

令和2-4年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「と畜・食鳥処理場における HACCP 検証方法の確立と

食鳥処理工程の高度衛生管理に関する研究」

分担総合研究報告書

馬とたいに対する HACCP 外部検証微生物試験採材部位設定に向けた研究

研究分担者 朝倉 宏  
研究協力者 伊豆一郎  
坂上友康

国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部  
熊本県食肉衛生検査所  
青森県十和田食肉衛生検査所

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

#### A. 研究目的

平成30年に公布された「食品衛生法等の一部を改正する法律」を受け、国内のと畜場及び大規模食鳥処理場では HACCP に基づく衛生管理が求められることとなった。その後、令和2年5月28日には、厚生労働省より、「と畜検査員及び食鳥検査員による外部検証の実施について」（生食発0528第1号、生活衛生・食品安全審議官通知）が発出され、各自治体の食鳥検査員は大規模食鳥処理場における「HACCP に基づく衛生管理」の状況を検証することが技術的助言として示された。同通知ではと畜検査

員が実施する微生物試験法も示されているが、その対象としては牛及び豚とたいが例示されている状況であった。一方、周知のとおり、と畜場では、牛及び豚のほか、馬やめん羊、山羊等も解体処理されており、これらを取り扱う施設における HACCP 外部検証微生物試験の在り方として、牛豚と同様でよいかを明示する根拠が見当たらない状況にあった。昨年度は、めん羊及び山羊とたいを対象とした検討を進めたことを受け、本年度は、馬とたいを対象とした微生物試験を行う際に、採材対象とすべき箇

所の選定に係る知見を収集することを目的として検討を行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. と畜場における処理工程等の情報収集

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

### 2. 微生物試験

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

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

### 3. 統計解析

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

### 4. 菌叢解析

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

## C. 研究結果

### 1. 馬とたいの解体処理工程フロー

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

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

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

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

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

### 2. 馬とたいにおける衛生指標菌検出結果

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

S2（腹部）、S3（臀部）でそれぞれ  $1.41 \pm 0.21 \log \text{CFU/cm}^2$ 、 $2.04 \pm 1.23 \log \text{CFU/cm}^2$ 、 $2.66 \pm 0.59 \log \text{CFU/cm}^2$ 、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  $0.72 \pm 0.36 \log \text{CFU/cm}^2$ 、 $0.71 \pm 0.51 \log \text{CFU/cm}^2$ 、 $1.02 \pm 0.71 \log \text{CFU/cm}^2$  であった。

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

S1 が  $1.39 \log \text{CFU/cm}^2$  及び  $1.21 \text{CFU/cm}^2$ 、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生菌数の「平均+2SD 値」及び「80 パーセンタイル値」はそれぞれ S1 が  $1.69 \log \text{CFU/cm}^2$  及び  $1.25 \text{CFU/cm}^2$ 、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生菌数の「平均+2SD 値」及び「80 パーセンタイル値」はそれぞれ S1 が  $4.70 \log \text{CFU/cm}^2$  及び  $3.96 \text{CFU/cm}^2$ 、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パーセントイル値」は一般生菌数がそれぞれ 4.06 log CFU/cm<sup>2</sup> 及び 2.85 log CFU/cm<sup>2</sup> であり、「平均+2SD 値」を超過した検体は施設 A の 1 検体と施設 C の 3 検体であった。また、腸内細菌科菌群数については、それぞれの値が 1.33 log CFU/cm<sup>2</sup> 及び 0.62 log CFU/cm<sup>2</sup> であり、「平均+2SD 値」を超過した検体は施設 C の 2 検体であった。

### 3. 馬枝肉切除検体の菌叢解析結果

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

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

### 4. 馬糞便検体の菌叢解析結果

馬枝肉切除検体での腸内細菌科菌群の低い占有率が示されたことを踏まえ、次に馬糞便検体を対象とした菌叢解析を実施した。結果として、馬糞便検体では *Clostridiaceae*、*Ruminococcaceae* 等が占める割合が高く、*Oxalobacteriaceae* や

*Enterobacteriaceae* の占有率は総じて低い値を示し、馬枝肉検体とは大きく異なる菌叢構成であることが確認された。

### D. 考察

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

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

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

菌科菌群試験を含めることが妥当と考えられた。

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

## E. 結論

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

## F. 研究発表

論文発表

1. Asakura H, Yamamoto S, Sasaki Y, Okada Y, Katabami, Fujimori A, Munakata K, Shiraki Y, Nishibu H,

Hisamoto C, Kawase J, Ojima Y, Kiyoshima A, Shiroma K. (2022) Bacterial distribution and community structure in beef cattle liver and bile at slaughter. J. Food Prot. 85:424-34.

学会発表

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

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

