

I. 総括研究報告

星薬科大学薬学部

穂山浩

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液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、北村洗人(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
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/アシ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°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。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* serover 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-STECC 培地、および CT-クロモアガー-STECC 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 STECC 7 血清群の確認を行った。

7) コロニーの STECC 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 STECC 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、STECC 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) STECC 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) STECC 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°C 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°C 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°C 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°C 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9CFR、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 °C、蒸気温度（排出口）：100 °C、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）0.1mL 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 1mL 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 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2]$ -2-チオウラシル、 $[^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}_2]$ -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 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 $S/N \geq 10$ 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どうかがわからない」「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られる。

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られる。

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られる。

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使用施設と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