

令和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

分担研究報告書

外部検証プロトコルの妥当性評価に関する研究

研究分担者 大屋 賢司 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

昨年度に3食肉衛生検査所の協力を得て実施した、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）及び病原菌関連遺伝子の検出状況について、改めて検討を行った。また、昨年度までに実施した検証結果を踏まえ、1施設の協力の元、剥皮前後の工程における衛生管理の重要性について評価した。各施設から提供された外部検証用切除検体の重量について95%信頼区間を算出し、逸脱した検体がどの程度存在したかを検証した。3施設の検体とも概ね10g前後の検体が採取されており、95%信頼区間から逸脱した検体はなかったことから、検体は適切に採材されていたと考えられた。昨年度の調査で、3施設の外皮拭き取り検体及び枝肉では、病原菌関連遺伝子が検出された検体では衛生指標菌数が多い傾向が認められた。そこで、衛生指標菌数について平均+2SD（母集団の約2.2%に相当）を超過した検体の精査を行った。豚と体及び牛と体の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数いずれも平均+2SDを超過した検体の割合は最大で13.3%であったが、これら検体と病原菌関連遺伝子陽性について明確な相関は認められず、対象となった施設では適切に衛生管理が行われていることが改めて確認された。豚と体及び牛と体の解体工程における「剥皮前」と剥皮後の「枝肉」工程間の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は剥皮後に大きく減少し病原菌関連遺伝子陽性率も「0」になることが明らかとなった。以上により、対象施設の豚と体及び牛と体解体工程では、剥皮前後の工程における衛生管理が重要であることが示された。

A. 研究目的

国産食肉・食鳥肉の輸出が拡大され輸出を行うと畜場・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であ

る。本研究では、と畜場において実施している HACCP 外部検証法を、科学的根拠を伴った形で検証することを目的とする。

今年度は、昨年度に3食肉衛生

検査所の協力を得て実施した、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）及び病原菌関連遺伝子の検出状況について、改めて検討を行った。また、昨年度までに実施した検証結果を踏まえ、1施設の協力の元、剥皮前後の工程における衛生管理の重要性について、衛生指標菌と病原菌関連遺伝子検出状況を指標に評価した。

## B. 研究方法

### 1) データ及び検体

外部検証の妥当性再評価には、令和3年度に、北陸～東海地方の3食肉衛生検査所の協力を得て実施した、管轄すると畜場に搬入された豚及び牛の外皮検証用検体及び同一個体（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及び病原菌関連遺伝子（病原性大腸菌の *stx* 及び *eae*）検出状況のデータを用いた。豚及び牛と体解体工程における衛生管理の調査には、1食肉衛生検査所から、豚及び牛と体拭き取り検体の提供を受けて用いた。拭き取りには、100 cm<sup>2</sup>の拭き取り検査枠（CRF-1010、アズワン）及び拭き取りスポンジ（ふき

取り用ドライスポンジスティック SSL100、スリーエム）を用いて 300 g/cm<sup>2</sup>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。豚と体からは図1に示す豚解体工程の洗浄前、洗浄後（剥皮前）及び枝肉の3工程において腹部から採材した。牛と体からは図2に示す牛解体工程の剥皮前及び枝肉の2工程において腹部から採材した。拭き取り後のスポンジは、冷蔵便で国立医薬品食品衛生研究所へ送付し、採材後48時間以内に試験に供した。各工程3検体ずつ採材し、試験は2回実施した。

### 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、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)(以下、通知法)に従い、以下のように計測した。滅菌PBSを用いて、送付された検体の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（スリーエム）及び腸内細菌科菌群数の計測には EB プレート（スリーエム）を用い、製造事業者が定める方法に従って試験を実施した。結果は常用対数で表したが、負の値となった場合は「0」として集計した。

### 3) 病原菌由来遺伝子の検出

送付された検体を 9 倍量の BPW に加え 37℃、18 から 24 時間増菌培養を行った。増菌培養液からアルカリ熱抽出法により DNA を調製し、腸管出血性大腸菌のスクリーニングに使用される *stx* 及び *eae* 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR を行った。

## C. 研究結果及び考察

### 1) 外部検証の妥当性再評価

令和 3 年度に 3 食肉衛生検査所の協力を得て、豚及び牛と体の外部検証用検体と外皮拭き取り検体における衛生指標菌数及び病原体検出状況の関連を検討した。この時に得られたデータを元に、3 施設における外部検証の妥当性について改めて検討した。

豚及び牛枝肉の外部検証（微生物試験）では、過去の厚生労働科学研究から、菌の検出感度に優れ、検査員によるばらつきが小さい切除法が採用されている。しかしながら、

採取法に問題があり検体重量にばらつきがあると衛生指標菌を正確に測定できていない可能性がある。そのため、各施設から提供された検体重量について 95%信頼区間を算出し、逸脱した検体がどの程度存在したかを検証した（表 1）。施設 A の豚と体では平均 9.97 g、標準偏差（SD）が 2.04 g であり 95%信頼区間 9.19 から 10.75 g の範囲から逸脱した検体はなかった。牛と体では、平均 10.80 g、SD は 1.15 g であり、95%信頼区間 10.36 から 11.25 g の範囲から逸脱した検体はなかった。施設 B の豚と体では平均 7.99 g、SD は 2.75 g であり 95%信頼区間 9.01 から 10.98 g の範囲から逸脱した検体はなかった。牛と体では、平均 9.99 g、SD は 2.75 g であり、95%信頼区間 9.01 から 10.98 g の範囲から逸脱した検体はなかった。施設 C の豚と体では平均 7.77 g、SD は 2.83 g であり 95%信頼区間 6.76 から 8.78 g の範囲から逸脱した検体はなかった。牛と体では、平均 10.10 g、SD は 3.25 g であり、95%信頼区間 8.94 から 11.27 g の範囲から逸脱した検体はなかった。過去の厚生労働科学研究では約 10 g の検体を採取するのが望ましいとされている。3 施設の検体とも概ね 10 g 前後の検

体が採取されており、95%信頼区間から逸脱した検体はなかったことから、対象となった3施設においては、適切に採材されていたと考えられた。

枝肉の微生物検査における工程管理目標値の設定では、平均値とSDから施設毎に設定することが求められている。3施設の外皮拭き取り検体及び枝肉では、病原菌関連遺伝子が検出された検体では衛生指標菌数が多い傾向が認められた。そこで、衛生指標菌数について平均+2SDより高い値を示した検体の精査を行った。

豚と体の一般細菌数では、3施設の外皮拭き取り検体及び枝肉いずれも平均+2SDを超過した検体は0もしくは1検体（総数の4.0%）であり、病原菌関連遺伝子が検出された検体はなかった（表2）。腸内細菌科菌群数では、施設Bの外皮拭き取り検体及び枝肉いずれも4検体（総数の13.3%）が平均+2SDを超過し、施設Cの外皮拭き取り検体及び枝肉いずれも3検体（総数の10.0%）が超過した。平均+2SDが母集団の約2.2%に相当することを考慮すると、B施設及びC施設では腸内細菌科菌群数が高値に逸脱した検体が多い傾向が認められたが、これら検体と病原菌関連遺伝子陽

性検体との明確な相関は認められなかった（表2）。

牛と体の外皮拭き取り検体では、一般細菌数で平均+2SDを超過した検体数はA施設では0、B施設では1（3.3%）及びC施設では0であった。腸内細菌科菌群数で平均+2SDを超過した検体数はA施設では1（4.0%）、B施設では3（10.0%）及びC施設では1（3.3%）であり、これら検体はいずれも病原体関連遺伝子陽性であった（表3）。

対象となった施設では、豚と体及び牛と体いずれも衛生指標菌数において母集団から逸脱した検体が顕著に多い傾向は認められず、適切に衛生管理が行われていることが改めて確認された。

## 2) 豚及び牛と体解体工程における衛生管理の調査

豚と体解体工程（図1）の中で、剥皮前の工程としての、と体洗浄機前の「洗浄前」から洗浄機通過後の「洗浄後（剥皮前）」間の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は、1回目の試験では「洗浄後（剥皮前）」で減少傾向にあったが、一般細菌数では $p > 0.55$ 及び腸内細菌科菌群数では $p > 0.41$ でありどちらも有意水準5%での差は認められなかった（図3上段）。「洗浄後（剥皮前）」と剥皮後の「枝肉」工程間では、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数いずれも減少傾向に

あり、一般細菌数では  $p < 0.02$  であり有意水準 5% で差が認められた（腸内細菌科菌群数に関しては負の値を「0」として集計しているため有意差検定は行っていない。」（図 3 上段）。病原菌関連遺伝子検出状況は、「洗浄前」では 33.3% (1/3)、「洗浄後（剥皮前）」では 33.3% (1/3)、「枝肉」では 0% (0/3) であり衛生指標菌の減少と共に病原菌関連遺伝子陽性率は減少し枝肉では検出されなくなることが示された。2 回目の試験においても同様の傾向が認められたが、「洗浄前」と「洗浄後（剥皮前）」の間で減少傾向にあった一般細菌数の差について、 $p < 0.03$  となり有意水準 5% で差が認められた（図 3）。

牛と体の解体工程では、2 回の試験いずれにおいても、「剥皮前」と剥皮後の「枝肉」の間では、一般細菌数及び腸内細菌科菌群数共に減少傾向であり、有意水準 5% で差が認められた。この間の病原菌関連遺伝子陽性率は衛生指標菌数と並行して 100% (3/3) から 0% (0/3) に減少した（図 4）。

以上により、対象の施設での豚と体及び牛と体解体工程において、剥皮前後の工程における衛生管理の重要性が示された。

#### D. 結論

今年度は、昨年度に 3 食肉衛生検査所の協力を得て実施した、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）及び病原菌関連遺伝子の検出状況について、改めて検討を行った。また、昨年度までに実施した検証結果を踏まえ、1 施設の協力の元、剥皮前後の工程における衛生管理の重要性について、衛生指標菌と病原菌関連遺伝子検出状況を指標に評価した。豚及び牛枝肉の外部検証（微生物試験）では、菌の検出感度に優れ、検査員によるばらつきが小さい切除法が採用されている。しかしながら、採取法に問題があり検体重量にばらつきがあると衛生指標菌を正確に測定できていない可能性がある。そのため、各施設から提供された検体重量について 95% 信頼区間を算出し、逸脱した検体がどの程度存在したかを検証した。3 施設の検体とも概ね 10 g 前後の検体が採取されており、95% 信頼区間から逸脱した検体はなかったことから、対象となった 3 施設においては、適切に採材されていたと考えられた。3 施設の外皮拭き取り検体及び枝肉では、病原菌関連遺伝子が検出された検体では衛生指標菌数が多い傾向が認められた。そこで、衛生指標菌数について平均+2SD（母集団の約 2.2% に相当）を超過した検体の精査を行

った。豚と体及び牛と体の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数いずれも平均+2SD を超過した検体の割合は最大で 13.3%であったが、これら検体と病原菌関連遺伝子陽性について明確な相関は認められず、対象となった施設では適切に衛生管理が行われていることが改めて確認された。豚と体及び牛と体の解体工程における「剥皮前」と剥皮後の「枝肉」工程間の一般細菌数及び腸内細菌科菌群数は剥皮後に大きく減少し病原菌関連遺伝子陽性率も「0」になることが明らかとなった。以上により、対象施設の豚と体及び牛と体解体工程では、剥皮前後の工程における衛生管理が重要であることが示された。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

(誌上発表)

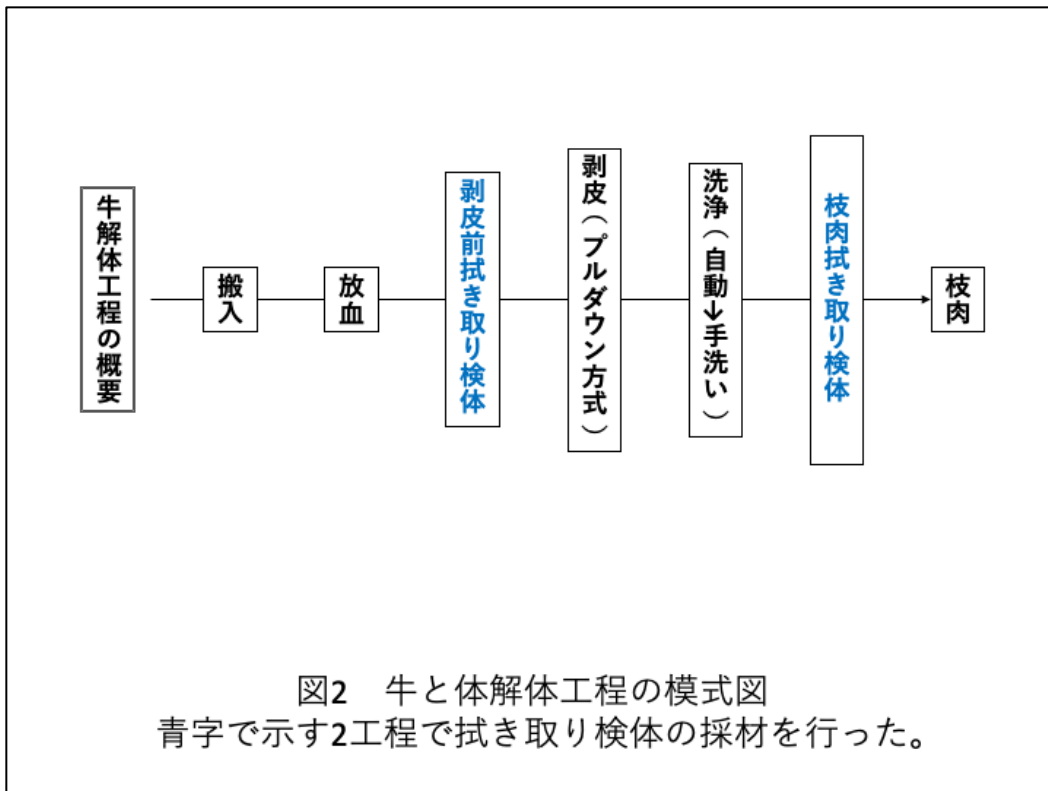
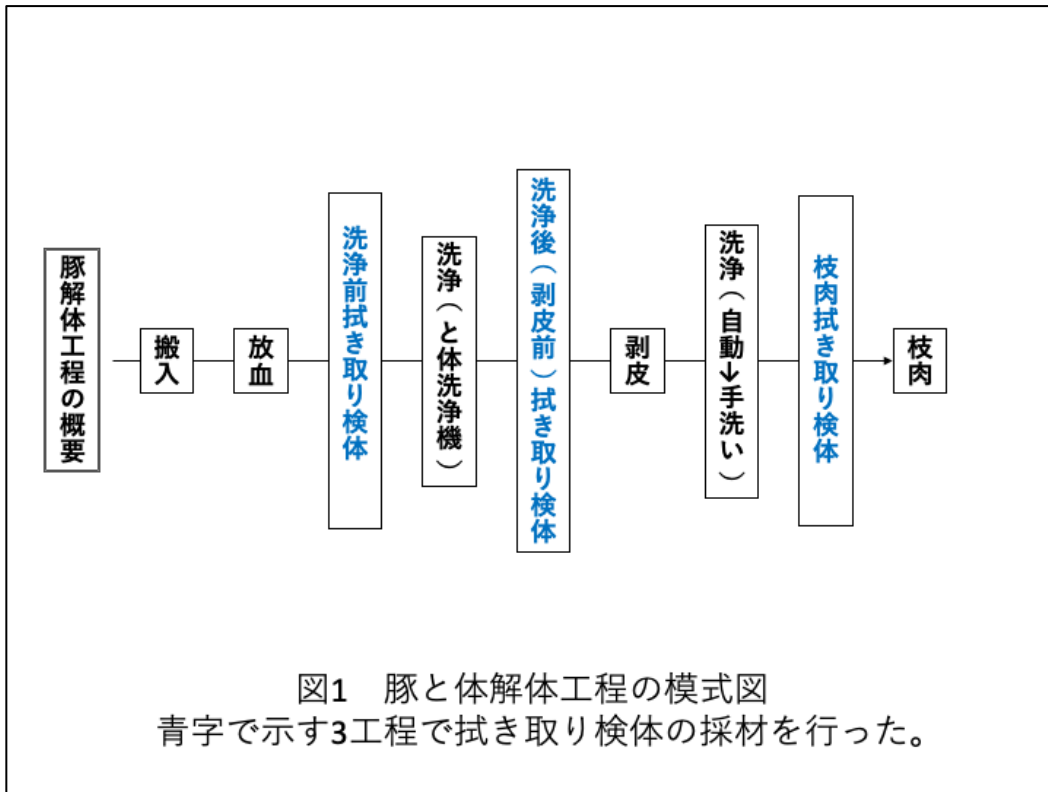
なし

(学会等発表)

なし

#### G. 知的所有権の取得状況・登録状況

なし



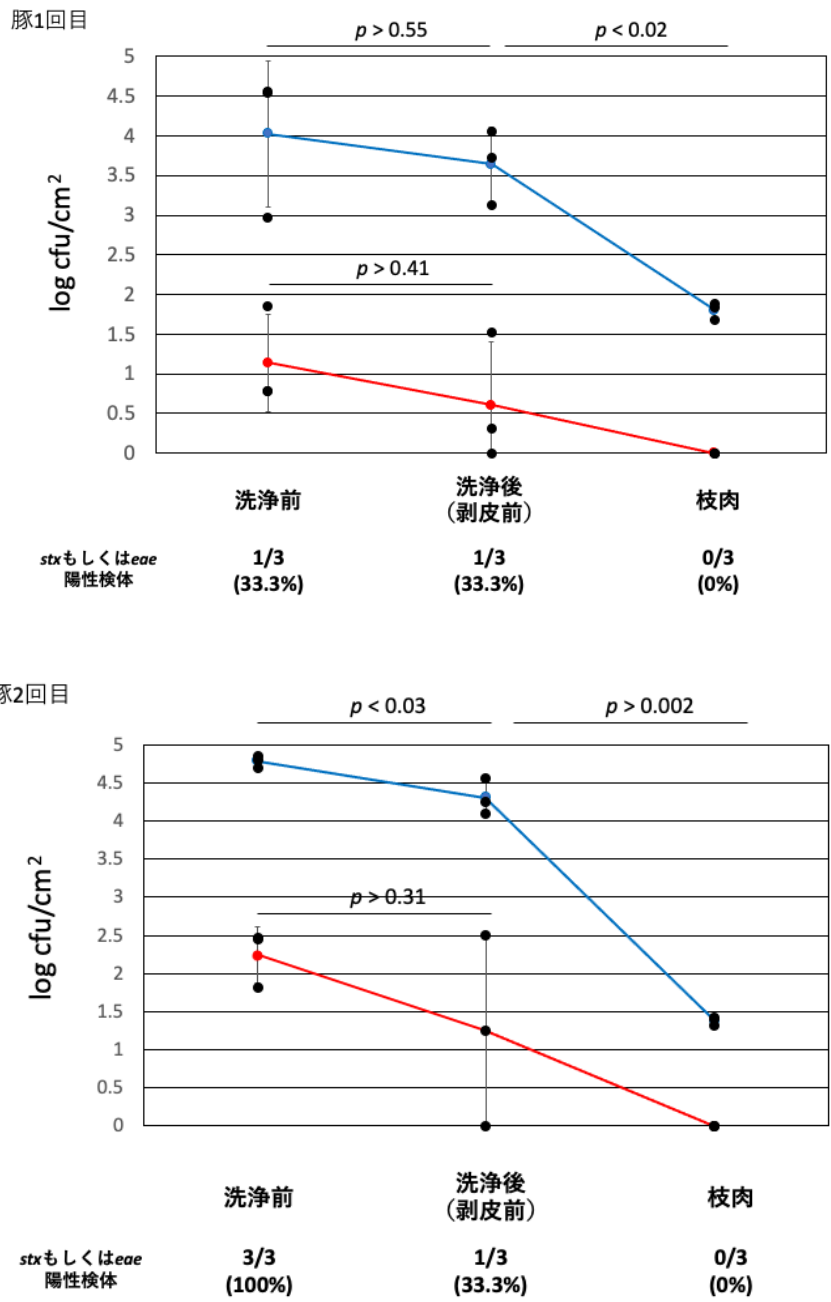


図 3 豚解体工程における衛生指標菌数と病原細菌関連遺伝子検出状況の推移。青字：一般細菌数、赤字：腸内細菌科菌群数。



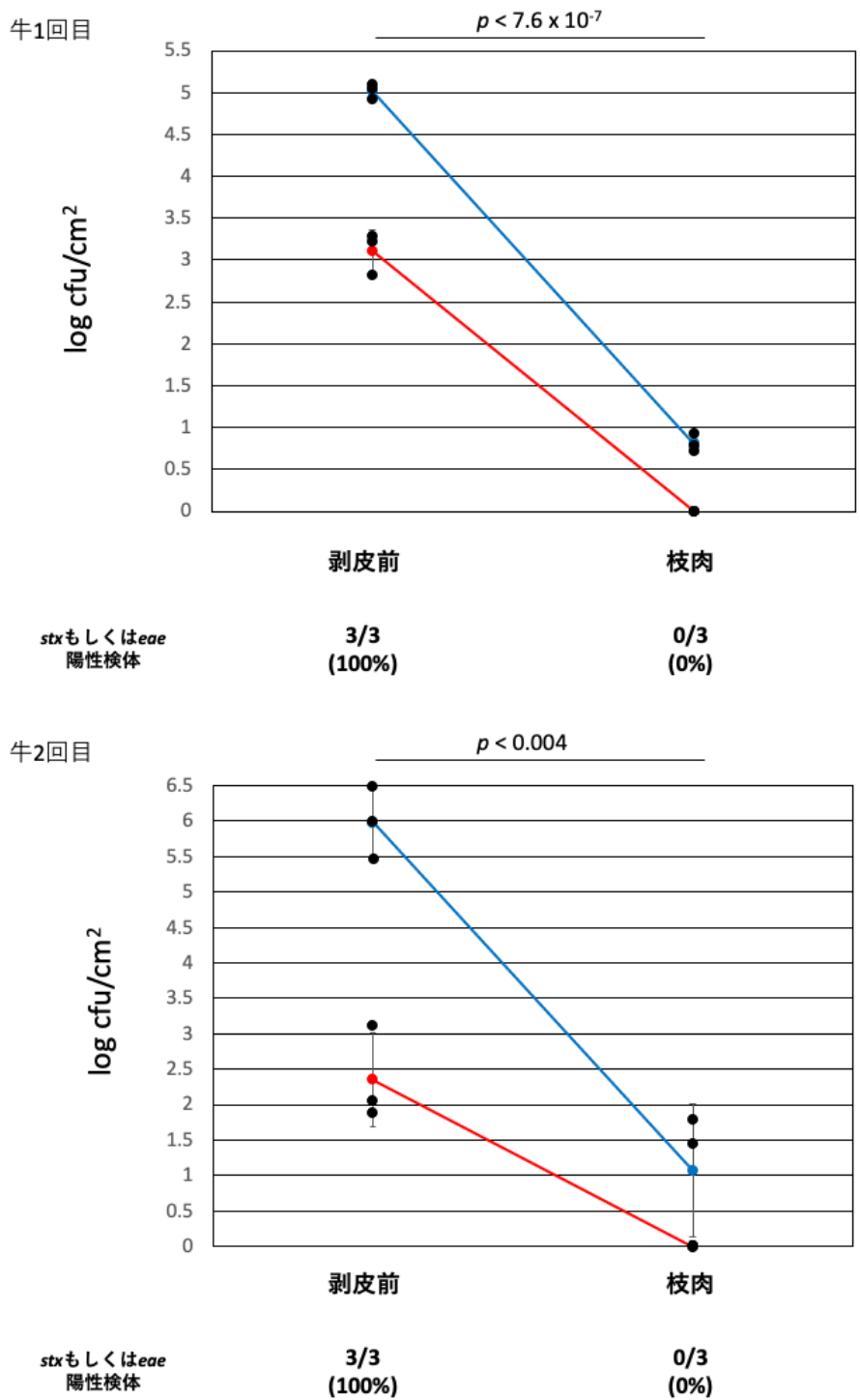


図 4 牛解体工程における衛生指標菌数と病原細菌関連遺伝子検出状況の推移。青字：一般細菌数、赤字：腸内細菌科菌群数。

表1 令和3年度外部検証切除検体重量の概要

施設	検体の種類	検体数	検体重量 (g)			95%信頼区間から 逸脱した検体数
			平均	標準偏差	95%信頼区間	
A	豚と体	25	9.97	2.04	9.19-10.75	0
	牛と体	25	10.80	1.15	10.36-11.25	0
B	豚と体	30	7.99	2.75	7.01-8.98	0
	牛と体	30	9.99	2.75	9.01-10.98	0
C	豚と体	30	7.77	2.83	6.76-8.78	0
	牛と体	30	10.10	3.25	8.94-11.27	0

表2 豚と体外部検証妥当性の検証

施設	検体の種類	検体数				一般細菌				腸内細菌科菌群				
		総数	<i>stx</i> もしくは <i>eae</i> 陽性検体 (%)		log cfu/cm <sup>2</sup>		総数	<i>stx</i> もしくは <i>eae</i> 陽性検体		log cfu/cm <sup>2</sup>		総数	<i>stx</i> もしくは <i>eae</i> 陽性検体	
			5 (20.0)	0 (0)	平均	平均+2SD		平均	平均+2SD	平均	平均+2SD		平均+2SD超過検体	平均+2SD超過検体
A	外皮拭き取り	25	5 (20.0)	2.40	3.72	0	0 (0)	0.17	0.76	1	1 (4.0)	0	0 (0)	
	枝肉	25	0 (0)	2.40	3.39	1	0 (0)	0.25	1.42	1	1 (4.0)	0	0 (0)	
B	外皮拭き取り	30	2 (6.7)	2.30	3.98	0	0 (0)	0.26	1.25	4	4 (13.3)	1	1 (3.3)	
	枝肉	30	0 (0)	1.88	3.12	1	0 (0)	0.67	1.10	4	4 (13.3)	0	0 (0)	
C	外皮拭き取り	30	3 (10.0)	2.57	3.64	0	0 (0)	0.21	0.93	3	3 (10.0)	1	1 (3.3)	
	枝肉	30	0 (0)	2.42	4.07	1	0 (0)	0.69	1.24	3	3 (10.0)	0	0 (0)	

\*SD：標準偏差

：令和3年度に報告したデータ

表3 牛と体外部検証妥当性の検証

施設	検体の種類	一般細菌				腸内細菌科菌群			
		検体数		log cfu/cm <sup>2</sup>		log cfu/cm <sup>2</sup>		平均+2SD超過検体	
		総数	stxもしくはeae陽性検体 (%)	平均	平均+2SD	平均	平均+2SD	総数	stxもしくはeae陽性検体
A	外皮拭き取り	25	22 (88.0)	4.95	6.18	2.28	3.43	1 (4.0)	1 (4.0)
	枝肉	25	0 (0)	2.30	3.24	0.46	1.56	0 (0)	0 (0)
B	外皮拭き取り	30	10 (33.3)	4.25	7.39	1.20	4.68	1 (3.3)	3 (10.0)
	枝肉	30	1 (3.3)	4.03	5.34	1.26	2.08	0 (0)	1 (3.3)
C	外皮拭き取り	30	16 (53.3)	4.84	6.88	1.74	3.95	0 (0)	1 (3.3)
	枝肉	30	2 (6.7)	3.03	4.76	0.91	1.92	1 (3.3)	2 (6.7)

\*SD：標準偏差

：令和3年度に報告したデータ