

牛と畜処理工程別のリステリア属菌の汚染実態について

食肉衛生検査所 ○中江優貴、久永崇宏、筆谷麻未、國井菜那子
松橋平太、寺井克哉、大畑克彦
国立医薬品食品衛生研究所 朝倉宏

【はじめに】

自然環境や動物の腸管内に広く生息しているリステリア属菌¹⁾については、欧米ではと畜場での工程管理指標とされることも多いが、国内のと畜場における環境汚染調査等の報告は少なく、当所においても、これまでほとんど調査がなされていない。当所管内のと畜場は、HACCPに基づく衛生管理において、冷蔵庫の温度管理をCCPとしているが、リステリア属菌が低温細菌であることを踏まえると、当該菌の汚染状況把握は、今後の衛生管理指導においても貴重なデータになり得ると考えられた。

そこで今回、牛と畜処理工程中での環境試料を拭き取り、リステリア属菌の汚染実態並びに菌叢変動に関する知見を得たので報告する。

【試料及び方法】

1 試料

(1) 採取期間 令和4年6月～11月

(2) 採取試料 当所管内と畜場の牛処理工程中の外皮、施設等の環境 20 検体/月×6回、10月～11月は4検体(No. 21～24)を追加した、合計 128 検体をスポンジスワブ (3M Hydrated-Sponge with Neutralizing Buffer) を用いて拭き取り、試料とした(表1)。

表1 試料採取箇所

検体No.	工程	対象	採材タイミング	拭き取り部位	検体No.	工程	対象	採材タイミング	拭き取り部位				
1	前肢落とし～ 後肢落とし	外皮①	処理序盤の牛	胸腹部 約100cm ² x 2箇所 (1スポンジ)	14	背部・肩部皮剥ぎ ～内臓摘出	シンク	作業終了後 (最終洗浄前)	全面拭き取り (1スポンジ)				
2		床①	検体No1 処理時	床面 1m ²	15			背割り	背割り機刃部	作業終了後 (最終洗浄前)	刃両面		
3		外皮②	処理中盤の牛	胸腹部 約100cm ² x 2箇所 (1スポンジ)	16	背割り	排水溝①	作業終盤	排水溝壁 約100cm ²				
4		床②	検体No3 処理時	床面 1m ²	17	枝肉洗浄	排水溝②						
5		外皮③	処理終盤の牛	胸腹部 約100cm ² x 2箇所 (1スポンジ)	18	冷蔵保管	枝肉表面	前日までに処理され 冷蔵保管されている もの	胸腹部 約100cm ² x 2箇所 (1スポンジ)				
6		床③	検体No5 処理時	床面 1m ²	19								
7	前・友バラ 皮剥ぎ	処理室床①	作業中盤以降	床面 1m ² (破損箇所等)	20								
8		処理室床②	作業終了後(最終洗浄前)	床面 1m ² (破損箇所等)	21					枝肉冷蔵室 (最終室)床	枝肉表面(No.18-20) 採取時	床面 1m ² (破損箇所等)	
9	背割り	処理室床③	作業中盤以降	床面 1m ² (破損箇所等)	22					冷蔵保管	枝肉冷蔵室 (最終室)床	採取時	床面 1m ² (破損箇所等)
10	冷蔵保管	枝肉冷蔵室(前室)床	作業終盤	床面 1m ² (破損箇所等)	23								
11		枝肉冷蔵室(前室)壁		壁 1m ² (汚染が見られる箇所等)	24								
12		枝肉冷蔵室(最終室)床	床面 1m ² (破損箇所等)										
13		枝肉冷蔵室(最終室)壁	壁 1m ² (汚染が見られる箇所等)										

2 方法

(1) リステリア定性試験

試料に100mLのhalf-fraser brothを加え、2分間のストマッキング処理を行った後、37±1℃で24-30時間前培養した。リステリア・モノサイトゲネスの検出には、MDS2 *Listeria monocytogenes* (3M)を用いた。他菌種の検出にあたっては、上記培養液をクロモアガー・リステリアに塗抹し、37±1℃にて培養後、発育した集落のうち、ハローの有無に関係なく青色を呈した集落を無作為に鈎菌し、VITEK2 (ビオメリュー) を用いて生化学性状に基づく菌種同定を行った。

(2) リステリア定量試験

9～11月に採材した検体について、(1)の定性試験で調製した懸濁液を10倍階段希釈後、クロモアガー・リステリアに直接塗抹し、37±1℃にて培養した。発育した集落のうち、色調が青色を呈した集落数を推定リステリア属菌数として求めると共に、ハローを伴う青色集落の有無を確認した。

(3) 拭き取り検体の構成菌叢解析

9月に採材した検体より、DNAを抽出し、16SrRNA配列^{*1}をPCR増幅した後、次世代シーケンサー (Ion PGM) を用いて塩基配列を取得し、RPD Classifierを用いて階層毎に構成菌叢を解析した。

※1 菌種間の保存性の高い定常領域と、菌種毎に配列が異なる可変領域が交互に存在するため、増幅領域中に含まれる可変領域のDNA配列の差異に基づいて、菌叢を構成する細菌の種類と相対存在量を知ることができる²⁾。

【結果】

1 リステリア属菌の定性及び定量試験

リステリア属菌は9月に採材した外皮(No. 3)及び7～9月に採材した枝肉冷蔵最終室床(No. 12)から検出されたが、すべてリステリア・モノサイトゲネス以外の菌種であった。また、クロモアガー上で多数の青色集落を認めた外皮、枝肉冷蔵室等からはリステリア属菌以外の菌種も検出された。これを裏付けるように、9～11月に行った同属菌の定量試験では、外皮(No. 1, 3, 5)、前後肢落とし工程の床(No. 2, 4, 6)、シンク(No. 14)、排水溝(No. 17)から多くの菌数が検出された(表2)。6月に採材した検体からリステリア属菌の検出はなかった。

表2 リステリアの定性試験及び定量試験結果

採材月	検体 No.	定性試験		採材月	検体 No.	定性試験		採材月	検体 No.	定性試験		定量試験 推定リステリア属菌数/スワブ
		Listeria属菌	他の菌種			Listeria属菌	他の菌種			Listeria属菌	他の菌種	
7月	1	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8月	1	-	<i>Staphylococcus sciuri</i>	9月	1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	167000
	2	-	-		2	-	<i>Staphylococcus sciuri</i>		2	-	Unidentified	65000
	3	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>		3	-	<i>Staphylococcus sciuri</i>		3	<i>L. fleischmannii</i>	-	151000
	4	-	-		4	-	<i>Staphylococcus sciuri</i>		4	-	-	65000
	5	-	-		5	-	<i>Staphylococcus sciuri</i>		5	-	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	102000
	6	-	-		6	-	-		6	-	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	189000
	7	-	-		7	-	-		7	-	-	36000
	8	-	-		8	-	-		8	-	-	14000
	9	-	-		9	-	-		9	-	-	1000
	10	-	-		10	-	-		10	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	2000
	11	-	<i>Enterococcus faecalis</i>		11	-	-		11	-	-	0
	12	<i>L. welshimeri</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus, Str. agalactiae</i>		12	<i>L. ivanovii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>		12	<i>Listeria grayi</i>	-	16000
	13	-	<i>Enterococcus faecalis</i>		13	-	-		13	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	0
	14	-	-		14	-	-		14	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	92000
	15	-	-		15	-	-		15	-	-	2000
	16	-	-		16	-	-		16	-	-	3000
	17	-	-		17	-	-		17	-	-	40000
	18	-	-		18	-	-		18	-	-	0
	19	-	-		19	-	-		19	-	-	0
	20	-	<i>Enterococcus faecalis</i>		20	-	-		20	-	-	0

採材月	検体 No.	定性試験		定量試験 推定リステリア属菌数/スワブ	採材月	検体 No.	定性試験		定量試験 推定リステリア属菌数/スワブ
		Listeria属菌	他の菌種				Listeria属菌	他の菌種	
10月	1	-	<i>Globicatella sanguinis</i>	33000	11月	1	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	24000
	2	-	-	< 100		2	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	200
	3	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	58000		3	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	10000
	4	-	<i>Enterococcus faecalis</i>	5000		4	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	16500
	5	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	9000		5	-	-	200
	6	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	2000		6	-	-	300
	7	-	-	< 100		7	-	-	2100
	8	-	-	5000		8	-	-	< 100
	9	-	-	< 100		9	-	<i>Enterococcus gallinarum</i>	300
	10	-	-	< 100		10	-	-	< 100
	11	-	-	< 100		11	-	<i>Gardnerella vaginalis</i>	200
	12	-	-	< 100		12	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	300
	13	-	-	< 100		13	-	-	< 100
	14	-	-	22000		14	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	< 100
	15	-	-	< 100		15	-	<i>Erysipelothrix spp.</i>	300
	16	-	-	< 100		16	-	-	200
	17	-	Unidentified	890000		17	-	-	< 100
	18	-	-	< 100		18	-	-	< 100
	19	-	-	< 100		19	-	-	< 100
	20	-	-	< 100		20	-	-	< 100
	21	-	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	< 100		21	-	-	< 100
	22	-	-	4000		22	-	-	< 100
	23	-	-	< 100		23	-	-	< 100
	24	-	-	< 100		24	-	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides, Globicatella sanguinis</i>	200

外皮、冷蔵室

2 拭き取り検体の構成菌叢解析

細菌科階層での占有率^{※2}が20%を超えたものを表3に示した。外皮や解体処理周辺環境(No. 1～8)ではモラクセラ属菌が最も優勢であり、一部の外皮(No. 5)ではコリネバクテリウム属菌も優勢であった。枝肉洗浄下にある排水溝(No. 17)はキサントモナス属菌等、他検体と異なる構成が認められ、当検体からは腸内細菌科菌群も多く検出された。枝肉冷蔵室では壁(No. 11, 13)、枝肉表面(No. 18～20)においてバシラス属菌が最も優勢な状況にあった。

リステリア属菌は外皮(No. 3, 5)及び冷蔵室床(No. 12)から、各1リードのみが検出された。

※2 16SrRNA メタゲノム解析では、シーケンスリード数の極端な偏りを抑えるためサンプル間のDNA濃度を等しく揃える工程が含まれているため、得られるリード数の差は試料中の総細菌数の差を反映したものではなく、総リード数に対する各細菌グループのリード数(占有率)で表現される³⁾。

表3 菌叢解析結果

検体No.	菌科
1	Moraxellaceae
2	Moraxellaceae
3	Micrococcaceae
4	Moraxellaceae
5	Corynebacteriaceae
6	Moraxellaceae, Weekseleaceae
7	Moraxellaceae
8	Moraxellaceae
9	Moraxellaceae, Bacillaceae
10	Moraxellaceae
11	Bacillaceae
12	Moraxellaceae
13	Bacillaceae
14	Moraxellaceae
15	Bacillaceae
16	Bacillaceae
17	Xanthomonadaceae, Rhodobacteraceae
18	Bacillaceae
19	Bacillaceae
20	Bacillaceae

【考察】

先行研究では、と畜場でのリステリア属菌の主要な汚染源として牛外皮が指摘されている⁴⁾。今回の成績から、解体処理工程の環境試料からリステリア属菌は検出されず、枝肉洗浄までの工程で、体表に由来する生物的危害の多くを適切に管理できていると解された。9～11月に行った定量試験成績からも、処理工程が前肢落し(No. 1～6)から友バラ皮剥ぎ(No. 7, 8)そして背割り(No. 9)へと進むに従い、推定リステリア属菌数の減少が確認できた。当所では従前より作業後に施設設備環境を温水を用いて洗浄するよう指導しており、このことが解体処理工程の環境試料からリステリア属菌が検出されなかった背景となっている可能性も想定される。しかしながら、水が常にたまった状態であるシンク(No. 14)や排水溝(No. 17)では菌数が増えていたほか、冷蔵室床(No. 12)は枝肉搬出時に人が頻繁に通る場所であり、長靴等を介した交叉汚染のおそれも排除できないため、一般衛生管理を点検する必要性が考えられた。

菌叢解析を通じ、背割り機(No. 15)ではバシラス属菌が優位となっており、剥皮後の枝肉汚染につながっている可能性が示唆された。本属菌は広く自然環境中に存在していることから、背割り機への汚染経路の確認や洗浄方法も含め、今後、管理の在り方を検討すべきと考えられた。

枝肉のリステリア汚染要因としては、腸管破損による内容物の汚染、機材や人の手を介した2次汚染、洗浄水の跳ね上げによる汚染の可能性が示唆されている⁵⁾。当と畜場でも枝肉洗浄下の排水溝より腸内細菌科菌群が多く検出され、枝肉の更なる衛生確保に向けた課題を見出すことができた。

当所においては枝肉の細菌汚染低減に向けて、外部検証等で衛生管理指導に取り組んでいるが、と畜処理工程には加熱殺菌工程がないため、細菌汚染をゼロにすることは非常に難しいのが現状である。今回、リステリア症の原因となるリステリア・モノサイトゲネスは全検体より検出されなかったが、本調査結果をもとに、HACCPシステムの効果的運用のため、日々の指導・助言に努めていきたい。

<参考文献>

- 1) 内閣府食品安全委員会：平成21年度食品安全確保総合調査「食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書」
https://www.fsc.go.jp/sonota/hazard/H21_22.pdf
- 2) 高安伶奈ら：腸内細菌叢の解析法の進歩。モダンメディア。2020。66(5)：133。
- 3) 井上亮：腸内細菌叢解析のいろは。Jpn. J. Lactic Acid Bact. 2019。30(1)：27-31。
- 4) 高橋知子ら：と畜場搬入牛皮膚からの *Listeria monocytogenes* の分離。J. Vet. Med. Sci. 2007。69(10)：1077-1079。
- 5) 竹重都子ら：と畜場における枝肉の *Listeria monocytogenes* 汚染要因。日獣会誌。1995。48(2)：131-135。