

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 検証手法の確立と

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

と畜場におけるリステリア属菌の汚染実態とリスク管理に関する研究

研究分担者	朝倉 宏	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
研究協力者	山本詩織	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	有田佳子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
	中江優貴	静岡県食肉衛生検査所
	久永崇宏	静岡県食肉衛生検査所
	大畑克彦	静岡県食肉衛生検査所

研究要旨：欧米ではと畜・食鳥処理工程並びに同加工工程における生物的危害要因としてリステリア・モノサイトゲネス（以下、LM）が認知されており、そのモニタリングも推奨されている。一方、国内のと畜場等における LM の汚染実態は十分に把握されていない。本分担研究では、あると畜場の協力を得て、令和4年6月から11月の期間、同施設環境における牛と畜処理工程を通じた LM 汚染状況を検討した。1月あたり20～24検体の施設環境ふき取り検体を採材し、LM 及びリステリア属菌を対象とした試験を行った結果、7月～9月の間に枝肉冷蔵室床より LM 以外のリステリア属菌が検出されたほか、9月には剥皮前の牛外皮からもリステリア属菌が検出され、外皮等が当該菌の施設内侵入経路となっている可能性が示唆された。これらの結果を事業者に逐次共有するとともに、枝肉冷蔵室の洗浄徹底等の指導がと畜検査員により段階的に行われた。また、9月から11月にかけては推定リステリア属菌数を調査したが、処理工程が進むにつれて、同指標菌数は減少傾向を示した。また、解体処理室内環境では上述の外皮を除き、リステリア属菌は検出されなかった。国内のと畜場の多くは、作業終了後に熱温水やスチーム等を用いてと畜解体工程施設環境を洗浄しており、この作業が LM の常在化に予防的に寄与していると想定される。一方で、枝肉冷蔵以降の工程では低温増殖性を示す当該菌の増殖可能性を完全には排除できないことから、それ以降の加工を含む工程を中心として、今後更なる情報の蓄積と対策の創出を図る必要があると考えられる。

A. 研究目的

と畜場及び大規模食鳥処理場においては、HACCPに基づく衛生管理が必要とされ、自治体のと畜検査員、食鳥検査員が行う検証（外部検証）として、現場検査、微生物検査及び記録の確認等が技術的助言として厚生労働省より発出されている。このうち、

微生物試験については、最終洗浄後から冷蔵までの間にある枝肉表面を切除し、衛生指標菌（生菌数及び腸内細菌科菌群数）の検出試験を行うこととなっている。

このほか、関連事業者団体が作成したと畜場における HACCP に基づく衛生管理の

ための手引書では、枝肉の冷蔵庫内温度の管理を重要管理点（CCP）として例示されている。冷蔵庫内温度の管理不備は微生物の増殖を招くおそれがあるためであるが、特にリステリア・モノサイトゲネス（以下、LM）等の低温菌の増殖を招きうるリスクが、欧米では従前より懸念されており、と畜場での工程管理指標として施設環境での生残をモニタリングすることも多い状況にある。しかしながら、国内のと畜場施設環境等における当該菌の汚染実態等に関する知見は乏しい状況であった。

以上の背景を踏まえ、本分担研究では、牛と畜処理工程中での施設環境試料を拭き取り、LM及びリステリア属菌の汚染実態並びに菌叢変動に関する検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 検体

令和4年6月～9月の間、と畜場の牛処理工程中の外皮、施設等の環境 20 検体を月あたり 20 検体、同年 10 月～11 月の間には、4 検体(No.21～24)を追加し、月あたり 24 検体を採材した（計 128 検体）。採材にあたっては、スポンジスワブ（ネオジェン）を用いて拭き取り、試料とした(表 1)。

2. リステリア定性試験

採材スポンジスワブ試料に 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、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 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、ISO 法との妥当性確認がなされ、我が国でも検疫所で活用されている MDS2 *Listeria monocytogenes* (ネオ

ジェン)を用いた。また、上記培養液をクロモアガー・リステリアに塗抹し、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 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代表集落を無作為に釣菌し、VITEK2（バイオメリュー）を用いて生化学性状に基づく菌種同定を行った。

3. リステリア定量試験

9～11 月に採材した検体については、上項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、 $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 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、ハローを伴うものについては VITEK2 システム（バイオメリュー）を用いて、LM であるかを確認した。

4. 菌叢解析

令和 4 年 9 月に採材した検体より、DNA を抽出し、16SrRNA 部分配列を PCR により増幅させた後、次世代シーケンサー（Ion PGM）を用いて塩基配列データを取得し、RPD Classifier を用いて階層毎に構成菌叢を解析した。

C. 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認められなかった。

2. 菌叢解析

細菌科(family)階層での占有率が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)ではモラクセラ科が最も優勢であり、一部の外皮(No.5)ではコリネバクテリウム科も優勢であった。枝肉洗浄下にある排水溝(No.17)はキサントモナス科等、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)においてバシラス科が最も優勢な状況にあった。

リステリア科は外皮(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。

D. 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。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、処理工程が前肢落とし(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。当該と畜場では従前より作業後に施設設備環境を熱温水を用いて洗浄するよう、管轄する食肉衛生検査所のと畜検査員による指導がなされており、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が想定される。こうした熱温水を用いた作業後洗浄は、他のと畜場においても、食肉衛生検査所への電話インタビューを通じ、同様の対応がとられている場合が複数確認されたことから、牛解体処理工程における施設環境でLMの常在化が生じる可能性は総じて低い状況にあると思われる。一方で、水が常にたまった状態であるシンク(No.14)や排水溝(No.17)では推定リステリア属菌数が増加を示した場合も見受けられたほか、枝肉冷蔵室床

(No.12)は、枝肉搬出時に作業者が頻繁に往来する場所であり、長靴等を介した交叉汚染のおそれも排除できないため、今後、これらの内容に係る一般衛生管理状況を改めて再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)ではバシラス科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も示唆された。当該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、管理の在り方を今後検討すべき事項と考えられた。

牛枝肉における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これまでに示唆されている。当該と畜場でも枝肉洗浄下の排水溝からは腸内細菌科菌群由来遺伝子が相対的に多く検出されており、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。

なお、当該と畜場を管轄する食肉衛生検査所では、枝肉の更なる細菌汚染低減に向けて、これまでも外部検証等を通じて、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、細菌汚染のゼロトレランスを成立させることは現実的ではない。今回、ヒト・リステリア症の原因となる LM 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 システムの更なる効果的・効率的な運用に向けて、衛生指導や助言を進めていくことが食肉の更なる安全性確保に向けての重要な課題と思われる。

E. 結論

本分担研究では、牛と畜工程におけるリステリアの常在化のリスクを探知することを主な目的として、令和 4 年 6 月から 11 月の間、と畜場内の施設環境におけるリステリア属菌及び LM の汚染状況を調査研究した。結果として、LM は検出されず、リステリア属菌が牛外皮及び牛枝肉冷蔵室内で見いだされた。これらの結果より、外皮等を通じ施設への LM の持ち込みの可能性が示唆されるとともに、特に枝肉冷蔵工程では洗浄消毒の励行を行うことがリスク管理策として重要と考えられた。なお、牛解体処理を行う施設環境では作業終了後に熱温水を用いた洗浄が毎回行われており、このことが同属菌の常在化の予防策となっているものと推察された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 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、朝倉宏、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、令和 4 年度静岡県衛生発表会。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. と畜場内におけるふき取り箇所の概要

作業No.	工程	対象	採材タイミング	拭き取り部位	作業No.	工程	対象	採材タイミング	拭き取り部位
1	前後落し 後投落し	外皮①	船庫停置の牛	船庫停置約100㎡×200㎡ (12ポイント)	14	骨部・屠部皮剥ぎ →内臓廃出	シンク	作業終了後 (最終洗浄前)	全室拭き取り (1スポンジ)
2		床①	検体No1 船庫時	床面積 1㎡					
3		外皮②	船庫中置の牛	船庫中置約100㎡×200㎡ (12ポイント)	15	骨削り	骨削り機方部	作業終了後 (最終洗浄前)	刃表面
4		床②	検体No2 船庫時	床面積 1㎡					
5		外皮③	船庫待置の牛	船庫待置約100㎡×200㎡ (12ポイント)	16	骨削り	排水溝①	作業終了後	排水溝壁 約100㎡
6		床③	検体No3 船庫時	床面積 1㎡	17	枝肉洗浄	排水溝②		
7	前・支バウ 皮剥ぎ	船庫室床①	作業中盤以降	床面積 1㎡ (破換箇所等)	18	冷蔵保管	枝肉表面	前日までに船庫され 冷蔵保管されている もの	物置部 約200㎡ x 2箇所 (1スポンジ)
8		船庫室床②	作業終了後(最終洗浄前)	床面積 1㎡ (破換箇所等)	19				
9		骨削り	船庫室床③	作業中盤以降	床面積 1㎡ (破換箇所等)				
10	冷蔵保管	枝肉冷蔵室(前室)床	作業終了後	床面積 1㎡ (破換箇所等)	21	枝肉冷蔵室 (最終室)床	枝肉表面(No.18~20) 採取時	採取時	床面積 1㎡ (破換箇所等)
11		枝肉冷蔵室(前室)壁	作業中盤	壁 1㎡ (検体が落ちる箇所等)	22				
12		枝肉冷蔵室(最終室)床	作業終了後	床面積 1㎡ (破換箇所等)	23				
13		枝肉冷蔵室(最終室)壁	作業中盤	壁 1㎡ (検体が落ちる箇所等)	24				

表2. リステリア検出試験成績概要

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 リアリスター アッセイ ソフト ウェア
		Listeria属属	他の菌種			Listeria属属	他の菌種			Listeria属属	他の菌種	
7月	1	-	Shigella flexneri	8月	1	-	Shigella flexneri	9月	1	-	Shigella flexneri	107000
	2	-	-		2	-	Shigella flexneri		2	-	Unde rif led	55000
	3	-	Shigella flexneri		3	-	Shigella flexneri		3	L. monocytogenes	-	103000
	4	-	-		4	-	Shigella flexneri		4	-	-	55000
	5	-	-		5	-	Shigella flexneri		5	-	Shigella flexneri	302000
	6	-	-		6	-	-		6	-	Shigella flexneri	283000
	7	-	-		7	-	-		7	-	-	30000
	8	-	-		8	-	-		8	-	-	14000
	9	-	-		9	-	-		9	-	-	1000
	10	-	-		10	-	-		10	-	Enterococcus faecalis	2000
	11	-	Enterococcus faecalis		11	-	-		11	-	-	0
	12	L. monocytogenes	Shigella flexneri Shigella flexneri		12	L. monocytogenes	Enterococcus faecalis		12	Listeria grayi	-	16000
	13	-	Enterococcus faecalis		13	-	-		13	-	Shigella flexneri	0
	14	-	-		14	-	-		14	-	Shigella flexneri	52000
	15	-	-		15	-	-		15	-	-	2000
	16	-	-		16	-	-		16	-	-	3000
	17	-	-		17	-	-		17	-	-	40000
	18	-	-		18	-	-		18	-	-	0
	19	-	-		19	-	-		19	-	-	0
	20	-	Enterococcus faecalis		20	-	-		20	-	-	0

採材月	検体 No.	定性試験		定量試験 CFU/g	採材月	検体 No.	定性試験		定量試験 CFU/g
		Listeria属属	他の菌種				Listeria属属	他の菌種	
10月	1	-	Gibberella fujikuroi	33000	11月	1	-	Enterococcus faecalis	24000
	2	-	-	< 100		2	-	Enterococcus faecalis	200
	3	-	Enterococcus faecalis	58000		3	-	Staphylococcus aureus	10000
	4	-	Enterococcus faecalis	5000		4	-	Staphylococcus aureus	15500
	5	-	Staphylococcus aureus	3000		5	-	-	200
	6	-	Staphylococcus aureus	2000		6	-	-	200
	7	-	-	< 100		7	-	-	2100
	8	-	-	5000		8	-	-	< 100
	9	-	-	< 100		9	-	Enterococcus gallinarum	200
	10	-	-	< 100		10	-	-	< 100
	11	-	-	< 100		11	-	Gardnerella vaginalis	200
	12	-	-	< 100		12	-	Enterococcus casseliflavus	200
	13	-	-	< 100		13	-	-	< 100
	14	-	-	22000		14	-	Staphylococcus agalactiae	< 100
	15	-	-	< 100		15	-	Erwinia sp.	200
	16	-	-	< 100		16	-	-	200
	17	-	Undulibacter	93000		17	-	-	< 100
	18	-	-	< 100		18	-	-	< 100
	19	-	-	< 100		19	-	-	< 100
	20	-	-	< 100		20	-	-	< 100
	21	-	Enterococcus casseliflavus	< 100		21	-	-	< 100
	22	-	-	4000		22	-	-	< 100
	23	-	-	< 100		23	-	-	< 100
	24	-	-	< 100		24	-	Leuconostoc pseudomicrobioides, Gibberella fujikuroi	200

表 3. 菌叢解析を通じた、各検体における優勢菌科について

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