

令和3年度厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業
総括研究報告書

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

研究代表者 朝倉 宏 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨：平成30年の「食品衛生法の一部を改正する法律」の公布に伴い、と畜場・食鳥処理場については「HACCPに基づく衛生管理」が求められることとなり、1年間の猶予期間を含みつつ令和2年度に施行予定となっている。同体制は事業者が行う内部検証に加え、自治体等が行う外部検証も要件とされる。本研究では、国内全てのと畜場・食鳥処理場において衛生管理システムが適切に構築されていることを検証する手法を構築し、国産食肉・食鳥肉の更なる安全性確保の向上を図ることを目的として検討を進めた。本研究では、(1)と畜場の HACCP 外部検証に関する研究、(2)食鳥処理場の HACCP 外部検証及び生食用食鳥肉製造加工における高度衛生管理に関する研究、(3) HACCP 検証解析手法に関する研究、(4)国際動向を踏まえた情報の収集整理、(5)と畜場等での内部検証に関する研究を分担研究項目として、複数の食肉衛生検査所の協力を得て検討にあたった。

(1)では、ゼロトレランス検証の有用性を確認するため、と畜検査員による枝肉検査・検証時に確認された獣毛、糞便、消化管内容物、レールダスト、フットカッターの汚れ等の異物が付着した枝肉表面を採取し、色調や質感により識別した上で、これらが付着した検体における衛生指標菌数等を解析し、獣毛も糞便等と同様に留意すべき異物であることを明示できた。また、牛体表における腸管出血性大腸菌 O157/O26 の汚染状況を生産農家毎に調査し、同食中毒菌の検査にあたってのロット設定として同一農家かつ同一と畜解体日の枝肉群を1ロットとすることが妥当との知見を得た。また、豚・牛とたい並びに同外皮を対象に衛生指標菌数分布と病原菌由来遺伝子検出状況との関連性を探索し、生菌数が $5 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 以上、腸内細菌科菌群数が $2 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 以上を示した牛外皮の一部では、腸管出血性大腸菌関連遺伝子が検出される状況が確認され、対象施設での剥皮前後の工程管理の重要性が示唆された。このほか、馬とたいに対する微生物試験を実施する際の採材部位設定に向けた検討を進め、胸部または腹部を対象とすることが概ね妥当との知見を得た。(2)では、食鳥処理場での HACCP 運用上の CCP と位置付けられる冷却工程について、特に工程管理の適切性を判断するための微生物試験に供すべき採材時間軸を検討し、現行通知で示される処理半ばが妥当であることを裏付ける知見を得た。また、南九州地方で生食用食鳥肉を取り扱う小規模施設の工程管理実態並びにカンピロバクター汚染動態を解析し、汚染防止を更に高度化するために必要となる状況を精査した。(3)では、全国から厚生労働省に報告された検査データの解析に協力し、牛・豚・食鳥における一般生菌数と腸内細菌科菌群数、並びに食鳥とたいにおけるカンピロバクター数に関する現況について概説した。微生物検査データを衛生指導へ有効活用するための Moving windows 方式の評価手法原案を作成した。(4)では、米国、カナダ、EU の食鳥処理場での工程管理に関して用いられる微生物試験及び関連情報を収集整理し、共通点としては、冷却後工程で採材を行い、カンピロバクター及びサルモネラを試験項目としている内容を確認した。(5)では、内部検証に係る国際情報を収集整理した上で食肉衛生検査所との意見・情報交換を行い、外部検証との連携のとれた形へと内部検証を発展させていくことの意義を確認した。

研究分担者

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

研究協力者

池田 晃	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
石川 樹生	長崎県食肉衛生検査所
伊豆 一郎	熊本県食肉衛生検査所
岩城 多佳子	三重県松阪食肉衛生検査所
大星 真弓	北海道帯広食肉衛生検査所
岡谷 友三	麻布大学
奥村 香世	帯広畜産大学
小畑 麗	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
楓 龍治	岐阜県中央食肉衛生検査所
苅谷 俊宏	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
倉園 久生	徳島大学
坂上 友康	青森県十和田食肉衛生検査所
佐々木 治美	青森県十和田食肉衛生検査所
里麻 美喜子	富山県食肉衛生検査所
田辺 美弥子	青森県十和田食肉衛生検査所
塚本 真由美	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
土屋 健次	岐阜県中央食肉衛生検査所
徳永 佳三	佐世保市食肉衛生検査所
平本 裕子	富山県食肉衛生検査所
松岡 和代	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
南川 総子	神戸市食肉衛生検査所
向島 幸司	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
村瀬 繁樹	岐阜県飛騨食肉衛生検査所
山崎 翔矢	岐阜県飛騨食肉衛生検査所

(敬称略、五十音順)

A. 研究目的

平成30年の「食品衛生法の一部を改正する法律」の公布に伴い、と畜場・食鳥処理場については「HACCPに基づく衛生管理」が求められることとなり、令和2年6月に施行通知が出され、令和3年6月より本格施行するはこびとなった。同体制は事業者が行う内部検証に加え、自治体等が行う外部検証も要件とされる。本研究では、国内全てのと畜場・食鳥処理場において衛生管理システムが適切に構築されていることを検証する手法を構築し、国産食肉・食鳥肉の更なる安全性確保の向上を図ることを目的とする。

欧米のと畜場・食鳥処理場では従前よりHACCPシステムの科学的評価手法が導入・運用されているが、国内では大規模施設の一部、並びに食肉・食鳥肉を輸出する施設に限定的であった。一方、昨年には食鳥肉の対EU輸出も認められる等、輸出を行うと畜場・食鳥処理場数は増加傾向にあり、国産当該食品の輸出拡大を推進する上でわが国の食肉・食鳥肉の安全性を国際標準的に示すことは極めて重要な課題である。

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

更に、南九州地方では生食用食鳥肉が製造加工さ

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

(1) と畜場における HACCP 外部検証に関する研究

① 枝肉に付着する異物による微生物汚染実態調査

「アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱(令和2年4月1日財務大臣・厚生労働大臣・農林水産大臣決定別紙)」により、以前から対米牛肉輸出施設はゼロトレランス検証(目視できる糞便、消化管内容物、乳房内容物に汚染されていないことを検証すること)を実施している。さらに、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について(令和2年5月28日 生食発0528第1号)」においても、ゼロトレランス検証が明記されており臨場すると畜検査の際に、と畜検査員は計画的にゼロトレランス検証を実施している。

枝肉に付着している異物は、糞便、消化管内容物、乳房内容物に加え、獣毛、レールダスト等様々である。そこで、危害分析の一助とするとともに、検証技術の向上を目的として、岐阜県飛騨食肉衛生検査所が所管する輸出食肉認定施設(以下、「GI-1」と略)でと畜・解体処理され、整形・トリミングから最終洗浄前の枝肉に付着する異物の肉眼像及び実体顕微鏡像を調査した。また、これら異物について微生物検査および菌叢解析を実施したので報告する。

② 生産農家ごとの和牛体表の志賀毒素産生性大腸菌 O157・O26 汚染状況

2018(平成30)年7月10日、厚生労働省は、米国農務省食品安全局(以下「FSIS」と略)からの要請を受け、食肉処理施設において製造される冷蔵ト

リミング肉を検体とした志賀毒素産生性大腸菌(以下「STEC」と略)検査の実施をアメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱に定めた。これを受けて、対象となると畜場及びこれを所管する食肉衛生検査所は STEC 検査を開始している。

FSIS のガイドラインにより、と畜解体より前の段階に着目した製品のロットの設定が求められる。厚生労働省は、農家単位で製品のロットを設定する方法の一例を事務連絡で示した。この設定は当面の間、論文等の既存データの活用が可能とされており、事業者は、検査所と協議の上、農林水産省のデータを活用し、「同一農家かつ同一と畜解体作業日の枝肉群を1ロットと設定する」こととしてきた。

しかし、既存データの活用は当面の間ということもあり、農家ごとの STEC 保有状況の把握が求められる。現在、当該施設に牛を出荷する農家数は100を超え、STEC O157、O26、O45、O103、O111、O121 及び O145 の保有状況の全容を把握するには、相当の労力と経費が必要となる。一方、先行研究では、農家及びと畜日ごとの STEC 保有状況を把握するには、検出され易い STEC O157 に絞り、体表拭取りを農家ごとに1検体となるように行うことが非常に効率的であることが確認されている。

こうした背景を受け、本年度は、採材すると畜日に係留された全ての牛について体表の拭取りを行い、農家ごとに1検体とし STEC・O157・O26 について、リアルタイム PCR による遺伝子検査及び細菌検査を実施し、スクリーニング検査としてのリアルタイム PCR の有用性と STEC O157・O26 保菌状況を調査した。

③ と畜場における外部検証プロトコールの妥当性評価に関する研究

国産食肉・食鳥肉の輸出を行うと畜場・食鳥処理場数が増加傾向にある中、我が国の食肉・食鳥肉の安全性を国際標準的に示すことは極めて重要な課題である。本研究では、国内全てのと畜場で令和3年6月より施行されている HACCP 外部検証のための微生物試験の妥当性に関する検討を行い、実効性を踏まえた改良等を進める際に必要となる知見

の集積を図ることを目的として検討を行った。

本年度は、北陸～東海地方の3食肉衛生検査所の協力を得て、外部検証用の枝肉切除検体及び同一個体（もしくは同一農場）の外皮拭き取り検体における、衛生指標菌数（一般細菌数及び腸内細菌科菌群数）及び病原体（サルモネラ属及び腸管出血性大腸菌）の検出状況の関連性について検討を行ったので報告する。

④ 馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究

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

(2) 食鳥処理場における HACCP 外部検証及び生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

① 食鳥処理場での冷却後の採材時間軸の妥当性に関する研究

令和2年5月28日に厚生労働省より発出された、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実

施について」(生食発0528第1号、生活衛生・食品安全審議官通知)では食鳥検査員が実施する微生物試験法も示され、最終冷却後の水切りを行った後の食鳥とたいを微生物試験検体とすることとされた。また、検体を採取する食鳥とたいの選定にあたっては、採材時刻の指定はないものの、食鳥処理の最初のロットは可能な限り避け、処理半ばの食鳥とたいを選定することとされた。この選定条件は施設毎に施設設備要件や処理羽数、処理速度も多様であることを踏まえた措置と思料されるが、「処理半ば」とする明確な科学的根拠は見当たらない状況にあると考えられた。

以上の背景より、本分担研究では国内の大規模食鳥処理場の中で一般的な肉用若鳥を中抜き方式で処理する施設において、同施設を所管する食肉衛生検査所の協力を得つつ、異なる時系列の冷却後食鳥とたいより首皮試料を採材し、外部検証通知で示される微生物試験（一般生菌数、腸内細菌科菌群数、及びカンピロバクター菌数）を求め、処理の進捗に応じた食鳥とたいの微生物汚染状況変動を解析し、「処理の半ば」を採材時点とする現行通知の妥当性に関して考察を行ったので報告する。

② 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

南九州地域では多くの生食用食鳥肉が製造加工され、管轄自治体はその衛生管理に関するガイドラインを作成している。これまで大規模食鳥処理場・加工施設での衛生管理実態等については検討が進められ望ましい衛生管理手法が提案されてきているが、同食品を取扱う施設の多くは小規模であることから、その実態に沿った衛生管理手法を提示する必要が求められている。このような小規模処理施設における処理工程は小規模であるが故に、極めて多様な方法がとられていると想定されたことから、本分担研究では、それらの小規模施設の多様性について、特に衛生管理実態の把握と問題点の抽出を行うことで、生食用食鳥肉製品の更なる安全性確保に向けた製造加工工程の衛生管理向上に資することを目的として検討を行ったので報告する。

(3) HACCP 検証の評価手法に関する研究

本分担研究では、と畜場及び大規模食鳥処理場における「HACCP に基づく衛生管理」の実施状況の妥当性を検証するための評価・検証方法を国際的な動向を踏まえて構築し、最終的には、各事業者及び自治体等が自ら検証結果に基づき、衛生管理状況の確認をすべき時系列や工程、更には対策が行われた後の改善効果の評価等の実施に資する解析手法の提供を目的としている。

令和3年度は、全国のと畜場・食鳥処理場で取得された HACCP 外部検証微生物試験成績のデータ解析に協力すると共に、こうしたデータの取得後に各対象施設の衛生管理状況の評価に資する解析手法に関する原案の作成を進めたので報告する。

(4) と畜場等での内部検証に関する研究

平成30年に公布された「食品衛生法等の一部を改正する法律」では、改正の柱の一つとして HACCP に沿った衛生管理の制度化が示された。同法に基づき、と畜場法第6条第1項第2号及び第9条第1項第2号及び、食鳥処理場の事業の規制及び食鳥検査に関する法律（以下、食鳥検査法）第11条第1項第2号において HACCP に基づく衛生管理（食品衛生上の危害の発生を防止するために特に重要な工程を管理するための取組）に関する要求が明文化された。同要求に基づくと畜場及び大規模食鳥処理場の衛生管理では、事業者が自ら実施する内部検証に加え、と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施が義務付けられ（と畜場法施行規則第3条第6項及び第7条第5項、食鳥処理の事業の規制及び食鳥検査に関する法律施行規則（以下、食鳥検査法施行規則）第4条第4項）、これを受けて令和2年5月28日付け生食発0528第1号「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（以下、「外部検証通知」）が通知された。同通知ではと畜検査員及び食鳥検査員が実施する外部検証の手順及び評価方法が示されており、令和3年6月より本格的な施行が開始されたところである。

外部検証通知の中では外部検証で確認する事項

として、微生物検査（同通知別添1及び2の第9項）に加え、施設・設備管理に関する手順書の確認、生体・と体の取り扱いに関する手順書の確認及び HACCP プランに関する手順書の確認（同通知内別添1及び2の第4項の（1））、施設・設備管理に関する記録及び実施状況の確認及び教育訓練の確認（同通知内別添1及び2の第4項の（2））、生体・と体の取り扱いに関する記録及び実施状況の確認及び教育訓練の確認（同通知内別添1及び2の第4項の（3））について示されている。微生物検査以外の確認事項の具体については同通知内で別表1及び別表2として示されており、と畜検査員及び食鳥検査員はそれぞれ別表1及び別表2に示された個々の内容について現場確認及び記録確認を通じてと畜場及び食鳥処理場の衛生管理が適切に行われていることを評価することとなっている。

と畜場及び食鳥処理場での効果的な外部検証実施に向けては、検証活動の独立性を保ちながらも、事業者が自ら実施する内部検証の結果を有効活用することが望まれる。と畜場法施行規則及び食鳥検査法施行規則においても事業者に対し、と畜場・食鳥処理場の管理及びと畜・食鳥処理作業の衛生的な実施や各活動の効果等を検証するよう求めている。と畜場及び食鳥処理場の衛生管理に関する前提条件プログラムは施行規則内で詳細な手順が示され、また、HACCP については業界団体等が作成した手引書内で詳細な手順が示されている。しかしながら、現在公開されている HACCP の手順書では、CCP の管理方法、各種記録方法等（HACCP 原則1～5及び7）の SOP 及び記録様式は詳細に例示されるが、それらの検証方法（原則6）については詳細な手順が示されたものは少ない。このため、事業者ごとに検証手順及び検証に係る記録様式等が異なり、このことは効率的な外部検証を実施する上での大きな障害となるおそれがあると考えられる。

そこで本年度は、事業者が参照可能な内部検証プログラム原案作成を目的として検討を進めた。検討にあたっては、自治体等が行う外部検証の効率的な実施が可能となるよう、外部検証通知との関連性を

明確にした内容となるように構成し、加えて海外の HACCP 関連規格等との整合性にも配慮して進めた。

(5) 国際動向を踏まえた情報の収集整理

本分担研究では、日本国内の「と畜場での HACCP に基づく衛生管理」における実効的な外部検証法の構築に有用な情報を提供することを目的として、先行的にと畜場等で「HACCP に基づく衛生管理」を運用している海外主要国における、関連ガイドライン、検証法、法規や科学的知見等を収集・整理することで、現状における国際動向の情報を取りまとめたので報告する。

B. 研究方法

(1) と畜場における HACCP 外部検証に関する研究

① 枝肉に付着する異物による微生物汚染実態調査

令和3年4月から8月まで、GI-1のトリミング工程、枝肉検査工程及び検査所の枝肉検証時に確認された異物(獣毛5検体、糞便8検体、消化管内容物6検体、レールダスト5検体、フットカッターの汚れ5検体、その他(肉眼で判別できないもの)2検体)が付着した肉表面を採取し、肉眼及び実体顕微鏡で色調及び質感を観察し、写真撮影を実施した。

異物が付着した部位を $2 \times 2 \text{ cm}^2$ 切り取り、PBSを25mL加え、60秒ホモジナイズしたものを試料原液とした。試料原液及び適宜段階希釈した希釈液1mLを、3MペトリフィルムACプレート及びEBプレート2枚ずつに接種した。ACプレートは $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 48 \pm 3時間、EBプレートは $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 24 \pm 2時間培養した。培養後、各プレート上の典型集落を測定し、試料 1 cm^2 あたりの菌数を算出した。試料原液を接種した2枚のペトリフィルムの両方で集落が認められなかった検体の菌数は0.5 CFU/ cm^2 として計算し、この値を検出限界とした。5検体以上採取できたものについては、対数平均値 \pm 標準偏差 $\log \text{ CFU}/\text{cm}^2$ を求めた。

各異物の菌数の差については、表計算ソフトのExcel (Microsoft社)でF検定を実施後、t検定で有

意差 ($p < 0.05$)を求めた。各異物については菌叢解析を実施した。

② 生産農家ごとの和牛体表の志賀毒素産生性大腸菌 O157・O26 汚染状況

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

検体をノボビオシン加mEC培地で $41 \pm 1^\circ\text{C}$ 、18~24時間増菌培養し、NucleoSpin® Tissueを用いてDNA抽出を行った。それをCycleavePCR O-157 (VT gene) Screening Kit Ver. 2.0を用いて、Thermal Cycler Dice® Real Time System IIIにより、VT (stx) 遺伝子のスクリーニング検査を実施した。これに加え、7月からはCycleavePCR™ EHEC (O157/O26) Typing Kitを用いて、O157及びO26遺伝子のスクリーニング検査を実施した。

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

③ と畜場における外部検証プロトコールの妥当性評価に関する研究

1) 検体

北陸~東海地方の3食肉衛生検査所の協力を得て、管轄すると畜場に搬入された豚及び牛の外部検証用検体の残余検体及び外部検証用検体と同一個体(もしくは同一農場)の外皮拭き取り検体について、令和3年9月~令和4年2月までの6ヶ月間に各月5検体ずつの提供を受けた。外部検証の残余検体は、令和2年5月28日に発出された「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」(生食発0528第1号)で示される方法(切除法)で採材され、前調整された検体懸濁液の提供を受けた。更に外皮拭き取り検体は、以下のように採材された。

100 cm²の拭き取り検査枠及び拭き取りスポンジを用いて 300 g/cm²以上の圧をかけながら、30 秒間縦、横、斜め（左右）の順に各 10 回拭き取りを行った。外部検証残余検体の懸濁液及び拭き取り後のスポンジは、冷蔵便で送付し、採材後 48 時間以内に試験に供した。

2) 衛生指標菌の試験

外皮拭き取り検体における衛生指標菌数は以下のように計測した。滅菌 PBS を用いて、送付検体の 10 倍階段希釈系列を作製し、検体中の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数を計測した。通知法に記載の通り、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の定量試験性能が、ISO 法と同等であると国際的な第三者認証機関において確認された代替法を用いた。一般細菌数の計測には AC プレート及び腸内細菌科菌群数の計測には EB プレートを用いた。切除法により採材された枝肉切除検体での衛生指標菌の計測結果は各施設から提供を受けた。

3) サルモネラ属菌の試験

サルモネラ属菌の分離培養試験は、ISO 6579-1 に従った。送付検体を 9 倍量の緩衝ペプトン水に加え、37°C で 18 ± 2 時間、前増菌培養を行った後、RVS 培地及び MKTTn 培地を用いて選択増菌培養を行った。RVS 培地に接種した検体は 42°C で 24 ± 3 時間、MKTTn 培地に接種した検体は 37°C で 24 ± 3 時間培養した。選択増菌培養液は MLCB 寒天培地及びクロモアガーサルモネラ寒天培地に画線塗抹し、37°C で 24 ± 3 時間培養した。また、培養法と平行して前増菌培養液からアルカリ熱抽出法により調製した DNA を用いた、*invA* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR を補助的試験として行った。

4) 腸管出血性大腸菌の試験

腸管出血性大腸菌（STEC）の分離培養試験は、ISO/TS 13136 に従った。送付検体に 9 倍量の BPW を加え、37°C で 18～24 時間増菌培養を行った。増菌培養液よりアルカリ熱抽出法により DNA を調製し、*stx* 及び *eae* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR によるスクリーニングを行った。*stx* 及び *eae*

どちらも陽性となった検体は、STEC 主要 7 血清群の O 抗原遺伝子を標的としたリアルタイム PCR に供した。いずれかの血清群に陽性を示した検体は、陽性となった血清群の免疫磁気ビーズを用いて増菌培養液中の STEC を濃縮し、TBX 寒天培地及びクロモアガー STEC 培地へ塗抹し、選択分離培養を行った。選択分離培地上に発育した STEC が疑われるコロニーは、*stx* を標的としたリアルタイム PCR、O 抗原に対する血清を用いた凝集試験及び生化学性状試験により確認試験を行った。

④ 馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験 採材部位設定に向けた研究

1) と畜場における処理工程等の情報収集

馬を取り扱うと畜場 3 施設における、解体処理に係る工程フローを調査した。

2) 微生物試験

冷却前の馬とたいについて、豪州の関連ガイドラインに示される S1（胸部）、S2（腹部）、及び S3（臀部）の 3 部位について、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（生食発 0528 第 1 号、生活衛生・食品安全審議官通知）で示される切除法により採材を行い、切除片 1 cm²あたりの一般生菌数及び腸内細菌科菌群数をそれぞれ求めた。また、施設 A 及び B では馬とたい関連検体と同一個体の馬糞便検体を同時に採材し、冷凍状態で輸送し、後述の菌叢解析に供した。

3) 統計解析

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

4) 菌叢解析

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

(2) 食鳥処理場における HACCP 外部検証及び生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

① 食鳥処理場での冷却後の採材時間軸の妥当性に関する研究

1) 食鳥処理場における処理実態調査

研究協力施設の処理工程概要、並びに年間処理羽数、年間稼働日を確認した。また、前工程にあたる中抜き工程において、食鳥検査員による 5 分間の目視確認を行い、同工程での総処理とたい数及び腸切れが生じたとたい数を記録した。

2) 微生物試験

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

3) 統計解析

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

② 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

1) 調査対象施設

鹿児島県内の生食用食鳥肉を取り扱う認定小規模食鳥処理場及び食肉加工施設のうち、処理工程が異なることが事前聴取により確認できた 6 施設 (A~F) を対象に調査を行った。

2) 供試材料

処理場搬入鶏のクロアカスワブ、処理工程における鶏の皮または肉を材料として 25g 採取した。クロアカスワブは滅菌綿棒により採取した。解体加工工程から、脱羽後、チラー後、焼烙後、解体後に皮または肉を、最終製品を含めてそれぞれ採取した。さらに、それぞれの鶏の盲腸を結紮して採取した。また、必要に応じて、まな板などのふき取りによる施設環境調査や農場での保菌状況調査も行った。

3) カンピロバクターの分離・同定及び定量

クロアカスワブについて、カンピロバクターの存

在の有無を調べるため、プレストン培地 10ml に接種し、増菌培養後、1 検体につき 1 白金耳量をバツラー寒天培地に画線塗布した。バツラー寒天培地上に発育したカンピロバクター様コロニーについて、位相差顕微鏡での形状確認を行い、Mueller-Hinton 寒天培地を用いて純培養した。菌種同定は PCR 法により実施した。

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

盲腸内容物中のカンピロバクター菌数算定には平板希釈法を用いた。また、環境材料のスワブサンプルはクロアカスワブと同様にプレストンブロスにて増菌培養、バツラー寒天培地によって分離、PCR で同定を行った。

(3) HACCP 検証の評価手法に関する研究

1) 国内検査成績の動向把握のための解析

各自治体から厚生労働省に報告がなされた国内のと畜場及び大規模食鳥処理場におけるとたいの微生物試験データについて、匿名化した上で、全体の傾向を分析し、各畜種ごとに検査成績の統計学的状況を解析した。

2) Moving windows 方式での試験結果解析フォーマット原案に関する検討

国内におけると畜場・食鳥処理場での微生物検査実態を考慮しつつ、HACCP に基づく衛生管理が先行的に実施されている欧州、米国、オーストラリア、ニュージーランド等で多くの施設で採用が進んでいる、“Moving windows 方式”での微生物検査成績の評価に関する手法の円滑な導入を検討するため、Lee らの報告 (Food Control. 58(12): 23-38. doi:

10.1016/j.foodcont.2014.07.012) で示される様式を参照しつつ、原案の作成にあたった。

(4) と畜場等での内部検証に関する研究

1) 検証活動に関する問題点の抽出

4 自治体（食肉衛生検査所）への聞き取り調査を実施し、外部検証の実施方法について確認すると共に、現状の問題点について抽出を行なった。また、と畜事業者（2社）、食鳥処理事業者（1社）への聞き取り調査を実施し、内部検証活動についての問題点の抽出を行なった。

2) 検証に関する海外規格についての調査

The Code of Federal Regulation Title 21（以下、CFR Title 21）、ISO 22000:2018 食品安全マネジメントシステム、製造の SQF 食品安全コードで示される検証に関わる要求事項を整理した。

(5) 国際動向を踏まえた情報の収集整理

海外主要国における食鳥処理場での HACCP 検証に関する情報、特に微生物試験に関する内容（試験対象項目等）を各国・地域の政府機関が発行するガイドライン、告示並びに関連文献を収集し、国内の状況との違いを踏まえ、要点を整理した。

C. 研究結果

(1) と畜場における HACCP 外部検証に関する研究

① 枝肉に付着する異物による微生物汚染実態調査

枝肉に付着の認められた獣毛 5 検体、糞便 8 検体、消化管内容物 6 検体、レールダスト 5 検体、フットカッターの汚れ 5 検体、その他（肉眼で判別できないもの）2 検体について、肉眼及び実体顕微鏡で、色調ならびに質感を観察した。

獣毛は、黒く、長さや本数は様々で、肉眼でも容易に判別できた。糞便及び消化管内容物は、どちらも黄又は褐色で、繊維質の異物を含むものからそうでないものまで様々であった。レールダストは、色調が灰色で、薄い乾質の異物で、長さ、幅共に 2～3mm 程度のものが多かった。フットカッター汚れ

は、後肢切断面に付着しており、色調が黒く、一見糞便のように見えた。その他の異物は、レールダストと潤滑油が混ざったもの（以下、「その他 1」）と推察されるものや背割り屑の中に繊維質の消化管内容物又は糞便と推察されるもの（以下、「その他 2」）が認められた。

以上の異物付着の認められた枝肉表面部位を切除し、微生物試験に供した。結果として、一般細菌数は、獣毛付着部位（以下、「付着部位」を略）は $3.28 \pm 1.23 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 、糞便は $4.37 \pm 1.83 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 、消化管内容物は $4.20 \pm 0.90 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 、レールダストは $1.05 \pm 0.58 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 、フットカッター汚れは $1.70 \pm 0.23 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ であった。獣毛、糞便及び消化管内容物のそれぞれに差はなかった ($p < 0.05$)。また、獣毛、糞便及び消化管内容物に比べて、レールダスト及びフットカッター汚れは低値 ($p < 0.05$) であった。レールダストとフットカッターの間に差はなかった ($p < 0.05$)。その他 1 は $2.26 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 、その他 2 は $5.73 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ であった。

腸内細菌科菌群数は、獣毛は $1.40 \pm 0.73 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 、糞便は $2.22 \pm 0.93 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 、消化管内容物は $2.12 \pm 1.35 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ 、レールダスト及びフットカッター汚れは全検体において検出限界値 ($0.49 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$) 未満であった。獣毛、糞便及び消化管内容物のそれぞれに差は認められなかった ($p < 0.05$)。また、獣毛、糞便及び消化管内容物に比べて、レールダスト及びフットカッター汚れは低値 ($p < 0.05$) であった。その他 1 は検出限界値以下、その他 2 は $3.22 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ であった。

菌叢解析を通じ、糞便と消化管内容物では *Firmicute* 門が優勢な検体が多く、*Proteobacteria* 門は獣毛付着部位とフットカッター汚れで多く認められる等、異物ごとに違いが認められた。なお、その他 1 は *Bacteroidetes* 門が多く独特の菌叢を示したほか、その他 2 は *Proteobacteria* 門が多く獣毛やフットカッターと類似性を示した。

② 生産農家ごとの和牛体表の志賀毒素産生性大腸菌 O157・O26 汚染状況

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

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

③ と畜場における外部検証プロトコールの妥当性評価に関する研究

1) 豚外皮拭き取り検体及び枝肉における衛生指標菌及び病原細菌試験結果

施設 A では、2021 年 9 月~2022 年 2 月 (11 月と 12 月は 1 度の採材) にかけて月あたり 5 と体 (各枝肉及び外皮拭き取り検体) 計 50 検体の提供を受けた。外皮拭き取り検体の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は $2.40 \pm 0.66 \log \text{cfu/cm}^2$ 及び $0.18 \pm 0.47 \log \text{cfu/cm}^2$ 、枝肉での一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は $2.40 \pm 0.49 \log \text{cfu/cm}^2$ または $1.36 \pm 2.03 \log \text{cfu/cm}^2$ であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及び STEC は分離されなかったが、外皮拭き取り 5 検体 (20.0%) では STEC 遺伝子が陽性であった。

施設 B では、2021 年 9 月~2022 年 2 月にかけて月あたり 5 と体 (各枝肉及び外皮拭き取り検体) 計 60 検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平

均±標準偏差は $2.30 \pm 0.84 \log \text{cfu/cm}^2$ 、 $4.20 \pm 6.87 \text{cfu/cm}^2$ 、枝肉での一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は $1.88 \pm 0.62 \log \text{cfu/cm}^2$ 、 $0.74 \pm 0.63 \log \text{cfu/cm}^2$ であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及び STEC は分離されなかったが、外皮拭き取り 2 検体 (6.7%) では STEC 遺伝子が陽性であった。

施設 C では、2021 年 9 月~2022 年 2 月にかけて月あたり 5 と体 (各枝肉及び外皮拭き取り検体) 計 60 検体の提供を受けて試験を行った。外皮拭き取り検体の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は $2.42 \pm 0.83 \log \text{cfu/cm}^2$ 、 $2.07 \pm 4.34 \text{cfu/cm}^2$ 、枝肉での一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は $2.57 \pm 0.54 \log \text{cfu/cm}^2$ 、 $0.84 \pm 1.03 \log \text{cfu/cm}^2$ であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌は分離されなかったが、外皮拭き取り検体 1 検体 (3.3%) から STEC O103 が分離されたほか、同拭き取り 3 検体 (10.0%) は STEC 遺伝子が陽性であった。

次に、外皮拭き取り検体及び枝肉検体を、病原性大腸菌関連遺伝子検出の有無で 2 群に分け、衛生指標菌数との関係について検討した。施設 A 及び B の病原性大腸菌関連遺伝子が検出された外皮拭き取り検体では、病原性大腸菌関連遺伝子陰性検体に比べ、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は共に多い傾向にあった。また、腸内細菌科菌群数は計測菌数が相対的に小さいが、検体間のばらつきが大きい傾向がみられた。また、サルモネラ属及び同遺伝子の分離・検出は全ての検体で認められなかった。

2) 牛外皮拭き取り検体及び枝肉における衛生指標菌及び病原細菌試験結果

施設 A では、2021 年 9 月~2022 年 2 月 (11 月と 12 月は 1 度の採材であった) にかけて月あたり 5 と体 (各枝肉及び外皮拭き取り検体) 計 50 検体の提供を受けた。外皮拭き取り検体における一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は $4.95 \pm 0.61 \log \text{cfu/cm}^2$ 、 $2.28 \pm 0.58 \log \text{cfu/cm}^2$ 、枝肉での一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は $2.30 \pm 0.47 \log \text{cfu/cm}^2$ 、 0.46 ± 0.55

log cfu/cm²であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及び STEC は分離されなかったが、外皮拭き取り検体では 22 検体 (88.0%) で STEC 遺伝子が陽性であった。

施設 B では、2021 年 9 月～2022 年 2 月にかけて月あたり 5 と体 (各枝肉及び外皮拭き取り検体) 計 60 検体の提供を受けた。外皮拭き取り検体における一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は $4.25 \pm 1.57 \log \text{cfu/cm}^2$ 、 $1.15 \pm 1.80 \log \text{cfu/cm}^2$ 、枝肉での一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は $4.03 \pm 0.66 \log \text{cfu/cm}^2$ 、 $1.26 \pm 0.41 \log \text{cfu/cm}^2$ であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及び STEC は分離されなかったが、外皮拭き取り 10 検体 (33.3%)、枝肉 1 検体 (3.3%) は STEC 遺伝子陽性であった。

施設 C では、2021 年 9 月～2022 年 2 月にかけて月あたり 5 と体 (各枝肉及び外皮拭き取り検体) 計 60 検体の提供を受けた。外皮拭き取り検体における一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は $4.84 \pm 1.02 \log \text{cfu/cm}^2$ 、 $1.61 \pm 1.29 \log \text{cfu/cm}^2$ 、枝肉での一般細菌数及び腸内細菌科菌群数の平均±標準偏差は $3.03 \pm 0.87 \log \text{cfu/cm}^2$ 、 $0.87 \pm 0.47 \log \text{cfu/cm}^2$ であった。いずれの検体からもサルモネラ属菌及び STEC は分離されなかったが、外皮拭き取り 16 検体 (53.3%) 及び枝肉 2 検体 (6.7%) では STEC 遺伝子が陽性であった。

豚と体と同様、牛枝肉検体からはサルモネラ属及び STEC は分離されず、対象施設における牛と体の衛生管理は概ね適切に行われていると思われた。一方、外皮拭き取り検体での STEC 関連遺伝子陽性率は豚に比べて相対的に高い値を示した。

衛生指標菌数分布は施設間で明確な差異は確認されなかった。施設 A では、外皮拭き取りがと体洗浄後に行われたが、と体洗浄前に採材した他の 2 施設の検体に比べて STEC 遺伝子陽性率は高値を示した。牛とたいについても、外皮拭き取り検体及び枝肉検体を、STEC 遺伝子検出の有無で 2 群に分け、衛生指標菌数との関連性を検討したところ、外皮拭き取り検体では STEC 遺伝子陽性検体の一般

細菌数は $5 \log \text{cfu/cm}^2$ 以上、腸内細菌科菌群数は $2 \log \text{cfu/cm}^2$ 以上を示したほか、枝肉検体では衛生指標菌数の減少と共に病原性大腸菌関連遺伝子が殆ど検出されなくなる傾向が認められた。

④ 馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究

1) 馬とたいの解体処理工程フロー

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

2) 馬とたいにおける衛生指標菌検出結果

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

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

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

CFU/cm²、 $0.71 \pm 0.51 \log \text{CFU/cm}^2$ 、 $1.02 \pm 0.71 \log \text{CFU/cm}^2$ であった。

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

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

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

が $1.44 \log \text{CFU/cm}^2$ 及び $1.10 \log \text{CFU/cm}^2$ 、S2 が $1.73 \log \text{CFU/cm}^2$ 及び $0.88 \log \text{CFU/cm}^2$ 、S3 が $2.44 \log \text{CFU/cm}^2$ 及び $1.61 \log \text{CFU/cm}^2$ であった。これらのうち、「平均+2SD 値」を超過した検体は S2 で 1 検体、「80パーセンタイル値」を超過した検体は S1、S2、S3 で各 1 検体認められた。なお、全体の「平均+2SD 値」及び「80パーセンタイル値」は一般細菌数がそれぞれ $4.06 \log \text{CFU/cm}^2$ 及び $2.85 \log \text{CFU/cm}^2$ であり、「平均+2SD 値」を超過した検体は施設 A の 1 検体と施設 C の 3 検体であった。また、腸内細菌科菌群数については、それぞれの値が $1.33 \log \text{CFU/cm}^2$ 及び $0.62 \log \text{CFU/cm}^2$ であり、「平均+2SD 値」を超過した検体は施設 C の 2 検体であった。

3) 馬枝肉切除検体の菌叢解析結果

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

全体を通じ、最も優勢であった菌群は、*Oxalobacteriaceae* であり、最も高い占有率を示した検体では 90%を超過した。同菌群の構成を確認したところ、*Telluria* 属及び *Naxibacter* 属等の土壌由来菌が占める割合が高い状況であった。

一方、腸内細菌科菌群の占有率は総じて低く、同菌群の構成菌属を確認したところ、*Enterobacter* 属及び *Yokonella* 属が最も高頻度に検出され、*Cedecea* 属がこれに続いた。腸内細菌科菌群に属し、牛肉の危害要因の一つとされる *Salmonella* 属は認められなかった。なお、部位別では S1 (胸部) の検体が最も菌叢多様性に富んでいた。

4) 馬糞便検体の菌叢解析結果

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

(2) 食鳥処理場における HACCP 外部検証及び生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

① 食鳥処理場での冷却後の採材時間軸の妥当性に関する研究

1) 対象施設での微生物試験結果

2 稼働日にわたり、冷却工程後の食鳥とたいを時系列を追って採材し、微生物試験に供したところ、処理直後（0 時間後）の時点で採材した食鳥とたい首皮 1g あたりの平均菌数は、一般生菌数が 4.74 log CFU/g、腸内細菌科菌群数が 2.99 log CFU/g、カンピロバクター菌数が 1.09 log CFU/g であったが、処理半ばにおける各菌数はそれぞれ 5.29 log CFU/g、3.23 log CFU/g、1.35 log CFU/g となり、いずれも処理開始直後の検体に比べ、有意な増加を示した。

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

② 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

研究対象とした計 6 施設について、処理工程の概要及び処理工程を通じたカンピロバクターの検出状況を調査した。A 処理場では、懸吊焼烙、外剥、解体の順で処理されていた。この処理場では鶏を自家飼育しており、農場の事前調査で、鶏直腸スワブ 12 検体、落下糞便、飲水、いずれからもカンピロバクターが分離されることはなかったことから、飼育段階からカンピロバクター陰性と判断し、処理工程は調査しなかった。

施設 B では、網上焼烙、外剥、解体の手順をとっていた。1 回目の調査では、鶏個体を 6 羽識別して汚染状況を調べたところ、表面焼烙後の皮や肉からカンピロバクターが検出されることはなかった。しかしながら、個体を識別することなく多数羽処理工程で無作為に皮または肉を得て行った 2/3 回目

の調査では、焼烙後の皮、肉、及び製品から微量ながらカンピロバクターが検出された。

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

施設 D では、内臓中抜後にチラー処理を行い、その後、個別に水道水で腹腔内を洗浄、網上焼烙、解体、製品化をいう手順をとっていた。調査の結果、チラー洗浄後の皮からわずかに菌が検出されたが、表面焼烙後ではいずれの検体からも菌は検出されなかった。

施設 E では、チラー槽で冷却したと体をチェーンに掛けて移動させながら表面焼烙を行い、冷水シャワーによる再冷却した後、外剥ぎで解体製品化する工程であった。表面焼烙直後の皮は陰性であったが、シャワー冷却後に 1 検体微量ながら陽性が見られた。解体後の肉、製品は陰性であった。

施設 F では、搬入、放血、湯漬の工程からチェーンによる懸吊を行い、大規模処理場とほぼ同様の作業で、脱羽、内臓中抜き、チラー処理を行っていた。その後、と体を再度チェーン懸吊し、風乾、表面焼烙、氷冷、解体、製品化へと続く工程をとっていた。本施設では、鶏個体の追跡調査を行うことはできなかったため、1 回目に拭き取り調査を行ったところ、焼烙後のと体の腹腔内スワブ 10 検体中 8 検体がカンピロバクター陽性であった。また、解体室におけると体表面及びブロック肉の皮、各 10 検体中 2 検体から本菌が検出された。まな板等の環境拭き取り検体は全て陰性であった。2 回目調査では、焼烙直後の皮は全て陰性であったが焼烙後氷冷中の皮や解体後の肉から微量ながらカンピロバクターが検出された。

(3) HACCP 検証の評価手法に関する研究

1) 国内における検証成績解析協力

自治体から厚生労働省に報告された国内のと畜場及び食鳥処理場における微生物試験データについて、全体の傾向を分析し、特に年間を通じての変動性に着目した検討を進めた。現時点では、検査結果データとして一般生菌数、腸内細菌科数が大部分であったが、一部食鳥処理場からはカンピロバクターのデータも取得されていた。

令和元年度下半期と同様に、全体ではバラつきは見られたものの、牛、豚、及び食鳥の各とたいにおける一般生菌数及び腸内細菌科数はともに、一定の範囲内に概ね収束することが確認された。衛生状態の良否を判断する一つの目安として、「 $\text{平均値} + 2 \text{標準偏差 (SD)}$ 」を上限値として採用した場合、牛、豚および食鳥とたいにおける一般生菌数は、それぞれ $4.21 \text{ log CFU/cm}^2$ 、 $3.93 \text{ log CFU/cm}^2$ および 5.88 log CFU/g であった。同様に牛、豚および食鳥とたいにおける腸内細菌科数はそれぞれ $1.60 \text{ log CFU/cm}^2$ 、 $1.58 \text{ log CFU/cm}^2$ および 4.91 log CFU/g であった。これらの数値は絶対的な基準とは言いきれないが、我が国での食肉とたいにおける一般的な値として解釈され、同指標からの逸脱の有無をもって、対象施設における衛生状況の判断を行い得る数値としての活用が期待されると判断された。

食鳥処理場におけるカンピロバクター数の分布等については、十分な継続的なデータの蓄積がなされていないため、本年度での適合性を判断するには至らなかった。

2) Moving window 方式での評価の検討

と畜場・食鳥処理場における牛、豚、及び食鳥とたいにおける一般生菌数、腸内細菌科数、並びに食鳥とたいにおけるカンピロバクター菌数に係る試験結果は、HACCP に基づく衛生管理が適切に実行されているかを評価するための基礎データとしての活用が期待される。検査体制の実態を考慮すると、現状では月に一回程度の検査が現実的であることから、この検査間隔を基準にして、Moving windows 方式での評価を実施するためのエクセル

のスプレッドシートを構築した。Moving windows 方式を採用する場合には、window 幅（間隔）の設定が問題になるが、現状の日本の検査体制を考慮すれば、月に一回の検査で3ヶ月ごと、あるいは6ヶ月を一つの評価 window として検討するのが妥当と考えられた。

上述のスプレッドシートへあると畜場で処理された牛枝肉の微生物試験成績データ（一般生菌数）を入力した場合には、経時的な菌数変動グラフが自動的に生成される形式とした。同グラフでは上側に示された赤色点線（ $\text{上限値} = \text{平均値} + 2\text{SD}$ ）を2回連続で超えるような事態が発生した場合には、工程管理の異常を疑い、作業工程の点検を実施する、といった意思決定の支援ツールとして活用することが期待される。

(4) と畜場等での内部検証に関する研究

1) 検証活動に関する問題点の抽出

4 自治体（食肉衛生検査所）への聞き取り調査を通じ、各食肉衛生検査所では外部検証通知に従った外部検証活動が開始され、ウォークスルー方式での現場確認に加え、事業者が作成した記録の検査も実施されていることが確認された。外部検証通知においては別表1及び2の項目について、月一回以上の記録確認及び、原則毎日の現場確認を実施することとなっており、各食肉衛生検査所では基本的にこれらの頻度に従った検証活動が実施されていたが、別表1及び2に示された確認項目は膨大なものであり、原則毎日実施する現場確認と併せてその作業量が膨大なものとなっていることも明らかとなった。

と畜場法施行規則第3条第1項及び第7条第1項では、と畜場の衛生管理及び衛生的なとさつ・解体に関する要求事項が、食鳥検査法施行規則別表第三では食鳥処理場の衛生管理及び食鳥、食鳥とたい、食鳥中抜とたい及び食鳥肉等の衛生的な取扱いに関する要求事項が示されている。加えて、それらの衛生管理等に対する検証については、と畜場法施行規則では第3条第1項26号及び第5項4号に加え第7条第1項20号及び第4項4号において、食鳥

検査法施行規則では別表第3第4号ハに加え第4条第3項4号において要求事項として示されている。事業者への聞き取り調査の結果、施設の衛生管理及びと体等の衛生的な処理作業(と畜場法施行規則第3条第1項及び第7条第1項関連及び、食鳥検査法施行規則別表第三関連)に関する理解は非常に進んでおり、各工程の管理記録も十分に作成されていることが確認された。一方、検証(と畜場法施行規則第3条第1項26号及び第5項4号、及び第7条第1項20号及び第4項4号関連、及び食鳥検査法施行規則別表第3第4号ハ及び第4条第3項4号関連)については、事業者により、その理解度は様々であった。

2) 検証に関する海外規格についての調査

CFR Title 21 では Chapter I Part 117.115 とその関連項目及び Part 120.11 において、ISO 22000:2018 では 8.8 節：PRPs 及びハザード管理プランに関する検証において、製造の SQF 食品安全コードではパート B:製造の SQF 食品安全コード、食品製造の SQF システム要素の 2.5 節:SQF システム検証において、それぞれ検証に関する要求事項が示されている。これらの中で、検証についての要求事項が最も詳細に述べられているのは CFR Title 21 であった。CFR Title 21 Chapter I Part 117.115 とその関連項目では前提条件プログラムの検証に関する要求事項が、Part 120.11 においては HACCP プランの検証に関する要求事項が示される構成となっていることからこれらの情報を整理した。

3) 内部検証のプログラム原案の作成

検証活動に関する聞き取り調査の結果、一部の事業者では検証に関する理解が進んでいないこと、外部検証との連携がなされていないことが明らかとなり、事業者に対する内部検証実施のための支援と、外部検証通知と連携可能な内部検証プログラム提案の必要性が抽出された。そこで、事業者が参照可能な内部検証のプログラム案の作成を行った。内部検証のプログラム案の作成にあたっては、事業者及びと畜・食鳥検査員への聞き取り調査の結果を踏まえ、以下の作成方針を設定した。

- ・施行規則で示されている「検証」の目的について事業者の理解を促進する
- ・事業者の負担軽減のために、チェックシート方式を基本とする
- ・検証の頻度等について海外の HACCP に係る規格との整合性を考慮する
- ・外部検証通知との整合性を図ることで、外部検証の効率化に資するものとする

(5) 国際動向を踏まえた情報の収集整理

参照した海外公的機関から示されている衛生管理ガイドライン、通知等には、食鳥処理工程における微生物汚染低減対策に関して、事業者に向けた提案等(冷却温度など)の有益な情報の記載も多くみられた。本報では、日本、アメリカ合衆国、カナダ、欧州における食鳥処理場で実施されている微生物試験に関して要点をまとめた。

< 日本 >

1) 微生物試験の対象項目と目的

- (1) 対象：一般細菌数, 腸内細菌科菌群
目的：一般衛生管理の達成状況の評価
- (2) 対象：カンピロバクター属菌
目的：病原微生物汚染に対して適切な措置が実施されているかの確認

2) 検体採取場所

最終冷却(チラー冷却)水切り後の食鳥とたい(又は食鳥中抜きとたい)
処理始めのロットを避け、処理半ばから選定する。

3) 検体採取頻度

施設の操業状態を踏まえて、年間の試験検体数を設定。月1回以上、年間を通じて実施するのが望ましい。

4) 検体採取方法、採取部位、採取量

採取方法：切除法
採取部位：首皮(首皮がないものは胸部分の皮)
同一ロット5羽分の首皮計25gをまとめて1検体とする(首皮の重量は、なるべく各羽均等にする)。
5検体(=25羽分)を1検体として試験に用いる。

5) 試験方法

試験懸濁液の調製

細切した5羽分の首皮25 gに225 mLの滅菌希釈水を加えて1分間混和。適宜10倍希釈懸濁液を作製し、試験に用いる。

一般細菌数：

下記の標準培養法又はISO法 (ISO 4833) (或いは同等性が確認された方法)

定量試験 接種量 1 mL (1希釈2平板)

標準寒天培地 (ISO処方)

好気条件で $37 \pm 1^\circ \text{C}$, 48 ± 3 時間混釈培養。

1平板あたり集落数が15-300の平板から集落数を加数え、CFU/g又はCFU/cm²を算出する。

腸内細菌科菌群：

下記の標準培養法又はISO法 (ISO 21528-2) (或いは同等性が確認された方法)

定量試験 接種量 1 mL

バイレッドレッド胆汁ブドウ糖 (VRBG) 寒天培地
好気条件で $37 \pm 1^\circ \text{C}$, 24 ± 2 時間混釈培養。

1平板あたり集落数が150以下の平板から集落数を数え、CFU/g又はCFU/cm²を算出する。

定型集落は釣菌し、非選択寒天培地 (普通寒天培地等)に画線し継代する。非選択寒天培地で発育した集落を用いて、生化学性状試験 (オキシダーゼ試験, ブドウ糖発酵試験)を実施し、確認試験の陽性率及び検体希釈率を乗じて、検体1 gあたりの菌数を算出する。

カンピロバクター属菌：

試料調製は上記の衛生指標菌試験と同様であるが、本菌試験を先行実施する。

下記の標準培養法又はISO法 (ISO 10272-2) (或いは同等性が確認された方法)。

検体1mLを200 uLずつ5枚のmCCDA培地に塗抹培養する。

好気条件で $42 \pm 1^\circ \text{C}$. 44 ± 4 時間。

1平板あたり集落数が150以下の平板から集落数を数え、CFU/g又はCFU/cm²を算出する。定型あ

るいは疑わしい集落を釣菌し、非選択寒天培地に画線塗抹し、微好気培養する。

確認試験として、非選択寒天培地で生育した5集落をグラム染色, カタラーゼ試験, オキシダーゼ試験 などに供する (PCRによる遺伝子検出法を代替としてもよい)。確認試験の陽性率及び検体希釈率を乗じて、検体1 gあたりの菌数を算出する。

6) 判定

直近1年間の試験結果の平均値及び標準偏差 (SD)から、施設の達成目標値 として暫定的に設定している「平均+2SD」を求め、管理図を作成し、年間を通じた検証を実施する。

< 米国 >

食鳥処理場は事業規模に応じて、以下の4つに区分される。

(a) 極小規模施設 (Very Low Volume : VLV)

年間処理羽数が、鶏44万羽、七面鳥6万羽、アヒル6万羽、ガチョウ6万羽、ホロホロ鳥6万羽、またはひな鳥6万羽以下の施設

(b) 超小規模施設 (Very Small)

従業員数が10名未満、或いは年間売上高が250万ドル未満の施設

(c) 小規模施設 (Small)

従業員数が10名~499名の施設。但し、年間売上高が250万ドル未満である場合を除く。

(d) 大規模施設 (Large)

従業員数500人以上の施設。

1) 微生物試験の対象項目と目的

・対象項目：サルモネラ属菌及びカンピロバクター属菌

・目的：糞便等に含まれる食中毒菌の交叉汚染防止と汚染低減に向けた工程管理の適切性を判断すること。

* 極小規模施設及び超小規模施設では、大腸菌試験によりモニタリングしてもよいとしている。但し、大腸菌は糞便汚染に特化したモニタリングである

ことから、各事業者は食中毒菌を対象とした試験を追加実施してもよいとされる。

2) 検体採材工程

(a) 極小規模施設及び超小規模施設

冷却工程後

(b) 小規模施設及び大規模施設

冷却工程前後

冷却工程前：懸吊から冷却工程直前迄の工程で検体を採材する。本工程での採材は、食鳥生体が保有する微生物の検出や処理工程前半での糞便等の交叉汚染状況をはかることを目的としている。

冷却工程後：食鳥とたいが冷却槽から出た時点で採材を行う。水浸漬冷却方式施設での採材にあたっては、60秒以上冷却水をとたいから自然滴下させ、冷却水中に含まれる殺菌剤の試験結果への影響を排除・低減させる。冷却前後間に抗菌介入を実施している場合、冷蔵後の検体はその抗菌介入の制御の有効性の判断に有用。

3) 検体採取頻度

(a) 処理数が非常に少ない施設 (Very Low Volume)

毎年6月1日から少なくとも操業各週につき1回採材を行う。連続13回の検体採取を行った後、効果的な工程管理を実証した場合、検体採取計画を変更することができる。

(b) 超小規模施設, (c) 小規模施設, (d) 大規模施設
鶏：とたい2.2万羽につき1回。ただし最低でも操業各週に1回。

七面鳥、アヒル、ガチョウ、ホロホロ鳥、ひな鳥：とたい3千羽につき1回。但し、操業週に最低1回。

4) 検体採取方法

・鶏とたい：とたい1羽を滅菌袋に入れ、400 mLの希釈水を用いて洗い出し液を調整する(リンスパック法)。

・七面鳥とたい：とたいの背部及び大腿部の表面各40 cm²を拭き取る(ふき取り法)。

5) 試験方法

大腸菌：AOAC 17.2.01最確数(MPN)法

サルモネラ属菌：MLG4.11、MLG4 Appendix 2.06

カンピロバクター属菌: MLG 41.05

採取した検体はできるだけ早く試験に供する必要がある、遅くとも採取日翌日には試験を行うことが求められている。また、検体を輸送する場合は、冷蔵温度帯で行うことが求められている。

6) 結果判定基準

<事業者>

事業者は自らの施設で得られた微生物試験結果について、時系列変動をグラフ化すると共に、統計解析を行い、工程管理の適切性を判断する。同解析にあたってはベースラインデータの取得が前提となる。こうしたベースラインデータも事業者自らが収集することが望ましいとされるが、その収集を行えない小規模事業者はFSISが公表する米国全国調査結果(指標菌中央値)を用いても構わないとしている。

<外部検証官>

以下に示した性能基準(*)に基づき、施設を3つに区分(区分1-区分3)し、指導を実施。

・サルモネラ菌

ブロイラーとたい

性能基準 5 / 51

最大許容陽性率 9.8 %

七面鳥とたい

性能基準 4 / 56

最大許容陽性率 7.1 %

・カンピロバクター属菌

ブロイラーとたい

性能基準 8 / 51

最大許容陽性率 5.7 %

七面鳥とたい

性能基準 3 / 56

最大許容陽性率 5.4 %

*性能基準: 計52週間に収集・解析された試験結果(定性成績)の陽性率を指す。

各施設の評価にあたっては、52週間の1試験に

つき、少なくとも以下の検体数を試験に供する必要がある。

ブロイラーとたい	11
七面鳥とたい	14

上述の試験結果及び判定基準を基に、各施設は以下の区分化が行われる。

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

区分に応じた指導（抜粋）

- ①事業所が区分2に指定された場合：衛生管理の不安定性が示唆されるため、今後性能基準不合格となる可能性があることを説明する。また、製品が性能基準の50%を超過した警告を送る等の措置を実施。
- ②事業所が区分3に指定された場合：性能基準の不履行であったことを伝える警告を送る。事業所が是正措置を講じていることを確認し、(必要であれば) HACCPシステムの再評価を行うことを説明するなどの措置を取る

< カナダ >

- 1) 微生物試験の対象
サルモネラ属菌
カンピロバクター属菌
大腸菌 バイオタイプ 1

< 欧州 >

- 1) 微生物試験項目及び目的
試験項目：サルモネラ属菌（鶏、七面鳥）、カンピロバクター属菌（鶏）
目的：工程管理の妥当性確認
- 2) 検体採取部位：冷却後の中抜きとたい
- 3) 検体採材頻度
少なくとも週1回5検体を採材することとし、曜

日に偏りが無いことを求めている。なお、以下の結果が得られた施設については、検体採材頻度を隔週へと変更してもよいこととなっている。

- ・サルモネラ属菌：連続した30週間の結果が全て適合レベルであった場合。
- ・カンピロバクター属菌：連続した52週間の結果が全て適合レベルであった場合。

4) 検体採材部位、採材方法及び採材量

- ・採材部位：頸皮（重量が不足する場合は他部位の皮を含めても良い）。
- ・採材方法：切除法

試験所の区分により以下に大別される。

1) サルモネラ属菌とカンピロバクター属菌を同一試験所で試験する場合

1ロットあたり少なくとも3羽分の頸皮計26gをまとめ、1検体とし、計5検体（=>15羽分）を試験に用いる。

2) サルモネラ属菌とカンピロバクター属菌を異なる試験所で試験する場合

1ロットあたり少なくとも4羽分の頸部の皮計35gをまとめて1検体とし、計5検体（=>20羽分）を試験に用いる。

いずれの場合も、採取から試験開始までの間、検体は1-8℃の温度帯で輸送し、0℃以下になったものは試験に供しない。また、採取後、48時間以内に試験を開始する。

5) 試験方法

- ・サルモネラ属菌：EN/ISO 06579-1（或いはこれと同等と認められた方法）
- ・サルモネラ属菌血清型の判定：

White-Kauffmann-Le Minor schemeの方法

- ・カンピロバクター属菌：EN/ISO 10272-2（或いはこれと同等と認められた方法）

6) 結果判定基準

<衛生管理指標として>

- ・サルモネラ属菌

連続10回の検体採取で得た50検体において、検出されないこと。ただし、サルモネラ属菌が検出されたものが50検体中5検体までであれば許容され

る。なお、鶏及び七面鳥とたいからサルモネラ属菌が検出された場合は、血清型の判定を行う。

・カンピロバクター属菌

連続10回の検体採取で得た50検体において、1,000 cfu/g以下であることが望ましい。但し、1,000 cfu/gを超えて検出されたものが50検体中15検体(*)までであれば許容される(*: 2022年3月現在のM値を示す。2025年1月1日以降は10検体となる見込)。

なお、欧州では食鳥肉製品について、サルモネラ属菌(血清型Typhimurium及びEnteritidis)をn=5で検査し、検出されないことを成分規格として設定している。

D. 考察

(1)と畜場における HACCP 外部検証に関する研究

① 枝肉に付着する異物による微生物汚染実態調査

研究協力の承諾を得た食肉衛生検査所では、アメリカ合衆国向け輸出食肉の取扱要綱により、外部検証微生物検査(以下、「外部検証」と略)として、枝肉のふき取りによるサルモネラ属菌検査、トリム肉の腸管出血性大腸菌検査に加え、対 EU 輸出食肉の取扱要領に従い、令和2年5月から洗浄後(冷蔵庫搬入前)の牛枝肉から剥ぎ取り法により衛生指標菌(一般細菌数及び腸内細菌科菌群数)定量試験を実施している。これまでの結果において、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌及び評価基準を上回る衛生指標菌の検出はされていない。しかし、GI-1の枝肉検査工程では、獣毛、糞便及び消化管内容物はほぼ毎日のように確認され、獣毛についてはほぼ全頭付着している。

本調査において、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は、獣毛、糞便及び消化管内容物それぞれの間で差がなく、同等の汚染があることが細菌学的に示された。当所の外部検証として令和3年4月から8月に実施した衛生指標菌定量試験結果(一般細菌数の平均値 $(1.69 \pm 0.49 \log \text{CFU}/\text{cm}^2)$ 、腸内細菌科菌群数の平均値 $(0.62 \pm 0.12 \log \text{CFU}/\text{cm}^2)$)と比較す

ると、高値であった。このことは、各作業工程において異物が付着し、確実なトリミングが不十分であるものの、GI-1の枝肉検査にて適切に除去されていることを示唆するものと思われた。

レーラダスト及びフットカッター汚れは、両者とも腸内細菌科菌群数は検出限界値以下であり、一般細菌数は差がなかった。これらについて、当所の外部検証の結果と比較すると、フットカッターの汚れは同等、レーラダストは低値($p < 0.05$)であったことから、最終洗浄後の枝肉の微生物汚染状況にただちに影響をあたえるものではないと考えられる。しかし、フットカッター汚れの付着はフットカッターの洗浄不足を示唆するものであり、この状態では、消毒時の消毒効果も低下することが考えられ、枝肉への汚れの付着が細菌数の増加につながる可能性がある。また、フットカッター汚れは後肢切断面のトリミングしにくい部分に付着していることから、付着させないことが重要であると思われた。

肉眼で糞便及び消化管内容物と判別できない異物においても、実体顕微鏡像において、糞便または消化管内容物に似た繊維質の異物が認められ、腸内細菌科菌群も検出された。これは、糞便又は消化管内容物による汚染を示唆するものである。枝肉に付着する異物については明らかな糞便及び消化管内容物等でなくてもそれらの汚染の可能性があることから確実に除去すべきであると思われた。

GI-1では、各工程において、枝肉をよく観察し、糞便、消化管内容物及び乳房内容物に加え、獣毛等の異物の付着が認められた場合もトリミングをすることとしている。これまで、作業手順等の微生物学的な検証は、最終洗浄後のふき取り検査又は剥ぎ取り検査で実施しているのみであった。本調査では、異物ごとの汚染状況について、画像とともに微生物学的データを解析し、ゼロトレランスが大変重要であることを示すことができた。

② 生産農家ごとの和牛体表の志賀毒素産生性大腸菌 O157・O26 汚染状況

牛体表の拭取り検体の O157 の陽性率は 8.1% (15/185 検体)、O26 の陽性率は 2.7% (5/185 検体)

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

拭取り検体と保菌率では異なるが、農林水産省の STEC O157 調査結果 (94 頭/500 頭 陽性率 18.8%)、宮城県の調査結果 (26~28 頭/224 頭 陽性率 11.6~12.5%) に比べると、今回の成績は有意に低かったが、農林水産省 (16 頭/250 頭 陽性率 6.4%)、島根県 (9 頭/100 頭 陽性率 9.0%)、京都市 (11 頭/176 頭 陽性率 6.3%)、群馬県 (3 頭/125 頭 陽性率 2.4%) 等の調査結果とは有意差が認められなかった。体表の STEC O157 の拭取り検査結果 (8.1% : 15/185 検体) と盲腸内容物の検査結果 (15.6% : 14/90 検体) の有意差は認められなかった ($p=0.05919$)。

STEC O26 も農林水産省 (1 頭/250 頭又は 5 頭/500 頭 陽性率 0.4% 又は 1%)、宮城県 (8 頭/261 頭 陽性率 3.1%) と有意差はなく、どちらも他の行政機関との差を判断できるような結果は得られなかった。体表の STEC O26 の拭取り検査結果 (2.7% : 5/185 検体) と盲腸内容物の検査結果 (1.1% : 1/90 検体) の有意差は認められなかった ($p=0.4655$)。

農家ごとの保有率の違いは、6 ヶ月連続で陰性の農家 B、4 回のうち 2 回陽性の農家 A、2 回中 2 回連続陽性になった農家 BO といった農家もあることから、保有状況は農家ごとに異なっていることが判明した。また、陽性となった農家も採取した月によっては陰性となること、農家 B と農家 G は以前の調査で STEC が検出された農家であるが、今年度は全て陰性であったことから、と畜日により搬入さ

れる牛の STEC 保有状況も異なっていると考えられた。

一方、7 月の農家 W と農家 AY、9 月の農家 A、農家 X、農家 BJ は同じ運搬車で搬入されることが多い農家であり、係留所でも隣に繋がれていたことから、運搬車又は係留所での交差汚染の可能性を疑った。しかし、5 月に農家 A は陽性であり、同じ運搬車での搬入が多い農家 X、農家 Z は陰性であったこと、10 月に陽性であった農家 BO と同じ運搬車で搬入されている農家 C は陰性であったことから、運搬車内での交差汚染は頻度としては高くはないと推測される。また、係留所での交差汚染が原因であるならば、陽性農家数はさらに多くなりうるため、この可能性も低いと考えられた。

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

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

搬入牛の STEC 保有状況調査は、米国からの要求により開始したが、JA 飛騨ミートの HACCP 計画において、STEC は重要な危害要因に位置付けており、保有状況の状態を確認していくことは、と畜場の衛生管理を行ってきうえでも、極めて重要なデータとなる。より正確に保有状況等を把握していくためにも、今後も搬入牛の STEC 保有状況を引き続き調査することが必要と思われた。

③ と畜場における外部検証プロトコルの妥当性評価に関する研究

1) 豚外皮拭き取り検体及び枝肉

3 施設で処理された豚の外皮拭き取り検体の一部からは STEC O103 が分離されたほか、一定の確率で上述の病原菌由来遺伝子が検出されたことは、剥皮及びその後の枝肉洗浄工程が、これらの枝肉汚染を防除する上で重要であることを示唆すると考えられた。

また、サルモネラ属及び同遺伝子の分離・検出は全ての検体で認められなかったが、外皮拭き取り方法については、実施者による作業の違いが結果に与える影響も多分に推察されることから、現行通知法で採用された切除法がより安定的な結果を創出できるものと考えられた。

2) 牛外皮拭き取り検体及び枝肉

豚と体と同様、牛枝肉検体からはサルモネラ属及び STEC は分離されず、対象施設における牛と体の衛生管理は概ね適切に行われていると思われた。一方、外皮拭き取り検体での STEC 関連遺伝子陽性率は豚に比べて相対的に高い値を示し、牛解体処理では外皮への当該菌汚染を想定して剥皮前洗浄、剥皮、その後の枝肉洗浄工程を適切に管理する重要性が示唆された。

衛生指標菌数分布については施設間で明確な差異は確認されなかった。施設 A では、外皮拭き取りがと体洗浄後に行われたが、と体洗浄前に採材した他の 2 施設の検体に比べて STEC 遺伝子陽性率は高値を示した。このことは、施設 A での外皮のついた状態でのとたい洗浄方法の見直し、当該菌汚染の可能性を低減する上での対策事項として抽出されたと言えよう。

④ 馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究

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

計 3 施設の処理工程を踏まえた上で行った微生物試験成績を基に、「平均+2SD 値」を超過した検体の採材部位を確認した結果、S1（胸部）または

S2（腹部）が該当したことから、これらの部位を採材箇所として設定することが、馬とたいの工程管理の適切性を判断するための微生物試験成績の集積を図る上で有用と考えられた。

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

次いで行った馬糞便検体における菌叢解析結果からも、腸内細菌科菌群の占有率は低い状況にあった。これらの知見は、腸内細菌科菌群に属するサルモネラ属菌や病原大腸菌を馬の解体処理工程における危害要因として想定する意義が低いようにも思われるが、欧米では馬肉を介したサルモネラ食中毒事例が報告されていることを踏まえると、そのおそれを否定できる状況にはなく、従って馬とたいの HACCP 外部検証を行う上では牛豚と同様に、腸内細菌科菌群試験を含めることが妥当と考えられた。また、菌叢解析結果からは土壌由来細菌が馬枝肉における構成菌叢となっている状況が確認された。このことは、腸管内容物の管理に加え、体表から枝肉への交叉汚染を管理するための対策を講じることで衛生管理上の更なる向上に繋がる可能性を示唆していると考えられる。今後、馬体表における菌叢解析や指標菌定量試験を行うことで、外皮の衛生的取り扱いが馬とたいの解体処理工程における衛生管理の向上に資する可能性を指し示すことが可能となるものと期待される。

(2) 食鳥処理場における HACCP 外部検証及び生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

① 食鳥処理場での冷却後の採材時間軸の妥当性に関する研究

本研究では食鳥検査員が実施する外部検証微生物試験における採材時点を処理半ばとする妥当性を評価することを目的として、一般的な処理工程を有する大規模食鳥処理場における冷却後食鳥とたいを試料とした微生物試験を行い、それらの時系列挙動を解析した。本研究結果から、処理開始直後の

食鳥とたいを採材することが望ましくなく、半ば以降での試料確保が望ましいことが確認された。

また、採材時点を検討するにあたり、当該施設では中抜き工程での腸切れ頻度を目視確認することで、腸切れの発生頻度に関する情報収集につとめた。冷却工程前における腸切れ発生は糞便等の交叉汚染に直接的な影響を及ぼす要因と考えられることから、HACCPに基づく衛生管理を更に向上させていく上では、処理工程を通じた実態把握とその情報に基づいた形での工程管理の改善措置の設定が有効な手立てとなるものと期待される。特にCCP工程とすることの多い冷却工程については、換水頻度や殺菌剤の有効持続時間をはじめとする不明な点が多い。次年度以降には、こうした点を踏まえ、冷却水中の微生物挙動に加え、濁度や殺菌剤の有効成分濃度等の物性についても動態を評価することで、処理場での衛生向上に向けた知見の創出を図りたい。

② 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

施設Bで行った2/3回目の調査では、焼烙後の皮、肉、及び製品から微量ながらカンピロバクターが検出されたことから、処理工程中の人為的交叉汚染の可能性が示唆された。すなわち、多くの鶏を一度に多数処理する場合、放血脱羽処理室と食肉解体室との間での人や物の不適切な移動が問題となるものと思われる。

また、施設Cでは改善指導が功を奏したことはこうした事例を積み上げることの意義を示唆するものと考えられる。

施設Dでは、中抜きによる処理法でも適切にと体を取り扱えば表面焼烙により汚染を阻止できる可能性が推察された。

施設Eでは、表面焼烙後の交叉汚染を阻止することが課題となると思われる。

施設Fでは、中抜き後のと体腹腔内面は焼烙されないため、交叉汚染の原因になりかねないと考えられる。

本年度の調査では異なる形態の工程を取る6施設の認定小規模食鳥処理場/食肉処理施設を調査することができ、その衛生管理状況の詳細が明らかに

なってきた。処理場により解体工程は一様でなく、それぞれに対し適切な管理を行う必要がある。生食用食鳥肉の生産過程でと体表面焼烙は、その過程でのカンピロバクター汚染阻止に有効ではあるが、焼烙後の交叉汚染及び食肉部分への汚染を防ぐ措置も必要と考えられた。

(3) HACCP 検証の評価手法に関する研究

欧米諸国等の動向を考慮すると、サンプリングプランを考慮した基準設定が理想的ではあるが、国内のと畜場・食鳥処理場は欧米に比べて集約化が進んでおらず、管理体制や施設設備の多様性を鑑みた対策が必要と考えられる。この視点からは、頻回に微生物試験を実施できる状況にはない施設・自治体も多いと考えられるため、最低ラインとして月に一回程度の微生物検査実施が現時点では現実的なところと推察される。継続的なデータ蓄積は、施設の衛生管理実態に係る時系列変化を把握していくために有用であり、HACCPに基づく管理体制の良否を判断することにつながるであろう。

現状では食鳥処理場でのカンピロバクター数の評価基準策定にはデータが圧倒的に不足しており、日本国内の事情を反映した評価基準の策定は難しいところである。今後、急激にカンピロバクター数データが蓄積されるかは不透明であるが、仮に十分な基礎検査データが蓄積されなかった場合には、諸外国の基準を参照した形でのMoving window方式を採用した評価方法を構築していくことも一つの対応策としてありうると考えられる。

(4) と畜場等での内部検証に関する研究

本研究ではと畜・食鳥検査員が実施する外部検証及び事業者が実施する内部検証の実態調査から、効果的な外部検証の実施のためには外部・内部検証の連携の必要性が想定されたことから、外部検証と整合性をもつ内部検証のプログラム原案の作成にあたった。

と畜・食鳥検査員に対する聞き取り調査から、事業者ごとに衛生管理の記録様式が多様であり、外部

検証の実施においては外部検証通知に記載の確認項目と事業者が作成した記録を照らし合わせる作業が必要となっていることが明らかとなった。外部検証の様な第三者による監査活動においては、監査者と被監査者の協力体制により効率的かつ効果的な監査が実現されることが知られている。令和3年度より本格始動したと畜場及び食鳥処理場の外部検証については、被監査者である事業者は施行規則に基づく外部検証の実施について理解しているものの、外部検証に対応する形での記録整備及び内部検証の実施は強く意識されていない状況にあると思われた。本研究では上記の問題に対し、内部検証と外部検証の連携を強化するための選択肢の一つとして外部検証と整合性のある内部検証プログラム案の作成を試みた。同案では確認項目として外部検証通知に示されたすべての項目を引用し、記載した手順に従うことで外部検証で確認されるべきすべての項目について内部検証としてモニタリング及び是正処置の検証（振り返り）が可能な仕様とした。外部検証では上記手順に従って事業者が作成した外部検証と整合性のある振り返り記録を確認することで、外部検証で要求される記録確認を効率的に実施可能となる。CFR Title 21にも示される様に、検証は記録確認と妥当性確認の2つの工程に大きく分けられる。内部検証プログラム案ではこのうち記録確認に多くの解説を割き、妥当性確認については簡潔な説明のみを記載した。これは妥当性確認には科学的かつ専門的な知識が要求されるためであり、このため本プログラム案では妥当性確認については、と畜・食鳥検査員との連携を強く推奨した。上述の様に、内部検証のプログラム案に外部検証通知との整合性を持たせることで、記録確認に係る検証を簡略化することが可能となる。すなわち内部検証のプログラム案の活用により、外部検証における実施状況検証の負担軽減が期待され、その分、専門的知識を有すると畜・食鳥検査員による妥当性確認への活動の重点化が期待されるものとする。

と畜・食鳥検査員及び事業者に対する聞き取り調査からは検証で得られた結果に対する評価方法につ

いての問題点も抽出されている。すなわち、外部検証により抽出された不適合について個々に適切な是正処置が実施されていた一方で、その発生数・発生工程等の長期的なトレンド解析についてはほとんど行われていなかった。HACCPにおける微生物検査を含む検証の評価方法としてはトレンド解析による評価が主流となりつつある。外部検証通知においても微生物検査結果の評価は施設ごとに直近1年間の結果との比較により実施することとなっている。内部検証のプログラム案においても検証結果の評価は結果の絶対値の短期的な評価ではなくトレンド解析が重要であることを説明した。このような検証結果に対する評価方法の考え方は今後、国際的整合性を担保しつつ食品衛生管理の高度化を図る上で重要な提案であると考えている。

過去に様々な業界団体等よりHACCPの手引書が公開されているが、多くの手引書ではHACCPの7原則のうち原則1：危害要因の分析から原則5：改善措置の設定までは詳細な解説とモデルとなる記録様式等が示されてきた。一方、原則6：検証については、その詳細が述べられているものは少ない。外部検証通知は国内で公開されているものの中で検証の手順について最も詳細に解説がなされた文書である。本研究で作成した内部検証プログラム案は外部検証に対応する形で、これまでに業界団体等により作成されたHACCPの手引書で詳細な解説が少なかった原則6：検証の解説を補完するモデルになるものと期待される。その作成にあたっては、国内で公表されている様々なHACCP手引書で主流となっているチェックシート方式を採用することで、事業者にとって導入のハードルが低くなるように構成した。また同案では、施行規則で要求される検証の目的の理解促進を促すことで、事業者による内部検証活動の実効性の向上も期待できるものとした。本プログラム案は、内部検証を通じてHACCPシステム運用の高度化を図りたい事業者にとって、HACCPの手引書を補完する参考書の一つとして参照可能なものとなることが望ましいと考えられる。その完成に向けて、次年度には、より多くのと畜・

食鳥検査員からの意見を広く求め、改訂を行っていききたい。

E. 結論

(1) と畜場における HACCP 外部検証に関する研究

① 枝肉に付着する異物による微生物汚染実態調査

ゼロトレランス検証に示されている糞便、消化管内容物及びゼロトレランス検証でしめされていない獣毛からは一般細菌数、腸内細菌科菌群数が検出されるが、各々の統計学的に有意差が無いこと。レーラダストやフットカッターの汚れに比べて糞便、消化管内容物、獣毛の一般細菌数、腸内細菌科菌群数は統計学的に有意に高いことが判明した。よって、ゼロトレランス検証に加え、獣毛についても、体表に付着していた場合は、トリミングすることが必要であると思われた。

② 生産農家ごとの和牛体表の志賀毒素産生性大腸菌 O157・O26 汚染状況

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

③ と畜場における外部検証プロトコールの妥当性評価に関する研究

本年度は、国内 3 と畜場で豚・牛の枝肉切除検体及び外皮拭き取り検体における衛生指標菌数と病

原菌検出結果の関連性を検討し、以下の知見を得た。

・豚及び牛枝肉検体は全てサルモネラ属菌及び STEC 陰性が確認され、対象施設での豚・牛の解体処理工程における衛生管理は概ね適切に行われていると考えられた。

・外皮拭き取り検体からは、特に牛で相対的に高い STEC 遺伝子陽性率を認める等、剥皮前洗浄、剥皮、そしてその後の枝肉洗浄がこれらの汚染低減に重要な工程であることが確認された。

・STEC 遺伝子検出結果と衛生指標菌数分布の関連性探索を通じ、牛外皮拭き取り検体では、STEC 遺伝子陽性検体の一般細菌数は 5 log cfu/cm² 以上、腸内細菌科菌群数は 2 log cfu/cm² 以上を示し、剥皮前後の洗浄工程の管理が当該病原菌汚染低減を果たす上で重要であると考えられた。

④ 馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究

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

(2) 食鳥処理場における HACCP 外部検証及び生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

① 食鳥処理場での冷却後の採材時間軸の妥当性に関する研究

大規模食鳥処理場での冷却工程後の食鳥とたいにおける微生物汚染実態を処理の進捗に応じて時系列比較し、処理半ば以降での検出菌数は処理開始直後に比べて有意な増加を認め、処理半ば以降での採材が対象施設での外部検証を行う上で必要かつ

有用なタイミングであることを裏付ける知見が得られた。次年度には冷却水中の時系列変動等についても検討を進め、冷却水の望ましい換水頻度等に関する知見、更にはカンピロバクター等の交叉汚染媒体として冷却水が直接的に関与する可能性について探索を進めたい。

② 生食用食鳥肉の高度衛生管理に関する研究

本分担研究では、小規模施設における処理工程の多様性に基づき、工程管理実態把握、問題点抽出、衛生管理の改善に取り組み、国産食鳥肉の更なる安全性確保の向上を図ることを目的とし、検討を進めた。結果として6形態の小規模施設を調査することができ、その衛生管理状況の詳細が明らかになった。処理場により解体工程は一様でなくそれぞれに対し適切な管理を行う必要があると考えられた。生食用食鳥肉の生産過程におけると体表面焼烙は、その過程でのカンピロバクター汚染阻止に有効ではあるが、焼烙後の交差汚染及び食肉部分への汚染を防ぐ措置も必要と考えられた。

(3) HACCP 検証の評価手法に関する研究

本年度は、国内でのと畜場・食鳥処理場における牛、豚、食鳥とたいの微生物汚染成績を把握して、今後の国内での検証方法の確立に向けた基礎知見を集積できた。また、検査データの入力分析システムフォーマットを、今後の本格的な導入に向けて準備を進めることができた。

(4) と畜場等での内部検証に関する研究

1) と畜・食鳥検査員が実施する外部検証及び事業者が実施する内部検証の実態調査から、外部検証と内部検証との連携が必ずしも十分ではない場合が散見され、事業者による内部検証の円滑な実施に加え、外部検証との合理的な連携性を持つプログラム案の作成が必要との考えに至った。

2) 国際規格で示される検証要求事項を調査・整理し、それらとの整合性の確保を図るために、検証活動を記録確認（実施状況の検証）と妥当性確認（有効性の検証）に二分した。

3) 内部検証プログラム原案の作成にあたっては、事業者の関連事項を理解できるよう冒頭に説明を付記したほか、事業者の簡便な実施に向けチェックシートを採用すること、海外のHACCP関連規格との整合性を考慮しつつ、外部検証との整合性を踏まえた構成とすること等を条件として原案作成を進めた。今後、ステークホルダーの意見聴取を行った後に必要な改訂を行いたい。

(5) 国際動向を踏まえた情報の収集整理

米国、カナダ、EU では、サルモネラ属菌及びカンピロバクター属菌を食鳥処理場での工程管理の検証のための微生物試験項目として共通に設定・運用している実態が確認された。しかしながら、上述の食中毒菌以外の試験項目や頻度等、国・地域間で相違が見られた点に関しては、根拠や背景を踏まえた考察が必要と考えられる。次年度には、国内の調査結果等を踏まえつつ、国内でのHACCPに基づく衛生管理体制を円滑かつ国際調和のとれたものとしていくために必要な事項の整理を行っていきたい。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 著書

- 1) 朝倉宏. (2021) 鶏肉等におけるカンピロバクター汚染低減対策とその有効性評価について. 食の安全と微生物検査. 11: 19-38.
- 2) 朝倉宏. (2021) 食肉・食鳥肉製品のハザードとその管理. 保健医療科学. 70: 100-106.

2. 論文

- 1) Yamasaki E and Fukumoto S: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Yezo sika deer *Cervus nippon yesoensis* in the Tokachi sub-prefecture of Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci. doi: 10.1292/jvms.21-0591.

- 2) Duc VM, Kakiuchi R, Obi T, Asakura H, Chuma T: The incidence of *Campylobacter* contamination levels through chicken-sashimi processing steps in a small-scale poultry processing plant applying the external stripping method. J Vet Med Sci. 2022;84: 414-9.
 - 3) Asakura H, Yamamoto S, Sasaki Y, Okada Y, Katabami, Fujimori A, Munakata K, Shiraki Y, Nishibu H, Hisamoto C, Kawase J, Ojima Y, Kiyoshima A, Shiroma K: Bacterial distribution and community structure in beef cattle liver and bile at slaughter. Journal of Food Protection. 2022;85:424-34.
 - 4) Ogawa A, Nagaoka H, Asakura H. Draft genome sequence of *Campylobacter jejuni* ST-508 strain Shizu21005, isolated from an asymptomatic food handler in Japan, 2021. Microbiol Resour Announc. 2022: e0031622.
 - 5) Asakura H, Nakayama T, Yamamoto S, Izawa K, Kawase J, Torii Y, Murakami S: Long-term grow-out affects *Campylobacter jejuni* colonization fitness in coincidence with altered microbiota and lipid composition in the cecum of laying hens. Frontiers in Veterinary Science. 2021;8:675570.
3. 学会発表
- 1) Vu Minh Duc、柿内梨那、小尾岳士、朝倉宏、中馬猛久: Decontamination of *Campylobacter* through chicken-sashimi processing steps in a small-scale poultry processing plant applying the outer stripping method. 第164回日本獣医学会学術集会。(2021.9.7-13)
 - 2) 塚本真由美、苅谷俊宏、山崎翔矢、小畑麗、向島幸司、村瀬繁樹: 枝肉に付着する異物による微生物汚染実態調査。令和3年度食肉及び食鳥肉衛生研究発表会。(2022.1.15-31)
 - 3) 山崎翔矢、池田晃、松岡和代、小畑麗、苅谷俊宏、向島幸司、塚本真由美、村瀬繁樹: 令和3年度生産農家ごとの牛の志賀毒素産生性O157保有状況調査。令和3年度岐阜県食肉衛生検査技術研修会。令和4年3月。
 - 4) 朝倉宏、中山達哉、山本詩織、伊澤和輝、川瀬遵、鳥居恭司、村上覚史: 長期飼育を通じた、採卵鶏における *Campylobacter jejuni* の腸管定着の経時変動並びに腸内菌叢・脂質組成との関連性探索。第164回日本獣医学会学術集会(2021.9.7-13)
 - 5) 中村寛海、秋吉充子、山本香織、梅田薫、平井佑治、朝倉宏、阿部仁一郎: mP-BIT法による食中毒起因カンピロバクターの流行動態解析。第14回日本カンピロバクター研究会総会(2021.9.24)
 - 6) 朝倉宏: 最近の食中毒の傾向と対策。文部科学省 学校給食の衛生管理等に関する指導者講習会(2021.7.1)
 - 7) 朝倉宏、山本詩織、町田李香、中馬猛久: 南九州で製造加工される生食用食鳥肉製品における衛生指標菌汚染分布と工程管理との関連性に関する検討。第42回日本食品微生物学会学術総会。(2021.9.21-10.20)
 - 8) 朝倉宏: 生食用食鳥肉の製造加工を通じたリスク管理について。第58回獣医疫学会学術集会シンポジウム(2021.8.28)
 - 9) 朝倉宏: 生食用食鳥肉製造加工の高度衛生管理に関する研究について。厚生労働省令和3年度食肉及び食鳥肉衛生技術研修並びに研究発表会(2022.1.15-31)
 - 10) 朝倉宏: 外部検証の微生物試験の分析結果について。厚生労働省令和3年度食肉及び食鳥肉衛生技術研修並びに研究発表会(2022.1.15-31)
- H. 知的財産権取得状況
該当なし