

ATP検査法を用いた牛及び豚枝肉表面の一般生菌数の推定と評価基準の策定
(ATP検査法の枝肉の衛生管理モニタリングへの応用)

食肉衛生検査所 ○安達俊輔、来待幹夫

1 目的

と畜場における衛生管理状況を把握するため、従来から枝肉の拭き取り検査を実施し、一般生菌数を測定している。一般生菌数の測定は結果の判明に48時間の培養時間を要することから、リアルタイムな状況把握には不向きである。と畜場にHACCPによる衛生管理が義務化となることから、高度な衛生管理やと畜処理技術が求められる。と畜場では加熱工程がないことから、一般的衛生管理と衛生的標準作業手順書(以下、SSOPという。)の遵守が重要となる。と畜処理当日の衛生管理の状況をその日のうちに確認できる方法として、ATP検査法による枝肉表面の一般生菌数の推定と同検査法の枝肉の衛生管理モニタリングへの応用を検討したので、報告する。

2 方法

(1) ATP値(RLU)と一般生菌数(cfu/cm²)による検量線及び評価基準の策定

①牛及び豚枝肉表面の一般生菌数検査

牛枝肉は、背割り前の胸部100cm²を拭き取り、原液、×10、×100及び×1000希釈し、それぞれの試験溶液から1ml採り、ACプレート(3M(株)製一般生菌数用ペトリフィルム)に接種した後、36℃、48時間培養し測定した。

豚枝肉は、剥皮前の胸部100cm²を拭き取り、同様に測定した。

いずれも、なるべく血液がない部分を拭き取った。

②牛及び豚枝肉表面のATP値(RLU)の測定

ルシフェールHSセット(キッコーマンバイオケミファ(株)製ATP検査キット)を用いて、一般生菌数検査に用いた試験溶液のATP値(RLU)を、ルミテスターC-110で測定した。

併せて、ルシパックA3Water(キッコーマンバイオケミファ(株)製ATP検査キット)を用いて、同試験溶液のATP値(RLU)をルミテスターPD-30(各保健所に配備済)で測定した。

③ATP値(RLU)と一般生菌数(cfu/cm²)との相関の検証

上記①及び②の検査結果から、Windows Excel2016を用いて相関関係を検証し、一般生菌数推定用の検量線及び評価基準を策定した。

評価基準は、EU基準を参考とした。

(2)仕上げ後の牛及び豚枝肉表面のATP値(RLU)による一般生菌数の推定と実測値との比較

(1)で策定した検量線から枝肉表面のATP値(RLU)による一般生菌数の推定を行うとともに、培養法による一般生菌数の測定を実施した。

3 結果

(1)ルミテスターC-110によるATP値(RLU)と一般生菌数(cfu/cm²)の関係

①牛枝肉背割り前胸部(100cm²)のルミテスターC-110によるATP値測定と一般生菌数

牛枝肉	実験日1			実験日2			実験日3			実験日4		
	(×10) /cm ²	(×100) /0.1cm ²	(×1000) /0.01cm ²	(×10) /cm ²	(×100) /0.1cm ²	(×1000) /0.01cm ²	(×10) /cm ²	(×100) /0.1cm ²	(×1000) /0.01cm ²	(×10) /cm ²	(×100) /0.1cm ²	(×1000) /0.01cm ²
No.1 ATP値	5,923	500	50	63,535	5,763	617	41,232	3,546	410	68,147	5,865	654
No.1 生菌数	690	69	7	7,300	730	73	480	48	5	880	88	9
No.2 ATP値	109,956	9,804	1,097	63,552	6,127	758	52,838	4,582	679	23,237	2,164	271
No.2 生菌数	890	89	9	OD			209	21	2	16,400	1,640	164
No.3 ATP値	35,923	2,743	286	50,349	4,301	414	30,784	3,329	272	106,093	9,510	962
No.3 生菌数	1,010	101	10	2,000	200	20	480	48	5	OD		
No.4 ATP値				191,097	17,340	1,640	3,924	296	35	60,017	5,517	642
No.4 生菌数				14,900	1,490	149	117	12	1	800	80	8
No.5 ATP値				130,271	10,810	1,140	5,272	386	52	21,003	1,969	207
No.5 生菌数				13,600	1,360	136	200	20	2	2,600	260	26

(): 希釈倍数、生菌数: ペトリフィルム(ACプレート)有効数字(25~250個)の収まった実測値に基づく推定値

上の表のとおり、ATP値は生菌数が多いと高く、少ないと低くなる傾向があったが、そうでない場合もあった。

②①の結果に基づくATP値測定と一般生菌数の相関関係

図1は牛の実験日1~4の結果を統合して作成した相関関係で、バラツキはあるものの相関係数(r)が「0.6788」となり、「正の相関あり」となった。

実験日1~4について、各実験系の相関関係を作成すると、表1のとおりとなった。

「高い正の相関」を示す実験系がある一方で、「ほとんど相関なし」となる場合があった。

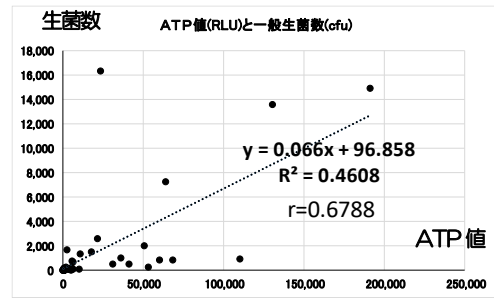


図1 牛実験日1~4の結果を統合した相関関係

表1 実験日ごとの相関関係(牛枝肉)

実験日1	$y=0.083x+166.83$	$r=0.7154$	高い正の相関あり	実験日3	$y=0.0077x+34.341$	$r=0.7937$	高い正の相関あり
実験日2	$y=0.0857x+88.095$	$r=0.9731$	高い正の相関あり	実験日4	$y=0.0293x+1447.4$	$r=0.1517$	ほとんど相関なし

③豚枝肉剥皮前胸部(100cm²)のルミテスターC-110によるATP値測定と一般生菌数

豚枝肉	実験日1			実験日2			実験日3			実験日4		
	(×1) /10cm ²	(×10) /cm ²	(×100) /0.1cm ²	(×10) /cm ²	(×100) /0.1cm ²	(×1000) /0.01cm ²	(×10) /10cm ²	(×100) /cm ²	(×1000) /0.1cm ²	(×10) /10cm ²	(×100) /cm ²	(×1000) /0.1cm ²
No.1 ATP値	>999,999	254,050	25,446	12,644	1,031	42	170,841	6,165	188	479,346	44,942	2,341
No.1 生菌数	1,940	194	20	44	4	ND	OD			84	8	ND
No.2 ATP値	>999,999	466,188	44,512	211,905	15,232	376	154,850	3,149	310	206,592	17,704	1,815
No.2 生菌数	2,320	232	23	OD			156	16	ND	測定不能		
No.3 ATP値	784,207	162,867	15,590	76,366	3,295	204	86,754	5,758	264	65,030	5,600	411
No.3 生菌数	2,620	262	26	OD			59	6	ND	26	3	ND
No.4 ATP値				319,755	17,453	947	167,048	6,757	96	134,905	12,222	2,707
No.4 生菌数				128	13	1	271	27	3	24	2	ND
No.5 ATP値				54,081	2,538	141	120,721	4,467	143	297,311	30,046	2,507
No.5 生菌数				69	7	ND	OD			OD		

(): 希釈倍数、生菌数: ペトリフィルム(ACプレート)有効数字(25~250個)の収まった実測値に基づく推定値

豚については、剥皮前の枝肉表面の生菌数が少なく、必要なデータが十分に得られなかった。なお、ATP値測定と生菌数の関係は牛の場合と同じであった。

④③の結果に基づくATP値測定と一般生菌数の相関関係

図2は豚の実験日1~4の結果を統合して作成した相関関係で、生菌数が全体的に少ないものの相関係数(r)が「0.7680」となり、「高い正の相関あり」となった。

各実験系の相関関係は、表2のとおりとなった。

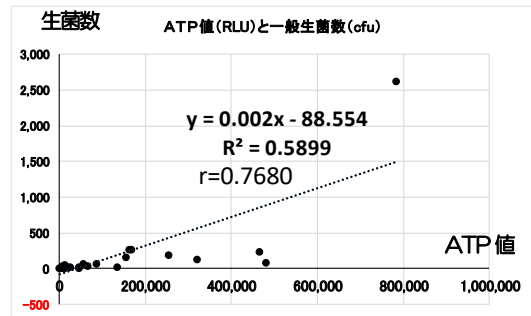


図2 豚実験日1~4の結果を統合した相関関係

豚については、いずれの実験系でも「高い正の相関あり」となった。

表2 実験ごとの相関関係(豚枝肉)

実験日1	$y=0.0029x-242.63$	$r=0.8701$	高い正の相関あり	実験日3	$y=0.0012x+1.09491$	$r=0.9301$	高い正の相関あり
実験日2	$y=0.0004x+16.641$	$r=0.9110$	高い正の相関あり	実験日4	$y=0.0002x+3.6524$	$r=0.9829$	高い正の相関あり

(2) ルミテスターPD-30によるATP値 (RLU) と一般生菌数 (cfu/cm²) の関係

牛及び豚枝肉の拭き取り検査において、ルミテスターC-110 を用いた実験からATP値と一般生菌数にある程度の相関を確認できたので、汎用性の高いルミテスターPD-30 への応用が可能な検討した。

①牛枝肉背割り前胸部 (100cm²) のルミテスターC-110 及びルミテスターPD-30 によるATP値測定と一般生菌数

牛枝肉	実験日1			実験日2			実験日3		
	(×10) /cm ²	(×100) /0.1cm ²	(×1000) /0.01cm ²	(×10) /cm ²	(×100) /0.1cm ²	(×1000) /0.01cm ²	(×10) /cm ²	(×100) /0.1cm ²	(×1000) /0.01cm ²
No.1 C-110:ATP値	3,879	426	160	20,406	1,704	188	80,771	7,719	838
No.1 PD-30:ATP値	94	16	7	89	9	4	621	67	5
No.1 生菌数	4,100	410	41	560	56	6	367	37	4
No.2 C-110:ATP値	2,558	207	32	10,336	939	123	10,950	956	70
No.2 PD-30:ATP値	25	9	6	63	2	0	90	7	1
No.2 生菌数	217	22	2	12,900	1,290	129	139	14	1
No.3 C-110:ATP値	4,940	377	55	9,158	653	112	28,335	2,081	214
No.3 PD-30:ATP値	35	7	5	38	2	0	159	13	1
No.3 生菌数	33	3	ND	9,500	950	95	42	4	1
No.4 C-110:ATP値	26,449	2,493	250	3,453	299	71	59,494	5,035	588
No.4 PD-30:ATP値	370	43	7	9	0	0	359	51	6
No.4 生菌数	20,900	2,090	209	58	6	1	1,100	110	11
No.5 C-110:ATP値	24,976	2,214	232	13,165	1,146	142	39,981	3,863	383
No.5 PD-30:ATP値	246	27	4	64	6	0	291	25	3
No.5 生菌数	410	41	4	2,800	280	28	82	8	1

() : 希釈倍数、生菌数: ペトリフィルム (ACプレート) 有効数字 (25~250個) の取まった実測値に基づく推定値

ルミテスターPD-30 を用いてATP値を測定した場合、ルミテスターC-110 のATP値より数値が100分の1以下まで低くなるものの、ルミテスターC-110 と同様の結果が得られた。

②①の結果に基づくATP値測定と一般生菌数の相関関係

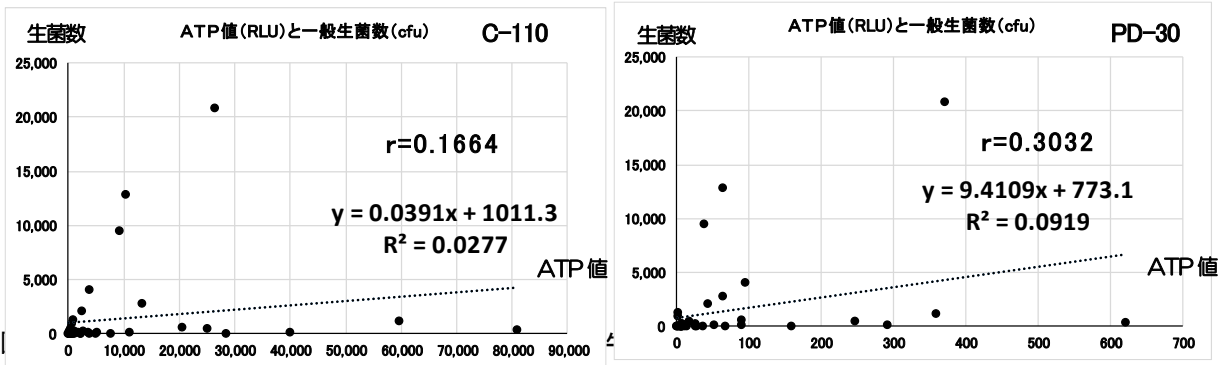


図3及び図4は、牛の実験日1~3の結果を統合して作成した相関関係で、「C-110」は「ほとんど相関なし」で、「PD-30」は「低い正の相関あり」となった。

なお、各実験系の相関関係は、表3のとおりで、いずれも「正の相関あり」となった。

表3 ルミテスターC-110 及びP-30 を用いた場合の相関関係

ルミテスターC-110の場合			ルミテスターPD-30の場合				
実験日1	y=0.4277x-79.616	r=0.6890	正の相関あり	実験日1	y=42.259x-670.17	r=0.8284	高い正の相関あり
実験日2	y=0.2817x+748.32	r=0.4499	正の相関あり	実験日2	y=63.1x+1035.3	r=0.4493	正の相関あり
実験日3	y=0.0081x-1.7088	r=0.7092	高い正の相関あり	実験日3	y=1.0193x+12.613	r=0.6390	正の相関あり

③豚枝肉剥皮前胸部 (100cm²) のルミテスターC-110 及びルミテスターPD-30 によるATP値測定と一般生菌数

牛の場合と同様の結果となった。

なお、豚の場合は、ATP値が大きくなり、C-110の測定限界値を超えることが幾度あった。

豚枝肉	実験日1			実験日2		
	(×1) /10cm ²	(×10) /cm ²	(×100) /0.1cm ²	(×1) /10cm ²	(×10) /cm ²	(×100) /0.1cm ²
No.1 C-110:ATP値	586,840	101,558	9,737	318,676	65,109	5,583
No.1 P-30:ATP値	2,816	510	44	2,836	301	38
No.1 生菌数	520	52	5	1,510	151	15
No.2 C-110:ATP値	759,709	135,221	13,679	499,810	92,019	7,916
No.2 P-30:ATP値	3,741	528	66	3,416	412	28
No.2 生菌数	129	13	1	6,400	640	64
No.3 C-110:ATP値	>999,999	188,601	19,472	>999,999	454,429	44,941
No.3 P-30:ATP値	6,729	1,022	100	14,105	2,035	168
No.3 生菌数	800	80	8	830	83	8
No.4 C-110:ATP値	>999,999	264,481	26,032	896,998	199,915	19,870
No.4 P-30:ATP値	8,975	1,193	160	7,041	762	59
No.4 生菌数	50	5	1	3,340	334	33
No.5 C-110:ATP値	570,858	96,196	9,161	709,061	139,749	14,011
No.5 P-30:ATP値	3,800	516	32	4,620	504	61
No.5 生菌数	95	10	1	2,940	294	29

(): 希釈倍数、生菌数: ペトリフィルム (ACプレート) 有効数字 (25~250個) の収まった実測値に基づく推定値

④③の結果に基づくATP値測定と一般生菌数の相関関係

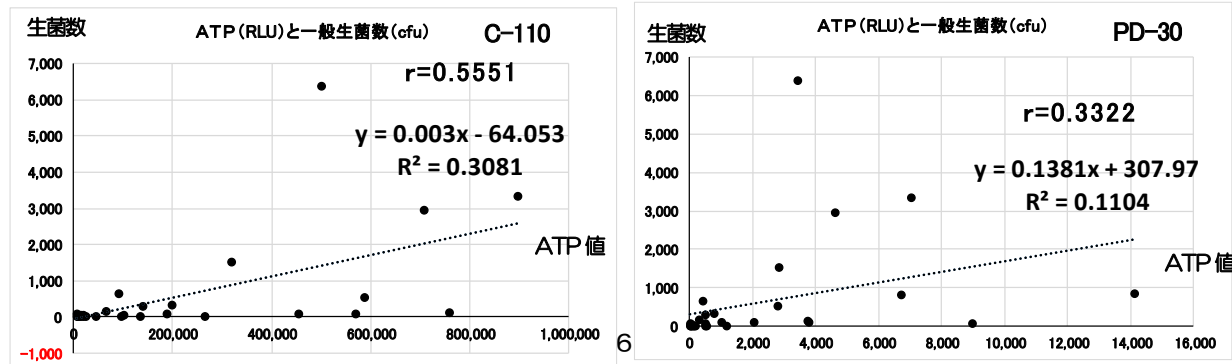


図5及び図6は、豚の実験系1~2の結果を統合して作成した相関関係で、「C-110」は「正の相関あり」、PD-30」は「低い正の相関あり」となった。

なお、各実験系の相関関係は、表4のとおりで、ルミテスターC-110の場合は「正の相関あり」となり、ルミテスターPD-30では「低い~正の相関あり」となった。

表4 ルミテスターC-110及びPD-30を用いた場合の相関関係

ルミテスターC-110の場合			ルミテスターPD-30の場合				
実験日1	y=0.0004x-5.7927	r=0.6514	正の相関あり	実験日1	y=0.0449x+27.42	r=0.5346	正の相関あり
実験日2	y=0.0047x-26.349	r=0.7184	高い正の相関あり	実験日2	y=0.1714x+695.75	r=0.3637	低い正の相関あり

(3) 評価基準の策定

(2)の実験で得られた近似曲線から牛枝肉及び豚枝肉の評価基準の策定を試みた。

評価基準は、「Official journal of European Union」に記載された牛及び豚枝肉の一般生菌数 (切除法) の基準、並びに甲子園大学・栄養学部教授の鎌田洋一らが実施した「切除法の検査結果の拭き取り法換算」を参考に、表5及び表6のとおり策定した。

表5 牛枝肉評価基準表

	優良レベル	許容レベル	不適合レベル
EU基準	3.5 log cfu/cm ²	3.5~5.0 log cfu/cm ²	5.0 log cfu/cm ²
換算値	3000 cfu/cm ²	3000~100000 cfu/cm ²	100000 cfu/cm ²
1/25値*	120cfu/cm ²	120~4000 cfu/cm ²	4000 cfu/cm ²

表6 豚枝肉評価基準表

	優良レベル	許容レベル	不適合レベル
EU基準	4.0 log cfu/cm ²	4.0~5.0 log cfu/cm ²	5.0 log cfu/cm ²
換算値	10000 cfu/cm ²	10000~100000 cfu/cm ²	100000 cfu/cm ²
1/64値*	156.25 cfu/cm ²	156.25~1562.5 cfu/cm ²	1562.5 cfu/cm ²

※甲子園大学・栄養学部教授 鎌田洋一ら：切除法の検査結果の拭き取り法換算
(牛枝肉：EU基準の換算値の1/25、豚枝肉：EU基準の換算値の1/64)

①牛枝肉の評価基準値

表5の牛枝肉評価基準表に基づき、最も相関係数の高かった実験系の一次式を用いて策定した。

表7 ルミテスターC-110用評価基準値

ルミテスターC-110「実験日3」				
y=0.0081x-1.7088 R ² =0.5029 r=0.7092				
	優良レベル	A社基準		EU不適合
cfu/cm ²	120	1000	2000	4000
RLU	15025.77	123667.75	247124.54	494038.12

表8 ルミテスターPD-30用評価基準値

ルミテスターPD-30「実験日1」				
y=42.259x-670.17 R ² =0.6862 r=0.8284				
	優良レベル	A社基準		EU不適合
cfu/cm ²	120	1000	2000	4000
RLU	18.69	39.52	63.18	110.51

表7及び表8においては、優良レベルと管内と畜場A社基準の間が「許容レベル」となる。

②豚枝肉の評価基準値

表6の豚枝肉評価基準表に基づき、最も相関係数の高かった実験系の一次式を用いて策定した。

表9 ルミテスターC-110用評価基準値

ルミテスターC-110「実験日2」			
y=0.0047x-26.349 R ² =0.5161 r=0.7184			
	優良レベル	A社基準	EU不適合
cfu/cm ²	156.25	1000	1562.5
RLU	38850.85	218372.12	338052.97

表10 ルミテスターPD-30用評価基準値

ルミテスターPD-30「実験日1」			
y=0.0449x+27.42 R ² =0.2858 r=0.5346			
	優良レベル	A社基準	EU不適合
cfu/cm ²	156.25	1000	1562.5
RLU	2869.26	21661.02	34188.86

表9及び表10においては、優良レベルとA社基準の間が「許容レベル」となる。

(3) ATP値 (RLU) による一般生菌数の推定と実測値との比較

Aと畜場の仕上げ洗浄後の牛及び豚枝肉について、ATP検査及び一般生菌数検査を実施した。

牛枝肉	ATP量 (RLU)	生菌数推定値 (cfu/cm ²)	評価	一般生菌数(実測値) (cfu/cm ²)	評価	牛枝肉	ATP量 (RLU)	生菌数推定値 (cfu/cm ²)	評価
C-110						PD-30			
No.1	3867.5	33.0	優良レベル	5	優良レベル	No.1	24.2	352.5	許容レベル
No.2	3161.8	27.3	優良レベル	24	優良レベル	No.2	15.5	-15.2	優良レベル
No.3	6344.2	53.1	優良レベル	43	優良レベル	No.3	42.7	1134.3	A社基準<
No.4	6510.5	54.4	優良レベル	28	優良レベル	No.4	42	1104.7	A社基準<
No.5	18223.4	149.3	許容レベル	74	優良レベル	No.5	115.2	4198.1	A社基準<
豚枝肉						豚枝肉			
C-110						PD-30			
No.1	39691	160.2	優良レベル	56	優良レベル	No.1	158	34.5	優良レベル
No.2	46739	193.3	許容レベル	81	優良レベル	No.2	199	36.4	優良レベル
No.3	60553	258.3	許容レベル	98	優良レベル	No.3	313	41.5	優良レベル
No.4	9588	18.7	優良レベル	14	優良レベル	No.4	65	30.3	優良レベル
No.5	32082	124.4	優良レベル	50	優良レベル	No.5	185	35.7	優良レベル

牛枝肉検査で、PD-30の結果では評価基準表の評価と実測値に乖離があった。

4 考察

ATP検査法は、食品工場の製造ラインの清浄度判定や洗浄方法の改善に用いられている。その原理は、生物細胞中のATPをルミノメトリック発光反応を利用して測定し、ATP値は純粋培養した細菌数とは強い正の相関を持つと言われる。しかし、細菌中のATPと生物由来の汚れや残渣の合計ATP量を測定するため、細菌検査の結果と完全には一致しないとも言われる。

今回、演者らは牛及び豚枝肉表面のATP検査 (RLU) と一般生菌数 (cfu/cm²) の相関関係の確認と評価基準値の策定を試み

た。

牛及び豚枝肉自体が有機物であること、血液、消化管内容物等が付着し、枝肉表面には細菌以外のATPが多く存在する。枝肉(10cm×10cm)は、血液等が付着していない部位を拭き取るように心掛けた。さらに、ATP検査用試薬に菌体外ATP消去薬が付属しており役立った。

一方、洗浄後の枝肉の一般生菌数が少なく、近似曲線の作成に不向きだったことから、牛は背割り前の枝肉胸部を、豚は剥皮直前の枝肉胸部を拭き取ることにした。

牛及び豚枝肉表面のATP値(RLU)と一般生菌数(cfu/cm²)の相関関係については、結果に示したとおり実験日ごとの結果は良好だが、まとめると相関関係が低くなった。実験日ごとにATP値や一般生菌数が変動することが影響していると考えられる。高い相関関係には実験数の増加が必要である。

次に、評価基準値の策定である。枝肉の一般生菌数の規制基準値がないことから、今回、EU基準で示されている牛並びに豚の枝肉表面の一般生菌数に関する基準を参考にした。なお、EU基準値は枝肉の切除法による数値であることから、甲子園大学・栄養学部教授の鎌田洋一らが実施した切除法の検査結果の拭き取り法換算値を引用することで、評価基準値を策定した。

ルミテスターC-110とルミテスターPD-30を比較したのは、C-110は「性能は高い」が「高額」なため入手し難い、PD-30(PD-20の新型機)は県下各保健所及びA社と畜場にも配備済みであることから、今回の手法を応用できると考えた。

なお、今回の試験法では、ATP値が高い場合でも実際の生菌数は低く、ATP値が低い場合でも生菌数が高い場合もあるが、実験の結果ATP値と一般生菌数との相関関係を確認したので、ATP値から細菌による汚染度合いを推定し、衛生管理が機能しているかのモニタリングに活用することは可能と考えている。

工程管理の試験法は、「コストが安く、迅速に結果が得られ、誰にでも実施できることが期待され、従来の試験法の結果との相関性が確認されている」ことが重要とされており、今回の取組はこのことを少なからず満たしていると考えられる。

5 ATP値評価基準値の活用方法

今回の実験は、「ATP検査法の枝肉の衛生管理モニタリングへの応用」を目的としている。

HACCP方式による衛生管理では、「システムが正しく動いているか」をモニタリングすることが重要である。その検証する方法として、コーデックス委員会がHACCPの微生物学的検証方法を示しており、「moving window (ムービング・ウィンドウ)」アプローチが世界的に一般化している。

演者らは、今回発表した「ATP値とその結果の評価基準値」と「moving window (ムービング・ウィンドウ)」アプローチを併せることで、簡易な枝肉の衛生管理モニタリングが可能になると考えている。