

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

黒毛和種牛枝肉に付着する異物の細菌叢解析

分担研究者 森田幸雄 麻布大学・獣医学部 教授

研究協力者 塚本真由美、荻谷俊宏 1、山崎翔矢、小畑 麗、向島幸司、村瀬繁樹 2
(岐阜県飛騨食肉衛生検査所：現所属 1: 岐阜県恵那保健所、2: 岐阜県動物愛護センター)

岡谷友三 (麻布大学)

朝倉 宏 (国立医薬品食品衛生研究所)

研究要旨

令和3年度に実施した「ゼロトレランス検証の有用性を確認するため、食肉衛生検査所の枝肉検査工程及び枝肉検証時に確認された獣毛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(その他Aとその他B)の菌叢解析を実施した。消化管内容物は Firmicutes 門、獣毛・レールダスト・フットカッター汚れは Proteobacteria 門の比率が高く、糞便は Firmicutes 門と Proteobacteria 門が高い比率の菌叢であった。その他A検体は Bacteroidetes 門と Fusobacteria 門の構成割合が高いという特徴を有していた。その他B検体は Proteobacteria 門が多く、次いで Actinobacteria 門、Firmicutes 門が検出され、菌叢の構成は糞便や獣毛と類似していた。付着異物ごとに菌叢の違いが確認された。食肉衛生上、肉眼で異物を判定するが、肉眼で実施する異物同定のうち糞便による汚染か消化管内容物による汚染かの判断は正しいものと思われた。令和3年度の調査結果と同様に、糞便及び消化管内容物だけでなく獣毛が付着したと体表面はトリミングすることが必要であると思われた。

A. 研究目的

「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、令和3年度は、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の観察及びこれら異物について微生物検査を実施した。令和4年度は菌叢解析を実施し、総合的に考察し、論文として公表した。

B. 研究方法

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、ルールダスト 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：検体 A と検体 B) が付着した肉表面を 2×2 cm²採取し、25 ml の滅菌 PBS を加え、1 分間ホモジナイズ処理したものを試料原液とした。試料原液残液は、遠心分離した後、Maxwell RSC Blood DNA kit (Promega, Madison, WI, USA) を用いて total DNA を抽出し、16S rRNA V5-V6 領域を PCR 増幅させた。PCR 増幅産物は Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA) を用いて精製し、Ion Library Equalizer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で各試料由来増幅産物を等量混合した後、Ion CHEF/ Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンス反応を行った。得られた配列データは CLC Genomic Workbench ver. 21 (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて低クオリティリードやキメラ配列を除去し、DADA2 (<https://benjjneb.github.io/dada2>) を用いて 1 試料あたりの配列数を 60,000 配列に平衡化した後、Blastn 検索を通じて OTU (Operational Taxonomic Unit) 解析を行った。なお、取得配列データは DNA データバンク (DDBJ) に登録を行った (DRX322191-DRX322221)。

C. 研究結果

獣毛 5 検体、糞便 8 検体、消化管内容物 6 検体、ルールダスト 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 検体の菌叢解析の結果を図 1 及び図 2 に示す。構成割合で 1% 以上を示すものは *Proteobacteria* 門、*Firmicutes* 門、*Actinobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Fusobacteria* 門、*Thermi* 門、*Spirochaetes* 門、*Euryarchaeota* 門、*Fibrobacteres* 門であった。消化管内容物は *Firmicutes* 門、獣毛、ルールダスト、フットカッター汚れは *Proteobacteria* 門の比率が高く、糞便は *Firmicutes* 門と *Proteobacteria* 門の双方合わせて高い比率を示す菌叢であった。その他 A 検体は *Bacteroidetes* 門と *Fusobacteria* 門の構成割合が高いという特徴を有していた。その他 B 検体は *Proteobacteria* 門が多く、次いで *Actinobacteria* 門、*Firmicutes* 門が検出され、菌叢の構成は糞便や獣毛と類似していた。

D. 考察

飛騨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。

GI-1 施設の枝肉は EU の切除法による基準をクリアしており、衛生管理は良好に維持されていると考えられる。また、チルド製品検査においても良好な成績を示しており、4°C、真空包装条件において 160 日間保存した牛肉の官能試験及び微生物学的検査結果において可食と判断されている。肉眼で獣毛、糞便、消化管内容物検体、ルールダストは容易に判定できるが、フットカッター汚れ検体は肉眼では糞便のように見えること、さらに肉眼では由来不明検体が散見されることが判明した。

反芻動物の糞便の構成菌叢は、給餌されている飼料、飼育環境、動物種、個体によって異なっている。我が国の黒毛和種牛の糞便の菌叢解析結果は見つけることができなかったが、乳牛の糞便を構成する菌は *Firmicutes* 門が最も多く、次いで、分離不能の菌門、*Bacteroidetes* 門、*Proteobacteria* 門の順であった。また、黒毛和種牛の第一胃の液相と固相を構成する細菌叢解析が実施され、*Firmicutes* 門は液相、固相ともに構成比率が高いことが報告されている。今回の獣毛検体は *Proteobacteria* 門、消化管内容物は *Firmicutes* 門の構成比率が多く、糞便は両者の中間のような菌叢であった。消化管内容物は *Firmicutes* 門の構成比率が高いことは、第一胃内容を調査した報告と一致しており、我々の異物同定のうち糞便による汚染か消化管内容物による汚染かの判断は正しいものと思われた。ルールダスト及びフットカッター汚れ検体は *Proteobacteria* 門が多い傾向があった。付着する異物の種類ごとに菌叢も異なることが判明した。

その他 A 検体は「ルールダストと潤滑油が混ざったもの」と推定され、*Bacteroidetes* 門と *Fusobacteria* 門の構成割合が高いという独特な特徴を有していた。その他 B 検体は「背割り屑の中に繊維質の消化管内容物又は糞便が混じたもの」と推定され、*Proteobacteria* 門が多く、次い

で *Actinobacteria* 門, *Firmicutes* 門が検出され菌叢の構成は糞便や獣毛と類似していた。これらの検体も調査数が増えると菌叢が明確になると思われた。

と畜におけるゼロトレランスは多くの国で取り入れられている手法である。しかし、その微生物学的効果を客観的に評価した論文は少ない。オランダ政府が実施したゼロトレランスでは、きわめて大きな効果があり、目に見える汚染を除去した牛・子牛の枝肉からは EHEC 0157 は分離されなくなったと報告している。

GI-1 施設では、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。本調査により、枝肉に付着した異物ごとの細菌学的な汚染状況が把握できた。そして、ゼロトレランスが食肉衛生上、大変重要であることが科学的に証明できたと思われる。

E. 結論

ゼロトレランス検証に示されている糞便は *Firmicutes* 門と *Proteobacteria* 門の双方合わせて高い比率を示す菌叢、消化管内容物は *Firmicutes* 門の比率が多い菌叢であった。ゼロトレランス検証でしめされていない獣毛、レールダスト、フットカッター汚れは *Proteobacteria* 門の比率が高く、糞便は *Firmicutes* 門と *Proteobacteria* 門の双方合わせて高い比率を示す菌叢であった。肉眼で実施されているゼロトレランス検証においても、糞便、消化管内容物は的確に判断されていると思われた。また、ゼロトレランス検証を実施することは食肉衛生上、大変重要であることが確認された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

塚本真由美、荻谷俊宏、山崎翔矢、小畑 麗、向島幸司、村瀬繁樹、朝倉 宏、森田幸雄*。
2023年3月。黒毛和種牛枝肉表面に付着する異物の細菌学的汚染状況、日本獣医師会雑誌、76,e11-e17.

2. 学会発表等

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

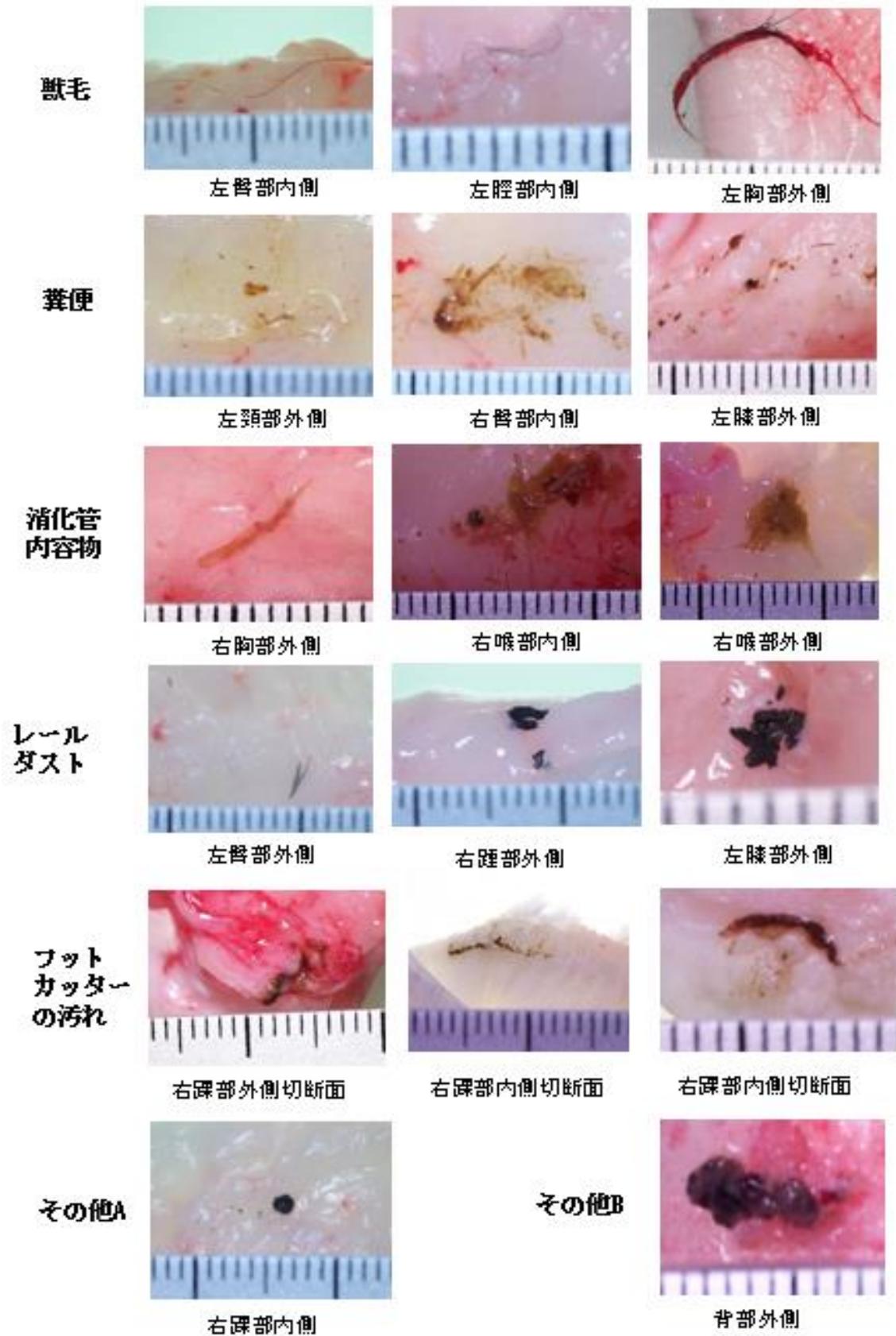


図1 異物の弱拡大

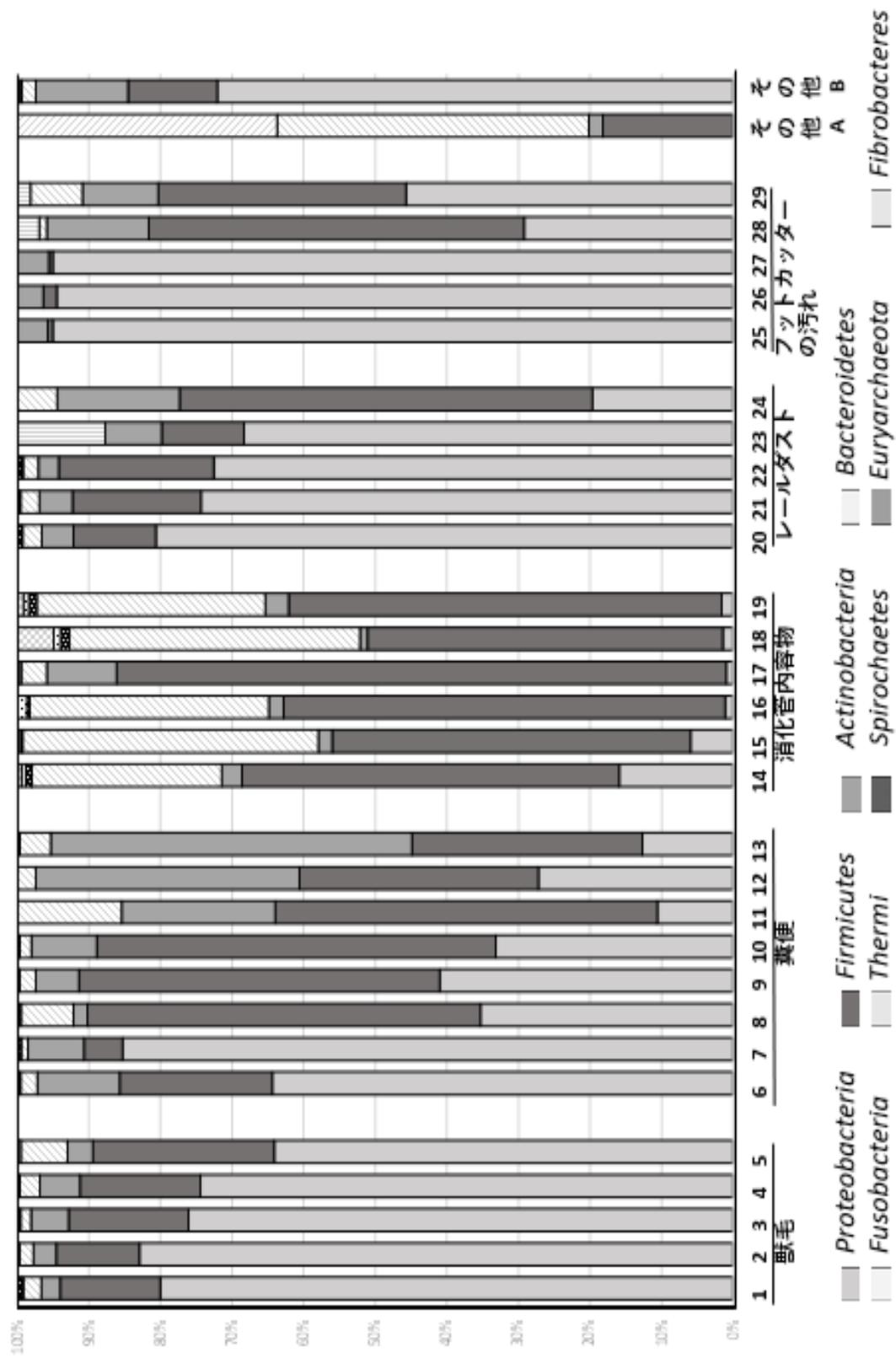


図2 各異物検体の細菌叢

