

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 $5.8 \text{ log cfu}/25 \text{ cm}^2$ 及び 8.5°C 、2 回目で $6.2 \text{ log cfu}/25 \text{ cm}^2$ 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 、 $3.77 \pm 0.76 \text{ log cfu}/25 \text{ cm}^2$ 、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 、 $4.00 \pm 0.65 \text{ log cfu}/25 \text{ cm}^2$ 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 $1 \text{ log cfu}/\text{cm}^2$ 程度、2 回の処理により $2 \text{ log cfu}/\text{cm}^2$ 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）ともに一般細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

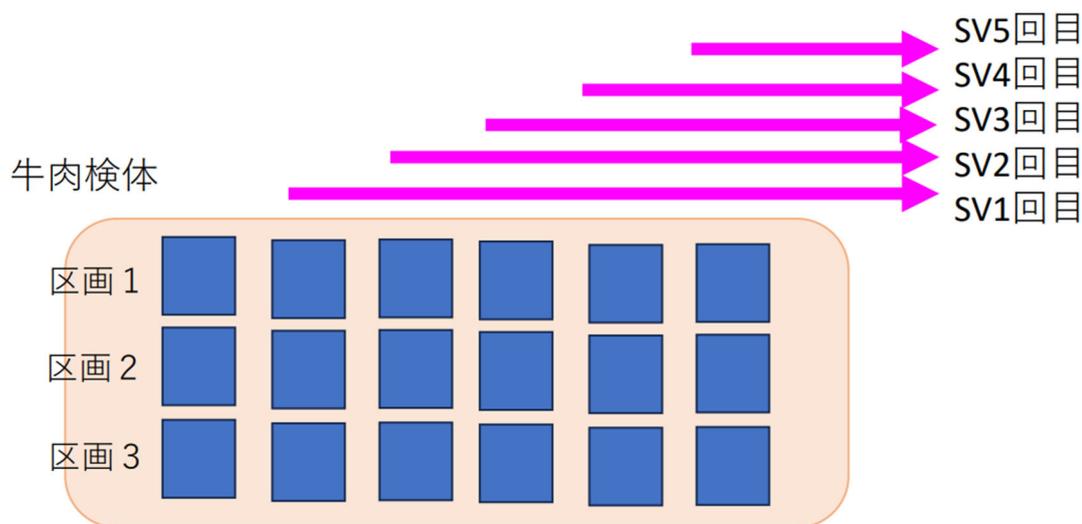


図1 SV 0回目 1回目 2回目 3回目 4回目 5回目
 検体5cm×5cmを切除法で採取し、菌を測定

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 (log ₁₀ cfu/25 cm ²)	5.8				
肉塊表面温度 (°C)	8.5				
試験結果					
洗浄回数	Average (log ₁₀ cfu/25 cm ²)	S.D. (log ₁₀ cfu/25 cm ²)	回収菌数 (log ₁₀ 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 (log ₁₀ cfu/25 cm ²)	6.2				
肉塊表面温度 (°C)	12.0				
試験結果					
洗浄回数	Average (log ₁₀ cfu/25 cm ²)	S.D. (log ₁₀ cfu/25 cm ²)	回収菌数 (log ₁₀ 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

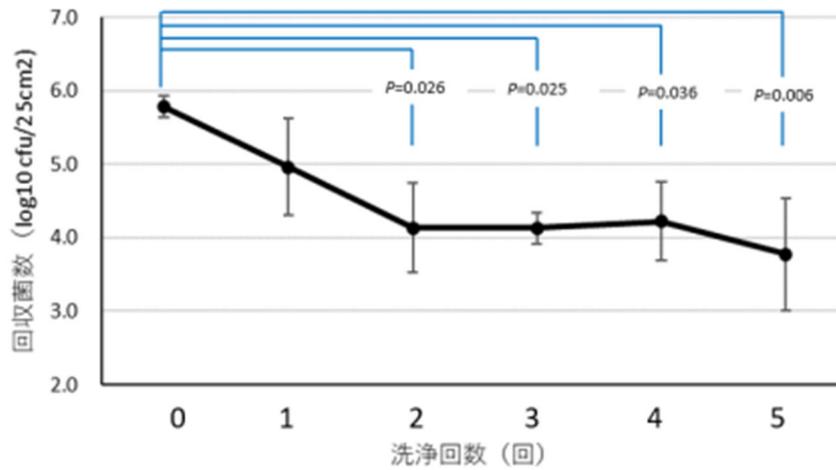


図2-1 スチームバキューム洗浄回数による菌数変化（1回目）
0回目と2回目($P=0.026$)、0回目と3回目($P=0.025$)、0回目と4回目($P=0.036$)、0回目と5回目($P=0.006$)で有意差あり。

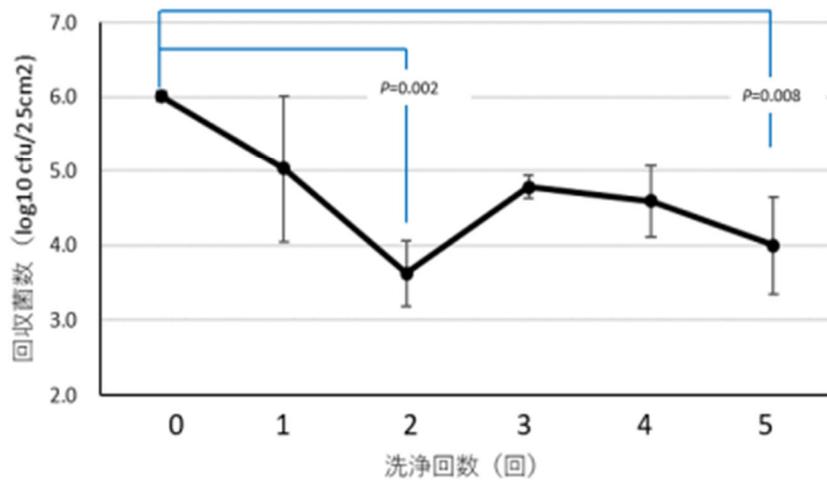


図2-2 スチームバキューム洗浄回数による菌数変化（2回目）
0回目と2回目($P=0.002$)、0回目と5回目($P=0.008$)で有意差あり。

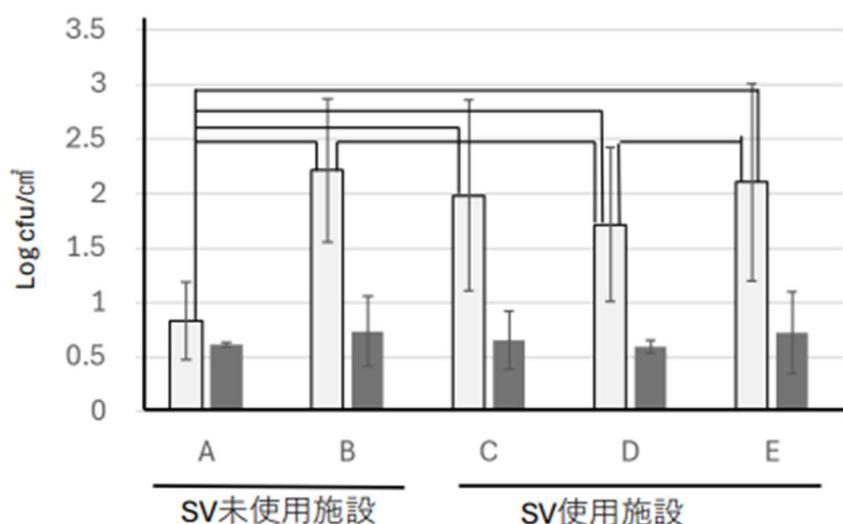


図3 SVが導入されていない2施設 (A、B) 及び導入されている3施設 (C、D、E) の一般生菌数と腸内細菌科菌群数
生菌数で有意差があるものは線で示した。

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