

令和 5 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

動物性食品輸出の規制対策の強化
に資する研究

総括・分担研究報告書

研究代表者

星薬科大学薬学部

穂山 浩

研究分担者

国立医薬品食品衛生研究所食品部

志田静夏

国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部

工藤由起子

国立保健医療科学院生活環境研究部

吉富真理

令和 6 年(2024 年) 5 月

目 次

I. 総括研究報告		
動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究	-----	1
亀山 浩		
II. 分担研究報告		
1. 動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価	-----	22
志田 静夏		
2. 牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究	-----	51
工藤 由起子		
3. と畜場 HACCP の検証を支援する資料作成に関する研究	-----	73
吉富真理		
4. 食肉衛生検査所の研修に関する実態調査	-----	84
吉富真理		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	98

I. 総括研究報告

星薬科大学薬学部

梶山浩

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)
令和 5 年度 総括研究報告書

動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究

研究代表者 穂山 浩

研究要旨

EU に動物性食品を輸出するためには、残留物質モニタリング計画を作成し、A 物質（スチルベン類等）及び B 物質（抗菌性物質等）のモニタリング検査を行う必要がある。モニタリング検査において A 物質が検出された場合は、原因を調査して必要な措置をとるまでの間、EU へ輸出することはできない。本研究では A 物質のうち、抗甲状腺薬である 2-チオウラシルが検出された場合に、その原因調査に必要な牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法を確立し、その性能を評価した。また、同じく A 物質のレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合に、その原因調査に必要な牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類（ゼラノール、タレラノール、ゼアララノンおよびゼアラレノン）分析法を確立し、その性能を評価した。対米輸出牛肉処理施設の検査所で腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌：STEC）およびサルモネラ試験で使用した検体培養残液から試験陽性対象外であるペロ毒素またはインチミン遺伝子保有大腸菌の分離やサルモネラ属菌特異的遺伝子検出を行うことで衛生指標として評価して各施設へのフィードバックによって処理工程の改善検討等に役立てること、また、各検査所での SOP 収集および検査体制の聞き取り調査を実施して対米輸出に必要な検査の逸脱防止を試みることを目的とした。STEC 試験培養液残液 40 検体およびサルモネラ試験培養液残液 86 検体を供試したところ、いずれの遺伝子も検出されなかった。供試された培養液に濁りが認められても牛脂等検体からの成分による濁りが生じることから、微生物の濁りの判別は困難であることが検体の特性として認められた。試験に用いた外部標準対象としての 16S rRNA を対象としたリアルタイム PCR 法は培養法で検出される一部の細菌を検出しないことが認められ、それらは主に、*Arcobacter* 属、*Bacillus* 属、*Campylobacter* 属、*Morganella* 属、*Proteus* 属、*Vibrio* 属および *Staphylococcus* 属であった。次に、各検査所での SOP 収集および検査体制の聞き取り調査から、同一ロットの定義が施設によって解釈が異なること、遺伝子検出では判定のトラブルが多いこと、陽性対照用 DNA 液の作製方法や確認試験の方法が異なる施設があることが判明した。各施設の採材場所、手順、検査施設・機器等を現地で確認し、多くの情報交換されたことによって検査所のこれまでの疑問点の解決や共通の問題点の把握がされた。アメリカ合衆国・EU 等向け輸出向け食肉取扱施設を管轄する食肉衛生検査所の指名検査員の検査業務を適切に実施するために行う研修に必要な教材及び仕組みの開発を目的として、各検査所の研修と研修に求められる教材、仕組みについてアンケート及びインタビュー調査を行った。また、教材開発の参考として、米国農務省の公衆衛生獣医師のトレーニング資料について調査を行った。各食肉衛生検査所では、指名検査員予定者向けの研修資料を職員が作成し、OJT を主とした研修が行われていたが、全国共通の教材として、検査業務に必要な知識をひとりで学習し、習得度の評価が可能で、動画を取り入れた教材が求められていた。教材の開発にあたり、アメリカ合衆国農務省食品検査局（FSIS）の新規採用公衆衛生獣医師向けのトレーニング資料が内容及び構成等の参考になると考えられた。と畜場の HACCP システムの検証において、指名検査員が行う科学的妥当性の判断を支援する資料の作成を目的として、スチームバキューム（以下、「SV」という。）処理による牛肉表面の微生物削減効果の妥当性確認試験を実施した結果、牛肉表面の SV 処理の *E. coli* 低減効果が示されたが、SV の処理回数や操作が影響するため、と畜場においては SV の取り扱い及び適切な使用のための手順書を作成し、その有効性を検証することが必要であることが示された。輸出食肉施設の SV の導入と外部検証の微生物試験結果との関係の比較では、SV の使用にかかわらず多くの枝肉は良好な衛生度を確保していることが判明した。また、支援資料の参考とするために、アメリカ合衆国農務省食品検査局の食肉ハザードコントロールガイドを翻訳した。

研究分担者

志田(齊藤) 静夏(国立医薬品食品衛生研究所
食品部第三室長)

吉富 真理 (国立保健医療科学院 上席主任研
究官)

工藤由起子(国立医薬品食品衛生研究所衛生微
生物部)

研究協力機関

(一財)日本食品分析センター

研究協力者 (*STEC 検査およびサルモネラ検査
の SOP に関する調査について)

鈴木竹彦、松本斉子(北海道帯広食肉衛生検査
所*)

久松暢子、北村洸人(岩手県食肉衛生検査所)

越勝男 (岐阜県飛騨食肉衛生検査所)

関口明子 (栃木県食肉衛生検査所)

川見明日香 (京都市衛生環境研究所食肉検査
部門*)

橋本朋美 (姫路市食肉衛生検査センター*)

小林将英 (熊本県食肉衛生検査所)

渡邊春香 (大分県食肉衛生検査所)

越野慶太 (宮崎県高崎食肉衛生検査所*)

廣瀬昌平、千葉由美(国立医薬品食品衛生研
究所)

北山 友子 (北海道帯広食肉衛生検査所)

久松 暢子 (岩手県食肉衛生検査所)

山崎 昭子 (群馬県食肉衛生検査所)

三浦 理恵子 (栃木県食肉衛生検査所)

坂下 幸久、塚本 真由美(岐阜県飛騨食肉衛生
検査所)

川見 明日香 (京都市衛生環境研究所食肉衛生
部門)

今井 真司、安達 恵(姫路市食肉衛生検査セン
ター)

角谷 玲雄 (大分県食肉衛生検査所)

松本 一俊 (熊本県食肉衛生検査所)

津江 友紀 (宮崎県都農食肉衛生検査所)

指宿 明星 (宮崎県高崎食肉衛生検査所)

中島 靖剛 (鹿児島県末吉食肉衛生検査所)

森田 幸雄 (麻布大学)

山崎 栄樹 (帯広畜産大学)

伊藤 里恵 (星薬科大学)

岩崎 雄介 (星薬科大学)

A. 研究目的

海外での和牛の需要の高まりや日本政府お
よび業界関係者による和牛輸出促進の影響の
ため、海外への和牛輸出量が増加している。
輸出促進のためには食品衛生管理の対策に関
する検討を行う必要がある。そこで3つの課題に
関して検討を行うことを目的とする。

第1の課題では、EU に動物性食品を輸出す
るためには、規則(EU)に従ってA物質(スチルベン
類等)のモニタリング検査を行う必要がある。牛や
鶏においてモニタリング検査またはEUでの輸入時
検査においてA物質が検出された場合に原因調
査を行うための分析法を開発し、輸出再開向け
迅速な対応が取れる体制を整備することを検討す
る。

第2の課題では、対米輸出食肉取扱施設や食
肉検査所では、牛肉の腸管出血性大腸菌(STEC)
およびサルモネラ属菌の検査を輸出先国の試験
法で実施している。そのため各検査所の標準作業
手順書(SOP)の確認および試験逸脱防止を検討
する。また各検査所での試験派生検体から遺伝子
保有大腸菌の分離やサルモネラ属菌特異的遺伝
子検出を行い、衛生指標として評価し、フィードバ
ックして処理工程の改善検討等に役立てることを
目的とする。

第3の課題では、米国及びEU等向け輸出の
動物性食品の衛生管理は公的監査体制の整備が
求められる。食肉衛生検査所の監視指導検査員
等に対し定期的に研修を行い、公的監査の知識
や技術等を修得する必要があるが、体系的に整理
された研修プログラム及び教材はない。輸出先国
等の動物性食品の衛生管理の監査担当職員向け
研修プログラムの調査、国内の監視指導検査員の
研修の実態調査等を行い、実施可能な監視指導

検査員等向けの研修プログラム及び教材を作成することを目的とする。

B. 研究方法

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

[1] 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシル分析法

(1) 前処理

試料2.5 mLを遠心管(15 mL容)に採取し、塩酸10 μ Lおよび0.25 mol/Lエチレンジアミン四酢酸溶液100 μ Lを加えて混合した。

(2) 誘導体化反応

(1)で得られた溶液に1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 8)7.5 mLおよび3-ヨードベンジルブロミド・メタノール溶液250 μ Lを加え、40°Cの水浴中で60分間振とうした。

(3) 精製

(2)で得られた反応液を、あらかじめメタノール5 mLおよび水5 mLでコンディショニングしたジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis HLB(150 mg/6 mL)]に負荷した。遠心管内を水5 mLで洗い、洗液をミニカラムに負荷した。水5 mLおよび水/メタノール(3:2)5 mLで順次洗浄した後、1分間吸引した。アセトニトリル約24 mLで溶出し、全量をフラスコ(25 mL容)に受けた後、アセトニトリルで25 mLに定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

[2] レゾルシル酸ラクトン類分析法

試料2 mLを遠心管(50 mL容)に量り採り、0.25 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.8)2 mLを加えた後、0.25 mol/L酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.8)及び β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼの混液(9:1)20 μ Lを加え、試験管ミキサーでよく攪拌した。これを密栓した後、55°Cの水浴中で2時間振とうした。

反応液を室温に戻した後、イムノアフィニティーカラム(ZearalaTest WB)に負荷した。遠心管内を水20 mLで洗い、洗液を負荷した。カラムを水/メタノール(9:1)10 mLで3回洗浄後、メタノール5 mLで溶出した。溶出液をロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した。残留物を水/アセトニトリル(3:1)2 mLに溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染調査

(1) STEC の検出

1) 試験検体の収集

食肉衛生検査所5施設での STEC 試験に伴い発生する培養液残液40検体を収集した。試験に供試されたウシの種類と月齢を表1-1に示す。

2) 試験検体の二次増菌培養

肉眼で濁りが認められない培養液残液については、培養液残液2 mLをTryptone soya broth (TSB) 8 mLに添加して42°Cで18時間培養(二次増菌培養)した。

3) 培養液残液および二次増菌培養液からの DNA 抽出

収集した培養液残液からDNAアルカリ熱抽出を行った。このDNA抽出液をマルチプレックスリアルタイムPCRのテンプレートとして用いた。

4) STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイムPCRによる判定

プライマーセット Assay1 (*stx/ee*) ではベロ毒遺伝子(*stx* 遺伝子) およびインチミンタンパク質遺伝子(*ee* 遺伝子)を、Assay2 (16S/0157) では16Sr RNA 遺伝

子および 0157 関連遺伝子を、Assay3

(026/0111) では 026 関連遺伝子および 0111 関連遺伝子を、Assay4 (045/0121) では 045 遺伝子および 0121 遺伝子を、Assay5 (0103/0145) では 0103 遺伝子および 0145 遺伝子を検出する。

リアルタイム PCR の反応条件は、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。また、Assay1 から Assay5 は、陰性対照も Ct 値 35 から 40 で検出されることから

(USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01)、Ct 値 35 未満を陽性とした。まず初めに Assay1、2 を行った。その結果、*stx* 陽性かつ *eae* 陽性の検体は、続けて Assay3、4、5 を同時に行い、7 血清群 0 遺伝子が陽性になるかを確認した。STEC 7 血清群陽性の検体は、陽性となった 0 血清型について免疫磁気ビーズ法実施した。7 血清群 0 遺伝子がない場合は STEC 7 血清群陰性とした。

5) 16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法の評価

4) に示した 16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法 (16S Assay2) および 16S Assay2 とは異なるプライマーおよびプローブの組み合わせによる 16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法に 26 菌種 (*Arcobacter butzleri*、*Arcobacter cryaerophilus*、*Arcobacter skirrowii*、*Bacillus cereus*、*Campylobacter coli*、*Campylobacter jejuni*、*Citrobacter freundii*、*Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter cloacae*、*Escherichia albertii*、*Escherichia coli*、*Escherichia fergusonii*、*Escherichia hermannii*、

Hafnia alvei、*Klebsiella oxytoca*、*Morganella morganii* subsp. *Morganii*、*Proteus mirabilis*、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium、*Shigella boydii*、*Shigella dysenteriae*、*Shigella flexneri*、*Shigella sonnei*、*Staphylococcus aureus*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Yersinia enterocolitica* および *Yersinia pseudotuberculosis*) の抽出 DNA 溶液を供試し、各 PCR 法で検出可能な細菌種を評価した。陰性対照は滅菌蒸留水を用いた。Nadkarni らは 16S Assay6 の検出限界を Ct 値 33 から 38 としており、本研究では、Assay2 と合わせて Ct 値 35 未満を検出陽性とした。

6) STEC 7 血清群の免疫磁気ビーズ法による濃縮および選択培地による単離

免疫磁気ビーズ法は、免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145、0157 「生研」(デンカ株式会社) を用いて行った。最終的に E バッファー 1 mL に懸濁したものをビーズ濃縮液とした。このビーズ濃縮液を E バッファーで 10 倍および 100 倍希釈し、各希釈液 0.1 mL をソルビトールマッコンキー寒天 (SMAC) 培地、セフィキシム・亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー寒天 (CT-SMAC) 培地、クロモアガー-STEC 培地およびセフィキシム・亜テルル酸加クロモアガー-STEC (CT-クロモアガー-STEC) 培地にそれぞれ 1 枚ずつ塗抹した。

さらに、酸 (1 N 塩酸) を加え、ローターで 1 時間反応させたものを酸処理ビーズ濃縮液とした。この酸処理ビーズ濃縮液は E バッファーで 2 倍および 20 倍に希釈した液 0.1 mL ずつを SMAC 培地、CT-SMAC

培地、クロモアガーSTEC 培地、および CT-クロモアガーSTEC 培地に 1 枚ずつ塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18–24 時間培養した。

これらの培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、以下の STEC 7 血清群の確認を行った。

7) コロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

コロニーを 0.1 mL の TE 緩衝液 (PH 8) に懸濁し、DNA 熱抽出を行なった。この抽出液をテンプレートとして、Assay1 および目的とする 0 群によるプライマーを用いて、4) と同様にリアルタイム PCR を行った。この結果、7 血清群 0 遺伝子が陰性となったこのコロニーを STEC 7 血清群陰性と判定した。*Stx* 陽性かつ *eae* 陽性、血清群 0 遺伝子が陽性のコロニーは、STEC 7 血清群陽性と判定し、必要に応じて同様の操作を行った。

8) STEC 分離株の血清型の再確認

基本的には、血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ株式会社) または市販のラテックス凝集試薬を用いた。7 血清群に凝集したものについては、H 血清型を抗血清および H-genotyping (1) を用いて H 血清型を決定した。なお、7 血清群以外については 0 血清群を抗血清および 0-genotyping (2) にて決定した。

9) STEC 7 血清群の生化学的性状試験

ブドウ糖、乳糖および白糖の発酵およびガス産生、硫化水素産生を観察するために Triple sugar iron agar (TSI 寒天培地) を、リジン脱炭酸産生、インドール産生、運動性を観察するために Lysine Indole

motility medium (LIM 培地) の培養を行った。

(2) サルモネラ属菌の検出

検出方法の流れを図 2 に示す。

1) 試験検体の収集

食肉衛生検査所 5 施設でのサルモネラ試験に伴い発生する培養液残液 86 検体を収集した。試験に供試されたウシの種類と月齢を表 1-1 に示す。

2) 試験検体の二次増菌培養

肉眼で濁りが認められない培養液残液については、培養液残液 2 mL を Tryptone soya broth (TSB) 8 mL に添加して、 42°C で 18 時間培養 (二次増菌培養) した。

3) 培養液残液および二次増菌培養液からの DNA 抽出

各食肉衛生検査所でのサルモネラ試験に伴い発生する培養液残液から DNA アルカリ熱抽出を行った。この DNA 抽出液を以下に示すリアルタイム PCR のテンプレートとして用いた。

4) サルモネラ属菌特異的遺伝子の検出

プライマーセット (*ttr*/16S) ではサルモネラ属菌特異的 *ttr* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子を検出する。16S rRNA 検出用プライマーおよびプローブは、(1) の 5) に示した 16S Assay2 と同じ配列を用いた。プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせおよび配列を表 1-4 に示す。

反応溶液の組成および量を表 1-5 に示す。

リアルタイム PCR の反応条件は、 95°C で 10 分を 1 サイクル、次いで 95°C で 15 秒、 59°C で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。*ttr* 遺伝子がない場合はサルモネラ属菌陰性とした。

5) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の分

離

4) で *ttr* 遺伝子が陽性だった培養液残液 0.5 mL をテトラチオネート (TT) 培地 10 mL に、培養液残液 0.1 mL を Rappaport-Vassiliadis R10 (RV) 培地 10 mL に接種し、42℃で 18~24 時間培養した。TT 培地および RV 培地での培養液を攪拌後、1 白金耳をスルファピリジン添加ブリリアントグリーン (BGS) 培地または Double Modified Lysin Iron Agar (DMLIA) 培地にそれぞれ接種し、35℃で 18~24 時間培養した。BGS 培地と DMLIA 培地に単離された疑わしいコロニーを観察し、疑わしいコロニーが見られない場合は、更に 6 時間培養を続けた。BGS 培地は、平坦で不透明なピンク色で、辺縁全域の培地が赤色を呈するコロニーを選択した。コロニーが密集した培地では、緑色のバックグラウンドに対し黄褐色を呈するコロニーを選択した。DMLIA 培地は、中心部が黒色 (H₂S 陽性)、非黒色 (H₂S 陰性) の紫色コロニーを選択した。典型的なサルモネラはリジンを脱炭酸し、乳糖やショ糖を発酵しないので、培地の色が紫色に変化した。疑わしいコロニーがある場合は、各プレート 2 コロニー以上を目安として標準寒天培地へ画線塗抹するのと同時に、4 分画した BGS 培地と DMLIA 培地にもそれぞれ画線し、35℃で 18~24 時間培養した。コロニーの密集によって単離が難しい場合は、BGS 培地あるいは DMLIA 培地へ適宜画線塗抹し単離した。または、TT 培地培養液と RV 培地培養液から再画線した。典型的なコロニーが認められない場合は、35℃で 18~24 時間継続培養し、典型的なコロニーが認められない平板は、陰性と判断した。

6) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の同定

標準寒天培地上のシングルコロニーを用いて、デンカ生研の「サルモネラ LA」で凝集試験を行った。凝集試験陽性のコロニーは AXIMA (島津製作所) で菌種を同定した。

7) 血清型別試験

サルモネラ属菌と同定された菌株は、サルモネラ免疫血清「生研」(O 群, Vi 血清) とサルモネラ免疫血清「生研」H 血清を用いて血清型を決定した。

2. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

2023 年 11 月から 2024 年 2 月に国内の対米輸出認定食肉取扱施設 9 ヶ所の協力を得て STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査を実施した。まず、各施設で使用している SOP を収集し、その内容について項目ごとに整理した。次に、各対米輸出認定食肉取扱施設を訪問し、食肉取扱施設内で食肉処理行程の詳細な説明を受け、STEC およびサルモネラ検査に関連する項目として検体の採材場所および手法等について聞き取り調査を実施した。続いて、整理した SOP の内容をふまえて各食肉衛生検査所で検査業務担当職員に以下の調査項目について聞き取り調査を実施した。

(1) STEC 検査

調査項目は、1 ロットの定義、検体採取法、前培養条件、遺伝子検出のための使用機器、判定時のトラブル、陽性対照 DNA 溶液の作成方法、病原因子確認試験の方法および免疫磁気ビーズのプロトコルとした。

(2) サルモネラ検査

調査項目は、検体採取法、前培養条件、遺

伝子検出のための使用機器、判定時のトラブルおよび陽性対照株の管理方法とした。

さらに、各食肉衛生検査所の微生物検査室を視察し、SOPに記載されていない諸項目として実験機器・設備、実験エリアの区分け、実験者の導線を含めた検査体制について聞き取り調査を実施した。

食肉衛生検査所の研修に関する実態調査

1. 指名検査員の研修に関する調査

(1) 調査期間

本調査は、2023 年 8 月～2024 年 3 月に実施した。

(2) 調査方法

本調査では、国内の 15 か所の輸出食肉施設を管轄する検査所がある自治体を通じて、書面アンケートを送付し、11 検査所より回答を得た。そのうち、協力を得られた 9 検査所に対面またはオンライン会議システムを用いて半構造化インタビューを実施した。

(3) 調査対象者

各検査所の研修責任者または研修担当者

(4) 調査項目

調査項目は、

- 1) 検査所の業務概要（牛のと畜検査数及び輸出食肉施設以外の業務、と畜検査員数と内訳、年齢層と人数、異動周期）
- 2) 指名検査員を含む職員へ実施している研修について（研修を規定する文書、研修計画、責任者、研修の内容）
- 3) 指名検査員の知識・技術の習得及び向上のために必要と考える教材、仕組み、支援等について
- 4) 厚生労働省が行う研修への要望について、の 4 項目とし、書面アンケートの回答を基にさらにインタビュー調査を実施した。

(5) 分析方法

アンケートの回答及びインタビュー調査の逐語録から、各検査所の概要、指名検査員を含む職員へ実施している研修、指名検査員の知識・技術の習得及び向上のために必要と考える教材、仕組み、支援等、厚生労働省が行う研修への要望に関わる内容について、キーワードを抽出して、カテゴリー化し、分析した。

（倫理面への配慮）

本調査は国立保健医療科学院の人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針の承認（承認番号：NIPH—IBRA # 23009）を受けて実施した。対象者には研究の目的、方法、内容等を説明し、研究協力および同意撤回の自由、個人情報の保護等について説明し、書面での同意を得た。

2. FSIS の公衆衛生獣医師及び検査官向け研修資料に関する調査

FSIS のホームページで公開されている公衆衛生獣医師及び検査官向けトレーニングシリーズ **Inspection Methods 1800 シリーズ**（以下、「IM1800」という。<https://www.fsis.usda.gov/inspection/inspection-training-videos/inspection-mission-training>）の資料概要を確認し、指名検査員の業務に関連する資料について、概要をまとめた。

3. アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱に関連する連邦規則集等の翻訳

アメリカ合衆国輸出食肉の取扱要綱（以下、「対米要綱」という。）の参照元である連邦規則集 9 CFR、及び **FSIS Directives**（公衆衛生獣医師及び検査官向け指令）のうち、指名検査員の業務に参考となる文書について確認し、一部翻訳した。

と畜場 HACCP の検証を支援する資料作成に関する研究

1. SV 処理による牛肉の *E. coli* 削減の妥当性確認試験

(1) 牛肉検体

牛肉は、国内流通製品工場から購入したブロック肉（筋膜未除去）を用いた。国内流通製品工場でカット処理、真空パックされた翌日に 10℃以下で輸送された牛ブロック肉を冷凍保存し、使用前に冷蔵庫（5℃以下）にて 3 日間かけて解凍し、供試した。

(2) 接種菌液の調製

牛・牛肉のハザード分析で重要となる腸管出血性大腸菌（以下、「STEC」と略。）の代わりに大腸菌（*E. coli* K12 株）を用いた。*E. coli* K12 株を LB 培地に植菌し、37℃で 24 時間、好気条件下で振盪培養した。

接種菌量は、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（薬生食監発 0531 第 6 号 令和 3 年 5 月 31 日）の別紙の牛と体における外部検証（微生物試験）の結果概要（全体）の腸内細菌科菌群について、最小～最大値 0.27～3.20 log cfu/cm²、平均値±標準偏差：0.80±0.45 log cfu/cm²より、最大値の 100 倍の 5 log cfu/cm²を目安に調整した。

(3) SV の使用条件

使用した SV は JARVIS 社製で、蒸気温度（設定）：120℃、蒸気温度（排出口）：100℃、蒸気排出圧：75 kPa、バキューム圧：65 kPa であった。

(4) 牛肉の大腸菌への SV の効果の検証

牛ブロック肉の表面にエタノールを噴霧後、乾燥防止のためラップをして、室温で 24 時間保管した。牛ブロック肉表面に油性マジックでマーキングした区画（面積 5 cm×5 cm：25 cm²）に、*E. coli* K12 株菌液（約 1×10⁶

cfu/0.1 mL）0.1 mL をマイクロピペットを用いて接種した。この菌接種検体に接種区画別に 0～5 回の SV 処理を行った。

SV 処理後、接種区画を切除し、それぞれストマッカー袋に入れ、ペプトン加生理食塩水を 90 mL 加え、ホモジナイズし試料原液を作製した。試料原液を適宜ペプトン加生理食塩水で段階希釈し、試料原液及び 10 倍段階希釈液を EC プレート（3M ペトリフィルム：ネオジェンジャパン製）に 1 mL ずつ接種し、35±1℃、24±2 時間培養し、コロニーを計測した。試験は 2 回実施し、SV 処理の 0～5 回による大腸菌の菌数の変化を比較した。統計処理は EZR (<https://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmed.html>) を用い、3 群以上の等分散性の検定（Bartlett 検定）を実施後、Tukey の多重比較検定を実施し、有意差（P<0.05）を求めた。

2. 輸出食肉施設における外部検証結果と SV 導入状況の解析

輸出食肉施設を管轄する食肉衛生検査所（以下、「検査所」という。）5 か所より提供された、管轄施設の外部検証で実施している微生物試験結果について、SV の導入との関係について比較した。提供頂いた 5 検査所の内訳は SV 非使用施設が A と B の 2 か所、SV 使用施設は C、D、E の 3 か所であった。統計処理は EZR を用いた。一般生菌数では A 施設のデータは正規分布を示しておらず、B、C、D、E 施設のデータは正規分布を示していた。B、C、D、E 施設間のデータは、3 群以上の等分散性の検定（Bartlett 検定）を実施後、Tukey の多重比較検定を実施し、有意差（P<0.05）を求めた。A 施設と B、C、D、E 間は各々算出された菌数の Log cfu/g 値について t 検定を実施し、有意差（P<0.05）を求め

た。腸内細菌科菌群数はA、B、C、D、E施設ともに正規分布を示していないため、平均値の比較は実施しなかった。

3. FSIS の食肉 HCG の翻訳

と畜場 HACCP の検証の科学的支援の資料の作成の参考資料として、FSIS の Meat and Poultry Hazards and Controls Guide 2018 (<https://www.fsis.usda.gov/guidelines/2018-0005>) を翻訳することとした。

C. 研究結果

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

1. 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシル分析法

牛尿を対象に 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルについて添加濃度 10 µg/L で確立した分析法の性能を評価した。

無添加試料を分析したところ、飼料由来と考えられる 2-チオウラシルのピークが検出されたが、定量限界の 1/3 未満であった。4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルはクロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されず、選択性に問題はないことが確認された。また、真度 95～100%、併行精度 5%未満および室内精度 8%未満となり、妥当性評価ガイドラインの 0.01 ppm での目標値(真度 70～120%、併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。内標準物質として用いた [¹³C、¹⁵N₂]-2-チオウラシル、[¹³C、¹⁵N₂]-4-チオウラシル、[¹³C5、¹⁵N₂]-6-メチル-2-チオウラシルの回収率はいずれも 90%以上であった。0.5～10 µg/L (試料中濃度 0.05～100 µg/L 相当)の範囲で検量線を作成したところ、いずれの化合物も決定係数 $r^2 > 0.997$ となり、良好な直線性が得られた。

試料マトリックスの測定への影響を評価するた

め、1 µg/L (試料中濃度 10 µg/L 相当)において溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めた。その結果、1.01～1.03 であったことから、いずれの化合物も試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定できることが示された。添加試料から得られたピークはいずれも S/N ≥ 10 であった。以上の結果から、本分析法は牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法(定量限界はいずれの化合物も 10 µg/L)として妥当であると考えられた。

2. レゾルシル酸ラクトン類分析法

牛尿を対象にゼラノール、タレラノール、ゼアラノンおよびゼアラレノンについて添加濃度 1 および 2 µg/L で確立した分析法の性能を評価した。

無添加試料を分析したところ、飼料由来フザリウムトキシシンと考えられるゼアラレノンのピークが検出されたが、定量限界の 1/3 未満であった。いずれの化合物もクロマトグラム上に定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はないことが確認された。また、真度 92～101%、併行精度 9%未満および室内精度 13%未満となり、妥当性評価ガイドラインの 0.01 ppm での目標値(真度 70～120%、併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。0.5～10 µg/L (試料中濃度 0.5～10 µg/L 相当)の範囲で検量線を作成したところ、いずれの化合物も決定係数 $r^2 > 0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

試料マトリックスの測定への影響を評価するため、1 および 2 µg/L (試料中濃度 1 および 2 µg/L に相当)において溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めた。その結果、いずれの化合物も 1 µg/L においては 0.93～1.01、2 µg/L においては 0.99～1.05 であったことから、試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定できることが示された。また、定量限界濃度(1 µg/L)を添加した試料から得られたピークは

いずれも S/N $\geq$ 10 であった。以上の結果から、本分析法は牛尿中のゼラノール、タレラノール、ゼアラノンおよびゼアラレノン分析法(定量限界はいずれの化合物も 1 μ g/L)として妥当であると考えられた。

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染調査

(1) 試験培養液および二次増菌培養液中の細菌増殖

STEC 検査の培養液残液 40 検体中 36 検体が濁っており、23 検体が 16S Assay2 で陽性

(CT 値 35 未満) であった(表 1-6)。二次増菌培養液では 4 検体中 4 検体が濁り、2 検体が 16S Assay2 で陽性(CT 値 35 未満)であった。サルモネラ属菌検査の培養液残液 86 検体中 18 検体が濁っており、17 検体が 16S Assay2 で陽性(CT 値 35 未満)であった(表 1-6)。二次増菌培養液では 68 検体中 68 検体が濁り、7 検体が 16S Assay2 で陽性(CT 値 35 未満)であった。16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法の評価では、16S Assay2 では 14 菌種が陽性であったのに対し、16S Assay6 では、23 菌種が陽性であった(表 1-7)。

Arcobacter butzleri、*Arcobacter cryaerophilus* および *Arcobacter skirrowii* はいずれの PCR 法でも検出されなかった。

(2) STEC の検出

供試した全検体が stx および eae 遺伝子陰性であり、STEC 陰性であった。(表 1-8)。

(3) サルモネラ属菌の検出

供試した全検体が ttr 遺伝子陰性であり、サルモネラ属菌陰性であった。(表 1-9)。

2. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に

関する調査

(1) STEC 検査

1 ロットの定義は、同一カット日が 1 施設、同一と畜日が 1 施設、同一農場・同一と畜日が 4 施設、同一農場・同一と畜日・同一カット日が 3 施設であった(表 2-1)。検体採取法は、全施設が N60 サンプルング法であり、検体は複数の個体または枝肉の混合であった。前培養条件は、通知法に準拠が 3 施設、米国農務省が発行している Microbiology Laboratory Guidebook (MLG) に準拠が 1 施設、AOAC に準拠が 4 施設だった(表 2-2)。遺伝子検出のための使用機器は、クオリバックス Q7 システムが 6 施設、RapidFinder が 3 施設だった。判定時のトラブルは、7 施設で認められ

、陽性対照 DNA 溶液の偽陰性等が挙げられた。陽性対照 DNA 溶液の作成方法は、通知法に準拠が 8 施設、通知法を一部改正して実施が 1 施設だった(表 2-3)。病原因子確認試験の方法は、概ね通知法に準拠が 8 施設、クオリバックスの説明書に準拠が 1 施設だった

(表 2-4)。免疫磁気ビーズのプロトコルは、全施設で「生研」デンカを使用しており、キットのプロトコルに準拠が 7 施設、一部改変が 2 施設だった(表 2-5)。

(2) サルモネラ検査

検体採取法および前培養条件は、全施設が MLG および農林水産省が公開しているアメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱に準拠していた(表 2-6)。遺伝子検出のための使用機器は、クオリバックス Q7 システムが 7 施設、3M Molecular Detection System が 3 施設だった(表 2-7)。判定時のトラブルは、クオリバックス Q7 システムを使用している 5 施設で認められ、サルモネラ Tm 値の波形の乱れ

や測定時のエラー表示などが挙げられた。陽性対照株は様々な血清型が供試されており、培地への植菌量は、施設によってばらつきが大きかった（表 2-8）。

（３）検査に関わる諸項目

一部の施設では、作業導線の効率化および生菌・遺伝子使用エリアの区分けが不足していた。

食肉衛生検査所の研修に関する実態調査

1. 指名検査員の研修に関する調査

（１）検査所の業務の概要

1) と畜検査業務について

9 検査所について、管轄する輸出食肉施設の 1 日あたりの平均牛と畜数は 100 頭以上 2 か所、50～99 頭 5 か所、49 頭未満 2 か所であった。牛以外の食肉施設を管轄している検査所は 8 か所であった。

2) 職員の状況について

9 検査所の職員の状況について、正規職員のみで定数を満たしている検査所はなく、不足職員は再任用職員、会計年度職員、家畜保健所職員との交換人事等で対応されていた。指名検査員は、会計年度職員以外の職員が指名されていた。1 検査所は、全職員数の 50% が会計年度職員であった。

9 検査所の全職員（207 名）の年齢分布は、20 歳代：20 名、30 歳代：33 名、40 歳代：53 名、50 歳代：39 名、60 歳代以上：62 名（内 70 歳代：10 名）であった。なお、30～40 歳代職員には中途採用者が含まれており、この年代の職員全てが公衆衛生獣医師の経験が 10 年以上というものではない。

（２）食肉衛生検査所の研修の規定について

現在、各検査所で指名検査員を含む職員へ実施している研修について整理した。

9 検査所のうち、検査所内の研修の規程文書及び研修計画を作成していた検査所は 5 か所、研修の規程文書のみ、計画のみが各 1 か所であった。「いずれも作成されていない」、または「回答者が把握していない」が 2 か所であった。

9 検査所のうち、研修責任者が規定または認識されていた検査所は 6 か所、不明確が 2 か所であった。で研修を規定する文書・計画がない、または把握できなかった検査所において、研修責任者が不明確であった。

（３）初めて食肉衛生検査所に配属される職員、または初めて指名検査員になる予定の職員向け研修について

検査所ごとに研修の名称、研修の分け方が異なるため、輸出食肉認定輸出食肉施設における検査実施要領（以下「検査実施要領」という。）のと畜検査及び検証に関する研修について整理した。

研修の対象者が、初めて食肉衛生検査所に配属される職員（以下、新任者という。）または初めて指名検査員になる予定の職員（以下、「指名検査員予定者」という）で、検査所で実施されている研修で、「と畜検査」、「対米・EU 要綱」、「検査実施要領」をキーワードとし、これらを研修名、概要、教材に含んでいる研修について、整理した。

新任者に対し、11 検査所すべてでと畜検査技術の習得を目的として、と畜検査研修を実施していた。

指名検査員予定者に対し、11 検査所すべてで対米・EU 要綱に基づく検査の習得を目的として、指名検査員を実施していた。

【研修に用いる資料】は、9 検査所以上で「検査所作成の業務マニュアル」、「対米・EU 要綱」、「検査実施要領」及び「それらを説明

するための資料を研修担当職員が作成」、「前年度の資料を講師担当者が改訂」し、使用していた。2～5検査所では検査の一部を「職員が撮影した動画」、「参考図書」「過去の厚生労働省研修資料」を使用、3検査所で「FSISの指令、通知」を研修資料としていた。

【講師担当職員】は11検査所のうち9検査所において、「検査1～2年以上の経験者数名で分担」していた。研修の内容に応じて、または検査所の体制として「役職者が担当」（2検査所）や、「研修規程文書に基づき所長による評価で一定以上のレベルである職員が担当」（1検査所）があった。

研修の結果、目標とする知識・技術を身に着けたことの【研修評価】について、「講師担当職員の確認」、「管理職の確認」、「複数者による確認」、「講師担当職員が課長または所長に報告」、「講師担当職員が課長に報告後、結果を所内回覧」、「講師担当職員が課長に報告後記録し、所長が検査実施要領のパフォーマンス評価を実施」があった。

と畜検査及び指名検査員予定者に対する研修は、研修対象者に対し、座学（講義）を1～2日間のうちに行い、その後、1～数か月間、講師担当職員とOJTを実施し、評価者の確認により一人でできるようになったと評価されていた。と畜検査はほとんどの検査所において着任後またできるだけ速やかに実施されていた。指名検査員予定者に対する研修は、と畜検査ができると評価された後に行われていたが、講義は着任後にと畜検査等と同時期に行われている検査所があった。なお、これらの研修の座学（講義）は講師担当職員が通常業務を調整して行うため、実質の時間は数時間程度であった。

【HACCPに関する研修】は10検査所におい

て、いずれも指名検査員予定職員向け研修や初任者向け研修の中でHACCPについて説明していた。それに加えて、「所属自治体の保健所等で実施されるHACCP研修に参加」が6検査所、「民間のHACCP研修に参加」が2検査所であった。

【検査所以外の機関を活用した研修】は、「所属自治体の他機関（保健所、衛生研究所、県庁）が実施する研修」、「近隣大学や民間団体の研修やセミナー及びオンライン研修へ参加」していた。所属自治体の他機関が実施する研修項目としては、HACCP、研究発表会、食品衛生の関係法令等であった。また、他の検査所と協力して各検査所が管轄する施設の見学と意見交換を企画、実施している例があった。

【指名検査員の任命時期】については、「配属直後」と「研修の評価後」があった。

【研修受講後の新任者のフォローアップ】は、「職員間のミーティング」や「検査結果の確認時」、「施設の点検や検査時」、「パフォーマンス評価後」等であった。

2. 指名検査員の知識・技術の習得及び向上のために必要と考える教材、仕組み等について

指名検査員の知識・技術の習得及び向上のために必要と考える教材、仕組み等（以下、教材・仕組み等）、及びそれらを必要と考える理由について整理した。

【教材の形式】として、「eラーニングのように新任者が一人で受講できる教材」、「理解度テストがついている教材」が挙げられた。その理由として「人員不足により通常業務をこなすことで精いっぱい状況で、満足な教育体制を取ることができない」、「4月の異動の時期の人の配置が困難」「研修担当職員の資料作

成にかかる時間の確保が困難」、「講師担当職員の経験不足」であった。

【教材の内容】として、「対米・EU 要綱の各項目に関する研修」、「海外規制官庁の法令・規則等の翻訳（解説付き）」、「動物福祉」、

「ISO17025 に基づく試験の管理」が4 検査所以上から、その他、「HACCP」、「検査実施要領に基づくと畜検査」「(国内の) 関係法令」「研修のためのガイドブック」が挙げられた。その理由として、「共通教材がなく、講師担当職員の力量に左右される」、「現在実施している研修で良いかがわからない」「研修レベルの平準化が困難、(全ての検査所で) 統一した教材が必要」であった。また、厚生労働省と食肉衛生検査所の疑義照会や過去の海外規制庁の査察等の「事例集」が挙げられ、その理由として「輸出食肉施設の管轄検査所としての経験が少ない」ことや、「(自治体内で食肉認定施設が1 か所の場合) 他の食肉認定施設の管轄検査所、施設の対応の情報が取れない」がある。

【仕組み、その他】として、「検査所間の意見交換・情報共有の場」が3 検査所から挙げられ、その理由として「輸出食肉認定施設の管轄検査所としての経験が少ない」ことや、「(自治体内で食肉衛生検査所または認定施設が1 か所の場合) 他の認定施設の管轄検査所、施設の対応の情報が得られない」がある。

その他、「海外規制庁のオンライン研修受講」や「グループワークと組み合わせた研修」等が挙げられた。

3. 厚生労働省が主催する研修及びその他の要望について

厚生労働省が主催する研修及びその他の要望について、整理した。

現在、1 年に1 回程度の頻度で、1 日間の厚生労働省の主催による研修が実施されており、座学及び机上演習が行われている。

その厚生労働省が主催する研修について、「地方厚生局の査察について、指摘事項を例にとってグループワークを行い、どのような改善措置や検証が行われたかについて、具体的な解説をしてほしい」、「輸出食肉施設を見学し、グループワーク演習及び指名検査員同士の意見交換を行う」、「輸出先国の規制や微生物検査手順が変更になったときの説明をしてほしい」、「STEC 検査や残留物質等モニタリング陽性時の対応についてのシミュレーション」が挙げられた。

厚生労働省が主催する研修ではなく指名検査員の研修全体についての要望として、「指名検査員は国から指名されているため、必要なすべての研修を行ってほしい」、「基礎的な導入研修」が挙げられた。

また、FSIS 等の海外規制官庁による研修への参加について「厚生労働省職員が受講し、その内容の伝達講習をしてほしい。食肉衛生検査所職員自身の受講を望まない理由として、食肉衛生検査所の人員不足により研修派遣が困難であることや、言語の問題で理解不足の懸念がある」が挙げられた。

その他、「ISO17025 に基づくマネジメントシステム構築のための研修及び内部監査員の研修」、「輸出先国の規制や微生物検査手順が変更になったときの厚生労働省からの速やかな周知」が挙げられた。

4. FSIS の公衆衛生獣医師及び検査官向け研修資料に関する調査

IM1800 は FSIS の新規採用の獣医師及び検査官が雇用条件として受講するトレーニングコースであり、FSIS が管轄する食品製造施設

の検査検証業務に必要な基本的知識を身に付けるためのものである。本コースは FSIS Directive 5000。1（施設の食品安全システムの検証について）に基づき設計されていると説明されているが、各資料の参照先には、連邦規則集（CFR）、5000.1 以外の Directive、通知（Notice）等が記載されている。資料では、業務マニュアル的な部分もあるが、各業務を行う上で必要な知識、法的根拠、評価や判断のプロセス等が説明されており、豊富なケーススタディが用意されている。

5. 対米要綱に関連する連邦規則集等の翻訳

連邦規則集 9 CFR、及び FSIS Directives（公衆衛生獣医師及び検査官向け指令）のうち、対米要綱の参照元及び指名検査員の業務に参考となる文書について確認し、一部を翻訳した。確認と翻訳を引き続き行う必要がある。

と畜場 HACCP の検証を支援する資料作成に関する研究

1. SV 処理による牛肉の *E. coli* 削減の妥当性確認試験

E. coli K12 株の接種菌量及び牛肉の表面温度は、1 回目で $5.8 \log \text{cfu}/25 \text{ cm}^2$ 及び 8.5°C 、2 回目で $6.2 \log \text{cfu}/25 \text{ cm}^2$ 及び 12.0°C であった。

SV の処理回数 0, 1, 2, 3, 4, 5 回で、それぞれ 1 回目試験において、 5.79 ± 0.15 、 4.96 ± 0.65 、 4.13 ± 0.61 、 4.13 ± 0.61 、 4.13 ± 0.21 、 4.23 ± 0.54 、 $3.77 \pm 0.76 \log \text{cfu}/25 \text{ cm}^2$ 、2 回目試験において、 6.01 ± 0.06 、 5.03 ± 0.99 、 3.63 ± 0.45 、 4.78 ± 0.16 、 4.59 ± 0.48 、 $4.00 \pm 0.65 \log \text{cfu}/25 \text{ cm}^2$ であった。1 回目の実験では統計学的に SV 処理回数 0 回目と 2 回目 ($P=0.026$)、0 回目と 3 回目 ($P=0.025$)、0 回目と 4 回目 ($P=0.036$)、0 回目と 5 回目 ($P=0.006$) で有意差が認められた。2 回目の実験では統計学的に SV 洗浄回数

0 回目と 2 回目 ($P=0.002$)、0 回目と 5 回目 ($P=0.008$) で有意差が認められた。SV を牛肉に 1 回の処理により $1 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$ 程度、2 回の処理により $2 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$ 程度の *E. coli* の減少が認められた。

2. 輸出食肉施設における外部検証の微生物試験の結果と SV 導入状況の解析

各施設の一般生菌数±標準偏差 $\log \text{cfu}/\text{cm}^2$ は A 施設で 0.84 ± 0.35 、B 施設で 2.21 ± 0.66 、C 施設で 1.98 ± 0.87 、D 施設で 1.71 ± 0.71 、E 施設で 2.1 ± 0.9 であった。A 施設の一般生菌数は B、C、D、E に比べ優位に低く、また、D 施設のそれは B 施設、E 施設のそれと比べ優位に低かった。SV 使用、未使用施設に関連は見いだせなかった。同様に、各施設の腸内細菌科菌群数は A 施設で 0.62 ± 0.02 、B 施設で 0.76 ± 0.31 、C 施設で 0.66 ± 0.26 、D 施設で 0.60 ± 0.06 、E 施設で 0.72 ± 0.38 であった。

C. 考察

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

牛肉輸出時のモニタリング検査において確立した分析法を適用することにより、2-チオウラシルが検出された場合に、2-チオウラシルの不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものかを判別することが可能と考えられた。

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染は、食品衛生上重要な課題である。過去の報告では、日本の牛肉からの STEC 分離率は 0.6% であり、分離された株は全て STEC 0157 であった (Ikeuchi et al., 2024)。海外の牛肉からの STEC 0157 の分離率は、オーストラリア

で0.1% (Phillips et al., 2006)、米国で0.66% (U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, 2016)、英国で1.4% (Chapman et al., 2001)、デンマークで3.4% (Breum & Boel, 2010)、アイルランドで3.9% (Prendergast et al., 2011) およびスペインで14.7%

(Ramoneda et al., 2013)と報告されている。また、日本の牛肉からのサルモネラ属菌分離率は0.2%であった (Shimajima et al., 2020)。海外の牛肉からのサルモネラ属菌の分離率は、米国で0.66% (Vipham et al., 2012) および英国で1.3% (Little et al., 2008) であり、オーストラリアでは27施設1155頭の枝肉を調査し全検体サルモネラ属菌陰性であったと報告されている (Phillips et al., 2006)。本研究では、牛枝肉のサルモネラおよびSTEC検査の結果が全て陰性であったことから、日本の対米輸出認定食肉取扱施設の牛枝肉処理工程においてSTECおよびサルモネラ汚染が適切に防除されていることが示唆された。また、試験方法は異なるが、検体供試元の食肉衛生検査所の試験結果も全て陰性だったことから、各検査所でのSTECおよびサルモネラ検査法の信頼性が改めて示された。一方で、検体の特性として、供試された培養液に濁りが認められても牛脂等検体からの成分による濁りが生じることから、肉眼での微生物の増殖の程度の判別は困難であった。また、試験に用いた外部標準対象としての16S rRNAを対象としたリアルタイムPCR法 (16S Assay2) は、培養法で検出される一部の細菌を検出しないことが認められ、それらは主に、*Arcobacter* 属、*Bacillus* 属、*Campylobacter* 属、*Morganella* 属、*Proteus* 属、*Vibrio* 属および *Staphylococcus* 属であっ

た。異なるプライマーおよびプローブを用いた16S Assay6では、多くの菌種の検出性が改善されたが、16S Assay2と同様に *Arcobacter* 属が検出されなかったことから、微生物の増殖を幅広く評価するためには、さらに広い検出性をもつ16S rRNA用プライマーおよびプローブを組み合わせる必要があることが考えられた。

STEC検査およびサルモネラ検査のSOPに関する調査では、複数の項目において施設ごとに異なる点が認められた。1ロットの定義は、カット日、と畜日および農場のどの項目を共通項とするかにおいて施設ごとにばらつきが認められた。しかし、1ロットの定義についてはMLGでも厳密な指定はされておらず、現在の定義は、各食肉取扱施設の処理工程および処理頭数等に合わせて適切に設定しているため問題ないと考えられた。また、クオリボックス Q7 システムおよびRapidFinderでのSTEC判定時のトラブルは、9施設中7施設で認められ、サルモネラ判定時のトラブルは7施設中5施設で認められた。検査機器のトラブルは、検査の信頼性確保と検査再実施による検査員作業時間の浪費につながる。そのため、次年度には、トラブルの発生状況の詳細について追加で聞き取り調査し、検査機器でのトラブルの再現性を検証し、場合によっては機器メーカーに問い合わせで障害を改善する必要があると考えられた。陽性対照株の培地への植菌量は、施設によってばらつきが大きかったため、植菌量と培養の安定性について、検証が必要と考えられた。作業動線の効率化および生菌・遺伝子エリアの区分け等は、試験の逸脱につながる恐れもあるため、現地でディスカッションし、改善案を提示した。これらの改善によって検査体制の効率化

が図られれば、輸出食肉 STEC 検査およびサルモネラ検査の信頼性の担保に寄与できると考えられた。

食肉衛生検査所の研修に関する実態調査

1. 食肉衛生検査所の指名検査員等の研修の現状と課題

調査した 11 検査所において、新任者または指名検査員予定職員に対する、と畜検査及び指名検査員の検査業務の研修資料として、対米・EU 要綱及び検査実施要領とこれらに基づき各検査所で作成した業務マニュアルが用いられていた。これらの資料・文書に加えて、受講者の理解を助けるための説明資料が指名検査員である職員により作成されていた。講義は数時間～1 日程度実施され、2～6 か月間をかけて OJT で指名検査員の検査業務を教え、ひととおりできるようになったことを講師担当職員や管理職等が評価していた。

OJT を主体とした研修方法は、元来、と畜検査の習得が OJT を基本として行われていたためではないかと思われる。また、検査所の人員不足のため、講師担当職員が業務で忙しく、講義の時間の確保が困難であること、検査に関する共通の基本教材がなく、検査所が独自に調査し、作成することは困難であることから、これまで検査所で行ってきた業務のやり方及び技術を OJT で指導し、新任職員がひととおりできるようになった後は、不明点を他の職員に訊いたり、新任者等の職員が独自で調べたり、外部の研修の参加や資料により知識を身に付けていっていると考えられる。検査所でも、OJT の間の講師担当職員からの指導やミーティングの質疑応答、研修の評価等の機会を利用して習得状況の確認が行われている。

この研修方法は、講義と OJT のバランス、講義資料、講師について以下のような問題点が考えられた。

OJT は現場の経験から学ぶことができ、業務の知識を身に着けるには効果が高いものであるが、その学習効果や質は講師役に依存し、学びが「単なる労働」となってしまう可能性がある（研修開発入門、p.36）。職員に対する研修は成人学習であり、成人学習は講義と実践的学習を組み合わせることが効果的であることから（研修開発入門、p.35）、実務経験がほとんどない新任者等には、知識をインプットし、繰り返し確認できることも必要である。

講義資料について、対米・EU 要綱及び検査実施要領を基にした各検査所の業務マニュアル、及びこれらの解説のための資料のそれぞれを各検査所で独自に作成するため、内容のばらつきが発生することが推測される。また、対米・EU 要綱及び検査実施要領は、指名検査員が行う事務手続きや検査方法等が規定されており、何をどのように行うかはわかるが、なぜそれを行うか背景、科学的根拠等の解説はなく、参照先の紹介がないため、根拠に基づく理解が困難になる可能性がある。

講師担当職員について、検査員が 2～3 年ごとに異動する地方公務員である以上やむを得ないが、検査経験が 1 年以上であれば講師を担当しており、学習効果や質を上げるのは困難であることが推測された。

このような状況を改善するために、指名検査員の検査業務の研修における講義用の教材の開発が必要と考えられた。

2. 食肉衛生検査所の指名検査員等向けの教材

（1）教材の形式

検査所の職員不足、正規職員の異動サイクル

が短いことを考慮すると、研修資料は受講者がひとりで学習することができ、その習得度を理解度テスト等により受講者及び評価者が確認できる教材が望ましい。また、実務経験がほとんどない新任者等には、知識をインプットし、繰り返し確認できることが効果的である。さらに、と畜検査や輸出食肉施設の衛生管理の HACCP 検証には、実例の写真や動画とその解説があると理解しやすく、一人でも学びやすい。これらのことから、動画を利用した e-ラーニングのような教材が適切と考えられた。

（２）教材の内容

【教材の内容】に対する要望は様々であったが、「対米・EU 要綱の各項目に関する研修」、「HACCP」、「検査実施要領に基づくと畜検査」「動物福祉」「ISO17025 に基づく試験の管理」は、対米・EU 要綱と検査実施要領に関連するものであり、「海外規制官庁の法令・規則等の翻訳（解説付き）」「（国内の）関係法令」はその参考資料にあたる。対米要綱及び検査実施要領は、米国連邦規則集の 9 CFR 食肉・食肉製品（Animals and Animal Products）に収められている Chapter 3 FSIS（Food Safety and Inspection Service、Department of Agriculture）の Sub chapter A 及び E の一部が反映されている。9 CFR は米国の食肉及び食肉製品等の規制要件が示されているが、FSIS では職員に対して公式の業務指示である Directives において、規制要件に基づく業務について、その目的、背景、手順、考え方、必要な記録の方法など詳細に説明している。さらに、IM1800 のようなトレーニングで業務手順だけでなく、必要な知識、技術を習得させていると考えられた。研修の規模やシステム等が異なることから、指名検査員向けの教材として IM1800 を

そのまま使用するのとは適切ではないが、指名検査員に求められる知識・技術の範囲や教材の構成の参考になると考える。また、FSIS Directives のような輸出先国の食肉衛生に関する法令・規則等を指名検査員が理解するために、その翻訳及び解説したものを提供できる体制の検討が必要と考えられた。

３．検査所における研修に関する文書、記録様式について

研修を規定する文書及びまたは計画が作成されている検査所が 7 か所あったが、2 か所はないか、不明であった。2 か所については研修責任者についても不明確であった。

検査実施要領には「指名検査員の検査等業務に係るパフォーマンス評価実施要領」があり、指名検査員の業務評価を定期的に行うこと、評価方法、結果の記録・保管について記載されており、各検査所で実施されている。しかし、業務量に対して人員が不足していることもあり、研修を規定する検査所の文書としての整備が進められていない場合があると考えられる。参考となる文書及び様式の例の提供は検討の余地があると考えられた。

４．厚生労働省が主催する研修について

厚生労働省主催の研修では、講義及びグループワークとして机上演習が行われている。グループワークの内容に対する要望として「地方厚生局の査察事例による演習及び解説」、「輸出食肉施設を見学し、グループワーク及び意見交換」が挙げられた。グループワークによる演習は、特に自治体内に複数の検査所や輸出食肉施設がない検査所において、「検査所間の意見交換・情報共有の場」であると考えられる。また、「ISO17025 に関する研修」、「STEC 検査や残留物質等モニタリング陽性時の対応についてのシミュレーション」が

挙げられたが、検査所において問題意識があるものや検討が難しい内容のものと考えられた。

と畜場 HACCP の検証を支援する資料作成に関する研究

1. SV 処理による牛肉の *E. coli* 削減の妥当性 確認試験

SV は、枝肉表面の小さな汚れに、熱水（約 85℃）の蒸気を噴射することにより、汚れに含まれる微生物を死滅させるとともに汚れを剥離し、真空で吸引する。

米国では、枝肉のトリミングと洗浄だけでは病原微生物について食品安全レベルを達成できないとして、食肉処理工程における病原微生物の削減のために様々な介入手段について、使用の際のパラメータを含め評価されている（Livestock Plant Familiarization 04-18-2017）。SV の使用はその介入手段のひとつである。

微生物学的リスク評価に関する FAO/WHO 合同専門家会議（JEMRA）の「Control measures for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) associated with meat and dairy products」

（<https://www.who.int/publications/i/item/9789240058576>）において、枝肉表面の SV の使用について、STEC の制御に関して有効性を中～高と評価している。

国内では、近年新たに建設されたと畜場に SV が導入されたり、後から設置したと畜場があるが、SV の病原微生物削減の妥当性に関する報告はほとんどない。本研究では、病原微生物の代わりに *E. coli* K12 株を用いて、SV 使用による *E. coli* 削減の効果を検討した。

1 回目の実験では統計学的に SV 処理回数 0 回目と 2～5 回目で、2 回目の実験では統計学

的に SV 処理回数 0 回目と 2 回目及び 5 回目で、いずれも有意差が認められた。2 回の実験でいずれも、2 回以上の SV 処理により *E. coli* が 2.0 log10cfu/25 cm² 程度の減少が認められた。1 回目より 2 回目の試験結果の標準偏差が大きくなったが、2 回目の試験ではバキューム口が肉に吸い付いてしまうことが数回あったためと考えられる。

この実験結果より、SV は、枝肉表面に 2～3 回以上処理することにより *E. coli* 低減の効果があると考ええる。

JEMRA の評価では、枝肉の *E. coli* を減少させる介入のメタ解析において SV 処理により枝肉の *E. coli* が平均 3.09 log10cfu/cm² 減少すると報告されており、今回の実験では減少幅は小さかったものの 2 回の実験で再現性が得られており、JEMRA の報告に一致しているものと考ええる。

また、JEMRA の評価では、SV の効果は作業者の技量、装置のメンテナンス、スチームの暴露時間と温度によると報告されており、今回の結果でも SV の処理回数や、操作の違いが、*E. coli* の減少効果に影響したと考えられることから、と畜場においては SV の装置のメンテナンスや枝肉に SV を使用するための手順書を作成し、その有効性を検証することが必要と考える。

2. 輸出食肉施設における外部検証の微生物試験の結果と SV 導入状況の解析

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/cm² 未満、許容レベルは 3.5～5.0 log 個/cm²、不適合レベルは 5.0 log 個/cm² 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/cm² 未満、許容レベルは 1.5～2.5 log 個/cm²、不適合レベルは 2.5 log 個/cm² 以上である。今回、SV 未

使用施設（A、B）とSV使用施設（C、D、E）ともに一般生菌数において不適格レベルのものは存在しなかったが、SV使用施設がともに優良な成績を得ることはなく、SV未使用施設でも、優良な成績を得ていることが判明した。腸内細菌科菌群数においてはSV使用施設のCが不適格レベルを示す菌数があったが、平均値では優良レベルであった。

SV使用の有無にかかわらず、EUの優良レベルまたは許容レベルの枝肉を生産していることが判明した。ただ、SV使用施設でも不適格レベルの値を示すものが存在することから、指名検査員の検証において細菌検査を用いることは重要であると思われた。SVを使用したからと言って、良好な枝肉が生産されるわけではなく、SV工程の前までの総合的な衛生管理が必要であると思われた。

D. 結論

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

牛尿中の2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシル分析法を確立した。また、牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類（ゼラノール、タレラノール、ゼアララノンおよびゼアラレノン）分析法を確立した。分析法の性能を評価した結果、いずれも良好な結果が得られた。これらの分析法はEUへの牛肉輸出時のモニタリング検査においてそれぞれ2-チオウラシルおよびレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合に、その原因を調査する方法として有用と考えられた。

牛肉のSTECおよびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

日本の対米輸出認定食肉取扱施設の牛枝肉処理工程におけるSTECおよびサルモネラ汚染

の適切な防除および各食肉検査所でのSTECおよびサルモネラ検査法の信頼性が改めて示された。また、STEC検査およびサルモネラ検査において、クオリボックスQ7システムおよびRapidFinderでの判定時のトラブルが複数の施設で認められたため、今後検証を進め、改善策を提示する必要があると考えられた。

食肉衛生検査所の研修に関する実態調査

国及びまたはEU輸出向け食肉取扱施設を管轄する食肉衛生検査所の指名検査員予定者の研修の教材として、対米等要綱に基づく検査業務に必要な知識について、受講者がひとりで学習し、理解度テスト等により習得度が評価できるもので、動画を取り入れた教材の開発が求められる。開発にあたっては、FSISの新規採用公衆衛生獣医師向けのトレーニング資料が参考になると考えられた。また、米国の食肉衛生に関する法令・規則等について一部の翻訳を行ったが、輸出先国の食肉衛生に関する法令・規則等について理解するためにその翻訳及び解説を提供できる体制の検討が求められる。その他、研修を規定する検査所の文書例の提供や、検査所間の意見交換及び情報共有も検討が必要と考えられた。

と畜場HACCPの検証を支援する資料作成に関する研究

SV処理による牛肉表面の*E. coli*削減効果の妥当性確認試験の結果、SVは、枝肉表面に2～3回以上処理することにより*E. coli*低減の効果があり、JEMRAの報告と同様の結果が得られた。なお、SVの処理回数や操作が*E. coli*低減効果に影響すると考えられることから、と畜場においてはSVの装置のメンテナンスや枝肉にSVを使用するための手順書を作成し、

その有効性を検証することが必要である。

輸出食肉施設の外部検証の微生物試験結果とSVの導入との関係を比較した結果、SV使用にかかわらず多くの枝肉は良好な衛生度を確保していることが判明した。しかし、SVを使用したからと言って、良好な枝肉が生産されるわけではなく、SV工程の前までの総合的な衛生管理が必要であると思われた。

指名検査員の輸出食肉施設の検証の支援資料の参考とするために、FSISの食肉HCGを翻訳した。

今回検討した結果に加え、今後、国内外の文献を検索、精査し、指名検査員の検証の支援資料を作成する必要がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, Suzuki T, Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y.: Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from the Surfaces of Beef Carcasses in Slaughterhouses in Japan. J Food Prot. 2024;87:100263.

2. Akiyama H, Iwasaki Y, Ito R, Basic principles for setting MRLs for pesticides in foods in Japan, Food Safety, in press (2024).

2. 学会発表

1. 廣瀬昌平, 池内隼佑, 島田光平, 児山綾子, 石田祥士, 吉田千央, 東海林明子, 高橋むつみ, 山口健一, 大迫英夫, 塚本真由美, 津江友紀, 片山直人, 瀧下恵里子, 樋渡佐知子, 林谷秀樹, 穂山浩, 工藤由起子. 国内食肉処理施設における牛枝肉の志賀毒素産生性大腸菌保有状況調査. 日本食品衛生学会第119回学術講演会. 令和5年10月12日-13日. 東京
2. 志田静香, 残留農薬検査における課題と展望について, 第21回食品安全フォーラム, 令和5年12月8日, 東京
3. Akiyama H, Suzuki Y, Tsutsumi T, Food safety risk management in Japan, International Conference on Food Safety and 38th KoSFos Annual Meeting, 令和5年11月30日, 韓国済州島

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅱ．分担研究報告

1．動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立 と妥当性評価

研究分担者 志田(齊藤) 静夏

令和5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)
分担研究報告書

動物性食品中の残留物質及び汚染物質の分析法の確立と妥当性評価

研究分担者 志田(齊藤)静夏 国立医薬品食品衛生研究所 食品部 室長

研究要旨

欧州連合(EU)へ牛肉を輸出する際のモニタリング検査において、A物質が検出された場合に必要原因調査のための分析法として、①牛尿中の2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシル分析法および②牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類分析法を確立した。牛尿中の2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシル分析法は、試料に塩酸およびエチレンジアミン四酢酸溶液を加えた後、3-ヨードベンジルブロミドで誘導体化し、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラムで精製した後、LC-MS/MSで測定する方法である。牛尿を用いて添加濃度10 µg/Lで分析法の性能を評価した結果、真度95~100%、併行精度5%未満および室内精度8%未満となり、良好な結果が得られた。定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。本分析法はモニタリング検査で2-チオウラシルが検出された場合に、2-チオウラシルの不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものかを判別する方法として有用と考えられた。牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類(ゼラノール、タレラノール、ゼアララノンおよびゼアラレノン)分析法は、試料にβ-グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼを加えて抱合体を加水分解した後、イムノアフィニティーカラムで精製し、LC-MS/MSで測定する方法である。牛尿を用いて添加濃度1および2 µg/Lで分析法の性能を評価した結果、真度92~101%、併行精度9%未満および室内精度13%未満となり、良好な結果が得られた。定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はなかった。本分析法はモニタリング検査においてレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合に、ゼラノールの使用によるものか、フザリウムトキシンに汚染された飼料を摂取したことによるものかを判別する方法として有用と考えられた。

研究協力機関

(一財)日本食品分析センター

研究協力者

伊藤里恵、穂山浩(星薬科大学)

A. 研究目的

欧州連合(EU)への牛肉等の動物性食品の輸出に際しては、欧州議会および理事会規則(EU)2017/625、欧州委員会委任規則(EU)2022/1644および欧州委員会実施規則(EU)2022/1646に基づき残留物質モニタリング計画を作成し、A物質(スチルベン類、抗甲状腺薬、ステロイド類、ゼラノールを含むレゾルシル酸ラクトン、β-作動薬、クロラムフェニコール等のその他の禁止物質)およびB物質(抗菌性物質、殺虫剤、殺菌剤、駆虫剤、鎮静剤、非ステロイド性抗炎症薬、抗コクシジウム剤、その他の薬理活性物質)のモニタリング検査を行う必要がある。B物質がモニタリング部位(肝臓、腎臓等)から検出された場合は筋肉を検査し、基準値を超過した場合は原因の調査が求められる。一方、A物質が検出された場合は、原因を調査して

ールを含むレゾルシル酸ラクトン、β-作動薬、クロラムフェニコール等のその他の禁止物質)およびB物質(抗菌性物質、殺虫剤、殺菌剤、駆虫剤、鎮静剤、非ステロイド性抗炎症薬、抗コクシジウム剤、その他の薬理活性物質)のモニタリング検査を行う必要がある。B物質がモニタリング部位(肝臓、腎臓等)から検出された場合は筋肉を検査し、基準値を超過した場合は原因の調査が求められる。一方、A物質が検出された場合は、原因を調査して

必要な措置をとるまでの間、EU へ輸出することはできない。

牛を対象とした A 物質として抗甲状腺薬の 2-チオウラシル (Fig. 1) やメチマゾール等がある。2-チオウラシル等の抗甲状腺薬を与えると、組織中に水分が保持されやすくなるため、屠殺前に枝肉重量を増加させる目的で用いられることがあるが、肉質の低下を招くことが知られている。また、2-チオウラシルは国際がん研究機関 (IARC) において Group 2B に分類され、人に対する発がん性が疑われている。このようなことから、EU では 2-チオウラシル等の抗甲状腺薬の使用が禁止されており、EU へ牛肉を輸出する際はモニタリング検査が求められている。

現在、EU では 2-チオウラシルに Maximum residue limit (MRL) および Reference point for action (RPA) は設定されていないが、牛の尿および甲状腺の minimum method performance requirement (MMPR) をそれぞれ 10 µg/L および 10 µg/kg とすることが提案されている。しかしながら、2-チオウラシルを不正に使用していなくても、アブラナ科植物を含む飼料を与えると尿から 10 µg/L 以上検出される場合がある。モニタリング検査において牛の尿から 2-チオウラシルが 10 µg/L 以上検出された場合は不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものかを調査することが求められる。前述のように A 物質が検出された場合、原因を調査して必要な措置をとるまでの間、EU へ牛肉を輸出することができないため、迅速に原因を調査する方法の確立が望まれている。

2-チオウラシルの不正使用か否かの判別方法に関して、Blokland ら¹⁾は牛に 2-チオウラシルを投与した場合と、アブラナ科植物を飼料として与えた場

合で両者を判別可能な尿中のバイオマーカーを探索した。その結果、2-チオウラシルを投与した場合は、2-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル (Fig. 1) が検出され、4-チオウラシルは検出されなかった。一方、アブラナ科植物を飼料として与えた場合は、2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルが検出され、6-メチル-2-チオウラシルは検出されなかった。加えて、4-チオウラシルは、その構造 (Fig. 1) から 2-チオウラシルの代謝物ではないと考えられた。これらの結果から、4-チオウラシルが検出され、6-メチル-2-チオウラシルは検出されなかった場合、2-チオウラシルの検出は不正使用によるものではないと判断できると結論された。したがって、2-チオウラシルに加えて、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルを分析すれば、2-チオウラシルの不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものかを判別することが可能と考えられる。

その他の牛肉を対象とした A 物質としてゼラノール (α -ZAL) 等のレゾルシル酸ラクトン類がある。 α -ZAL は、我が国ではこれまで動物用医薬品として承認されたことはないが、海外では肥育促進や飼料効率の改善を目的として使用されることがあり、米国、カナダおよび豪州等においては使用が認められている。一方、EU では、食肉の生産において成長促進を目的として α -ZAL 等のホルモン剤を使用すること、およびこれらを使用した動物の食肉の輸入が禁止されている。

α -ZAL を投与すると、ゼアララノン (ZAN) およびタレラノール (β -ZAL) に代謝されることが知られている (Fig. 2)。しかしながら、 α -ZAL を使用していなくても、飼料が *Fusarium* 属の真菌によって産生されるゼアラレノン (ZEN: Fig. 2) 等のマイコトキシン (フザリウムトキシン) に汚染されていると α -ZAL、 β -

ZAL および ZAN が検出される場合がある。モニタリング検査においてレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合は原因が α -ZAL の投与によるものではないことが明らかになるまで、EU へ牛肉を輸出することができないため、 α -ZAL の使用によるものか、フザリウムトキシンに汚染された飼料を摂取したことによるものかを簡便に判別できる方法の確立が望まれている。

牛尿からレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合に、 α -ZAL の使用によるものか、フザリウムトキシンに汚染された飼料を摂取したことによるものかを判別する方法として、 α -ZAL、 β -ZAL および ZAN の和と、ZEN、 α -ゼアラレノール (α -ZEL) および β -ゼアラレノール (β -ZEL) の和を比較し、 α -ZAL、 β -ZAL および ZAN の和の方が高い場合に α -ZAL の使用が原因と判断する方法が報告されている。しかし、本方法は分析が必要な化合物数が 6 化合物と多い。より少数の分析対象化合物を用い、且つ α -ZAL を使用しているにもかかわらず、陰性となる確率 (偽陰性率) を下げるためには α -ZAL、 β -ZAL、ZAN および ZEN を分析し、 α -ZAL、 β -ZAL および ZAN の和と、ZEN の濃度を比較して、 α -ZAL、 β -ZAL および ZAN の方が高い場合に α -ZAL の使用が原因と判断するのが良いと考えられる。

そこで、本研究では、EU への牛肉輸出時のモニタリング検査で 2-チオウラシルが検出された場合に、その原因調査に必要な牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法を確立し、その性能を評価した。また、モニタリング検査でレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合に、その原因調査に必要な牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類 (α -ZAL、 β -ZAL、ZAN および ZEN) 分析法を確立し、その性能を評価した。

B. 研究方法

[1] 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法

1. 試料

牛尿をよく混合後、毎分 3,500 回転で 5 分間遠心分離し、上澄みを試料とした。

2. 試薬・試液

2.1 試薬等

アセトニトリル:LC-MS用(関東化学製)

アセトニトリル、メタノール、塩酸、酢酸、リン酸二水素カリウム、水酸化ナトリウム:特級(富士フィルム和光純薬製)

エタノール:特級(99.5%:キシダ化学製)

リン酸水素二ナトリウム二水和物:分析用(Merck 製)

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物:試験研究用(同仁化学研究所製)

3-ヨードベンジルブロミド(東京化成工業製)

ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム:Oasis HLB (150 mg/6 mL:Waters製)

メンブランフィルター:PTFEシリンジフィルター(0.22 μ m:中部科学機器製)

1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 8):リン酸二水素カリウム 2.1 gおよびリン酸水素二ナトリウム二水和物 86.3 gに水を加えて温めながら溶解後、水を加えて正確に 500 mLとした。

6 mol/L水酸化ナトリウム溶液:水酸化ナトリウム 120 gに水を加えて溶解後、水を加えて正確に 500 mLとした。

0.25 mol/Lエチレンジアミン四酢酸溶液:エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物 9.3 gに水約 80 mLを加えた後、攪拌しながら 6 mol/L水酸化ナトリウム溶液で pH を 8.0 に調整し、さらに約 10 分間

攪拌して溶解後、水を加えて正確に100 mLとした。

3-ヨードベンジルブロミド・メタノール溶液:3-ヨードベンジルブロミド20 mgにメタノール8 mLを加えて溶解した。

2.2 標準品

以下を標準品として使用した。

2-チオウラシル:純度99.91% (Toronto Research Chemicals製)

4-チオウラシル:純度98.9% (Merck製)

6-メチル-2-チオウラシル:純度98.3% (Merck製)

[¹³C,¹⁵N₂]-チオウラシル([¹³C,¹⁵N₂]-2-チオウラシル):純度97% (Toronto Research Chemicals製)

[¹³C,¹⁵N₂]-4-チオウラシル:純度99.3% (Alsachim製)

[¹³C₅,¹⁵N₂]-4-ヒドロキシ-2-メルカプト-6-メチルピリミジン([¹³C₅,¹⁵N₂]-6-メチル-2-チオウラシル):純度99.8% (Alsachim製)

2.3 標準原液

2-チオウラシル, 4-チオウラシル, 6-メチル-2-チオウラシル:各標準品約10 mgを精秤し, エタノールに溶解してそれぞれ100 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

[¹³C,¹⁵N₂]-2-チオウラシル, [¹³C,¹⁵N₂]-4-チオウラシル, [¹³C₅,¹⁵N₂]-6-メチル-2-チオウラシル:各標準品1 mgを精秤し, エタノールに溶解してそれぞれ50 mg/Lの濃度の溶液を調製した。

2.4 添加用標準溶液および添加用内標準溶液

添加用標準溶液:2-チオウラシル標準原液, 4-チオウラシル標準原液および6-メチル-2-チオウラシル標準原液を混合後, エタノールで希釈して0.1 mg/L標準溶液を調製した。

添加用内標準溶液:[¹³C,¹⁵N₂]-2-チオウラシル内標準原液, [¹³C,¹⁵N₂]-4-チオウラシル内標準原液および[¹³C₅,¹⁵N₂]-6-メチル-2-チオウラシル内標準

原液を混合後, エタノールで希釈して1 mg/L内標準溶液を調製した。

3. 装置

ロータリーエバポレーター:N-1000(東京理化工械製)

遠心分離機:H-60R(コクサン製)

pH計:F-72(堀場製)

振とう恒温水槽:BT101(ヤマト科学製)

4. LC-MS/MS測定条件

液体クロマトグラフ:Nexera X2(島津製作所製)

質量分析計:Triple Quad 6500+(Sciex製)(一部の検討はTriple Quad 5500(Sciex製)を用いて行った。)

4.1 LC条件

分析カラム:Shim-pack Scepter C18-120(内径2.1 mm, 長さ100 mm, 粒子径1.9 μm:島津製作所製)

移動相:A液0.01 vol%酢酸, B液 アセトニトリル

流速:0.4 mL/min

グラジエント条件:0 min 30%B, 2 min 38%B, 4.5 min 38%B, 7.5 min 95%B, 9.5 min 95%B, 9.51 min 30%B, 14 min 30%B

注入量:1 μL

カラム温度:40°C

保持時間:Table 1に示した。

4.2 MS条件

イオン化モード:ESI(-)

測定モード:選択反応モニタリング(SRM)

イオンスプレー電圧:-4500 V

ヒーター温度:650°C

ネブライザーガス:空気, 40 psi

ターボガス:空気, 70 psi

コリジョンガス:窒素

SRM条件:Table 1に示した。

5. 試験溶液の調製

5.1 前処理

試料2.5 mLを遠心管(15 mL容)に採取し、塩酸10 μ Lおよび0.25 mol/Lエチレンジアミン四酢酸溶液100 μ Lを加えて混合した。

5.2 誘導体化反応

5.1で得られた溶液に1 mol/Lリン酸緩衝液(pH 8)7.5 mLおよび3-ヨードベンジルブロミド・メタノール溶液250 μ Lを加え、40°Cの水浴中で60分間振とうした。

5.3 精製

5.2で得られた反応液を、あらかじめメタノール5 mLおよび水5 mLでコンディショニングしたジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム[Oasis HLB(150 mg/6 mL)]に負荷した。遠心管内を水5 mLで洗い、洗液をミニカラムに負荷した。水5 mLおよび水/メタノール(3:2)5 mLで順次洗浄した後、1分間吸引した。アセトニトリル約25 mLで溶出し、全量をフラスコ(25 mL容)に受けた後、アセトニトリルで25 mLに定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

6. 定量

水2.5 mLに塩酸10 μ Lおよび0.25 mol/Lエチレンジアミン四酢酸溶液100 μ Lを加え、標準溶液および内標準溶液を添加した後、実験方法5.2および5.3に従い、0.5, 1, 2, 5および10 μ g/L(内標準溶液は5 μ g/L)の濃度の内標準混合標準溶液を調製した。この溶液1 μ LをLC-MS/MSに注入して、得られた $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2]$ -2-チオウラシルに対する2-チオウラシル, $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2]$ -4-チオウラシルに対する4-チオウラシルおよび $[^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N}_2]$ -6-メチル-2-チオウラシルに対する6-メチル-2-チオウラシルのピーク面積比を用いて検量線を作成した。試験溶液1 μ LをLC-MS/MSに注入し、検量線から内部標準法により2-

チオウラシル, 4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシルの含量を算出した。

7. マトリックス標準溶液

無添加試験溶液2.5 mLをロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固し、2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシル混合標準溶液(0.001 mg/L)2.5 mLを加えて溶解したものをマトリックス標準溶液とした。

8. 性能評価試験

牛尿を対象に添加濃度10 μ g/Lで性能評価試験を実施した。「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(妥当性評価ガイドライン)に従って1日2併行, 5日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを求めた。牛尿を5.1に従って前処理を行った後、添加用標準溶液(0.1 mg/L)250 μ Lおよび添加用内標準溶液(1 mg/L)125 μ Lを添加したものを添加試料として用いた。なお、無添加試料から飼料由来と考えられる2-チオウラシルのピークが検出されたため、2-チオウラシルについては、添加試料から得られた測定値から無添加試料の測定値を差引いた値を用いて各性能パラメータを算出した。

[2] レゾルシル酸ラクトン類分析法

1. 試料

牛尿をよく混合し静置後、上澄みを採取した。

2. 試薬・試液

2.1 標準品

以下を標準品として用いた。

β -ZAL 標準品:純度 99.22%(Merck 製)

ZAN 標準品:純度 98.0%(富士フイルム和光純薬製)

ZEN 標準品:純度 99.5%(Merck 製)

α -ZAL 標準品:純度 98.6%(富士フイルム和光

純薬製)

2.2 試薬等

メタノール: 残留農薬試験用(関東化学製)

メタノール: 高速液体クロマトグラフ用(富士フイルム和光純薬製)

アセトニトリル: 高速液体クロマトグラフィー用(関東化学製)

酢酸, 酢酸ナトリウム, 酢酸アンモニウム: 特級(関東化学製)

β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼ(Helix pomatia 由来): 生化学用(Merck 製)

イムノアフィニティーカラム: ZearalaTest WB (VICAM 製)

メンブランフィルター: Millex-LG (0.2 μ m, Merck 製)

0.25 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.8): 酢酸ナトリウム 4.1 g を量り, 水 200 mL を加えて溶かし, 酢酸で pH を 4.8 に調整した.

2.3 標準溶液

α -ZAL, β -ZAL および ZAN 標準原液: 各標準品約 2 mg (α -ZAL は約 5 mg) を精秤し, それぞれ水/アセトニトリル(1:1)に溶解して 100 mg/L 濃度の溶液を調製した.

ZEN 標準原液: 標準品約 10 mg を精秤し, メタノール(高速液体クロマトグラフ用)に溶解して 100 mg/L 濃度の溶液を調製した.

添加用混合標準溶液: 各標準原液を混合後, 水/アセトニトリル(3:1)で希釈して 10 及び 20 μ g/L 混合標準溶液を調製した.

3. 装置

ロータリーエバポレーター: N-1300(東京理化工機製)

pH 計: D-72(堀場製)

振とう恒温水槽: T-N22S(トーマス科学器械製)

試験管ミキサー: AUTOMATIC MIXER S-100 (タイテック製)

LC-MS/MS: Nexera X2(島津製作所製)および TripleQuad 4500(Sciex 製)

4. LC-MS/MS 測定条件

カラム: InertSustain C18(内径 2.1 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 3 μ m: ジーエルサイエンス製)にガードカラム InertSustain C18(内径 2.1 mm, 長さ 10 mm, 粒子径 3 μ m: ジーエルサイエンス製)を接続したものの

移動相流速: 0.3 mL/min

注入量: 5 μ L

カラム温度: 40°C

移動相: A 液 10 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液, B 液アセトニトリル/メタノール(4:1)

グラジエント条件: 0min 40%B, 1 min 40%B, 16 min 80%B, 21 min 80%B, 21.01 min 40%B, 26 min 40%B

保持時間: Table 2

選択反応モニタリング(SRM)

イオン化モード: ESI(-)

イオンスプレー電圧: -4500 V

ヒーター温度: 700°C

ネブライザーガス: 空気, 70 psi

ターボガス: 空気, 40 psi

コリジョンガス: 窒素

SRM条件: Table 2に示した.

5. 定量

添加用混合標準溶液を水/アセトニトリル(3:1)で希釈し, 0.5, 1, 2, 5 及び 10 μ g/L 濃度の混合標準溶液を調製した. この溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入して, 得られたピーク面積を用いて検量線を作成した. 試験溶液 5 μ L を LC-MS/MS に注入し, 検量線から絶対検量線法により α -ZAL, β -ZAL,

ZAN および ZEN の含量を算出した。

6. 試験溶液の調製

試料 2 mL を遠心管 (50 mL 容) に量り取り、0.25 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.8) 2 mL を加えた後、0.25 mol/L 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.8) 及び β -グルクロニダーゼ/アリルスルファターゼの混液 (9:1) 20 μ L を加え、試験管ミキサーでよく攪拌した。これを密栓した後、55°C の水浴中で 2 時間振とうした。

反応液を室温に戻した後、イムノアフィニティーカラム (ZearalaTest WB) に負荷した。遠心管内を水 20 mL で洗い、洗液を負荷した。カラムを水/メタノール (9:1) 10 mL で 3 回洗浄後、メタノール 5 mL で溶出した。溶出液をロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮し、窒素気流下で溶媒を除去した。残留物を水/アセトニトリル (3:1) 2 mL に溶解し、メンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。

7. マトリックス標準溶液の調製

ブランク試験溶液 1 mL を遠心管 (50 mL 容) に分取し、ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固した。これに、1 または 2 μ g/L の混合標準溶液 1 mL を加えて溶解したものをそれぞれ 1 および 2 μ g/L 濃度のマトリックス標準溶液とした。

8. 性能評価試験

牛尿を対象に添加濃度 1 および 2 μ g/L で性能評価試験を実施した。「食品中に残留する農薬等に関する試験法の妥当性評価ガイドラインについて」(妥当性評価ガイドライン) に従って 1 日 2 併行、5 日間の枝分かれ実験を行い、各性能パラメータを求めた。牛尿試料 2 mL に、10 または 20 μ g/L 濃度の混合標準溶液を 0.2 mL 添加したものをそれぞれ添加濃度 1 および 2 μ g/L の添加試料として用いた。なお、無添加試料から飼料由来と考えられ

る ZEN のピークが検出されたため、ZEN については、添加試料から得られた測定値から無添加試料の測定値を差引いた値を用いて各性能パラメータを算出した。

C. 結果及び考察

[1] 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび6-メチル-2-チオウラシル分析法

1. LC-MS/MS 条件の検討

1.1 MS 条件

2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルは LC-MS (ESI 法および APCI 法) で測定可能であるが、感度が低い。このため、3-ヨードベンジルブロミドや 4-クロロ-7-ニトロベンゾフラザン等で誘導体化後、LC-MS/MS で測定するのが一般的である。本検討では 3-ヨードベンジルブロミドで誘導体化後、LC-MS/MS で測定することとした。各化合物の 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物 (Fig. 1) をフルスキャン測定した。その結果、いずれも ESI(+) および ESI(-) モードで測定が可能であったが、ESI(-) モードの方がバックグラウンドが低く、高い S/N が得られたため、ESI(-) モードで測定することとした。2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルは位置異性体であるため、ESI(-) モードではいずれも m/z 343 ($[M-H]^-$) が検出された。本イオンをプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行ったところ、2-チオウラシルでは m/z 309、4-チオウラシルでは m/z 249 が観測され、両化合物で異なるイオンが検出された。このため、 m/z 309 および 249 をそれぞれ 2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルの定量用プロダクトイオンとした。その他の S/N が高いプロダクトイオンは両化合物で共通のイオンであったが、保持時間の違いにより両化合物を分離することが可能であるため、最も

S/N が高い m/z 127 を定性用プロダクトイオンとすることとした。

1.2 LC 条件

Blokland ら¹⁾の LC 条件と同一の移動相(0.1% 酢酸含有水/メタノール), 分析カラム (Acquity UPLC BEH C18; 内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 1.7 μm ; Waters 製)およびグラジエント条件で 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物の測定を行った。その結果, 本条件では 2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルの誘導体化物を分離することができなかった。そこで, LC 条件(移動相, 分析カラムおよびグラジエント条件)を変更することとした。水系溶媒として 0.01 vol% 酢酸, 有機溶媒としてアセトニトリルを用いたところ, 2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルの誘導体化物の分離および S/N が向上した。また, 分析カラムとして Shim-pack Scepter C18-120 (内径 2.1 mm, 長さ 100 mm, 粒子径 1.9 μm)を用いたところ, 2-チオウラシルおよび 4-チオウラシルの誘導体化物のピークの分離度は 1.5 以上となり, 良好な分離が得られた。6-メチル-2-チオウラシルの誘導体化物についても本 LC 条件で良好なピーク形状および強度が得られた。これらの結果から, 移動相として 0.01 vol% 酢酸およびアセトニトリル, 分析カラムとして Shim-pack Scepter C18-120 を用いて測定を行うこととした。

2. 試験溶液調製方法の検討

2.1 前処理

2-チオウラシル等は pH 3 以上の尿中では安定性が低い。また, 尿中に銅イオン等の金属イオンが共存すると, チオール基と相互作用して分解することが知られている。このため, 尿中の 2-チオウラシル等の分析では, 分解を抑えるため, 試料を塩酸等で pH 1 以下に調整し, エチレンジアミン四酢酸を加えた後, 誘導体化等を行うことが多い。本検

討においても牛尿に塩酸およびエチレンジアミン四酢酸を加えた後, 誘導体化を行うこととした。

2.2 誘導体化反応

各化合物の誘導体化反応は Blokland ら¹⁾の方法を参考にした。3-ヨードベンジルブロミドを加え, 40°C で 60 分間加熱する方法を採用しているため, 本条件で誘導体化反応が進行するか確認を行った。

まず, 牛尿の代わりに水を試料として用いて検討を行った。実験方法 5.1 に従い, 塩酸および 0.25 mol/L エチレンジアミン四酢酸溶液を加えた後, 試料中濃度 100 $\mu\text{g/L}$ 相当となるように 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルを添加し, 実験方法 5.2 および 5.3 に従って誘導体化反応および精製を行った。ただし, 誘導体化の反応時間は 20~120 分間とした。120 分(参考文献¹⁾の 2 倍の反応時間)でのピーク面積値に対する各反応時間でのピーク面積値の割合(%)を Fig. 3 に示した。いずれの化合物も反応時間 60 分以上では 97% 以上となった。

次に, 牛尿を試料として用いて誘導体化の反応時間(50~120 分)の検討を行った。その結果, いずれの化合物も反応時間 60 分以上では 94% 以上となった(Fig. 4)。これらの結果より, Blokland ら¹⁾の方法と同様に, 3-ヨードベンジルブロミドを加えた後, 40°C の水浴中で 60 分間加熱することで十分反応が進行すると考えられた。このため, 本条件で各化合物を 3-ヨードベンジルブロミド誘導体化物へ変換することとした。

2.3 精製方法

Blokland ら¹⁾は誘導体化後, 反応液をケイソウ土が充填された 96 ウェルプレートに負荷し, 酢酸エチルで溶出した後, 溶媒を除去し, アセトニトリル/水に再溶解して LC-MS/MS で測定する方法を

採用している。しかし、本方法では酢酸エチルの除去操作が必要であった。そこで、ジビニルベンゼン-*N*-ビニルピロリドン共重合体ミニカラム Oasis HLB(150 mg/6 mL)を用いて溶媒の除去を必要としない方法を検討した。牛尿の代わりに水を試料として用いて、実験方法 5.1 に従い、塩酸 10 μ L および 0.25 mol/L エチレンジアミン四酢酸溶液 100 μ L を加えた後、試料中濃度 100 μ g/L 相当の 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルを添加し、実験方法 5.2 に従って誘導体化反応を行った。得られた反応液を Oasis HLB(あらかじめメタノール 5 mL、水 5 mL でコンディショニングしたもの)に負荷し、水 5 mL および水/メタノール (3:2) 5 mL で順次洗浄した後、アセトニトリルで溶出した。その結果、アセトニトリル 20 mL で 2-チオウラシルは 98%、4-チオウラシルは 89%、6-メチル-2-チオウラシルは 93%が溶出され、アセトニトリル 20~25 mL の画分にはいずれの化合物も溶出されなかった(Table 3)。これらの結果から、アセトニトリル約 25 mL で溶出することとした。

3. 性能評価

牛尿を対象に 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルについて添加濃度 10 μ g/L で 1 日 2 併行、5 日間の添加回収試験を行い、確立した分析法の性能を評価した。なお、妥当性評価ガイドラインでは尿を対象としていないが、本ガイドラインに従って評価を行い、0.01 ppm での目標値を参照した。

無添加試料を分析したところ、飼料由来と考えられる 2-チオウラシルのピークが検出されたが、定量限界の 1/3 未満であった。4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシルはクロマトグラム上に定量を妨害するピークは検出されず、選択性に問題はないことが確認された(Fig. 5 ~7)。

真度、併行精度および室内精度の結果を Table 4に示した。真度 95~100%、併行精度 5%未満および室内精度 8%未満となり、妥当性評価ガイドラインの 0.01 ppm での目標値(真度 70~120%、併行精度 25%未満、室内精度 30%未満)を満たした。また、内標準物質として用いた [^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-2-チオウラシル, [^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-4-チオウラシル, [$^{13}\text{C}5$, $^{15}\text{N}_2$]-6-メチル-2-チオウラシルの回収率はいずれも 90%以上であった。0.5~10 μ g/L(試料中濃度 0.05~100 μ g/L 相当)の範囲で検量線を作成したところ、いずれの化合物も決定係数 $r^2>0.997$ となり、良好な直線性が得られた。

試料マトリックスの測定への影響を評価するため、1 μ g/L(試料中濃度 10 μ g/L 相当)において溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めた。その結果、1.01~1.03 であったことから、いずれの化合物も試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定できることが示された。また、添加試料から得られたピークはいずれも S/N ≥ 10 であった。以上の結果から、本分析法は牛尿中の 2-チオウラシル、4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法(定量限界はいずれの化合物も 10 μ g/L)として妥当であると考えられた。牛肉輸出時のモニタリング検査において本分析法を適用することにより、2-チオウラシルが検出された場合に、2-チオウラシルの不正使用によるものか、アブラナ科植物を含む飼料を与えたことによるものかを判別することが可能と考えられた。

[2] レゾルシル酸ラクトン類分析法

1. LC-MS/MS条件の検討

カラムとしてInertSustain C18(内径2.1 mm, 長さ150 mm, 粒子径3 μ m), ガードカラムとしてInertSustain C18(内径2.1 mm, 長さ10 mm, 粒子

径 3 μm)を用いて測定条件を検討した. 移動相の添加剤は, 酢酸アンモニウムを用いると, 酢酸と比べて感度が向上することが知られているため, 水系移動相として10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液を用いることとした. 移動相の有機溶媒は, メタノールよりもアセトニトリルの方が, ベースラインが低くなることが報告されている. そこで, アセトニトリルとアセトニトリル/メタノール(4:1)を比較したところ, アセトニトリル/メタノール(4:1)の方がピーク形状, ピークの分離, 再現性及びピーク強度のいずれも良好な結果が得られた. これらの結果から, 10 mmol/L酢酸アンモニウム溶液及びアセトニトリル/メタノール(4:1)を移動相として用いることとした.

2. 試験溶液調製方法の検討

レゾルシル酸ラクトン類は抱合体として存在している場合があるため, LC-MS/MS測定を行う前に加水分解を行う必要がある. しかし, 本研究ではレゾルシル酸ラクトン類の抱合体の標準品を入手できず, 加水分解条件を検討することはできなかった. このため, 加水分解反応はArrizabalaga-Larrañagaらの方法²⁾に従い, β -グルクロニダーゼ/アシルスルファターゼを加えて55°Cで2時間振とうすることとした.

牛や豚の尿中のレゾルシル酸ラクトン類の分析では, 加水分解後の溶液を液々分配, C18ミニカラム及びNH₂ミニカラムを用いて精製する方法や, 液々分配, HLBミニカラム及びNH₂ミニカラムを用いて精製する方法, 多孔性ケイソウ土カラムおよびNH₂ミニカラムによって精製する方法等が報告されているが, 操作が煩雑であった. 一方, 飼料や食品中のフザリウムトキシシン(ZEN等)の分析ではイムノアフィニティーカラムを用いた方法も報告されている. そこで本検討では操作を簡便化するため, イムノアフィニティーカラムを用いた精製を尿中の

レゾルシル酸ラクトン類の分析に用いることとした. 加水分解後の溶液をそのままイムノアフィニティーカラム(ZearalaTest WB)に負荷して精製する方法を検討した.

まず, カラムへ負荷後の洗浄方法を検討するため, 水/メタノール混液(10 mL)を洗浄溶媒として用いた場合の溶出状況を確認した. 水20 mLに α -ZAL, β -ZAL, ZANおよびZEN(各0.1 μg)を添加し, ZearalaTest WBへ負荷した後, 水/メタノール混液(9:1), (8:2), (7:3), (6:4)および(5:5)各10 mLで順次溶出した(Table 5). その結果, 水/メタノール(9:1)の画分にはいずれの化合物も溶出しなかったが, (8:2)~(5:5)の画分には溶出が認められた. このため, カラムに負荷後, 水/メタノール(9:1)で洗浄を行うこととした.

次に, 洗浄溶媒量を検討するため, 水20 mLに α -ZAL, β -ZAL, ZANおよびZEN(各0.1 μg)を添加し, ZearalaTest WBへ負荷した後, 水/メタノール(9:1)40 mLを注入し, 各化合物の溶出状況を確認した(Table 6). その結果, いずれの化合物も水/メタノール(9:1)40 mLまでは溶出しないことが確認された.

ZearalaTest WBからの溶出溶媒の検討を行った. 水20 mLに α -ZAL, β -ZAL, ZANおよびZEN(各0.1 μg)を添加し, ZearalaTest WBへ負荷した後, メタノールで溶出した(Table 7). その結果, いずれの化合物もメタノール5 mLでカラムから十分に溶出された. これらの結果から, 加水分解後の溶液をZearalaTest WBへ負荷後, 水/メタノール(9:1)で洗浄し, メタノール(5 mL)で溶出することとした.

そこで, 水/メタノール(9:1)による洗浄の効果を確認するため, 牛尿(2 mL)に α -ZAL, β -ZAL, ZANおよびZEN(各0.002 μg)を添加後, 実験方法6に従って加水分解を行い, 得られた溶液をイムノ

アフィニティーカラムへ負荷し、水/メタノール(9:1) 10, 20, 30および40 mLで洗浄した後、メタノール5 mLで溶出した。回収率をTable 8, クロマトグラムをFig. 8に示した。その結果、いずれの化合物も洗浄に用いた水/メタノール(9:1)の量は回収率に影響しなかった(Table 8)。しかし、洗浄に用いる水/メタノール(9:1)の量を増やすほど、 α -および β -ZALの定性イオンのクロマトグラムにおいて、 α -および β -ZALの保持時間付近に認められた夾雑成分のピークが小さくなった(Fig. 8)。洗浄溶媒量30 mLと40 mLでは夾雑成分のピーク強度に差は認められなかった。このため、洗浄に用いる水/メタノール(9:1)の溶媒量は30 mLとすることとした。以上の結果から、加水分解後の溶液をZearalaTest WBへ負荷し、水/メタノール(9:1) 30 mLで洗浄した後、メタノール5 mLで溶出することとした。

3. 性能評価

EU では、牛尿中の β -ZAL および ZEN の minimum method performance requirements (MMPR)はそれぞれ 1 および 2 ppb(1 および 2 $\mu\text{g/L}$)と設定されている。このため、牛尿を対象に α -ZAL, β -ZAL, ZAN および ZEN について添加濃度 1 および 2 $\mu\text{g/L}$ で 1 日 2 併行, 5 日間の添加回収試験を行い、確立した分析法の性能を評価した。なお、妥当性評価ガイドラインでは尿を対象としていないが、本ガイドラインに従って評価を行い、0.01 ppm での目標値を参照した。

無添加試料を分析したところ、飼料由来フザリウムトキシンと考えられる ZEN のピークが検出されたが、定量限界の 1/3 未満であった。いずれの化合物もクロマトグラム上に定量を妨害するピークは認められず、選択性に問題はないことが確認された(Fig. 9~12)。

真度, 併行精度および室内精度の結果を Table

9に示した。真度 92~101%, 併行精度 9%未満および室内精度 13%未満となり、妥当性評価ガイドラインの 0.01 ppm での目標値(真度 70~120%, 併行精度 25%未満, 室内精度 30%未満)を満たした。0.5~10 $\mu\text{g/L}$ (試料中濃度 0.5~10 $\mu\text{g/L}$ 相当)の範囲で検量線を作成したところ、いずれの化合物も決定係数 $r^2>0.998$ となり、良好な直線性が得られた。

試料マトリックスの測定への影響を評価するため、1 および 2 $\mu\text{g/L}$ (試料中濃度 1 および 2 $\mu\text{g/L}$ に相当)において溶媒標準溶液に対するマトリックス標準溶液のピーク面積比を求めた。その結果、いずれの化合物も 1 $\mu\text{g/L}$ においては 0.93~1.01, 2 $\mu\text{g/L}$ においては 0.99~1.05 であったことから、試料由来のマトリックスの影響をほとんど受けずに測定できることが示された。また、定量限界濃度(1 $\mu\text{g/L}$)を添加した試料から得られたピークはいずれも $S/N \geq 10$ であった。以上の結果から、本分析法は牛尿中の α -ZAL, β -ZAL, ZAN および ZEN 分析法(定量限界はいずれの化合物も 1 $\mu\text{g/L}$)として妥当であると考えられた。

D. 結論

牛尿中の 2-チオウラシル, 4-チオウラシルおよび 6-メチル-2-チオウラシル分析法を確立した。また、牛尿中のレゾルシル酸ラクトン類(α -ZAL, β -ZAL, ZAN および ZEN)分析法を確立した。分析法の性能を評価した結果、いずれも良好な結果が得られた。これらの分析法は EU への牛肉輸出時のモニタリング検査においてそれぞれ 2-チオウラシルおよびレゾルシル酸ラクトン類が検出された場合に、その原因を調査する方法として有用と考えられた。

[参考文献]

1) Blokland, M. H., van Tricht, F. E., Groot, M. J., Van Ginkel, L. A., Sterk, S. S. Discrimination between the exogenous and endogenous origin of thiouracil in farm animals, the final chapter? Food Addit. Contam. Part A, **38**, 2077-2090 (2021).

2) Arrizabalaga-Larrañaga, A., Linders, R., Blokland, M. H., Sterk, S. Occurrence of resorcyclic acid lactones in porcine urine: discrimination between illegal use and contamination. Food Addit. Contam. Part A., **40**, 838-851 (2023).

E. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表 なし

1. 志田(齊藤) 静香、残留農薬検査における課題と展望について、第 21 回食品安全フォーラム、令和 5 年 12 月 8 日、東京

F. 知的財産権の出願・登録状況 なし

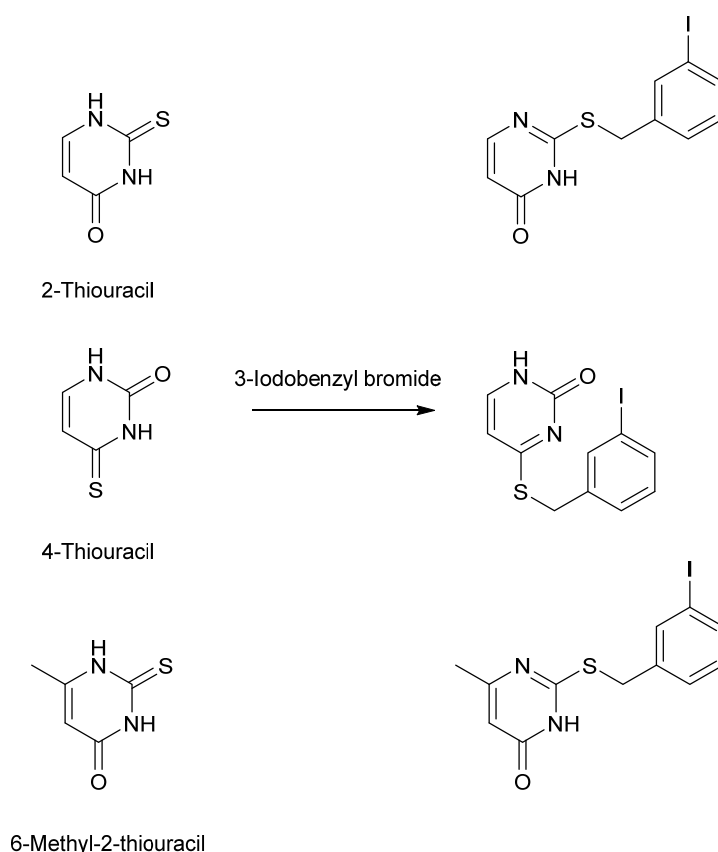


Fig. 1. Structures of 2-thiouracil, 4-thiouracil, 6-methyl-2-thiouracil, and their derivatives with 3-iodobenzyl bromide

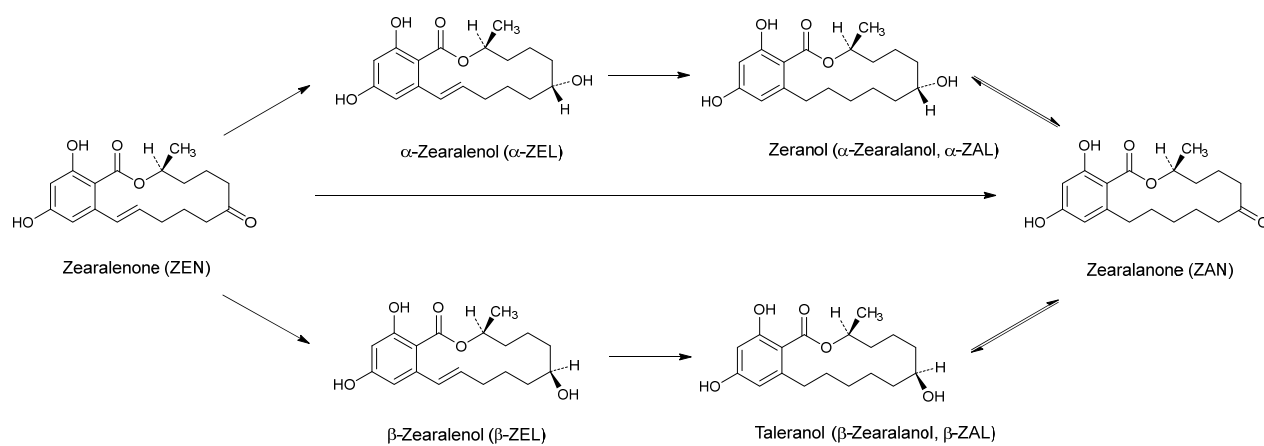


Fig.2. Structures of resorcylic acid lactones and plausible metabolic pathways

Table 1. Retention times and SRM parameters

	Retention time (min)	SRM transition	Declustering potential (V)	Collision energy (eV)
2-Thiouracil*	5.0	m/z 343 $\rightarrow$ 309 (Quantifier ion)	-70	-24
		m/z 343 $\rightarrow$ 127 (Qualifier ion)	-70	-32
[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-2-Thiouracil*	4.2	m/z 346 $\rightarrow$ 312	-55	-24
4-Thiouracil*		m/z 343 $\rightarrow$ 249 (Quantifier ion)	-20	-20
		m/z 343 $\rightarrow$ 127 (Qualifier ion)	-20	-40
[^{13}C , $^{15}\text{N}_2$]-4-Thiouracil*	6.2	m/z 346 $\rightarrow$ 249	-20	-20
		m/z 357 $\rightarrow$ 127 (Quantifier ion)	-55	-34
6-Methyl-2-thiouracil*		m/z 357 $\rightarrow$ 58 (Qualifier ion)	-55	-102
[$^{13}\text{C}_5$, $^{15}\text{N}_2$]-6-Methyl-2-thiouracil*		m/z 364 $\rightarrow$ 127	-80	-34

* 3-Iodobenzyl bromide derivatives

Table 2. Retention times and SRM parameters

	Retention time (min)	SRM transition	Declustering potential (V)	Collision energy (eV)
α -ZAL	7.0	m/z 321 $\rightarrow$ 277 (Quantifier ion)	-90	-32
		m/z 321 $\rightarrow$ 303 (Qualifier ion)	-90	-32
β -ZAL	5.7	m/z 321 $\rightarrow$ 277 (Quantifier ion)	-105	-30
		m/z 321 $\rightarrow$ 303 (Qualifier ion)	-105	-30
ZAN	9.1	m/z 319 $\rightarrow$ 275 (Quantifier ion)	-115	-30
		m/z 319 $\rightarrow$ 205 (Qualifier ion)	-115	-32
ZEN	9.3	m/z 317 $\rightarrow$ 175 (Quantifier ion)	-20	-34
		m/z 317 $\rightarrow$ 131 (Qualifier ion)	-20	-36

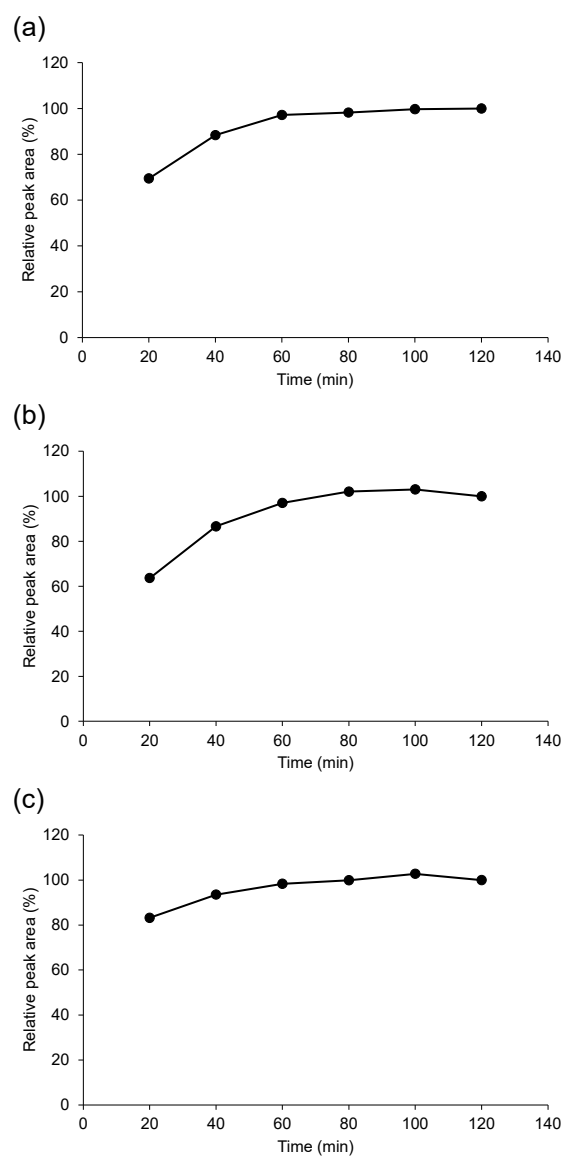


Fig. 3. Relative peak area (%) of 3-iodobenzyl bro-mide derivatives of (a) 2-thiouracil, (b) 4-thiouracil, and (c) 6-methyl-2-thiouracil compared to peak area of those at 120 min in water sample

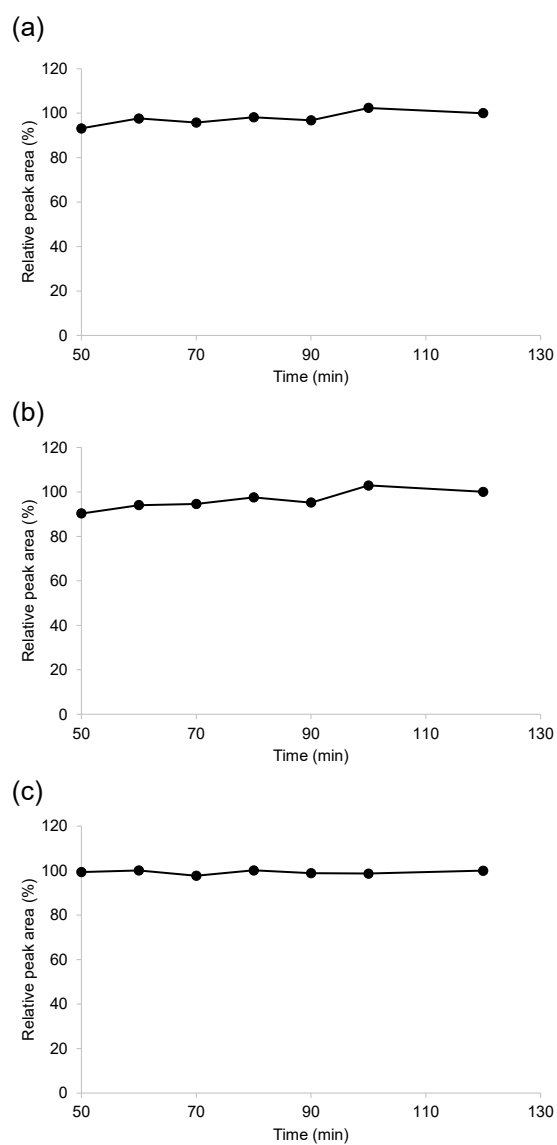


Fig. 4. Relative peak area (%) of 3-iodobenzyl bromide derivatives of (a) 2-thiouracil, (b) 4-thiouracil, and (c) 6-methyl-2-thiouracil compared to peak area of those at 120 min in bovine urine

Table 3. Recovery (%) of 2-thiouracil, 4-thiouracil, and 6-methyl-2-thiouracil from Oasis HLB (150 mg)

	Acetonitrile					Total
	0-5 mL	5-10 mL	10-15 mL	15-20 mL	20-25 mL	
2-Thiouracil	86	10	1	1	0	98
4-Thiouracil	83	5	1	0	0	89
6-Methyl-2-thiouracil	72	18	2	1	0	93

Table 4. Trueness and intra- and inter-day precisions

	Trueness (%)	Intra-day precision (%RSD)	Inter-day precision (%RSD)
2-Thiouracil	95	4.9	4.9
4-Thiouracil	100	2.3	4.2
6-Methyl-2-thiouracil	97	3.0	7.2

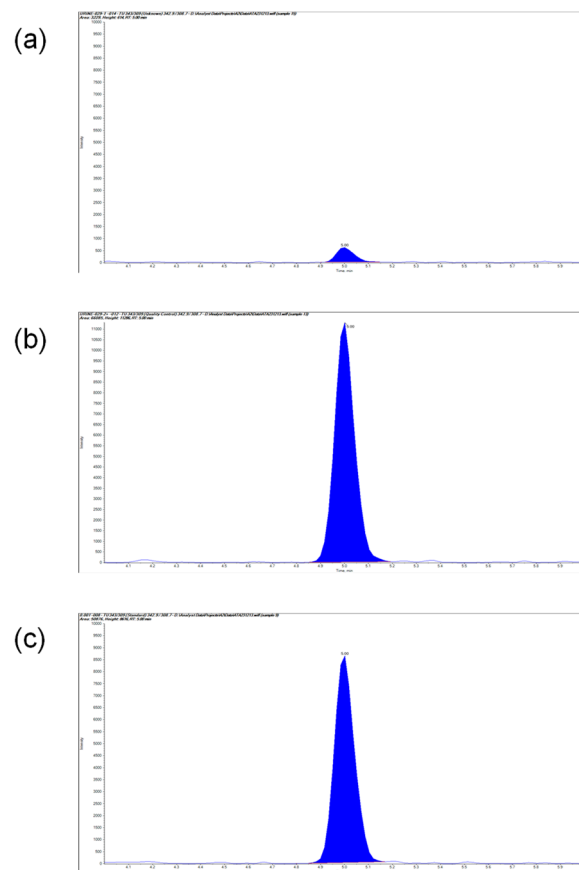


Fig. 5. SRM chromatograms of 3-iodobenzyl bromide derivatives of 2-thiouracil.
 (a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 10 µg/L 2-thiouracil, and (c) a 1 µg/L standard solution (corresponding to 10 µg/L in sample)

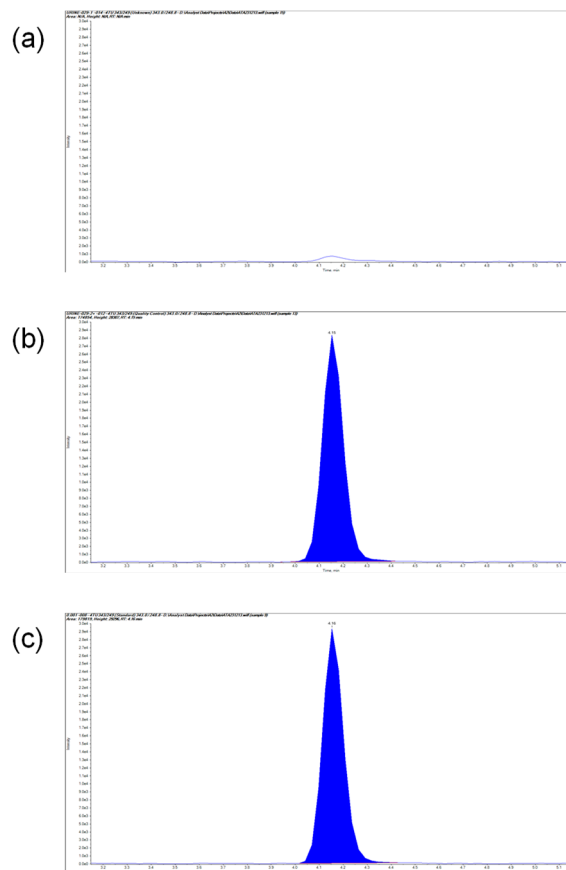


Fig. 6. SRM chromatograms of 3-iodobenzyl bromide derivatives of 4-thiouracil.
 (a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 10 $\mu\text{g/L}$ 4-thiouracil, and
 (c) a 1 $\mu\text{g/L}$ standard solution (corresponding to 10 $\mu\text{g/L}$ in sample)

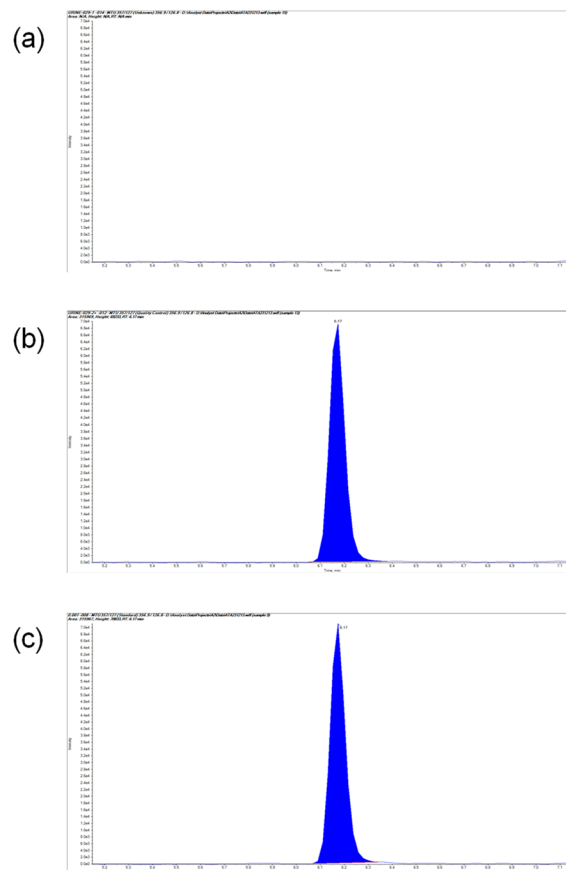


Fig. 7. SRM chromatograms of 3-iodobenzyl bromide derivatives of 6-methyl-2-thiouracil.
 (a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 10 µg/L 6-methyl-2-thiouracil,
 and (c) a 1 µg/L standard solution (corresponding to 10 µg/L in sample)

Table 5. Recovery (%) of α -ZAL, β -ZAL, ZAN, and ZEN from ZearalaTest WB eluted with water/methanol (10 mL)

	Water/methanol				
	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5
α -ZAL	0	0	2	14	53
β -ZAL	0	2	7	52	37
ZAN	0	0	1	9	46
ZEN	0	1	2	18	60

Table 6. Recovery (%) of α -ZAL, β -ZAL, ZAN, and ZEN from ZearalaTest WB eluted with water/methanol (9:1)

	Water/methanol (9:1)			
	0-10 mL	10-20 mL	20-30 mL	30-40 mL
α -ZAL	0	0	0	0
β -ZAL	0	0	0	0
ZAN	0	0	0	0
ZEN	0	0	0	0

Table 7. Recovery (%) of α -ZAL, β -ZAL, ZAN, and ZEN from ZearalaTest WB eluted with methanol

	Methanol		Total
	0-5 mL	5-10 mL	
α -ZAL	96	0	96
β -ZAL	107	0	107
ZAN	102	0	102
ZEN	100	0	100

Table 8. Recovery (%) of α -ZAL, β -ZAL, ZAN, and ZEN from ZearalaTest WB eluted with water/methanol (9:1)

	Water/methanol (9:1)			
	10 mL	20 mL	30 mL	40 mL
α -ZAL	100	90	98	112
β -ZAL	100	103	99	94
ZAN	92	106	98	109
ZEN	108	111	108	107

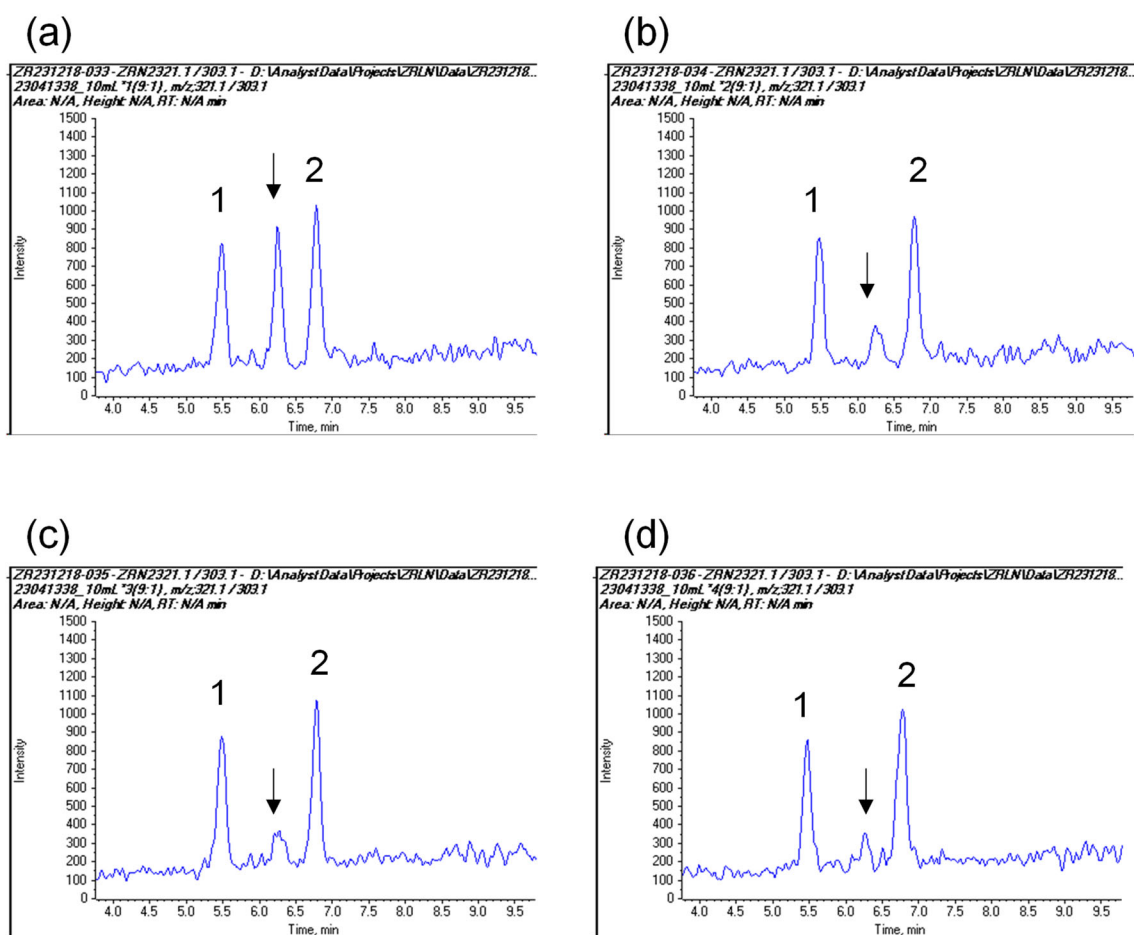


Fig. 8. SRM chromatograms (m/z 321→303; qualifier ion of α - and β -ZAL) of α -ZAL (2) and β -ZAL (1) (spiked concentration: 1 μ g/L) in bovine urine after cleanup with ZearalaTest WB.

Amount of water/methanol (9:1) used for washing: (a) 10 mL, (b) 20 mL, (c) 30 mL, and (d) 40 mL

Arrows indicate co-extracted matrix components.

Table 9. Trueness and intra- and inter-day precisions

Compound	Spiked concentration (mg/kg)	Trueness (%)	Intra-day precision (%RSD)	Inter-day precision (%RSD)
α -ZAL	1	99	4.6	8.1
	2	98	5.4	5.6
β -ZAL	1	101	6.3	12.7
	2	99	4.6	5.0
ZAN	1	92	6.1	8.9
	2	95	7.4	7.7
ZEN	1	94	8.7	9.5
	2	96	7.2	7.2

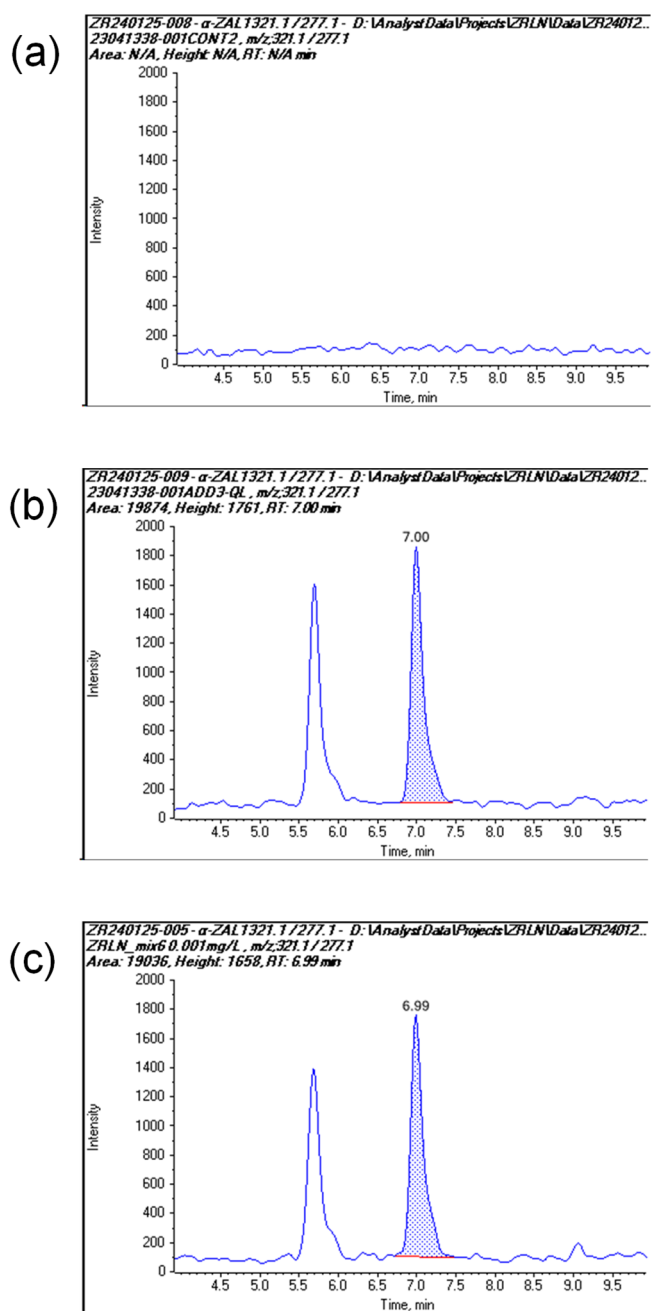


Fig. 9. SRM chromatograms of α -ZAL.

(a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 1 μ g/L α -ZAL, and (c) a 1 μ g/L standard solution (corresponding to 1 μ g/L in sample)

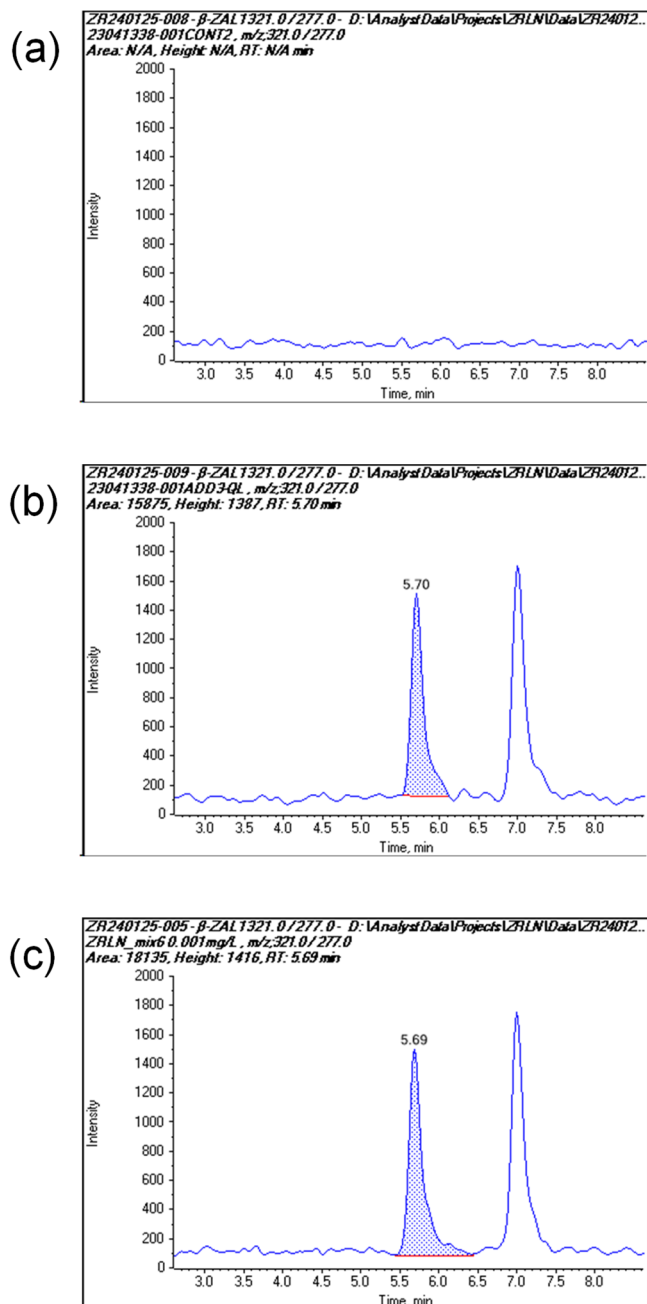


Fig. 10. SRM chromatograms of β-ZAL.

(a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 1 µg/L β-ZAL, and (c) a 1 µg/L standard solution (corresponding to 1 µg/L in sample)

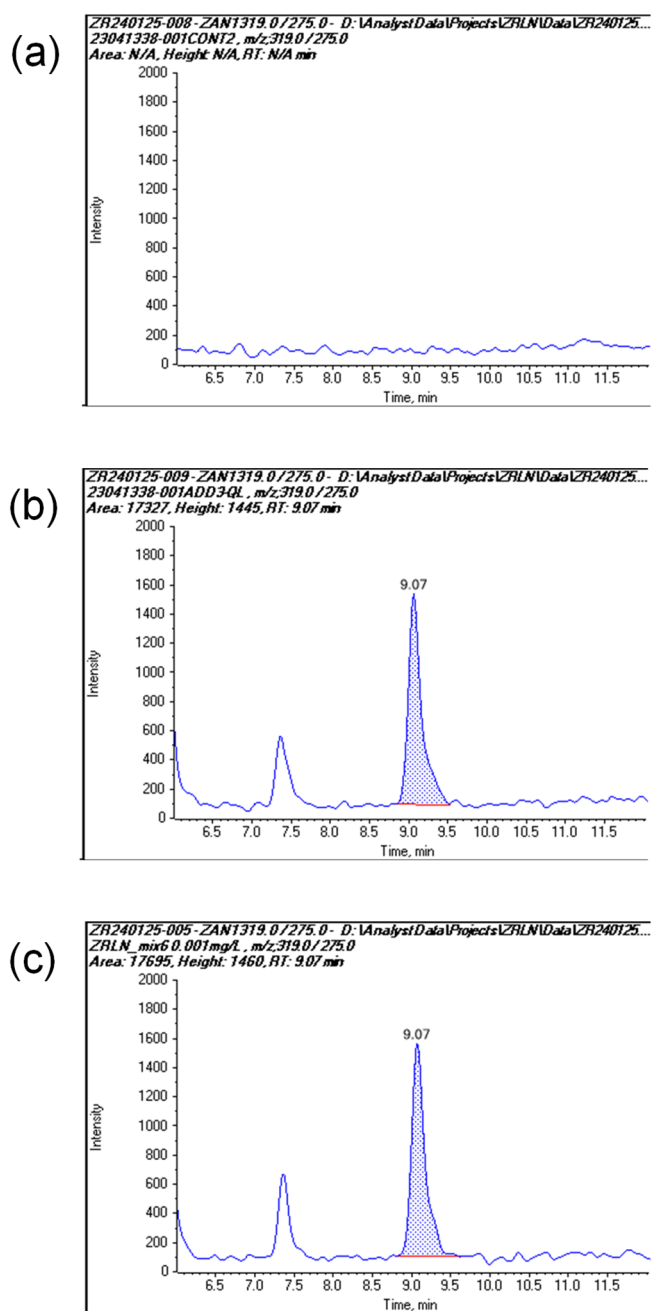


Fig. 11. SRM chromatograms of ZAN.

(a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 1 $\mu\text{g/L}$ ZAN, and (c) a 1 $\mu\text{g/L}$ standard solution (corresponding to 1 $\mu\text{g/L}$ in sample)

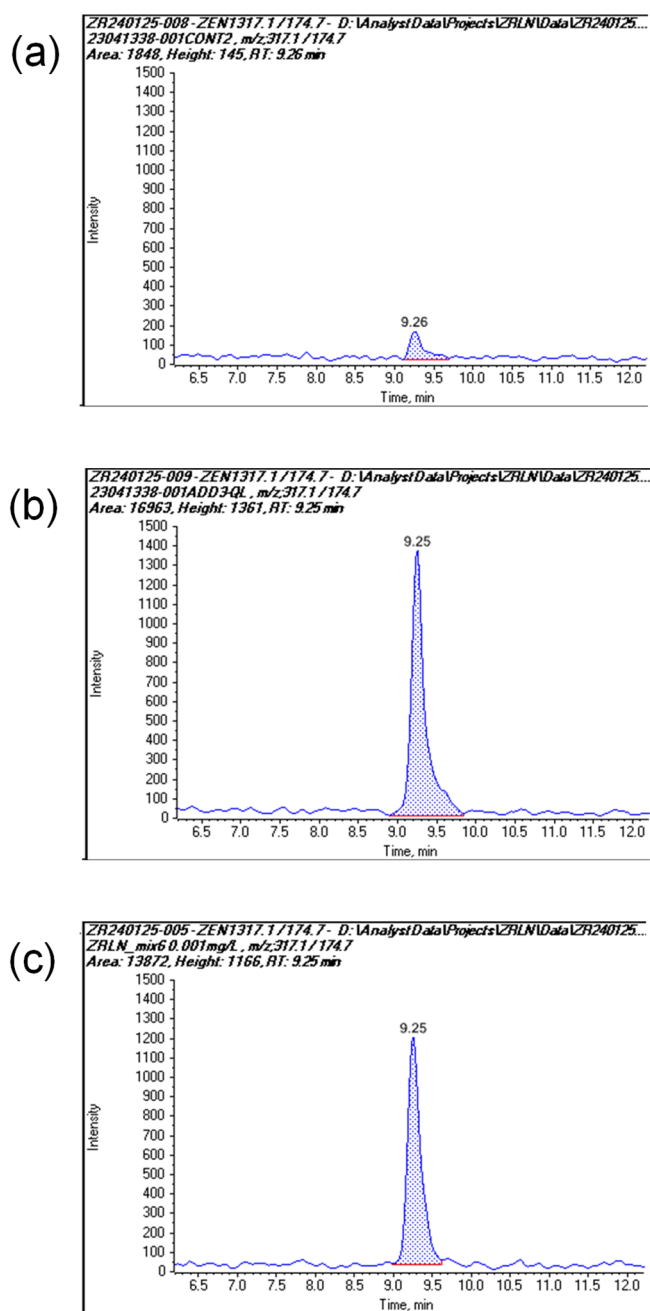


Fig. 12. SRM chromatograms of ZEN.

(a) Blank bovine urine extract, (b) bovine urine extract spiked with 1 µg/L ZEN, and (c) a 1 µg/L standard solution (corresponding to 1 µg/L in sample)

Ⅱ．分担研究報告

2．牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク 低減に関する研究

研究分担者 工藤 由起子

令和5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)
分担研究報告書

牛肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染リスク低減に関する研究

研究分担者 工藤由起子 国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部 部長

研究要旨

本研究は、対米輸出牛肉処理施設の検査所で腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌：STEC）およびサルモネラ試験で使用した検体培養液から試験陽性対象外であるベロ毒素またはインチミン遺伝子保有大腸菌の分離やサルモネラ属菌特異的遺伝子検出を行うことで衛生指標として評価して各施設へのフィードバックによって処理工程の改善検討等に役立てること、また、各検査所での SOP 収集および検査体制の聞き取り調査を実施して対米輸出に必要な検査の逸脱防止を試みることを目的とした。まず、STEC 試験培養液残液 40 検体およびサルモネラ試験培養液残液 86 検体を供試したところ、いずれの遺伝子も検出されなかった。また、供試された培養液に濁りが認められても牛脂等検体からの成分による濁りが生じることから、微生物の濁りの判別は困難であることが検体の特性として認められた。さらに、試験に用いた外部標準対象としての 16S rRNA を対象としたリアルタイム PCR 法は培養法で検出される一部の細菌を検出しないことが認められ、それらは主に、*Arcobacter* 属、*Bacillus* 属、*Campylobacter* 属、*Morganella* 属、*Proteus* 属、*Vibrio* 属および *Staphylococcus* 属であった。次に、各検査所での SOP 収集および検査体制の聞き取り調査から、同一ロットの定義が施設によって解釈が異なること、遺伝子検出では判定のトラブルが多いこと、陽性対照用 DNA 液の作製方法や確認試験の方法が異なる施設があることが判明した。各施設の採材場所、手順、検査施設・機器等を現地で確認し、多くの情報交換されたことによって検査所のこれまでの疑問点の解決や共通の問題点の把握がされた。今後、検査所と検体採取法について調整を行い、異なるアプローチによって衛生指標となる微生物の試験を行う予定である。

研究協力者（*STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査について）

北海道帯広食肉衛生検査所*	鈴木竹彦、松本斉子
岩手県食肉衛生検査所	久松暢子、北村洸人
岐阜県飛騨食肉衛生検査所	越 勝男
栃木県食肉衛生検査所	関口明子
京都市衛生環境研究所食肉検査部門*	川見明日香
姫路市食肉衛生検査センター*	橋本朋美
熊本県食肉衛生検査所	小林将英

大分県食肉衛生検査所
宮崎県高崎食肉衛生検査所*
国立医薬品食品衛生研究所

渡邊春香
越野慶太
廣瀬昌平、千葉由美

A. 研究目的

対米輸出食肉取扱施設や食肉検査所では、牛肉の腸管出血性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌：STEC）およびサルモネラ属菌の検査を輸出先国の試験法で実施しているが、国内試験法とは異なるため知識や手技の高度な習得が必要である。検査担当者は、試験法についてウェブサイト等を参照し、標準作業手順書（SOP）を作成するが、緻密な試験への経験や知識の必要性や慢性的な人員不足による記載事項の再確認や再検討など精査が不足する傾向があり、試験法について高い専門性を有する者による客観的な検査体制の確認の機会が必要とされている。このため、本研究では、各検査所の SOP 収集および検査体制の聞き取り調査を実施し、対米輸出に必要な検査の逸脱防止を試みる。一方で、各検査所での STEC およびサルモネラ試験で使用した検体培養液から試験陽性対象外であるベロ毒素またはインチミン遺伝子保有大腸菌の分離やサルモネラ属菌特異的遺伝子検出を行い、衛生指標として評価し、フィードバックして処理工程の改善検討等に役立てる。

B. 研究方法

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染調査

（1）STEC の検出

検出方法の流れを図 1 に示す。

1) 試験検体の収集

食肉衛生検査所 5 施設での STEC 試験に伴い発生する培養液残液 40 検体を収集した。試験に供試されたウシの種類と月齢を表 1-1 に示す。

2) 試験検体の二次増菌培養

肉眼で濁りが認められない培養液残液については、培養液残液 2 mL を Tryptone soya broth (TSB) 8 mL に添加して 42℃で 18 時間培養（二次増菌培養）した。

3) 培養液残液および二次増菌培養液からの DNA 抽出

収集した培養液残液から DNA アルカリ熱抽出を行った。この DNA 抽出液をマルチプレックスリアルタイム PCR のテンプレートとして用いた。

4) STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

プライマーセット Assay1 (*stx/ea*) ではベロ毒素遺伝子 (*stx* 遺伝子) およびインチミンタンパク質遺伝子 (*ea* 遺伝子) を、Assay2 (16S/0157) では 16S rRNA 遺伝子および 0157 関連遺伝子を、Assay3 (026/0111) では 026 関連遺伝子および 0111 関連遺伝子を、Assay4 (045/0121) では 045 遺伝子および 0121 遺伝子を、Assay5 (0103/0145) では 0103 遺伝子および 0145 遺伝子を検出する。プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせおよび配列を表 1-2 に示す。

Assay1 から Assay5 の反応溶液の組成および量を表 1-3-1 から表 1-3-5 に示す。リアルタイム PCR の反応条件は、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。また、Assay1 から Assay5 は、陰性対照も Ct 値 35 から 40 で検出されることから (USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01)、本研究では、Ct 値 35 未満を陽性とした。まず初めに Assay1、2 を行った。その結果、*stx* 陽性かつ *eae* 陽性の検体は、続けて Assay3、4、5 を同時に行い、7 血清群 0 遺伝子が陽性になるかを確認した。STEC 7 血清群陽性の検体は、陽性となった 0 血清型について免疫磁気ビーズ法実施した。7 血清群 0 遺伝子がない場合は STEC 7 血清群陰性とした。

5) 16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法の評価

4) に示した 16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法 (16S Assay2) および 16S Assay2 とは異なるプライマーおよびプローブの組み合わせによる 16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法 (Nadkarni et al., 2002, 16S Assay6、表 1-2) に 26 菌種 (*Arcobacter butzleri*、*Arcobacter cryaerophilus*、*Arcobacter skirrowii*、*Bacillus cereus*、*Campylobacter coli*、*Campylobacter jejuni*、*Citrobacter freundii*、*Enterobacter aerogenes*、*Enterobacter cloacae*、*Escherichia albertii*、*Escherichia coli*、*Escherichia fergusonii*、*Escherichia*

hermannii、*Hafnia alvei*、*Klebsiella oxytoca*、*Morganella morganii* subsp. *Morganii*、*Proteus mirabilis*、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium、*Shigella boydii*、*Shigella dysenteriae*、*Shigella flexneri*、*Shigella sonnei*、*Staphylococcus aureus*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Yersinia enterocolitica* および *Yersinia pseudotuberculosis*) の抽出 DNA 溶液を供試し、各 PCR 法で検出可能な細菌種を評価した。陰性対照は滅菌蒸留水を用いた。Nadkarni らは 16S Assay6 の検出限界を Ct 値 33 から 38 としており、本研究では、Assay2 と合わせて Ct 値 35 未満を検出陽性とした。

6) STEC 7 血清群の免疫磁気ビーズ法による濃縮および選択培地による単離
免疫磁気ビーズ法は、免疫磁気ビーズ 026、045、0103、0111、0121、0145、0157「生研」(デンカ株式会社)を用いて行った。最終的に E バッファー 1 mL に懸濁したものをビーズ濃縮液とした。このビーズ濃縮液を E バッファーで 10 倍および 100 倍希釈し、各希釈液 0.1 mL をソルビトールマッコンキー寒天 (SMAC) 培地、セフィキシム・亜テルル酸加ソルビトールマッコンキー寒天 (CT-SMAC) 培地、クロモアガーSTEC 培地およびセフィキシム・亜テルル酸加クロモアガーSTEC (CT-クロモアガーSTEC) 培地にそれぞれ 1 枚ずつ塗抹した。

さらに、酸 (1N 塩酸) を加え、ローテーターで 1 時間反応させたものを酸

処理ビーズ濃縮液とした。この酸処理ビーズ濃縮液は E バッファーで 2 倍および 20 倍に希釈した液 0.1 mL ずつを SMAC 培地、CT-SMAC 培地、クロモアガー STEC 培地、および CT-クロモアガー STEC 培地に 1 枚ずつ塗抹し、 $36 \pm 1^\circ\text{C}$ で 18–24 時間培養した。

これらの培地上に増殖した疑わしいコロニーに関して、以下の STEC 7 血清群の確認を行った。

7) コロニーの STEC 7 血清群のマルチプレックスリアルタイム PCR による判定

コロニーを 0.1 mL の TE 緩衝液 (PH 8) に懸濁し、DNA 熱抽出を行なった。この抽出液をテンプレートとして、Assay1 および目的とする 0 群によるプライマーを用いて、4) と同様にリアルタイム PCR を行った。この結果、7 血清群 0 遺伝子が陰性となったこのコロニーを STEC 7 血清群陰性と判定した。*Stx* 陽性かつ *eae* 陽性、血清群 0 遺伝子が陽性のコロニーは、STEC 7 血清群陽性と判定し、必要に応じて同様の操作を行った。

8) STEC 分離株の血清型の再確認

基本的には、血清群 026、045、0103、0111、0121、0145 および 0157 の血清型別は、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ株式会社) または市販のラテックス凝集試薬を用いた。7 血清群に凝集したものについては、H 血清型を抗血清および H-genotyping (1) を用いて H 血清型を決定した。なお、7 血清群以外については 0 血清群を抗血清および 0-genotyping (2) にて決定した。

9) STEC 7 血清群の生化学的性状試験

ブドウ糖、乳糖および白糖の発酵およびガス産生、硫化水素産生を観察するために Triple sugar iron agar (TSI 寒天培地) を、リジン脱炭酸産生、インドール産生、運動性を観察するために Lysine Indole motility medium (LIM 培地) の培養を行った。

(2) サルモネラ属菌の検出

検出方法の流れを図 2 に示す。

1) 試験検体の収集

食肉衛生検査所 5 施設でのサルモネラ試験に伴い発生する培養液残液 86 検体を収集した。試験に供試されたウシの種類と月齢を表 1-1 に示す。

2) 試験検体の二次増菌培養

肉眼で濁りが認められない培養液残液については、培養液残液 2 mL を Tryptone soya broth (TSB) 8 mL に添加して、 42°C で 18 時間培養 (二次増菌培養) した。

3) 培養液残液および二次増菌培養液からの DNA 抽出

各食肉衛生検査所でのサルモネラ試験に伴い発生する培養液残液から DNA アルカリ熱抽出を行った。この DNA 抽出液を以下に示すリアルタイム PCR のテンプレートとして用いた。

4) サルモネラ属菌特異的遺伝子の検出

プライマーセット (*ttr*/16S) ではサルモネラ属菌特異的 *ttr* 遺伝子および 16S rRNA 遺伝子を検出する。16S rRNA 検出用プライマーおよびプローブは、(1) の 5) に示した 16S Assay2 と同じ配列を用いた。プライマーセット、

プライマーおよびプローブの組み合わせおよび配列を表 1-4 に示す。

反応溶液の組成および量を表 1-5 に示す。リアルタイム PCR の反応条件は、95℃で 10 分を 1 サイクル、次いで 95℃で 15 秒、59℃で 1 分の組み合わせを 45 サイクルとした。*ttr* 遺伝子がない場合はサルモネラ属菌陰性とした。

5) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の分離

4) で *ttr* 遺伝子が陽性だった培養液残液 0.5 mL をテトラチオネート (TT) 培地 10 mL に、培養液残液 0.1 mL を Rappaport-Vassiliadis R10 (RV) 培地 10 mL に接種し、42℃で 18~24 時間培養した。TT 培地および RV 培地での培養液を攪拌後、1 白金耳をスルファピリジン添加ブリリアントグリーン (BGS) 培地または Double Modified Lysin Iron Agar (DMLIA) 培地にそれぞれ接種し、35℃で 18~24 時間培養した。BGS 培地と DMLIA 培地に単離された疑わしいコロニーを観察し、疑わしいコロニーが見られない場合は、更に 6 時間培養を続けた。BGS 培地は、平坦で不透明なピンク色で、辺縁全域の培地が赤色を呈するコロニーを選択した。コロニーが密集した培地では、緑色のバックグラウンドに対し黄褐色を呈するコロニーを選択した。DMLIA 培地は、中心部が黒色 (H₂S 陽性)、非黒色 (H₂S 陰性) の紫色コロニーを選択した。典型的なサルモネラはリジンを脱炭酸し、乳糖やショ糖を発酵しないので、培地の色が紫色に変化した。疑わしいコロニーがある場合は、各プレート 2 コロニー以上

を目安として標準寒天培地へ画線塗抹すると同時に、4 分画した BGS 培地と DMLIA 培地にもそれぞれ画線し、35℃で 18~24 時間培養した。コロニーの密集によって単離が難しい場合は、BGS 培地あるいは DMLIA 培地へ適宜画線塗抹し単離した。または、TT 培地培養液と RV 培地培養液から再画線した。典型的なコロニーが認められない場合は、35℃で 18~24 時間継続培養し、典型的なコロニーが認められない平板は、陰性と判断した。

6) 選択培地を用いたサルモネラ属菌の同定

標準寒天培地上のシングルコロニーを用いて、デンカ生研の「サルモネラ LA」で凝集試験を行った。凝集試験陽性のコロニーは AXIMA (島津製作所) で菌種を同定した。

7) 血清型別試験

サルモネラ属菌と同定された菌株は、サルモネラ免疫血清「生研」(O 群, Vi 血清) とサルモネラ免疫血清「生研」H 血清を用いて血清型を決定した。

2. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

2023 年 11 月から 2024 年 2 月に国内の対米輸出認定食肉取扱施設 9 ヶ所の協力を得て STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査を実施した。まず、各施設で使用している SOP を収集し、その内容について項目ごとに整理した。次に、各対米輸出認定食肉取扱施設を訪問し、食肉取扱施設内で食肉処理行程の詳細な説明を受け、STEC およびサルモネラ検査に関連する項目として検体の採材場所お

よび手法等について聞き取り調査を実施した。続いて、整理した SOP の内容をふまえて各食肉衛生検査所で検査業務担当職員に以下の調査項目について聞き取り調査を実施した。

(1) STEC 検査

調査項目は、1 ロットの定義、検体採取法、前培養条件、遺伝子検出のための使用機器、判定時のトラブル、陽性対照 DNA 溶液の作成方法、病原因子確認試験の方法および免疫磁気ビーズのプロトコルとした。

(2) サルモネラ検査

調査項目は、検体採取法、前培養条件、遺伝子検出のための使用機器、判定時のトラブルおよび陽性対照株の管理方法とした。

さらに、各食肉衛生検査所の微生物検査室を視察し、SOP に記載されていない諸項目として実験機器・設備、実験エリアの区分け、実験者の導線を含めた検査体制について聞き取り調査を実施した。

C. 研究結果

1. 牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染調査

(1) 試験培養液および二次増菌培養液中の細菌増殖

STEC 検査の培養液残液 40 検体中 36 検体が濁っており、23 検体が 16S Assay2 で陽性 (CT 値 35 未満) であった (表 1-6)。二次増菌培養液では 4 検体中 4 検体が濁り、2 検体が 16S Assay2 で陽性 (CT 値 35 未満) であった。サルモネラ属菌検査の培養液残液 86 検体中 18 検体が濁ってお

り、17 検体が 16S Assay2 で陽性 (CT 値 35 未満) であった (表 1-6)。二次増菌培養液では 68 検体中 68 検体が濁り、7 検体が 16S Assay2 で陽性 (CT 値 35 未満) であった。16S rRNA 検出用リアルタイム PCR 法の評価では、16S Assay2 では 14 菌種が陽性であったのに対し、16S Assay6 では、23 菌種が陽性であった (表 1-7)。*Arcobacter butzleri*、*Arcobacter cryaerophilus* および *Arcobacter skirrowii* はいずれの PCR 法でも検出されなかった。

(2) STEC の検出

供試した全検体が stx および eae 遺伝子陰性であり、STEC 陰性であった。(表 1-8)。

(3) サルモネラ属菌の検出

供試した全検体が ttr 遺伝子陰性であり、サルモネラ属菌陰性であった。(表 1-9)。

2. STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査

(1) STEC 検査

1 ロットの定義は、同一カット日が 1 施設、同一と畜日が 1 施設、同一農場・同一と畜日が 4 施設、同一農場・同一と畜日・同一カット日が 3 施設であった (表 2-1)。検体採取法は、全施設が N60 サンプルング法であり、検体は複数の個体または枝肉の混合であった。前培養条件は、通知法に準拠が 3 施設、米国農務省が発行している Microbiology Laboratory Guidebook (MLG) に準拠が 1 施設、AOAC に準拠が 4 施設だった (表 2-2)。遺伝子検出のための使用機器は、クオリバックス Q7 システムが 6 施設、

RapidFinder が 3 施設だった。判定時のトラブルは、7 施設で認められ、陽性対照 DNA 溶液の偽陰性等が挙げられた。陽性対照 DNA 溶液の作成方法は、通知法に準拠が 8 施設、通知法を一部改正して実施が 1 施設だった（表 2-3）。病原因子確認試験の方法は、概ね通知法に準拠が 8 施設、クオリバックの説明書に準拠が 1 施設だった（表 2-4）。免疫磁気ビーズのプロトコルは、全施設で「生研」デンカを使用しており、キットのプロトコルに準拠が 7 施設、一部改変が 2 施設だった（表 2-5）。

（2）サルモネラ検査

検体採取法および前培養条件は、全施設が MLG および農林水産省が公開しているアメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱に準拠していた（表 2-6）。遺伝子検出のための使用機器は、クオリバック Q7 システムが 7 施設、3M Molecular Detection System が 3 施設だった（表 2-7）。判定時のトラブルは、クオリバック Q7 システムを使用している 5 施設で認められ、サルモネラ Tm 値の波形の乱れや測定時のエラー表示などが挙げられた。陽性対照株は様々な血清型が供試されており、培地への植菌量は、施設によってばらつきが大きかった（表 2-8）。

（3）検査に関わる諸項目

一部の施設では、作業導線の効率化および生菌・遺伝子使用エリアの区分けが不足していた。

D. 考察

牛枝肉の STEC およびサルモネラ属菌汚染は、食品衛生上重要な課題である。過去

の報告では、日本の牛肉からの STEC 分離率は 0.6%であり、分離された株は全て STEC 0157 であった（Ikeuchi et al., 2024）。海外の牛肉からの STEC 0157 の分離率は、オーストラリアで 0.1%（Phillips et al., 2006）、米国で 0.66%（U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, 2016）、英国で 1.4%（Chapman et al., 2001）、デンマークで 3.4%（Breum & Boel, 2010）、アイルランドで 3.9%（Prendergast et al., 2011）およびスペインで 14.7%（Ramoned et al., 2013）と報告されている。また、日本の牛肉からのサルモネラ属菌分離率は 0.2%であった（Shimajima et al., 2020）。海外の牛肉からのサルモネラ属菌の分離率は、米国で 0.66%（Vipham et al., 2012）および英国で 1.3%（Little et al., 2008）であり、オーストラリアでは 27 施設 1155 頭の枝肉を調査し全検体サルモネラ属菌陰性であったと報告されている（Phillips et al., 2006）。本研究では、牛枝肉のサルモネラおよび STEC 検査の結果が全て陰性であったことから、日本の対米輸出認定食肉取扱施設の牛枝肉処理工程において STEC およびサルモネラ汚染が適切に防除されていることが示唆された。また、試験方法は異なるが、検体供試元の食肉衛生検査所の試験結果も全て陰性だったことから、各検査所での STEC およびサルモネラ検査法の信頼性が改めて示された。一方で、検体の特性として、供試された培養液に濁りが認められても牛脂等検体からの成分による濁りが生じることから、肉眼での微生物の増殖の程度の判別は困難であった。また、試験に用いた外部標準対象としての 16S

rRNA を対象としたリアルタイム PCR 法 (16S Assay2) は、培養法で検出される一部の細菌を検出しないことが認められ、それらは主に、*Arcobacter* 属、*Bacillus* 属、*Campylobacter* 属、*Morganella* 属、*Proteus* 属、*Vibrio* 属 および *Staphylococcus* 属であった。異なるプライマーおよびプローブを用いた 16S Assay6 では、多くの菌種の検出性が改善されたが、16S Assay2 と同様に *Arcobacter* 属が検出されなかったことから、微生物の増殖を幅広く評価するためには、さらに広い検出性をもつ 16S rRNA 用プライマーおよびプローブを組み合わせる必要があることが考えられた。

STEC 検査およびサルモネラ検査の SOP に関する調査では、複数の項目において施設ごとに異なる点が認められた。1 ロットの定義は、カット日、と畜日および農場のどの項目を共通項とするかにおいて施設ごとにばらつきが認められた。しかし、1 ロットの定義については MLG でも厳密な指定はされておらず、現在の定義は、各食肉取扱施設の処理工程および処理頭数等に合わせて適切に設定しているため問題ないと考えられた。また、クオリバックス Q7 システムおよび RapidFinder での STEC 判定時のトラブルは、9 施設中 7 施設で認められ、サルモネラ判定時のトラブルは 7 施設中 5 施設で認められた。検査機器のトラブルは、検査の信頼性確保と検査再実施による検査員作業時間の浪費につながる。そのため、次年度には、トラブルの発生状況の詳細について追加で聞き取り調査し、検査機器でのトラブルの再現性を検証し、場合によっては機器メーカーに問い合わせることで障害を改

善する必要があると考えられた。陽性対照株の培地への植菌量は、施設によってばらつきが大きかったため、植菌量と培養の安定性について、検証が必要と考えられた。作業動線の効率化および生菌・遺伝子エリアの区分け等は、試験の逸脱につながる恐れもあるため、現地でディスカッションし、改善案を提示した。これらの改善によって検査体制の効率化が図られれば、輸出食肉 STEC 検査およびサルモネラ検査の信頼性の担保に寄与できると考えられた。

E. 結論

日本の対米輸出認定食肉取扱施設の牛枝肉処理工程における STEC およびサルモネラ汚染の適切な防除および各食肉検査所での STEC およびサルモネラ検査法の信頼性が改めて示された。また、STEC 検査およびサルモネラ検査において、クオリバックス Q7 システムおよび RapidFinder での判定時のトラブルが複数の施設で認められたため、今後検証を進め、改善策を提示する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(誌上発表)

Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, Suzuki T, Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y.: Isolation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*

from the Surfaces of Beef Carcasses
in Slaughterhouses in Japan. J Food
Prot. 2024;87:100263.

(学会発表)

廣瀬昌平，池内隼佑，島田光平，児山綾
子，石田祥士，吉田千央，東海林明子，
高橋むつみ，山口健一，大迫英夫，塚
本真由美，津江友紀，片山直人，瀧下
恵里子，樋渡佐知子，林谷秀樹，亀山
浩，工藤由起子．国内食肉処理施設に
おける牛枝肉の志賀毒素産生性大腸菌
保有状況調査．日本食品衛生学会第 119
回学術講演会．令和 5 年 10 月 12 日-13
日．東京

H. 知的所有権の取得状況・登録状況
なし

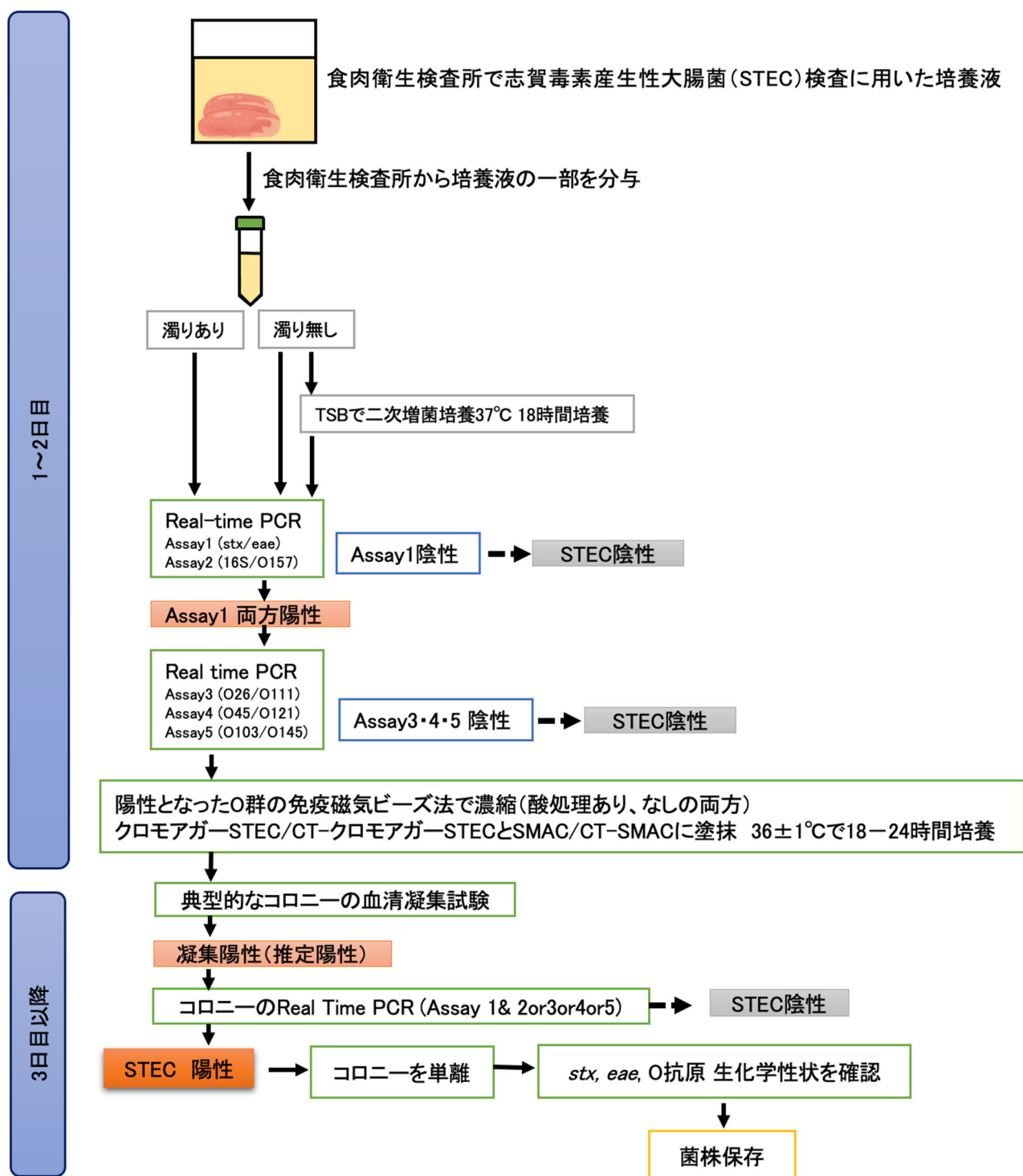


図1 志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) の検出・分離方法

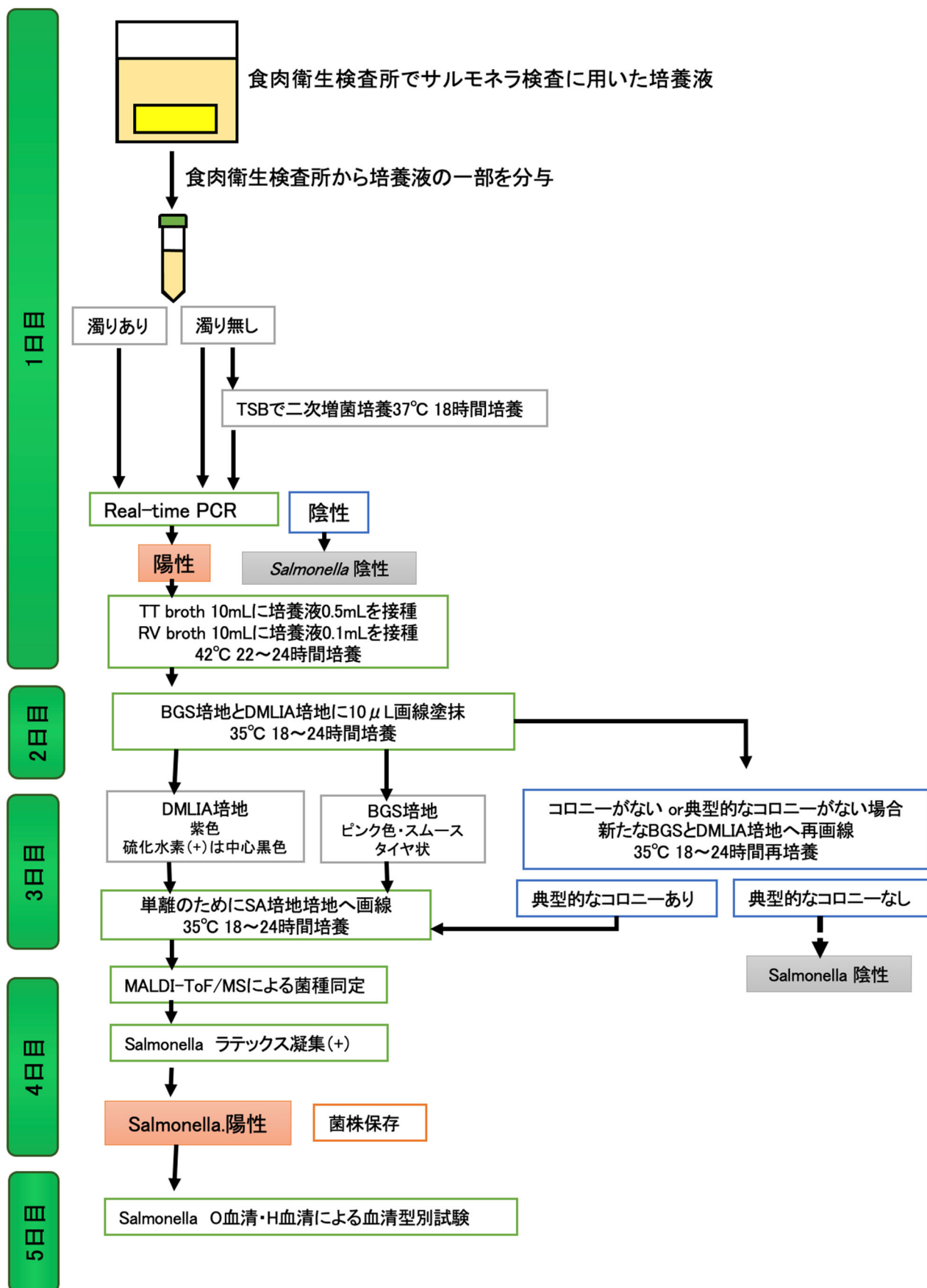


図2 サルモネラ属菌の検出・分離方法

表1-1. 供試した培養液残液のウシの情報

検査	種類	合計 個体数	齢の幅 (ヶ月)	齢 (ヶ月)	個体数
STEC*	黒毛和種	41	23-182	20未満	0
				20以上30未満	28
				30以上	13
	交雑種	57	23-29	20未満	0
				20以上30未満	57
				30以上	0
	牛情報なし	16	NT	20未満	NT
				20以上30未満	NT
				30以上	NT
サルモネラ属菌	褐毛和種	10	24-26	20未満	0
				20以上30未満	10
				30以上	0
	黒毛和種	61	25-83	20未満	0
				20以上30未満	52
				30以上	9
	交雑種	13	25-27	20未満	13
				20以上30未満	0
				30以上	0
	ホルスタイン	2	37, 95	20未満	0
				20以上30未満	0
				30以上	2

*: STEC検査の培養液は複数個体の検体が混合

表1-2. プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせと配列

アッセイ名	標的 遺伝子	プライマー とプローブ	配列	出典
Assay1	Stx	Stx-F	5' TTTGTACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG 3'	USDA
		Stx-R	5'CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACDTC 3'	
		Stx1-P	5' FAM-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A-BHQ_1 3'	
		Stx2-P	5' FAM-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC- MGB 3'	
	eaeA	Eae-F	5' CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA 3'	USDA
		Eae-R	5' CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTM 3'	
		Eae-P	5' HEX-ATA GTC TCG CCA GTA TTC GCC ACC AAT ACC-BHQ_1 3'	
Assay2	16S rRNA gene	16S rRNA-F	5' CCT CTT GCC ATC GGA TGT G 3'	USDA
		16S rRNA-R	5' GGC TGG TCA TCC TCT CAG ACC 3'	
		16S rRNA-P	5' HEX-GTG GGG TAA CGG CTC ACC TAG GCG AC- BHQ_1 3'	
	RfbE0157	RfbE 0157-F	5'-TTT CAC ACT TAT TGG ATG GTC TCA A-3'	EFSA
		RfbE 0157-R	5'-CGA TGA GTT TAT CTG CAA GGT GAT-3'	
		RfbE 0157-P	5' FAM-AGG ACC GCA GAG GAA AGA GAG GAA TTA AGG-BHQ_1 3'	
Assay3	Wzx026	Wzx 026-F	5' GTA TCG CTG AAA TTA GAA GCG C 3'	USDA
		Wzx 026-R	5' AGT TGA AAC ACC CGT AAT GGC 3'	
		Wzx 026-P	5' 56-FAM-TGG TTC GGT TGG ATT GTC CAT AAG AGG G- 3BHQ_1 3'	
	WbdI0111	WbdI 0111-F	5' TGT TCC AGG TGG TAG GAT TCG 3'	USDA
		WbdI 0111-R	5' TCA CGA TGT TGA TCA TCT GGG 3'	
		WbdI 0111-P	5' 5MAXN - TGA AGG CGA GGC AAC ACA TTA TAT AGT GC- 3IABkFQ 3'	
Assay4	Wzx045	Wzx 045-F	5' CGT TGT GCA TGG TGG CAT 3'	USDA
		Wzx 045-R	5' TGG CCA AAC CAA CTA TGA ACT G 3'	
		Wzx 045-P	5' 56-FAM- ATT TTT TGC TGC AAG TGG GCT GTC CA- 3BHQ_1 3'	
	Wzx0121	Wzx 0121-F	5' AGG CGC TGT TTG GTC TCT TAG A 3'	USDA
		Wzx 0121-R	5' GAA CCG AAA TGA TGG GTG CT 3'	
		Wzx 0121-P	5' 5MAXN - CGC TAT CAT GGC GGG ACA ATG ACA GTG C- 3IABkFQ 3'	
Assay5	Wzx0103	Wzx 0103-F	5' TTG GAG CGT TAA CTG GAC CT 3'	USDA
		Wzx 0103-R	5' ATA TTC GCT ATA TCT TCT TGC GGC 3'	
		Wzx 0103-P	5' HEX- AGG CTT ATC TGG CTG TTC TTA CTA CGG C- BHQ-1 3'	
	Wzx0145	Wzx 0145-F	5' AAA CTG GGA TTG GAC GTG G 3'	USDA
		Wzx 0145-R	5' CCC AAA ACT TCT AGG CCC G 3'	
		Wzx 0145-P	5' FAM-TGC TAA TTG CAG CCC TTG CAC TAC GAG GC-BHQ_1 3'	
Assay6	16S rRNA gene	16S_br_F	5'TCCTACGGGAGGCAGCAGT 3'	Nadkarni MA et al., 2002.
		16S_br_R	5'GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3'	
		16S_br_P	5' FAM- CGTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-BHQ_1 3'	

USDA: USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01

EFSA: EFSA Journal. 11:3138、2013

表1-3-1. Assay1 stx1&2, eae geneの1wellあたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2×Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer stx F (50 μM)	0.63	1.25	
Primer stx R (50 μM)	0.63	1.25	
Primer Eae F (50 μM)	0.50	1.00	
Primer Eae R (50 μM)	0.50	1.00	
Probe stx1 P (5 μM)	1.25	0.25	FAM
Probe stx2 P (5 μM)	1.25	0.25	FAM
Probe Eae-P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	1.74		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表1-3-2. Assay2 O157, 16S rRNA geneの1wellあたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2×Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer 16SRna-F (20 μM)	0.20	0.16	
Primer 16SRna-R (20μM)	0.20	0.16	
Primer RfbE-O157-F (20μM)	0.25	0.20	
Primer RfbE-O157-R (20μM)	0.25	0.20	
Probe 16SrRNA-P (5 μM)	0.50	0.10	HEX
Probe RfbE-O157-P (5 μM)	0.25	0.05	FAM
滅菌蒸留水	5.85		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表1-3-3. Assay3 O26, O111 geneの1wellあたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2×Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O26 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O26 R (20 μM)	0.31	0.25	
Primer WbdI O111 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer WbdI O111 R (20 μM)	0.31	0.25	
Probe Wzx O26 P (2 μM)	1.88	0.15	FAM
Probe WbdI O111 P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	3.38		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表1-3-4. Assay4 O45, O121 geneの1wellあたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2×Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O45 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O45 R (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O121 R (20 μM)	0.31	0.25	
Probe Wzx O45 P (2 μM)	2.34	0.19	FAM
Probe Wzx O121 P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
滅菌蒸留水	2.92		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表1-3-5. Assay5 O103, O145 geneの1wellあたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2×Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer Wzx O103 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O103 R (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 F (20 μM)	0.31	0.25	
Primer Wzx O145 R (20 μM)	0.31	0.25	
Probe Wzx O103 P (5 μM)	1.00	0.20	HEX
Probe Wzx O145 P (2 μM)	2.50	0.20	FAM
滅菌蒸留水	2.76		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表1-4. プライマーセット、プライマーおよびプローブの組み合わせと配列

アッセイ名	標的 遺伝子	プライマー とプローブ	配列	出典
サルモネラ属菌	16S rRNA gene	16S rRNA-F	CCTCTTGCCATCGGATGTG	USDA
		16S rRNA-R	GGCTGGTCATCCTCTCAGACC	
		16S rRNA-P	GTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGAC	
	ttr	ttr-6 (forward)	CTCACCAGGAGATTACAACATGG	Appl Environ Microbiol. 2006 Jul;72(7):4545-53. doi: 10.1128/AEM.00131-06.
		ttr-4 (reverse)	AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC	
		ttr-5 (Target probe)	CACCGACGGCGAGACCGACTTT	

USDA: USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01

表1-5. サルモネラ属菌Assay ttr, 16SrRNA geneの1wellあたりの反応溶液組成

試薬	1反応 (μl)	終濃度 (μM)	標識
2× Taqman Environmental MastermixMaster Mix	12.50		
Primer 16SRna-F (20 μM)	0.20	0.16	
Primer 16SRna-R (20μM)	0.20	0.16	
Primer ttr-6 F (20 μM)	0.50	0.40	
Primer ttr-4 R (20 μM)	0.50	0.40	
Probe 16SrRNA-P (5 μM)	0.50	0.10	HEX
Probe ttr-5 (5 μM)	1.25	0.25	FAM
滅菌蒸留水	4.35		
DNAテンプレート	5.00		
合計	25.00		

表1-6. 培養液の濁りと16S real-time PCRの結果

対象菌	全検体数	培養液残液		二次増菌培養	
		濁りの認めら れた検体数 /全検体数	16S陽性 (Ct値<35) 検体数 /全検体数	濁りの認めら れた検体数 /二次増菌培養 供試検体数	16S陽性 (Ct値<35) 検体数 /二次増菌培養 供試検体数
志賀毒素産生性大腸菌 (STEC)	40	36/40	23/40*	4/4	2/4**
サルモネラ属菌	86	18/86	17/86***	68/68	7/68****

*Ct値13.9～31.9、**Ct値33.8～34.8、***Ct値13.8～29.5、****Ct値14.1～15.9

表1-7. 16S rRNA リアルタイムPCR Assay2およびAssay6 の検出性

菌種	16S Assay2*	16S Assay6**
<i>Arcobacter butzleri</i>	-	-
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	-	-
<i>Arcobacter skirrowii</i>	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	+
<i>Campylobacter coli</i>	-	+
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+
<i>Escherichia albertii</i>	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+
<i>Escherichia fergusonii</i>	+	+
<i>Escherichia hermannii</i>	-	+
<i>Hafnia alvei</i>	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+
<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>Morganii</i>	-	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	+	+
<i>Shigella boydii</i>	+	+
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+
<i>Shigella sonnei</i>	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	+
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	+
陰性対照 (MilliQ)	-	-

* USDA, Laboratory Guidebook, MLG 5C Appendix 4.01

** Nadkarni MA et al., 2002.

表1-8. 供試培養残液からSTEC分離結果

施設	供試 検体数	陽性 検体数
A	8	0
B	8	0
C	8	0
D	8	0
E	8	0
合計	40	0

表1-9. 供試培養残液からのサルモネラ属菌分離結果

施設	供試 検体数	陽性 検体数
A	32	0
B	54	0
合計	86	0

表2-1. STEC検査1ロットの定義および検体採取方法

項目	施設数
1ロットの定義	
同一カット日	1
同一と畜日	1
同一農場および同一と畜日	4
同一農場、同一と畜日および同一カット日	3
検体	
複数の個体または枝肉	9
検体採取方法	
N60法	9

表2-2. STEC検査の検体培養条件、遺伝子検出方法および判定時のトラブル

項目	施設数
検体培養条件	
通知法 例1 MLG	1
通知法 例2 AOAC	5
通知法 例3	3
遺伝子検出使用機器	
Applied BioSystems Rapid Finder STEC (AOAC)	3
BAXクオリバックスQ7 (MLG)	6
遺伝子検出キット	
STEC Ditection Workflow (AOAC061602)	3
STEC Screening(AOAC091301)、E.coli O157:H7(AOAC031002)、 STEC Panel 1&2(AOAC022203)	6
判定時のトラブル (Applied BioSystems Rapid Finder STEC)	
あり	2
なし	1
判定時のトラブル (BAXクオリバックスQ7)	
あり	5
なし	1

表2-3. 陽性対照DNA溶液の作成方法

項目	施設数
作製方法の根拠	
通知法	8
通知法から一部改変	1
増菌培地	
mTSB	7
TSB	1
羊血液寒天培地 (MLG)	1

表2-4. コロニーからの病原因子確認試験の方法

項目	施設数
DNA抽出方法の根拠	
通知法	8
BAXクオリバックスQ7	1
抽出方法	
1 コロニーを100 μ l の滅菌蒸留水に懸濁し、97 $\pm$ 2°Cで10 分間加熱後、14,000 $\times$ g の遠心処理した上清をキットへ	8
1 コロニーを100 μ l の滅菌蒸留水に懸濁し、検体培養液と同様の操作でキットへ	1

表2-5. 免疫磁気ビーズのプロトコル

項目	施設数
免疫磁気ビーズ試薬	
「生研」デンカ	9
免疫磁気ビーズの洗浄回数	
1 回	7
2 回以上	1
3 回	1

表2-6. サルモネラ検査の検体採取法および培養法

項目	施設数
検体	
去勢／未経産 82	4
去勢／未経産 82 + 廃用／種雄 58	5
検体採取方法	
牛枝肉表面3か所（腹部、胸部及び臀部）それぞれ100 cm ² を滅菌mTSB培地 10 mlを含ませたスポンジで拭き取り	9
増菌培地	
mTSB 60 m（検体採取時にスポンジに染み込ませた10 mLを含む）	9
検体の培養条件	
42 $\pm$ 1°Cで15~24時間	7
42 $\pm$ 0.5°Cで22~24時間	2

表2-7. サルモネラ属菌遺伝子検出のための使用機器および判定時のトラブル

項目	施設数
サルモネラ属菌遺伝子検出機器	
BAXクオリバックスQ7 (AOAC)	7
3M Molecular Detection System (MLG)	2
サルモネラ属菌遺伝子検出キット	
エンドポイント試薬サルモネラ 2	7
3 M病原菌検出アッセイ 2 サルモネラ属菌用	2
判定時のトラブル (BAXクオリバックスQ7)	
あり	5
なし	0
聞き取り未調査	2
判定時のトラブル (3M Molecular Detection System)	
あり	0
なし	2

表2-8. サルモネラ陽性対照株の管理方法

項目	施設数
サルモネラ陽性対照株の増菌培地	
mTSB 60 mL	9
植菌量	
マクファーランド0.5に希釈した培養液を 1 μ L	3
マクファーランド0.5に希釈した培養液を1白金耳	1
培養液を1白金耳	1
培養液を 1 mL	1
保存培養液の約13倍希釈液を 1 mL	1
マイクロバンクビーズ 1 粒	1
1 白金耳 (10 μ L) あるいはマイクロバンクビーズ 1 粒	1
サルモネラ陽性対照株 (<i>Salmonella enterica</i>) の血清型	
AbaetetubaおよびCholeraesuis	1
AboyおよびEnteritidis	1
AboyおよびEnteritidisあるいはCholeraesuis	1
BaetetubaおよびSenftenberg	1
DerbyおよびHarder	1
EnteritidisおよびCholeraesuis	1
TyphimuriumおよびInfantis	1
TyphimuriumおよびMuenchen	1
SOPに記載なし	1
保存方法	
マクファーランド0.5に希釈した培養液を -20°C以下で保存	2
普通寒天斜面で4°C保存	2
カジトン培地で4°C保存	1
マイクロバンクビーズを冷凍保存	1
マイクロバンクビーズを-70°C以下で保存あるいは培養液を-75°C以下で保存	1
スキムミルク中 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mLで -20°Cに保存	1
培養液を10倍希釈し-70°C以下で保存	1

Ⅱ．分担研究報告

3. と畜場 HACCP の検証を支援する資料作成に関する研究

研究分担者 吉富 真理

令和5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）
分担研究報告書

と畜場 HACCP の検証を支援する資料作成に関する研究

研究分担者 吉富 真理 国立保健医療科学院 生活環境研究部 上席主任研究官

研究要旨

と畜場の HACCP システムの検証において、指名検査員が行う科学的妥当性の判断を支援する資料の作成を目的として、スチームバキューム（以下、「SV」という。）処理による牛肉表面の微生物削減効果の妥当性確認試験を実施した結果、牛肉表面の SV 処理の E. coli 低減効果が示されたが、SV の処理回数や操作が影響するため、と畜場においては SV の取り扱い及び適切な使用のための手順書を作成し、その有効性を検証することが必要であることが示された。輸出食肉施設の SV の導入と外部検証の微生物試験結果との関係の比較では、SV の使用にかかわらず多くの枝肉は良好な衛生度を確保していることが判明した。また、支援資料の参考とするために、アメリカ合衆国農務省食品検査局の食肉ハザードコントロールガイドを翻訳した。

研究協力者：

山崎 栄樹（帯広畜産大学）

森田 幸雄（麻布大学）

A. 研究目的

厚生労働省があらかじめ都道府県知事等の推薦を受けて対米輸出食肉を検査する検査員として指名したと畜検査員（以下、「指名検査員」という。）は、対米国向けと畜検査、HACCP システム等に基づく衛生管理の監視、作業前・作業中点検、廃棄物の管理確認等の、輸出国と日本で定めた認定要綱等に基づく対応を実施している。指名検査員は、と畜場の HACCP システムの検証の際に、と畜場の HACCP プランのハ

ザード分析に示された判断について、科学的妥当性を評価することが求められるが、国内で検証結果の報告はほとんどない。そこで、その評価を支援する資料の作成のために、スチームバキューム（以下、「SV」という。）処理による牛肉表面の微生物削減効果の妥当性確認試験を行うとともに、米国及びまたは EU 輸出向け食肉取扱施設（以下、「輸出食肉施設」という。）の外部検証の微生物試験結果にと SV の導入との関係を比較した。また、支援資料作成の参考として、アメリカ合衆

国農務省食品検査局（以下、「FSIS」という。）の食肉ハザードコントロールガイド（以下、「HCG」という。）を翻訳した。

B. 研究方法

1. SV 処理による牛肉の E. coli 削減の妥当性確認試験

（1）牛肉検体

牛肉は、国内流通製品工場から購入したブロック肉（筋膜未除去）を用いた。国内流通製品工場でカット処理、真空パックされた翌日に 10℃以下で輸送された牛ブロック肉を冷凍保存し、使用前に冷蔵庫（5℃以下）にて 3 日間かけて解凍し、供試した。

（2）接種菌液の調製

牛・牛肉のハザード分析で重要となる腸管出血性大腸菌（以下「STEC」と略。）の代わりに大腸菌（E. coli K12 株）を用いた。E. coli K12 株を LB 培地に植菌し、37℃で 24 時間、好気条件下で振盪培養した。

接種菌量は、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

（薬生食監発 0531 第 6 号 令和 3 年 5 月 31 日）の別紙の牛と体における外部検証（微生物試験）の結果概要（全体）の腸内細菌科菌群について、最小～最大値 0.27～3.20 log cfu/cm²、平均値±標準偏差：0.80±0.45 log cfu/cm²より、最大値の 100 倍の 5 log cfu/cm²を目安に調整した。

（3）SV の使用条件

使用した SV は JARVIS 社製で、

蒸気温度（設定）：120℃、蒸気温度（排出口）：100℃、蒸気排出圧：75 kPa、バキューム圧：65 kPa であった。

（4）牛肉の大腸菌への SV の効果の検証

SV の効果の検証方法を図 1 に示す。牛ブロック肉の表面にエタノールを噴霧後、乾燥防止のためラップをして、室温で 24 時間保管した。牛ブロック肉表面に油性マジックでマーキングした区画（面積 5 cm×5 cm：25 cm²）に、E. coli K12 株菌液（約 1×10⁶ cfu/0.1 mL）0.1 mL をマイクロピペットを用いて接種した。この菌接種検体に接種区画別に 0～5 回の SV 処理を行った。

SV 処理後、接種区画を切除し、それぞれストマッカー袋に入れ、ペプトン加生理食塩水を 90 mL 加え、ホモジナイズし試料原液を作製した。試料原液を適宜ペプトン加生理食塩水で段階希釈し、試料原液及び 10 倍段階希釈液を EC プレート（3M ペトリフィルム：ネオジェンジャパン製）に 1 mL ずつ接種し、35±1℃、24±2 時間培養し、コロニーを計測した。試験は 2 回実施し、SV 処理の 0～5 回による大腸菌の菌数の変化を比較した。統計処理は EZR (<https://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmed.html>) を用い、3 群以上の等分散性の検定（Bartlett 検定）を実施後、Tukey の多重比較検定を実施し、有意差（P<0.05）を求めた。

2. 輸出食肉施設における外部検証

結果と SV 導入状況の解析

輸出食肉施設を管轄する食肉衛生検査所（以下、「検査所」という。）5 か所より提供された、管轄施設の外部検証で実施している微生物試験結果について、SV の導入との関係について比較した。提供頂いた 5 検査所の内訳は SV 非使用施設が A と B の 2 か所、SV 使用施設は C、D、E の 3 か所であった。統計処理は EZR を用いた。一般生菌数では A 施設のデータは正規分布を示しておらず、B、C、D、E 施設のデータは正規分布を示していた。B、C、D、E 施設間のデータは、3 群以上の等分散性の検定（Bartlett 検定）を実施後、Tukey の多重比較検定を実施し、有意差（ $P<0.05$ ）を求めた。A 施設と B、C、D、E 間には各々算出された菌数の Log cfu/g 値について t 検定を実施し、有意差（ $P<0.05$ ）を求めた。腸内細菌科菌群数は A、B、C、D、E 施設ともに正規分布を示していないため、平均値の比較は実施しなかった。

3. FSIS の食肉 HCG の翻訳

と畜場 HACCP の検証の科学的支援の資料の作成の参考資料として、FSIS の Meat and Poultry Hazards and Controls Guide 2018 (<https://www.fsis.usda.gov/guidelines/2018-0005>) を翻訳することとした。

C. 結果

1. SV 処理による牛肉の E. coli 削減の妥当性確認試験

E. coli K12 株の接種菌量及び牛肉の表面温度は、1 回目で $5.8 \log \text{cfu}/25 \text{cm}^2$ 及び 8.5°C 、2 回目で $6.2 \log \text{cfu}/25 \text{cm}^2$ 及び 12.0°C であった。

SV の 1 回目、2 回目の実験の使用条件は表 1 のとおりである。

1 回目と 2 回目の SV 処理回数による菌数変化は図 2-1、表 2-1、図 2-2、表 2-2 のとおりである。SV の処理回数 0, 1, 2, 3, 4, 5 回で、それぞれ 1 回目試験において、 5.79 ± 0.15 、 4.96 ± 0.65 、 4.13 ± 0.61 、 4.13 ± 0.61 、 4.13 ± 0.21 、 4.23 ± 0.54 、 $3.77\pm 0.76 \log \text{cfu}/25 \text{cm}^2$ 、2 回目試験において、 6.01 ± 0.06 、 5.03 ± 0.99 、 3.63 ± 0.45 、 4.78 ± 0.16 、 4.59 ± 0.48 、 $4.00\pm 0.65 \log \text{cfu}/25 \text{cm}^2$ であった。1 回目の実験では統計学的に SV 処理回数 0 回目と 2 回目 ($P=0.026$)、0 回目と 3 回目 ($P=0.025$)、0 回目と 4 回目 ($P=0.036$)、0 回目と 5 回目 ($P=0.006$) で有意差が認められた。2 回目の実験では統計学的に SV 洗浄回数 0 回目と 2 回目 ($P=0.002$)、0 回目と 5 回目 ($P=0.008$) で有意差が認められた。SV を牛肉に 1 回の処理により $1 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$ 程度、2 回の処理により $2 \log \text{cfu}/\text{cm}^2$ 程度の E. coli の減少が認められた。

2. 輸出食肉施設における外部検証の微生物試験の結果と SV 導入状況の解析

SV が導入されていない 2 施設 (A、B) 及び導入されている 3 施設 (C、D、E) の一般生菌数と腸内細菌科菌群数を図 3、表 3 に示す。各施

設の一般生菌数±標準偏差 log cfu/cm²は A 施設で 0.84±0.35、B 施設で 2.21±0.66、C 施設で 1.98±0.87、D 施設で 1.71±0.71、E 施設で 2.1±0.9 であった。A 施設の一般生菌数は B、C、D、E に比べ優位に低く、また、D 施設のそれは B 施設、E 施設のそれと比べ優位に低かった。SV 使用、未使用施設に関連は見いだせなかった。同様に、各施設の腸内細菌科菌群数は A 施設で 0.62±0.02、B 施設で 0.76±0.31、C 施設で 0.66±0.26、D 施設で 0.60±0.06、E 施設で 0.72±0.38 であった。

D. 考察

1. SV 処理による牛肉の E. coli 削減の妥当性確認試験

SV は、枝肉表面の小さな汚れに、熱水（約 85℃）の蒸気を噴射することにより、汚れに含まれる微生物を死滅させるとともに汚れを剥離し、真空で吸引する。

米国では、枝肉のトリミングと洗浄だけでは病原微生物について食品安全レベルを達成できないとして、食肉処理工程における病原微生物の削減のために様々な介入手段について、使用の際のパラメータを含め評価されている（Livestock Plant Familiarization 04-18-2017）。SV の使用はその介入手段のひとつである。

微生物学的リスク評価に関する FAO/WHO 合同専門家会議（JEMRA）の「Control measures for Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) associated with meat and dairy products」

（<https://www.who.int/publications/i/item/9789240058576>）において、枝肉表面の SV の使用について、STEC の制御に関して有効性を中～高と評価している。

国内では、近年新たに建設されたと畜場に SV が導入されたり、後から設置したと畜場があるが、SV の病原微生物削減の妥当性に関する報告はほとんどない。本研究では、病原微生物の代わりに E. coli K12 株を用いて、SV 使用による E. coli 削減の効果を検討した。

1 回目の実験では統計学的に SV 処理回数 0 回目と 2～5 回目で、2 回目の実験では統計学的に SV 処理回数 0 回目と 2 回目及び 5 回目で、いずれも有意差が認められた。2 回の実験でいずれも、2 回以上の SV 処理により E. coli が 2.0 log10cfu/25 cm²程度の減少が認められた。1 回目より 2 回目の試験結果の標準偏差が大きくなったが、2 回目の試験ではバキューム口が肉に吸い付いてしまうことが数回あったためと考えられる。

この実験結果より、SV は、枝肉表面に 2～3 回以上処理することにより E. coli 低減の効果があると考ええる。

JEMRA の評価では、枝肉の E. coli を減少させる介入のメタ解析において SV 処理により枝肉の E. coli が平均 3.09 log10cfu/cm²減少すると報告されており、今回の実験では減少幅は小さかったものの 2 回の実験で再現性が得られており、JEMRA の報告に一致しているものと考ええる。

また、JEMRA の評価では、SV の効果は作業者の技量、装置のメンテナン

ス、スチームの暴露時間と温度によると報告されており、今回の結果でも SV の処理回数や、操作の違いが、E. coli の減少効果に影響したと考えられることから、と畜場においては SV の装置のメンテナンスや枝肉に SV を使用するための手順書を作成し、その有効性を検証することが必要と考える。

2. 輸出食肉施設における外部検証の微生物試験の結果と SV 導入状況の解析

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/ cm^2 未満、許容レベルは $3.5 \sim 5.0 \log$ 個/ cm^2 、不適合レベルは $5.0 \log$ 個/ cm^2 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/ cm^2 未満、許容レベルは $1.5 \sim 2.5 \log$ 個/ cm^2 、不適合レベルは $2.5 \log$ 個/ cm^2 以上である。今回、SV 未使用施設（A、B）と SV 使用施設（C、D、E）ともに一般生菌数において不適格レベルのものは存在しなかったが、SV 使用施設がともに優良な成績を得ることはなく、SV 未使用施設でも、優良な成績を得ていることが判明した。腸内細菌科菌群数においては SV 使用施設の C が不適格レベルを示す菌数があったが、平均値では優良レベルであった。

SV 使用の有無にかかわらず、EU の優良レベルまたは許容レベルの枝肉を生産していることが判明した。ただ、SV 使用施設でも不適格レベルの値を示すものが存在することから、指名検査員の検証において細菌検査を用いるこ

とは重要であると思われた。SV を使用したからと言って、良好な枝肉が生産されるわけではなく、SV 工程の前までの総合的な衛生管理が必要であると思われた。

E. 結論

SV 処理による牛肉表面の E. coli 削減効果の妥当性確認試験の結果、SV は、枝肉表面に 2 ～ 3 回以上処理することにより E. coli 低減の効果があり、JEMRA の報告と同様の結果が得られた。なお、SV の処理回数や操作が E. coli 低減効果に影響すると考えられることから、と畜場においては SV の装置のメンテナンスや枝肉に SV を使用するための手順書を作成し、その有効性を検証することが必要である。

輸出食肉施設の外部検証の微生物試験結果と SV の導入との関係を比較した結果、SV 使用にかかわらず多くの枝肉は良好な衛生度を確保していることが判明した。しかし、SV を使用したからと言って、良好な枝肉が生産されるわけではなく、SV 工程の前までの総合的な衛生管理が必要であると思われた。

指名検査員の輸出食肉施設の検証の支援資料の参考とするために、FSIS の食肉 HCG を翻訳した。

今回検討した結果に加え、今後、国内外の文献を検索、精査し、指名検査員の検証の支援資料を作成する必要がある。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

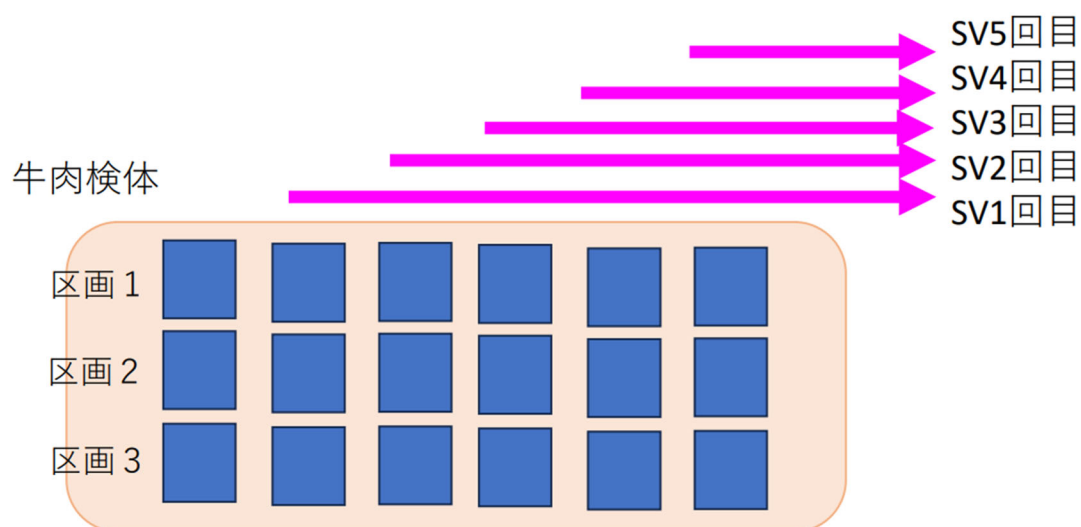


図1 SV 0回目 1回目 2回目 3回目 4回目 5回目
検体5cm×5cmを切除法で採取し、菌を測定

表1 スチームバキュームの使用条件

	1回目	2回目
蒸気温度（設定）（℃）	125	123
蒸気温度（排出口）（℃）	110	105
蒸気排出圧（kPa）	75	75
バキューム圧（kPa）	52	38

表 2 - 1 スチームバキューム洗浄回数による菌数変化（1 回目）

接種条件	
接種菌量 (cfu/25 cm ²)	580,000
接種菌量 (log10 cfu/25 cm ²)	5.8
肉塊表面温度 (°C)	8.5

試験結果

洗浄回数	Average (log10 cfu/25 cm ²)	S.D. (log10 cfu/25 cm ²)	回収菌数 (log10 cfu/25 cm ²)		
			区画 1	区画 2	区画 3
0	5.79	0.15	5.72	5.68	5.96
1	4.96	0.65	5.58	4.28	5.04
2	4.13	0.61	4.07	3.56	4.78
3	4.13	0.21	4.08	3.95	4.36
4	4.23	0.54	3.92	4.85	3.91
5	3.77	0.76	4.33	4.09	2.90

表 2 - 2 スチームバキューム洗浄回数による菌数変化（2 回目）

接種条件	
接種菌量 (cfu/25 cm ²)	1,450,000
接種菌量 (log10 cfu/25 cm ²)	6.2
肉塊表面温度 (°C)	12.0

試験結果

洗浄回数	Average (log10 cfu/25 cm ²)	S.D. (log10 cfu/25 cm ²)	回収菌数 (log10 cfu/25 cm ²)		
			区画 1	区画 2	区画 3
0	6.01	0.06	5.98	6.08	5.97
1	5.03	0.99	3.98	5.93	5.19
2	3.63	0.45	3.83	3.11	3.93
3	4.78	0.16	4.60	4.89	4.85
4	4.59	0.48	4.73	4.98	4.06
5	4.00	0.65	3.32	4.62	4.06

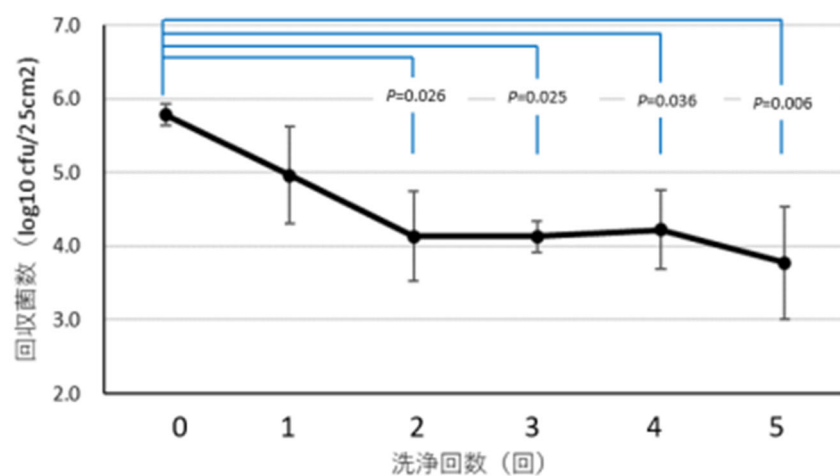


図2-1 スチームバキューム洗浄回数による菌数変化（1回目）
0回目と2回目($P=0.026$)、0回目と3回目($P=0.025$)、0回目と4回目($P=0.036$)、0回目と5回目($P=0.006$)で有意差あり。

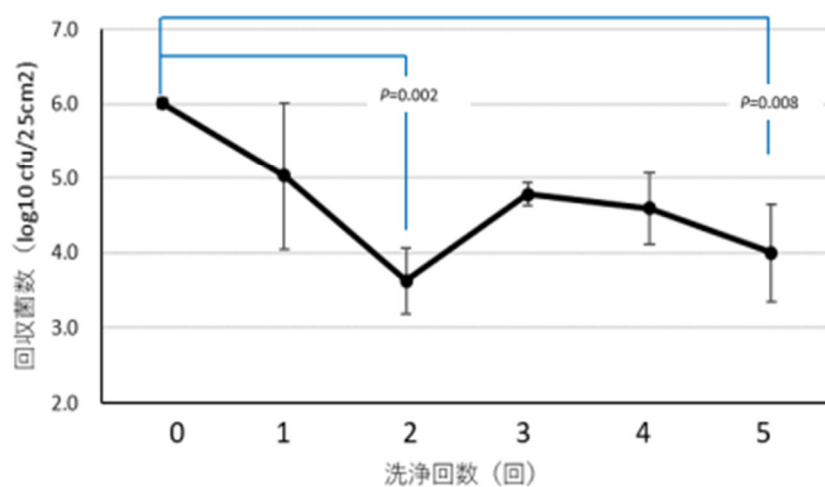


図2-2 スチームバキューム洗浄回数による菌数変化（2回目）
0回目と2回目($P=0.002$)、0回目と5回目($P=0.008$)で有意差あり。

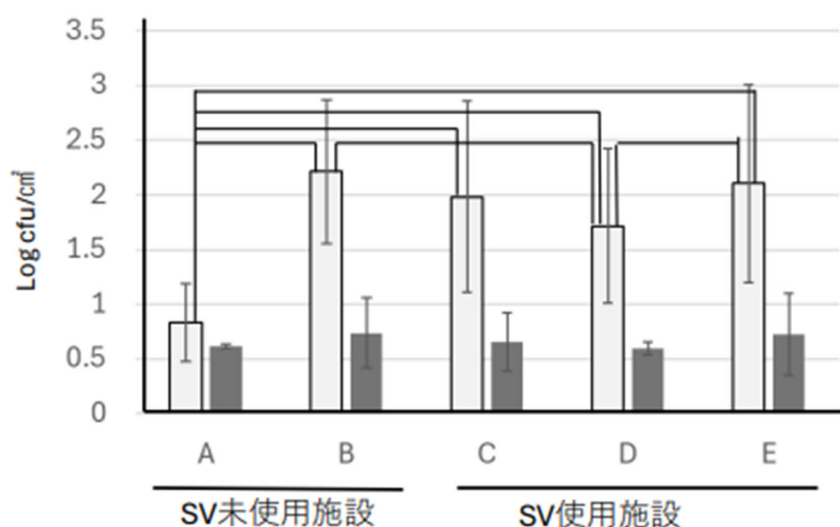


図3 SVが導入されていない2施設（A、B）及び導入されている3施設（C、D、E）の一般生菌数と腸内細菌科菌群数
生菌数で有意差があるものは線で示した。

表3 SVが導入されていない2施設及び導入されている3施設の
一般生菌数と腸内細菌科菌群数

項 目	SV未使用施設		SV使用施設		
	A	B	C	D	E
生菌数					
平均	0.84	2.21	1.98	1.72	2.10
標準偏差	0.36	0.66	0.87	0.71	0.90
中央値（メジアン）	0.64	2.14	1.87	1.70	2.05
最頻値（モード）	0.60	1.88	該当なし	0.78	0.60
最小	0.58	0.57	0.58	0.58	0.58
最大	1.84	3.97	3.91	3.44	4.05
合計	50.18	376.28	128.94	240.19	126.29
データの個数	60	170	65	140	60
腸内細菌科菌群数					
平均	0.62	0.74	0.66	0.60	0.72
標準偏差	0.02	0.32	0.26	0.06	0.38
中央値（メジアン）	0.61	0.60	0.60	0.59	0.59
最頻値（モード）	0.61	0.58	0.62	0.59	0.58
最小	0.58	0.56	0.56	0.57	0.58
最大	0.69	2.43	2.53	1.15	2.10
合計	36.91	125.76	42.68	84.10	43.44
データの個数	60	170	65	140	60

Ⅱ．分担研究報告

4. 食肉衛生検査所の研修に関する実態調査

研究分担者 吉富 真理

令和5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）
分担研究報告書

食肉衛生検査所の研修に関する実態調査

研究分担者 吉富 真理 国立保健医療科学院 生活環境研究部 上席主任研究官

研究要旨

アメリカ合衆国・EU 等向け輸出向け食肉取扱施設を管轄する食肉衛生検査所の指名検査員の検査業務を適切に実施するために行う研修に必要な教材及び仕組みの開発を目的として、各検査所の研修と研修に求められる教材、仕組みについてアンケート及びインタビュー調査を行った。また、教材開発の参考として、米国農務省の公衆衛生獣医師のトレーニング資料について調査を行った。各食肉衛生検査所では、指名検査員予定者向けの研修資料を職員が作成し、OJT を主とした研修が行われていたが、全国共通の教材として、検査業務に必要な知識をひとりで学習し、習得度の評価が可能で、動画を取り入れた教材が求められていた。教材の開発にあたり、アメリカ合衆国農務省食品検査局（FSIS）の新規採用公衆衛生獣医師向けのトレーニング資料が内容及び構成等の参考になると考えられた。

研究協力者：

北山 友子（北海道帯広食肉衛生検査所）
久松 暢子（岩手県食肉衛生検査所）
山崎 昭子（群馬県食肉衛生検査所）
三浦 理恵子（栃木県食肉衛生検査所）
坂下 幸久、塚本 真由美（岐阜県飛騨食肉衛生検査所）
川見 明日香（京都市衛生環境研究所食肉衛生部門）
今井 真司、安達 恵（姫路市食肉衛生検査センター）
角谷 玲雄（大分県食肉衛生検査所）
松本 一俊（熊本県食肉衛生検査所）
津江 友紀（宮崎県都農食肉衛生検査所）、
指宿 明星（宮崎県高崎食肉衛生検査所）
中島 靖剛（鹿児島県末吉食肉衛生検査所）
森田 幸雄（麻布大学）

A. 研究目的

米国及びまたは EU 輸出向け食肉取扱施設（以下、「輸出食肉施設」という。）を管轄する食肉衛生検査所（以下、「検査所」という。）の指名検査員に対し、アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱及び英国、欧州連合、スイス、リヒテンシュタイン及びノルウェー向け輸出食肉の取扱要綱（以下、「対米・EU 要綱」）において、「厚生労働省及び都道府県等が定期的に研修を行い、本要綱に基づく検査等の業務の実施に必要な知識等を修得させること」が規定されているが、具体的な研修内容は示されていない。本研究では、各検査所の指名検査員の研修についてアンケート及

びインタビュー調査を行い、各検査所の事例を収集し、課題について明らかにした。

また、指名検査員の研修教材の参考とするために、アメリカ合衆国農務省食品検査局（以下、「FSIS」という。）の公衆衛生獣医師及び検査官向けトレーニングの資料の概要を確認した。

B. 研究方法

1. 指名検査員の研修に関する調査

（1）調査期間

本調査は、2023 年 8 月～2024 年 3 月に実施した。

（2）調査方法

本調査では、国内の 15 か所の輸出食肉施設を管轄する検査所がある自治体を通じて、書面アンケートを送付し、11 検査所より回答を得た。そのうち、協力を得られた 9 検査所に対面またはオンライン会議システムを用いて半構造化インタビューを実施した。

（3）調査対象者

各検査所の研修責任者または研修担当者

（4）調査項目

調査項目は、

- 1) 検査所の業務概要（牛のと畜検査数及び輸出食肉施設以外の業務、と畜検査員数と内訳、年齢層と人数、異動周期）
- 2) 指名検査員を含む職員へ実施している研修について（研修を規定する文書、研修計画、責任者、研修の内容）
- 3) 指名検査員の知識・技術の習得及び向上のために必要と考える教材、仕組み、支援等について

4) 厚生労働省が行う研修への要望について、の 4 項目とし、書面アンケートの回答を基にさらにインタビュー調査を実施した。

（5）分析方法

アンケートの回答及びインタビュー調査の逐語録から、各検査所の概要、指名検査員を含む職員へ実施している研修、指名検査員の知識・技術の習得及び向上のために必要と考える教材、仕組み、支援等、厚生労働省が行う研修への要望に関わる内容について、キーワードを抽出して、カテゴリー化し、分析した。

（倫理面への配慮）

本調査は国立保健医療科学院の人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針の承認（承認番号：NIPH—IBRA #23009）を受けて実施した。対象者には研究の目的、方法、内容等を説明し、研究協力および同意撤回の自由、個人情報保護等について説明し、書面での同意を得た。

2. FSIS の公衆衛生獣医師及び検査官向け研修資料に関する調査

FSIS のホームページで公開されている公衆衛生獣医師及び検査官向けトレーニングシリーズ Inspection Methods 1800 シリーズ（以下、「IM1800」という。
<https://www.fsis.usda.gov/inspection/inspection-training-videos/inspection-mission-training>）の資料概要を確認し、指名検査員の業務に関連する資料について、概要をまとめた。

3. アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱に関連する連邦規則集等の翻訳

アメリカ合衆国輸出食肉の取扱要綱（以下、「対米要綱」という。）の参照元である連邦規則集 9 CFR、及び FSIS Directives（公衆衛生獣医師及び検査官向け指令）のうち、指名検査員の業務に参考となる文書について確認し、一部翻訳した。

C.結果

1. 指名検査員の研修に関する調査

（1）検査所の業務の概要

1) と畜検査業務について

9 検査所について、管轄する輸出食肉施設の 1 日あたりの平均牛と畜数は 100 頭以上 2 か所、50～99 頭 5 か所、49 頭未満 2 か所であった。牛以外の食肉施設を管轄している検査所は 8 か所であった。

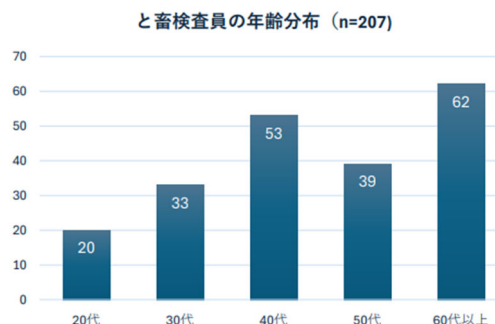
2) 職員の状況について

9 検査所の職員の状況について、表 1 及び図 1 に整理した。

表 1 食肉衛生検査所の概要（と畜検査業務及び職員の状況）

	牛と畜数 (1日平均)	牛以外の食肉施設の 管轄業務	会計年度職員以外の職員 /全職員 (%)
A	65	○	50.0
B	60	○	65.5
C	60	○	53.6
D	100頭以上	○	59.2
E	75	○	84.6
F	47		78.9
G	20	○	72.7
H	54	○	89.5
I	100頭以上	○	80.0

図 1 食肉衛生検査所の概要（職員の状況）



9 検査所について、正規職員のみで定数を満たしている検査所はなく、不足職員は再任用職員、会計年度職員、家畜保健所職員との交換人事等で対応されていた。指名検査員は、会計年度職員以外の職員が指名されていた。1 検査所は、全職員数の 50%が会計年度職員であった。

9 検査所の全職員（207 名）の年齢分布は、20 歳代：20 名、30 歳代：33 名、40 歳代：53 名、50 歳代：39 名、60 歳代以上：62 名（内 70 歳代：10 名）であった。なお、30～40 歳代職員には中途採用者が含まれており、この年代の職員全てが公衆衛生獣医師の経験が 10 年以上というものではない。

（2）食肉衛生検査所の研修の規定について

現在、各検査所で指名検査員を含む職員へ実施している研修について整理した（表 2）。

表2 食肉衛生検査所の研修の規定

研修を規程する文書、研修計画の有無 n=9	文書及び計画あり	5
	文書のみ	1
	計画のみ	1
	無または不明	2
研修責任者 n=9	あり	6
	不明確	1
	不明	1

9 検査所のうち、検査所内の研修の規程文書及び研修計画を作成していた検査所は5か所、研修の規程文書のみ、計画のみが各1か所であった。「いずれも作成されていない」、または「回答者が把握していない」が2か所であった。

9 検査所のうち、研修責任者が規定または認識されていた検査所は6か所、不明確が2か所であった。で研修を規定する文書・計画がない、または把握できなかった検査所において、研修責任者が不明確であった。

(3) 初めて食肉衛生検査所に配属される職員、または初めて指名検査員になる予定の職員向け研修について

検査所ごとに研修の名称、研修の分け方が異なるため、輸出食肉認定輸出食肉施設における検査実施要領（以下「検査実施要領」という。）のと畜検査及び検証に関する研修について、以下のとおり整理した（表3）。

研修の対象者が、初めて食肉衛生検査所に配属される職員（以下、新任者という。）または初めて指名検査員になる予定の職員（以下、「指名検査員予定者」という）で、検査所で実施されている研修で、「と畜検査」、「対米・EU要綱」、「検査実施要領」をキーワードとし、これらを研修名、概要、教材に含んでいる研修

について、整理した。

新任者に対し、11 検査所すべてでと畜検査技術の習得を目的として、と畜検査研修を実施していた。

指名検査員予定者に対し、11 検査所すべてで対米・EU 要綱に基づく検査の習得を目的として、指名検査員を実施していた。

【研修に用いる資料】は、9 検査所以上で「検査所作成の業務マニュアル」、「対米・EU 要綱」、「検査実施要領」及び「それらを説明するための資料を研修担当職員が作成」、「前年度の資料を講師担当者が改訂」し、使用していた。2～5 検査所では検査の一部を「職員が撮影した動画」、「参考図書」「過去の厚生労働省研修資料」を使用、3 検査所で「FSIS の指令、通知」を研修資料としていた。

【講師担当職員】は 11 検査所のうち 9 検査所において、「検査1～2年以上の経験者数名で分担」していた。研修の内容に応じて、または検査所の体制として「役職者が担当」（2 検査所）や、「研修規程文書に基づき所長による評価で一定以上のレベルである職員が担当」（1 検査所）があった。

研修の結果、目標とする知識・技術に身に着けたことの【研修評価】について、「講師担当職員の確認」、「管理職の確認」、「複数者による確認」、「講師担当職員が課長または所長に報告」、「講師担当職員が課長に報告後、結果を所内回覧」、「講師担当職員が課長に報告後記録し、所長が検査実施要領のパフォーマンス評価を実施」があった。

と畜検査及び指名検査員予定者に対

する研修は、研修対象者に対し、座学（講義）を1～2日間のうちに行い、その後、1～数か月間、講師担当職員とOJTを実施し、評価者の確認により一人でできるようになったと評価されていた。と畜検査はほとんどの検査所において着任後またできるだけ速やかに実施されていた。指名検査員予定者に対する研修は、と畜検査ができると評価された後に行われていたが、講義は着任後にと畜検査等と同時期に行われている検査所があった。なお、これらの研修の座学（講義）は講師担当職員が通常業務を調整して行うため、実質の時間は数時間程度であった。

【HACCPに関する研修】は10検査所において、いずれも指名検査員予定職員向け研修や初任者向け研修の中でHACCPについて説明していた。それに加えて、「所属自治体の保健所等で実施されるHACCP研修に参加」が6検査所、「民間のHACCP研修に参加」が2検査所であった。

【検査所以外の機関を活用した研修】は、「所属自治体の他機関（保健所、衛生研究所、県庁）が実施する研修」、「近隣大学や民間団体の研修やセミナー及びオンライン研修へ参加」していた。所属自治体の他機関が実施する研修項目としては、HACCP、研究発表会、食品衛生の関係法令等であった。また、他の検査所と協力して各検査所が管轄する施設の見学と意見交換を企画、実施している例があった。

【指名検査員の任命時期】については、「配属直後」と「研修の評価後」があっ

た。

【研修受講後の新任者のフォローアップ】は、「職員間のミーティング」や「検査結果の確認時」、「施設の点検や検査時」、「パフォーマンス評価後」等であった。

3. 指名検査員の知識・技術の習得及び向上のために必要と考える教材、仕組み等について

指名検査員の知識・技術の習得及び向上のために必要と考える教材、仕組み等（以下、教材・仕組み等）、及びそれらを必要と考える理由について整理した（表4）。

【教材の形式】として、「e-ラーニングのように新任者が一人で受講できる教材」、「理解度テストがついている教材」が挙げられた。その理由として「人員不足により通常業務をこなすことで精いっぱい状況で、満足な教育体制を取ることができない」、「4月の異動の時期の人の配置が困難」「研修担当職員の資料作成にかかる時間の確保が困難」、「講師担当職員の経験不足」であった。

【教材の内容】として、「対米・EU要綱の各項目に関する研修」、「海外規制官庁の法令・規則等の翻訳（解説付き）」、「動物福祉」、「ISO17025に基づく試験の管理」が4検査所以上から、その他、「HACCP」、「検査実施要領に基づくと畜検査」「(国内の)関係法令」「研修のためのガイドブック」が挙げられた。その理由として、「共通教材がなく、講師担当職員の力量に左右される」、「現在実施している研修で良いかどうか分からない

ない」「研修レベルの平準化が困難、(全ての検査所で) 統一した教材が必要」であった。また、厚生労働省と食肉衛生検査所の疑義照会や過去の海外規制庁の査察等の「事例集」が挙げられ、その理由として「輸出食肉施設の管轄検査所としての経験が少ない」ことや、「(自治体内で食肉認定施設が 1 か所の場合) 他の食肉認定施設の管轄検査所、施設の対応の情報が取れない」がある。

【仕組み、その他】として、「検査所間の意見交換・情報共有の場」が 3 検査所から挙げられ、その理由として「輸出食肉認定施設の管轄検査所としての経験が少ない」ことや、「(自治体内で食肉衛生検査所または認定施設が 1 か所の場合) 他の認定施設の管轄検査所、施設の対応の情報が得られない」がある。

その他、「海外規制庁のオンライン研修受講」や「グループワークと組み合わせた研修」等が挙げられた。

4. 厚生労働省が主催する研修及びその他の要望について

厚生労働省が主催する研修及びその他の要望について、整理した(表 5)。現在、1 年に 1 回程度の頻度で、1 日間の厚生労働省の主催による研修が実施されており、座学及び机上演習が行われている。

その厚生労働省が主催する研修について、「地方厚生局の査察について、指摘事項を例にとってグループワークを行い、どのような改善措置や検証が行われたかについて、具体的な解説をしてほしい」、「輸出食肉施設を見学し、グルー

プワーク演習及び指名検査員同士の意見交換を行う」、「輸出先国の規制や微生物検査手順が変更になったときの説明をしてほしい」、「STEC 検査や残留物質等モニタリング陽性時の対応についてのシミュレーション」が挙げられた。

厚生労働省が主催する研修ではなく指名検査員の研修全体についての要望として、「指名検査員は国から指名されているため、必要なすべての研修を行ってほしい」、「基礎的な導入研修」が挙げられた。

また、FSIS 等の海外規制官庁による研修への参加について「厚生労働省職員が受講し、その内容の伝達講習をしてほしい。食肉衛生検査所職員自身の受講を望まない理由として、食肉衛生検査所の人員不足により研修派遣が困難であることや、言語の問題で理解不足の懸念がある」が挙げられた。

その他、「ISO17025 に基づくマネジメントシステム構築のための研修及び内部監査員の研修」、「輸出先国の規制や微生物検査手順が変更になったときの厚生労働省からの速やかな周知」が挙げられた。

5. FSIS の公衆衛生獣医師及び検査官向け研修資料に関する調査

IM1800 は FSIS の新規採用の獣医師及び検査官が雇用条件として受講するトレーニングコースであり、FSIS が管轄する食品製造施設の検査検証業務に必要な基本的知識を身に付けるためのものである。公開されている 50 以上の研修資料のうち、指名検査員の業務に関連す

ると考える 23 の資料を一覧にまとめた (表 6)。本コースは FSIS Directive 5000.1 (施設の食品安全システムの検証について) に基づき設計されていると説明されているが、各資料の参照先には、連邦規則集 (CFR) 、5000.1 以外の Directive、通知 (Notice) 等が記載されている。資料では、業務マニュアル的な部分もあるが、各業務を行う上で必要な知識、法的根拠、評価や判断のプロセス等が説明されており、豊富なケーススタディが用意されている。

6. 対米要綱に関連する連邦規則集等の翻訳

連邦規則集 9 CFR、及び FSIS Directives (公衆衛生獣医師及び検査官向け指令) のうち、対米要綱の参照元及び指名検査員の業務に参考となる文書について確認し、一部を翻訳した。確認と翻訳を引き続き行う必要がある。

D. 考察

1. 食肉衛生検査所の指名検査員等の研修の現状と課題

調査した 11 検査所において、新任者または指名検査員予定職員に対する、と畜検査及び指名検査員の検査業務の研修資料として、対米・EU 要綱及び検査実施要領とこれらに基づき各検査所で作成した業務マニュアルが用いられていた。これらの資料・文書に加えて、受講者の理解を助けるための説明資料が指名検査員である職員により作成されていた。講義は数時間～1 日程度実施され、2～6 か月間をかけて OJT で指名

検査員の検査業務を教え、ひととおりできるようになったことを講師担当職員や管理職等が評価していた。

OJT を主体とした研修方法は、元来、と畜検査の習得が OJT を基本として行われていたためではないかと思われる。また、検査所の人員不足のため、講師担当職員が業務で忙しく、講義の時間の確保が困難であること、検査に関する共通の基本教材がなく、検査所が独自に調査し、作成することは困難であることから、これまで検査所で行ってきた業務のやり方及び技術を OJT で指導し、新任職員がひと通りできるようになった後は、不明点を他の職員に訊いたり、新任者等の職員が独自で調べたり、外部の研修の参加や資料により知識を身に付けていると考えられる。検査所でも、OJT の間の講師担当職員からの指導やミーティングの質疑応答、研修の評価等の機会を利用して習得状況の確認が行われている。

この研修方法は、講義と OJT のバランス、講義資料、講師について以下のような問題点が考えられた。

OJT は現場の経験から学ぶことができ、業務の知識を身に付けるには効果が高いものであるが、その学習効果や質は講師役に依存し、学びが「単なる労働」となってしまう可能性がある (研修開発入門、p.36)。職員に対する研修は成人学習であり、成人学習は講義と実践的学習を組み合わせることが効果的であることから (研修開発入門、p.35)、実務経験がほとんどない新任者等には、知識をインプットし、繰り返し確認できること

も必要である。

講義資料について、対米・EU 要綱及び検査実施要領を基にした各検査所の業務マニュアル、及びこれらの解説のための資料のそれぞれを各検査所で独自に作成するため、内容のばらつきが発生することが推測される。また、対米・EU 要綱及び検査実施要領は、指名検査員が行う事務手続きや検査方法等が規定されており、何をどのように行うかはわかるが、なぜそれを行うか背景、科学的根拠等の解説はなく、参照先の紹介がないため、根拠に基づく理解が困難になる可能性がある。

講師担当職員について、検査員が2～3年ごとに異動する地方公務員である以上やむを得ないが、検査経験が1年以上であれば講師を担当しており、学習効果や質を上げるのは困難であることが推測された。

このような状況を改善するために、指名検査員の検査業務の研修における講義用の教材の開発が必要と考えられた。

2. 食肉衛生検査所の指名検査員等向けの教材

(1) 教材の形式

検査所の職員不足、正規職員の異動サイクルが短いことを考慮すると、研修資料は受講者がひとりで学習することができ、その習得度を理解度テスト等により受講者及び評価者が確認できる教材が望ましい。また、実務経験がほとんどない新任者等には、知識をインプットし、繰り返し確認できることが効果的である。さらに、と畜検査や輸出食肉施設の

衛生管理の HACCP 検証には、実例の写真や動画とその解説があると理解しやすく、一人でも学びやすい。これらのことから、動画を利用した e-ラーニングのような教材が適切と考えられた。

(2) 教材の内容

【教材の内容】に対する要望は様々であったが、「対米・EU 要綱の各項目に関する研修」、「HACCP」、「検査実施要領に基づくと畜検査」「動物福祉」「ISO17025 に基づく試験の管理」は、対米・EU 要綱と検査実施要領に関連するものであり、「海外規制官庁の法令・規則等の翻訳（解説付き）」「(国内の) 関係法令」はその参考資料にあたる。対米要綱及び検査実施要領は、米国連邦規則集の 9 CFR 食肉・食肉製品（Animals and Animal Products）に収められている Chapter 3 FSIS（Food Safety and Inspection Service, Department of Agriculture）の Sub chapter A 及び E の一部が反映されている。9 CFR は米国の食肉及び食肉製品等の規制要件が示されているが、FSIS では職員に対して公式の業務指示である Directives において、規制要件に基づく業務について、その目的、背景、手順、考え方、必要な記録の方法など詳細に説明している。さらに、IM1800 のようなトレーニングで業務手順だけでなく、必要な知識、技術を習得させていると考えられた。研修の規模やシステム等が異なることから、指名検査員向けの教材として IM1800 をそのまま使用するのとは適切ではないが、指名検査員に求められる知識・技術の範囲や教材の構成の参考になると考える。また、FSIS Directives のよ

うな輸出先国の食肉衛生に関する法令・規則等を指名検査員が理解するために、その翻訳及び解説したものを提供できる体制の検討が必要と考えられた。

3. 検査所における研修に関する文書、記録様式について

研修を規定する文書及びまたは計画が作成されている検査所が 7 か所あったが、2 か所はないか、不明であった。2 か所については研修責任者についても不明確であった。

検査実施要領には「指名検査員の検査等業務に係るパフォーマンス評価実施要領」があり、指名検査員の業務評価を定期的に行うこと、評価方法、結果の記録・保管について記載されており、各検査所で実施されている。しかし、業務量に対して人員が不足していることもあり、研修を規定する検査所の文書としての整備が進められていない場合があると考えられる。参考となる文書及び様式の例の提供は検討の余地があると考えられた。

4. 厚生労働省が主催する研修について

厚生労働省主催の研修では、講義及びグループワークとして机上演習が行われている。

グループワークの内容に対する要望として「地方厚生局の査察事例による演習及び解説」、「輸出食肉施設を見学し、グループワーク及び意見交換」が挙げられた。グループワークによる演習は、特に自治体内に複数の検査所や輸出食肉施設がない検査所において、「検査所間の

意見交換・情報共有の場」であると考えられる。また、「ISO17025 に関する研修」、「STEC 検査や残留物質等モニタリング陽性時の対応についてのシミュレーション」が挙げられたが、検査所において問題意識があるものや検討が難しい内容のものと考えられた。

E. 結論

米国及びまたは EU 輸出处向け食肉取扱施設を管轄する食肉衛生検査所の指名検査員予定者の研修の教材として、対米等要綱に基づく検査業務に必要な知識について、受講者がひとりで学習し、理解度テスト等により習得度が評価できるもので、動画を取り入れた教材の開発が求められる。開発にあたっては、FSIS の新規採用公衆衛生獣医師向けのトレーニング資料が参考になると考えられた。また、米国の食肉衛生に関する法令・規則等について一部の翻訳を行ったが、輸出先国の食肉衛生に関する法令・規則等について理解するためにその翻訳及び解説を提供できる体制の検討が求められる。その他、研修を規定する検査所の文書例の提供や、検査所間の意見交換及び情報共有も検討が必要と考えられた。

参考文献

- ・「アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱」(令和5年 12 月 21 日更新)
- ・「英国、欧州連合、スイス、リヒテンシュタイン及びノルウェー向け輸出食肉の取扱い要綱」(令和6年3月4日更新)
- ・「輸出食肉認定輸出食肉施設における検

査実施要領」(令和3年1月 20 日最終改正)
・中原淳.『研修開発入門』.ダイヤモンド
社, 2014

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表3 新任者及び指名検査員予定者向け研修について

研修に用いる資料	前年度までに使用したものを講師担当者が改訂した研修資料	9
n=11	要綱、検査実施要領またはそれらを説明した研修資料	11
複数回答	検査所のマニュアル、規程	10
	動画の利用（と畜検査、微生物試験の採材）	3
	過去の厚生労働省研修資料	5
	FSISの指令、通知	3
	参考図書	2
	過去の記録	1
講師担当職員	検査1～2年以上の経験者数名	9
n=11	役職者、または所長指名	2
複数回答	評価で一定以上のレベルの者	1
研修評価	講師担当職員が課長または所長に報告（書面または口頭）	4
n=11	講師担当職員の確認・記録、所長等の評価	3
	管理職の確認	1
	講師担当職員が課長に報告後、結果を所内回覧	1
	複数者による確認	1
	講師担当職員の確認	1
HACCPに関する研修	指名検査員予定者向け研修等で説明	10
n=10	所属自治体で実施のHACCP研修へ参加	6
複数回答	民間のHACCP研修へ参加	2
外部機関が実施する研修の利用	他検査所との交流	6
n=11	自治体内他機関の研修	7
複数回答	民間団体、大学等の研修（科学院研修を除く）	4
	民間団体の無料オンライン研修の利用	2
指名検査員の任命時期	異動、配属直後	3
n=4	研修し、評価後	1
研修後のフォローアップ	文書発行時にヒアリング	1
n=6	週数回のミーティング	1
	現場で経験者に確認できる	2
	パフォーマンス評価で満たさない場合はOJT	2

表4 指名検査員の知識・技術の習得及び向上のために必要と考える教材、仕組みとその理由 (n=9)

希望教材		
教材の形式	新任者が一人で受講できる教材 (例: e-ラーニング)	4
	理解度テストがついているもの	4
教材の内容	検査要領に基づく畜検査	2
	FSISのと畜検査の手技、解説付き動画	1
	認定要綱の各項目に関する研修	6
	動物福祉 (施設への指導法も含む)	4
	HACCP	2
	ISO17025 に基づく試験の管理	4
	輸出新法に基づく手続き規程	1
	法令、要綱等の変更点等解説	2
	研修プログラム、ガイドブック的なもの	2
	事例集	2
事例集	局の査察による改善指導と対応事例	2
	過去のQ&A	2
	過去の関係会議の結果	1
	衛生証明書発行関係の疑義	1
	過去の海外査察の事例	2
輸出先国の法令・規則等の翻訳、解説付き		4
教材・資料以外の希望		
検査所間の意見交換、情報共有の場		3
海外規制庁のオンライン研修受講		1
グループワークが可能なライブ配信による研修		1
専門家による講義		1
海外規制官庁の法令改訂時の連絡		1
各輸出先国の要綱の相違点を整理した資料・一覧表		1

表5 厚生労働省主催研修及びその他の要望

厚生労働省主催研修への要望	・ 地方厚生局の指摘事項を例にとり、指摘、改善措置、検証などの説明 ・ 1か所の認定施設を見学後、グループワークを実施、情報交換 ・ STEC検査や残留物質等モニタリング陽性時の対応についてのシミュレーション
研修全体への要望	・ 指名検査員に必要な全研修 ・ 基礎的な導入研修
FSIS研修への参加に関して	・ 検査所では人員、時間の余裕がないため、厚生労働省の職員が参加し、伝達講習をしてほしい。 ・ FSISの研修について、言葉の問題で研修内容を熟知できていないと嘆息がたい。
その他	・ ISO17025に基づくマネジメントシステム構築のための研修及び内部監査員の研修 ・ 輸出先国の規制や微生物検査手順が変更になったときの厚生労働省からの速やかな周知

表 6 FSIS Inspection & Mission Training 1800 の抜粋

教材名	概略
Statutes (Acts).	関係法令
Rules of Practice .	用語定義。違反時の法的措置について
Regulatory Process Overview	検査官のHACCPに基づく検査と法的措置までのプロセスについて
Food Safety Systems Fundamentals	食品安全システムの基礎
Food Microbiology	食品微生物学
SRM Control	特定危険物 (SRM)の管理
Common Foodborne Pathogens	一般的な食中毒
Sanitation Performance Standards (SPS)	サニテーション・パフォーマンス・スタンダード (SPS)
Sanitation Standard Operating Procedures (SSOP)	サニテーション標準作業手順書 (SSOP)
Sanitation PHIS Documentation Workshop	PHIS (FSISのシステム) による記録、記録方法
PHIS Inspection Verification	PHIS (FSISのシステム) による記録、記録方法
Processing Categories and Fish Inspection	危害要因分析について
HACCP Seven Principles	HACCP7原則
HACCP Regulatory Process	検査員が行う施設のHACCP検証について
HAV Methodology	検査員によるハザード分析の検証をどのように行うか
HACCP Verification Task	検査員によるHACCPシステムの検証をどのように行うか
Slaughter Food Safety Standard	オンライン検査及びオフライン検査について
Salmonella and Campylobacter Testing	サルモネラ菌およびカンピロバクター検査、工程管理等について
Raw Beef Product Sampling	牛肉のハザード、STEC検査のサンプリング
Sampling Requirements - Slaughter Operations	施設が実施する大腸菌検査について
Humane Handling/ Good Commercial Practices	家畜の人道取り扱いと違反時の対応
Sanitary Dressing	衛生的な解体作業の検証
Review Establishment Data Task	施設の記録のレビューと評価

FSIS Inspection & Mission Training(<https://www.fsis.usda.gov/inspection/inspection-training-videos/inspection-mission-training>) で公開されている46教材から抜粋

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikeuchi S, Hirose S, Shimada K, Koyama A, Ishida S, Katayama N, Suzuki T, Tokairin A, Tsukamoto M, Tsue Y, Yamaguchi K, Osako H, Hiwatashi S, Chiba Y, Akiyama H, Hayashidani H, Hara-Kudo Y.	Isolation of Shiga Toxin-Producing <i>Escherichia coli</i> from the Surfaces of Beef Carcasses in Slaughterhouses in Japan.	Journal of Food Protection	2024 ;87	1002 63	2024
Akiyama H, Iwasaki Y, Ito R,	Basic principles for setting MRLs for pesticides in foods in Japan,	Food Safety	in press		2024

厚生労働大臣 殿

機関名 星薬科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 牛島 俊和

次の職員の 令和5年度 厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 教授

(氏名・フリガナ) 穂山 浩 (アキヤマ ヒロシ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 6 年 3 月 4 日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 衛生微生物部・部長
- (氏名・フリガナ) 工藤 由起子・クドウ ユキコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 6 年 3 月 4 日

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正 充

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業

2. 研究課題名 動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究

3. 研究者名 (所属部署・職名) 食品部・室長

(氏名・フリガナ) 志田 静夏・シダ シズカ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無 有 無	左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
		審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐ 有 ☒ 無	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐ 有 ☒ 無	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣
~~（国立医薬品食品衛生研究所長） 殿~~
~~（国立保健医療科学院長）~~

機関名 国立保健医療科学院
所属研究機関長 職 名 院長
氏 名 曾根 智史

次の職員の令和5年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 動物性食品輸出の規制対策の強化に資する研究
3. 研究者名 （所属部署・職名） 生活環境研究部・上席主任研究官
（氏名・フリガナ） 吉富 真理・ヨシトミ マリ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入（※1）		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査（※2）
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針（※3）	☒	☐	☒	国立保健医療科学院	☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること（指針の名称： ）	☐	☒	☐		☐

（※1）当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他（特記事項）

（※2）未審査に場合は、その理由を記載すること。
（※3）廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由： ）
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合は委託先機関： ）
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ （無の場合はその理由： ）
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ （有の場合はその内容： ）

（留意事項） ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。