

図2. 市販白カビタイプチーズにおける *L. monocytogenes* の挙動

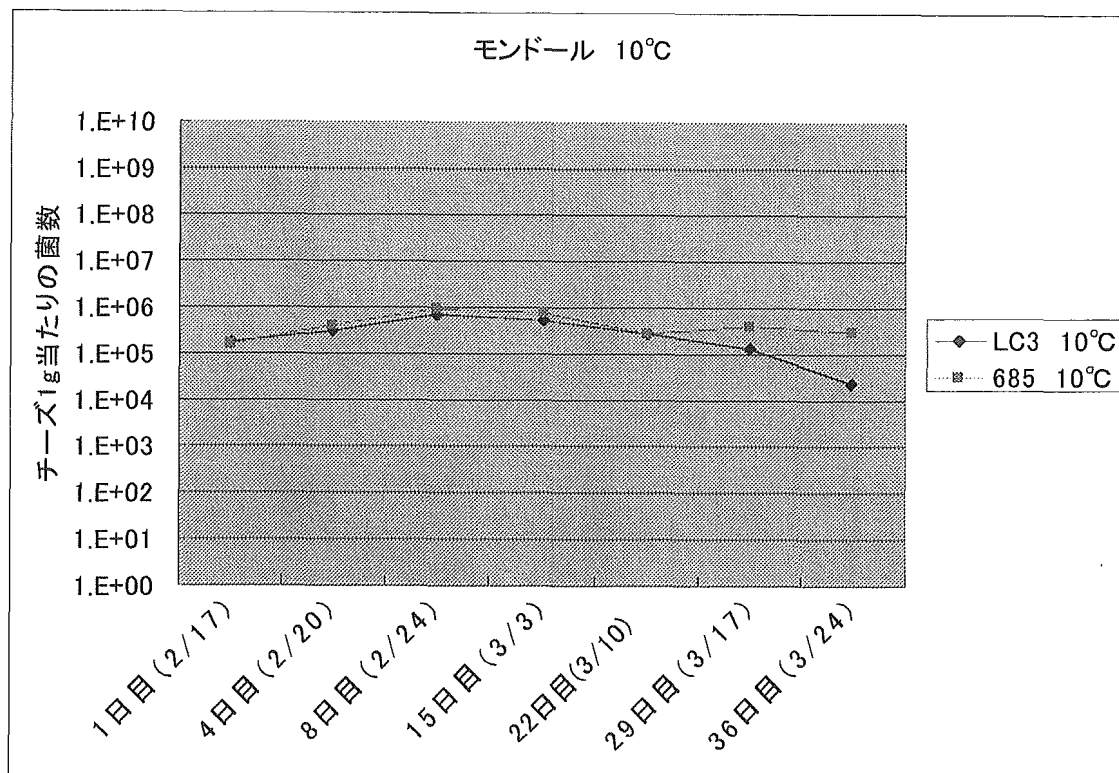
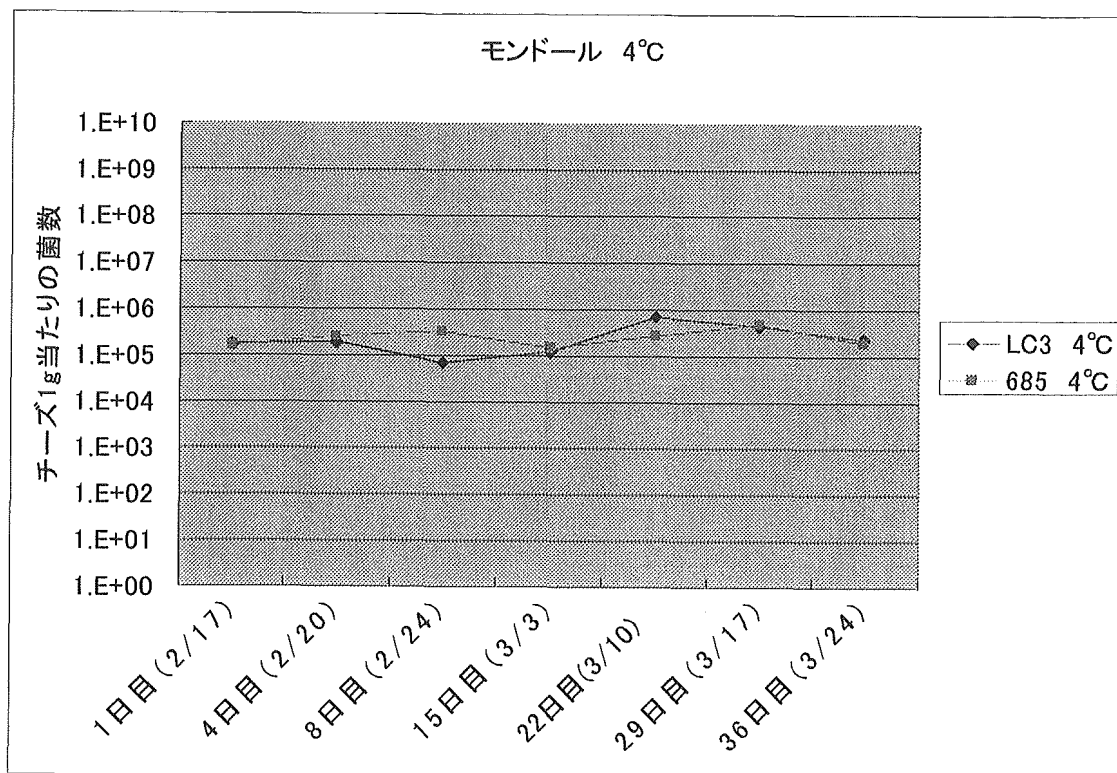


図3. 市販モンドールチーズにおける *L. monocytogenes* の挙動

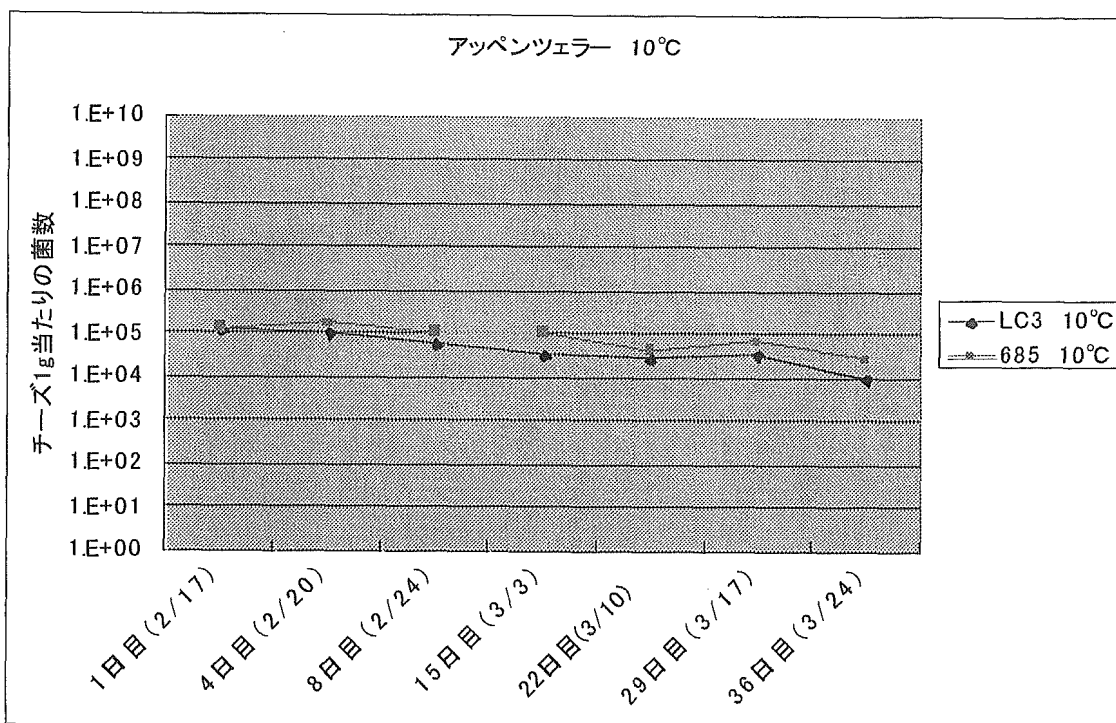
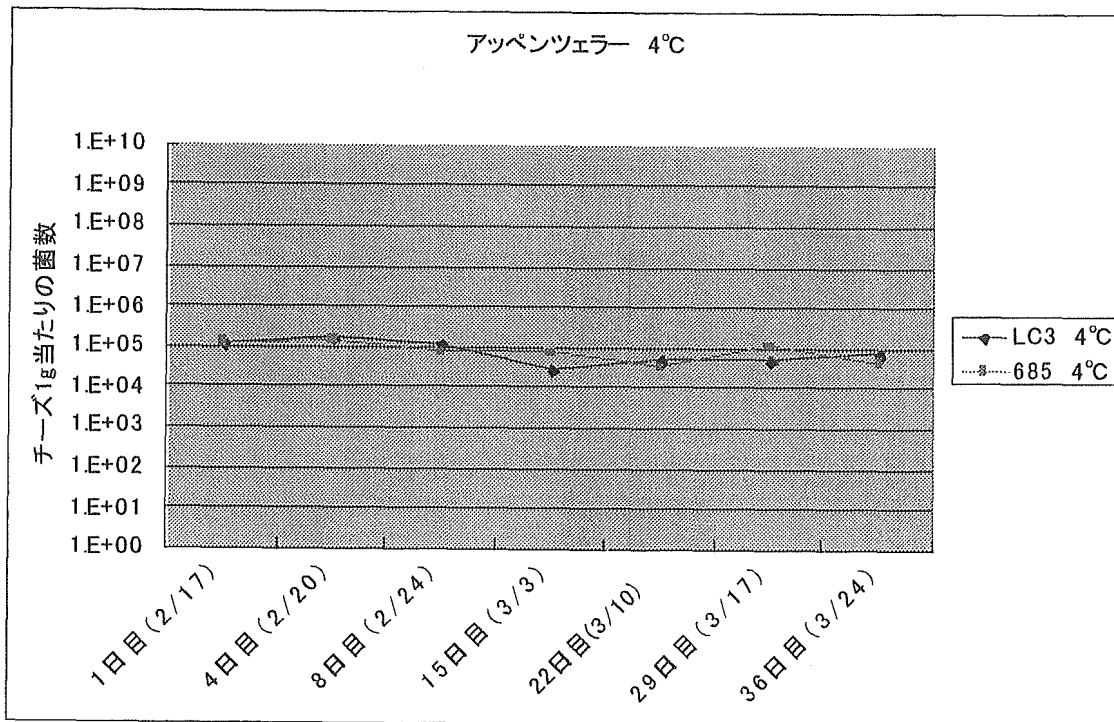


図4. 市販アップペンツェラーチーズにおける *L. monocytogenes* の挙動

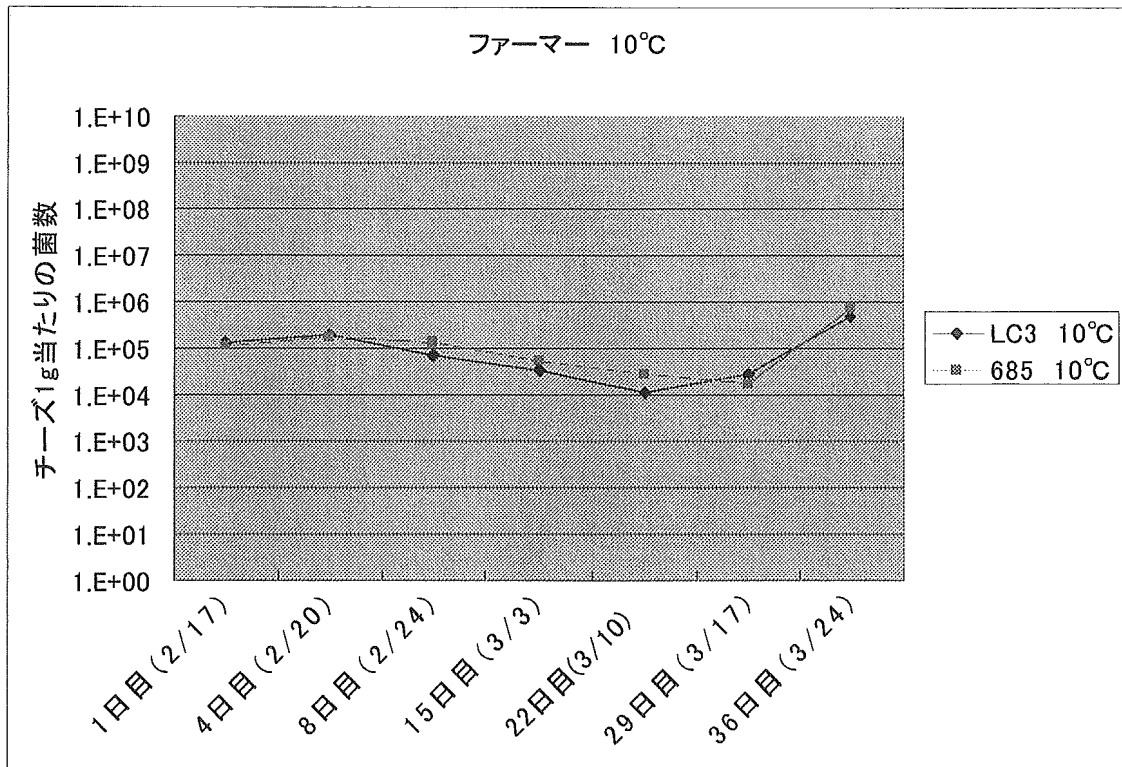
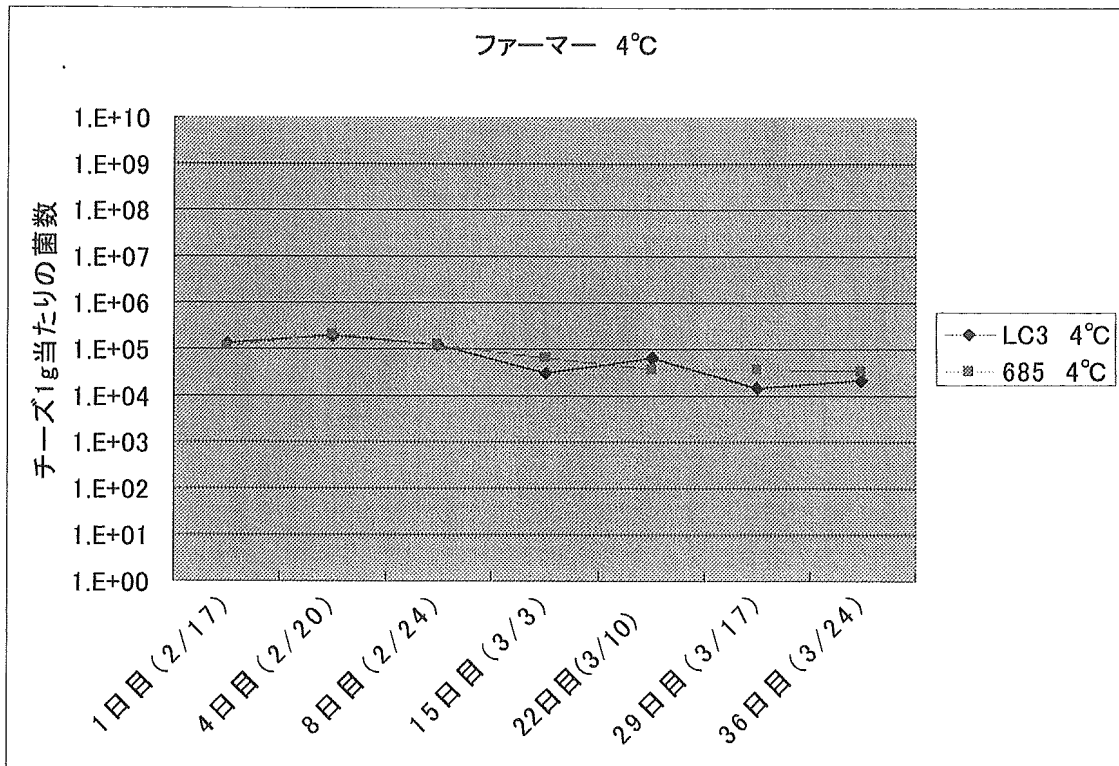
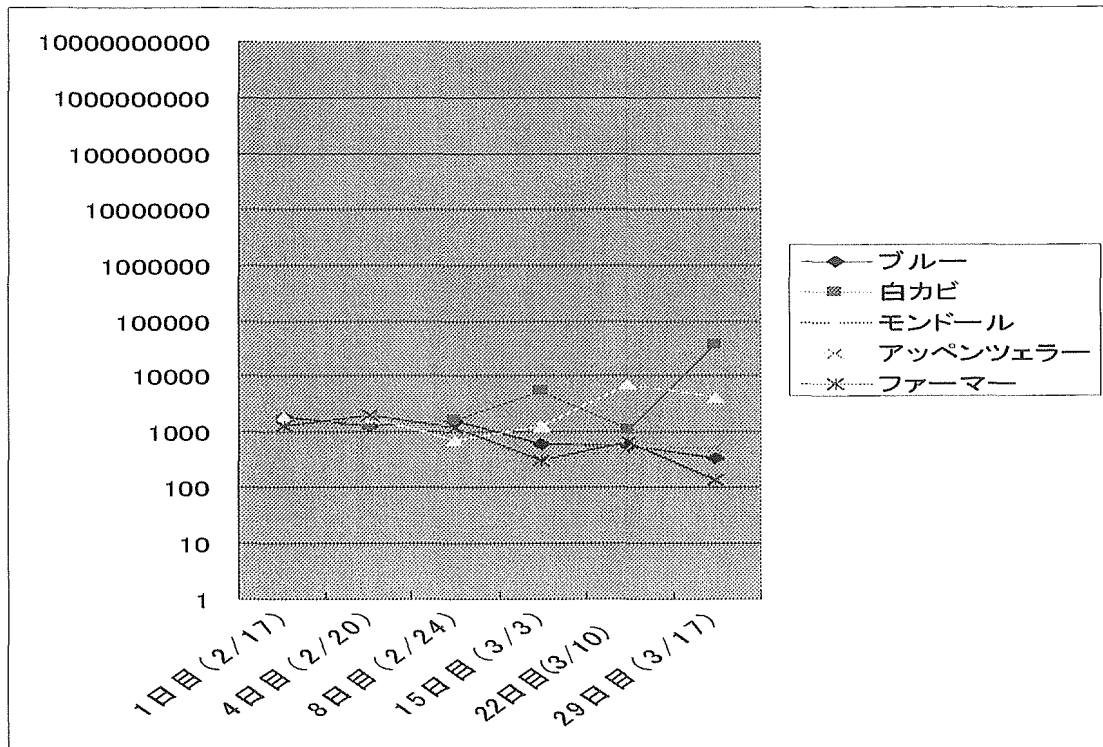


図5. 市販ファーマーチーズにおける *L. monocytogenes* の挙動

#LC3 (serotype 1/2b) 4°C



#LC3 (serotype 1/2b) 10°C

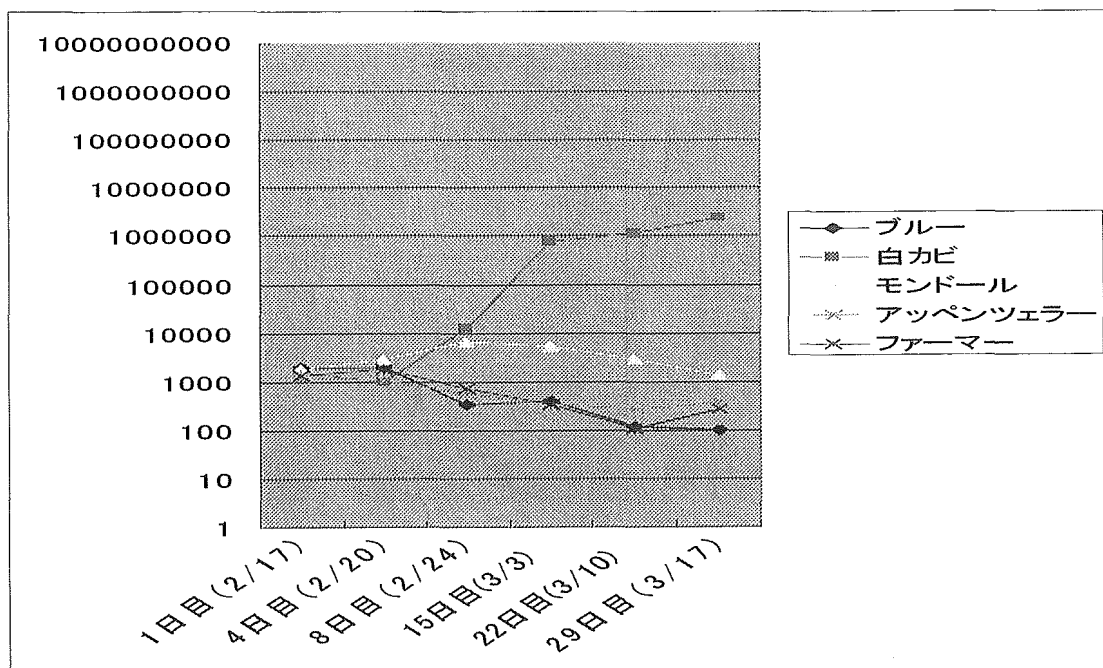
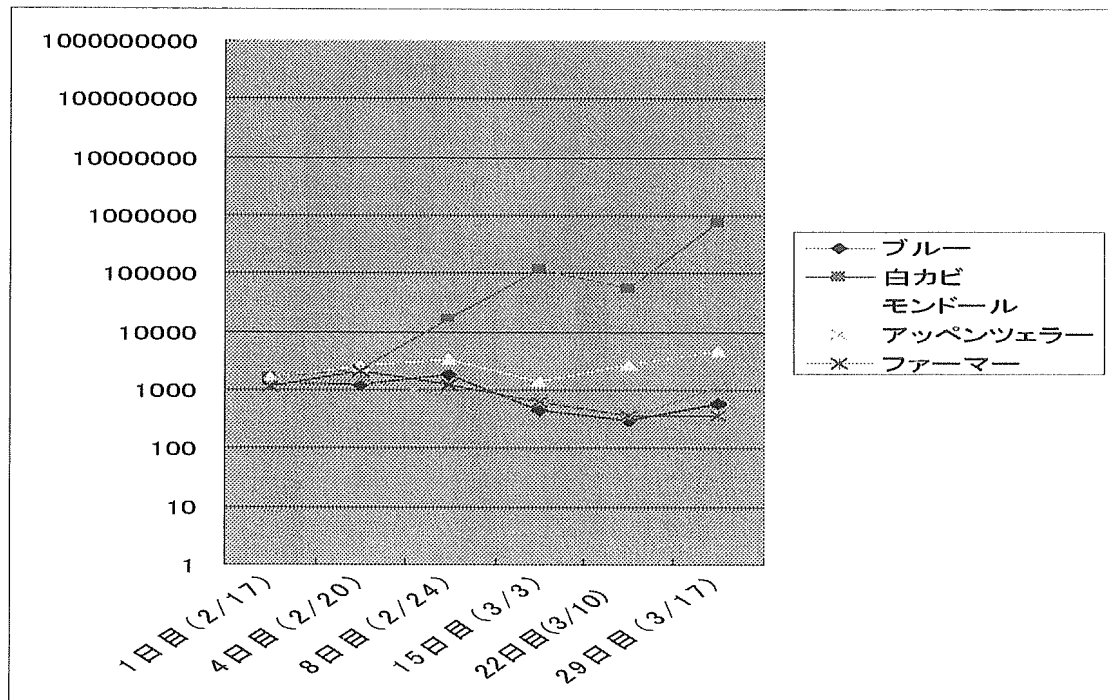


図6. #LC3 (serotype 1/2b)株の市販チーズにおける菌の増殖比較

#685 (serotype 4b) 4 °C



#685 (serotype 4b) 10 °C

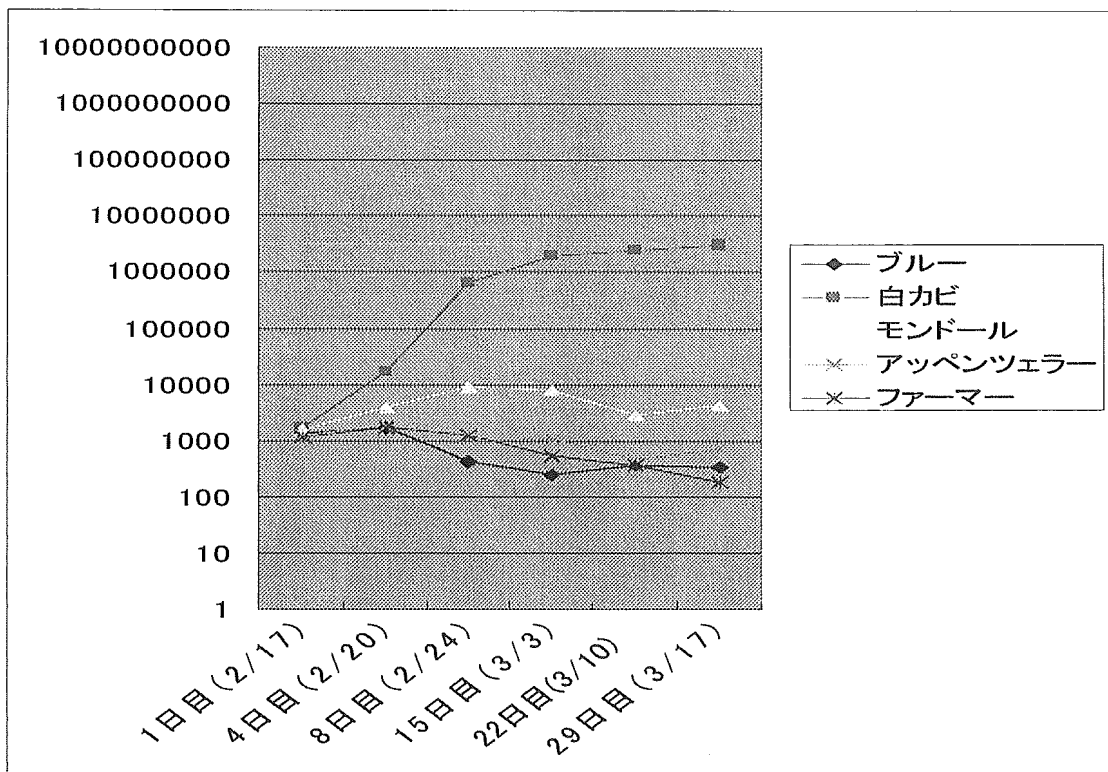


図7. #685 (serotype 4b)株の市販チーズにおける菌の増殖比較

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)

分担研究報告書

分担研究者 高谷 幸 (社) 日本乳業協会 常務理事

冷蔵保存したナチュラルチーズにおける *Listeria monocytogenes* の生残性

研究要旨：2001年に国産ナチュラルチーズの摂取による *Listeria monocytogenes* 食中毒事件が確認されたことを契機に、本菌の各種食品における汚染菌量など詳細な情報や本菌による食品媒介感染症の発生防止対策の策定に関心がもたれることとなった。近年の国内チーズ消費量は255,889トンで、チーズを使用した料理が日本人の食生活にとけ込んできている。そこで、本研究では *L. monocytogenes* に汚染されたチーズが飲食店や家庭等で冷蔵保存された場合、消費されるまでの菌の挙動を知る目的で、実験的に市販のナチュラルチーズ表層に菌を接種して、菌数の推移を試験した。*L. monocytogenes* は10℃保存した熟成・乾燥型チーズにおいて、63日の保存期間中増加することなく、減少あるいは死滅した。ソフトチーズは種類によって菌の推移が異なり、カマンベールでは保存1日後から急速に増殖し、保存期間中高い菌数を維持した。モッツアレラでは増殖開始時期に菌株差が見られ、保存7日あるいは21日後まで菌数の変化がなく、その後いずれの菌株も増殖して56日後まで死滅しなかった。

協力研究者

大塚佳代子 埼玉県衛生研究所

A. 研究目的

ヒトのリステリア症は1929年に Nyfeldt により初めて *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*)を患者の血液から分離して

以来、散発的な急性感染症として知られることとなった。1980年代になって欧米で食品が感染源となったリステリア症が相次いで報告されたことから食品衛生の分野では注目されるようになり、今日では *L. monocytogenes* が食肉およびその加工品、乳および乳製品等に広く分布していること

は日本の食品衛生に関わる人々の中では周知のことである。しかしながら、ヒトに重篤な危害を及ぼし、社会的にインパクトを与えた腸管出血性大腸菌 O157 などと比べると、日本国内の社会においては本菌の食品媒介感染症としての認知度は低い。このような状況下において、2001年に国産ナチュラルチーズの摂取による *L.monocytogenes* 食中毒事件が確認されたことを契機に、本菌の各種食品における汚染菌量など詳細な情報や本菌による食品媒介感染症の発生防止対策の策定に関心がもたれることとなった。

また、2003年度の国内チーズ消費量は255,889トンで、そのうちナチュラルチーズが136,486トンと半数以上を占める。9年前(1994年)のチーズ消費量は189,500トンであり、近年チーズを使用した料理が日本人の食生活にとけ込んできていることが伺える。

これまで、チーズ製造工程における *L. monocytogenes* 制御に関する国外での研究は数多くされているが、製造後の本菌の挙動についての報告は少ない。そこで、本研究では *L. monocytogenes* に汚染されたチーズが飲食店や家庭等で冷蔵保存された場合、消費されるまでの菌の挙動を知る目的で、実験的に市販のナチュラルチーズ表層に菌を接種して、菌数の推移を試験した。

B. 研究方法

1. *L. monocytogenes* 菌数の変動

Brain heart infusion (DIFCO) で 30℃、20時間、3代継代した *L. monocytogenes* 4b (685: 臨床由来株) および *L. monocytogenes* 1/2b (LC3: 食中毒原因チーズ由来株) を滅菌生理食塩水で10倍段階希釈して接種菌液を調製した。使用したチーズはグリユエール、レッドチェダー、カマンベール (France製、国産各1種類) およびモッツアレラの5種類とし、チーズブロック(5~10g) 当たり 10^5 cfu となるよう、表面に希釈菌液を接種した。菌を接種したチーズは滅菌合成樹脂性袋に採取し、ヒートシールした後10℃で最長63日間保存した。経日的にサンプルを3検体ずつ開封し、滅菌蒸留水を9倍量加えて、10倍乳剤を調製した。その0.1mlを、また必要に応じてその10倍段階希釈液をPALCAM寒天培地 (Merk) 2枚に塗抹し30℃で48時間培養して、*L. monocytogenes* 菌数を測定した。なお、平板上に菌の発育が見られないと推定されるサンプルは、10倍乳剤1mlを5枚のPALCAM寒天培地平板に塗抹して培養する方法並びに10倍乳剤10mlを2倍濃度のHalf Fraser broth (Merk) 10mlに接種し、30℃48時間増菌培養後、PALCAM寒天培地で培養する方法で菌の生残を確認した。なお、使用したチーズは予め、Half Fraser broth に

よる増菌培養法で *L. monocytogenes* が陰性であることを確認した。

2. 生菌数の変動

L. monocytogenes 菌数の測定に使用したチーズサンプルの 10 倍段階希釈液は、標準寒天培地(栄研化学)で混釈培養し、30℃、48 時間後に発育した生菌数を測定した。

3. pH、塩分濃度の測定

L. monocytogenes 菌数の測定に使用したチーズサンプルの 10 倍乳剤は 3,000r.p.m、15 分遠心した後、上清を 0.45 μ m のミリポアフィルターで濾過滅菌して試料とした。

pH は HORIBA twin pH(堀場製作所)を、塩分濃度は SALTLY 島津ハンディ塩分計 SAL-1 (SHIMADZU) を用いて、添付の取扱説明書に従い測定した。

4. 水分活性の測定

菌未接種の 10℃ 保存チーズサンプル(対照)について、菌接種前、保管 35 日後および 63 日後に ro-tronic-Hygroskop DT (GSI クレオス) を使用して水分活性を測定した。

C. 研究結果

1. 10℃ 保存下における *L. monocytogenes* 菌数

熟成・乾燥型チーズのグリュエールおよびレッドチェダーにおける菌数の変化を図 1 に示した。なお、グラフにプロットし

た値は 3 サンプルの平均値である。グリュエールでは、保存期間中、供試した 685 株(臨床由来、血清型 4b)、LC3 株(食中毒原因チーズ由来、1/2b)共に徐々に減少した。その速度は菌株によって異なり、685 株が保存 63 日後に logs 1.6(log5.4 から log3.8 に)と緩やかに減少したのに対し、LC3 株は logs 3 (log5.4 から log2.5 に)減少した。レッドチェダーでは、保存 8 日後まではいずれの菌株も初期菌数を維持した。その後 685 株は 30 日以降急速に減少し、保存 63 日後に初期菌数を logs 4 下回った。LC3 株の減少速度はさらに速く、保存 56 日後に平板培養法および増菌培養法いずれの検査方法でも菌を検出することができなくなった。

ソフトチーズのカマンベール(France 製、国産)とモッツアレラにおける菌数の変化を図 2 に示した。カマンベールでは France 製、国産、並びにいずれの菌株も保存 1 日後には logs 0.5 ほど増加した。その後いずれのカマンベールでも菌の増加は急速に進み、3 日後には初期菌数を logs 2 ほど上回り、以後さらに増加を続けて France 製が 9 日以降から最終保存日の 63 日まで logs 7、logs 8 台を維持した。また国産カマンベールでの菌数は France 製よりも早い速度で増え、9 日以降最終保存日まで logs 9 台であった。モッツアレラでは 685 株が保存 7 日後まで菌数の変化はなかった

が、その後 35 日まで平均世代時間 97 時間の速度で増加した。LC3 株は 385 株よりも遅れて保存 21 日以降に増加し、42 日後には初期菌数を $\log_{10} 1.2$ 上回った。今回検討した 3 種類のソフトチーズでは、供試したいずれの菌株も保存期間中死滅するには至らなかった。

2. 10℃保存下における生菌数

熟成・乾燥型チーズにおける生菌数の変化を図 3 に示した。*L. monocytogenes* を接種したグリュエールの生菌数は 15 あるいは 22 日まで、またレッドチェダーは 22 あるいは 35 日まで減少傾向にあったが、その後増加に転じた。なお、菌未接種のグリュエールおよびレッドチェダー対照の生菌数は、保存 0 日で各々 $8.4 \times 10^5 \text{cfu/g}$ および $2.2 \times 10^8 \text{cfu/g}$ であり、保存期間中に変化はなかった。

ソフトチーズの生菌数を図 4 に示した。France 製カマンベール、国産カマンベールおよびモッツアレラ対照の生菌数は各々 $4.7 \times 10^8 \text{cfu/g}$ 、 $< 30 \text{cfu/g}$ 、 $2.3 \times 10^8 \text{cfu/g}$ であった。*L. monocytogenes* を接種した France 製カマンベールの生菌数は保存 42 日後までチーズ 1 g あたり $\log_{10} 8$ 台の菌数を維持し、56 日後に減少して $\log_{10} 7$ 台となった。国産カマンベール対照は生菌数が $< 30 \text{cfu/g}$ であったため、接種した *L. monocytogenes* の菌数変化が生菌数の変化として反映され、保存 1 日後 $\log_{10} 8$ 台にま

で達し、その後も菌数を維持した。モッツアレラの生菌数は保存期間中、僅かな増加と減少を繰り返し、終始 $\log_{10} 7 \sim 9$ 台であった。

3. 10℃保存下におけるチーズの pH

熟成・乾燥型チーズの pH 変化を図 5 に示した。今回の試験に使用したグリュエールおよびレッドチェダーの pH は各々 6.4 と 5.7 で、この値は保存 63 日間を通して殆ど変化しなかった。

ソフトチーズの pH 変化を図 6 に示した。菌接種前の France 製カマンベール、国産カマンベールおよびモッツアレラの pH は各々 7.2、6.4、5.8 であった。菌接種後の保存期間中、France 製カマンベールの pH は殆ど変化せず、63 日後の値は対照チーズと同じく 6.8 であった。国産カマンベールおよびモッツアレラも同様で、56 日間の保存期間中、pH の変化は殆どなかった。

4. 10℃保存下におけるチーズの塩分濃度

熟成・乾燥型チーズの塩分濃度変化を図 7 に示した。保存期間中、グリュエールの塩分濃度は 1.9~3.8 の間で推移し、レッドチェダーでは 1.6~2.9 であった。

ソフトチーズの塩分濃度変化を図 8 に示した。France 製カマンベールの塩分濃度は 1.8~3.9 で、国産カマンベールは 0.7~1.4、モッツアレラは 0.3~0.8 で推移した。

5. 10℃保存下におけるチーズの水分活

性

L. monocytogenes 未接種チーズ（対照）の水分活性を表 1 に示した。グリュエールの水分活性は保存 0 日の 0.93 から 63 日後に 0.91 となった。レッドチェダーは 0.96 から 63 日後に 0.94 となった。France 製および国産カマンベールは各々 0.97 と 0.98 から 63 日後に 0.94 と 0.96 になった。モッツアレラは 0.98 から 56 日後に 0.97 となり、いずれのチーズも水分活性に大きな変化は見られなかった。

D. 考察

グリュエールの *L. monocytogenes* は、保存期間中減少し続けた。この菌の減少要因としては、同チーズ保存中の水分活性が 0.93~0.91 であり、*L. monocytogenes* の発育可能水分活性下限値が 0.92 付近（pH など他の条件との組み合わせによっても変動はある）であることから、増殖が抑制されたと考えられる。また一要因として、同チーズの生菌数が初期に減少したものの、その後増加に転じて保存 63 日に初期の菌数となったことから、同チーズの細菌叢との間に競合があったものと考えられる。

レッドチェダーのスターターとしては乳酸菌が利用される。乳酸菌はそれが生成する乳酸とそれに伴う pH の低下のほかに、副生する少量の揮発性脂肪酸や過酸化水素が有害微生物を抑制する効果を持っている

と言われる。今回供試したレッドチェダーの乳酸菌数が保存期間中 logs6~7cfu/g（データ示さず）であったことから、*L. monocytogenes* はチーズ本来の細菌叢である乳酸菌によって増殖が抑制されたものと考えられる。

検討したいずれの熟成・乾燥型チーズにおいても、*L. monocytogenes* は 10℃保存下では増加することなく減少し、あるいは死滅した。今回の研究では、より低い温度帯での保存実験を行っていないが、過去の研究報告によると、*L. monocytogenes* の世代時間は 10℃で 10 時間、4.4℃で 36 時間であることから、チーズの流通・販売温度、飲食店や家庭等における保存温度は、10℃よりも低い温度が *L. monocytogenes* の抑制に効果的で適切と考えられる。

カマンベールでは輸入品、国産品問わず、*L. monocytogenes* の増殖速度が速く、63 日以内に減少することはなかった。いずれのカマンベールの pH も *L. monocytogenes* の発育可能最小 pH4.6（10℃）を上回り、菌の増殖には好適な環境であった。France 製のカマンベールの塩分濃度は保存期間中 1.8 ~ 3.9 % で推移したが、*L. monocytogenes* は高濃度の食塩に抵抗することが知られており、この濃度域は菌の抑制要因として作用しなかったものとする。

今回使用したモッツアレラの消費期限は保存 12 日目にあたる。*L. monocytogenes*

はこの頃まで接種した初期菌数を維持し、さらに消費期限以降にあつては増殖速度を速めて増加し、56日後も死滅することはなかった。*L. monocytogenes*の低温増殖性を考慮すると、モッツアレラのようなフレッシュチーズは10℃よりも低温での保存と消費期限内の喫食が望まれる。

FDAの報告によると、*L. monocytogenes*はスモークされた魚介類、生の魚介類、果物、発酵ソーセージなどを数%~数十%の割合で汚染している。また、本菌は土壌、河川水、植物など広範囲の環境材料から分離される。*L. monocytogenes*フリーな状態で出荷されたチーズが喫食やカット工程時などに取扱の不備によって他の食品や環境から2次汚染された場合には、チーズ中で長期に渡り生存しうることが今回の研究で明らかとなった。

L. monocytogenes 防御は菌の汚染を避けることは言うまでもないが、より低温の冷蔵下でチーズを保存することは、菌の増殖速度を抑制する効果もあり、流通、販売および保存時の重要な管理点と考える。

また、低温増殖性の *L. monocytogenes* の発育を完全に阻止することは難しい。近年注目されている微生物やその代謝産物を利用したバイオプリザベーションを活用した *L. monocytogenes* 抑制法にも期待したい。

E. 結論

L. monocytogenes は10℃保存した熟成・乾燥型チーズにおいて、63日の保存期間中増加することなく、減少あるいは死滅した。カマンベールでは、保存1日後から急速に増殖し、保存期間中高い菌数を維持した。モッツアレラでは、増殖開始時期に菌株差が見られ、保存7日あるいは21日後までは菌数の変化がなく、その後いずれの菌株も増殖して56日後まで死滅しなかった。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

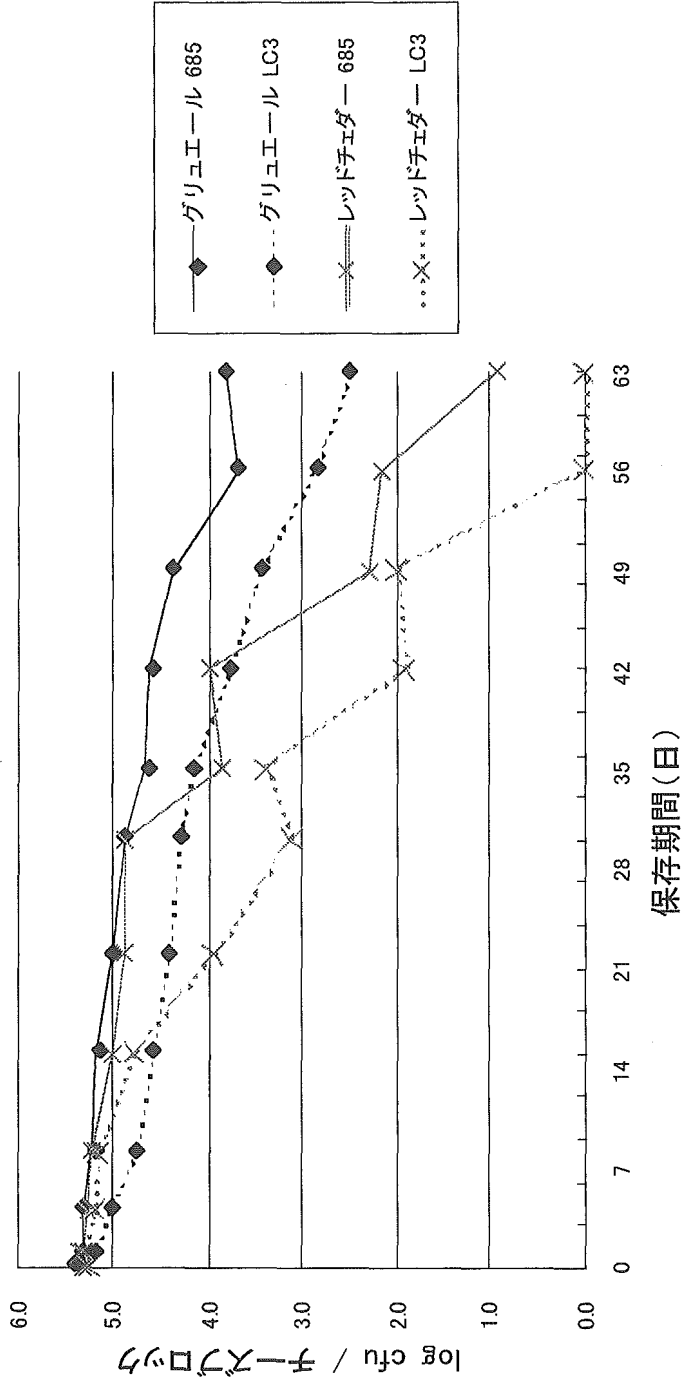


図1 10°C保存下における熟成・乾燥型チーズの *Listeria monocytogenes* 菌数

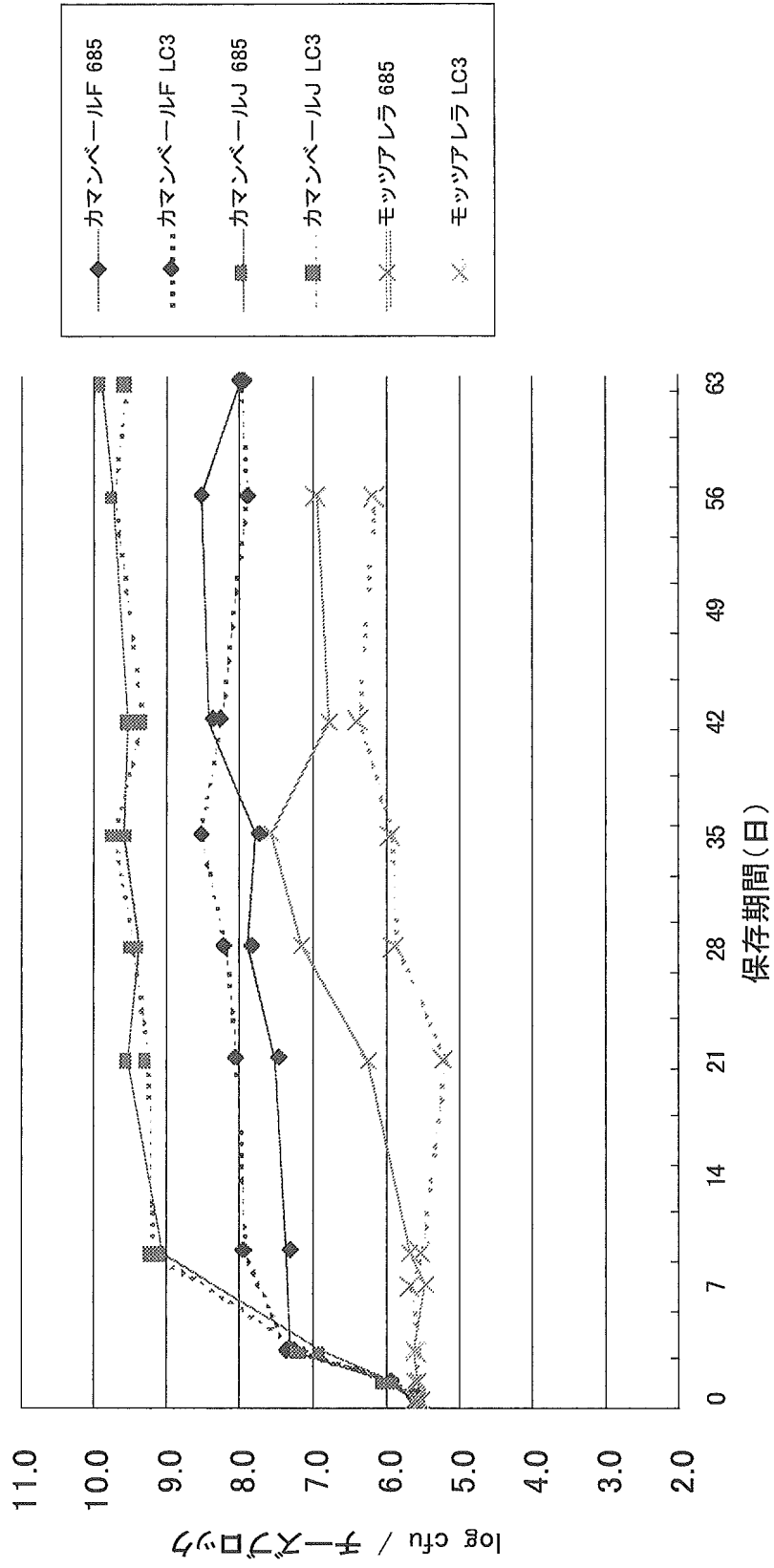


図2 10°C保存下におけるソフトチーズの *Listeria monocytogenes* 菌数

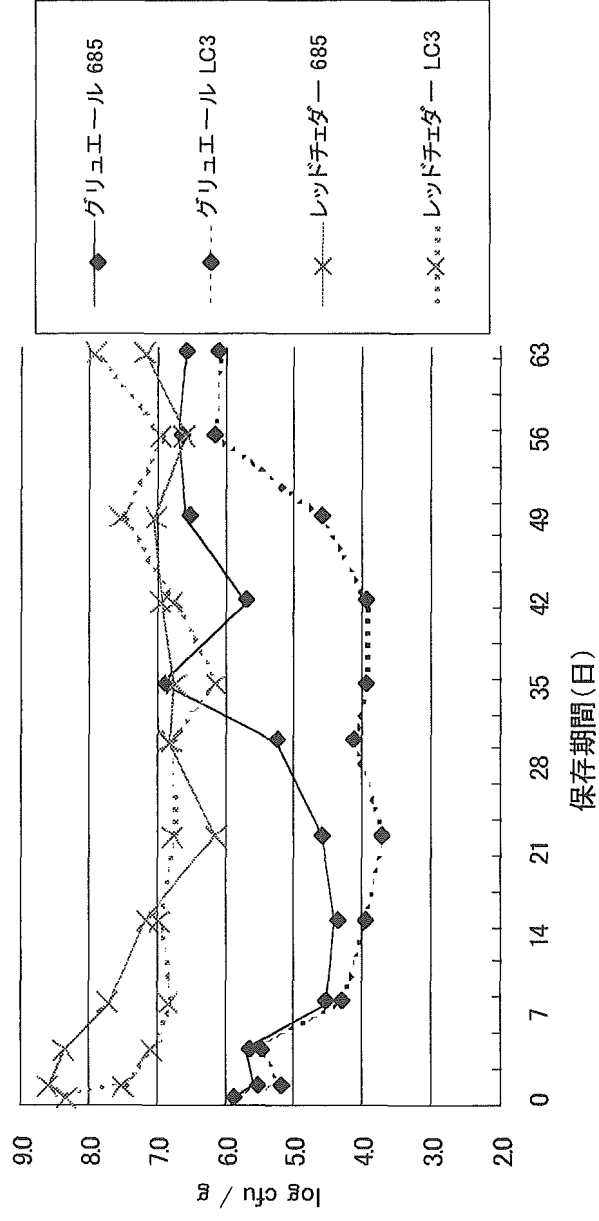


図3 10°C保存下における熟成・乾燥型チーズの生菌数

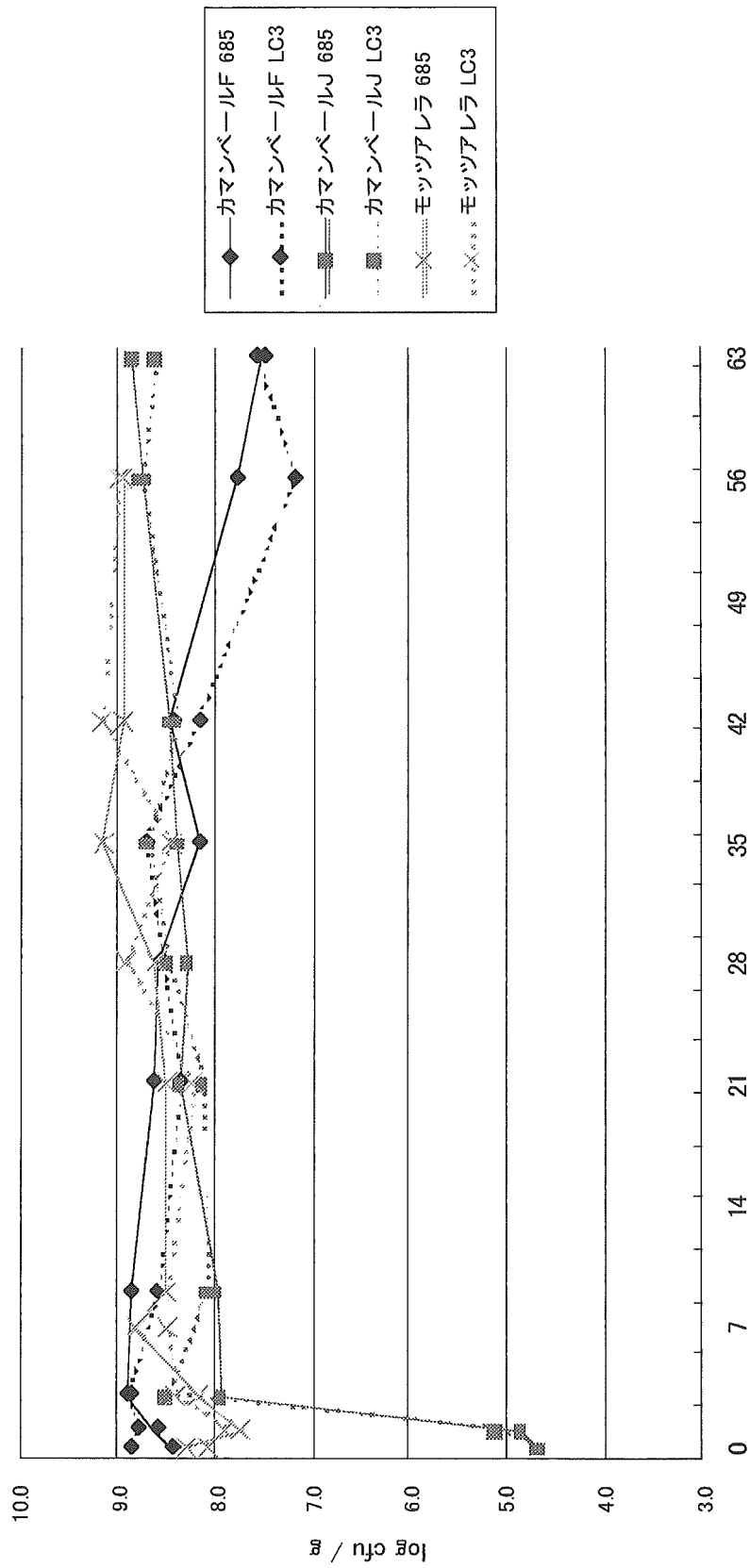


図4 10°C保存下におけるソフトチーズの生菌数

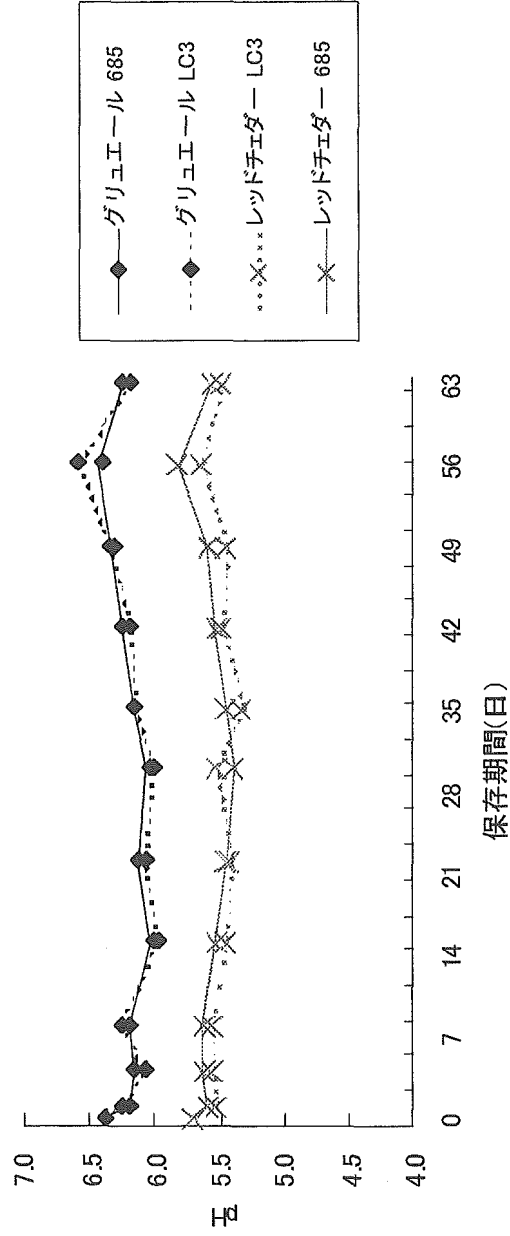


図5 10°C保存下における熟成・乾燥型チーズのpH変化

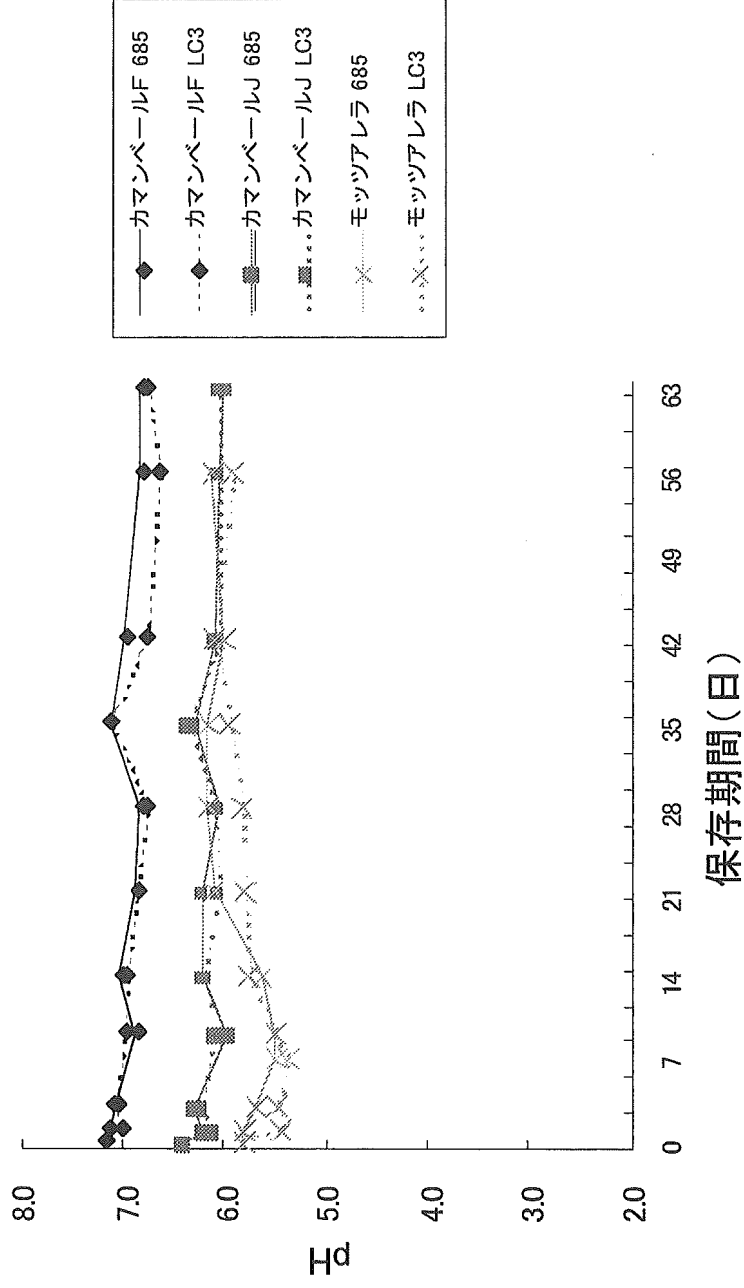


図6 10°C保存下におけるソフトチーズのpH変化

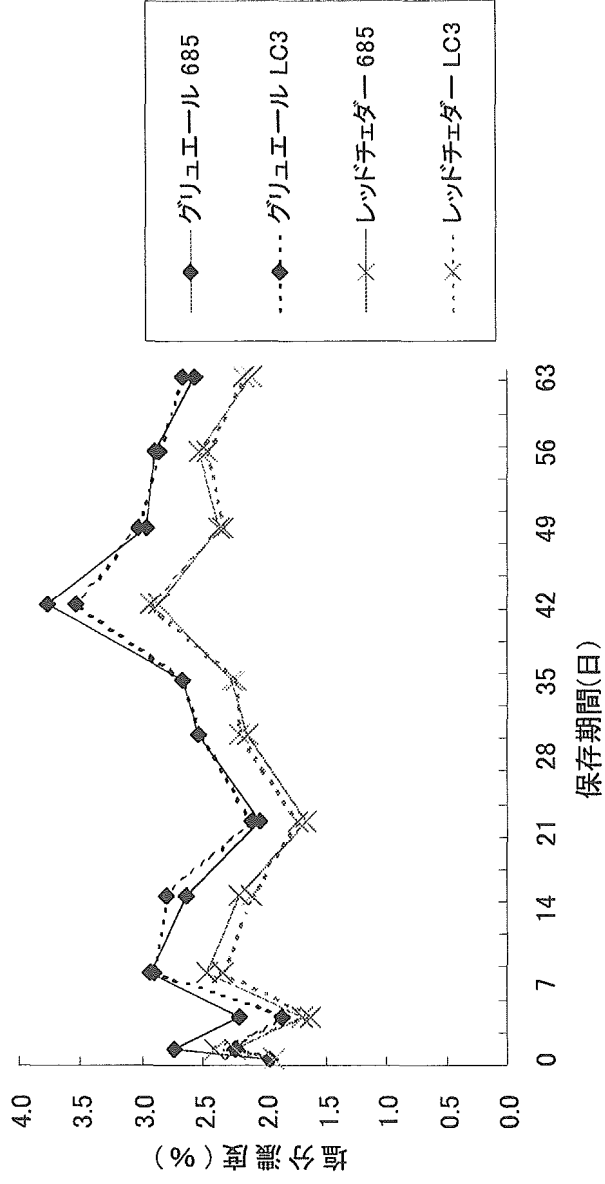


図7 10°C保存下における熟成・乾燥型子ーズの塩分濃度変化

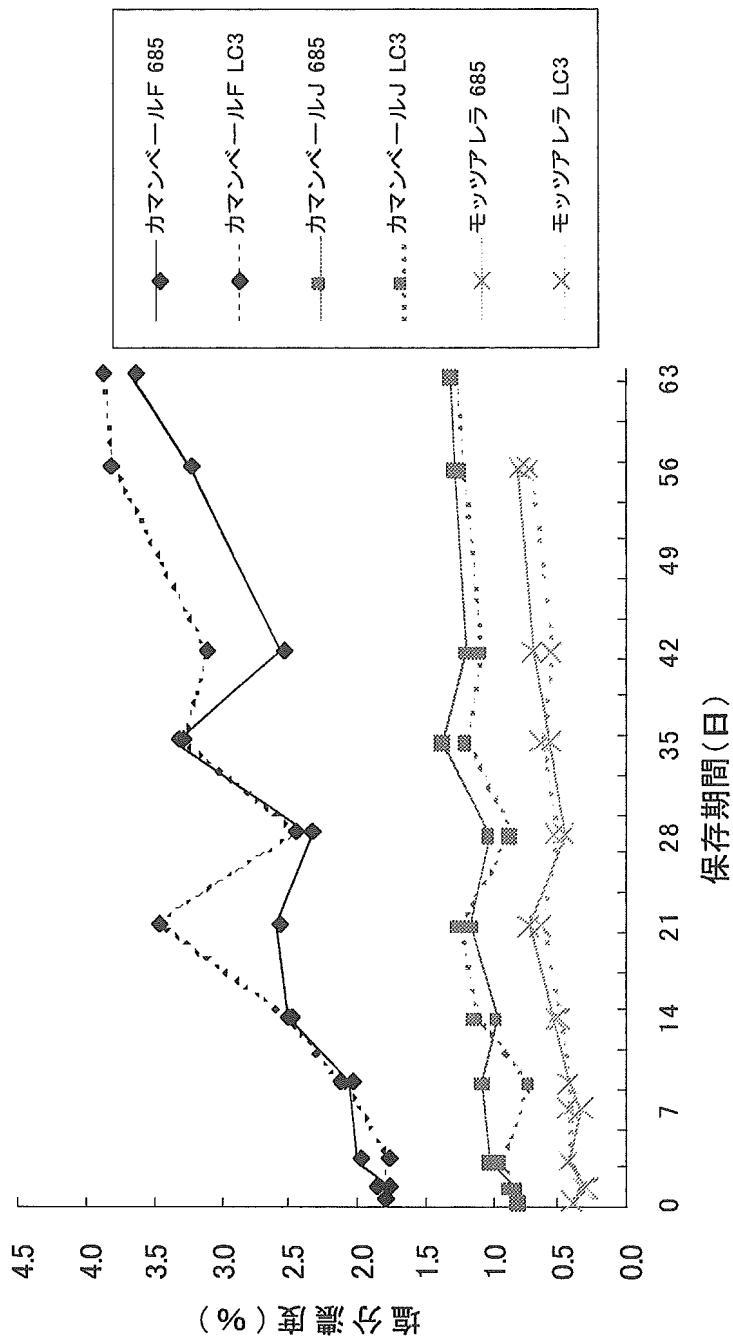


図8 10°C保存下におけるソフトチーズの塩分濃度変化