

表3-3

冷たいか刺身採取リスト(3日目分)表

サンプリング年月日:平成17年 10月18日

(1)冷凍するめいか刺身

No	細菌数/g	大腸菌群/g	E. Coli/g	腸炎ビブリオMPN/g	
1-1 低温解凍後	1-1-1	8.0 × 10 ⁵	<300(0)	陰性	<3.0
	1-1-2	4.6 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
	1-1-3	4.0 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
	1-1-4	5.9 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
	1-1-5	1.4 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
1-2 洗浄後	1-2-1	7.8 × 10 ²	<300(0)	陰性	<3.0
	1-2-2	4.0 × 10 ²	<300(0)	陰性	<3.0
	1-2-3	3.1 × 10 ²	<300(0)	陰性	<3.0
	1-2-4	1.8 × 10 ²	<300(0)	陰性	<3.0
	1-2-5	3.0 × 10 ²	<300(0)	陰性	<3.0
1-3 細切機裁断後	1-3-1	3.9 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-2	3.2 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-3	2.4 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-4	2.2 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-5	4.1 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
1-4 急速凍結後	1-4-1	5.0 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-2	2.1 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-3	2.0 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-4	2.9 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-5	6.1 × 10 ³	<300(0)	陰性	<3.0

表4-1 生食用ほたて貝サンプル細菌検査結果(1日目分)

サンプリング:平成17年8月9日

No	細菌数/g	大腸菌群/g	E. Coli/g	腸炎ビブリオMPN/g	
1-1 脱殻/内臓 除去後	1-1-1	<300(5)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-1-2	<300(1)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-1-3	<300(1)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-1-4	<300(5)	<300(0)	陰性	<3.0
1-2 1次洗浄 後	1-2-1	<300(11)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-2-2	<300(10)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-2-3	<300(8)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-2-4	3.1×10^2	<300(0)	陰性	<3.0
1-3 2次洗浄 後	1-3-1	6.4×10^2	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-2	<300(26)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-3	<300(27)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-4	<300(28)	<300(0)	陰性	<3.0
1-4 整列後	1-4-1	2.9×10^4	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-2	2.5×10^4	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-3	8.0×10^2	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-4	1.6×10^3	<300(0)	陰性	<3.0
1-5 選別後	1-5-1	1.3×10^5	<300(4)	陰性	<3.0
	1-5-2	1.1×10^4	<300(0)	陰性	<3.0
	1-5-3	<300(11)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-5-4	<300(10)	<300(0)	陰性	<3.0

表4-2

生食用ほたて貝柱採取リスト(2日目分)

サンプリング:平成17年9月27日

No	細菌数/g	大腸菌群/g	E. Coli/g	腸炎ビブリオMPN/g	
1-1 脱殻/内臓 除去後	1-1-1	<300(1)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-1-2	<300(3)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-1-3	<300(2)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-1-4	<300(1)	<300(0)	陰性	<3.0
1-2 1次洗淨 後	1-2-1	<300(0)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-2-2	<300(0)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-2-3	<300(4)	<300(0)	陰性	<3.0
	1-2-4	<300(2)	<300(0)	陰性	<3.0
1-3 2次洗淨 後	1-3-1	6.0×10^2	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-2	7.2×10^2	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-3	5.2×10^2	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-4	4.0×10^2	<300(0)	陰性	<3.0
1-4 整列後	1-4-1	4.0×10^2	<300(1)	陰性	<3.0
	1-4-2	1.1×10^3	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-3	1.2×10^3	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-4	7.5×10^2	<300(0)	陰性	<3.0
1-5 選別後	1-5-1	1.4×10^3	<300(0)	陰性	<3.0
	1-5-2	1.5×10^3	<300(0)	陰性	<3.0
	1-5-3	2.0×10^3	<300(0)	陰性	<3.0
	1-5-4	1.4×10^3	<300(0)	陰性	<3.0

表 5 - 1 各保存温度におけるバター液中の細菌数 (個/g)

保存温度	保存時間				
	0hr	2hr	4hr	6hr	24hr
8℃	<300	<300	<300	<300	<300
20℃	<300	<300	<300	<300	7.6 × 10 ²
30℃	<300	<300	<300	<300	1.4 × 10 ⁷

表 5 - 2 各保存温度におけるバター液中の pH

保存温度	保存時間				
	0hr	2hr	4hr	6hr	24hr
8℃	6.5	6.4	6.6	6.4	6.3
20℃	6.6	6.3	6.6	6.8	6.6
30℃	6.3	6.5	6.6	6.8	6.4

表6 冷凍ポテトコロッケサンプリングリスト(冷凍食品:凍結前未加熱)

サンプリング 工程	サンプリング No	細菌数/g		大腸菌群/g		黄色ブドウ球菌		サルモネラ	
		A工場	B工場	A工場	B工場	A工場	B工場	A工場	B工場
1-1 混合攪拌後	1-1-1	<300(35)	<300(45)						
	1-1-2	<300(60)	<300(10)						
	1-1-3	<300(30)	<300(30)						
	1-1-4	<300(15)	<300(10)						
	1-1-5	<300(60)	<300(0)						
	1-1-6	<300(20)	<300(15)						
	1-1-7	<300(15)	<300(0)						
	1-1-8	<300(15)	<300(0)						
	1-1-9	<300(35)	<300(245)						
	1-1-10	<300(15)	<300(0)						
1-2 使用中バター	1-2-1	<300(130)	<300(50)						
	1-2-2	<300(95)	<300(110)						
	1-2-3	<300(290)	<300(90)						
	1-2-4	<300(85)	<300(95)						
	1-2-5	<300(45)	<300(5)						
	1-2-6	<300(40)	<300(50)						
	1-2-7	<300(80)	<300(60)						
	1-2-8	<300(110)	<300(20)						
	1-2-9	<300(180)	<300(10)						
	1-2-10	<300(40)	3.0×10^2						
1-3 凍結前	1-3-1	1.6×10^3	<300(85)		陰性		陰性		陰性
	1-3-2	8.5×10^2	<300(90)		陰性		陰性		陰性
	1-3-3	9.5×10^2	<300(270)	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	1-3-4	1.4×10^3	<300(90)	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
	1-3-5	<300(180)	<300(135)		陰性		陰性		陰性
	1-3-6	4.3×10^2	<300(80)		陰性		陰性		陰性
	1-3-7	3.6×10^2	<300(205)		陰性		陰性		陰性
	1-3-8	<300(200)	<300(80)		陰性		陰性		陰性
	1-3-9	9.7×10^2	<300(85)		陰性		陰性		陰性
	1-3-10	2.2×10^3	<300(230)		陰性		陰性		陰性

表7

ポテトコロッケ細菌検査結果(製品):[A工場]

2006年度

検査月	検体数	細菌数(X ²)					大腸菌		サルモネラ		ブドウ球菌	
		<300	2	3	4	5	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性
4月	57	3	14	37	3		57		4		57	
5月	37	3	15	17	2		37		3		37	
6月	53	4	15	32	2		53		2		53	
7月	58	2	26	26	4		58		4		58	
8月	56	2	27	23	4		56		5		56	
9月	60	4	17	30	7	2	60		5		60	
10月												
11月												
12月												
1月	48	9	17	21	1		48		3		48	
合計	369	27	131	186	23	2	369	0	26	0	369	0

ポテトコロッケ細菌検査結果(製品):[B工場]

2006年度

検査月	検体数	細菌数(X ²)					大腸菌		サルモネラ		ブドウ球菌	
		<300	2	3	4	5	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性
4月	16	11	3	2			16		16		16	
5月	9	4	4	1			9		9		9	
6月	12	5	6	1			12		12		12	
7月	11	2	8	1			11		11		11	
8月	9	1	3	5			9		9		9	
9月	8		5	3			8		8		8	
10月	8	1	1	6			8		8		8	
11月	8	2	1	5			8		8		8	
12月	9			9			9		9		9	
1月	7	7					7		7		7	
合計	97	33	31	33	0	0	97	0	97	0	97	0

ポテトコロッケ細菌検査結果(製品):[2工場の集計]

2006年度

検査月	検体数	細菌数(X ²)					大腸菌		サルモネラ		ブドウ球菌	
		<300	2	3	4	5	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性
4月	73	14	17	39	3		73		20		73	
5月	46	7	19	18	2		46		12		46	
6月	65	9	21	33	2		65		14		65	
7月	69	4	34	27	4		69		15		69	
8月	65	3	30	28	4		65		14		65	
9月	68	4	22	33	7	2	68		13		68	
10月	8	1	1	6			8		8		8	
11月	8	2	1	5			8		8		8	
12月	9			9			9		9		9	
1月	55	16	17	21	1		55		10		55	
合計	466	60	162	219	23	2	466	0	123	0	466	0

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進 研究事業）
分担研究報告書

協力研究者 宮原美知子 国立医薬品食品衛生研究所

3. 食品冷凍保存における病原細菌の挙動

世界中から、原料あるいは加工食品が冷凍保存の状態に日本に運ばれてきている。そしてそれを元にして冷凍食品ばかりでなく、あらゆる食品が製造されるようになってきている。その冷凍食品のなかで、食中毒発生の原因となる病原細菌はいかなる挙動を示すのかについて検討を行った。冷凍貯蔵において汚染された病原菌はいかなる経過をたどるのかについての検証を行った。

検討した病原細菌は腸管出血性大腸菌（EHEC）、腸炎ビブリオ、カンピロバクター、サルモネラ、リステリアと赤痢菌についての食品中での挙動を観察した。-20℃での冷凍保存で、2・3ヶ月の長期保存による病原細菌の生残性を検討した。MPN法に従って、菌数の計算を行った。ただし、検出法については、冷凍損傷検体から有効である増菌培養法を使って、検出を行った。

その結果、食品中での冷凍保存試験において、2・3ヶ月保存によって菌数の低下が見られない病原細菌はEHEC、カンピロバクター、サルモネラ、リステリアであった。腸炎ビブリオと赤痢菌は徐々に菌数が低下していくが、6ヶ月後にも一部数%は残存していた。

以上の結果より、汚染した病原細菌は冷凍された食品中でも長く残存することから、受け入れ時の検査又はその検査法が重要であるばかりでなく、解凍後の衛生管理も注意をしなければならないことになる。

A. 研究目的

昨年の当研究班の研究課題として、腸炎ビブリオの食品中での冷凍保存に関する研究を行った。この研究により、培養液中の腸炎ビブリオは冷凍により直ぐに死滅するが、冷凍食品中では一部生存することがわかり、世界中から集められる食品中の魚介類に対して危険性を指摘することが出来た。

今年度は、冷凍食品中での食中毒起因細菌の動態を中心に検討を行った。このことは、冷凍食品の高度衛生管理をする上での基礎資料として重要であると考えている。

B. 研究方法

各接種菌については、新鮮培養菌を実験に用いた。腸管出血性大腸菌(EHEC)、サルモネラ、リステリア、赤痢菌については保存培地からトリプトソイ培地 (TSB) 3ml へ接種し 36°C (リステリアのみ 30°C) での培養を行った。その培養液を滅菌生理食塩水により適宜希釈を行って、実験菌液とした。カンピロバクターについては冷凍保存菌株グリセリン含寒天培地を Muller-Hinton agar 上に塗抹し、42°C 微好気培養 2 - 3 日後出現したコロニーをエーゼで掻き取り、Muller-Hinton 培地に懸濁させ、適宜滅菌生理食塩水により 10 倍希釈を行って実験菌液とした。腸炎ビブリオ保存株はアルカリ性ペプトン水 (APW) に懸濁させ、36°C での一晚培養により、滅菌生理食塩水により適宜に 10 倍希釈を行って実験菌液を作製した。接種菌液については、適当倍の希釈菌液 0.1ml を TSA に 5 枚塗抹を行って、培養後、出現コロニー数により接種菌数を計測した。

接種食品検体は以下のものを使用した。EHEC 接種は牛挽肉、サルモネラ、リステリアとカンピロバクターは鶏挽肉、赤痢菌にはヤングコーン、そして腸炎ビブリオはスルメイカを使用した。

最初に食品検体 25g をストマフィルターに入れ、菌接種後に各検体は 20°C で冷凍保存を行った。

各保存期間の後に袋の外から 40°C の温流水により、解凍を行って検出検査を行った。増菌培地 225ml を加え、ストマッカー処理により懸濁させた後に、この懸濁液を原液として一般生菌数、(計測する場合は) 大腸菌群数および最確数(MPN) 3 本法による病原細菌数の計測を行った。腸内出血性大腸菌 O157:H7 については、緩衝ペプトン水(BPW)中での 36°C、24 時間増菌培養を行い、その BPW 増菌液の 1ml を NmEC(ノボビオシン加胆汁酸入り EC 培地) 10ml に加えて、42°C で、24 時間培養を行った。検出用分離寒天平板培地には、亜テレル酸カリウムとセフィキシム加ソルビトールマッコンキー寒天培地 (CT-SMAC) と CHROMagar O157 寒天培地を使用した。腸炎ビブリオは APW 増菌後に TCBS 寒天培地塗抹により判定した。カンピロバクターについては、ボルトン培地での 42°C、24 時間培養後に、CCDA と Karmali 寒天培地への塗抹を行い、42°C での 24-48 時間培養を行い、出現コロニーによって、MPN 判定を行って菌数を計測した。サルモネラについては、BPW での 36°C、24 時間培養後に 0.1ml BPW 増菌液を RV 10ml へ加えて、42°C、24 時間培養を行い、その選択培養液を XLD と CHROMagar *Salmonella* 寒天培地に塗抹培養して、出現

コロニーにより、サルモネラの有無を判定した。リステリアでは、最初に BPW での 36°C、24 時間の増菌培養後に、10ml UVM 培地へ 1ml BPW 増菌液を加え、30°Cでの 24 時間培養を行い、その選択増菌液を PALCAM 分離寒天平板培地上に塗抹し、30°Cでの 24-48 時間培養後にコロニーの出現により、リステリアの有無を判断した。赤痢菌では BPW での増菌後に、*Shigella* broth での 42°C 嫌気培養を行い、その選択増菌液をマッコンキー No.3 と CHROMagar O157 TAM の寒天培地上に塗抹し、36°C、24 時間の培養により、出現コロニーにより、菌の有無を判定した。

EHEC, サルモネラ、リステリアと赤痢菌の検出方法については宮原が発表している論文に従った¹⁾。図 1 参照。

接種に用いた食品は、未接種検体を増菌培養—選択増菌等を行って、分離寒天平板培地での塗抹を行って、接種菌の有無を確認した。

又、接種菌が検出されたかどうかを確認するために、PCR や各種イムノクロマトキットを使用した。PCR のプライマーとして、EHEC 検出用として EVC-1/2 プライマーセット (TaKaRa) 増幅 DNA 171 bp, サルモネラ検出用として SIN-1/2 プライマーセット (TaKaRa) 増幅 DNA 378 bp, リステリア検出用には、*prfA*1/2²⁾ 増幅 DNA 467 bp, 赤痢菌 IPA-1/2 (TaKaRa) 増幅 DNA 171bp, カンピロバクター *jejuni/coli* 用には *16S rRNA*³⁾ 増幅 DNA 857 bp, 腸炎ビブリオは VPD-1/2 (TaKaRa) 増幅 DNA 251bp を使用した。各 PCR 条件等については販売されているものはその使用説明書に従い、文献が記されているものについて

はその条件に従った。また、イムノクロマトキット等の簡易検出用については、サルモネラ用として、Lateral flow system: *Salmonella* test kit (DuPont) を使用した。リステリア検出用として、Lateral flow system: *Listeria* test kit (DuPont) を使用した。カンピロバクター検出用には *Campylobacter* test (OXOID) を使用した。

C. 研究結果

牛挽肉には、そのものの一般生菌数が 2.9×10^4 cfu/g であったが、2 ヶ月間の冷凍保存中この一般生菌数も接種した EHEC 5.6×10^5 cfu/g 菌数も変動がなかった。

鶏挽肉は一般生菌数が 1.5×10^4 cfu/g であったが、接種カンピロバクターの菌数 2.7×10^4 cfu/g のどちらも 2 ヶ月間の冷凍保存中変動がほとんどなかった。

サルモネラとリステリアを接種した鶏挽肉の一般生菌数は 8.0×10^3 cfu/g であったが、カンピロバクター接種前例と同様で、一般生菌数に変動はなかった。また、サルモネラとリステリア自体の接種菌数も変動がなかった。

これらの実験結果は表 1, 2, 3, 4 に示すとともに縦軸を対数軸とした図によって結果を表示した。図 2, 3, 4, 5 参照。

次に、前年度に検討を行ったスルメイカに関して、1 回の検体数 2 から 5 に増やして再検討を行った。結果について標準偏差値も表示した。結果として、腸炎ビブリオは冷凍保存によって、安定でないことが再度確認された。また、この検討には、大腸菌群の検討も行った。本来、生のお刺身用スルメイカを購入したので、0.01g 検体から大腸菌群は検出されないはずであったが、

7日と28日冷凍保存後のスルメイカより、 6.2×10^2 と 1.3×10^2 cfu/gの菌数が検出された。一般的には30-300個のコロニーのみ計測することになっているので、本来の表示からすれば、<300以下で表示されない程度の大腸菌群数ではあった。接種腸炎ビブリオは冷凍保存1週間では接種菌数を保ったが、4週間の保存では、菌数が約25%に減少した。2ヶ月間保存では、さらに減少し、約4%にまで減少し、6ヶ月保存では、約1.6%に減少した。けれども、どの検体においても、接種した600 cfu/g腸炎ビブリオが4-15個/g生存していた。スルメイカの一般生菌数は6ヶ月保存中にゆっくりと減少し、菌数が約10%になった。この結果は表5と図6に示した。

赤痢菌も冷凍保存によって菌数が減少した。 2.3×10^3 cfu/g接種した赤痢菌は1週間で約2%まで減少した。3ヶ月以降は4-24個/gの菌数は残存していた。この結果は表6と図7に示した。

D. 考察

以上の結果から、食中毒起因細菌を接種した食品検体では、冷凍保存されてもEHEC、サルモネラ、リステリア、カンピロバクターでは接種菌数に変動がなかった。要するに、あるものはそのまま残ることが考えられた。もっとも、EHECやカンピロバクターの検出法は通常行う検出法とは異なった方法を用いた。冷凍保存と言うことを考えて、損傷菌の増菌ということも考えた培養での検出法を使った。EHECはNmECでの42℃、24時間培養後に塗抹が一般的な検出法となっているが、損傷菌を増殖させやすいBPWでの前増菌法を採り

入れているので、ほとんどの菌を検出できたものとする。また、カンピロバクターの検出では、Preston培地での増菌が多く採り入れられているが、ボルトン培地による増菌によって、多くの冷凍検体からもカンピロバクターが検出されるようになってきている。このボルトン培地による増菌を行って検出しているために、ほとんどすべての接種菌が回収出来たものと考えられた。接種した食品から考えると食肉等に汚染した病原細菌数は冷凍保存期間を経てもほとんど菌数が変動しないものと考えられる。最近では鶏肉も冷凍にて輸入されることが多くなっているが、牛肉、豚肉等は元々冷凍で輸入されてきている。これらのものに検出される一般細菌も保存によって菌数の変動は見られなかった。

一方、著しい菌数減少が見られた腸炎ビブリオと赤痢菌であるが、これらの菌に関しては検出のための増菌培地に関してはこれ以上改善できるのかどうかについては不明である。食品の赤痢菌自然汚染を検出した方法は2001年に宮原と小沼によって、初めて導入された⁴⁾。BPWによる前増菌を行っていることから、損傷菌を回復させて検出させているものと考えている。腸炎ビブリオの検出法は食品衛生検査法で2001年よりAPWでの増菌が決められているが、この増菌法は、検出の難しいTDH等毒素産生株の検出には有効であると考えられた方法である。

食品中の接種菌を回収し、菌数を計測する方法として、MPN法を使用した。この方法により、増菌も採り入れた検出法を使えたことから回収が良好であったと思われる。

検出法的側面から考察すると以上であるが、腸炎ビブリオや赤痢菌の冷凍保存での菌数減少はいかにして起きてくる現象なのであろうか？そもそも腸炎ビブリオは夏場に多く海や食品中にも検出されるが、海温20℃以下になるとほとんど検出されてこないことが知られている。腸炎ビブリオ食中毒が起きてくるのも日本では6-9月であり、8月がピークである。これらのことから Viable but not culturable (VNC) 等の考えも提案される所以である。また、赤痢菌はどのようにして冷凍保存で減少してくるのかについても検討を行いたいと考えている。

E. 結論

高度衛生管理的観点からは、どの食中毒細菌も汚染していれば、解凍後に増殖してくる危険があることから、解凍後の調理や保存に関しては温度管理を徹底する必要があると考えられる。

世界中から食料品が集められて大量に日本で消費されている。運ばれてくる食料の多くは冷凍形態をとっていることから、受け入れ時の検査法も重要であり、解凍後の衛生管理も注意しなければならない。

参考論文

- 1) Miyahara, M. (2005) Simultaneous Enrichment Detection Method for Four Types of Pathogenic Bacteria in Food. *Biocontrol Sci.*, **10**, 91-96.
- 2) Bubert, A., Riebe, J., Schnitzler, N., Schonberg, A., Goebel, W., and Schubert, P. (1997) Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies

and/or PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **35**, 179-183.

- 3) Denis, M., Refregier-petton, J., Laisney, M.J., Ermel, G., and Salvat, G. (2001) *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli*. *J. Appl. Microbiol.*, **91**, 255-267.

- 4) 宮原美知子、小沼博隆 (2002) 輸入冷凍生カキより *Shigella sonnei* 赤痢菌の検出 防菌防黴誌、**30**, 299-302.

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

- 1) Frozen Pathogenic Bacteria in Food: Michiko Miyahara, Kunihiro Shinagawa

119th AOAC Annual Meeting & Exposition, September 11-15, 2005

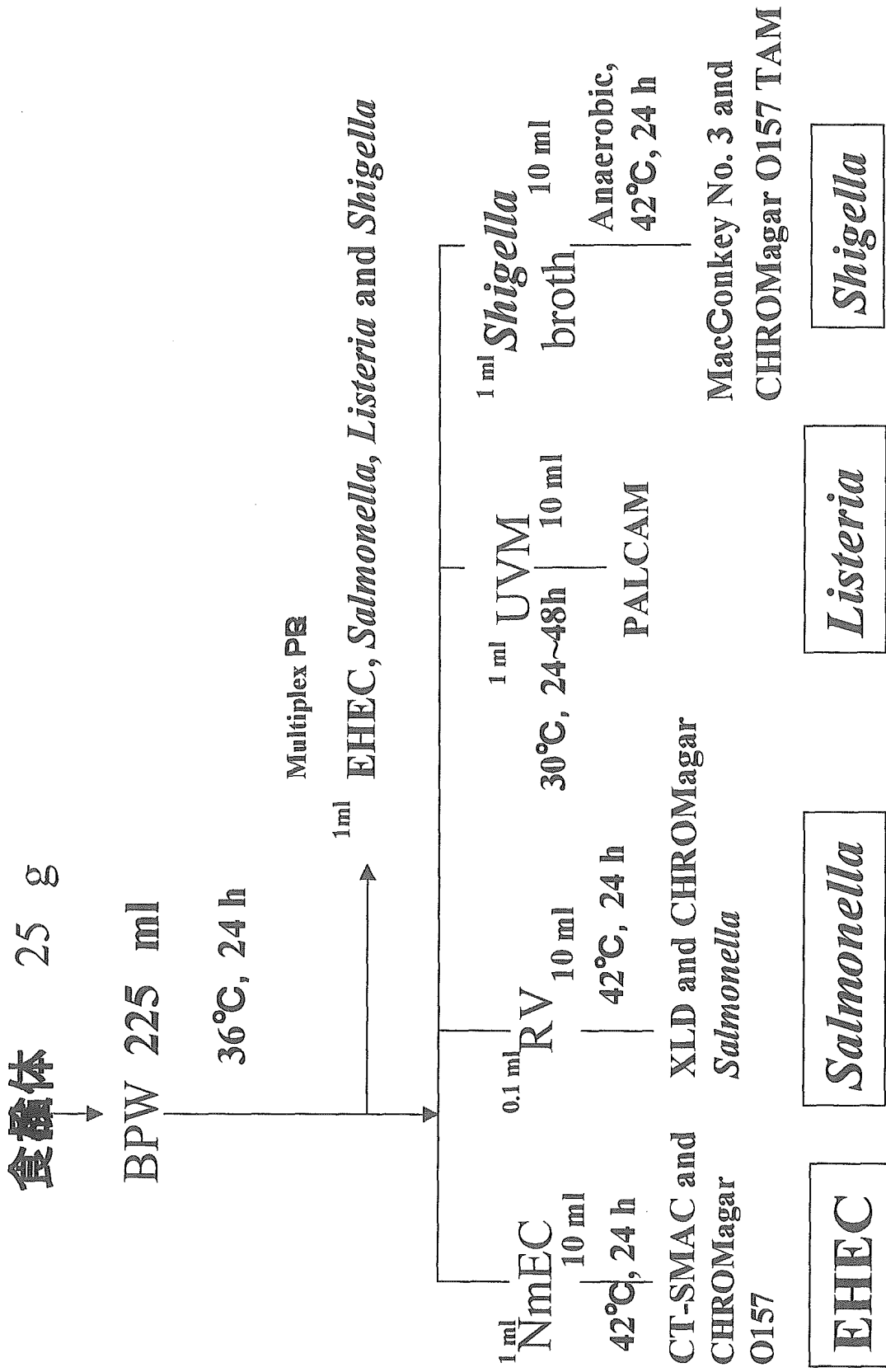
- 2) 食品接種腸炎ビブリオ冷凍保存での動態：宮原美知子、品川邦汎

第26回日本食品微生物学会学術総会
平成17年11月

- 3) 冷凍食品保存中接種食中毒起因細菌の挙動：日本薬学会第126年会

平成18年3月

图1



一着菌を食中探検 (EHEC, Salmonella, Listeria and Shigella)

図1

食品検体 25 g

BPW 225 ml

36°C, 24 h

Multiplex PR

1 ml

EHEC, *Salmonella*, *Listeria* and *Shigella*

1 ml NmEC
10 ml
42°C, 24 h

CT-SMAC and
CHROMagar
O157

EHEC

0.1 ml RV
10 ml
42°C, 24 h

XLD and CHROMagar
Salmonella

Salmonella

1 ml UVM
30°C, 24~48h
10 ml

PALCAM

Listeria

1 ml *Shigella*
broth
10 ml

Anaerobic,
42°C, 24 h

MacConkey No. 3 and
CHROMagar O157 TAM

Shigella

— 斉増菌による食品中の病原細菌検出 (EHEC, *Salmonella*, *Listeria* and *Shigella*)

図2 接種 EHEC の冷凍牛挽肉中での動態

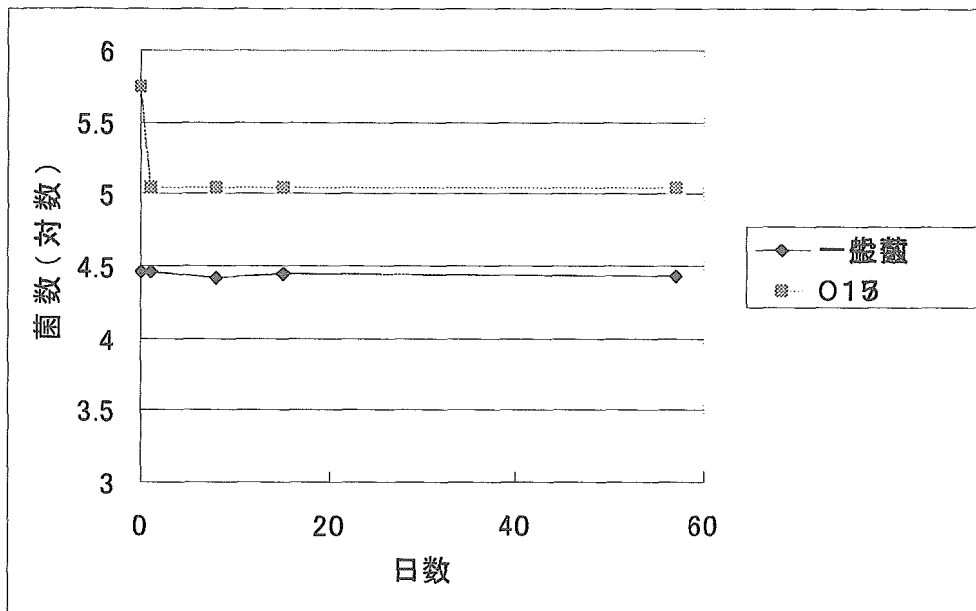


図3

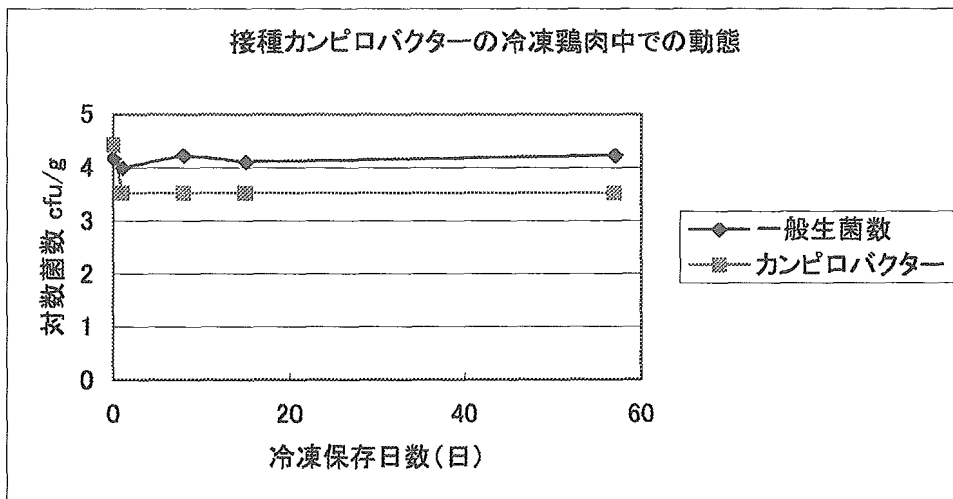


図4 接種サルモネラの冷凍鶏挽肉中での動態

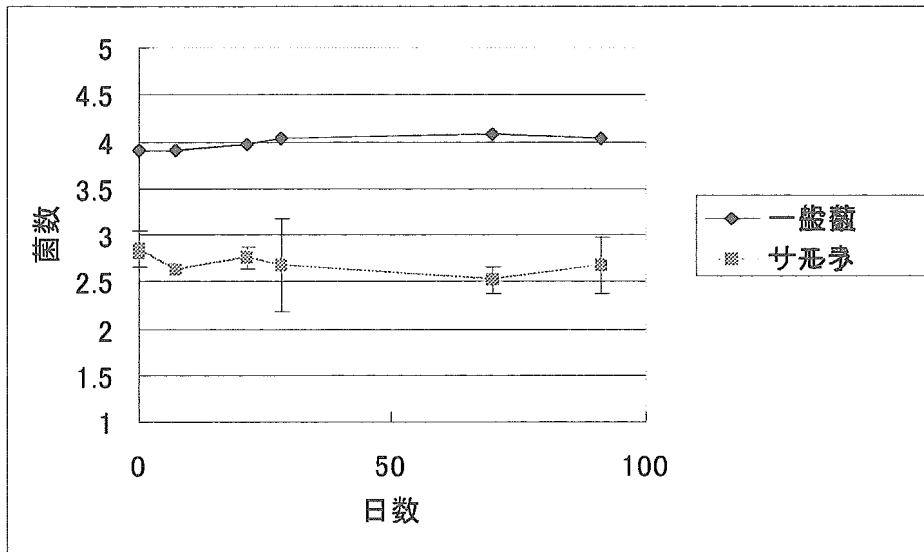


図5 接種リステリアの冷凍鶏挽肉中での動態

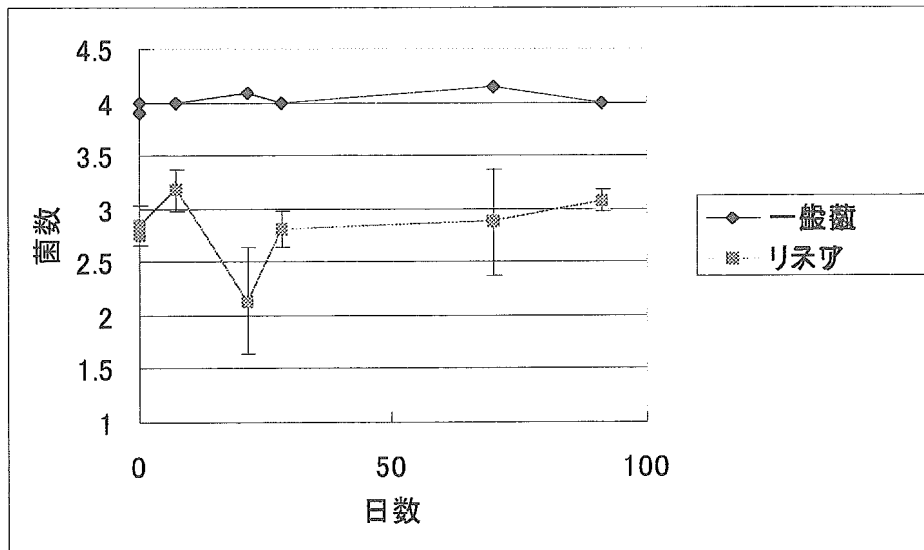


図 6

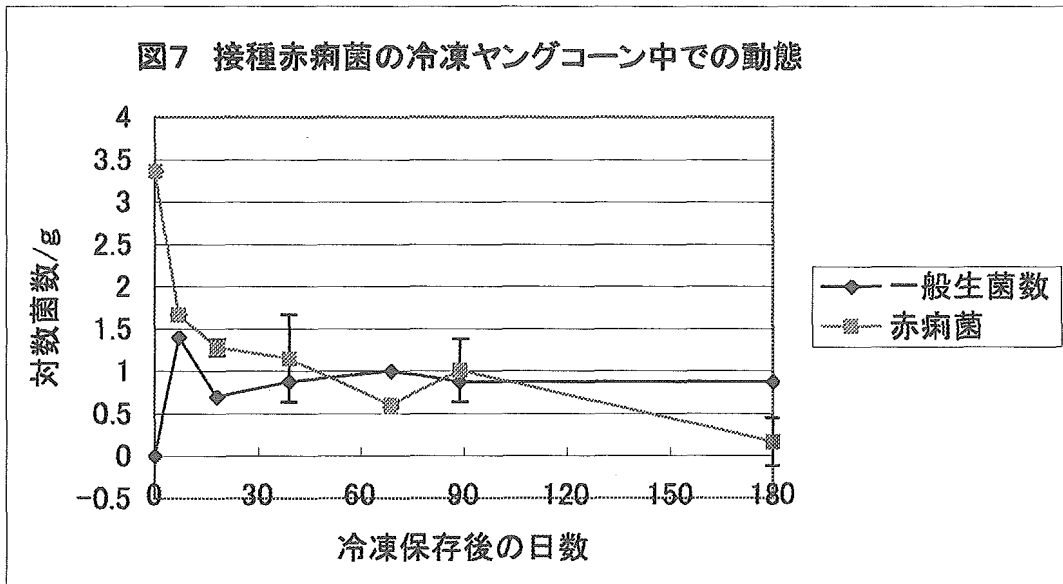
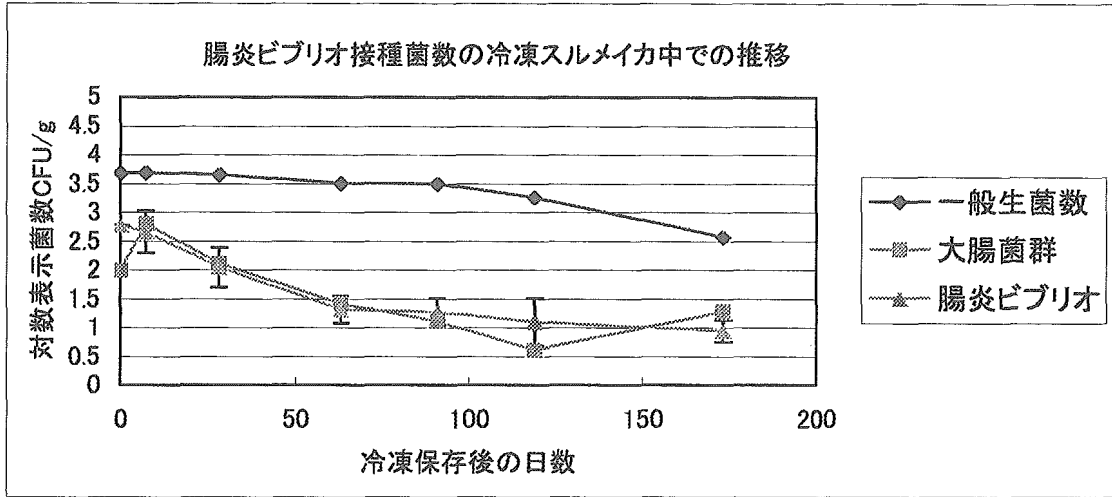


表1 各種EHECの冷凍牛挽肉中での動態

	0	1	8	15	57	log
cfu/g	log	log	log	log	log	log
牛挽肉	29000	29000	26000	28000	27000	4.431
一般生菌数	4.462	4.462	4.415	4.447	4.447	4.431
O157	560000	110000	110000	110000	110000	5.041
	5.748	5.041	5.041	5.041	5.041	5.041

表2 各種カンピロバクターの冷凍鶏挽肉中での動態

	0	1	8	15	57	log
cfu/g	log	log	log	log	log	log
鶏挽肉	15000	10000	17000	13000	17000	4.230
一般生菌数	4.176	4.000	4.230	4.114	4.230	4.230
Campylobacter	270000	>44000	>44000	>44000	>44000	3.519
	5.431	3.519	3.519	3.519	3.519	3.519

表3 各種サルモネラの冷凍鶏挽肉中での動態

	0	7	21	28	70	91	log
cfu/g	log	log	log	log	log	log	log
鶏挽肉	8000	3903	7900	3898	9500	11000	4.041
一般生菌数	3.903	3.903	3.903	3.898	3.978	4.041	4.041
Salmonella	640	2808	430	2.633	750	1500	3.176
	2.808	3.041	2.633	2.633	2.875	2.40	2.380
	480	2.663	430	2.633	430	150	2.176
Average	2.852	2.633	2.754	2.633	2.676	2.521	2.674
STDEV	0.189	0.121	0.121	0.121	0.500	0.141	0.294

表4 各種>Listeriaの冷凍鶏挽肉中での動態

	0	7	21	28	70	91	log
cfu/g	log	log	log	log	log	log	log
鶏挽肉	8000	3903	9900	3996	12000	9700	3.987
一般生菌数	3.903	3.903	4.000	3.996	4.079	4.146	3.987
Listeria	560	2.748	930	2.968	430	240	2.968
	2.748	3.041	2.968	2.633	2.633	2.380	2.968
	1100	3.041	2400	1.633	430	1500	3.176
Average	2.852	2.633	2.133	2.633	2.801	2.880	3.072
STDEV	0.189	0.168	0.500	0.168	0.500	0.500	0.104

表5 各種腸炎ビブリオの冷凍スルメイカ中での動態

	0	7	28	63	91	119	173	log
cfu/g	log	log	log	log	log	log	log	log
スルメイカ	4800	3.681	4800	3.653	3200	1800	370	2.568
一般生菌数	3.681	3.681	3.681	3.653	3.505	3.491	3.255	2.568
大腸菌群(チリ)	98	1.991	630	2.114	26	4	19	1.279
Vibrio	600	2.778	240	1.633	15	46	9.3	0.968
	2.778	2.380	43	1.633	15	24	9.3	0.968
	1500	3.176	43	1.633	9.3	24	9.3	0.968
	150	2.176	240	2.380	24	15	15	1.176
	380	2.580	150	2.176	24	4.3	4.3	0.633
	930	2.968	240	2.380	46	9.3	9.3	0.968
Average	2.656	2.041	1.314	2.041	1.273	1.164	0.943	0.943
STDEV	0.412	0.381	0.259	0.381	0.262	0.262	0.195	0.195

表6 接種赤痢菌の冷凍ヤングコロン中での動態

ヤングコロン cfu/g	log												
	0	7	18	39	69	89	180	log	log	log			
一般生菌数	0	1	25	5	0.699	7.5	0.875	10	1.000	7.5	0.875	7.5	0.875
<i>Shigella sonnei</i>	2300	3.362	46	24	1.380	46	1.663	4.3	0.633	4.3	0.633	0.92	-0.036
		46	46	15	1.176	4.3	0.633	3.8	0.580	24	1.380	2.3	0.362
Average			1.663		1.278		1.148		0.607		1.007		0.163
STDEV			0		0.144		0.728		0.038		0.528		0.281

II. 分担研究報告書

II-3. ナチュラルチーズ製造の高度衛生管理に関する研究

II-3-1. ナチュラルチーズ製造の高度衛生管理に関する研究

高谷 幸 ((社) 日本乳業協会)

II-3-2. 未殺菌乳を原料とするナチュラルチーズの製造工程におけ

るリステリアの挙動に関する研究

高谷 幸 ((社) 日本乳業協会)

II-3-3. 冷蔵保存したナチュラルチーズにおける *Listeria*

monocytogenes の生残性

高谷 幸 ((社) 日本乳業協会)

分担研究報告書

分担研究者 高谷 幸 （社）日本乳業協会

食品製造の高度衛生管理に関する研究

ナチュラルチーズ製造の高度衛生管理に関する研究

研究要旨

わが国におけるナチュラルチーズの製造の多くは原料である生乳を殺菌するか、あるいは製造工程中に殺菌効果を有する工程を設定し製品を製造・流通させている。

一方、欧州の一部地域においては、未殺菌原料乳を使用しナチュラルチーズを製造・流通している。ナチュラルチーズによるリステリア感染症の可能性は以前より指摘されており、業界の多くをはじめ行政当局としても他の食品に比べ当該食品のリステリア汚染に注意を払っているところである。

また、欧州をはじめナチュラルチーズによるリステリア感染症の発生事例も報告されており、当該食品はリステリア症のハイリスク食品であることは周知の事実である。

近年、わが国においても小規模の乳業者の中に製品の差別化を目指し欧州と同様に未殺菌の原料を使用したナチュラルチーズの製造を求める者がいる。そこで、未殺菌の原料を使用してナチュラルチーズを製造するにあたり、使用原料（生乳）、製造工程及び製造後の取扱いに係る危害分析を行い、安全性確保のための HACCP 方式の確立のための科学的なデータを収集するとともに、ナチュラルチーズ製造のための HACCP モデルを構築するための基礎的資料を得ることとした。

平成16年度に得られた生乳中のリステリアの存在状況、国内外のリステリア症の発生状況に関する文献調査等を基に未殺菌の原料を使用して製造する際の基礎的なデータの収集を行い HACCP 構築の資料を得ることとした。

研究協力者	岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所
畑山昭典 よつ葉乳業（株）	田村 豊 酪農学園大学
柴田貴弘 雪印乳業（株）	上野弘志 酪農学園大学
松崎 勝 森永乳業（株）	男澤聖子 酪農学園大学
安部俊朗 明治乳業（株）	藤平ひとみ 酪農学園大学
相澤純一 （社）日本乳業協会	上前知子 酪農学園大学
五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所	大塚佳代子 埼玉県衛生研究所