

図1. 工程フロー図と拭き取りポイント及び試料サンプリング箇所

工程フロー	拭き取りポイント		サンプリング品
	作業中	洗浄後	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">原貝保管</div> <p style="text-align: center;">↓</p>	原貝保管場所		原貝(貝柱) 原貝(中腸腺)
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">脱殻/内臓除去</div> <p style="text-align: center;">↓</p>	搬送ベルトコンベアー 脱殻台 貝べら 脱殻後貝柱搬送パイプ 脱殻作業者手指(手袋着用) 脱殻作業者手指(手袋着用)	搬送ベルトコンベアー 脱殻台 貝べら 脱殻後貝柱搬送パイプ	脱殻後貝柱 脱殻後中腸腺
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">一次洗浄</div> <p style="text-align: center;">↓</p>	一次洗浄用カゴ 一次洗浄後貝柱うけ(バット)	一次洗浄用カゴ 一次洗浄後貝柱うけ(バット)	一次洗浄後貝柱 一次洗浄水(第3槽)
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">整形</div> <p style="text-align: center;">↓</p>	整形作業台表面	整形作業台表面	整形後貝柱
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">二次洗浄</div> <p style="text-align: center;">↓</p>	二次洗浄カゴ 作業者手指(手袋着用)	二次洗浄カゴ	二次洗浄後貝柱 二次洗浄水(第3槽)
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">水切り</div> <p style="text-align: center;">↓</p>			
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">整列</div> <p style="text-align: center;">↓</p>	整列機ラインコンベアー 整列板 整列作業者手指(手袋着用) 整列作業者手指(手袋着用)	整列機ラインコンベアー 整列板 作業者手指	整列後貝柱
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">凍結</div> <p style="text-align: center;">↓</p>	凍結後ラインコンベアー	凍結後ラインコンベアー	凍結後貝柱
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">グレージング</div> <p style="text-align: center;">↓</p>	グレーズ後ラインコンベアー	グレーズ後ラインコンベアー	グレージング後貝柱 グレーズ水
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">計量/箱詰め</div>	自動計量包装機振動バケツ	自動計量包装機振動バケツ	

表 1. ほたて貝柱拭き取り試験結果表

製造工程	作業中			洗浄後作業開始前		
	拭き取り箇所	細菌数/ 10cm <sup>2</sup>	大腸菌群/ 10cm <sup>2</sup>	拭き取り箇所	細菌数/ 10cm <sup>2</sup>	大腸菌群/ 10cm <sup>2</sup>
原貝保管	原貝保管場所	<30(18)	<30(0)			
脱殻/内臓除去	搬送ベルトコンベアー	2.3 × 10 <sup>4</sup>	<30(0)	搬送ベルトコンベアー	1.2 × 10 <sup>3</sup>	<30(0)
	脱殻台	6.8 × 10 <sup>2</sup>	<30(0)	脱殻台	<30(0)	<30(0)
	貝べら	1.2 × 10 <sup>3</sup>	<30(0)	貝べら	<30(5)	<30(0)
	脱殻後貝柱搬送パイプ	4.4 × 10 <sup>2</sup>	<30(0)	脱殻後貝柱搬送パイプ	<30(8)	<30(0)
	脱殻作業用手指(手袋着用)	2.5 × 10 <sup>3</sup>	<30(0)			
	脱殻作業用手指(手袋着用)	2.7 × 10 <sup>3</sup>	<30(0)			
一次洗浄	一次洗浄用カゴ	8.4 × 10	<30(0)	一次洗浄用カゴ	<30(0)	<30(0)
	一次洗浄後貝柱うけ(バット)	8.1 × 10	<30(0)	一次洗浄後貝柱うけ(バット)	<30(0)	<30(0)
整形	整形作業台表面	<30(10)	<30(0)	整形作業台表面	<30(0)	<30(0)
二次洗浄	二次洗浄カゴ	1.4 × 10 <sup>2</sup>	<30(0)	二次洗浄カゴ	<30(1)	<30(0)
	作業用手指(手袋着用)	<30(11)	<30(0)			
水切り						
整列	整列機ラインコンベアー	<30(0)	<30(0)	整列機ラインコンベアー	<30(0)	<30(0)
	整列板	<30(3)	<30(0)	整列板	<30(0)	<30(0)
	整列作業用手指(手袋着用)	<30(3)	<30(0)	作業用手指	3.3 × 10	<30(0)
	整列作業用手指(手袋着用)	<30(7)	<30(0)			
凍結	凍結後ラインコンベアー	<30(2)	<30(0)	凍結後ラインコンベアー	<30(1)	<30(0)
グレージング	グレーズ後ラインコンベアー	<30(0)	<30(0)	グレーズ後ラインコンベアー	2.3 × 10 <sup>2</sup>	<30(0)
計量/箱詰め	自動計量包装機振動バケット	3.2 × 10	<30(0)	自動計量包装機振動バケット	<30(0)	<30(0)

表 2. ほたて貝柱サンプリング試験結果表

工程	サンプリング		
	採集品	細菌数/g	大腸菌群/g
原貝保管	原貝1(貝柱)	<300(21)	<300(0)
	原貝2(貝柱)	<300(13)	<300(0)
	原貝1(中腸腺)	<300(2)	<300(0)
	原貝2(中腸腺)	<300(14)	<300(0)
脱殻/内臓除去	脱殻後貝柱1	$3.9 \times 10^2$	<300(0)
	脱殻後貝柱2	<300(18)	<300(0)
	脱殻後貝柱3	<300(8)	<300(0)
	脱殻後中腸腺	<300(4)	<300(0)
	脱殻後中腸腺	<300(9)	<300(0)
	脱殻後中腸腺	<300(11)	<300(0)
一次洗浄	一次洗浄後貝柱	<300(5)	<300(0)
	一次洗浄水(第3槽)	<300(8)	<300(0)
整形	整形後貝柱	<300(3)	<300(0)
二次洗浄	二次洗浄後貝柱	<300(1)	<300(0)
	二次洗浄水(第3槽)	<300(0)	<300(0)
水切り			
整列	整列後貝柱	<300(3)	<300(0)
凍結	凍結後貝柱	<300(2)	<300(0)
グレージング	グレージング後貝柱	<300(4)	<300(0)
	グレーズ水	$2.3 \times 10^5$	<300(0)
計量/箱詰め			

表 3. 生食用ほたて貝柱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	$3.1 \times 10^2$	<300(0)	陰性	<3.0
1-3 2次洗浄 後	1-3-1	$6.4 \times 10^2$	<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	$2.9 \times 10^4$	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-2	$2.5 \times 10^4$	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-3	$8.0 \times 10^2$	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-4	$1.6 \times 10^3$	<300(0)	陰性	<3.0
1-5 選別後	1-5-1	$1.3 \times 10^5$	<300(4)	陰性	<3.0
	1-5-2	$1.1 \times 10^4$	<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.

## 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	$6.0 \times 10^2$	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-2	$7.2 \times 10^2$	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-3	$5.2 \times 10^2$	<300(0)	陰性	<3.0
	1-3-4	$4.0 \times 10^2$	<300(0)	陰性	<3.0
1-4 整列後	1-4-1	$4.0 \times 10^2$	<300(1)	陰性	<3.0
	1-4-2	$1.1 \times 10^3$	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-3	$1.2 \times 10^3$	<300(0)	陰性	<3.0
	1-4-4	$7.5 \times 10^2$	<300(0)	陰性	<3.0
1-5 選別後	1-5-1	$1.4 \times 10^3$	<300(0)	陰性	<3.0
	1-5-2	$1.5 \times 10^3$	<300(0)	陰性	<3.0
	1-5-3	$2.0 \times 10^3$	<300(0)	陰性	<3.0
	1-5-4	$1.4 \times 10^3$	<300(0)	陰性	<3.0

## 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

1. 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、森田邦雄 ((社) 日本乳業協会)

2. 未殺菌ナチュラルチーズ内での *Listeria monocytogenes* の消長  
森田邦雄 ((社) 日本乳業協会)

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

分担研究者 高谷 幸 ((社) 日本乳業協会)  
森田邦雄 ((社) 日本乳業協会)

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）

1. 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

分担研究者 高谷 幸 日本乳業協会 常務理事  
森田邦雄 日本乳業協会 常務理事

研究要旨 *Listeria monocytogenes*（以下リステリア）は土壌、河川水や様々な動物の腸管内から分離されることが知られている。また、食塩耐性、低温増殖能などの高度な環境抵抗性を持つため、本菌の食品やその原料への1次汚染や食品製造工程での2次汚染、保存過程での増殖の抑制は困難である。ヒトへは主にナチュラルチーズ、食肉製品などの汚染食品を通じて媒介されることが知られている。わが国においてもバルクタンク内の生乳中にしばしばリステリアが含まれていることが本研究班によって明らかにされている。チーズの製造工程において本菌による健康被害を防止するには、原料である生乳を殺菌するか、あるいは製造工程中で死滅させることが求められる。一方欧州の一部地域では、未殺菌乳からチーズを製造・販売しており、国内においてもチーズの販売拡大や新規特産品の製造を目的として、未殺菌乳を原料としたナチュラルチーズを製造したいとの要望が出されている。しかしながら欧米では過去数十年に亘って未殺菌乳や殺菌の不十分な原料乳から作られたチーズを原因食品とするヒトのリステリア症の集団事例が報告されている。リステリアによる人の健康被害を防止する観点からわが国の原料生乳及びチーズの製造工程に係る危害分析を行い、HACCP方式の確立のための科学的データを収集した。未殺菌乳を原料としたナチュラルチーズ製造時のリステリア汚染によるリスクを明らかにする目的で、人工的にリステリアを投与した未殺菌乳由来のナチュラルチーズの各種製造工程に於ける本菌の消長について調査を行った。平成16年度は主に情報収集を行い、それを基に平成17年度にかけて市販のナチュラルチーズにリステリアを接種した場合の挙動につき明らかにし、チーズの種類により菌数の変化に違いがあることを明らかにした。平成17年度はさらに実際に未殺菌の生乳を原料としてナチュラルチーズを製造し、その主な製造工程における本菌の増殖を確認するためのスパイクテストを実施した。ゴーダチーズ中間製品の3製造段階、カマンベールチーズ2種の各2製造段階及び市販クリームチーズにリステリアを接種して各製造工程の培養条件で保管した結果、一旦菌数の増殖を示してから低下していくもの、

経時的に菌数の低下を示すもの、一旦菌数の低下を示してから増加していくものの3パターンが示された。多くのものは検体のpH低下に伴って菌数の低下を示していたが、ほとんどの検体において検出限界以上の菌が残存しており、接種菌数以上の菌が増殖しているものも見られたため、平成18年度はナチュラルチーズの最終製品の熟成段階での汚染を想定し、2種3品目のチーズについて通常行っている最終段階での殺菌をしない状態での本菌の増殖を2種類の温度設定で観察した。その結果よりチーズ製造開始時から消費者が購入・消費するまでの全期間での菌の消長を調査検討することで、未殺菌乳を原料とするナチュラルチーズ製造時に本菌の汚染があった場合の喫食者への感染リスクを明らかにした。その結果から、原料乳が本菌に汚染されていた場合及び熟成時間に製品が汚染された場合には未殺菌乳から作られたナチュラルチーズ最終製品に本菌が残存、増殖している可能性が高いと思われた。

協力研究者

五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所・室長

岡田 由美子

国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官

田村 豊

酪農学園大学獣医学部・教授

大塚 佳代子

埼玉県衛生研究所・主任研究員

究班によって明らかにされている。そのため、現在はチーズの製造工程において本菌による健康被害を防止する目的で、原料である生乳を殺菌するか、あるいは製造工程中で殺菌を行うことが義務付けられている。一方欧州の一部地域では、未殺菌乳からチーズを製造・販売しており、近年の食生活の欧米化に伴い、日本におけるナチュラルチーズの輸入・消費量は増大を続けており、その種類も多様化している。国内においてもチーズの販売拡大や新規特産品の製造を目的として、未殺菌乳を原料としたナチュラルチーズを製造したいとの要望が出されている。しかしながら欧米では過去数十年に亘って未殺菌乳や殺菌の不十分な原料乳から作られたチーズを原因食品とするヒトのリステリア症の集団事例が報告されている。また、我が国においても過去の研究から未殺菌の原料乳が一定の割合で本菌に汚染されていることが明らかとなっているため、国内の未殺菌乳を原料とするナチュラルチーズの製造、消費にはある程度のリステリア症感染リスクが存在すると憂慮される。リステリアによる人の健康被害

#### A. 研究目的

*Listeria monocytogenes* (以下リステリア) は土壌、河川水や様々な動物の腸管内から分離されることが知られている。また、食塩耐性、低温増殖能などの高度な環境抵抗性を持つため、本菌の食品やその原料への1次汚染や食品製造工程での2次汚染、保存過程での増殖の抑制は困難である。ヒトへは主にナチュラルチーズ、食肉製品などの汚染食品を通じて媒介されることが知られている。わが国においてもバルクタンク内の生乳中にしばしばリステリアが含まれていることが本研

を防止する観点からわが国の原料生乳及びチーズの製造工程に係る危害分析を行い、HACCP方式の確立のための科学的データを収集し、未殺菌乳を原料としたナチュラルチーズ製造時のリステリア汚染によるリスクを明らかにする目的で、人工的にリステリアを投与した未殺菌乳由来のナチュラルチーズの各種製造工程に於ける本菌の消長について調査を行った。

## B. 研究方法

### 1. 各種製造工程での消長

(1) 検体：乳業メーカーの協力により試験的に作成された未殺菌乳を原料とするナチュラルチーズ中間製品（ゴードチーズ、カマンベールチーズ2社）及び対照群として市販クリームチーズを使用した。

ナチュラルチーズは一片10gに、クリームチーズは一片5gに切断して使用した。

(2) 使用菌株：各チーズ検体に *Listeria monocytogenes* 臨床分離株(LC2, 血清型4b)の一夜培養菌液を1/50に希釈したもの50 $\mu$ lを投与した。

(3) 培養方法：ゴードチーズはカード形成直後、塩漬直後、発酵開始時の3製造工程、カマンベールチーズは型詰め直後、熟成開始時の2製造工程での培養条件を用いた。

クリームチーズ：最終製品を一片5gに切断。製造工程の温度にて、製造時培養時間の2倍程度まで培養。設定時間ごとに生理食塩水90ml（クリームチーズは45ml）を加えストマッカーで懸濁して100 $\mu$ lをPALCUM listerial selective agar (Merck)に塗布、37 $^{\circ}$ Cで培養しコロニー数を計測した。各チーズの培養温度及び時間は以下の通りとした。

ゴードチーズカード形成直後：37 $^{\circ}$ C 0、1.5、3、4.5時間（製造工程では3時間）

ゴードチーズ塩漬後：10 $^{\circ}$ C 0、1、3、5日（製造工程では1-3日）

ゴードチーズ発酵開始後：10 $^{\circ}$ C 0、3、5、10、15、30、45日（製造工程では30日）

カマンベールチーズ型詰め直後：30 $^{\circ}$ C 0、4、8、16、20時間（製造工程では8-16時間）

カマンベールチーズ熟成開始後：15 $^{\circ}$ C 0、1、3、7、10、17、30、40日（製造工程では20日）

クリームチーズ最終製品：10 $^{\circ}$ C 0、3、5、10、03、60、90、120、150、180日（賞味期限は約100日）

### (4) pHの測定

各チーズ中のリステリア培養時には、同じ懸濁液を用いて検体のpHを測定した。測定にはpH試験紙（アドバンテック社）を用い、検体のpHに応じてT.B (pH8.0-9.6)、B.T.B (pH6.2-7.8)、C.R.P (pH5.0-6.6)及びP.B (pH3.2-5.6)を使用した。

## 2. 最終製品（熟成段階）での消長

### (1) 使用菌株および培地

日本国内での臨床分離株である *L. monocytogenes* LC2（血清型4b）を用いた。直接培養にはPALCAM listeria selective agar(oxidoid)を用いた。MPN法による培養にはCHROM agar Listeria（関東化学）を用いた。

### (2) 検体

乳業メーカーから提供されたカマンベールチーズ（2種）およびゴードチーズ（1種）の最終製品で最終的な殺菌工程を行っておらず、添加した乳酸菌（スターター）が青山している状態のものを用いた。

### (3) 接種および培養方法

#### [A] 直接培養

ナチュラルチーズの殺菌していない最終製品を一片 10g に切断し、各チーズ検体にリステリアの一夜培養菌液を 1/50 に希釈したもの 50  $\mu$ l を投与した。各検体をストマッカー袋に入れ、抜気後シールし 4°C または 10°C にて保存培養を行った。保存培養はカマンベールチーズが 0、1、3、7、14、21、28、35 および 42 日間、ゴーダチーズが 0、1、3、7、14、21、28、35、49、63 および 84 日間行った。保存培養期間が終了した検体に生理食塩水 90ml を加え、ストマッカーで懸濁して原液あるいは適切な濃度に希釈した菌液 100  $\mu$ l を PALCAM listerial selective agar に塗布し、37°C で 48 時間 培養してコロニー数を計測した。

#### [B] MPN 法 (3 本法)

カマンベールチーズの殺菌していない最終製品を一片 10g に切断し、各チーズ検体にリステリアの一夜培養菌液を 10<sup>2</sup>CFU/g になるよう希釈し 50  $\mu$ l を投与した。各検体をストマッカー袋に入れ、抜気後シールし 10°C にて保存培養を行った。培養は 0、1、3、7、14、21、28 及び 35 日間行った。保存培養期間が終了した検体に UVM 培地 90ml を加え、ストマッカーで懸濁して原液、1/10 希釈液及び 1/100 希釈液各 10ml を 3 本ずつ中試験管に入れ、37°C で一夜培養した。各試験管内でのリステリアの増殖の有無を CHROM agar Listeria に画線培養し、ハローを形成する青色コロニーにより確認した。各検体のリステリア菌数は ISO4831: Microbiology-general guidance for enumeration of coliforms- most probable number technique より作成された食品衛生検査指針の MPN 3 本法計算式に基づき、算出した。

#### [C] pH 及び水分活性の測定

菌数測定と同時に各検体の pH と水分活性をラコムテスター pH 計 (アズワン) と水分活性計 (GSI クレオス) を用いて測定した。

#### (倫理面への配慮)

本研究ではヒトの臨床材料及びデータを使用しておらず、動物実験も行っていないため、研究倫理上の問題は生じていない。

### C. 研究結果

#### 1. 各種製造工程での消長

##### (1) ゴーダチーズ製造工程でのリステリアの消長

ゴーダチーズ製造工程におけるカード形成後の培養条件は 37°C 約 180 分であり、今回は 270 分まで培養を行った (図 1)。培養開始直後の pH は 6.6 であり、同じ pH を維持していた 90 分までは菌は増殖を示したが、その後 pH の低下に伴い減少を示した。製造工程の 1.5 倍まで培養時間を延長したが、検出限界以下までの菌数減少は示さなかった。塩漬時の培養条件は 10°C 1-3 日であり、今回は 5 日まで培養を行った。その結果、pH の低下と共に菌数の減少も見られたものの、5 日目になっても検出限界以下までの菌数減少は示さなかった (図 2)。発酵開始後の熟成時における培養条件は 10°C 30 日であり、今回は 45 日まで培養を行ったところ、5 日目に pH、菌数共に最低値を記録したものの、その後 pH 値は微増し、それに伴って菌数も上昇を示し、15 日目以降には培養開始時と同程度まで増加を示した (図 3)。

##### (2) カマンベールチーズ製造工程におけるリステリアの消長

カマンベールチーズ製造工程における型詰直後の培養時間は 30°C 8-16 時間であり、今回は

20時間まで培養を行った。その結果、1社の検体では培養開始時から8時間後までのpHが5.6であり、4時間までに3倍程度の菌数増加が見られたものの8時間では減少に転じ、20時間でpHが5に減少したのに伴って開始時と同程度の菌数まで減少した(図4)。一方他社の検体では、培養開始時のpHが6.4であったが、16時間で5.4まで低下し、それに伴って菌数も20時間で培養開始時の1/4程度まで減少を示した(図6)。製造工程における熟成時の培養条件は10℃20日であり、今回は40日まで培養を行ったところ、1社の検体ではpHはほぼ5.5を維持しており、菌数は3日目まで増殖を示したが7日目以降減少に転じ、17日目以降には接種菌量よりも減少を示した。しかしながら40日目においても検出限界以下の菌数は示さなかった(図5)。一方他社の検体では、培養1日目からpHの低下に伴って菌数の減少を示し、pHが5以下になった30日目以降は検出限界以下となった(図7)。

### (3) 市販クリームチーズ保存期間中のリステリアの消長

今回購入したクリームチーズの賞味期限は100日であり、家庭内の冷蔵庫での保存を想定してリステリア接種後10℃で180日まで保存し、その消長を調べる計画であり、現在まで30日間の培養が終了している。これまでの結果では5日目まではpHと共に菌数の微減が見られたものの、10日目で接種菌数の3倍程度まで菌数の増加を示し、30日目では再度減少は示したものの、接種菌数の2倍程度を維持していた(図8)。

#### 2. 最終製品(熟成段階)での消長

最終製品の加熱殺菌を行っていないカマンベールチーズにリステリアを接種し、4℃で培養したところ、検体1では2週間目に最大菌数となった

後減少傾向を示したもののその後も6週間まで漸増し、最終的に実験開始時よりもやや多い菌数を示した(図9, 1)。また、水分活性には余り菌数との相関は見られなかったがpHは菌の消長と類似した変動を示した(図9, 2)。検体2では3週目にやや菌数の減少を示すまでは接種菌数を保ち、最終的に実験開始時よりもやや多い菌数となった(図9, 3)。また、pHも4週間目まではほとんど変化せず、最終的に漸減したため、検体1と異なり菌の消長との類似はみられなかった(図9, 4)。一方10℃で培養した検体は、1, 2共にほとんど菌数の変化が見られなかった(図10, 1および3)。水分活性は検体2が培養期間を通じてほとんど変化しなかったのに対し、検体1では4週間目を境に低下を示した(図10, 2および4)。ゴーダチーズでは4℃、10℃共に菌数は最終的に接種菌量の1/100程度まで減少していた(図11, 1及び3)。pHは全培養期間を通じてあまり変化しなかったが、水分活性は12週間で漸減する傾向を示した(図11, 2, 4)。MPN法による測定では、2種のカマンベールチーズで異なる消長を示した。検体1は3日目以降増殖を示し、最終的に当初の接種菌量の100倍以上まで増殖した(図12, 1, 2)。一方検体2は初めの1週間は増減をくり返したものの2週間目以降は減少し続けた(図12, 3, 4)。水分活性及びpHについては検体間に大きな差は見られなかった。

#### D. 考察

本研究の結果から、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消長は3種類のパターンに分類された。第1に、一旦菌数の増殖を示してから低下していくもの

で、カード形成後のゴードチーズ（図1）、カマンベールチーズの型詰後（図4、6）及び1社の熟成時（図5）がこのパターンを示した。第2に経時的に菌数の低下を示すもので、ゴードチーズの塩漬時（図2）と他社のカマンベール熟成時（図7）がこのパターンを示した。第3に一旦菌数の低下を示してから増加していくもので、ゴードチーズ熟成時（図3）がこのパターンを示した。対照群として用いた市販クリームチーズも同様であった（図8）。パターン1におけるリステリアの増殖は検体のpHが5.5から6.5の間で、更に変動しない時に見られており、5.5以上のpHで安定している時に本菌が増殖しやすくなると思われる結果が示された。一方パターン2では検体のpHがパターン1と同様に6.5から5.5の範囲であっても、その範囲内で低下を示している場合、また、pHが安定していても5.0と低い場合には増殖せずに低下し続けることが示された。また、パターン3では検体のpHが6.5から5.5に近づく間は菌数の減少が見られたが、その後pHの漸増に伴って菌数の回復を示していた。以上の結果から、スターターとして用いられる乳酸菌や、熟成に用いられる白カビの作用によってチーズ中間製品のpHが低下することによりある程度のリステリア増殖抑制がおこることが示された。また、図4、5、6に示されるように、一旦増加した菌数がpHの変動を伴わずに低下する傾向も示されたことから、pH以外の増殖抑制要因も存在すると思われる。しかしながら1社のカマンベールチーズ熟成時を除いた大半の検体において検出限界以下の菌数を示すことはなく、ナチュラルチーズ製造時の原乳にリステリアが混入していた場合、複数の製造工程を経て作られた最終製品に本菌が残存する可能性は高いと思われた。また、殺菌してい

ないカマンベールチーズ最終製品へのリステリア接種試験の結果、4℃及び10℃の何れの培養温度においても菌数は最終的に実験開始時と同程度か、更に増加していた。また、より少ない接種菌量で試験したMPN法の結果でも1検体は最終的に100倍以上の増加を示していた。pH及び水分活性は菌数の変動とあまり関連しておらず、チーズ内の菌量の指標とはならなかった。これらから、熟成開始時の汚染菌量が少量であっても条件によってはリステリアが著しく増殖し、熟成終了後の喫食時には感染リスクが大きく増大する可能性があると思われた。

殺菌していないゴードチーズ最終製品へのリステリア接種試験の結果、4℃及び10℃の何れの培養温度においても菌数は最終的に実験開始の1/100程度まで減少していたが、検出限界以下にはならなかった。従って多くの条件で実験開始時より菌数が増加していたカマンベールチーズと比較すると、感染リスクは少ないとは思われるが、依然としてある程度のリスクが残ると考えられた。

## E. 結論

未殺菌乳を原料としたナチュラルチーズの中間製品にリステリアを接種し、いくつかの製造工程におけるその消長を調べた結果、大半の中間製品の製造段階で検出限界以上の菌が残存あるいは接種菌数以上の増殖を示した。これらの結果から、原料乳がリステリアに汚染されていた場合、未殺菌乳から作られたナチュラルチーズ最終製品には本菌が残存している可能性が高いと思われた。

## F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 学会発表

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。2005 年 5 月

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 年 11 月（金沢）

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。2005 年 11 月（東京）

木村晃一、原田勝一郎、上橋健三、岡田由美子、五十君静信。市販のナチュラルチーズにおけるリステリアモノサイトゲネスの挙動。第 27 回日本食品微生物学会学術総会。2006 年 9 月（大阪）

岡田由美子、石和玲子、五十君静信、高谷幸。

未殺菌乳を原料とするチーズ製造工程における *Listeria monocytogenes* の消長。第 80 回日本細菌学会総会。2007 年 3 月（大阪）

五十君静信、岡田由美子、石和玲子、森田邦雄、松崎勝。ナチュラルチーズ製造工程におけるリステリアの増殖性に影響を及ぼす環境要因について。第 93 回日本食品衛生学会学術集会。2007 年 5 月（東京）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

図1 カード形成後のゴーダチーズ内におけるリステリアの消長

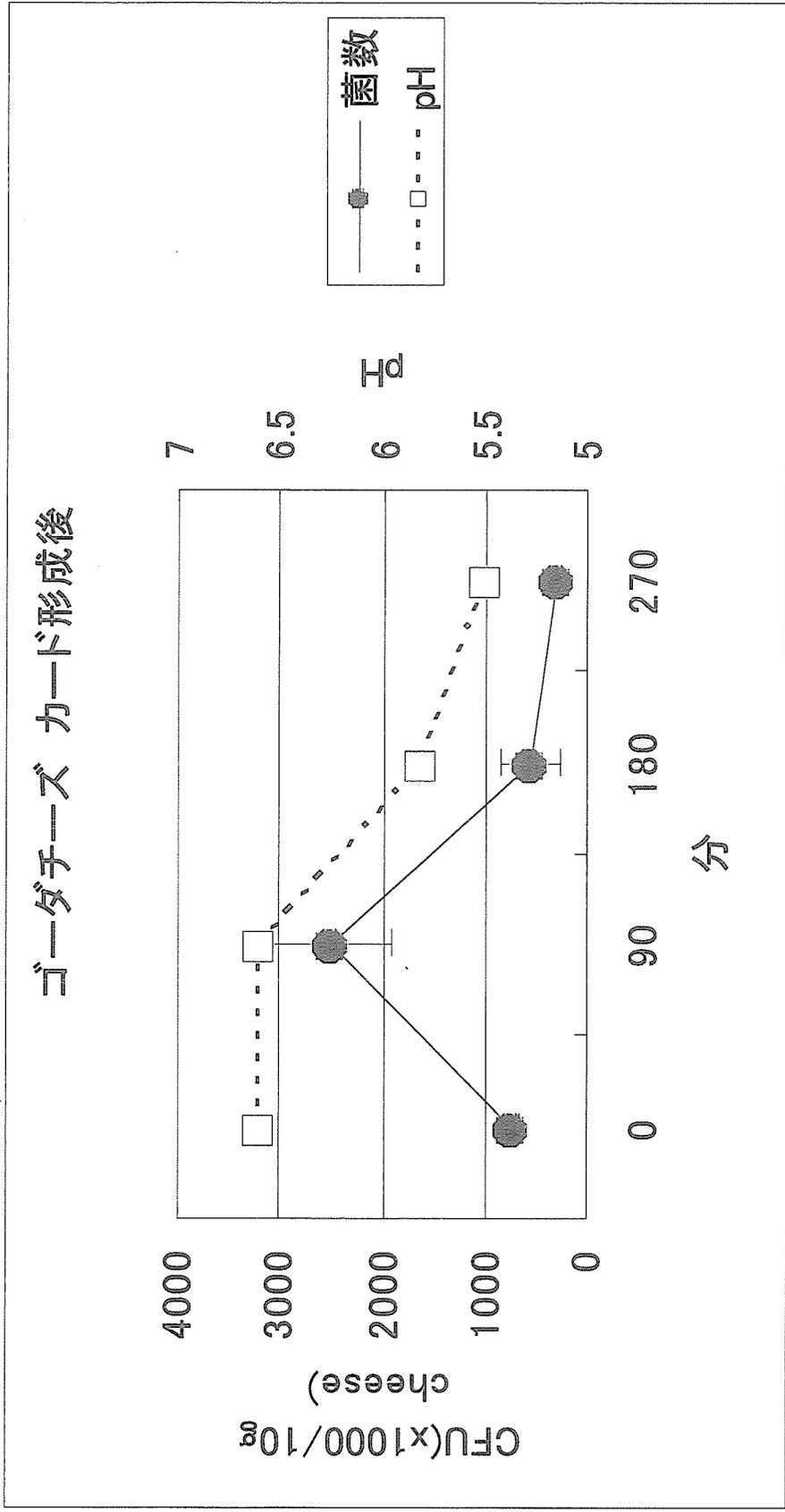


図2 塩漬時のゴーダチーズ内におけるリステリアの消長

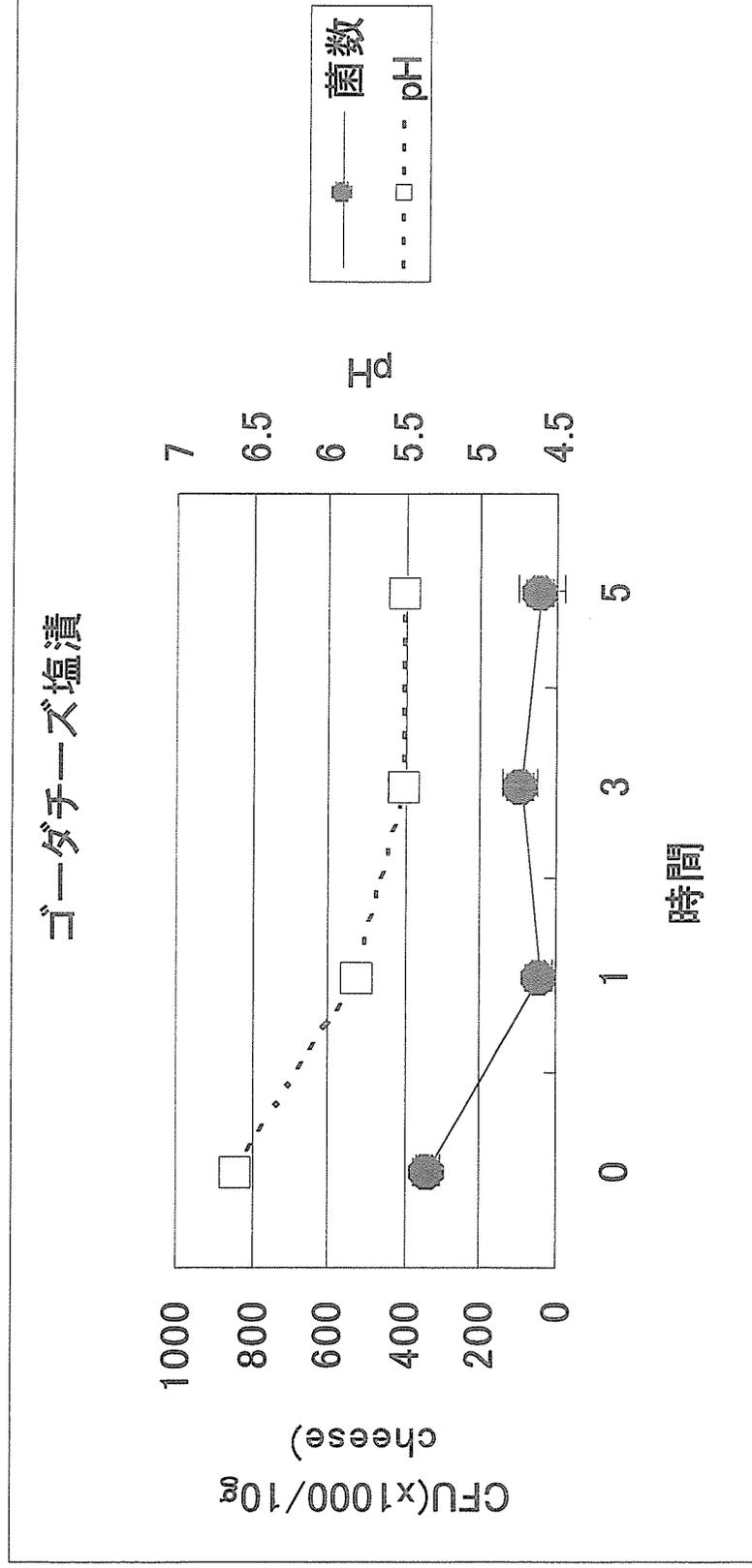


図3 熟成期間のゴーダチーズにおけるリステリアの消長

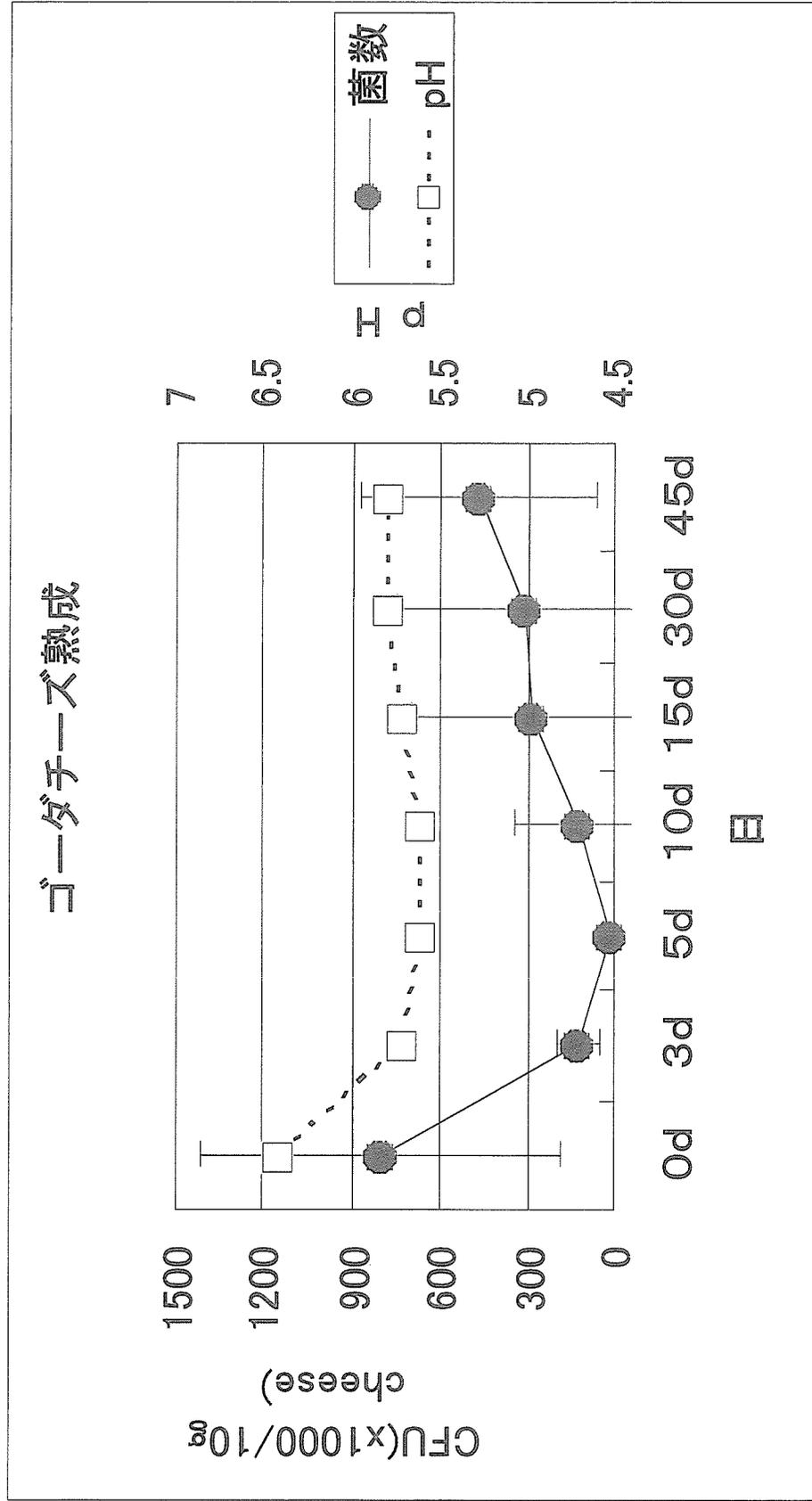


図4 型詰め後のカマンベールチーズにおけるリステリアの消長

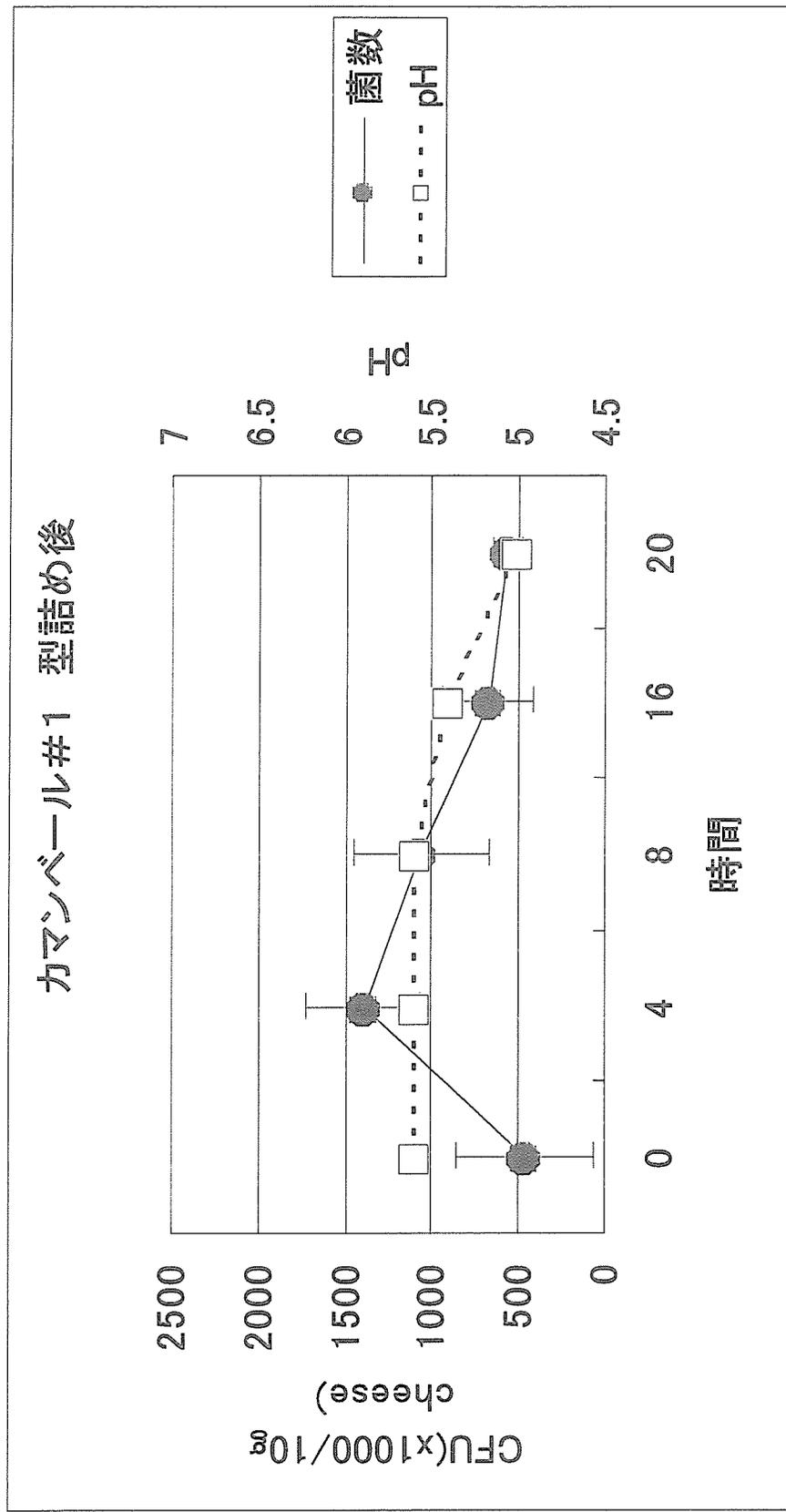


図5 熟成時のカマンベールチーズにおけるリステリアの消長

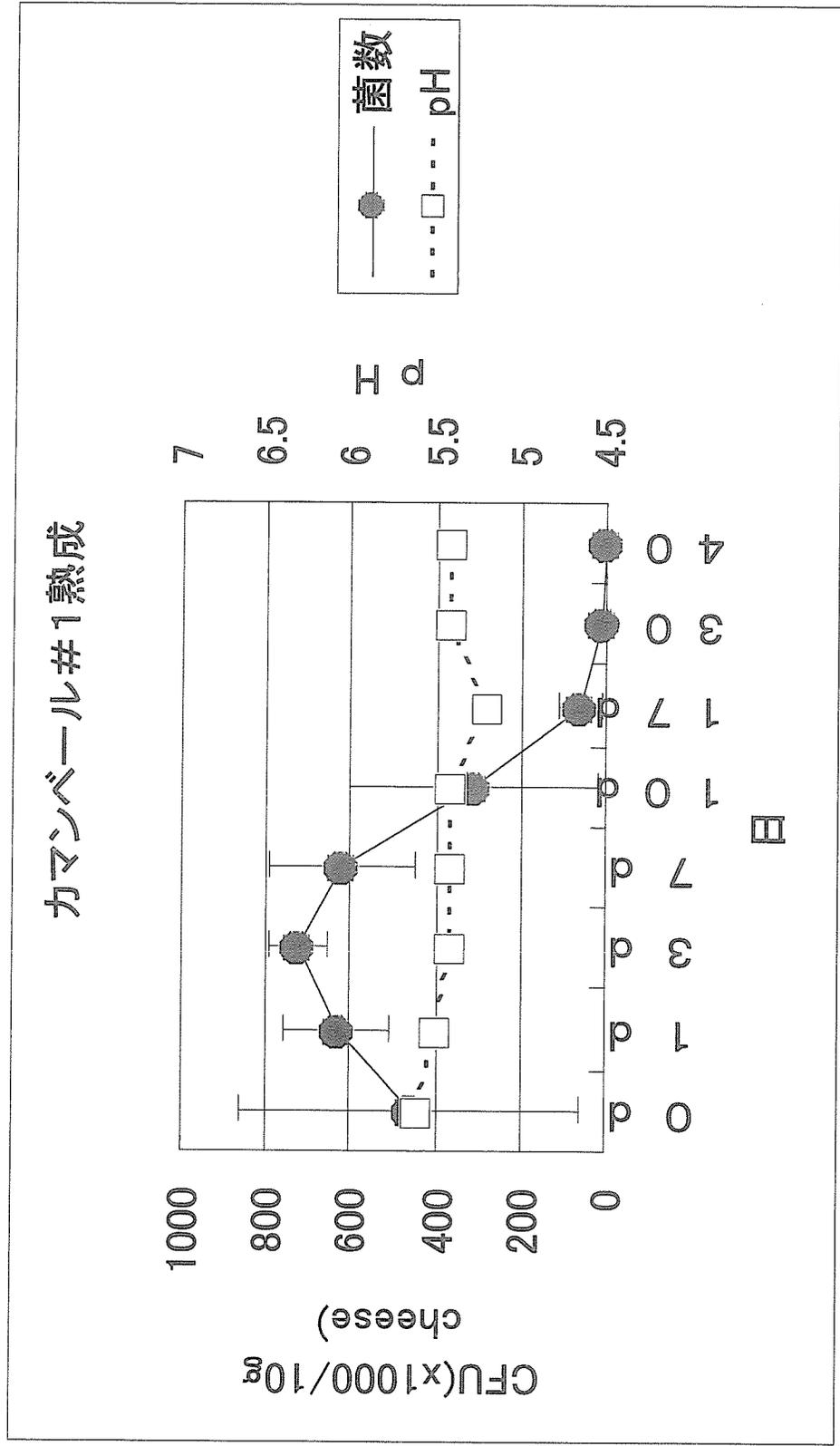


図6 型詰め後のカマンベールチーズにおけるリステリアの消長

