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／*C. jejuni* (%)	耐性／*C. coli* (%)
03	31／81 (38. 3)	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)
06	88／207 (42. 5)	39／131 (29. 8)	49／76 (64. 5)
計	152／386 (39. 4)	82／246 (33. 3)	70／140 (50. 0)

表３、出荷１週間前のブロイラーからのカンピロバクター分離状況とナリジクス酸感受性

農場ー鶏群	サンプル数	陽性数	NA感受性数	NA耐性数
A 1	12	11	11	0
A 2	12	10	10	0
A 3	12	9	9	0
B 1	12	0	0	0
B 2	12	0	0	0
C 1	12	12	0	12
C 2	12	9	0	9
D 1	12	11	11	0
D 2	12	10	10	0
E 1	10	7	7	0
F 1	10	3	3	0
G 1	10	10	10	0
H 1	10	10	10	0
I 1	10	9	0	9
J 1	10	7	6	1
J 2	10	9	8	1
K 1	10	7	7	0
K 2	10	8	3	5
L 1	10	9	8	1
計	196	151	113	38

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

平成１８年度　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）

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　五十君靜信　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
木村　稔　北海道立中央水産試験場・科長
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・教授
本藤　良　日本獣医生命科学大学・名誉教授
落合　由嗣　日本獣医生命科学大学・助手
小笠原邦敏　横浜検疫検査センター
庄司　紘史　国際医療福祉大学リハビリテーション学部教授
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、以下の研究を行った。

１．シロサケ筋子製造におけるリステリアの危害分析

２．味付けカズノコ製造におけるリステリアの危害分析

３．ナチュラルチーズからのリステリアの迅速検出法の検討

４．国内で分離されたリステリア臨床株の分子疫学的研究

５．輸入食肉から分離されるリステリアにつき国内分離株との異同につき検討

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、リスクマネー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、製造工程全体にわたる微生物を調査し、危害分析を試み、具体的なリスクマネージメントの方法に関する情報を提供する。これにより、リステリアに対するリスクマネージメントをどのように行うべきか明かとなり、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、魚卵加工品を主な対象とした。

B. 研究方法

1．シロサケ筋子製造におけるリステリアの危害分析

道東海域で漁獲された生鮮シロサケを用いた筋子製造における、原材料、製造工程、製造環境における汚染指標菌およびリステリアの汚染状況を明らかにし、リステリアの菌数の変動を明らかにした。すべての試料はリステリアのほかに，標準寒天培地(日水製薬㈱)による一般生菌数を，また，クロモアガーColiform ECC(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.

2．味付けカズノコ製造におけるリステリアの危害分析

調味カズノコにおいて，輸入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。カナダ産の輸入ペール缶を原料として用いて製造される加工製品につき、原材料、製造工程、製造環境における汚染指標菌およびリステリアの汚染状況を明らかにした。

3．ナチュラルチーズからのリステリアの迅速検出法の検討

PCR法を用いてチーズから*L. monocytogenes*を迅速に検出する方法を検討した。チーズのEB 増菌液および half fraser 増菌液に *L. monocytogenes*を接種しDNAを抽出してPCR法を実施した。

4．国内で分離されたリステリア臨床株の分子疫学的研究

全国の病院から送付された *Listeria monocytogenes* 臨床由来株３３検体を使用した。リボタイピングの手法を用いた *L. monocytogenes*の型別は、各菌株をBrain Heart Infusion寒天培地 (Difco) 上で37℃一夜培養後、RiboPrinter® System(DuPont) 及びRiboPrinter® SystemEcoRI Batch Kit（タカラバイオ）を用い、そのマニュアルに従って加熱処理後に行った。制限酵素はEcoRIを使用した。血清型が同定されていない菌株はリステリア免疫診断用血清「生研」（デンカ生研）を用いて血清型別を行った。

5．輸入食肉から分離されるリステリアにつき国内分離株との異同につき検討

11 カ国（タイ、ブラジル、ニュージーランド、米国、アイルランド、カナダ、オーストラリア、中国、デンマーク、フランス、メキシコ）から輸入された生肉から分離した *L. monocytogenes* 菌株と国内分離菌株について、*iap*領域の塩基配列を決定し、系統樹解析を行った。

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ただきたい。

（倫理面への配慮）

当研究においては，リステリア症に関する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、個人情報の保護について最大限の倫理的な配慮を行った。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．シロサケ筋子製造におけるリステリアの危害分析

シロサケスジコ製造において、原材料から最終製品に至る全ての過程でリステリアは、検出されなかった。しかし、断頭機の魚体搬送ベルト、原魚裁割る工程における器具類および回収した魚卵を漬け込み工程に搬送するためのローラーコンベアー（軸受け部）で一般生菌数が顕著に高く、また、裁割工程の器具類、ローラーコンベアー設置床面で大腸菌群が陽性となり、大腸菌が検出された。これらの部分は、肉片や粘液などの汚れを溜めやすく、容易に排除しにくい箇所で、微生物増殖の温床となりやすい。これらの箇所が、リステリアに置いても重要な管理ポイントとなる。

2．味付けカズノコ製造におけるリステリアの危害分析

味付けカズノコ製造において、原材料から最終製品に至る全ての過程でリステリアは、検出されなかった。原卵は、カナダ産の輸入ペール缶を使用しており、飽和塩水漬けされており水分活性は非常に低かった。一般菌数は10^4CFU/gであったが、工程中に菌数は低下し、最終製品中では10^2CFU/gと低かった。周辺環境の拭き取りでは、運搬台車の内枠、作業エリア床、保冷庫床、踏み台で一般生菌数が顕著に高く、大腸菌群も10～10^4CFU/g検出された。

3．ナチュラルチーズからのリステリアの迅速検出法の検討

チーズのEB増菌液及びhalf fraser増菌液に*L. monocytogenes*を接種しDNAを抽出してPCR法を行ったところ、アルカリ熱抽出のみでは10^6個/mlで検出されない場合があった。市販のキットを用いたが、検出感度は10^5個/mlまででであった。このレベルは、増菌後の菌数レベルの低い場合には直接PCRでは検出困難と思われる。チーズを対象とするこのような迅速法には、まだ検討が必要である。

4．国内で分離されたリステリア臨床株の分子疫学的研究

リボタイピングの結果から、今回調査した臨床由来リステリア菌株の30株が既存のDupont ID Number（DUP）１５種類に分類された。既存のDUPに分類されないもの(none)は3株見られ、そのうち2株は同一のリボパターン(none1)を示した。また、３３株中７株（２１．２%）がDUP1038に分類され、それらは全て血清型４ｂであった。他にも複数の株が分類されたDUP8種のうち、DUP18596に型別された3株とDUP18611に型別された2株が血清型４ｂに属していた。

血清型1/2aに属する8株は7種のDUPに、血清型1/2bに属する5株は4種のDUPに、血清型4bに属する19株は9種のDUPに型別された。一方、各DUPに型別された複数の菌株の分離地区には特に傾向は見られなかったため、特定の分離地区に多いDUPは特にないと思われた。

5．輸入食肉から分離されるリステリアにつき国内分離株との異同につき検討

輸入株30株は輸入国と血清型に対応して、EGD株とは異なる10型に分類された。この内3型は、本邦分離株で作成した系統樹中で新しい枝を形成していたが、本邦分離株のみで作成した系統樹を大きく変化させることはなかった。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ただきたい。

D. 考察

1．シロサケ筋子製造におけるリステリアの危害分析

シロサケ筋子の製造工程、原材料、中間製品、最終製品のいずれからもリステリアは検出されなかったが、断頭機の魚体運搬ベルト、原魚裁割工程における機器類等、ローラーコンベアの軸受け部で、一般生菌数が顕著に高いことから、これらの箇所での微生物制御を重点的に行う必要がある。裁割工程の機具類やローラーコンベア設置床面では、大腸菌群が陽性であり、このような器具や周辺環境からの交叉汚染の対策も重要である。

2．味付けカズノコ製造におけるリステリアの危害分析

調味カズノコの製造工程、原材料、中間製品、最終製品のいずれからもリステリアは検出されず、輸入原材料から最終製品に至るまで一般生菌数も低く、最終製品で、一般生菌数は10^2CFU/g程度であることから、製品自体の微生物制御は比較的良好である。一方、製造環境の拭き取り検査では、大腸菌群が10～10^4CFU/g検出され、このような周辺環境からの交叉汚染により、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。このような観点から、一般衛生管理事項の再点検と、製造環境の徹底した洗浄・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。

3．ナチュラルチーズからのリステリアの迅速検出法の検討

PCR 法を用いた増菌培養液からの *L. monocytogenes* の簡易迅速な検出方法を検討した。EB 培地に *L. monocytogenes* を接種し、アルカリ熱抽出法による検出感度を検討したところ 10^4 cfu/ml であった。しかし、チーズに増菌培地(EB または half Fraser)を添加し、24時間培養後の培養液に *L. monocytogenes* を接種し、同様にアルカリ熱抽出法でPCRを行ったところ、10^6 cfu/ml でも検出できない場合があった。このことから、チーズの成分によってPCR反応が阻害されていると考えられた。そこで、市販のDNA抽出キットを用いた抽出を検討した。最も検出感度のよかったものは QIAamp キットであったが、この方法でも安定して検出できたのは 10^5 cfu/ml までであった。
チーズ25g当たり10cfuのレベルで菌を接種してEB培地あるいはhalf Fraser培地で24時間培養後の培養液中の *L. monocytogenes* の菌数を測定したところ 10^2～10^6 cfu/ml であったため、増菌後の菌数が低い場合に上記の方法では検出ができないと考えられた。チーズはタンパク質、脂肪などPCR反応を阻害する物質が多いため一次増菌液から簡易に DNA サンプルを作製することは容易ではなく、今後の検討が必要である。

4．国内で分離されたリステリア臨床株の分

子疫学的研究

今回の研究により、以前行った10種の病原因子の保有状況では型別できなかった患者由来株の分子疫学的型別が、リボタイピングの手法を用いることにより可能となることが示された。また、もっとも普遍的に行われている本菌の型別方法である血清型別で同一のタイプに分類される菌株もリボタイピングにより更に細かな型別が可能であることが示された。また、リボタイピングは試薬類及びリボプリンターシステムが高価であることが欠点ではあるが、大変簡便であり、操作者による結果の差が極めて少ないところが同じく本菌の遺伝子型別に用いられるパルスフィールドゲル電気泳動と比較して大変有用であると思われた。

全国各地で分離された患者由来株の2割以上がDUP1038に型別される血清型4bの菌株であった。今後国内産食品や輸入食品等から分離された本菌のリボタイピングによる型別を行うことで、同じ遺伝子型別に分類される菌株がどのような食品に多く含まれているかを明らかにすることが可能となり、食品媒介リステリア症の原因食品を迅速に同定するための有用な情報となりうると思われた。

今回試験した臨床由来株33株のうち3株はDuPont社のデータベース上（85菌株が*L. monocytogenes*として登録）で同一とされる菌株が見られない株であり、国内に限局して存在している株である可能性が示唆された。

5．輸入食肉から分離されるリステリアにつき国内分離株との異同につき検討

輸入株30株は輸入国と血清型に対応して、EGD株とは異なる10型に分類された。この10型中の3型は、本邦株で作成した系統樹中で新しい枝を形成していたが、本邦株のみで作成した系統樹を大きく変化させることはなかった。従って、輸入株も本邦株と同様に分子進化学的にA、B、C群の3系統に大別可能な系統樹上に分類し得ることを明らかにした。また、この3系統に含まれる分離株の血清型の分布との関連を解析することにより、系統と血清型との強い関連性を明らかにした。

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ただきたい。

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、主に魚卵加工品を対象にその製造工程における危害分析を行った。リステリアのハイリスク食品であるナチュラルチーズについては、迅速検出法を検討した。菌株に関する分子疫学的検討については、食品・環境由来株と臨床分離株の特徴が示された。国内で分離された患者由来株が多くのリボタイプに型別されたこと、それらの約2割が同一の型に分類されたこと、また、約1割はDuPont社のデータベースに同一株が見られず未報告の株であったことなどが示された。個々の研究はそれぞれにつき研究目標を設定していたが、いずれも充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ただきたい。

F. 研究発表

論文発表

1. Yamada F, Ueda F, Ochiai Y, Mochizuki M, Shoji H, Ogawa-Goto K, Sata T, Ogasawara K, Fujima A and Hondo R. (2006) Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. J. Microbiol. Methods 66(1), 96-103.
2. Asakura H, Kawamoto K, Igimi S, Yamamoto S, Makino SI. (2006) Enhancement of mice susceptibility to infection with *Listeria monocytogenes* by the treatment of morphine. Microbiol. Immunol. 50(7): 543-547.
3. Okada Y, Okada N, Makino SI, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S. (2006) The sigma factor, RpoN (sigma54) is involved in osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett. 263(1):54-60.
4. Takeshi K, Kitagawa M, Kadohira M, Maruyama T, Igimi S, Kawamoto K, Makino S-I. (2007) Hazard Analysis of *Listeria monocytogenes* Contaminations in Processing of Salted Roe from Alaska Pollock (Theragra chalcogramma) in Ho kkaido, Japan. J. Food Protect., in press.
5. 仲真晶子. (2006) 食品の *Listeria monocytogenes*汚染実態. 日本食品微生物学会雑誌, 23(4) : 183-189.
6. 五十君靜信. (2006) 国内のリステリア症の現状とその制御に向けて。日本食品微生物学会雑誌, 23(4):190-193
7. 丸山務、五十君靜信. (2006) シンポジウム *Listeria monocytogenes*の研究動向 司会の言葉。日本食品微生物学会雑誌 23(4):182
8. 仲真晶子. (2006) 食品媒介リステリア症. 臨床栄養, 108(5) : 512.

口頭発表

1. 清家一生、福田雅史、小笠原邦敏、本藤良、植田富貴子。*Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎的研究、7. *Listeria monocytogenes* 輸入株における分子進化学的解析（2）。第142回日本獣医学会学術集会、2006。
2. 樋口 篤、仲真晶子、小西典子、下島優香子、尾畑浩魅、門間千枝、矢野一好、甲斐明美、福山正文、山田澄夫. チーズからの *Listeria monocytogenes*検出法の比較検討. 第27回食品微生物学会学術集会. 平成18年9月. 大阪.
3. 仲真晶子、小西典子、下島優香子、石崎直人、尾畑浩魅、門間千枝、矢野一好、甲斐明美、五十君靜信、諸角 聖、山田澄夫. *Listeria*のヒト糞便からの検出状況. 第27回日本食品微生物学会学術総会. 平成18年9月. 大阪.
4. Okada Y, Makino S-I, Okada N, Asakura H, Yamamoto S and Igimi S. Identification and analysis of the osmotolerance associated genes in *Listeria monocytogenes*. 10th International Symposum on Toxic Microorganisms.

Washington DC USA. November 8, 2006.

5. 五十君靜信。食品媒介感染症としてのリステリア症の現状。ILSI Japan食品汚染微生物　シンポジウム。2006.12.7
6. 五十君靜信。国内のリステリア症の現状。リステリア菌髄膜炎の11ヶ月の乳児例に関する指定発言。第546回日本小児科学会東京都地方会談話会2007.3.10。帝京大学。東京
7. 岡田由美子、石和玲子、高谷幸、山本茂貴、五十君靜信。未殺菌乳を原料とするチーズ製造工程における*Liseria monocytogenes*の消長。日本細菌学会2007.3.26。大阪

書籍等

1. 植田富貴子、本藤良分担。光岡知足編集。菌株レベルの同定：シーケンスによる分離株間の分子疫学的解析。 腸内細菌の分子生物学的実験法。pp48-53　(財) 日本ビフィズス菌センター。2006。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

   なし
2. 実用新案登録

   なし
3. その他

   なし

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）
（受託事業報告書）

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
筋子製造における *Listeria monocytogenes* に対する危害分析

北海道立釧路水産試験場利用部

担当者　北川雅彦（主任研究員）
麻生真悟（利用技術科長）
宮崎亜希子（原料化学科・研究職員）
飯田訓之（利用部長）

研究要旨

シロサケ筋子製造において，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．

その結果，製造工程，原材料，中間製品，最終製品のいずれからも本菌は検出されなかった．しかし，断頭機の魚体搬送ベルト，原魚裁割工程における器具類および回収した魚卵を漬け込み工程に搬送するためのローラーコンベア（軸受け部）で一般生菌数が顕著に高く，また，裁割工程の器具類，ローラーコンベア設置床面で大腸菌群が陽性となり，しかも大腸菌が検出された．これらは，機器の構造が微小な肉片や粘液などの汚れを溜めやすく，容易に排除しにくいものであることと，洗浄および殺菌が効果的に実施されていなかったことにより，微生物増殖の温床となっていること，更に当該コンベア設置場所を本来通路として使用しないことになっているものの，作業員が原魚裁割工程から直接進入することによって交差汚染したことによるものと考えられた．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ので，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

シロサケ筋子（以下筋子とする）を介した *Listeria monocytogenes*（以下リステリア菌とする）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 18 年 9 月から平成 18 年 10 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，筋子をはじめ醤油漬けイクラ，サケドレス冷凍品等を製造している。

2. 調査試料

(1) 原材料

道東海域で漁獲された生鮮シロサケを氷冷下で工場に搬入し，直ちに裁割して卵巣を分離，回収した。この卵巣を筋子製造用の原料とした。

(2) 製造工程

裁割工程における腹出し直後の魚卵および筋子製造工程において中間製品である「洗浄・水切り後の魚卵（以下洗浄魚卵とする）」，「飽和塩水漬け込み・水切り後の魚卵（以下漬け込み

魚卵とする)」および「加圧熟成後の魚卵（冷凍直前の最終製品，以下最終製品とする)」について調査した.

(3) 製造環境

作業室の床，作業員手袋，作業台，調理器具類，漬け込み機，洗浄水タンク，台車，運搬用パレット，ローラーコンベア等を環境試料とした.

(4) 細菌検査および理化学試験

腹出し直後の魚卵，洗浄魚卵，漬け込み魚卵および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．また，これらについては滅菌リン酸緩衝液(ステリウォーター)で10倍乳剤を調製し，標準寒天培地(日水製薬㈱)による混釈培養により一般生菌数を，また，クロモアガーColiform ECC(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．さらに，上述した試料について蒸留水で10倍乳剤を調製して理化学的試験を行った．すなわち，pHをガラス電極法，塩分をN/10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10×10 cmを拭き取り（ふきふきチェックⅡ，栄研器材㈱)，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種類のリステリア培養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(日水製薬㈱)による一般生菌数を，また，クロモアガーColiform ECC(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

(5) 原材料，中間製品，最終製品

筋子の製造工程を図１に，腹出し直後の魚卵，中間製品である洗浄魚卵および漬け込み魚卵の微生物学的試験及び理化学的試験の結果を表１に，最終製品のそれを表２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．一般生菌数については，腹出し直後の魚卵から 10^2 cfu/g に検出され，これを洗浄処理(真水)した後も 10^2 cfu/g と腹出し直後の魚卵レベルと同様であった．次ぎに，この洗浄卵を飽和塩水による漬け込み処理を行った魚卵では，菌数の増加は認められず，10^2cfu/g を維持していた.

この漬け込み魚卵は樹脂製容器に充填され，容器専用の蓋にて密閉した後，容器を所定の量に積み重ね，上部より加圧して室温にて熟成を行った。これらは，およそ６日間の熟成の後，出荷まで冷凍貯蔵される．そこで，加圧熟成が終了し，冷凍貯蔵に供される直前の卵（最終製品）の一般生菌数を測定したところ，10^2～10^3cfu/g と加圧熟成前と同等か，微増していることが確認された.

理化学的性状を見ると，pH では腹出し直後の魚卵で6.22を示し，その洗浄魚卵では6.42とわずかに上昇した．一方，この洗浄魚卵を飽和塩水に漬け込んだ魚卵では6.19まで低下した．これらを加圧熟成した魚卵の pH は 6.10から6.19を示したことから，加圧熟成中のpHは安定しているものと推測された.

塩分濃度は漬け込み終了時に 6.6%を示し，加圧熟成後の魚卵では4.8～6.2%であった．水分活性は漬け込み前の魚卵で 0.996 と高い値を示したが，漬け込み終了後には0.896まで減少した。これを加圧熟成した魚卵では 0.930から0.938を示した.

(2) 製造環境の拭き取り試験

施設の拭き取り検査結果を図２に示した．原魚運搬工程での一般生菌数は，魚市場より加工場まで原魚を運搬するための金属製魚箱(原魚運搬 1)で 10^3cfu/100cm^2，フォークリフト通路で 10^5cfu/100cm^{2}を示した。また，大腸菌

群は後者で 10^2cfu/100cm^{2}であり，大腸菌が陽性となった。いずれもリステリア菌は検出されなかった。

断頭工程における一般生菌数は，魚体表面で 10^5cfu/100cm^2，断頭機の魚体搬送ベルト（断頭位置へ原魚を送り込むためのベルト）で 10^7cfu/100cm^2，断頭後に次工程へ魚体を送るためのベルトコンベアのベルトで 10^3cfu/100cm^{2}を示した。それらの大腸菌群は 10^1～10^2cfu/100cm^{2}であったが，魚体表面および断頭機魚体搬送ベルトで大腸菌を検出した。この工程でリステリア菌は検出されなかった.

裁割・魚卵回収工程を見ると，一般生菌数は作業場床で 10^4cfu/100cm^2，その床上に設置された金網製の作業員足場では 10^7cfu/100cm^{2}と顕著に高かった。一方，まな板，包丁，メフンかき（腹腔内の背骨に沿って配置されている腎臓を掻き取るスプーン様の金属性器具）では，いずれも 10^5cfu/100cm^{2}であり，腹出しされた魚卵を回収するためのザルは 10^4cfu/100cm^{2}であった。大腸菌群はザルでは陰性であり，メフンかき，作業床および足場では 10^2cfu/100cm^{2}となったが，まな板，包丁で 10^3～10^4cfu/100cm^{2}を示し，大腸菌が陽性となった。この工程においてリステリア菌は検出されなかった.

ザルに回収された魚卵は，ザルごと前工程の作業場からローラーコンベア（ステンレス製）により別室（漬け込み室）に設置された魚卵洗浄工程へ搬送される。この工程における一般生菌数は，ローラーコンベア設置床およびローラー表面で 10^4cfu/100cm^{2}であったが，ローラーの軸受け部では 10^6cfu/100cm^{2}と高い値を示した。また，それらの大腸菌群は 10～10^2cfu/100cm^{2}であり，ローラーコンベア設置床で大腸菌を検出した。また，魚卵洗浄用タンク（真水使用）では，一般生菌数が 10cfu/100cm^{2}となり，大腸菌群は陰性であった。洗浄後の魚卵を次工程に運搬するために使用する台車の一般生菌数は荷台表面で 10^5cfu/100cm^{2}を示し，大腸菌群 10cfu/100cm^{2}で大腸菌陽性となった．なお，この工程でもリステリア菌は検出されなかった.

洗浄魚卵の水切り工程において使用される樹脂製のパレット（洗浄された魚卵をザルごと静置するための台）では，一般生菌数が 10^6cfu/100cm^2，大腸菌群が 10^3fu/100cm^{2}と高かったが，大腸菌は検出されなかった。この工程においてもリステリア菌は検出されなかった.

漬け込み工程において，魚卵は飽和塩水を満たした円形タンクにて，攪拌しながら所定の時間浸漬される。当該タンクの内側および抵抗板取り付け部の一般生菌数はいずれも 10^4cfu/100cm^{2}であった．大腸菌群は前者で 10cfu/100cm^{2}を示したが，後者では陰性となった．この工程でリステリア菌は検出されなかった.

飽和塩水浸漬後の水切り・選別工程で使用される器材の一般生菌数は 10cfu/100cm^{2}と低く，大腸菌群も陰性であった．この工程での作業台表面（魚卵と接触）の一般生菌数は 10^3cfu/100cm^{2}であったが，大腸菌群は陰性となった。この工程においてリステリア菌は検出されなかった.

計量・箱詰め工程における一般生菌数は，計量器上皿および作業台表面で 10^3cfu/100cm^2，作業員手袋および作業台キャスター部で 10^4cfu/100cm^{2}を示した。大腸菌群は計量器上皿で 10cfu/100cm^{2}を示した以外は全て陰性であった。この工程における排水溝蓋（ステンレス製）の集水孔と壁立ち上がり部（床面と壁の境界部）の一般生菌数を測定したところ，いずれも 10^5cfu/100cm^{2}であった。一方，大腸菌群は前者で陰性となったものの，後者では 10^4cfu/100cm^{2}を示し，大腸菌が検出された。この工程でリステリア菌は検出されなかった.

加圧熟成工程では，魚卵が詰められた容器を積み上げた後，上部より加重を行いながら室温約 15℃で 6 日間程度脱水と熟成を行う。加圧終了時における容器内魚卵からの流出液（容器外壁に付着）の一般生菌数は 10^5～10^7cfu/100cm^2，容器を積載した樹脂製パレット

では 10^5cfu/100cm^{2}を示した. 加圧熟成室の床および壁立ち上がり部の一般生菌数はそれぞれ 10^7cfu/100cm^2, 10^6cfu/100cm^{2}であった. この工程における大腸菌群は流出液と壁立ち上がり部で 10cfu/100cm^{2}を示した以外はすべて陰性であった. この工程においてリステリア菌は検出されなかった.

D. 考察

筋子製造工程において, いずれの工程からもリステリア菌は検出されなかった. しかし, 原魚の体表面, 断頭機の魚体搬送ベルト表面, および原魚の裁割工程における器具類(まな板, 包丁)で一般生菌数は 10^5～10^7cfu/100cm^2, 大腸菌群が 10^2～10^4cfu/100cm^{2}を示し, 大腸菌陽性となった。断頭機の魚体搬送ベルトについては, 付着した汚れを抱え込みやすい構造であることと, 洗浄及び殺菌が不十分であることが原因であること推測された. また, 包丁, まな板で大腸菌群が高い値を示したのは, これらの洗浄及び殺菌が不十分であったため, 刃を納める木質の柄やまな板の切り傷部分で微生物が増殖したことによるものと考えられた。

次ぎに, 裁割工程から魚卵を漬け込み工程に搬送するためのローラーコンベア（軸受け部）では一般生菌数が顕著に高く, 大腸菌群も陽性であり, ローラコンベア設置床から大腸菌が検出された。これは, 当該コンベアについては軸受け部の構造が汚水を溜めやすく, また, 洗浄により排出されにくい構造にあるため, 微生物増殖のための温床となっていること, 更に当該コンベア設置場所を本来通路として使用しないことになっているものの, 作業員が原魚裁割工程から直接進入して交差汚染したものと考えられた。

漬け込み室の壁立ち上がり部でも大腸菌が検出されていることから, 洗浄過程での床からの水の跳ね返りによって中間製品等を汚染することが危惧された。

一方, 原魚裁割工程から飽和食塩水による漬け込み工程における魚卵の一般生菌数は 10～10^2cfu/100cm^{2}と安定しており, 大腸菌群も陰性であり, 加圧熟成して製造された筋子製品の一般生菌数も 10^2～10^3cfu/100cm^2, 大腸菌群陰性と製造工程の値とほぼ同様な結果を示した。

E. 結論

筋子製造施設において, 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. いずれの製造工程及び中間製品, 最終製品からもリステリア菌は検出されなかった。なお, 製造工程に使用されている機器および器具等で一般生菌数が高く, 大腸菌も検出されたことから, 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

該当なし

2. 学会発表

該当なし

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

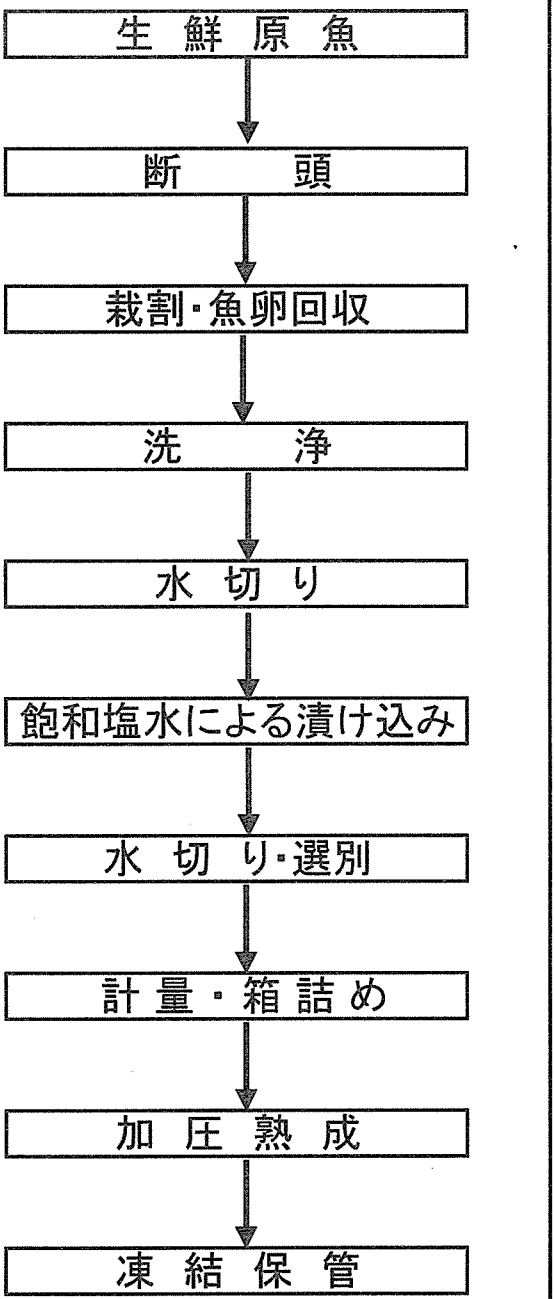

図1 筋子の製造工程

図2 筋子造工程におけるふき取り検査結果

注) ＊は大腸菌陽性

表1　原料および中間製品の理化学的及び微生物学的性状

試　　料	pH	水分(%)	塩分(%)	水分活性	リステリア	一般生菌数	大腸菌群
①腹出し直後の魚卵	6.22	56.5	0.6	0.998	0	8.0×10^2	0
②洗浄魚卵(真水洗浄)	6.42	57.8	0.5	0.996	0	3.6×10^2	0
③飽和塩水漬け込み魚卵	6.19	45.4	6.6	0.896	0	1.8×10^2	0

H18.9.25採集検体

表2　製品の理化学的及び微生物学的性状

試　　料	pH	水分(%)	塩分(%)	水分活性	リステリア	一般生菌数	大腸菌群
製　品 1	6.11	48.1	5.4	0.936	0	1.0×10^3	0
製　品 2	6.10	47.8	4.8	0.938	0	8.2×10^3	0
製　品 3	6.19	48.6	6.2	0.930	0	7.0×10^2	0

H18.10.5採集検体(9月29日漬け込み・熟成(脱水)開始－凍結前のパック詰め製品)

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）
（受託事業報告書）

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
調味カズノコにおける *Listeria monocytogenes* に対する危害分析

北海道立中央水産試験場 加工利用部

担当者　木村　稔（品質保全科長）
三上加奈子（品質保全科・研究職員）
阪本正博（主任研究員）
大堀忠志（加工利用部長）

研究要旨

調味カズノコにおいて，輸入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．

その結果，製造工程，原材料，中間製品，最終製品のいずれからも本菌は検出されなかった．原卵は，カナダ産の輸入ペール缶のものを使用しており，飽和塩水漬けされているため水分活性が非常に低かったが，一般生菌数は比較的高く 10^4CFU／g検出された。しかし，原卵の塩抜き工程や調味後において一般生菌数が減少し，最終製品では 10^2CFU／g程度と低かった．

環境温度は，外部の影響を受けやすい場所では 13～26℃の温度差が認められたが，工程の大部分を行う作業エリアの温度は 15～20℃，保冷庫はほぼ５℃以下に保たれていた．カズノコ自体の温度は，原卵で 10℃，塩抜き卵で 7.5℃，調味後の卵で５℃以下となっており，特に問題はなかった．

一方，拭き取り検査については，運搬台車の内枠，作業エリア床，保冷庫床，踏み台で一般生菌数が顕著に高く，大腸菌群も 10～10^4CFU／g検出された．運搬台車の内枠については角の部分に水が溜まりやすい構造になっており，容易に菌数が増加したと考えられた．また，作業エリア床は，全て粗いコンクリート状であり汚れが溜まりやすいため，頻繁に洗浄するなど衛生管理に注意する必要がある．作業員用の踏み台は，木製であるため木目の間に汚れが溜まっており，菌が増殖しやすい形状であった．これらからの交差汚染により，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ので，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

調味カズノコ製品を介した *Listeria monocytogenes*（以下リステリア菌とする）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 18 年 10 月から平成 18 年 11 月にかけて実施された．調査施設は北海道後志管内にあり，カズノコをはじめタラコ製品等を製造している．

2. 調査試料

(1) 原材料

カナダ産の輸入ペール缶

ペール缶とは，原卵カズノコ（以下原卵とする）を輸出する際，ペールと呼ばれるプラスチック容器に原卵が詰められもので，容器には容量一杯に飽和塩水が注入され，さらに撒塩が施されている．

(2) 製造工程

ペール缶中の「原卵」，原卵から水洗浄によって脱塩された「塩抜き卵」，調味液で味付けした「調味卵」，及び包装後の「最終製品」について調査した．

(3) 製造環境

作業エリアの床，作業員手袋，作業台，洗浄水タンク，運搬台車，運搬用パレット，水切り用ザル等を環境試料とした．また，作業エリアの環境温度や水温，工程毎のカズノコ品温を測定した．

(4) 細菌検査および理化学試験

原卵，塩抜き卵，調味卵および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．また，これらについては0.1%ペプトン加生理食塩水で10倍乳剤を調製し，標準寒天培地(日水製薬㈱)による混釈培養により一般生菌数を，また，クロモアガーColiform ECC(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．

さらに，上述した試料について蒸留水で10倍乳剤を調製して理化学的試験を行った．すなわち，pHはガラス電極法，塩分はN/10硝酸銀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．製造環境の拭き取り試料については，滅菌ブースを用いて約10×10 cmを拭き取り（ふきふきチェックⅡ，栄研器材㈱），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種類のリステリア培養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(日水製薬㈱)による一般生菌数を測定した．また，クロモアガーColiform ECC(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

調味カズノコの製造工程を図１に，原卵，中間製品である塩抜き卵，調味卵の微生物学的試験及び理化学的試験の結果を表１に，最終製品のそれを表２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．一般生菌数については，原卵から10^4 cfu/gが検出され，真水で洗浄した塩抜き卵で10^3 cfu/g，調味後の調味卵で300cfu/以下と製造段階が進むにつれて徐々に減少した．塩抜き工程では10℃の水道水を使用しオーバーフローさせて一晩行うため，その洗浄効果により塩抜き卵の菌数が減少したと考えられる．調味液漬け込み工程では，塩抜き卵を入れた容器に市販品の調味液を添加し，保冷室で24時間行った．調味卵の菌数の減少はアルコールなどの添加物の影響が考えられる．

理化学的性状変化を見ると，pHでは原卵から塩抜き卵までは6.07であったが，調味液のpH(4.7)の影響もあり調味卵や最終製品で5.65まで低下した．塩分濃度は原卵で20.3%と高く，塩抜き卵で0.2%まで低下しており，洗浄による塩抜き効果が確認された．調味卵や最終製品では，調味液の塩分濃度(4.6%)の影響で2.1%まで上昇した．水分活性は，塩分濃度の高い原卵で0.787と低かった．このように原卵の水分活性値は低かったが，前述のように一般生菌数が比較的高かったことから，原卵には好塩性菌や酵母類が多かったと推察される．塩抜き卵の水分活性値は0.998と脱塩の影響で高くなり，調味卵や最終製品では調味液の影響で0.98とやや低下した．

(2) 製造環境の拭き取り試験

施設の拭き取り検査結果を図2に示した.

原卵取り出し作業での一般生菌数は,原卵をザルに入れて1F作業エリア(左)まで運搬するためのプラスチック製運搬台車で 10^7 cfu/100cm^{2}を示した. また, 大腸菌群は 10^4 cfu/100cm^{2}と高かったが, 大腸菌, リステリア菌は共に検出されなかった. 運搬台車では容器と接触する内枠部分が非常に汚れており, 交差汚染の危険性が考えられた. この工程においてリステリア菌は検出されなかった.

水洗い・夾雑物除去工程では1F作業エリア(左)の床が 10^4cfu/100cm^{2}で大腸菌群も陽性となった. 床は粗いコンクリート状であり, 常にウェットで汚れが溜まりやすい状態であった. 水洗い用タンク, 水切り用ザル, 作業員の手袋は 10^3cfu/100cm^{2}で, 大腸菌群は検出されなかった. 塩抜き工程ではタンク等が 10^3 cfu/100cm^{2}で, 大腸菌群は検出されなかった. これら工程においてリステリア菌は検出されなかった.

水切り工程では, 作業員の手袋で一般生菌数が 10^2～10^4cfu/100cm^{2}と大きく異なった. 移動の多い作業員ほど菌数が高くなっており, 移動後のアルコールでの殺菌が重要と考えられた. この工程においてリステリア菌は検出されなかった.

調味漬け込み工程では, 保冷庫床(手前), 踏み台の一般生菌数は 10^5～10^6cfu/100cm^{2}と高く, 大腸菌群も陽性であった. 保冷庫床(手前)は古く, コンクリートも一部破損しているなど, 衛生的にも問題があった. また, 1F作業エリア(右)で使用されている踏み台は, 一部の作業員が使用している木製の板で, 移動の際には手と接触する危険性が考えられた. 踏み台については洗浄しても菌数が減らない可能性もあり, 蒸気による加熱殺菌やプラスチック製に変えるなど改善が必要である. 作業エリア床(右)の一般生菌数は 10^4cfu/100cm^2, 大腸菌群が陽性となっていた. この工程においてリステリア菌は検出されなかった.

液切り工程では保冷室(奥)の床で 10^4 cfu/100cm^2, 大腸菌群が陽性であった. ザルで液を切る際に床からの跳ね返りの液がカズノコに接触する可能性があるため, 注意が必要である. 一方, 液切り工程では作業員が他の器具への接触や移動などが無く, 作業員の手袋の一般生菌数は 10^1cfu/100cm^{2}と低かった. この工程においてリステリア菌は検出されなかった.

計量・袋詰めを行う2F作業エリア床の一般生菌数は 10^4cfu/100cm^{2}大腸菌群は陰性であった. 床はドライな状態であり, 他の床より菌数が少ないものと考えられた. また, 作業台や作業員手袋も 10^2～10^3cfu/100cm^{2}と低く, アルコール噴霧も頻繁に行っており衛生的な取り組みが認められた. 一方, 包装資材に液切り工程が終了した卵を入れた後に, 調味液を加える工程では, 使用しているバケツ内の一般生菌数が 10^4cfu/100cm^{2}近くあり, 大腸菌群も陽性であった. 調味液を入れる容器はステンレス製にするなど工夫が必要と思われた. この工程においてリステリア菌は検出されなかった.

各作業エリアにおける環境温度の変化を図3に示す. 主にペール缶から原卵を取り出す作業を行う, 1F作業エリア(入り口)は, シャッター付近にあるため外気温の影響を受けやすく, 試験期間中も13℃～26℃まで変化した. 主にカズノコの洗浄, 塩抜き, 調味を行う1F作業エリア(左)では室温は比較的安定しており 15℃～20℃であった. 調味液を入れた後に保管する冷温庫は－5℃～7℃とドアの開閉によって大きく変化した. 主に最終製品の袋詰めを行う2F作業エリアでは, 15℃～22℃と室温は比較的安定していた.

一方, カズノコの品温は, 原卵 10℃, 塩抜き卵 7.5℃, 調味卵や最終製品5℃以下と低く保たれており, 特に問題はなかった.

D. 考察

調味カズノコ製造工程において, いずれの工程からもリステリア菌は検出されなかった. し