

表2、ブロイラーから分離されたカンピロバクターのナリジクス酸耐性

年度	耐性株数／分離株数 (%)	耐性／ <i>C. jejuni</i> (%)	耐性／ <i>C. coli</i> (%)
95	20／78 (25.6)	ND	ND
03	33／81 (41.0)	20／48 (41.7)	11／33 (33.3)
04	27／62 (43.5)	17／41 (43.5)	10／21 (47.6)
05	6／36 (16.7)	6／26 (23.1)	0／10 (0)

ND: データ無し

# 分 担 研 究 報 告 書

無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究

五十君 静信

## 無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究

分担研究者	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所・室長
研究協力者	牧野 壮一	国立大学法人帯広畜産大学・教授
	武士 甲一	国立大学法人帯広畜産大学・教授
	北川 雅彦	北海道立釧路水産試験所・主任研究員
	樋脇 弘	福岡市保健環境研究所・主任研究員
	宮本 敬久	九州大学大学院・教授
	仲真 晶子	東京都健康安全研究センター
	植田 富貴子	日本獣医生命科学大学・助教授
	本藤 良	日本獣医生命科学大学・教授
	小笠原 邦敏	横浜検疫検査センター
	庄司 紘史	久留米大学・教授
	岡田 由美子	国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官

### 研究要旨

本年度は、無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究は、以下研究を行った。

1. 塩たらこ製造におけるリステリアの危害分析
2. 辛子明太子およびその製造過程におけるリステリアの消長
3. 魚卵加工品の低温保存時におけるリステリアの挙動
4. 食肉と環境分離リステリア菌株の分子進化学的解析
5. リステリアの食品内での生残性・増殖性の考察とヒトへの感染リスク

わが国独特の魚介類加工無調理摂取食品におけるリステリアの菌としての挙動を中心に、我国におけるリステリアの危害分析に関する基礎的な知見を明らかにした。

### A. 研究目的

我国における食品媒介感染症としてのリステリア症の発生状況を把握し、そのヒトへの危害について科学的に分析を行い、リスクマネジメントに必要な科学的根拠を提供する。危害の想定される特定の非加熱喫食食品については、リスクアセスメントを試み、具体的なリス

クマネジメントの方法に関する情報を提供する。これにより、リステリアによるリスクが明かとなり、食品を介したヒトのリステリア症の発生を未然に防止できることが期待される。本年度は、魚介類加工無調理摂取食品を主な対象とした。

## B. 研究方法

### 1. 塩たらこ製造におけるリステリアの危害分析

原材料、製造工程、製造環境におけるリステリアの汚染状況を明らかにし、漬け込み工程については菌の接種試験を試み、リステリアの菌数の変動を明らかにした。1/20 スケールの模擬漬け込み工程を考案し、本菌の消長を観察した。

### 2. 辛子明太子およびその製造過程におけるリステリアの消長

調味液およびバラコ試料にリステリアを接種し、菌数の変動を明らかにした。製造工程における菌の消長を制御する因子を明らかにするため、調味液の組成および温度管理について検討した。

### 3. 魚卵加工品の低温保存時におけるリステリアの挙動

魚卵加工品はリステリアの汚染率が比較的高いことが知られており、食品を摂取する時点での菌数を予測するため、たらこ明太子について本菌を接種し、温度管理の違いによる菌数の挙動を調べた。環境抵抗性の異なる複数の菌株につき検討した。

### 4. 食肉と環境分離リステリア菌株の分子進化的解析

食品および環境から分離した 88 株のリステリア菌株につき、遺伝子レベルで検討を行った。染色体 DNA を抽出し、*iap* 領域を増幅し、制限酵素を用いてその切断パターンにつき比較解析した。

### 5. リステリアの食品内での生残性・増殖性の

## 考察とヒトへの感染リスク

食品及び環境由来株、臨床由来株を各約 100 株を用いて、環境ストレス抵抗性について調査し、比較検討した。

それぞれの研究方法については、各協力研究報告書を参照にしていきたい。

### (倫理面への配慮)

当研究においては、疫学情報を取り扱う可能性があるが、この場合は、“疫学研究に関する倫理指針”に従い実験内容や方法などについて国立医薬品食品衛生研究所の倫理審査委員会の審査を受け、個人情報保護について最大限の倫理的な配慮を行い研究する。リステリア研究の患者情報の取り扱いに関しては、国立医薬品食品衛生研究所の医学研究倫理委員会の審査を既に受けており、医学研究倫理規定に基づき管理を行った。本年度は、菌株の性質の検討が中心で、疫学情報を扱う研究は無かった。

## C. 研究結果

### 1. 塩たらこ製造におけるリステリアの危害分析

塩たらこ製造において、原材料から最終製品に至るすべての過程におけるリステリアの危害分析を行った。漬け込み工程で使用される運搬用パレットと樽移動用コンベアーから菌が検出され、これら使用器具・機材からの交叉汚染が製品への汚染に重要であることが示された。

### 2. 辛子明太子およびその製造過程におけるリステリアの消長

辛子明太子の製造過程における本菌の消長

の検討から、pH5.9かつAw0.95以下の調味液を使用して6℃の温度で辛子明太子を製造すれば、リステリアの生菌数は減少して行くことが示された。

### 3. 魚卵加工品の低温保存時におけるリステリアの挙動

わが国独特の ready-to-eat 食品である魚卵加工品は、海外ではリステリアの挙動に関する知見がない。今回の検討で辛子明太子では、4℃、10℃共に菌数の減少が、たらこでは、4℃において菌数の減少が観察され、これらの製品では温度管理をどの様に行うかが本菌の制御に重要であることが示された。

### 4. 食肉と環境分離リステリア菌株の分子進化学的解析

わが国におけるリステリア分離株が3つの分子進化学的系統からなることが明かとなり、この内C群は、最近、輸入食品を通じわが国に輸入された輸入株であることが示された。

### 5. リステリアの食品内での生残性・増殖性の考察とヒトへの感染リスク

高食塩濃度耐性能に関しては、食品・環境由来株と臨床由来株の間に差は見られなかったが、低温増殖能に関しては食品・環境由来株が抵抗性を示した。ヒト腸管上皮細胞由来のCaco-2細胞内での増殖性の強い株（強毒株）は細胞内増殖性の弱い株と比較して、食塩抵抗性が強い株の割合が高い傾向が認められた。それぞれの研究結果については、各協力研究報告書を参照にしていきたい。

## D. 考察

### 1. 塩たらこ製造におけるリステリアの危害分析

塩たらこ製造工程における交叉汚染は、使用器具・器材を介して中間製品あるいは最終製品が汚染を受ける可能性があるため、一般的衛生管理事項の再点検と、器具・器材の徹底した洗浄・殺菌を行い、定期的な細菌検査によって常に衛生状態を確認する必要がある。

### 2. 辛子明太子およびその製造過程におけるリステリアの消長

調味液の組成と温度管理により本菌の生菌数の減少が起こったのは、温度、pH、Awあるいは浸透圧などの複数の要因によって菌の増殖が抑制され、一部は分裂能が消失したためと思われる。

### 3. 魚卵加工品の低温保存時におけるリステリアの挙動

辛子明太子、たらこ共に4℃保存では菌数が減少したため、これらの製品における厳密な温度コントロールは重要である。たらこでは、10℃保存において当初菌数に変化が見られなかったが、3週間目には菌数が増加し、初発菌数より2オーダー菌数が増加した。温度コントロールに加えて賞味期限の設定は本菌の制御に重要である。

### 4. 食肉と環境分離リステリア菌株の分子進化学的解析

最近、輸入食品を介して、新たなるリステリアの菌群が輸入されつつあることは、本菌の疫学に重要な影響を与えうる問題と思われる。

### 5. リステリアの食品内での生残性・増殖性の考察とヒトへの感染リスク

食品分離株の中には、病原性と環境抵抗性が強く、ヒトへの感染リスクが高いと思われる菌株が存在していることが示されたため、今後その割合や特徴に関する知見を収集刷る必要があると思われる。

それぞれの研究結果に対する考察については、各協力研究報告書を参照にしていきたい。

#### E. 結論

無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究として、主に魚介類加工品を対象に検討し、それぞれにつき研究目標を設定していたが、いずれも十分な研究成果を上げることが出来た。個々の成果については、協力研究報告書を参考にしていきたい。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Ueda F, Anahara R, Yamada F, Mochizuki M, Ochiai Y, Hondo R. Discrimination of *Listeria monocytogenes* contaminated commercial Japanese meats. *Int J Food Microbiol.* 105:455-462. (2005)
2. Ueda F, Yugami K, Mochizuki M, Yamada F, Ogasawara K, Fujima A, Shoji H, Hondo R. Comparison of genomic structures in the serovar 1/2a *Listeria monocytogenes* isolated from meats and listeriosis patients in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 58:289-293. (2005)
3. Ueda F, Ogasawara K, Hondo R. Analysis of the molecular evolution of *Listeria monocytogenes* isolated from Japanese meats and environment. *Jpn J Infect Dis.* 58:320-322. (2005)
4. Yamada F, Ueda F, Ochiai Y, Mochizuki M, Shoji H, Ogawa-Goto K, Sata T, Ogasawara K, Fujima A, Hondo R. Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. *J Microbiol Methods.* 66:96-103. (2006)
5. Ueda F, Ogasawara K, Hondo R. Characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from imported meat in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 59:54-56. (2006)
6. Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S, Igimi S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int J Food Microbiol.* 104:189-196. (2005)
7. 牧野壮一, 武士甲一, 2005. 危機管理: パイオテロリズムへの対応, 細菌毒素. *臨床と微生物*, 32 :621-627.
8. 牧野壮一, 武士甲一, 2005. 食品微生物検査の簡易・迅速・自動化に関する最近の動向, *資源環境対策*, 41(12):74-79.
9. 仲真晶子 食品媒介リステリア症. *防菌防黴* 34 : 149-154 (2006)
10. 五十君静信、岡田由美子. 食品を介したリステリア症. *化学療法の領域*. 21巻No. 4 : 475-481. (2005)
11. 酒井史彦、青山顕司、篠澤映子、山縣尚、

- 丸山務、五十君静信、柳平修一。ナチュラルチーズからの*Listeria monocytogenes*検出における自動免疫蛍光測定装置の利用。日本食品微生物学会誌22：17-23。(2005)
12. 五十君静信。リステリア症の概況と対策。月刊フードケミカル21(5):32-37。(2005)
13. 五十君静信。リステリア菌の汚染実態と制御。食品工業。48(12):29-35。(2005)
14. 五十君静信。リステリアの食品汚染とリスク管理。食品衛生学雑誌。46:J237-239。(2005)
15. 五十君静信。国内外のリステリアによる食中毒の現状とその対策。チルド研究会情報。No. 54:23-27。(2005)
5. 高橋知子、松館宏樹、長谷川和弘、高橋雅輝、大窪富士子、瀬川俊夫、落合由嗣、植田富貴子、本藤良。と場に搬入された牛におけるリステリア菌の保有状況とL. m分離株のゲノム構造の特性。第140回日本獣医学会学術集会。(2005)
6. 小笠原邦敏、植田富貴子、望月眞理子、山田文也、青木英雄、木田中、中野恵、本藤良。*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎研究6, *Listeria monocytogenes*輸入株における分子進化学的解析。第140回日本獣医学会学術集会。(2005)
7. 五十君静信。国内外における食中毒の動向とその制御。微生物制御システム研究部会公開講演会“リステリア菌の汚染の動向と制御～欧米での最新情報から検査・制御まで～”。日本防菌防黴学会。(2005)

#### 口頭発表

1. 馬場愛、樋脇弘、宮本敬久、瓜生佳世、江淵寿美、武田昭：辛子明太子製造過程における*Listeria monocytogenes*の消長。第26回日本食品微生物学会学術総会。2005年11月。金沢
2. 仲真晶子。食品媒介リステリア症。日本防菌防黴学会第32回年次大会。平成17年5月。大阪。
3. 仲真晶子。食品の*Listeria*汚染実態。第26回日本食品微生物学会学術総会。平成17年11月。金沢。
4. 関本容子、清家一生、植田富貴子、山田文也、小笠原邦敏、望月眞理子、本藤良。*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎研究5, *Listeria monocytogenes*分離株の分子進化学的解析。第139回日本獣医学会学術集会。(2005)
8. 岡田由美子、牧野壮一、岡田信彦、朝倉宏、山本茂貴、五十君静信。*Listeria monocytogenes*の $\sigma$ 因子の食塩耐性における役割。日本細菌学会総会(2005)
9. 朝倉宏、川本恵子、度合雅久、五十君静信、塚本定三、山本茂貴、牧野壮一。モルヒネによる*Listeria monocytogenes*及び*Brucella abortus*感染に対する感受性変化についての検討。日本細菌学会総会(2005)
10. 五十君静信。食品媒介リステリア感染症の現状とその制御に向けて。第89回日本食品衛生学会学術講演会(2005)

11. Okada Y, Okada N, Makino SI, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S. SigmaL contributes the osmotolerance of *Listeria monocytogenes*. The XI International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. (2005) 文永堂出版株式会社。P201-203。(2006)
12. 岡田由美子, 朝倉宏, 岡田信彦, 牧野壮一, 山本茂貴, 五十君静信: *Listeria monocytogenes* rpoN欠失変異株の高食塩濃度下でのプロテオーム解析。第79回日本細菌学会総会 (2006) H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
13. 五十君静信。国内のリステリア症の現状とその制御に向けて。第26回日本食品微生物学会学術総会 (2005) 1. 特許取得
14. 五十君静信。国内のリステリア症の現状とその制御の方向性。食の安全を確保するための微生物検査協議会講演会 (2005) なし
15. 岡田由美子, 朝倉宏, 岡田信彦, 牧野壮一, 山本茂貴, 五十君静信。 *Listeria monocytogenes* rpoN欠失変異株の高食塩濃度下でのプロテオーム解析。第79回日本細菌学会総会。(2006) 2. 実用新案登録
3. その他
- なし

#### 書籍等

1. 五十君静信。食品媒介リステリア症の原因と発症の特徴。食中毒検査・診療のコツと落とし穴。中山書店。P. 28-29。(2006)
2. 五十君静信。リステリア症の診断法。食中毒検査・診療のコツと落とし穴。中山書店。P. 112。(2006)
3. 五十君静信。ヒトのリステリア症。獣医感染症カラーアトラス 第2版。見上彪監修。



厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
（協力研究報告書）

無調理摂取食品におけるリステリア食中毒の予防に関する研究  
塩タラコ製造における *Listeria monocytogenes* に対する危害分析

協力研究者 牧野壮一 国立大学法人帯広畜産大学・教授  
              武士甲一 国立大学法人帯広畜産大学・教授  
              北川雅彦 北海道立釧路水産試験場・主任研究員

## 研究要旨

塩タラコ製造において、原材料から最終製品に至るすべての過程でリステリア菌に対する危害分析を行った。また、1/20スケールの模擬漬け込み工程を考案し、中間製品にリステリア菌を接種して消長を観察した。

その結果、漬け込み工程で使用される運搬用パレット及び漬け込み樽移動用ローラーコンベアからリステリア菌が検出された。しかし、原材料、中間製品、最終製品から本菌は検出されず、また、模擬漬け込み工程において本菌の増殖は確認されなかった。運搬用パレットは、洗浄不足のため本菌を排除できなかったため、漬け込み樽底部が当該運搬用パレットを介して汚染を受け、さらに漬け込み樽がローラーコンベアを汚染したと考えられた。これらの交叉汚染により、使用器具・器材を介して中間製品あるいは最終製品が汚染を受ける可能性があるため、一般的衛生管理事項の再点検と徹底した洗浄・殺菌を行い、定期的な細菌検査によって常に衛生状態を確認する必要がある。

## A. 研究目的

塩タラコを介した *Listeria monocytogenes*（以下、リステリア菌）による食害の発生を未然に防ぐことを目的とし、当該食品製造施設においてリステリア菌に対する危害分析を行い、衛生管理の再構築と定期的な試験検査の実施について検討した。

## B. 研究方法

### 1. 調査期間及び調査施設

本調査は、平成17年12月から平成18年1月にかけて実施された。調査施設Aは北海道東部太平洋沿岸で創業し、塩タラコ製造以外の品目で対米輸出 HACCP の認定を取得している。

### 2. 調査試料

#### (1) 原材料

ロシア産冷凍卵より製造された漬け込み直前のスケトウダラ卵（解凍・洗浄・水切り実施済み）を原材料とした。

#### (2) 製造工程

塩たらこ製造工程において中間製品である「解凍・洗浄・水切り卵」、「漬け込み後の卵」、「洗浄・水切り・成形後の卵」、「チルド保管後の卵」及び「漬け込み液」ならびに「最終製品」について調査した。

#### (3) 製造環境

作業室の床、作業員手袋、台車、作業台、漬け込み機、漬け込み樽、運搬用パレット、洗浄水タンク等を環境試料とした。

#### (4) 漬け込み工程とリステリア菌接種試験

施設で実際に行われている漬け込み工程の1/20スケールの模擬工程を考案し、これにリステリア菌（スモークサーモン由来野外

株)を接種して消長を観察した。原料用タラコの胞膜を除去してバラコとし、2L ポリ容器にバラコ(1kg)及び調味液ならびに塩類を実際の1/20スケールに計算して入れ、よく混合・攪拌した後、リステリア菌を接種した。本試料を3本用意し、実際の工程で設定されている温度管理に準じて20℃で7時間恒温放置した後、各々をポリ容器にさらに3等分し、各々から試料を採取して直接塗培養法によりリステリア菌を測定した。次いで各試料3検体ずつを1群として各々4℃、10℃、20℃で保存し、20時間及び40時間後に試料を採取して直接塗培養法によりリステリア菌を測定した。なお模擬工程においてはリステリア菌のほかに、一般生菌数、大腸菌群、pH、水分活性(Aw)、食塩濃度についても測定した。

#### (5) 細菌検査および理化学試験

原材料、中間製品、最終製品についてはHalf Fraser Blothによる一次増菌及びFraser Blothによる二次増菌の後、PALCAM Listeria Selective Agar(オクソイド)及びCHROMagar Listeria(クロモアガー社)に培養し、リステリア菌の分離を試みた。解凍・洗浄・水切り卵、漬け込み後の卵、洗浄・水切り・成形後の卵、チルド保管後の卵、漬け込み液、最終製品については、蒸留水で10倍乳剤として理化学的試験を行った。pHはガラス電極法、塩分は硝酸銀水溶液を用いた滴定法、水分活性はコンウェイユニット法により測定した。環境の拭き取り試料については、滅菌ブースを用いて約10×10cmを拭き取り(ふきふきチェックII, 栄研器材株)、これを添付の緩衝液に浮遊させて均一な試料液とした後、この試験液を前述の2種類の寒天培地表面に各々0.25ml ずつコンラージ棒で塗抹し、37℃で48時間培養した。すべての試料はリステリア菌のほかに、標準寒天培地(日本製薬株)による一般生菌数を、また、クロモアガー-Coliform TAK1(クロモアガー社、推定試験)による混釈培養により大腸菌

群を推定した。

(倫理面への配慮)

当該施設名、従業員名、製品に関する情報を匿名とした。

### C. 研究結果

#### (1) 原材料、中間製品、最終製品

塩たらこの製造工程を図1に、中間製品、漬け込み液(漬け込み前、漬け込み終了後)、最終製品の微生物学的試験及び理化学的試験の結果を表1に示す。いずれの試料からも大腸菌群及びリステリア菌は検出されなかったが、A社製品の10検体中2検体から*L. innocua*及び*L. welshimeri*が検出された(表2)。一般生菌数については、解凍・洗浄・水切り後の卵から30cfu/gに検出され、漬け込み終了後には約 $10^2$ cfu/gまで増殖した。漬け込み後の洗浄・水切り及びその後のチルド保管までの工程においてこのレベルの菌数を維持したが、最終製品では70cfu/gであった。漬け込み液については、漬け込み前で35cfu/ml、漬け込み終了時には $10^3$ cfu/mlまで増加した。漬け込み前の卵のpHは6.08であったが、漬け込み終了後には6.17、最終製品では6.19で急激な変化は認められなかった。塩分濃度は漬け込み終了時に5.3%を示し、最終製品では5.6%であった。水分活性は漬け込み前の卵で0.991と高い値を示したが、漬け込み終了後及びチルド保管後の卵ではいずれも0.94まで減少し、最終製品は0.936であった。

#### (2) 製造環境の拭き取り試験

施設の拭き取り検査の結果を図2に示した。卵の解凍及び洗浄・水切り工程での一般生菌数は、作業終了後にスチーム洗浄を行った凍結卵解凍室床を除いて、作業エリア床-1(凍結卵の搬入作業)及び作業エリア床-2(解凍卵の洗浄・水切り作業)で各々 $10^6$ cfu/100cm<sup>2</sup>及び $10^4$ cfu/100cm<sup>2</sup>であった。また、洗浄卵の水切りに用いるステンレス製水切り台では $10^7$ cfu/100cm<sup>2</sup>と高い値を示

し、解凍卵洗浄に用いるステンレス製洗浄タンク壁面は  $10^3$  cfu/100cm<sup>2</sup> であった。大腸菌群は作業エリア床-1 及び作業エリア床-2 から各々  $10^2$  cfu/100cm<sup>2</sup>,  $10^3$  cfu/100cm<sup>2</sup> に検出された。この工程からリステリア菌は検出されなかった。

漬け込み工程では、ステンレス製漬け込み液タンク壁面、漬け込み樽内側、漬け込み樽蓋のパッキン部分から一般生菌数及び大腸菌群は検出されず、清潔な状態であった。この工程における作業エリア床-3 の一般生菌数及び大腸菌群は、各々  $10^5$  cfu/100cm<sup>2</sup>,  $10^3$  cfu/100cm<sup>2</sup> で、前工程における細菌数とほぼ同レベルであった。一方、漬け込み樽を運搬するための運搬用パレット-1、フォークリフトのタイヤ、漬け込み樽を漬け込み機室へ移動させるためのローラーコンベア、漬け込み機室床では一般生菌数は  $10^6 \sim 10^7$  cfu/100cm<sup>2</sup> と高い値となった。大腸菌群は  $10^2$  から  $10^4$  cfu/100cm<sup>2</sup> に検出され、漬け込み機室床では大腸菌が検出された。リステリア菌は運搬用パレット (図 6) から  $1.6 \times 10^2$  cfu/100cm<sup>2</sup>, ローラーコンベア (図 7) から 40 cfu/100cm<sup>2</sup> に検出された。

漬け込み終了後の洗浄・水切り・成形工程において、作業エリア床-4 及び床-5 における一般生菌数は  $10^8$  cfu/100cm<sup>2</sup> と工程中で最も高い値を示し、大腸菌群は  $10 \sim 10^3$  cfu/100cm<sup>2</sup> となり、作業エリア床-4 では大腸菌が陽性となった。使用器具・器材の一般生菌数は、 $10^2 \sim 10^5$  cfu/100cm<sup>2</sup> の範囲で、ステンレス製作業台-1 では  $10^5$  cfu/100cm<sup>2</sup>, 作業員手袋(使い捨てタイプ)では  $10^2$  cfu/100cm<sup>2</sup> に検出された。角ザルから大腸菌群が  $10^3$  cfu/100cm<sup>2</sup> に検出されたが、この工程でリステリア菌は検出されなかった。

チルド保管工程での一般生菌数は、チルド室床-1 及び床-2 で  $10^4$  cfu/100cm<sup>2</sup> と直前の工程より低い値となった。しかし、この工程で用いられる運搬用パレット-2 及び 3 では  $10^6$  cfu/100cm<sup>2</sup> と床よりも高い値を示し、チ

ルド室に設置のドレインパイプ末端では、一般生菌数が運搬用パレット-1 及び 2 と同じく  $10^6$  cfu/100cm<sup>2</sup>, また、大腸菌群が  $10^3$  cfu/100cm<sup>2</sup> に検出され、しかも大腸菌も陽性となった。本工程においてもリステリア菌は検出されなかった。

選別・計量工程では、作業エリア床-6 で一般生菌数が  $2.0 \times 10^7$  cfu/100cm<sup>2</sup>, 大腸菌群が  $8.9 \times 10^3$  cfu/100cm<sup>2</sup> に検出された。ステンレス製作業台-2 及び作業員手袋(使い捨てタイプ)では一般生菌数はいずれも  $10^3$  cfu/100cm<sup>2</sup>, 大腸菌群は  $10 \sim 10^2$  cfu/100cm<sup>2</sup> に検出されたが、この工程においてもリステリア菌は検出されなかった。

箱詰め・包装工程では、作業エリア床-7 で一般生菌数が  $10^4$  cfu/100cm<sup>2</sup> を示したものの、箱詰め製品輸送用のコンベアベルト(繊維製)、ステンレス製洗浄水タンク壁面及び作業員手袋から  $10 \sim 10^2$  cfu/100cm<sup>2</sup> の結果であった。作業員が製品の箱詰めを行うときに使用する手袋洗浄用の桶(使用前)、ステンレス製作業台-3 から細菌は検出されなかった。この工程において、リステリア菌及び大腸菌群は検出されなかった。

### (3) リステリア菌の接種試験

リステリア菌非接種の模擬漬け込み工程における pH の変化を表 3 に、食塩濃度の変化を表 4 に、一般生菌数の変化を図 3 に、大腸菌群の変化を表 5 に各々示す。原卵の pH の平均は 6.93, 漬け込み開始から保存 47 時間後の pH の平均は各々, 6.30, 6.26, 6.29, 6.26 (平均 6.28) で、大きな変化は認められなかった(表 3)。食塩濃度については、原卵で 0.7%, 漬け込み開始から保存 47 時間後の食塩濃度は 5.1 ~ 5.7% の範囲 (平均 5.4%) で大きな変化は認められず(表 4), Aw についても 0.939 ~ 0.943 (平均 0.941) の範囲で、大きな変化は認められなかった(表 4)。一般生菌数については、原卵で  $10 \sim 35$  cfu/g, 漬け込み開始から保存 47 時間までにおいては  $0 \sim 1.0 \times 10^3$  cfu/g の範囲で検出され(図 3), また、大腸菌群(表

5) はいずれの試料からも検出されなかった。漬け込み工程の模擬試料にリステリア菌を接種し、その消長を観察した結果を図4(1回目, 着色料使用せず)及び図5(2回目, 着色料赤色102号, 黄色5号使用)に示す。1回目の接種試験における初発菌数の平均は  $3.0 \times 10^4$  cfu/g, 保存7~47時間後においては各々,  $3.2 \times 10^3$  cfu/g,  $3.2 \times 10^3$  cfu/g,  $5.4 \times 10^3$  cfu/g で, 保存7時間後に約1/10のレベルに低下し, その後は大きな変化は認められなかった。2回目における初発菌数の平均は  $3.0 \times 10^4$  cfu/g, 保存7~47時間後においては各々,  $5.5 \times 10^3$  cfu/g,  $8.8 \times 10^2$  cfu/g,  $7.5 \times 10^2$  cfu/g で, 保存7時間後に約1/10のレベルに低下し, その後さらに低下して保存27及び47時間後においては約  $10^2$  cfu/g まで低下した。

#### D. 考察

塩タラコ製造工程において, 漬け込み工程で使用される運搬用パレット-1及び漬け込み樽を漬け込み機室へ移動させるためのローラーコンベアからリステリア菌が検出された。運搬用パレット-1の洗浄方法及び洗浄回数に問題があったため, 本菌を排除できなかったと考えられた。漬け込み樽底部は運搬用パレット-1と接触することにより汚染を受け, 次に漬け込み樽が漬け込み機室に搬送される過程でローラーコンベアを介して交叉汚染が生じたと考えられた。これらの交叉汚染により, 使用器具・機材等を介して中間製品あるいは最終製品が本菌によって汚染を受ける可能性があり, 現に最終製品10検体中2検体からリステリア属菌が検出されたことは, 製造環境からの交叉汚染であると結論付けられる。凍結原卵の解凍から漬け込み工程で使用される器具・機材及び全工程における作業エリア床については, 一般的衛生管理事項を再点検して改善し, 徹底した洗浄・殺菌を実施する必要がある。さらに, 定期的に細菌試験を行って本菌を排除又は許容レベルまで低減させたことを確認し, そ

の記録を保存する必要がある。

模擬漬け込み工程における中間製品は, pHの平均が6.28, 食塩濃度の平均は5.4%で, Awの平均は0.941であった。リステリア菌の発育に必要な最低Awは0.93で, Aw0.90でも発育する株があることが知られている。模擬漬け込み工程における試料のAwは, 最低発育Aw付近にあったため, 接種1回目の試験において一旦菌数が低下した後, 保存47時間後に再び増殖する傾向が認められたと考えられた。接種2回目においては, 着色料の作用により菌数がさらに低下したと考えられた。

#### E. 結論

塩タラコ製造施設において, 原材料から最終製品に至る過程でリステリア菌に対する危害分析を行った。漬け込み工程で使用される運搬用パレット及び漬け込み樽を漬け込み機室へ移動させるためのローラーコンベアからリステリア菌が検出された。運搬用パレットは, 洗浄不足のため本菌を排除できなかったと考えられ, また, 漬け込み樽底部が当該運搬用パレットを介して汚染を受け, さらに漬け込み樽がローラーコンベアを汚染したと考えられた。原材料, 中間製品からリステリア属菌は検出されず, また, 模擬漬け込み工程におけるリステリア菌の接種試験において, 本菌の増殖は確認されなかった。最終製品において10検体中2検体から *L. innocua* 及び *L. welshimeri* が検出された。最終製品からリステリア属菌が検出されたことについては, 製造環境からの交叉汚染である可能性が高いので, 一般的衛生管理事項の再点検と改善および定期的に細菌検査を実施して, 常に汚染状況を把握する必要があると考えられた。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 牧野壮一, 武士甲一, 2005. 危機管理: パ

イオテロリズムへの対応, 細菌毒素. 臨床と微生物, 32 :621-627.

2) 牧野壮一, 武士甲一, 2005. 食品微生物検査の簡易・迅速・自動化に関する最近の動向, 資源環境対策, 41(12):74-79.

3) 武士甲一, (他2名), 2005. 容器包装詰食品のボツリヌス食中毒対策について－厚生労働省からの通知を中心として－. 食品衛生学雑誌, 46(3):J-210-212.

4) S.-I. Makino et al. (他6名, 3番目) 2005. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. Int. J. Food Microbiol., 104:189-196.

## 2. 学会発表

該当なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

表1 中間製品, 漬け込み液, 及び最終製品の微生物学的性状と理化学的性状

試料	pH	塩分(%)	水分活性	一般生菌数	大腸菌群	リステリア菌
解凍・洗浄・水切り卵	6.08	0.8	0.991	30	陰性	陰性
漬け込み液(使用前)	6.97	-	-	35	陰性	陰性
漬け込み液(使用後)	6.17	-	-	$1.3 \times 10^3$	陰性	陰性
漬け込み後の卵	6.18	5.3	0.941	$4.9 \times 10^2$	陰性	陰性
洗浄・水切り・成形後の卵	6.19	5.2	0.943	$6.3 \times 10^2$	陰性	陰性
チルド保管後の成形卵	6.22	5.4	0.940	$2.1 \times 10^2$	陰性	陰性
最終製品	6.19	5.6	0.936	70	陰性	陰性

表2 塩タラコ(市販品)のリステリア菌試験結果

#	製造者	容器包装形態	内容量	賞味期限	リステリア菌 (25g 中)	備考欄
1	A	木製箱	2kg	07.05.19	陰性	
2	A	〃	〃	07.05.24	陰性	
3	A	〃	〃	07.05.28	陰性	
4	A	〃	〃	07.05.29	陰性	<i>L. welshimeri</i>
5	A	〃	〃	07.05.30	陰性	
6	A	〃	〃	07.05.031	陰性	
7	A	〃	〃	07.06.01	陰性	
8	A	発泡スチロール箱	〃	07.06.03	陰性	<i>L. innocua</i> <i>L. welshimeri</i>
9	A	〃	〃	07.06.09	陰性	
10	A	〃	〃	07.06.10	陰性	
11	B	〃	〃	06.11.09	陰性	<i>L. innocua</i>
12	B	〃	〃	05.12.07	陰性	
13	C	〃	〃	05.12.07	陰性	

表3 漬け込み前の原卵、漬け込み及び漬け込み後の試料の各貯蔵温度におけるpHの変化

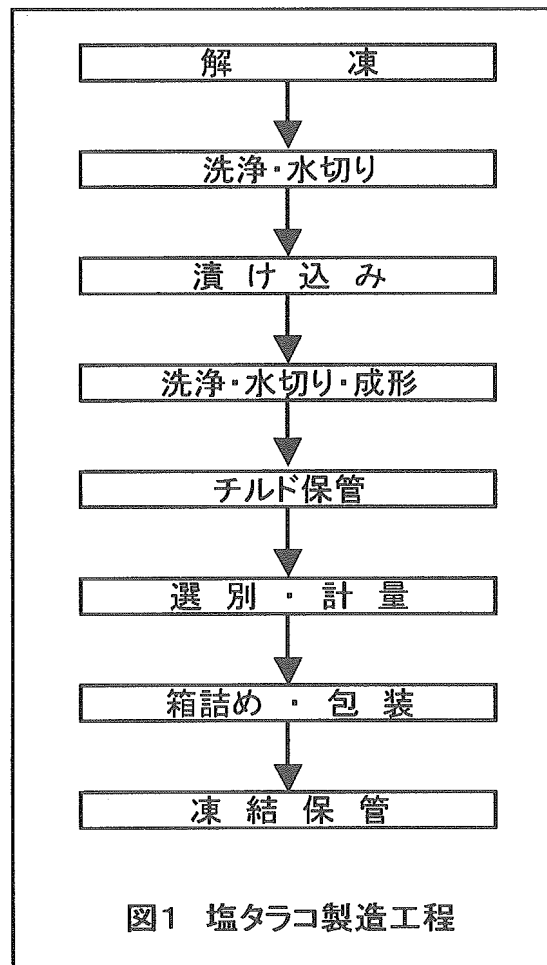
試料	原卵	0時間 (漬け込み開始)	7時間 (漬け込み終了)	27時間	47時間
A-20°C×7h・4°C	—	—	—	6.25	6.25
A-20°C×7h・10°C	—	—	—	6.25	6.25
A-20°C×7h・20°C	6.06	6.28	6.24	6.26	6.20
B-20°C×7h・4°C	—	—	—	6.31	6.31
B-20°C×7h・10°C	—	—	—	6.31	6.30
B-20°C×7h・20°C	6.16	6.35	6.28	6.31	6.26
C-20°C×7h・4°C	—	—	—	6.30	6.29
C-20°C×7h・10°C	—	—	—	6.30	6.27
C-20°C×7h・20°C	6.06	6.34	6.26	6.29	6.25

表4 漬け込み前の原卵、各貯蔵温度時間における食塩濃度、水分活性の変化

試料	食塩濃度 (%)					47時間後の水分活性
	原卵	0時間 (漬け込み開始)	7時間 (漬け込み終了)	27時間	47時間	
A-20°C×7h・4°C	—	—	—	5.2	5.2	0.942
A-20°C×7h・10°C	—	—	—	5.2	5.1	0.943
A-20°C×7h・20°C	0.7	5.6	5.4	5.2	5.5	0.942
B-20°C×7h・4°C	—	—	—	5.2	5.2	0.941
B-20°C×7h・10°C	—	—	—	5.1	5.2	0.941
B-20°C×7h・20°C	0.7	5.4	5.7	5.2	5.2	0.942
C-20°C×7h・4°C	—	—	—	5.1	5.1	0.939
C-20°C×7h・10°C	—	—	—	5.1	5.2	0.941
C-20°C×7h・20°C	0.7	5.3	5.5	5.1	5.2	0.941

表5 漬け込み前の原卵, 各貯蔵温度時間における大腸菌群の経時変化

試料	食塩濃度 (%)					漬け込み47時間後の水分活性
	原卵	0時間 (漬け込み開始)	7時間 (漬け込み終了)	27時間	47時間	
A-4°C	—	—	—	0	0	0.942
A-10°C	—	—	—	0	0	0.943
A-20°C	0	—	0	0	0	0.942
B-4°C	—	—	—	0	0	0.941
B-10°C	—	—	—	0	0	0.941
B-20°C	0	—	0	0	0	0.942
C-4°C	—	—	—	0	0	0.939
C-10°C	—	—	—	0	0	0.941
C-20°C	0	—	0	0	0	0.941





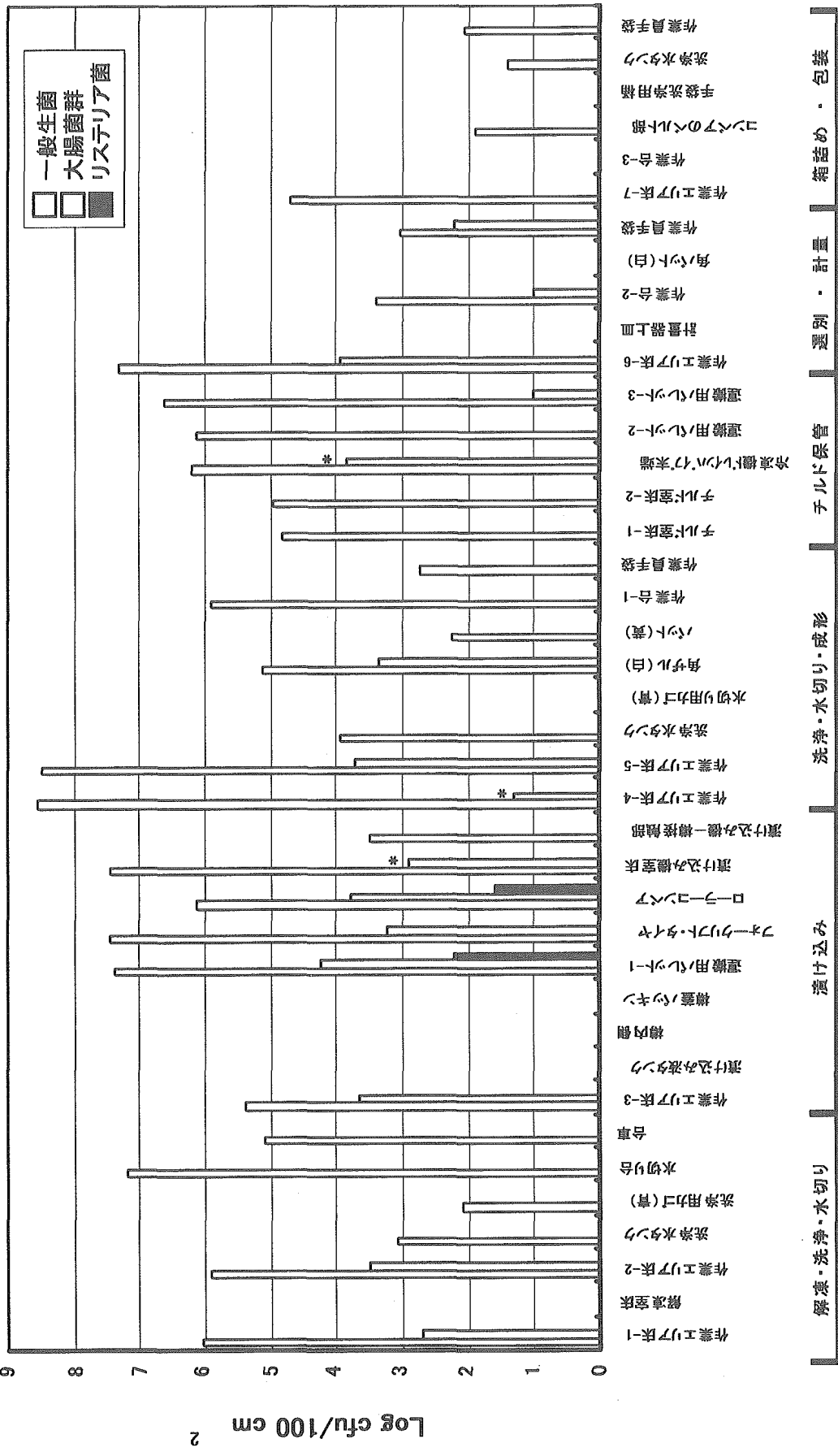


図2 塩タラコ製造工程におけるふき取り検査結果

注) \*は大腸菌陽性

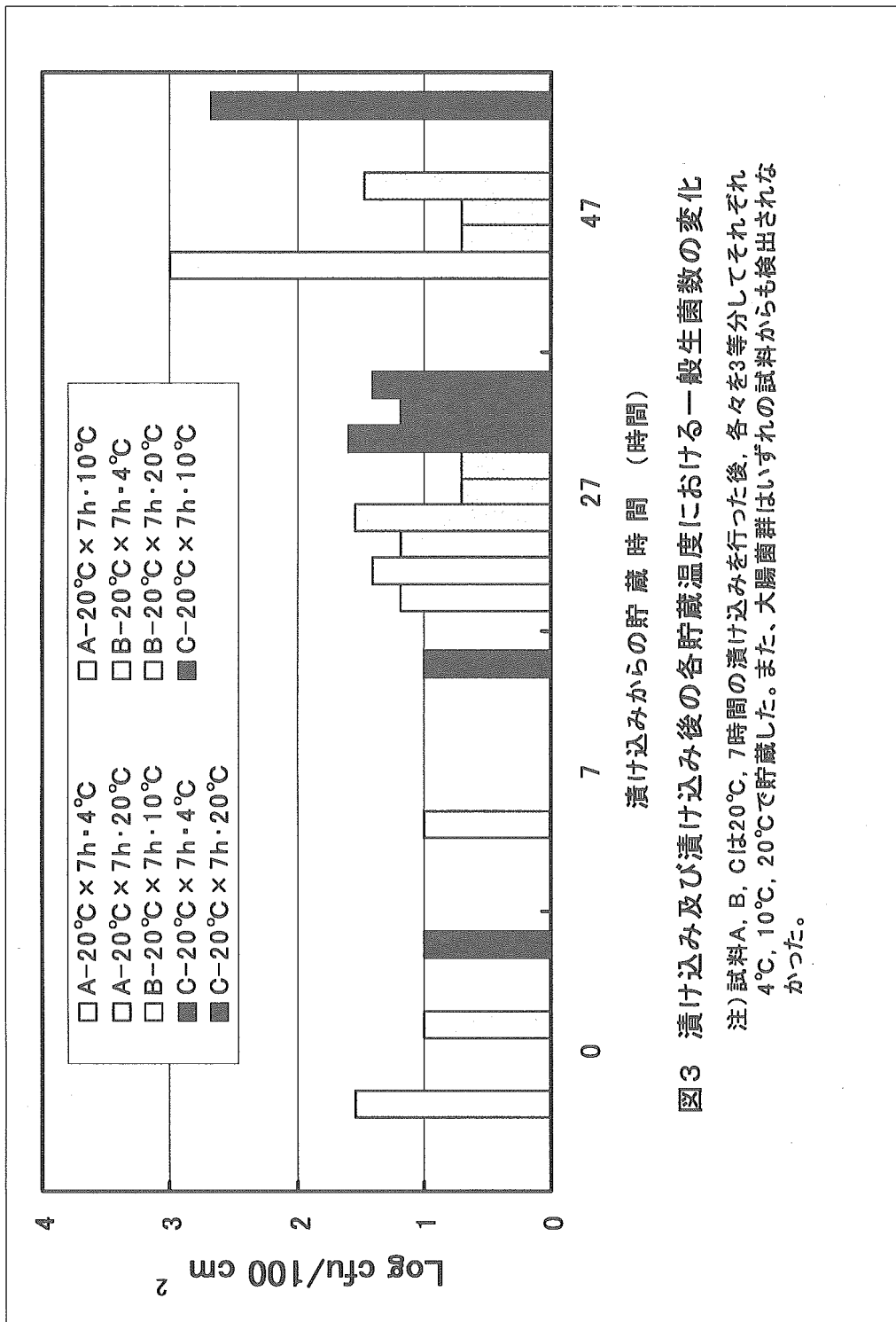


図3 漬け込み及び漬け込み後の各貯蔵温度における一般生菌数の変化

注) 試料A, B, Cは20°C, 7時間の漬け込みを行った後, 各々を3等分してそれぞれ4°C, 10°C, 20°Cで貯蔵した。また, 大腸菌群はいずれの試料からも検出されなかった。

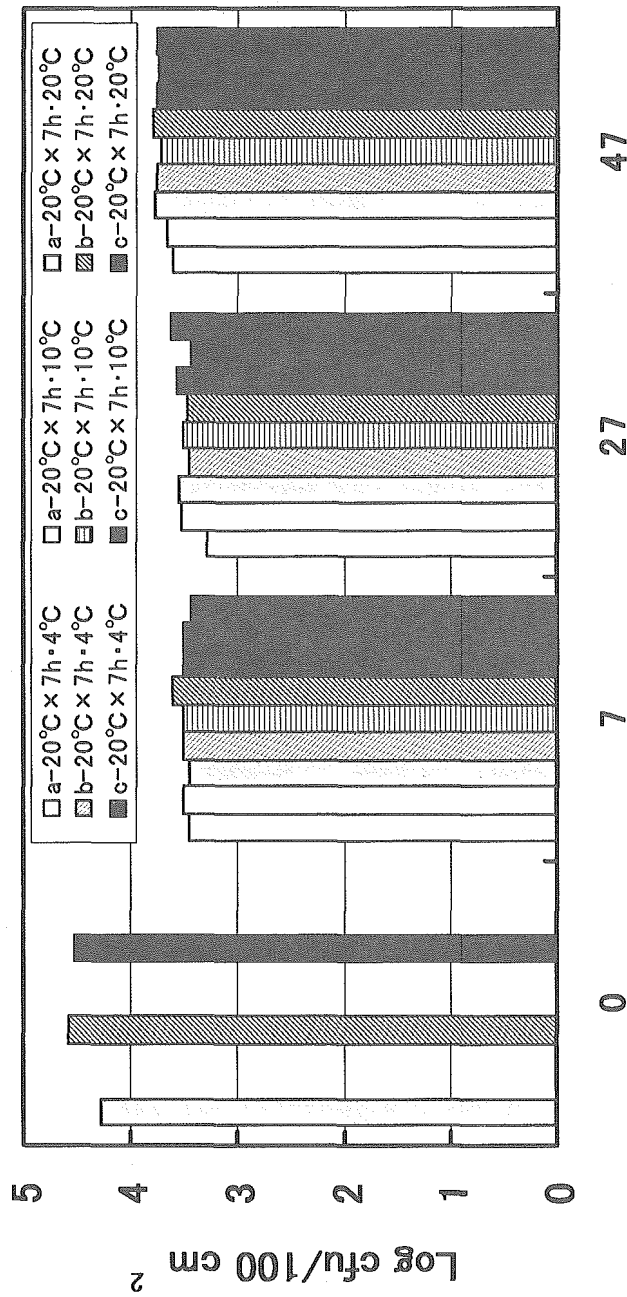


図4 漬け込み及び漬け込み後の各貯蔵温度におけるリステリア菌の消長の消長(1回目)  
 注) 試料a, b, cは20°C, 7時間の漬け込みを行った後、各々を3等分してそれぞれ4°C, 10°C, 20°Cで貯蔵した。

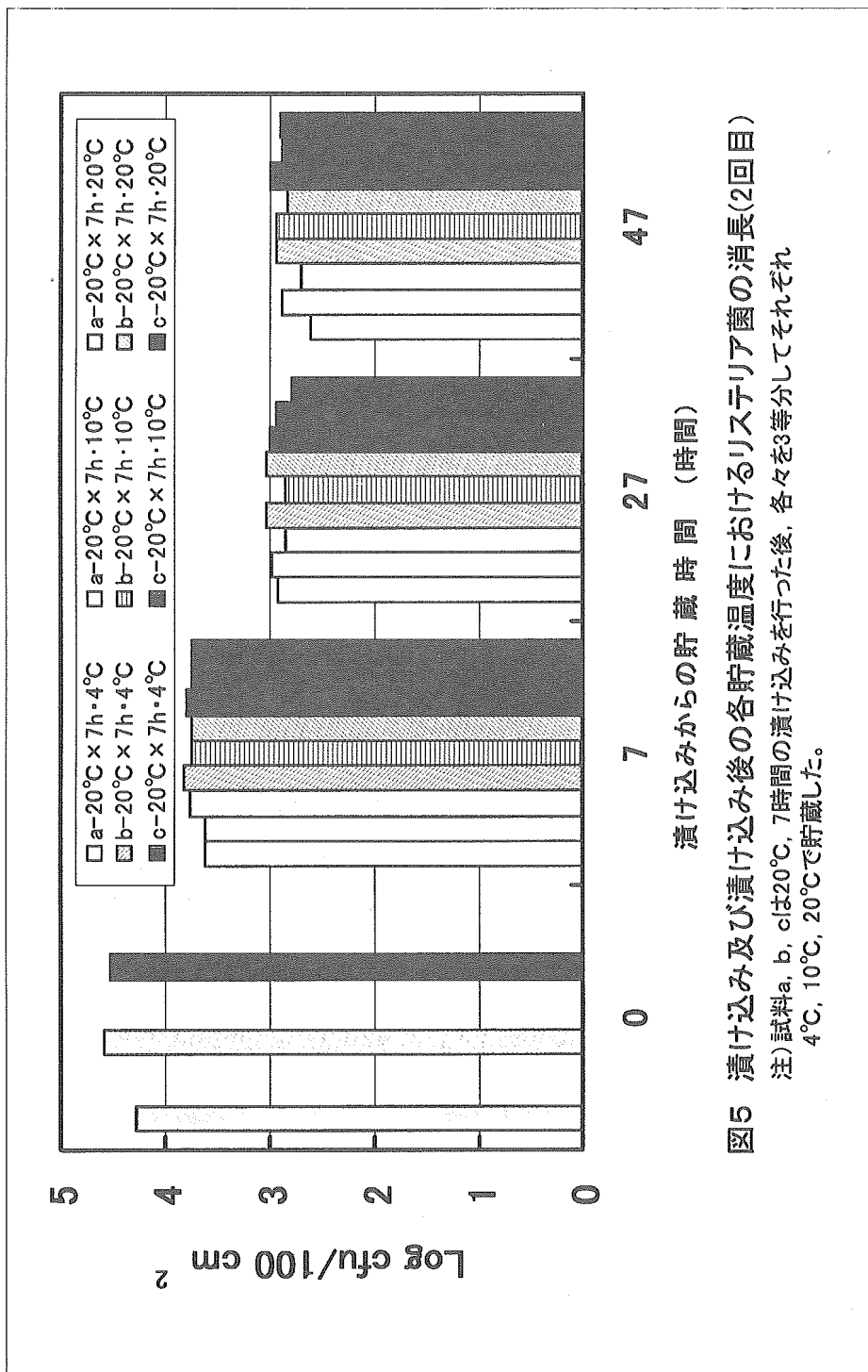


図5 漬け込み及び漬け込み後の各貯蔵温度におけるリステリア菌の消長(2回目)

注) 試料a, b, cは20°C, 7時間の漬け込みを行った後, 各々を3等分してそれぞれ4°C, 10°C, 20°Cで貯蔵した。