

HACCP 内部検証のための豚枝肉の微生物汚染評価方法の検討

豊橋市食肉衛生検査所 ○牧野 江梨子、安岡 知未、岡田 麻美子、森本 賢治、
松田 克也、葛岡 功弥子、河合 浩二、山内 俊平

1 はじめに

令和2年現在、と畜場 HACCP システムの生物的危害制御のための外部検証法について、厚労省は枝肉表面を切り取る採材方法（切除法）を検討しており^{1) 2)}、国際的にも EU 規則（EC2073/2005）において切除法が採用されている。本法では、採材部分表面すべての細菌を採取できるが、製品価値を低下させ、技術的に煩雑で時間を要する³⁾。そのため、と畜場管理者が実施する内部検証には、枝肉損傷が少なく簡便・迅速な拭き取り検査方法が望まれる。そこで今回、拭き取り法である綿球法（当と畜場で使用）およびスポンジ法（米国で採用）の2種類について精度を比較するとともに切除法との相関を確認し、切除法の代替法として内部検証に応用可能か検討した。

2 材料及び方法

(1) 拭き取り法（綿球法およびスポンジ法）の精度の比較

ア 材料

令和元年7月にと畜された繁殖豚13頭の冷却前の枝肉を採材に供した。

イ 採材

【綿球法】片側枝肉（左7枝、右6枝）の臀部表面 $10\times 10\text{cm}^2$ を、乾性滅菌綿球（A.C.F.コート綿球、ベニツル）で拭き取った。10mL 滅菌生理食塩水（以下、生食水）を加え、30秒間振とう攪拌したものを試料原液とした。

【スポンジ法】反対側枝肉（左6枝、右7枝）の臀部表面 $10\times 10\text{cm}^2$ を、10mL 生食水で湿潤化したスポンジ（Whirl-Pak Speci-Sponge Bags, Nasco）で拭き取った。90mL 生食水を加え、ストマッカーで2分間攪拌したものを試料原液とした。

【切除法】各方法で拭き取った同部分表面を、無菌的に厚さ5mm以下で切除した。100mL 生食水を加え、スポンジ法と同様に攪拌したものを試料原液とした。

ウ 測定

各試料原液を生食水で段階希釈し、ペトリフィルム™（3M）生菌測定用プレートを用いて35℃、48時間培養した後、一般生菌数（cfu/cm²）を測定した。

エ 算出

以下のとおりに用語および計算式を定義し、各拭き取り法でどの程度の菌量を採取できているかを比較した。なお、菌数の平均値の算出に際してはそれぞれの 95%信頼区間を算出し、区間外の値を外れ値とした。

拭き取り菌数：綿球法およびスポンジ法で得られたそれぞれの菌数

枝肉総菌数：それぞれの拭き取り菌数 + 同一部位の切除法での菌数

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{拭き取り菌数}}{\text{枝肉総菌数}} \times 100$$

(2) 拭き取り菌数と枝肉総菌数の相関

(1) で優れていると判断したスポンジ法での菌数について、枝肉総菌数との相関を調べた。

ア 材料

令和元年 8 月にと畜された肥育豚 30 頭の冷却前の枝肉を採材に供した。

イ 採材、測定および算出

(1) と同様にスポンジ法での菌数および枝肉総菌数を測定した。回収率を算出し、それぞれの菌数を常用対数に変換した後、二変量の相関を求めた。

3 成績

(1) 拭き取り法（綿球法およびスポンジ法）の精度の比較

菌数の平均値±標準偏差は、綿球法では $286.5 \pm 574.2 \text{ cfu/cm}^2$ （外れ値 1 検体、幾何平均値±幾何標準偏差 $99.4 \pm 4.1 \text{ cfu/cm}^2$ ）、スポンジ法では $950.5 \pm 1158.1 \text{ cfu/cm}^2$ （外れ値 1 検体、幾何平均値±幾何標準偏差 $504.4 \pm 3.2 \text{ cfu/cm}^2$ ）であった。回収率の平均値±標準偏差は、綿球法では $14 \pm 12\%$ （中央値 8%、最小値 3~最大値 48%）、スポンジ法では $32 \pm 6\%$ （中央値 32%、最小値 20~最大値 46%）であった（図 1）。以上の結果より、スポンジ法は、綿球法と比べて回収率が高く、バラツキが小さかったため、(2) の切除法との比較ではスポンジ法を用いた。

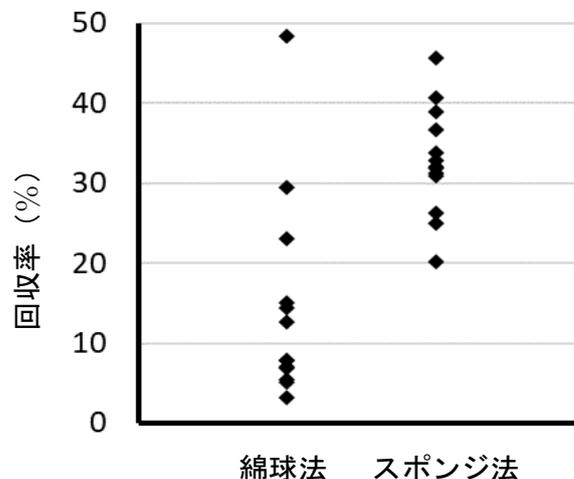


図 1 各拭き取り法の回収率

(2) 拭き取り菌数と枝肉総菌数の相関

スポンジ法の回収率の平均値±標準偏差は $54 \pm 12\%$ （中央値 55%、最小値 16～最大値 69%）であった。また、回帰直線 $y=0.89x+0.55$ （ x の範囲： $1 < x < 4$ ）、相関係数 $R^2=0.82$ で表せる良好な正の相関が得られた（図 2）。

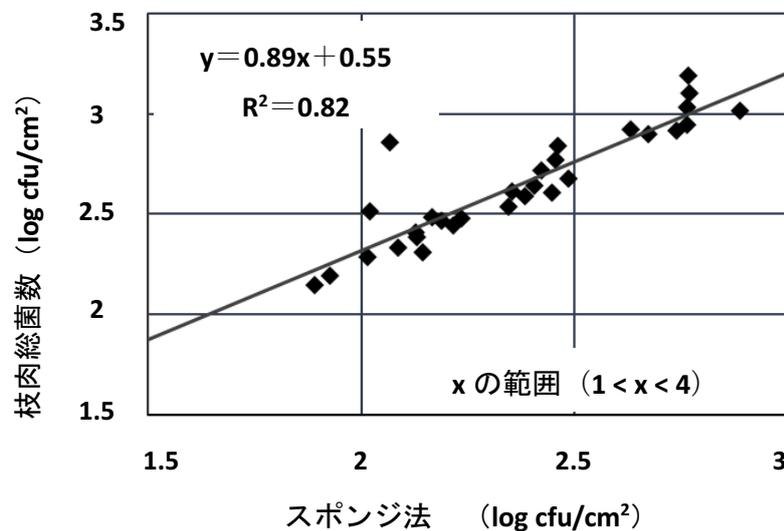


図 2 スポンジ法と枝肉総菌数の相関

4 考察

今回の検討の結果、綿球法の回収率は低く、大西らも拭き取り法（ガーゼタンポン）では 10%未満であったと報告している⁴⁾。一方、スポンジ法は高い回収率でバラツキが小さく、枝肉総菌数との良好な相関が得られたことから、スポンジ法は切除法の代替法として内部検証に応用可能であると考えられた。

製造工程に滅菌処理のない枝肉において、微生物汚染度の把握は重要である。枝肉の細菌検査は、と畜場管理者が実施すべき内部検証の一つであり、手順が容易かつ運用コスト（器材、時間など）を抑えた反復継続性のある検査方法が望まれる。諸外国での報告においても、スポンジ法などの拭き取り法は、切除法での菌数と相関し、迅速・簡便で枝肉に損傷を与えないことから、切除法の代替法として実用的な採材方法であると述べられている^{4) 5) 6)}。今後は、スポンジ法でのデータの蓄積および他の部位（胸部、頸部など）を用いた検証を行い、科学的根拠に基づいたより適切な検査方法を確立していきたい。

当と畜場では、牛および豚枝肉の冷蔵・保管工程を、病原微生物の増殖を生物学的危害要因とする重要管理点（CCP）としており、出庫時の枝肉温度の管理基準（CL）の設定にあたっては、体表 10℃および深部 7℃として冷却庫内温度の経時推移から枝肉温度を推計する統計モデル式を設計した^{7) 8)}。この管理方法で枝肉の生物学的危害を制御できているかを検証するには、冷却後（出庫時）の切除法による微生物汚染度調査が必要であるが、出庫の多忙な時間帯にと畜場管理者が実施するのは困難である。今後は、冷却前の枝肉の拭き取り法による菌数から冷却後の枝肉総菌数を推定可能であるか検討を加えていく予定である。

5 引用文献

- 1) 令和元年 8 月 30 日付厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課発事務連絡「と畜場及び大規模食鳥処理場における HACCP の外部検証の試行への協力依頼等について」
- 2) 令和元年 12 月 4 日付厚生労働省医薬・生活衛生局食品監視安全課発事務連絡「と畜場における HACCP の外部検証のための微生物学的試験方法（プロトコール）作成のための研究への協力依頼等について」
- 3) Rossvol, E. *Food Protection Trends*. 37. 419-429 (2017)
- 4) 大西利恵. 平成 16 年度全国食肉衛生検査所協議会中国・四国ブロック技術研修会
- 5) Millios, K. T. *Food Control*. 43. 74-81 (2014)
- 6) Gallina, S. *Food Control*. 50. 919-924 (2015)
- 7) 葛岡功弥子. 平成 28 年度食肉衛生技術研修会・衛生発表会
- 8) 葛岡功弥子. 平成 29 年度日本獣医師会獣医学術大会年次大会