

解体

製品

図6、F処理場の解体処理工程

放血

湯漬

脱羽

冷却

冷却２

チェーン懸吊

チェーン懸吊焼烙

シャワー冷却

外剥

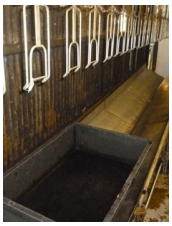
解体

製品

図7、G処理場の解体処理工程

放血

湯漬



脱羽

内臓中抜き

冷却

乾燥

チェーン懸吊焼烙

氷冷

解体

スライス

製品

図8、H処理場の解体処理工程

放血

脱羽

洗浄

焼烙

焼烙

外剥

運搬移動

再焼烙・スライス

製品

図９-1　Ｉ処理場の解体処理工程

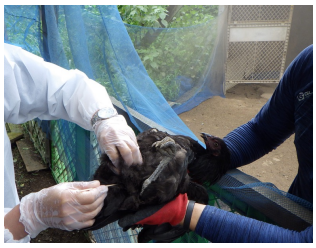


図９-2　Ｉ処理場の併設される養鶏場

放血

湯漬

脱羽

冷却

内臓中抜き

焼烙

棚へ移動

解体・冷却

製品

図１０　J処理場の解体処理工程

令和 2～4 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）
「と畜・食鳥処理場における HACCP 検証手法の確立と
食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究」
分担総合研究報告書

生食用食鳥肉製品の工程管理手法の確立に向けた研究

研究分担者	朝倉　宏	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	山本　詩織	国立医薬品食品衛生研究所
	町田　李香	国立医薬品食品衛生研究所
	有田　佳子	国立医薬品食品衛生研究所
	濱崎　隼人	とりさし協会

研究要旨：南九州地方では従前より普及してきた生食用食鳥肉の製造から消費に至る工程での総合的な衛生管理が自治体及び関連事業者団体により作成・遵守され、その安全確保に努めている。一方、他地域では加熱用食鳥肉を消費段階で生食に転用することでカンピロバクター食中毒が多発している。南九州地方で普及する生食用食鳥肉の衛生管理に係る知見を収集するため、先行研究では同地域で生食用食鳥肉を製造加工する大規模食鳥処理場における工程管理実態を調査した。令和 2 年度からの本分担研究では、生食用食鳥肉を取り扱う事業者の多くが小規模であることを踏まえ、小規模施設で製造加工・販売された生食用食鳥肉製品を入手し、衛生指標菌定量試験に供した上で、上述の工程管理実態と照合することで、特に小規模施設で留意すべきと目される工程管理条件（中抜き手順、焼烙条件等）を整理した。また、大規模食鳥処理場で生食用として処理された食鳥中抜きとたいの冷蔵保存条件に関する調査を行い、外部の食鳥処理場より食鳥とたいを受け入れ、生食用食鳥肉を加工する小規模事業者が遵守すべき加工期限目標案（処理から 5 日後）を提起した。加えて、関連事業者団体である「とりさし協会」の協力を得て、小規模事業者向けのアンケート調査を行ったところ、食鳥処理業を営む小規模事業者では、生鳥の湯漬け温度・時間は多様ながら、鶏種や日齢に応じた対応がとられており、脱羽後とたいの冷却前流水洗浄はすべての事業者で行われていた。また、食肉処理工程では、「とりさし協会」が推奨する焼烙条件である「脚：２０秒以上、体：４０秒以上、焦げ目がつき、水分がなくなるまで」を管理基準とすることについて、概ね採用可能との回答が得られた。また、鳥刺し製品 1 食分の重量については 100g 以下であるとの情報が得られた。カンピロバクター食中毒の最少発症菌数が 500 個とされていることを踏まえると、製品 1g あたり 5CFU 未満を維持することが本食中毒の発生防止に資するものと考えられる。また、カンピロバクターの汚染状況は総じて皮部分が筋肉部位に比べ高い状況にあるため、製品の微生物学的品質評価にあたっては、鳥皮を試験に供することが安全確保に有用と考えられた。以上を踏まえ、生食用食鳥肉の衛生管理に関するガイドライン案を作成した。今後、生食用食鳥肉については、食鳥処理から消費に至る各工程で生食専用の衛生管理が必須であることが国内全体に認知されることで、加熱用鶏肉の生食への転用抑制が図られ、カンピロバクター食中毒の発生低減、ひいては国民の健康保持へと繋がることが期待される。

A．研究目的

南九州地方では、従前より、「とりさし」と呼称される生食用食鳥肉製品が製造加工、販売されている。大都市圏の飲食店でしばしば食中毒の原因とされる「とりさし」の多くが、加熱用食鳥肉を飲食段階で生食用に転用しているのに対し、当該地方の生食用食鳥肉製品は食鳥処理段階から加工、販売に至る過程で異なる方法により管理されている実態をこれまで調査してきた。

令和元年度の検討においては、当該地方の自治体の協力を得てアンケート調査を行い、当該製品の多くが小規模事業者により製造加工、販売等が行われている実態を確認してきた。

また、南九州地方のとりさし関連団体である、「とりさし協会」では、教育を通じた認証制度を設けており、加熱用鶏肉との違いを自治体が発出している衛生管理に係るガイドラインを基本としつつ、独自のより望ましい基準目標を提唱している。

以上の背景を踏まえ、本分担研究では、生食用食鳥肉製品の製造加工等の工程に関わるガイドライン作成の基礎知見を収集するため、小規模事業者により製造加工された生食用食鳥肉製品を入手し、微生物試験に供した上で、先行研究において収集した各施設の工程管理情報と照合することにより、微生物学的品質との関連性の高い要因の抽出を図った。また、大規模食鳥処理場の協力を得て、食鳥中抜きとたいの冷蔵保存期限に係る知見の収集にあたった。更に、「とりさし協会」の協力を得て、当該団体の加盟会員のうち、主に小規模事業者を対象としたアンケート調査を行い、実効性を踏まえた生食用食鳥肉の衛生管理に必要となる知見を取りまとめたので報告する。

B．研究方法

1. 生食用食鳥肉製品検体

南九州地方で生食用食鳥肉を加工販売する小規模施設のうち、昨年度工程管理実態調査対象となった 19 施設及び大規模 2 施設より、生食用食鳥モモ肉製品を購入し、冷凍状態で当所に搬入した。

2. 生食用食鳥肉製品に対する微生物試験

1）衛生指標菌定量検出試験

各検体の皮部分 25g を採材し細切後、緩衝ペプトン水（BPW）225ml に加え、1 分間ストマッキング処理を行った。同懸濁液（検体懸濁原液）及び同 10 倍階段希釈液各 1ml をペトリフィルム AC プレート、EB プレート、EC プレート及び STX プレートに接種し、使用説明書に従い、定量検出試験を行った。

2）主要病原菌の定性検出試験

上項と同一検体を対象として、MDS（Molecular Detection Assay）カンピロバクター及び MDS サルモネラに供し、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ及びサルモネラ属菌の定性検出試験をそれぞれ行った。

3. 食鳥とたいの保存過程を通じた微生物動態試験

大規模食鳥処理場において処理された同一ロットの食鳥中抜きとたい計 30 検体を、異なる時間軸で当該施設の保管温度条件（5°C以下）で保存し、その後個別包装を行い、温度ロガーを同封して冷蔵状態で当所に輸送した。到着後は速やかに 1 とたいあたり 25g の首皮を採材し、上項 2.に示す微生物試験に供した。

4. 小規模加工施設における食鳥とたい受

入れ後の温度管理実態に関する調査

鶏の生食加工業者協議会（以下、生食協議会、現とりさし協会）の協力を得て、外部の食鳥処理場より食鳥とたいを受入れ、生食用食鳥肉を加工する小規模事業者に対し、とたい受入れ後の温度管理等に関する実態をアンケート形式で調査した。

5. 統計解析

微生物検出成績と工程管理実態情報との関連性をノンパラメトリック検定法である、Kruskal-Wallis 検定を用いて解析した。

6. アンケート調査項目の作成

食鳥処理段階では①生鳥の湯漬け温度及び湯漬け時間、②脱羽後とたいの洗浄と冷却の有無及び状況、③冷却水中の次亜塩素酸濃度の管理方法を、食鳥肉加工段階では、焼烙工程の条件を、販売段階では、生食用食鳥肉製品の 1 包装あたりの重量を調査項目として、とりさし協会を通じて小規模事業者に対し、アンケート形式にて調査を行った。

C．結果

1. 生食用食鳥肉製品における微生物検出状況

生食用食鳥肉を製造加工する計 21 の小規模施設及び大規模 2 施設より、生食用食鳥肉製品計 230 検体を入手し、微生物試験に供した。何れも病原菌であるサルモネラ属菌、カンピロバクター・ジェジュニ/コリは不検出であった。衛生指標菌数試験を通じ、全体の平均菌数は一般細菌数が 3.52±1.16 logCFU/g であったほか、腸内細菌科菌群数は 1.52±1.26 logCFU/g、大腸菌数は 0.48±0.71 logCFU/g であった。一般細菌数を含め、何れの指標菌も菌数分布に対数正規性は認められなかった。

大腸菌については、不検出（5 CFU/ g 未満）が全体の 75.2%（173/230）を占めた。大腸菌が検出された 57 検体（24.8%）のうち、40 検体（70.2%）は 1.0-2.0 logCFU/g の菌数分布を示し、2.0 logCFU/g 以上は 5 施設で製造加工された 11 検体（4.8%、うち 3 施設では各 1 検体）に留まっていた。

腸内細菌科菌群数については、不検出（5 CFU/ g 未満）が全体の 31.7%（73/230）に留まった。腸内細菌科菌群が検出された 157 検体（68.3%）のうち、109 検体（69.4%）は 1.0-3.0 logCFU/g の菌数分布を示し、3.0 logCFU/g 以上は 7 施設で製造加工された 34 検体（21.7%）であった。3.0 logCFU/g 以上の腸内細菌科菌群数を示した検体より代表集落を釣菌し、菌種同定のための生化学性状試験に供したところ、4 施設由来製品検体では *Pantoea* 等の環境由来と思われる細菌であることが確認されたが、*E. coli* が寡占する施設由来検体も認められた。

また、一般細菌数と腸内細菌科菌群数との間での関連性を解析したところ、相関係数は 0.67 となり、正の相関が確認された。一方、一般細菌数と大腸菌数の間での相関係数は 0.44 であった。

以上の成績より、生食用食鳥肉製品検体における衛生指標菌分布は総じて加熱用食鳥肉製品に比べ低い状況にあることが確認された。但し、一部の施設由来検体では糞便汚染指標菌が高頻度に検出され、各施設の工程管理実態との関連性をより詳細に検討すべきと考えられた。

2. 微生物試験成績と各施設での工程管理実態等との関連性の探索

（1）焼烙面

本分担研究で検討対象とした生食用食鳥肉製品検体はいずれも加工工程で焼烙が施されていた。まず、各製品検体の焼烙面を目視確認したところ、表裏両面が焼烙されていた製品は、5 製品（うち 1 製品は大規模施設由来）に留まり、残り 18 製品は表面のみが焼烙されていた。焼烙面の差異と微生物検出結果との関連性を探索したところ、何れの指標菌についても、両面焼烙検体は片面焼烙検体に比べ、有意に低い菌数分布を示し（P< 0.001)、特に大腸菌については、両面焼烙検体では 3 検体のみが陽性を示 し、その最大値は 1.0 log CFU/g であった。これらの成績より、両面焼烙処理は微生物制御に有用であることが数的に示された。

（2）焼烙時間及び距離

各小規模施設における焼烙処理はバーナーを用いて行われていた。一方、バーナー口径や焼烙時間、焼烙距離等については多様であることが先行研究により明らかになっている。これらの要素と微生物検出成績との関連性を解析した結果、大規模 2 施設を除く計 21 の小規模施設全体で用いられているバーナー口径が 35 ㎜から 60 ㎜の範囲にある施設は全体の約 76.2%（16/21 施設）を占めた。このうち 11 施設由来 59 検体（うち 6 施設で 51 検体を占有）からは大腸菌が検出されたが、口径がより小さな（15-30mm）或いは、より大きなバーナー（90 ㎜）を用いていた 5 施設由来の 50 検体中 49 検体、並びにバーナー口径が 35-60 ㎜の 5 施設由来の 50 検体全てでは大腸菌不検出であった。

焼烙に関わるその他の要素として、焼烙時間及び焼烙距離（火炎長、バーナー口からとたい表面までの平均距離）を含め、三次元散布図を作成したところ、対象とした 21 施設の焼烙条件は分散を呈した。大腸菌不検出または 1 検体のみ陽性となった施設（大腸菌低汚染群）と、大腸菌が 2 検体以上で陽性を示した施設（大腸菌高汚染群）の間で、ロジスティック回帰分析を行ったところ、各要素のうち、加熱時間が最も群間で有意差を持つ要素として抽出され（P=0.0013）、大腸菌低汚染群の平均が 3.27 分であったのに対し、大腸菌高汚染群の平均は 1.83 分であった。なお、バーナー口径は大腸菌低汚染群では平均 43.97mm、大腸菌高汚染群では平均 40.83mm であった。

焼烙距離は、大腸菌低汚染群の施設では平均 21.96cm、大腸菌高汚染群の施設では平均 23.08cm であった。これらのうち、例えば小口径のバーナーを使用する場合であっても、相対的に長い焼烙時間を取ることで、大腸菌陰性となっている施設が確認されたほか、大口径のバーナーを使用する場合には焼烙距離を短くとることにより、単位時間あたりの焼烙面積を抑え、とたい全周を焼烙するために十分な焼烙時間をとることで大腸菌陰性となっている施設も存在した。

以上より、焼烙処理にあたって焼烙距離は上述の指標を目安に可能な限り短くとり、焼烙時間を例えば 2 分以上に延長させること等が焼烙による微生物汚染低減に有効な対策と考えられた。

（3）内臓摘出手順

先行研究で行ったアンケート調査において、内臓摘出手順については、頸部を切開後、総排泄口を切開するとした施設と総排泄口を切開後、頸部を切開するとした施設に大別されていた。また、前者については、頸部切開後、同切開部よりそ嚢及び食道を摘出する場合と、頸部を切開した場合も、剥離のみを行い、食道より下部の消化管等を総排泄口から摘出する場合がみられていた。本研究の対象とした検体を処理していた施設では、いずれも頸部を先に切開する取り扱いではあったが、摘出方法を含めて大腸菌検出結果を比較したところ、食道以降を総排泄口から摘出した群の平均±SD値が 1.26±0.95 log CFU/g であったのに対し、そ嚢及び食道を頸切開部より摘出後、筋胃以降を総排泄口から摘出した群の同値は 0.95±0.34 log CFU/g となり、両群間で有意な差異が認められた（P＜0.001）。

以上の成績より、内臓摘出手順としては、頸部を切開後、そ嚢及び食道を同切開部より摘出した後、総排泄口切開部より、筋胃以降の消化管等を摘出する手順を取ることが、大腸菌汚染低減に有効と考えられた。

3. 大規模食鳥処理場において生食用として処理された食鳥中抜きとたいの保管条件に関する評価

近年、食鳥処理場の集約化に伴い、食鳥中抜きとたいを受入れ、生食用食鳥肉製品を加工する小規模施設の割合が増加傾向にある。これらの小規模施設が受け入れる食鳥中抜きとたいは概して大規模食鳥処理場で処理されたものであることを踏まえ、生食用の食鳥とたいを処理する大規模食鳥処理場の協力を得て、当該施設で処理された食鳥中抜きとたいについて、異なる時間、当該施設の保管条件である 5°C以下で保管した後の微生物挙動を評価した。

食鳥中抜きとたいの首皮部位における一般細菌数は、保存 2 日後の中央値として 4.20 log CFU/g であったが、時間経過に伴い、保存 5 日後の中央値は 5.70 logCFU/ g、保存 7 日後の中央値は 7.50 logCFU/g へと有意な増加を示した。これに対し、腸内細菌科菌群数及び大腸菌数は時間経過に伴う増加を認めず、同糞便汚染指標菌数の中央値は保存 2 日後でそれぞれ 2.90 log CFU/ g、2.90 log CFU/ g、保存 7 日後ではそれぞれ 2.50 log CFU/ g、2.25 log CFU/ g であった。

食鳥肉の主要な危害要因であるカンピロバクター・ジェジュニ/コリ及びサルモネラ属菌について定性試験により検出を試みたところ、カンピロバクター・ジェジュニ/コリは全ての検体で不検出となったが、サルモネラ属菌については、保存 7 日後の 1 検体より検出された。

以上の成績より、生食用に処理された食鳥中抜きとたいを生食用食鳥肉として加工に供する際の冷蔵保管期間としては、5°C以下で 5 日以内が妥当と考えられた。

4. 小規模施設における受入後の食鳥中抜きとたいの保存条件に関する調査

鶏の生食加工業者協議会（現、とりさし協会）の協力を得て、同協会加盟会員のうち、認定小規模食鳥処理場を営む 24 事業者に対し、原料（食鳥とたい）、製品、販売ショーケースにおける冷蔵温度管理実態に関するアンケート調査を依頼し、うち 9 事

業者から回答が得られた。回答事業者における冷蔵庫内実測温度は保存対象の別を問わず、いずれも 10°C以下を満たし、特に 4 事業者では、各冷蔵庫の実測温度は全て 4°C以下であった。一方、3 事業者からは、原料冷蔵庫の情報のみが得られ、製品冷蔵庫、販売ショーケースの情報については回答がなかった。

5. 小規模事業者における食鳥処理段階での衛生管理

南九州地方で生食用食鳥肉を取り扱う事業者の多くが小規模である実態を鑑み、とりさし協会の協力を得て、同協会に加盟する小規模事業者宛に工程管理に関する追加アンケート調査を行った。

①生鳥の湯漬け条件

生鳥の湯漬け条件に関する問いに対し、計 9 事業者から回答が得られた。湯漬け温度の最低値は 60°Cであったが、当該事業者の処理時間は 60〜120 秒と他事業者に比べ、相対的に長い傾向を認めた。また、温度の最高値は 75°Cであった。

回答があった 7 事業者の平均湯漬け処理時間は約 64 秒、最短時間は 25 秒であった。

②脱羽後とたいの洗浄の有無

脱羽後とたいについては、9 事業者中 6 事業者で「洗浄している」との回答があり、1 事業者は「汚れている場合には洗浄している」との回答であった。残り 2 事業者については「洗浄していない」との回答であった。

③冷却水の種類、温度及び塩素濃度管理

本項目については 7 事業者から回答があり、脱羽後とたいの冷却にあたり使用している冷却水の種類としては、4 事業者が「氷水」、2 事業者が「流水」、1 事業者が「チラー水」との回答が得られた。

次に、「氷水」の温度管理状況を確認したところ、2 事業者は 3°C〜8°C、4°C〜10°C と 10°C以下の回答であったが、残り 2 事業者では 10〜15°C、または氷がなくならないように管理（温度測定は実施していない）との回答であった。このうち、1 事業者は中抜き処理方式をとっており、食鳥中抜きとたいを洗浄・消毒しているとのコメントが付されていた。

なお、「流水」を用いた冷却を行うと回答のあった事業者の水温は 12°C〜18°C、または 15〜20°Cであった。これに対し、「チラー水」を用いている事業者では 6°C〜9°Cに水温を管理しているとの回答があった。

④焼烙条件

「とりさし協会」では、「脚：２０秒以上、体：４０秒以上、焦げ目がつき、水分がなくなるまで」を推奨すべき焼烙条件として例示している。食鳥処理業に併設して食肉処理業を営む小規模事業者に対し、加工時の当該条件を満たしているかについて回答を求めたところ、すべての事業者より条件を満たしているとの回答があった。

6. 小規模事業者における食肉加工段階での衛生管理

上述の「とりさし協会」推奨ガイドラインで示される焼烙条件を満たしているかを、生食用食鳥肉の加工を営む小規模事業者に照会したところ、計 6 事業者から回答が得られ、うち 5 事業者では「満たしている」と回答があった。1 事業者では「満たしていない」との回答であったが、当該事業者は正肉を外部の処理事業者より受け入れ、

塩素濃度 100ppm で 30 分間攪拌浸漬して殺菌し、流水タンク内で洗浄した後、上下ガスバーナーコンベアを 15 秒間通過させることで焼烙工程を管理しており、製品について数回のふき取り検査を実施し、一般細菌が陰性であることを確認しているとのコメントがあった。

7. 小規模事業者が製造加工する、とりさし製品の重量

とりさし製品を販売する小規模事業者に 1 包装あたりの最少重量について調査を行ったところ、いずれも 100 g 以下との回答が得られた。

D. 考察

本分担研究では、南九州地方で製造加工、販売・消費される、生食用食鳥肉製品の衛生管理実態と更なる安全確保に向けて、特に実効性の観点から検討を進めてきた。

先行研究では大規模食鳥処理場及び併設される食肉加工施設における生食用食鳥肉の工程管理に関する検討を進め、事業者が定めた管理要件に従って適切に製造加工された生食用食鳥肉及び食鳥中抜きとたいについては、カンピロバクター汚染リスクは極めて低い状況にあることを確認した。一方、南九州地方で生食用食鳥肉を取り扱う事業者の多くは小規模である実態を管轄自治体及び関連業界団体から聴取した上で、小規模事業者における工程管理実態について調査を進めた。これらの活動を通じて得られた情報として、特に加工段階で用いられる焼烙の条件については、「とりさし協会」が定める内容に従うこと、そして温度管理や食鳥とたいの洗浄・冷却を徹底すること等について、実効性並びに一定の統一性を踏まえた内容として提案するに至った。

また、カンピロバクター食中毒の最少発症菌数が 500 個と認知されている状況を踏まえて行った製品あたりの重量から、カンピロバクターについては、1g あたり 5 個未満の汚染状況となるよう担保していくことが、当該食中毒の発生防止に資すると目された。なお、製品の成分規格目標の項目としてはこのほかにサルモネラ属菌及び糞便汚染指標としての大腸菌（β-グルクロニダーゼ産生大腸菌）を用いることが妥当と考えられる。これまでに管轄自治体により作成されたガイドラインの成分規格目標としては、糞便汚染指標菌として糞便系大腸菌群が示されているが、令和 2 年度調査結果では、これに類似する腸内細菌科菌群が多くの事業者由来製品から検出され、代表製品検体から単離された菌株の同定試験を行った結果、製品由来の腸内細菌科菌群は原料由来ばかりではなく、施設環境由来と思われるものも一定の割合で検出されており、ヒトへの病原性がない、或いは不明な菌属種も複数検出される状況にあった。国際動向として、食品等の直接的な糞便汚染指標菌としてはβ-グルクロニダーゼ産生大腸菌が多くの国で採用されている一方、糞便系大腸菌群は他国では殆ど採用されていない現況、更には微生物検査実施にあたっての効率性や細菌分類学上との整合性等を踏まえると、生食用として製造加工、販売される「とりさし製品」の成分規格目標としてはβ-グルクロニダーゼ産生大腸菌を採用し、陰性を担保できているかを検証することが合理性に富むと思料される。

更にサンプリングプランについて、「と

りさし協会」では少なくとも年に 2 回以上検査の実施を推奨しており、これに沿って微生物試験を実施することで検証は実効性あるものとなると思料される。但し、小規模事業者の中には、これを自身で実施することが困難な事業者も相当数あると見込まれることから、食鳥検査員が現在実施している食鳥処理場における外部検証と平行する形で、自治体が収去検査として実施し、陰性を確認することをもって適切と判断することも可能と考えられる。なお、微生物試験にあたっては、採材部位はこれまでの汚染状況に係る知見を踏まえ、皮部位を原則とし、かつカンピロバクターは冷凍により死滅しやすいため、須く冷凍出荷している製品を除き、冷凍していない製品を試験対象とすることが妥当と考えられる。

以上の知見を踏まえ、本分担研究では、生食用食鳥肉の製造加工等における衛生管理ガイドライン案を作成し、厚生労働省担当官に共有した。これらの知見の活用を通じたガイドライン発出等は、生食用食鳥肉は、食鳥処理場から販売・消費に至る過程で生食用の工程管理がなされたもののみが流通販売消費される必要性が我が国全体に浸透し、加熱用鶏肉を飲食店等で生食に転用することで多発するカンピロバクター食中毒の発生低減へと繋がる事が期待される。

E．結論

本分担研究では、南九州地方で生食用食鳥肉を取り扱う、食鳥処理場及び食肉加工場での衛生管理実態情報並びに製品の微生物学的評価を進めた。両者を照合することにより、例えば、焼烙条件は、「とりさし協会」が推奨するガイドラインに示される条件が実効性に富む状況にあることが確認されたほか、安全を確保する上で重要と思われる管理要件について抽出･整理を行った。更に、成分規格目標を含め、生食用食鳥肉の衛生管理ガイドライン原案を策定した。

F．研究発表

１．論文発表

1) 朝倉宏. 食肉・食鳥肉製品のハザードとその管理. 保健医療科学. 2021. 70：100-106.

2. 学会発表等

1) 朝倉宏、山本詩織、町田李香、中馬猛久. 南九州で製造加工される生食用食鳥肉製品における衛生指標菌汚染分布と工程管理との関連性に関する検討. 第 42 回日本食品微生物学会学術総会.

2) 朝倉宏. 生食用食鳥肉の製造加工を通じたリスク管理について. 第 58 回獣医疫学会学術集会シンポジウム.

3) 朝倉宏. 生食鳥食鳥肉製造加工の高度衛生管理に関する研究について. 令和３年度食肉及び食鳥肉衛生研究発表会.

4) 朝倉宏. 生食用食鳥肉製造加工の高度衛生管理について. 令和 3 年度食品安全行政講習会.

5) Asakura H. Surface-burn process immediate after slaughter for the improvement of microbiological quality in poultry meat. 54th Korean Society for Food Science of Animal Resources (KoSFA) International Sympodium and Annual Meeting.

G．知的財産権の出願・登録状況

なし

令和 2～4 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）
「と畜・食鳥処理場における HACCP 検証方法の確立と
食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究」
分担総合研究報告書

と畜場・食鳥処理場の内部検証に関する研究

研究分担者　山崎栄樹　国立大学法人帯広畜産大学
研究協力者　倉園久生　国立大学法人徳島大学
奥村香世　国立感染症研究所

研究要旨：と畜場法と同施行規則、並びに食鳥処理場の事業の規制及び食鳥検査に関する法律と同施行規則の改正に伴い、と畜場及び食鳥処理場においては自治体等が行う外部検証が要件とされた。外部検証を効果的に実施するためには事業者が自ら行う内部検証活動との連携が有効である。本研究ではと畜・食鳥検査員が実施する外部検証と事業者が実施する内部検証の連携強化を目的として外部検証通知と整合性のある内部検証プログラム（内部検証の手順書案）の作成を行った。加えて、微生物試験の評価方法について科学的根拠を提示する目的で、衛生指標菌検出と病原微生物汚染の比較検証を行った。衛生指標菌検出と病原微生物汚染の相関解析においては、枝肉に対する自主検査成績が生菌数 2 $\log_{10}$ cfu/cm^2 以下かつ大腸菌陰性程度まで、外部検証における微生物検査成績が生菌数 3 $\log_{10}$ cfu/cm^2 以下かつ腸内細菌科菌群陰性程度まで低減されていれば枝肉における病原微生物汚染の可能性が低いと見込まれた。内部検証の手順書案の作成にあたっては、事業者及びと畜・食鳥検査員に対する聞き取り調査から明らかになった内部検証の意義についての理解不足、内部検証活動と外部検証活動の連携不足等の問題を解決するために、施行規則等で示される検証活動の目的の理解促進、令和２年５月発出「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」との整合性確保を主たる作成方針として設定し、加えて、海外の HACCP に係る規格との整合性についても考慮した。作成した手引書案の活用により、事業者側には検証の目的の理解促進による内部検証活動の実効性の向上及び外部検証を意識した内部検証の実施が期待され、一方でと畜・食鳥検査員側には内部検証との連携による外部検証活動の効率化が期待される。今後、本手順書案の事業者による活用は、内部検証の確実な実施と高度化へと繋がると共に、と畜・食鳥検査員による効果的・効率化な外部検証活動へと波及することが期待される。

A．研究目的

平成３０年に交付された「食品衛生法等の一部を改正する法律」では、改正の柱の一つとしてHACCPに沿った衛生管理の制度化が示された。同法に基づき、と畜場法第６条第１項第２号及び第９条第１項第２号及び、食鳥処理場の事業の規制及び食鳥検査に関する法律（以下、食鳥検査法）第１１条第１項第２号においてHACCPに基づく衛生管理（食品衛生上の危害の発生を防止

するために特に重要な工程を管理するための取組）に関する要求が明文化され、令和２年より本格的な運用が開始される事となった。同要求に基づくと畜場及び食鳥処理場（認定小規模食鳥処理事業者を除く）の衛生管理においては、事業者が自ら実施する内部検証に加え、と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施が義務付けられており（と畜場法施行規則第３条第６項及び第７条第５項、食鳥処理の事業の規制及び食鳥検査に関する法律施行規則（以下、食鳥検査法施行規則）第４条第４項）これを受けて、令和２年５月２８日付け生食発０５２８第１号「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（以下、「外部検証通知」）が通知された。同通知内ではと畜検査員及び食鳥検査員が実施する外部検証について、その手順及び評価方法が示されており、令和３年６月より全国的に同通知に従った外部検証の実施が本格的に開始され、微生物試験データの全国的な解析も進められている。

外部検証通知の中では外部検証で確認する事項として、微生物検査（同通知内別添１及び２の第９項）に加え、施設・設備管理に関する手順書の確認、生体・と体の取り扱いに関する手順書の確認及びHACCPプランに関する手順書の確認（同通知内別添１及び２の第４項の（１））、施設・設備管理に関する記録及び実施状況の確認及び教育訓練の確認（同通知内別添１及び２の第４項の（２））、生体・と体の取り扱いに関する記録及び実施状況の確認及び教育訓練の確認（同通知内別添１及び２の第４項の（３））について示されている。微生物検査以外の確認事項の内容は同通知内で別表１及び別表２として示されており、と畜検査員及び食鳥検査員はそれぞれ同別表に示された個々の内容について現場及び記録の確認を通じて、衛生管理が適切に行われていることを評価することとなっている。

と畜場及び食鳥処理場において効果的な外部検証を実施するためには、検証活動の独立性を保ちながらも、事業者が自ら実施する内部検証の結果を有効活用することが望まれる。本研究では外部検証の円滑な導入手法について検討する目的で、施設の構造及び管理体制が異なる複数の事業者に対する内部検証活動の実態調査及び、と畜・食鳥検査員に対する外部検証活動の実態調査を行った。また、微生物試験に関する外部検証項目の妥当性及び外部検証結果の評価方法について科学的根拠を提示する目的で、病原微生物汚染実態と衛生指標菌検出状況の比較検証を行った。さらに、事業者及びと畜・食鳥検査員に対する聞き取り調査から明らかとなった外部検証と内部検証の連携不足に関する問題に対して、事業者の内部検証実施の支援を目的として外部検証と連携した内部検証プログラムの提案を起案し、事業者が参照可能な内部検証の手順書案の作成を行ったので報告する。

Ｂ．研究方法

１．調査対象施設

衛生管理に関する外部認証等の状況が異なる複数の事業者（と畜事業者２社、食鳥処理事業者１社）及び、食肉衛生検査所（4所）について聞き取り調査調査を実施した。このうち、と畜事業者事１社は国内流通製品工場、対米輸出向け製品対応工場、対EU輸出向け製品対応工場を有しており、と畜

事業者 1 社及び食鳥処理事業者については SQF 認証施設（国内流通製品工場）を運営していた。

２．内部検証の実施状況についての調査

微生物検査については、各事業所において自主検査として実施する項目について実施頻度、採材方法、試験方法及び管理基準を調査した。微生物検査以外の項目については、外部検証通知の別表 1 に示された項目について実施状況及び頻度について各施設に書面アンケートを送付し回答を得た。加えて電話等によるインタビューを実施し、外部検証への対応状況について聞き取り調査を実施した。

３．衛生指標菌の検出状況と病原微生物汚染の比較検証

調査対象事業者からと畜事業者 1 社を選定し、同事業者の国内流通製品工場において 2020 年 10 月～2021 年 2 月の期間に 2～3 週間隔で計 7 回（各採取日において、牛・豚それぞれ 1 と体づつ）のサンプリングを実施した。各サンプリングにおいて同一と体に由来する生体外皮拭き取り試料、枝肉拭き取り試料、枝肉切除試料の 3 検体を 1 セットとして採取し、生菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、大腸菌群数、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌数（以上、3M™ペトリフィルムを使用）及び、腸管出血性大腸菌（STEC）（「アメリカ合衆国向け輸出食肉認定施設における牛肉からの腸管出血性大腸菌 026、045、0103、0111、0121、0145 及び 0157 の検査法について」（最終改正日：令和 2 年 4 月 1 日の方法）に従った、クリオバックス ™ システム Q7 による試験）による検査を実施した。

４．HACCP に関する海外規格の調査

the Code of Federal Regulation Title 21 （以下、CFR Title 21）、 ISO22000:2018 食品安全マネジメントシステム、及び製造の SQF 食品安全コードで示される検証に関わる要求事項について整理を行なった。これらの中で、検証についての要求事項が最も詳細に述べられているのは CFR Title 21 であった。

C．結果

１．内部検証（微生物試験）の実施状況について

各事業者が自主検査として実施している微生物試験の項目について書面アンケート形式での調査を実施し回答を得た。生菌数に関しては同項目に対する自主検査が必須となっている対 EU 向け製品のみならず、国内向け製品等についても広く自主検査が実施されている事が確認された。他方で、外部検証通知で微生物検査項目として指定されている腸内細菌科菌群検査については事業者による自主検査実施項目として一般的ではない実態が明らかとなった。また、大腸菌数については「と畜場法施行規則の一部を改正する省令等の施行について」（平成 9 年 1 月 28 日衛乳第 25 号）において必須項目として指定されているため、国内向け製品工場では広く実施されており、加えて大腸菌群数についても国内での衛生指標菌としての認知度が高いことから、比較的広く実施されている事が確認された。病原微生物検査については営業形態により検査対象微生物は多様であり、輸出向け製品工場の併設等、特段の理由がない限りはその実施実績は低い傾向が見られた。

２．衛生指標菌の検出状況と病原微生物汚

染の比較検証

微生物汚染状況と衛生指標菌の検出状況の相関について考察する目的で枝肉を対象とした微生物試験を行った。内部検証モデルとして枝肉拭き取りサンプルを、外部検証モデルとして枝肉切除サンプルを同一と体から採取し、また、比較対照として枝肉サンプリングを行なった牛及び豚の屠畜前（生体洗浄後、スタンニング直前）の外皮より拭き取りサンプルを採取した。各サンプルに対して、衛生指標菌として生菌数、腸内細菌科菌群数、大腸菌数、大腸菌群数を、病原微生物汚染の指標としてSTEC(牛のみ)、サルモネラ属菌、黄色ブドウ球菌について検査を実施し、7回の独立した採取日のそれぞれにおいてと畜前後の汚染状況について比較したところ、と畜前には病原微生物汚染の指標としたSTEC（牛のみ）及び黄色ブドウ球菌（牛及び豚）が検出された一方で、と畜後の枝肉においては拭き取り試験及び切除試験のいずれにおいてもこれらの病原微生物は検出されなかった。この時、生菌数についてはと畜前に牛で5 $\log_{10}$ cfu/cm^{2}程度、豚で4 $\log_{10}$ cfu/cm^{2}程度であったものが、と畜解体後には牛豚ともに拭き取り試験で2 $\log_{10}$ cfu/cm^{2}以下程度、切除試験で3 $\log_{10}$ cfu/cm^{2}以下程度まで低減されていた。腸内細菌科菌群及び大腸菌群については、と畜前に牛で2.5 $\log_{10}$ cfu/cm^{2}程度、豚で1 $\log_{10}$ cfu/cm^{2}程度であったものが、と畜解体後には拭き取り試験及び切除試験のいずれにおいても多くのもので検出限界以下まで低減されていた。大腸菌についても、と畜前に牛で1.5 $\log_{10}$ cfu/cm^{2}程度、豚で0.5 $\log_{10}$ cfu/cm^{2}程度であったものが、と畜解体後には拭き取り試験及び切除試験のいずれにおいても多くのもので検出限界以下まで低減されていた。

３．内部検証（微生物試験以外）の実施状況及び外部検証への対応ついて

外部検証通知においては同通知内別表１及び２の項目について、月一回以上の記録確認及び、原則毎日の現場検査を実施する事となっている。別表１及び２に示された確認項目は膨大なものであり、これらの外部検証を効率的に実施するためにはと畜事業者が自ら行う内部検証活動の結果を有効活用することが不可欠であると考えられる。そこで本研究では外部検証通知と内部検証実施状況の整合性について検証を行う目的で、各事業者に対して内部検証の実施状況及び頻度について書面アンケート及びインタビュー形式での調査を行った。

と畜場法施行規則においては第３条第１項及び第７条第１項においてと畜場の衛生管理及び衛生的なとさつ・解体に関する要求事項が、食鳥検査法施行規則においては別表第三において食鳥処理場の衛生管理及び食鳥、食鳥とたい、食鳥中抜とたい及び食鳥肉等の衛生的な取扱に関する要求事項が示されている。外部検証通知の別表１及び２に示される各項目については上記の施行規則内の要求事項とよく一致しており、施行規則に則った適切な事業所運営を行う事で外部検証通知の別表１及び２に示された全ての確認事項への対応が可能な仕組みとなっている。一方で、衛生管理等に対する検証については、と畜場法施行規則では第３条第１項２６号及び第５項４号に加え第７条第１項２０号及び第４項４号において、食鳥検査場法施行規則では別表第３第４号ハに加え第４条第３項４号において要求事

項として示されている。事業者への聞き取り調査の結果、施設の衛生管理及びと体等の衛生的な処理作業（と畜場法施行規則第３条第１項及び第７条第１項関連及び、食鳥検査法施行規則別表第三関連）についての理解は非常に進んでおり、各工程の管理記録も十分に作成されていることが確認された。一方で、検証（と畜場法施行規則第３条第１項２６号及び第５項４号、及び第７条第１項２０号及び第４項４号関連及び、食鳥検査法施行規則別表第３第４号ハ及び第４条第３項４号関連）については、事業者によってその理解度が様々であり、この事が原因で内部検証に対する取り組み状況（方法及び頻度）が多様であることが明らかとなった。

食肉衛生検査所に対しても聞き取り調査を実施し、外部検証の実施方法について確認するとともに、現状の問題点について抽出を行なった。各食肉衛生検査所では外部検証通知に従った外部検証活動が実施され、ウォークスルー方式での現場確認に加え、事業者が作成した記録の検査も実施されていることが確認された。外部検証通知においては別表１及び２の項目について月一回以上の記録確認及び、原則毎日の現場確認を実施する事となっており、各食肉衛生検査所では基本的にこれらの頻度に従った検証活動が実施されていたが、別表１及び２に示された確認項目は膨大なものであり、原則毎日実施する現場確認と併せてその作業量が膨大なものとなっていることも明らかとなった。また、内部検証と外部検証との間の連携も弱く、この事が原因でと畜・食鳥検査員による外部検証の負担が大きくなっている事も明らかとなった。

４．内部検証の手順書案の作成

検証活動に関する聞き取り調査の結果、事業者においては検証に関する理解が進んでいないこと、及び外部検証との連携がなされていないことが明らかとなり、事業者に対する内部検証実施支援の必要性が抽出された。そこで本研究では、事業者が参照可能な内部検証の手順書案の作成を行った。内部検証の手順書案の作成にあたっては、事業者及びと畜・食鳥検査員への聞き取り調査の結果を踏まえ、以下の作成方針を設定した。

・検証の目的について事業者の理解促進を図る
・施行規則と内部検証の関連性について明確化する
・外部検証通知との整合性を図り、内部検証と外部検証の連携を強化することで外部検証の効率化に資するものとする
・検証の頻度等について海外の HACCP に係る規格との整合性を考慮する
・事業者の負担軽減のために、チェックシート方式を基本とする

本研究においては、上記の方針に従って手順書の原案を作成した後、作成した原案に対してと畜・食鳥検査員及び事業者からの意見聴取を行い、実行性を高めた形での内部検証の手順書の最終案を作成した。手順書案の構成及び概要は以下の通りとなっている。

４-１．手順書案の目的

手引書案では最初に「背景及び目的」の項を設け、同書の目的を明確化した。事業者の HACCP 構築支援についてはこれまで、厚生労働省や関連団体等から複数の手引書が示され、衛生管理計画の解説のほか、記録様式例

が示されてきたところである。しかしながら、検証活動に係る具体的な手順については例示が少ない状況であった。検証活動は各事業所の製造工程、衛生管理計画及び衛生管理に関する記録の種類に対応した形で事業所ごとに計画されるべきものである。この理由から、本来であれば検証活動については共通した手順や様式等を示すことが難しくなっている。しかしながらと畜場及び食鳥処理場においては、外部検証通知が示された事によって、外部検証との連携を主たる目標とすることで事業者に提案可能な共通した検証の手順書案を示すことが可能となった。手順書案では「背景及び目的」にて「本手順書案が外部検証において確認される記録の確実な取得の支援を主たる目的とする」と説明し、これを参照することで外部検証に対応した形での効率的な内部検証の実施が可能であることを示した。各手順書案内の「別紙 1 記録の整備状況の確認シート」では、外部検証通知の別表 1 及び別表 2 を参照することで外部検証との連携を図った。一方で、各記録自体の作成方法については厚生労働省や関連団体から発表されている HACCP 構築のための手引書等を参照する様に記述し、本手順書案が HACCP の手引書を補完するものであることを示すことで、これまでに公表されている HACCP の手引書との差別化を強調し、手順書案の目的を明確化した。

４-２．検証についての説明

手順書原案に対する意見聴取を通じて、事業者のみならず外部検証員においても検証活動についての理解が十分では無いことが明らかとなった。そこで本手順書案では、「1. 検証とは」の項に検証活動の構造に関する説明を加えることとした。すなわち、検証が「衛生管理計画の妥当性確認」と「衛生管理の継続的検証」から構成される事を説明し、さらに「衛生管理の継続的検証」は「手法の妥当性検証」「実施状況の検証」及び「効果の検証」の 3 つの要素からなることを説明した。これらの分類については CFR Title 21 に示される検証に関わる要求事項を参照し、HACCP に係る海外の規格との整合性を確保している。それぞれの要素については「目的」「方法」「頻度」について実施するべき具体的な活動等を示した。各々の項目における具体的活動内容については CFR Title 21 で示される要求事項のうち特に重要と考えられるものに内容を絞り、事業者にとって無理のない内部検証を実行可能となるように構成した。「手法の妥当性検証」では測定機器（温度計等）の外部校正及び精度確認により施行規則及び衛生管理計画が求める値を真に達成しているかについて確認することとした。「実施状況の検証」においては、作業の現地確認と記録の振り返りを要求した。と畜場法施行規則及び食鳥検査法施行規則においては、検証活動の一つとして教育訓練の効果の確認が求められている。事業者に対する聞き取り調査から、教育訓練については教育訓練の記録はあるものの、効果確認の記録については不十分であることが明らかとなっており、作業の現場確認による教育訓練効果の確認について解説する必要性がしめされた。手順書案では施行規則で記述される「教育訓練の効果」について「各工程の作業者が衛生管理計画及び手順書に示された作業を意図した目的に沿って適切に実施できるかどうかを確認すること」と解説し、現場確認により教育訓練の効

果が確認できることを解説した。加えて、作業の現場確認を記録の整備と紐付け、作業の現場確認に伴って確実な記録の取得がなされるように促している。記録の振り返りについては検証活動において最も重要な要素の一つであるものの、その重要性について事業者及びと畜・食鳥検査員にて認識が弱く、このため手順書案内では記録の振り返りの重要性について特に丁寧な説明を加えた。すなわち、製品検査の結果と同様に衛生管理の記録が製品の安全性を実証するための証拠となること、食品衛生上の問題が発生した場合に記録に基づき責任の所在の究明がなされることを説明し、事業者への聞き取り調査において実施率が高いとは言い難かった記録の振り返り活動について確実な実施を促した。「効果の検証」においては、これまで事業者で実施されていた微生物検査が「日々の作業が衛生管理計画及び手順書で決められた通りに実施された場合に、安全な製品の製造が可能であったかを実証する」手段であり、検証活動の一環であることを説明した。

手順書案では上記の項目のうち、日々の作業の確認及び振り返りとして実施される 3 種類の継続的検証の具体的手法について以降の項で詳細に解説した。

4-3．継続的検証の具体的手法の提示

「衛生管理手法の妥当性の検証方法」としては、過去に公表されている「と畜場におけるとさつ・解体処理の衛生管理計画作成のための手引書（HACCP に基づく衛生管理）」（公益財団法人日本食肉生産技術開発センター編）、「食品製造における HACCP 入門のための手引書［食鳥処理・食鳥肉処理編］」（厚生労働省編）等との整合性を図り、温度計の校正方法についての解説を行った。と畜場法施行規則及び食鳥検査法施行規則においては温度に関する要求事項が複数示されているため、事業所内で使用する温度計の校正方法について詳細に解説することで、事業者による衛生管理手法の施行規則への妥当性が上昇するものと考える。「衛生管理の実施状況の検証方法」の項では、作業の現場確認に加え、これまでに事業者において記録の振り返りの実施状況が悪かった実態を受け、記録の振り返りについて他の項目よりも詳細な手順の提示を行った。すなわち、前述の様に記録整備及び振り返りの重要性を示した事に加え、記録の整備状況の確認及び記録の振り返りに必要な「記録の整備状況の確認シート」及び「記録の検証シート」を提示し、加えて「記録確認のフローチャート」を提示することで事業者が適切な記録の振り返り活動を実施可能となるように解説した。同項では、最初に各施設での記録の整備状況の確認のために「記録の整備状況の確認シート」を提示した。同シートの作成にあたっては外部検証通知との整合性の確保し、外部検証通知の別表 1 及び 2 で確認する事項に関する記録を事業者側で確実に取得可能となるように構成した。次に、別紙 1 で挙げた各記録を別紙２の「記録の検証シート」に転記し、記録の振り返りをチェックシート方式で実施可能とあるようにした。チェックシートの記入に際しては、別紙 3 として「記録確認のフローチャート」を提示し、フローチャートに従うことでモニタリング状況と是正処置の妥当性の確認が可能となるように構成した。記録確認の頻度については CFR Title 21 との整合性を確保するために週 1 回程度に設定した。

これらの手順の提示により、事業者の負担を大幅に増やすことなく、外部検証通知との整合性を確保した上で、CFR Title 21 でも要求されているモニタリング状況と是正処置の検証を行いながら記録の振り返りが可能となる構成となっている。「衛生管理計画の効果の検証方法」では、これまで事業者で実施されていた微生物検査が検証活動の一部であることを明確にするとともに、試験結果の評価にトレンド解析を導入することによって、効果的な検証活動に繋がるように解説した。微生物試験法としては、従前より事業者が参照している厚生労働省通知（「と畜場法施行規則の一部を改正する省令の施行等について」（平成 9 年 1 月 28 日衛乳第 25 号）及び「食鳥処理場における HACCP 方式による衛生管理指針について」（平成 4 年 3 月 30 日衛乳第 71 号））を提案し、事業者が負担無く手引書を導入できるように配慮した。

D．考察

本研究では外部検証通知で示された外部検証の実効性及び円滑な導入手法について検討することを目的として調査を行い、調査により抽出された内部検証と外部検証の連携不足の問題に対して外部検証の円滑な実施に資する内部検証の手順書案を作成した。加えて、病原微生物汚染実態と衛生指標菌検出状況の比較検証により、外部検証及び内部検証における微生物試験の評価指標についても検討を行った。

事業者が自主検査として実施する微生物検査については、生菌数及び大腸菌数検査が一般的な実施項目であり、輸出向け工場併設等の特段の理由がない限りは病原微生物についての検査は実施されてはいない事が調査により明らかとなった。製品の安全性確保の観点からは病原微生物汚染のモニタリングは非常に有効である。このため、病原微生物汚染状況を推察可能な衛生指標菌数の基準値を示していく事は、より高度な衛生管理の実現に資するものと考える。衛生指標菌数と病原微生物汚染の相関解析のパイロットスタディとして本研究で行った比較検証実験の結果からは、内部検証（枝肉拭き取り検査）成績が生菌数 2 $\log_{10}$ cfu/cm^2 以下かつ大腸菌陰性程度まで低減されていれば病原微生物汚染の可能性は低いと見込まれ、自主検査結果を評価する際にはこれらの値が一定の目安となるものと考えられた。加えて、外部検証（枝肉切除法）成績においては生菌数 3 $\log_{10}$ cfu/cm^2 以下かつ腸内細菌科菌群陰性程度まで低減されていれば病原微生物汚染の可能性は低いと見込まれ、これらの値が外部検証で実施する微生物検査を評価する際の目安になるものと考えられた。これらの値は Commission Regulation (EC) No 2073/2005 に示される衛生指標菌に対する基準とも合致しており、国際整合性を考慮する上でも妥当な目安であると考えられる。今後、各施設にて外部検証で実施される微生物試験においても同様の相関解析を行い、それらの結果からより信頼性の高い基準値が提示されることを期待する。

微生物試験の方法に関して、外部検証通知においては国際整合性の確保の目的で切除法による検査が採用された。一方で、事業者による自主検査においては現在でも拭き取り法が利用されている。と畜・食鳥検査員及び事業者に対する聞き取り調査からは、微

生物試験について方法の統一化に関する意見も多く抽出された。しかしながら、本研究で提案した手順書案においては、事業者の負担軽減を意図して、微生物試験の方法として従前より事業者が参照している厚生労働省通知を提案し、外部検証通知とは異なった拭き取り法による検査方法を示した。外部検証における微生物試験結果については全国的な解析が既に開始されており、今後、その結果が衛生管理状況の評価に利用される事となる。一方で、自主検査結果の全国的な解析は現実的には実現困難である。そのため、個々の事業者において外部検証と内部検証の微生物試験結果を比較しつつ検証を進めることが望まれる。内部検証の手順書案においては外部検証通知と同様に、検証結果の評価は結果の絶対値の短期的な評価ではなくトレンド解析が重要であることを説明した。手順書案にて提案した自主検査におけるトレンド解析の導入は食品衛生管理の高度化を図る上で重要な提案であるのみならず、外部検証結果と自主検査結果の比較解析において有効なツールになると期待している。外部検証と内部検証における微生物試験法の整合性確保については今後の課題とし、有効なシステムの構築を目指したいと考えている。

と畜場及び食鳥処理場の外部検証については本格的実施の開始から約 2 年を迎え、と畜・食鳥検査員にて外部検証通知に沿った形で詳細な検証活動を実施頂いているところである。一方で、外部検証通知に示される作業は膨大なものとなっており、持続可能な外部検証実施体制の整備のためには今後、外部検証作業の効率化に関する取り組みが求められるものと考える。本研究では外部検証の効率化に向けた取り組みの一つとして、外部検証と内部検証の連携強化を目的とした内部検証手順の提案を起案した。事業者に対する聞き取り調査においては、外部検証に対する協力姿勢は強いものの、外部検証通知の内容については事業者側では意識しておらず、このことが外部検証と内部検証の連携の大きな障害となっていることが明らかとなった。本研究で作成した手順書案では外部検証において確認される記録について事業者側での確実な取得を主たる目的の一つとして設定している。内部検証の手順書案の中で示す記録の取得・確認作業においては、外部検証通知の別表にて示される確認項目を引用し、外部検証で行う各検証作業の意図について事業者側でも共有し、それをもって外部検証の確実性の上昇も見込んでいる。今後、内部検証の手順書案を参照することで事業者側においても外部検証の意図を理解していただき、その意図に沿った形での記録の取得をして頂けるように期待している。これらの意識の共有は外部検証の効率化に繋がるのみならず、内部検証の効率化も期待され、事業者側にとっても大きなメリットを提供するものであると考える。

CFR Title 21 にも示される様に検証は妥当性確認と継続的検証の 2 つの工程に大きく分けられる。内部検証の手順書案ではこのうち継続的検証に多くの解説を割き、妥当性確認については簡潔な説明のみを記載した。妥当性確認には科学的かつ専門的な知識が要求されるため、妥当性確認（衛生管理計画及び手順書の妥当性確認）についてはと畜・食鳥検査員との連携が推奨されるものと考える。内部検証の手順書案は外部

検証通知との整合性を持たせることで、記録確認に係る検証を簡略化する事が可能となるよう企図した。事業者による本手引書案の活用により、外部検証における継続的検証に関すると畜・食鳥検査員の負担軽減へと繋がり、その分、専門的知識を有する検査員による妥当性確認活動の重点化へと波及することが期待される。

E．結論

本研究では、衛生指標菌汚染と病原微生物汚染の相関解析のパイロットスタディを行うと共に、外部検証通知の有効性を高める目的で外部検証通知と連携可能な内部検証プログラム提案を行った。内部検証の手順書案では、検証の目的・重要性についての事業者の理解不足の解消、及び内部検証と外部検証の連携の強化を主たる目的とし、内部検証の確実な実施と高度化による外部検証の円滑化と有効性の強化を期待している。手順書案の作成においてはと畜、食鳥検査員及び事業者からの意見を反映した改定を行うことで実行性を高め、事業者にとって無理なく導入可能なものとしている。作成した手順書案については今後、公益財団法人日本食肉生産技術開発センター等の関連団体を通じて事業者に広く公開する事を目指し、事業者が HACCP システムの高度化を図りたい場合に参照可能な選択肢の一つとして活用されることが期待される。

F．研究発表

論文発表

1. Yamasaki E, Matsuzawa S, Takeuchi K, Morimoto Y, Ikeda T, Okumura K, Kurazono H: Rapid Serotyping of *Salmonella* Isolates Based on Single Nucleotide Polymorphism-Like Sequence Profiles of a *Salmonella*- Specific Gene. *Foodborne Pathog. Dis.*, 18(1): 31-40, 2020
2. Okumura K, Kaido M, Yamasaki E, Akai Y, Kurazono H, Yamamoto S: Genomic Sequences of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains with Various Fluoroquinolone Resistance Profiles. *Microbiol. Resour. Announc.* 9(38): e00199-20, 2020
3. Yamasaki E and Fukumoto S: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Yezo sika deer *Cervus nippon yesoensis* in the Tokachi sub-prefecture of Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 84(6): 770-776, 2022

学会発表

1. 山崎栄樹、福本晋也：北海道十勝地方におけるエゾシカの腸管出血性大腸菌保有状況調査. 第 24 回腸管出血性大腸菌感染症研究会、2022 年 10 月 13-14 日、神奈川県川崎市

G．知的財産権の出願・登録状況

該当なし

令和2-4年度 厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「と畜・食鳥処理場におけるHACCP検証方法の確立と
食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究」

分担総合研究報告書
国際動向を踏まえた情報の収集整理

分担研究者　廣井豊子 (至学館大学)

研究要旨
日本国内のと畜場・食鳥処理場での「HACCP に基づく衛生管理」において、実効的な外部検証法を構築し実施することは、と畜場・食鳥処理場の衛生管理が適切に行なわれていることを担保する上で重要である。国内での実効的かつ国際標準的な外部検証法を構築するにあたり、日本より先行してと畜場・食鳥処理場での「HACCP に基づく衛生管理」を導入している諸外国での実施内容等を把握することは有用であると考え、諸外国での衛生管理の検証に関する情報の収集を行なった。すでにと畜場・食鳥処理場に「HACCP に基づく衛生管理」を導入しているアメリカ合衆国、欧州諸国、オーストラリア等諸外国の政府機関が発行すると畜場・食鳥処理場での HACCP 検証に関する法規、ガイドライン、告示並びに関連文献等を検索収集し、外部検証法、特に微生物試験に関する内容 (検査対象項目等) の要点をまとめた。いずれの国・地域も、衛生管理状況の評価及び病原体あるいは糞便汚染の低減化の確認等の目的で、外部検証として複数項目の微生物試験を実施していた。試験に用いる検体の採取部位や試験項目の一部には共通点が見られる一方、検体採取方法、検体採取頻度等には、海外諸国間でも相違があることが明らかとなった。この結果を踏まえ、国際動向を踏まえつつ、日本の多様なと畜場・食鳥肉処理場での適切かつ円滑な衛生管理検証法の構築及び提案には、本調査で明らかになった諸外国の情報を参照とし、相違がみられた試験条件に関する科学的検証、国内のと畜場・食鳥処理場の現状 (処理場の施設や設備、処理数、処理工程手順、管理能力、実際の枝肉やとたいの微生物汚染状況等)を考慮した検討が重要であると考えられた。

A. 研究目的

平成30年の「食品衛生法の一部を改正する法律」の公布に伴い、国内のと畜場・食鳥処理場には「HACCPに基づく衛生管理」の実施が求められることとなった。「HACCPに基づく衛生管理」は、令和2年6月に施行となり、その後1年間の経過措置期間を経た令和3年6月より完全に実施となっている。同制度では、と畜場・食鳥処理場の事業者が行う内部検証に加え、自治体等が外部検証を実施することで、と畜場・食鳥処理場の衛生管理が適切に行なわれていることが担保される。と畜場・食鳥処理場への「HACCP方式での衛生管理」の導入に関しては、各事業団体等が衛生管理の手引書を作成し、その啓発や普及が進められた。一方で、手引書を元に各事業者が構築した衛生管理計画の施設への導入及びその運用の適切性を判断する検証法に関しては、令和2年5月に「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について(生食発0528第1号) 」において、外部検証について技術的助言がなされた。しかし、多様な国内施設全体を対象にした実効性のあるHACCP外部検証法として確立させるには、更なる検討や調整が必要である。

そこで本研究では、日本国内のと畜場・食鳥処理場における「HACCPに基づく衛生管理」の実効的な外部検証法を構築するために有用となる情報を提供することを目的として、と畜場・食鳥処理場の運営及び獣畜・食鳥のと殺解体処理工程において既に「HACCP方式での衛生管理」を実施している海外諸国から、関連する法規、ガイドラインや科学的知見等の情報を検索及び収集し、と畜場・食鳥処理場の衛生管理における検証法の国際的な動向の把握を行った。

B. 研究方法

令和 2 年度は、まず初めに、と畜場・食鳥処理場の運営及び獣畜・食鳥のと殺解体処理において「HACCP 方式での衛生管理」をすでに実施している海外の国及び地域の探索を行なった。その後、牛や豚等獣畜のと畜 (と殺解体)を実施していると畜場に焦点を当て、HACCP による衛生管理を導入している海外諸国における HACCP 検証に関する情報 (と畜場の衛生管理に関する法規、ガイドライン、検証法に関連する通知、科学的知見、微生物試験に関する詳細 (検査対象項目等))等を収集し整理を行った。収集対象の資料及び情報は、最新のものを収集する必要から、改正や変更が速やかに反映されると考えられる電子ファイルと主とし、インターネットを介してオンラインで収集した。また情報収集

元は、海外諸国の政府や政府関連機関等の公的機関のホームページ等とした。
　令和 3 年度は、令和 2 年度の「獣畜のと畜を行うと畜場における衛生管理」に関する情報収集と同様の手法により、食鳥の解体を行う食鳥処理場に焦点を当て、食鳥処理場における衛生管理や検証に関する情報を収集した。
　令和 4 年度は、と畜場・食鳥処理場の衛生管理・検証に関する最新情報を継続して収集し、追加訂正を行う共に、国内の状況との違いを踏まえ、要点を整理した。

C. 研究結果

と畜場・食鳥処理場の運営及び獣畜・食鳥のと殺解体処理において「HACCP方式での衛生管理」を実施している国及び地域の探索：
日本からの食肉 (牛肉, 豚肉等の獣畜肉及び食鳥肉)の輸出に際して、事業所の認定要件としてHACCP方式による衛生管理を必要としている国を「と畜場・食鳥処理場の運営、食肉処理にHACCP方式の衛生管理を取り入れている国」と判断し、情報収集の対象国とした。
令和2年末時点で該当する国・地域は、米国、カナダ、英国、欧州連合EU、オーストラリア、ニュージーランド、マレーシア、ウルグアイ、サウジアラビア、シンガポール、フィリピン、インドネシア、台湾、ブラジル、アラブ首長国連邦、アルゼンチンの15の国・地域であった。（令和4年度時点では 上記にタイ、香港も加わり17の国・地域)

情報の収集：上記の国・地域について、農林水産省食料産業局 (令和3年7月より輸出・国際局)のホームページに記載されている輸出用食肉の取扱要綱の情報に加え、各国で食肉衛生を管轄する政府機関及び関連の公的機関等のホームページを情報入手先とし、それぞれの国・地域でのと畜場・食鳥処理場のHACCP方式での衛生管理に関連する法規、ガイドライン、検証法、通知等や調査研究論文等を英語若しくは日本語で公開されているものを検索した。その結果、対象とした15の国・地域のうち、概略だけの記載で、詳細な情報 (外部検証として行う微生物試験に使う検体の採取法等) が入手できない国もあったが、欧州連合EU、英国、米国、カナダ、オーストラリア等に関しては、複数の情報が英語等で閲覧が可能であった。

収集した各国の情報
<< 牛、豚等獣畜の食肉 >>
< 英国 UK >
欧州連合(EU)の規則に準拠し、さらに一部は国内法で細部を規定している。

A: 検査対象菌と対象動物
検査対象項目(菌)：一般生菌数, 腸内細菌科菌群, サルモネラ属菌
対象動物種：牛, 緬羊, 山羊, 馬, 豚

＊サルモネラ属菌の存在に関する基準及び条件は、サルモネラ属菌の有病率に見られる変化に照らして改訂される。

B: 検体採取頻度
と畜場は、年間の処理動物数に応じて、①-⑤の 5 つに分類 (*1) され、各区分で検体採取頻度及び検査対象菌株が異なる。

① 一般と畜場
初期の検体採取頻度：
一般生菌数, 腸内細菌科菌群, サルモネラ属菌：動物種毎に 1 週毎 1 回 5 検体
＊1 週間の各曜日が網羅するように、検体採取の曜日は毎週変更する。

結果が優良で採取頻度を下げる場合：
一般生菌数, 腸内細菌科菌群
5 検体/週, 6 週間連続 (30 検体/種)して優良結果の場合: 動物種毎に 2 週毎 1 回 5 検体
サルモネラ属菌
5 検体/週, 30 週間連続 (150 検体/種) して優良結果の場合: 動物種毎に 2 週毎 1 回 5 検体

② 小規模と畜場 A
初期の検体採取頻度：
・一般生菌数, 腸内細菌科菌群：動物種毎に 1 週毎 1 回 5 検体
・サルモネラ属菌：動物種毎に 4 週毎 1 回 5 検体

結果が優良で採取頻度を下げる場合：
・一般生菌数, 腸内細菌科菌群
5 検体/週, 2 週間連続 (10 検体/種) して優良結果の場合：動物種毎に 4 週毎 1 回 5 検体
・サルモネラ属菌：頻度の削減無し

③ 小規模と畜場 B
初期の検体採取頻度：
・一般生菌数, 腸内細菌科菌群：動物種毎に 1 週毎 1 回 5 検体
・サルモネラ属菌：必要無し

結果が優良で採取頻度を下げる場合：
一般生菌数, 腸内細菌科菌群
5 検体/週, 2 週間連続 (10 検体/種) して優良結果の場合：動物種毎に 12 週毎に 1 回 5 検体

④ 小規模と畜場 C
初期の検体採取頻度：
・一般生菌数, 腸内細菌科菌群：動物種毎に連続 5 検体

・サルモネラ属菌：必要無し

結果が優良で採取頻度を下げる場合：
一般生菌数 腸内細菌科菌群：動物種毎に優良となった最後の検査から 1 年後に連続 5 検体

⑤ 小規模と畜場 D
・一般生菌数 腸内細菌科菌群
・サルモネラ属菌：必要無し

(*1) と畜場の分類
と畜場は、年間の処理動物数によって、以下の 5 つに分類する
① 一般と畜場
年間処理数：20,000 頭超の牛もしくは馬、又は 100,000 頭超の豚, 緬羊もしくは山羊
（1 週間に 400 頭超の牛, 馬、又は 2,000 頭超の豚, 緬羊, 山羊）
② 小規模と畜場 A
年間処理数：7500 頭超 20,000 頭未満の牛もしくは馬、又は 37,500 頭超 100,000 頭未満の豚, 緬羊もしくは山羊
（1 週間に 150 頭超 400 頭未満の牛, 馬、又は 750 頭超 2,000 頭未満の豚, 緬羊, 山羊）
③ 小規模と畜場 B
年間処理数：1,500 頭超 7,500 頭未満の牛もしくは馬、又は 7,500 頭超 37,500 頭未満の豚, 緬羊もしくは山羊
（1 週間に 30 頭超 150 頭未満の牛, 馬、又は 150 頭超 750 頭未満の豚, 緬羊, 山羊）
④ 小規模と畜場 C
年間処理数：500 頭超 1,500 頭未満の牛もしくは馬、又は 2,500 頭超 7,500 頭未満の豚, 緬羊もしくは山羊
（1 週間に 10 頭超 30 頭未満の牛,馬、又は 50 頭超 150 頭未満の豚, 緬羊, 山羊）
⑤ 小規模と畜場 D
年間処理数：500 頭未満の牛もしくは馬、又は 2,500 頭未満の豚, 緬羊もしくは山羊
（1 週間に 10 頭未満の牛, 馬、又は 50 頭未満の豚, 緬羊, 山羊）

C1: 検体採取場所 ISO 17604 に準拠
冷却前の枝肉から採取する。

C2: 検体採取方法 ISO 17604 に準拠
汚染されている可能性が最も高い場所を選択。(ISO 17604 で、牛 12 箇所, 豚 10 箇所, 緬羊 6 個所が示されている。図 1)

＜一般生菌数、腸内細菌科菌群＞
1 回の検査: 1 個体の枝肉から 1 検体, 動物種毎に 5 個体, 計 5 検体採取
採取方法：切除法 (1 検体から 4 箇所 総計 20 cm^2）又はスワブもしくはスポンジ法　(1 検体から 4 箇所, 各 100 cm^2, 小型反芻獣は各 50 cm^2）
判定：5 検体の平均 log をとる

＜サルモネラ属菌＞
１回の検査: 1 個体の枝肉から 1 検体, 動物種毎に 5 個体, 計 5 検体採取
採取方法：スポンジ法 (最低でも 1 検体 400 cm^2 の面積),
判定：連続した 10 回の検査の検体 (50 検体) 中の陽性数

D: 試験方法
一般生菌数: ISO 4833 に準拠
腸内細菌科菌群: ISO 21528-2 に準拠
サルモネラ属菌: ISO 6579 に準拠

E: 判定基準
規則に示された限界値と比較して判定

・牛, 緬羊, 山羊, 馬
一般生菌数　単位： log cfu/cm^2

優良	3.5 (2.8) 以下
許容	3.5-5.0 (2.8-4.3)
不適合	5.0 (4.3) 超

スワブ又はスポンジ法は()内の値

腸内細菌科菌群 単位：log cfu/cm^2

優良	1.5 (0.8) 以下
許容	1.5-2.5 (0.8-1.8)
不適合	2.5 (1.8) 超

スワブ又はスポンジ法は()内の値

サルモネラ属菌　50 検体中の陽性数

優良	陰性
許容	2 未満
不適合	2 超

・豚
一般生菌数 単位： log cfu/cm2

優良	4.0 (3.3) 以下
許容	4.0-5.0 (3.3-4.3)
不適合	5.0 (4.3) 超

スワブ又はスポンジ法は()内の値

腸内細菌科菌群 単位： log cfu/cm^2

優良	2.0 (1.3) 以下
許容	2.0-3.0 (1.3-2.3)
不適合	3.0 (2.3) 超

スワブ又はスポンジ法は()内の値

サルモネラ属菌　　50 検体中の陽性数

優良	陰性
許容	3 以下
不適合	3 超

＊サルモネラ属菌の判定基準に関しては、EU 規定では以下の表記。

・牛, 緬羊, 山羊, 馬
　　優良　　2 以下
　　不適合　　2 超
・豚
　　優良　　3 以下
　　不適合　　3 超

F: その他
食肉の温度管理: 施設において、以下の温度を超えないように維持
牛肉(枝肉を含む)　　：7 °C
内臓　　：3 °C

<u>< アメリカ合衆国　USA ></u>
<u>I: 大腸菌 (Biotype 1)</u>：工程管理検証
A: 対象動物種：牛, 緬羊, 山羊, 馬, ラバ, その他の馬科動物, 豚 (*1)
2 種以上の対象動物を処理する施設は最も多くとさつする対象動物を検査しなければならない。

(*1) : 豚に関しては、事業者が複数の指標菌 (一般生菌数, 腸内細菌科菌群, 大腸菌群, 大腸菌 (Biotype 1)等)から 1 つ以上の指標菌を選ぶことを認めている。

B: 検体採取頻度
・牛, 緬羊, 山羊, 馬, ラバ, その他の馬科動物: 300 と体毎に 1 回。
・豚: 1,000 と体毎に 1 回 (*2)
上記ともに、と畜場の稼働期間中は、各週, 最低 1 回を採取すること。 ただし、小規模と畜場(*3)は、以下の通り
・スポンジ法の場合：毎年 6 月 1 日以降の 1 週間完全稼働日以降、週に最低 1 回を採取し、翌年の 6 月 1 日まで継続する、もしくは、13 検体が採取されるまで継続する（いずれか早い方）。
・切除法の場合：毎年 6 月 1 日以降の 1 週間完全稼働日以降、週に最低 1 回は採取し、一連の 13 回の検査で基準を満たすまで継続する。

(*2)：豚のと畜場では、１回の採取で内蔵摘出前前と冷却後の工程それぞれで 1 検体ずつを採取する。（1,000 頭ごとに 2 検体）。冷却は最低 12 時間行い、冷却の最大時間の制限はない。
　冷却前に脱骨を行う施設では、内蔵摘出前に１検体、脱骨前の最終洗浄後に１検体を採取する。枝肉の冷却を行う施設では、内蔵摘出前に１検体、冷却後に１検体を採取する。これらの 2 検体は、同じ枝肉から採取する必要はない。
　豚の小規模と畜場(*3) では、冷却後の工程で 1 検体を採取する。13 回連続して検体を検査した後、効果的に工程管理を維持していることを証明できる場合、その事業所は検体採取の頻度を減らすように変更するか、検体採取を中止することができる。

(*3)：小規模と畜場
・牛, 緬羊, 山羊, 馬, ラバ, その他の馬科動物：
年間処理数が、牛 6,000 頭、緬羊 6,000 頭、山羊 6,000 頭、馬、ラバ若しくはその他の馬科動物 6,000 頭を超えない、又は、牛 6,000 頭及び全家畜の合計が 20,000 頭を超えない。
・ 豚：
年間の豚処理数が 20,000 頭以下、もしくは、牛の処理数が 6,000 頭を超えずかつ全家畜の合計処理数が年間 20,000 頭を超えない。
以下の事業者は、豚の小規模と畜場としての上記の検体採取条件を適応しない。
豚の年間処理数が 20,000 頭超える場合、全家畜の年間合計処理数が 20,000 頭を超える場合、または、全家畜の年間合計処理数が 20,000 頭を超えていない場合でも牛、緬羊もしくは山羊の処理数が 6,000 頭を超えている場合。

C: 検体採取方法
・牛の枝肉：事業者は、ともばら flank、胸部 brisket、臀部 rump の 3 箇所から、切除法あるいはスポンジ法で採取する。剥皮をしていない仔牛の場合、事業者は、ともばら flank の内側、胸部 brisket の内側、臀部 rump 内側の３箇所からスポンジ法で採取する。
・緬羊、山羊、馬、ラバ、またはその他の馬科動物の枝肉：事業者は、ともばら flank、胸部 brisket、臀部 rump の 3 箇所からスポンジ法で採取する。剥皮をしていない場合、事業者は、ともばら flank の内側、胸部 brisket の内側、臀部 rump 内側の 3 箇所からスポンジ法で採取する。
・豚の枝肉：施設は、もも ham、腹部 belly、頚部 jowl の 3 箇所から切除法あるいはスポンジ法で採取する。
・スポンジ法を用いた場合は、統計的工程管理の手法を用いて検査結果を評価する

＜切除法＞
以下のサイズを 1 枚片として切り取る、
・牛
ともばら flank ：長さ 8 インチ (20.3 cm)、幅 6 インチ (15.2 cm)、厚さ 1/2 インチ (1.3 cm)
胸部 brisket　　：長さ 8 インチ (20.3 cm)、幅 6 インチ (15.2 cm)、厚さ 4 インチ (10.2 cm)
臀部 rump　　：長さ 8 インチ (20.3 cm)、幅 6 インチ (15.2 cm)、厚さ 4 インチ (10.2 cm)

・豚 (表皮を切り取る)

もも ham　　: 長さ 10 インチ (25.4 cm)、幅 5 インチ (12.7 cm)、 厚さ 1/2 インチ (1.3 cm)
腹部 belly　　: 長さ 10 インチ (25.4 cm)、幅 5 インチ (12.7 cm) 、厚さ 1/2 インチ (1.3 cm)
頚部 jowl　　: 両側からそれぞれ長さ 5 インチ (12.7 cm) 、幅 5 インチ (12.7 cm)、 厚さ 1/2 インチ(1.3 cm)
上記の検体から、試験室で直径 3.6 cm 表面積約 10cm^2 の円形の組織を 2 枚ずつ切り取り、検査に用いる。

＜スポンジ法＞
牛, 馬, 豚: 1 箇所の面積は 100 cm^2
緬羊, 山羊: 1 箇所の面積は 50 cm^2

D: 試験方法
　AOAC International の AOAC Official Method として承認されているもの、もしくは、最確数 (MPN) 法　(適切な MPN 指数の 95%上下信頼区間を満たし、外部学術団体によって評価試験が実施され、承認、公表されているもの)。

E: 判定基準
・直近の検体数 (n) 13 検体中の結果で判定する。
・合格判定値 (m) 以下の場合、合格とする。
・合格判定値 (m) から条件付き合格判定値 (M) までの条件付き合格範囲 (m~M)を示す検体数 (c) が 3 検体の場合、合格とする。
・(m~M) の値を示す検体数 (c) が 4 検体の場合、不合格とする。
M 以上の値を示す検体が 1 検体以上ある場合、不合格。

・牛, 緬羊, 山羊, 馬, ラバ, その他馬科動物

合格判定値 (m)	陰性 (*4)
条件付き合格判定値 (M)	100 cfu/cm^2
検体数 (n)	13
条件付き合格範囲の検体数 (C)	3

(*4) 陰性：検出限界 5 cfu/cm^2 以下

・豚 (*5)

合格判定値 (m)	10 cfu/cm^2
条件付き合格判定値	10,000 cfu/cm^2
検体数 (n)	13
条件付き合格範囲の検体数 (C)	3

(*5)　米国農務省食品安全検査局 (FSIS) は、豚における大腸菌の性能基準を規則から削除している。しかし、継続して大腸菌を測定している小規模事業者等が、この基準に満たすことで、米国農務省食品安全検査局 (FSIS)の要求事項への適合証明に使用することを選択することができる、と記載されている情報もある。

II サルモネラ属菌：病原体低減性能評価
A: 対象動物種：牛
＊豚のサルモネラ属菌の検査は 2011 年に廃止

B: 検体採取頻度
上記　I 大腸菌と同じ,
検査員は、抜き打ちで検体採取を行う。

C: 検体採取方法
上記　I 大腸菌のスポンジ法と同じ

D: 試験方法
　米国農務省食品安全検査局 (FSIS)監修の微生物試験室ガイドブックで示された方法 (MLG 4.10)　もしくは当該方法と同等以上の方法。

E: 結果判定基準
サルモネラ属菌の達成規格値
検体数 (n)中、最大許容検体数 (c) 以上の検体数が、達成規格値 (サルモネラ陽性率) を超えてはならない。
・去勢牛/未経産牛

達成規格値（サルモネラ陽性率）	1.0%
検体数 (n)	82
最大許容検体数 (c)	1

・廃用牛/ 種雄牛

達成規格値（サルモネラ陽性率）	2.7%
検体数 (n)	58
最大許容検体数 (c)	2

III: STEC (志賀毒素産生性大腸菌)：HACCP システム検証
(対象の血清型：*E. coli* O157:H7, O26, O45, O103, O111, O121,並びに O145)

A: 対象動物種：牛 (仔牛も含む)
B:検体採取頻度
　1 週間あたりの牛肉生産量に応じて以下の頻度で行う。
・113,400 kg 以上: 少なくとも月 1 回（年 12 回）
・2,268～113,400kg: 少なくとも 2 ヶ月に 1 回（年 6 回）
・2,268 kg 未満 : 少なくとも 3 ヶ月に 1 回（年 4 回）
　ただし、4 月から 10 月は、採取頻度を 2 倍以上にするべきである。

C: 検体採取方法
N60 法
　不適切な衛生的な処理により牛肉表面が汚染される可能性から、薄切り肉片を採取することが重要。牛肉外表面から 60 枚の薄切り検体を採取する。各検体スライス片は、長さ約 3 インチ (7.6 cm)、幅約 1 インチ (2.5 cm)、厚さ約 1/8

インチ (0.3 cm)。肉生産ロットが 60 個未満である場合を除き、 1 個体から 1 つの検体スライス片のみを採取する。
3 枚の滅菌サンプリング袋 (Whirl-Pak バッグ) を使用し、2 枚の滅菌サンプリング袋にそれぞれ検体スライスを 30 枚ずつ入れる。3 枚目の滅菌サンプリング袋には、予備として同じ生産ロットから検体を無菌的に採取する。

D: 試験方法
米国農務省食品安全検査局 (FSIS) 監修の微生物試験室ガイドブックで示された方法 (MLG 5C.01)　あるいは当該方法と同等以上の方法。
MLG 5C.01 法の概略：液体培地での増菌培養後、培養液を用いてスクリーニングとして *stx* 遺伝子 及び *eae* 遺伝子の PCR での検出を行う。スクリーニング PCR で陽性であった検体は、PCR での血清型別及び磁気ビースを用いて培養液の濃縮後、分離培地を用いて菌の分離を行う。分離培地で単離された集落を用い、O 抗原の存在を凝集試験で確認するとともに、PCR で *stx* 遺伝子 及び *eae* 遺伝子の存在を確認する。最終的に、5%の羊血を含むトリプティック大豆寒天培地に接種し、生育した単離集落を用いて、再度、O 抗原の存在、*stx* 遺伝子、*eae* 遺伝子、対象となる血清群のいずれかを有する大腸菌であることを確認し、STEC 陽性と確定する。

E: 結果判定
陽性の場合、製品が STEC に汚染されていると判定し、適正に管理し記録するとともに適正に処分を行う。陽性の製品は、加熱調理用とするか廃棄する。

<u>< オーストラリア AU ></u>
A: 検査対象菌
検査対象項目 (菌)
(1) 工程管理の検証: 一般生菌数 (APC)、（一般) 大腸菌
(2) 病原体削減の検証: サルモネラ属菌

B: 検体採取頻度
・毎日、少なくとも 1 検体/日は採取する。
・検体採取を行う枝肉は無作為に選択する。
・検体採取の頻度は、食肉処理区分、作業ラインごとに個別に決める。

一般生菌数、大腸菌
去勢牛, 未経産牛,廃用牛, 種雄牛: 300 枝肉に 1 検体
馬, ラバ, ロバ: 300 枝肉に 1 検体
豚: 1,000 枝肉に 1 検体
緬羊, 仔羊, 仔牛, 山羊: 1,000 枝肉に 1 検体
・大腸菌と一般生菌数の検査は、同じ検体から行うことができる。

サルモネラ属菌
去勢牛, 未経産牛,廃用牛,種雄牛: 1,500 枝肉に 1 検体
馬, ラバ, ロバ: 1,500 枝肉に 1 検体
豚: 5,000 枝肉に 1 検体
緬羊, 仔羊, 仔牛, 山羊: 5,000 枝肉に 1 検体

C1: 検体採取する場所
冷却後の枝肉

検体採取する枝肉の冷却時間
牛, 豚, 馬, ラバ, ロバ, ラクダ ：12 時間以上
緬羊, 山羊, その他の小型動物 ：4 時間以上
＊冷凍設備の性能評価を検証するも微生物検査の重要な要素の一つであることから、検体を採取する枝肉はすべての冷凍設備から選択する（1 つの冷凍設備からのみ選択されるべきではない）

C2: 検体採取方法
スポンジ法　（希釈液の約 10mL を用いてスポンジを湿らせ、採取前には余分な液体を絞る。）
科学的に汚染が最も高いと確認されている部位 (以下に示す) から検体を採取する。
以下に示す部位が個々の施設で汚染される可能性の高い部位ではないという証拠がある場合には、施設が代替部位を指名することができる。

採取部位と面積
・牛、馬、ラバ、ロバ
部位：ともばら flank、胸部 brisket、尻肉 butt の 3 箇所。ともばら、胸部、尻肉の順に採取する。
（スポンジの片面を使い ともばら、胸部を採取し、もう片面で尻肉を採取する。）
各部位の面積は、10 cm 四方 100 cm^2 (総面積 300 cm^2)

・緬羊、山羊、仔牛
部位：ともばら flank、胸部 brisket、腰中位 mid-loin の 3 箇所。ともばら、胸部、腰中位の順に採取する。（スポンジの片面を使い ともばら、胸部を採取し、もう片面で腰中位を採取する。）
各部位の面積は、5 cm 四方 25 cm^2 (総面積 75cm^2)

・豚
部位：腹部 belly、もも ham、頚部 jowl の 3 箇所。腹部、もも、頚部の順に採取する。
（スポンジの片面を使い腹部、もも を採取し、もう片面で頚部を採取する。）
各部位の面積は、10 cm 四方 100 cm^2 (総面積 300 cm^2)

・一般生菌数及び大腸菌検査：3 箇所の検体採取後、希釈液　（緩衝ペプトン水等）を約 15 mL 加え、最終的にスポンジに添加する希釈液の総量は 25 mL とする。
・サルモネラ属菌検査：増菌培養中スポンジが確実に希釈液で覆われるように、最終的な希釈液（緩衝ペプトン水）の量は 60～100 mL とする。

採取した検体は、0～7 ℃の温度範囲で輸送、保存する。凍結させてはいけない。一般生菌数の試験を行う場合は、0～5 ℃の温度範囲とする。

D: 試験方法
　検体の試験は、省庁が承認した方法を使用しなければならない。以下に承認されている方法の一部を示す。
・一般大腸菌: AS 5013.5-2016, AOAC 990.12, AOAC 2008.10, AOAC010404, AOAC 091702
・大腸菌 AS 5013.15-2006 (ISO 7251:2005), AOAC 991.14 及び AOAC 998.08, AOAC 110402, AOAC 070901
・サルモネラ属菌 AS 5013.10-2009 (modified ISO 6579:2002) , MLG4, AOAC 2003.09

　採取後 24 時間以内に検査を開始する。（遅くとも採取日から 2 日目までに開始する）。一般大腸菌と大腸菌の結果は、枝肉表面の CFU/cm2 として報告する。サルモネラ属菌の検査の結果は、「陰性」または「陽性」として報告する。

E: 判定基準
一般生菌数及び大腸菌
・検体数 (n) 連続した 15 検体中の結果で判定する。
・許容値 (m) 以下の場合、合格とする。
・許容値 (m) 超から許容上限値 (M) 以下までの値を示す検体が、条件付き合格範囲の検体数 (c) 以下の場合 合格とする。
・許容上限値 (M) より大きい場合、不合格。
・許容上限値 (M)より大きい値を示す検体が 1 検体以上ある場合、不合格。

大腸菌検査で不合格の場合、 10 営業日以内にと体処理手順の見直しを開始し、考えられる要因の調査、再発を防止するための是正措置及び予防措置の実施を施設に要求する。

サルモネラ属菌
検査結果を性能基準に照らして評価する。
検体数 (n)中、サルモネラ属菌が検出された陽性検体数が最大許容検体数 (c) を超えた場合、基準を満たしていないと判断する。

　サルモネラ属菌の性能基準を満たさない場合、施設は 10 営業日以内に考えられる原因を調査し、不衛生または衛生的な服装の証拠が得られた場合は、是正措置及び予防措置を取らなければならない。
サルモネラ属菌検査で陽性となった検体は、サルモネラ菌参照検査機関で血清型別を行わなければならない。

<< 食鳥肉 >>
< 欧州連合 EU >
A: 検査対象項目と対象動物
(1) 衛生管理の指標
検査対象項目 (菌)：サルモネラ属菌 (肉用鶏、七面鳥) , カンピロバクター属菌 (肉用鶏)

(2) 規格基準
検査対象項目 (菌)：サルモネラ属菌　血清型 タイフィミュリウム及びエンテリティディス) (肉用鶏)
＊サルモネラ菌の存在に関する基準及び条件は、サルモネラ菌の有病率に見られる変化に照らして改訂される。

B: 検体採取頻度
少なくとも週 1 回 5 検体。
曜日に偏りがないこと。
以下の結果の場合、検体採取を隔週に変更できる。
・サルモネラ属菌：連続した 30 週間の結果が全て適合レベルであった場合
・カンピロバクター属菌：連続した 52 週間の結果が全て適合レベルであった場合

C1: 検体採取場所
　冷却後の中抜きとたい

C2: 検体採取方法、採取量
・切除法
採取部位：頸部の皮 (頸部の皮のみでは重量が不足する場合はその他の部位の皮及び表層筋肉を含めても良い)

a: サルモネラ属菌とカンピロバクター属菌を同一試験室で検査する場合： 1 回の検体採取で少なくとも 15 羽を選定。少なくとも 3 羽分の頸部の皮 計 26 g をまとめて 1 検体 とする。5 検体 (= 15 羽分)を試験に用いる。

b: サルモネラ属菌とカンピロバクター属菌を別の試験室で検査する場合： 1 回の検体採取で少なくとも 20 羽を選定。少なくとも 4 羽分の頸部の皮計 35 g をまとめて 1 検体 とする。5 検体 (= 20 羽分)を試験に用いる。
　検体は分割し、25 g (25 g x 5 検体) をサルモネ

ラ属菌の検査に使用し、10 g (10 g x 5) をカンピロバクター属菌の検査に使用する
　いずれの場合も、採取から検査開始までの輸送時の検体の温度は 1-8 °C とする。0°C 以下になったものは使用しない。採取後 48 時間以内に検査を開始する。

D: 試験方法
サルモネラ属菌：EN/ISO 06579- 1 (あるいは、これと同等と認められた方法）
サルモネラ属菌血清型の判定：White-Kauffmann-Le Minor scheme の方法
カンピロバクター属菌：EN/ISO 10272-2　(あるいは、これと同等と認められた方法）

E: 判定
<衛生管理指標として>
・サルモネラ属菌
連続 10 回の検体採取で得た 50 検体において、検出されないこと。ただし、サルモネラ属菌が検出されたものが 50 検体中 5 検体以下であれば許容。肉用鶏、七面鳥からサルモネラ属菌が検出された場合は、血清型の判定を行う

・カンピロバクター属菌
連続 10 回の検体採取で得た 50 検体において、1,000 cfu/g 以下であること。ただし、1,000 cfu/g を超えて検出されたものが 50 検体中 15 検体 (*) 以下であれば許容。
(*: 2025 年 1 月 1 日以降は 10 検体に変更)

F: その他
　温度管理: 施設において、以下の温度を超えないように維持。
中抜きと体及び内臓　　：4 °C

<規格基準>
サルモネラ属菌 (血清型 タイフィミュリウム及びエンテリティディス)
25g 1 検体で 5 検体 (25 g x 5) において、検出されないこと

< 英国 UK > 欧州連合 EU の規則に準拠し、一部は国内法で細部を規定（欧州連合 EU にない部分のみ記載）

B: 検体採取頻度
食鳥処理場は、年間の処理動物数に応じて、①-③の 3 つに分類 (*1) され、各区分で検体採取頻度及び検査対象菌株が異なる。

① 一般食鳥処理場
初期の検体採取頻度：
サルモネラ属菌：動物種毎に 1 週毎 1 回 5 検体
カンピロバクター属菌 ： 1 週毎 1 回 5 検体 (肉用鶏のみ)
・結果が優良で採取頻度を下げる場合：
サルモネラ属菌: 5 検体/週, 30 週間連続 (150 検体/種)して優良結果の場合: 動物種毎に 2 週毎 1 回 5 検体としてもよい。
カンピロバクター属菌:5 検体/週, 52 週間連続 (260 検体) して優良結果の場合: 2 週毎 1 回 5 検体

② 小規模食鳥処理場 A
初期の検体採取頻度：
サルモネラ属菌：動物種毎に 4 週毎 1 回 5 検体
カンピロバクター属菌： 1 週毎 1 回 5 検体 (肉用鶏のみ)
・結果が優良で採取頻度を下げる場合：
サルモネラ属菌：頻度の削減無し
カンピロバクター属菌: 5 検体/週, 52 週間連続 (260 検体) して優良結果の場合: 2 週毎 1 回 5 検体

③ 小規模食鳥処理場 B
・初期の検体採取頻度：
サルモネラ属菌：必要無し
カンピロバクター属菌： 1 週毎 1 回 5 検体 (肉用鶏のみ)
・結果が優良で採取頻度を下げる場合
：カンピロバクター属菌: 5 検体/週, 52 週間連続 (260 検体) して優良結果の場合: 2 週毎 1 回 5 検体としてもよい。

(*1) 食鳥処理場の分類
食鳥処理場は、年間の処理羽数によって、以下の 5 つに分類する。
① 食鳥処理場
年間処理羽数：7,500,000 羽超の肉用鶏, 七面鳥（1 週間に 150,000 羽超の肉用鶏, 七面鳥）
② 小規模食鳥処理場 A
年間処理羽数：1,000,000 羽超 7,500,000 羽未満の肉用鶏, 七面鳥（1 週間に 20,000 羽超 150,000 羽未満の肉用鶏, 七面鳥）
③ 小規模食鳥処理場 B
年間処理数：1,000,000 羽未満の肉用鶏, 七面鳥（1 週間に 20,000 羽未満の肉用鶏, 七面鳥）

< アメリカ合衆国 USA>
　ダチョウ等平胸類（走鳥類）の食鳥処理施設を除くすべての食鳥処理施設を、事業規模に応じて以下の①-④の 4 つに区分し、検査の項目等が異なる。

・事業所の区分
① 処理数が非常に少ない施設 (Very Low Volume：VLV)
年間のと殺羽数が、鶏 44 万羽、七面鳥 6 万羽、アヒル 6 万羽、ガチョウ 6 万羽、ホロホロ鳥 6 万羽、またはひな鳥 6 万羽以下

② 超小規模施設 (Very Small)
従業員 10 名未満、あるいは年間売上高が 250 万ドル未満
③ 小規模施設 (Small)
従業員数が 10 名～499 名。ただし年間売上高が 250 万ドル未満である場合を除く。
④ 大規模施設 (Large)
従業員数 500 人以上

A: 微生物試験の対象項目と目的
対象：サルモネラ属菌, カンピロバクター属菌
目的：腸内病原体及び糞便物質による汚染防止工程の管理を維持しているかを評価

＊従来の検査で操業している超小規模施設 (Very Small) 及び処理数が非常に少ない事業者 (VLV) では、従来の検査項目である一般大腸菌 (大腸菌バイオタイプ I）の検査を選択することが可能。一般大腸菌は糞便汚染に特化したモニタリングであるため、腸内病原体を監視するための追加検査を実施することも選択できる

B: 検体採取頻度
① 処理数が非常に少ない施設 (VLV)
　毎年 6 月 1 日から少なくとも操業各週に 1 回。連続 13 回検体採取後、効果的な工程管理を実証した場合、検体採取計画を変更することができる。

② 超小規模施設, ③ 小規模施設, ④大規模施設
・鶏：とたい 2.2 万羽につき 1 回。ただし最低でも操業各週に 1 回。
・七面鳥、アヒル、ガチョウ、ホロホロ鳥、ひな鳥：とたい 3 千羽につき 1 回。但し、最低でも操業各週に 1 回。

C1: 検体採取場所
① 処理数が非常に少ない施設 (VLV): 冷蔵後
② 超小規模施設 (Very Small) : 冷蔵後
③ 小規模施設 (Small): 冷蔵前・冷蔵後の 2 回
④ 大規模施設 (Large): 冷蔵前・冷蔵後の 2 回

・冷蔵前:吊り換えから枝肉が冷蔵室に入る直前までの間の時点。冷蔵前の検体は、生体が保有していた微生物及び処理工程でとたいを汚染した腸管病原体及び糞便物質の汚染を反映していると判断。

・冷蔵後:全ての処理工程が完了し、とたいが冷却装置から出た時点。水浸漬冷却の場合は、検体を採取する前に適切な滴下時間 (60 秒以上) を確保する。

・冷蔵前と冷蔵後の間に殺菌剤等を用いた介入を実施している場合、冷蔵後の検体は、その介入効果の判断に有用である（多くの施設が 1 種以上の殺菌剤による介入を実施している）。

C2: 検体採取方法
（非破壊的手法）
・鶏肉：枝肉全体を滅菌袋にいれて 400 mL の溶液で洗浄
・七面鳥：枝肉の背中と大腿部の 2 箇所で 40 cm2 (50 cm2)の区画を拭き取る

D: 試験方法
一般的大腸菌：AOAC 17.2.01 最確数法
サルモネラ属菌：MLG4.11、MLG4 Appendix 2.06,
カンピロバクター属菌: MLG 41.05

採取後できるだけ早く分析する必要があり、遅くとも採取日の翌日には分析する必要
検体を輸送する場合は、冷蔵保存する

E: 評価
以下に示した性能基準 (*)に基づき、施設を 3 つに区分 (区分 1-区分 3) し、区分に応じた指導を実施

<u>サルモネラ菌</u>
・ブロイラー枝肉

性能基準	5 in 51
最大許容陽性率	9.8%

・七面鳥枝肉

性能基準	4 in 56
最大許容陽性率	7.1 %

<u>カンピロバクター属菌</u>
・ブロイラー枝肉

性能基準	8 in 51
最大許容陽性率	5.7%

・七面鳥枝肉

性能基準	3 in 56
最大許容陽性率	5.4 %

＊性能基準: 52 週間の期間で収集・分析された目標検体数に対する最大許容陽性数の割合。
施設を評価し分類するために、1 回の 52 週間の期間で少なくとも以下の数の検体を分析する必要がある。

ブロイラー枝肉	11
七面鳥枝肉	14

・区分 1：直近の 52 週間の検査期間において、最大許容陽性率の 50%以下を達成した事業所。
・区分 2：最大許容陽性率を満たしているが、直近の 52 週間の検査期間において最大許容陽性率の 50%以上の結果を示した事業所。

・区分 3：直近の 52 週間の検査期間の結果が最大許容陽性率を超えている事業所。

区分に応じた指導 (抜粋)
事業所が区分 2 に指定された場合：病原体の制御が不安定であることを示しており、その事業所は性能基準に不合格となる可能性があることを説明。製品が性能基準の 50%を超過した警告を送る等の措置を実施。

事業所が区分 3 に指定された場合：性能基準の不履行であったことを伝える警告を送る。事業所が是正措置を講じていることを確認し、（必要であれば）HACCP システムの再評価を行うことを説明する等の措置を取る。

< 平胸類を食肉処理する施設の微生物検査 >
一般大腸菌 (大腸菌バイオタイプ I）を試験対象とする。
平胸類及び家畜を処理する施設は、処理する平胸類または家畜の種類が最も多いものを検査対象とする。
平胸類の年間処理羽数が 6 千羽以下の施設は処理数が非常に少ない施設 (VLV)とし、検体採取は、毎年 6 月 1 日から翌年 6 月まで、または 13 回検体採取を行うまでのいずれか早い方まで、事業所の営業週に最低 1 回を継続。

< カナダ CA >
A: 検査対象項目
・サルモネラ属菌
・カンピロバクター属菌
・一般大腸菌バイオタイプ 1

＊カナダ国内向けの微生物学的モニタリングの検体採取並びに評価基準に関しては、以下の内部資料に記載されており、日本から入手閲覧することができなかった

< オーストラリア AU >
A: 検査対象項目
・サルモネラ属菌
・カンピロバクター属菌

C2: 検体採取方法
リンス法

D：考察
と畜場・食鳥処理場の運営及び獣畜・食鳥のと殺解体処理における「HACCP 方式での衛生管理」は、欧州, アジア, 北米, 南米, 大洋州, 中東の各地域の複数の主要国で導入されていた。本調査では、導入済の全ての国と地域の詳細な情報までは確認することはできなかったが、比較的早期に食品製造に HACCP 方式による衛生管理を導入し、一般的に「HACCP 先進国」とされている米国, 欧州連合, カナダ, オーストリア等の国・地域での情報を一部得ることができた。欧州諸国では、欧州連合 EU として統一した手法を基本としさらに各国が国内法等で国内の状況に合わせて変更等を加えていると考えられた。
国・地域によって入手できたガイドライン等の情報に記載されている微生物検査の項目や表記方法が統一していないため、単純には比較できないが、微生物試験に関する主要な項目を纏めた。また、諸外国で採用されている微生物検査の基準値の一部も抜粋し表として取り纏めた。
と畜場での HACCP 方式での衛生管理の評価や検証として、牛、豚等の獣畜の枝肉に対して実施されている微生物試験について、英国 (欧州連合)、米国、オーストラリア、日本の 4 カ国を比較した場合、対象微生物としては、代表的な衛生指標菌である一般細菌数, 腸内細菌科菌群, 大腸菌群, 大腸菌のうち少なくとも 1 種類は必ず実施されている。これに加えて、英国 (欧州連合)、米国、オーストラリアでは、サルモネラ属菌が検査対象となっている。しかし、英国の小規模と畜場では、サルモネラ属菌検査は不要としており、また、欧州連合としては「サルモネラ菌の存在に関する基準及び条件は、サルモネラ菌の有病率に見られる変化に照らして改訂されるもの」としている。米国においても、豚に対してはサルモネラ属菌検査は廃止されている。日本では、現在サルモネラ属菌を検証のための微生物検査項目には含めていない。サルモネラ属菌検査の必要性の有無は、海外における実施状況の動向に加え、国内の獣畜枝肉のサルモネラ属菌による汚染状況や衛生指標菌数とサルモネラ属菌数の関連性等の検討によって、判断するのが望ましいと考えられる。
検体採取の時期 (場所) に関しては、欧州連合と日本は冷却前の枝肉としている一方、米国, オーストラリアは一定時間冷却後の枝肉としている。後者の国では、冷却後の枝肉を用いることで、微生物検査の結果をと畜工程の衛生評価 (枝肉の汚染度) に加え冷却設備の評価 (増殖)も含めた総合的な評価としていると考えられる。
枝肉からの検体採取部位に関しては、英国 (欧州連合)、米国、オーストラリアでは、１つの枝肉から複数箇所を選んで検体を採取している。部位の表記名は異なるものの概ね類似した部位をISO及びオーストラリアの両者が指定している。日本、米国も同じあるいは類似部位を採取部位をしており、枝肉における採取部位にはどの国も差がないと考えて良いと思われた。検体採取方法は、日本を含めいずれの国も切除法、スポンジ法のどちらかあるいは両方を採用されている。試験の頻度は、日本以外は週に 1 回以上あるいは毎日としている。しかし英国の場合、「週 1 回以上」としつつも、一定期間検

査結果が優良であった場合検査頻度を「2週間1回」あるいは「4週間1回」に減らすことを可能としている。日本では、通知(生食発0528第1号)においては月1回以上としつつ、管轄する自治体 (食肉衛生検査所等) が各と畜場の衛生管理状況に応じて、より高い頻度で検査を実施することによって、適切な検証及び指導が可能であると考えられる。

食鳥肉では、腸管系病原体のうちサルモネラ属菌、カンピロバクター属菌の汚染頻度が高いことは世界共通で周知であり、食鳥肉の安全性確保には、これらの病原体を考慮した微生物の制御・モニタリングは欠かせない。英国 (欧州連合)、米国、カナダ、オーストラリアのいずれの国でもサルモネラ属菌、カンピロバクター属菌を検査対象としていた。日本は、衛生指標菌である一般細菌と腸内細菌科菌群の定量試験を基本とし、カンピロバクター属菌については任意としている点が他国と異なっている。カンピロバクター属菌やサルモネラ属菌の検査の必要性の有無は、国内の食鳥とたいでのカンピロバクター属菌やサルモネラ属菌の検出頻度、検出菌数に加え、衛生指標菌の菌数とカンピロバクター属菌やサルモネラ属菌の菌数との相関性の検討等を実施した上で判断することが適切であると考える。食鳥とたいからの検体の採取方法に関しては、欧州と日本が首皮の切除法を採用し、アメリカ合衆国とオーストラリアではリンス法を採用していた。

国内と畜場での牛及び豚の枝肉での微生物検査の平均の菌数 は、一般細菌数、腸内細菌科菌群数ともに、海外諸国の基準 に暫定的に当てはめた場合、優良に値するものであった。このことから、おおむね国内のと畜場の現行のHACCP方式による衛生管理に重大な問題はないと予測される。但し、国内の検体での結果の最小菌数と最大菌数の間には大きな幅があり、国内の最大菌数は海外諸国の基準で不適合に値するものもあった。このことから、国内においても適切な判定基準を設けることで、海外諸国基準で不適合と判断されうるような衛生的に問題がある枝肉等を検知し、事業者が実施する作業工程の衛生管理の評価及び指導が自治体の検査員と連携した形で適切に運用されることが重要であろう。

食鳥とたいに関しては、検査項目が海外諸国と異なるため、日本における衛生指標菌での結果を諸外国の判定基準に当てはめることはできなかった。一部の国内食鳥とたいで実施されたカンピロバクター菌の検査結果では、欧州連合の基準値である 3 log cfu/gを超えた検体が 22検体 (2.45%）存在していた。国内では、カンピロバクター菌の検査は任意であることを踏まえ、このような衛生的に問題がある食鳥とたいを検知し適切に衛生管理状態を評価及び指導するためには、現行の検査項目の適切性及びカンピロバクター菌の検査の必要性の有無についてさらなる検討を行い、より実効性のある検証手法の構築が必要と考えられた。

E: 結論

本研究では、と畜場・食鳥処理場の衛生管理に、日本より先行してHACCP方式を取り入れている諸外国の情報を収集し整理した。地域間及び日本との間で相違が見られた点に関しては、更なる根拠の創出や実態背景を踏まえた考察が必要であるものの、本研究で得られた知見は、国際標準に対応し、かつ国内におけるHACCP方式によると畜場・食鳥処理場の衛生管理に係る検証手法の改訂整備にあたっての基礎情報として活用されることが期待される。

F: 健康危機情報

なし

G: 研究発表

なし

H: 知的財産情報取得状況

なし

令和 2-4 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）
「と畜・食鳥処理場における HACCP 検証方法の確立と
食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究」

分担総合研究報告書

HACCP 検証の評価手法に関する研究

研究分担者　小関成樹　　北海道大学大学院農学研究院

研究要旨：と畜場・食鳥処理場における HACCP に基づく衛生管理状況の妥当性を検証するための評価方法を、国際的な動向を踏まえて構築することを目的として、最終的には、各事業者あるいは自治体等が自ら検証を簡易に実施可能とする評価システムを提供することを目的とした。全国の食肉処理場から収集した検査データをもとにして、牛肉、豚肉および鶏肉の一般生菌数と腸内細菌科群数、ならびに鶏肉のカンピロバクター数の基準となる菌数情報を精査した。全国各地の牛とたい、豚とたい、および食鳥とたいにおける外部検証微生物試験結果を解析し、施設間、季節間の変動を考慮した工程管理目標の提示を試みた。各とたいにおける一般生菌数、腸内細菌科群数の傾向を把握することができ、さらに、食鳥とたいにおいてはカンピロバクターの定量データが蓄積されたことで、諸外国の基準との比較検討から、工程管理目標を提示した。さらに、その情報をもとにして、実際の管理運用を目指した Monving window 方式での評価方法の素案を提示した。

A. 研究目的

本分担研究課題では、と畜場・食鳥処理場における「HACCP に基づく衛生管理」の実施状況の妥当性を検証するための評価検証方法を、国際的な動向を踏まえて構築することを目的とする。最終的には、各事業者あるいは自治体等が自ら検証を簡易に実施可能とする評価システムを提供することを目的としている。

まず、HACCP に基づく衛生管理が実施されている、諸外国の状況を把握して、日本国内での実施方法の方向性を明確にする。さらに、逐次報告されてくる国内での検査結果データをもとにして、現状の管理状況を把握することを目的とした。

次に、全国のと畜場・食鳥処理場の通年での細菌検査データを収集精査して、と畜場・食鳥処理場の衛生管理状態を把握可能とするデータ評価の素案を作成することを目的とした。

B. 研究方法

（1）国際動向の調査

と畜場・食鳥処理場において HACCP に基づく衛生管理が先行実施されている、欧州、米国、オーストラリア、ニュージーランドでの取り組みについて文献調査した。

（2）Moving window 方式での評価の検討

畜場・食鳥処理場の日本における検査体制の実態を考慮して、HACCP に基づく衛生管理が先行実施されている、欧州、米国、オーストラリア、ニュージーランドでん採用が進んでいる Moving window 方式での衛生管理状態の評価

方法を実現するための検討をした。

（3）国内施設での現状の検査状況の把握とその解析

各自治体から報告がなされる日本国内のと畜場・食鳥処理場における微生物検査データの傾向を分析し、適切な衛生管理の実施状況を推定した。

C. 研究結果および考察

（1）国際動向の調査

欧州での食鳥処理におけるカンピロバクターを対象としたはサンプリングプランとして、以下の基準での運用を行なっている。

n = 50、 c = 15、 m = 1000 CFU/g

ここで、n はサンプル数、c は基準を超えてしまうサンプル数の上限、m は基準菌数である。ただし、想定している n は「連続した」もの、すなわち、週に 1 回ずつで 50 週を想定して、その中での変動を「moving window」と呼ばれる、一定期間毎での変動をずらしつつ検証していく方法を採用している。これによって、衛生管理の実施体制が妥当であるかを、検査実施時点だけでなく、長期的、日常的な視点から検証することを目指してる。現行の基準では c = 15 となっているが、2025 年 1 月からはさらに基準を高めて、c = 10 へと移行することが決定している（EU、2017）。

米国でも欧州と同様の管理検証体制がとられており、moving window 方式での 52 週間の連続したサンプル分析の実施が行われている。ただし、サンプリンプランの基準設定は施設の規模毎に異なり、一律の基準は設定されていない。しかし、monving window 方式でのデータ推移を検証して、中長期的な視点での評価を行うことを目指している点は欧州と同様である（USDA-FSIS、2018）。

オーストラリア、ニュージーランドでの食品安全規格を所管する Food Standards Australia New Zealand (FSANZ)ではより細かな評価手法が検討されている。方向性としては欧州、米国と同様であるが、サンプリングプランがより細かく規定されいてる。すなわち、n = 45、 c = 6、 m = 3.78 CFU/carcass が規定されている。基準だけをみても、c = 6 であるとともに、m が g あたりではなく、1 と体あたりの菌数であることからも、欧州基準よりも厳格である。また、moving window 方式もより細かく規定されていて、期間の最初の 15 サンプル分の変動を初期 window として、その後 5 サンプルずつずらした各 window での許容サンプル数を検証していく方法を用いている（Lee et al.、 2016）。

諸外国の動向を考慮すれば、年間を通じての検査データの傾向を分析する moving window 方式で、サンプリングを設定した上で検証していくことが妥当であることを確認した。その場合に考慮しなければならない点としては、サンプリングプランにおける基準設定が非常に重要である。しかし、現時点では日本国内での HACCP に基づく衛生管理体制でのターゲットとする危害要因（病原体）の年間を通じてのベースラインデータが十分に存在しないことから、基準設定には、今後蓄積されていく検査データの結果を考慮して策定となる。さらに、日本国内での実態を考慮しつつ、国際的な基準との整合性も加味した基準設定が求められる。

（2）Moving window 方式での評価の検討

と畜場・食鳥処理場における牛、豚、鶏肉の一般生菌数、腸内細菌科数あるいはカンピロバクター数の検査結果は、HACCP に基づく衛生管理が適切に実行されているかを評価するための基礎データとなる。検査体制の実態を考慮すると、現状では月に一回程度の検査が現実的であることから、この検査間隔を基準にして、Moving window 方式での評価を実施するため

のエクセルのスプレッドシートを構築した。Moving window 方式を採用する場合には、window 幅（間隔）の設定が問題になるが、現状の日本の検査体制を考慮すれば、月に一回の検査で 6 ヶ月ごと、あるいは 12 ヶ月を一つの評価 window として検討するのが妥当かと考えられる。

検査結果データを入力していくと、グラフが生成されて、上限値を２回連続で超えるような事態が発生した場合には、処理工程の異常を疑い、作業工程の点検を実施する、といった意思決定の支援ツールとして活用することができる。

（3）国内施設での現状の検査状況の把握

1）牛とたいにおける外部検証の結果

厚生労働省に報告があった 121 施設の検査データの解析を行った。121 施設で 3306 検体が採材され、微生物試験に供された。採材部位の内訳は、ともばらが 22 施設 563 検体、胸部が 78 施設 2179 検体、頸部が 20 施設 534 検体であった。一般生菌数の全体の平均値は 2.34±0.97 log CFU/cm^2 であり、全体で、+3SD 超過は 8 検体（0.2%）、+2SD 超過は 96 検体（2.9%）で認められた。腸内細菌科群数の全体平均は 0.79±0.43 log CFU/cm^2 であり、全体で+3SD 超過は 104 検体（3.2%）、+2SD 超過は 220 検体（6.7%）で認められた。

採材部位の内訳は、「ともばら」が 22 施設 563 検体、「胸部」が 78 施設 2179 検体、「頸部」が 20 施設 534 検体であった。一般細菌数の分布は、「胸部」が「ともばら」および「頸部」に比べ統計的には有意に高値を示した。腸内細菌科菌群数の分布は、「胸部」及び「頸部」が「ともばら」に比べ統計的には有意に高値を示した（Mann-Whitney U test, $p < 0.05$）。

季節変動を検討したが、一般生菌数および腸内細菌科群数ともに変動は認められず、ほぼ一定の値を示した。

牛とたいに関して、仮に平均値+2SD（一般生菌数が 4.28 log CFU/cm^2、腸内細菌科菌群数が 1.65 log CFU/cm^2）を達成目標とした場合、一般生菌数では 97.3%（3218/3306）、腸内細菌科菌群数では 93.3%（3071/3291）が適合する状況にあった。また、平均値+2SD を全検体で満たした施設数は 52（43.0%）であった。このほか、同値を超過した検体数が供試検体数の 20%以内であった施設数は 56（46.3%）、平均値+3SD（一般生菌数が 5.25 log CFU/cm^2、腸内細菌科菌群数が 2.08 log CFU/cm^2）を超過した検体を含み、かつ平均値+2SD 以上の検体が供試検体数の 20%以上であった施設数は 13（10.7%）であった。

2）豚とたいにおける外部検証の結果

厚生労働省に報告があった 128 施設の検査データの解析を行った。128 施設で 3448 検体が採材され、微生物試験に供された。採材部位の内訳は、胸部が 77 施設 2040 検体、頸部が 48 施設 1343 検体、肩部が 1 施設 5 検体であった。一般生菌数の全体平均値は 2.74±0.80 log CFU/cm^2 であり、+3SD 超過は 3 検体（0.09%）、+2SD 超過は 62 検体（1.8%）で認められた。腸内細菌科群数の全体平均値は 0.96±0.53 log CFU/cm^2 であり、+3SD 超過は 55 検体（1.6%）、+2SD 超過は 181 検体（5.3%）で認められた。

採材部位の内訳は、胸部が 77 施設 2040 検体、頸部が 48 施設 1343 検体と、施設数では全体の 97.7%、検体数では一般生菌数成績として 98.1%（3383/3448）を多くを占めたことから、両部位間での試験成績を比較した。一般生菌数分布は、「胸部」が「頸部」に比べて統計的には有意に高い傾向を示した（Mann-Whitney U test, $p < 0.05$）が、その差は微生物試験結果としては無視できる範囲であった。。腸内細菌科菌群数分布についても「頸部」が「胸部」に比べ

て統計的には有意に高い傾向を示した（Mann-Whitney U test, $p < 0.05$）が、こちらも実際上は無視できる範囲であった。

年間の季節変動を検討したが、一般生菌数および腸内細菌科群数ともに変動は認められず、ほぼ一定の値を示した。

豚とたいに関して、仮に平均値+2SD（一般生菌数が 4.34 log CFU/cm^2、腸内細菌科菌群数が 2.02 log CFU/cm^2）を達成目標とした場合、一般生菌数では 98.2%（3386/3448）、腸内細菌科菌群数では 94.7%（3252/3433）が適合する状況にあった。平均値+2SD を全検体で満たした施設数は 58（45.3%）であった。このほか、同値を超過した検体数が供試検体数の 20%以内であった施設数は 64（50.0%）、平均値+3SD（一般生菌数が 5.14 log CFU/cm^2、腸内細菌科菌群数が 2.55 log CFU/cm^2）を超過した検体を含み、かつ平均値+2SD 以上の検体が供試検体数の 20%以上であった施設数は 6（4.5%）であった。

3）食鳥とたいにおける外部検証の結果

厚生労働省に報告があった 131 施設の検査データの解析を行った。31 施設で 2492 検体が採材され、微生物試験に供された。採材部位の内訳は、首皮が 71 施設 1443 検体、胸皮が 62 施設 1034 検体であった。全体の一般生菌数の平均値は 3.98±0.98 log CFU/cm^2 であり、+3SD 超過は 31 検体（1.2%）、+2SD 超過は 93 検体（3.7%）で認められた。腸内細菌科群数の全体平均値は 2.56±1.03 log CFU/cm^2 であり、+3SD 超過は 22 検体（0.9%）、+2SD 超過は 75 検体（3.0%）で認められた。

採材部位の内訳は、①首皮が 71 施設 1443 検体、②胸皮が 62 施設 1034 検体であり、③1 施設由来の検体を除き、両部位のいずれかに属した。③を除く検体の微生物試験成績を部位間で比較したところ、以下の知見が得られた。

一般生菌数および腸内細菌科菌群数の分布は、「首皮」が「胸皮」に比べて有意に高い傾向を示した（Mann-Whitney U test, $p < 0.05$）。季節変動を検討したが、一般生菌数および腸内細菌科群数ともに変動は認められず、ほぼ一定の値を示した。

4）食鳥とたいのカンピロバクター定量試験成績結果

厚生労働省に報告があった 18 自治体 53 施設の検査データの 解析を行った。53 施設で 895 検体が採材され、カンピロバクター定量試験に供された。カンピロバクター定量試験対象施設の処理方式/鶏種の内訳は、中抜き/ブロイラーが 47 施設、中抜き/成鶏が 2 施設、外剥ぎ/ブロイラーが 2 施設、外剥ぎ/成鶏が 1 施設、中抜き/あひるが 1 施設であった。

カンピロバクターは 33.1%（296/895 検体）より検出され、全体の平均菌数+SD は 0.94±0.74 log CFU/g、最大菌数は 3.75 log CFU/g であった。22 検体は欧州で達成目標値とされる 3.0 log CFU/g を超過しており、うち 15 検体は特定の処理場由来であった。2 施設では欧州の達成目標値を超過した検体の割合が 10%を超過していた。年間を通じてのカンピロバクター数の変動は認められなかった。

食鳥肉の直接的な危害要因であるカンピロバクターの定量的汚染状況は衛生指標菌定量試験成績によっては判断できないことが相関性解析を通じて示され、カンピロバクター定量試験を実施する必要性が提起されたと考えられる。

欧州の食鳥処理場で工程管理の達成目標とされるカンピロバクターが鶏皮 1 g あたり 3.0 log CFU/g を超過した検体が供試検体数の 20%以上を占めた施設も認められた。こうした施設の衛生管理実態は微生物試験を実施して確認を継続的に行いつつ、改善指導を進める必要があると考えられる。微生物試験報告様式につい

ては、カンピロバクター試験成績報告様式に含まれる鶏種や処理方式、更に年間処理羽数の情報を含めていくことで、施設毎の試験検体数や試験頻度の設定を検討することが可能になると思われる。

D. 結論

汚染実態調査結果を踏まえた、牛、豚、食鳥とたいにおける一般生菌数、腸内細菌科群数の工程管理目標値としては通年平均＋2SD を基準値として提案しうると考えられた。また、食鳥とたいにおいては、カンピロバクター数の工程管理目標案として、通年平均＋2SD（2.4 log）あるいは 欧州基準 3.0 log が妥当であると考えられた。今後の運用のなかで、検査データを蓄積しつつ長期的な観察の中で、HACCP の運用効果が評価されていくことになろう。

E. 研究発表

１．論文発表

なし

２．学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III.　研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

発表者氏名	タイトル名	発表書籍名	出版社	ページ	出版年
森田　幸雄	牛肉	生食のはなしーリスクを知って、おいしく食べるー	朝倉書店	30-35	2023
中馬　猛久	豚肉	生食のはなしーリスクを知って、おいしく食べるー	朝倉書店	41-46	2023
朝倉　宏	鶏肉	生食のはなしーリスクを知って、おいしく食べるー	朝倉書店	46-51	2023
朝倉　宏	カンピロバクター	生食のはなしーリスクを知って、おいしく食べるー	朝倉書店	69-70	2023

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻	ページ	出版年
Kumagai Y, Pires SM, Kubota K, Asakura H.	Attributing human foodborne diseases to food sources and water in Japan using analysis of outbreak surveillance data.	J. Food Prot.	83	2087-94	2020
Yamasaki E, Matsuzawa S, Takeuchi K, Morimoto Y, Ikeda T, Okumura K, Kurazono H.	Rapid Serotyping of Salmonella Isolates Based on Single Nucleotide Polymorphism-Like Sequence Profiles of a *Salmonella*- Specific Gene.	Foodborne Pathog. Dis.	18(1)	31-40	2020
Okumura K, Kaido M, Yamasaki E, Akai Y, Kurazono H, Yamamoto S.	Genomic Sequences of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains with Various Fluoroquinolone Resistance Profiles.	Microbiol. Resour. Announc.	9	e00199-20	2020
Yamamoto S, Kitagawa W, Nakano M, Asakura H, Iwabuchi E, Sone T, Asano K.	Plasmid sequences of four large plasmids carrying antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle in Japan.	Microbiol. Resour. Announc.	9	e00219-20	2020
朝倉宏	食肉・食鳥肉製品のハザードとその管理	保健医療科学	70	100-106	2021
Asakura H, Nakayama T, Yamamoto S, Izawa K, Kawase J, Torii Y, Murakami S.	Long-term grow-out affects *Campylobacter jejuni* colonization fitness in coincidence with altered microbiota and lipid composition in the cecum of laying hens.	Front. Vet. Sci.	8	675570	2021

Duc VM, Kakiuchi R, Obi T, Asakura H, Chuma T.	The incidence of *Campylobacter* contamination levels through chicken-sashimi processing steps in a small-scale poultry processing plant applying the external stripping method.	J. Vet. Med. Sci.	84	414-419	2022
Asakura H, Yamamoto S, Sasaki Y, Okada Y, Katabami, Fujimori A, Munakata K, Shiraki Y, Nishibu H, Hisamoto C, Kawase J, Ojima Y, Kiyoshima A, Shiroma K.	Bacterial distribution and community structure in beef cattle liver and bile at slaughter.	J. Food Prot.	85	424-434	2022
Ogawa A, Nagaoka H, Asakura H.	Draft genome sequence of *Campylobacter jejuni* ST-508 strain Shizu21005, isolated from an asymptomatic food handler in Japan, 2021.	Microbiol. Resour. Announc.	2022	e0031622	2022
Yamasaki E and Fukumoto S.	Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Yezo sika deer *Cervus nippon yesoensis* in the Tokachi sub-prefecture of Hokkaido, Japan.	J. Vet. Med. Sci.	84	770-6	2022
塚本真由美、苅谷俊宏、山﨑翔矢、小畑麗、向島幸司、村瀬繁樹、朝倉宏、森田幸雄.	黒毛和種牛枝肉表面に付着する異物の細菌学的汚染状況.	日本獣医師会雑誌	76	e11-e17	2023

【分担研究報告書の修正の概要】

令和６年８月１日

〇修正した内容・箇所

認定小規模食鳥処理場の調査数及びそれに伴う調査した施設結果にズレが生じた。

修正箇所

研究要旨　：９行目

B 研究方法：３行目、７行目

C 研究結果：51～60、68、72、75、76、81、84、89、92、99、108、115、118、126、135、158、162、165 行目

それに伴う、表及び図の施設名等の修正

〇修正するに至った理由

最終報告書の作成時に各年度末報告書のとりまとめを行った際、認定小規模食鳥処理場の調査で年度を跨いで行われた部分について、図表の一部重複と本文表記について混乱が生じてしまい、報告書案提出後にその誤りに気づいたため、修正に至った。なお、本修正は研究成果に影響を及ぼさない。