

図7 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

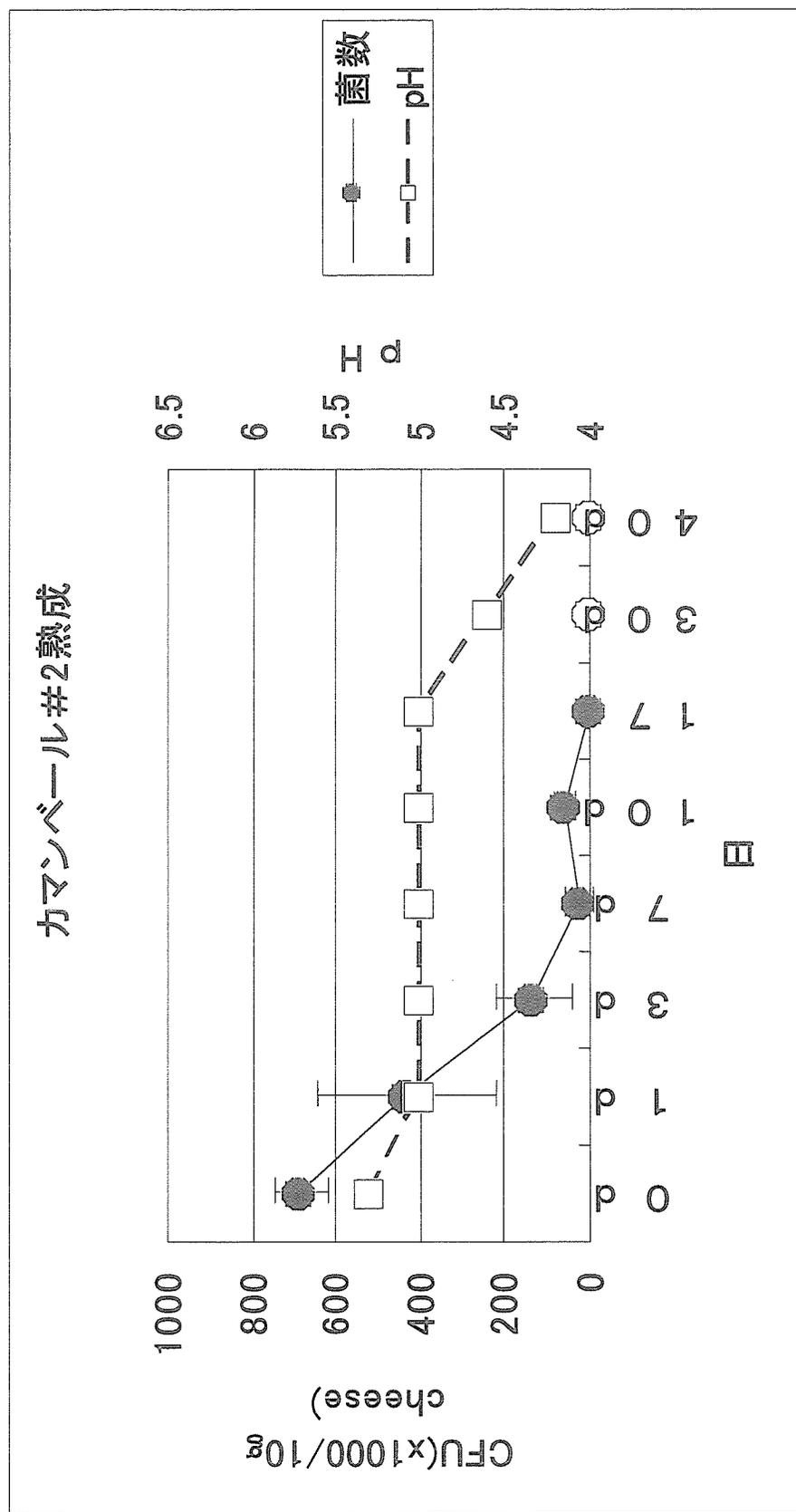


図8 クリームチーズにおけるリステリアの消長

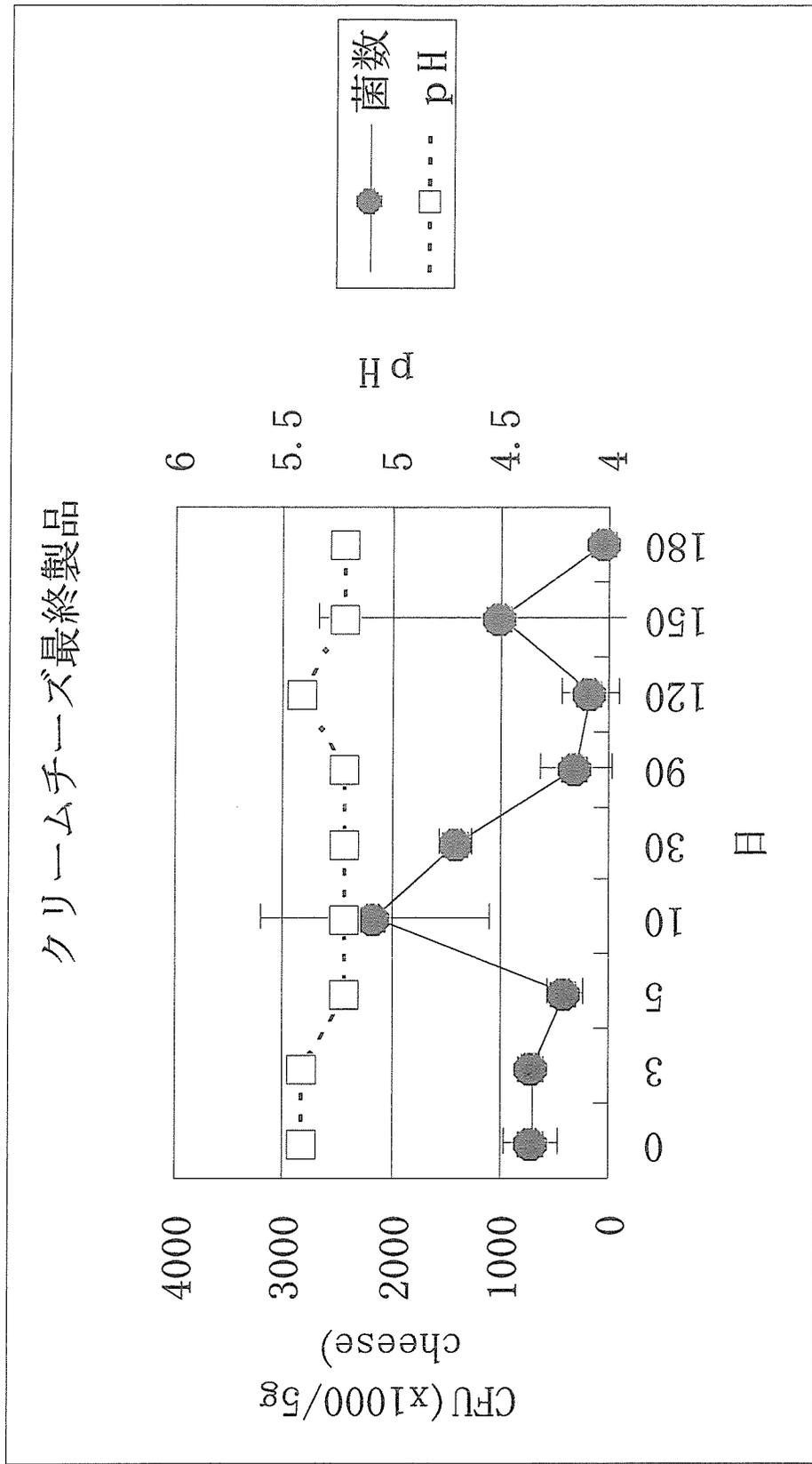


図9 直接培養法によるカマンベールチーズ内におけるリステリアの消長の消長(4°C)

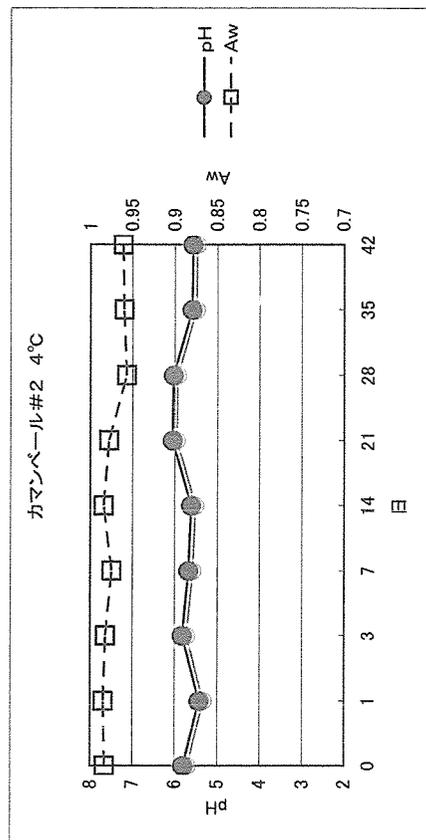
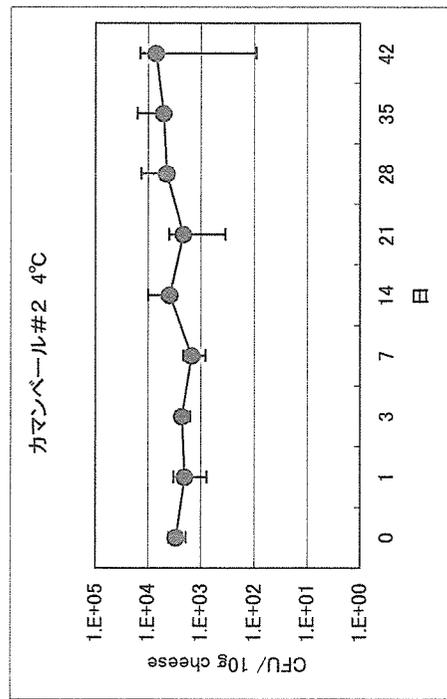
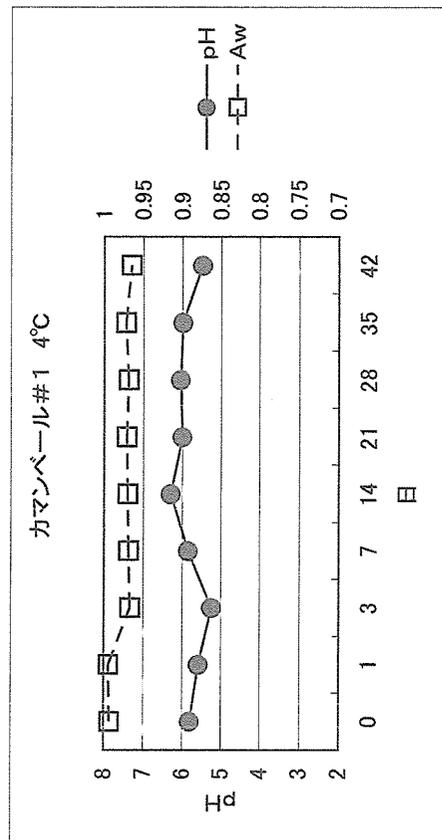
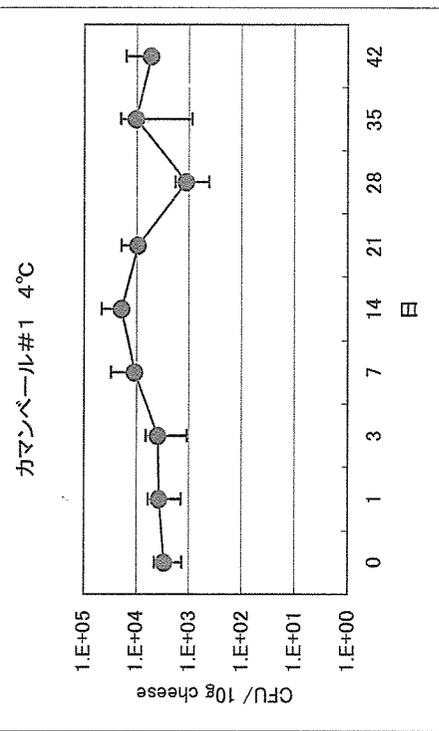


図10 直接培養法によるカマンベールチーズ内におけるリステリアの消長(10°C)

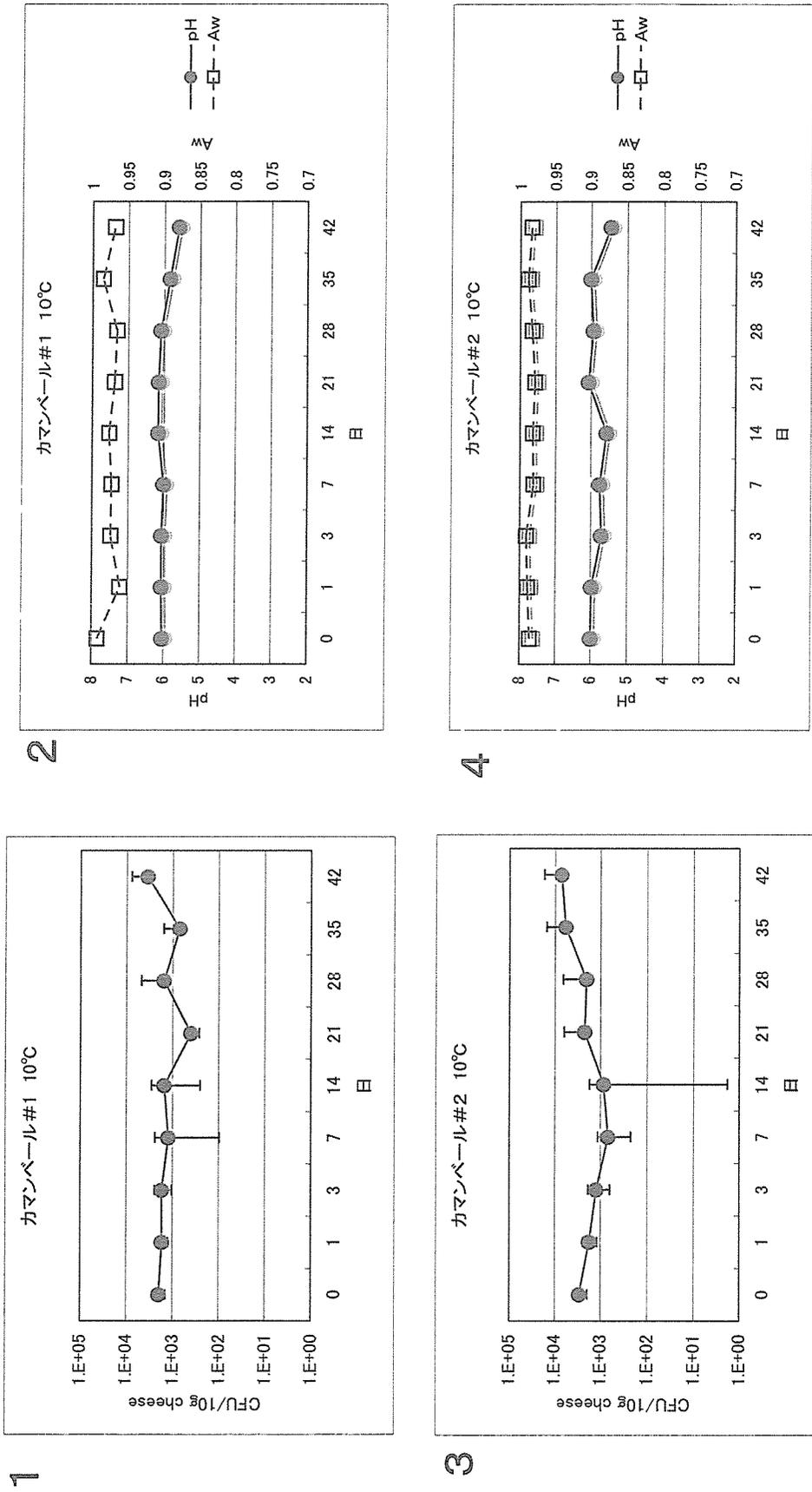
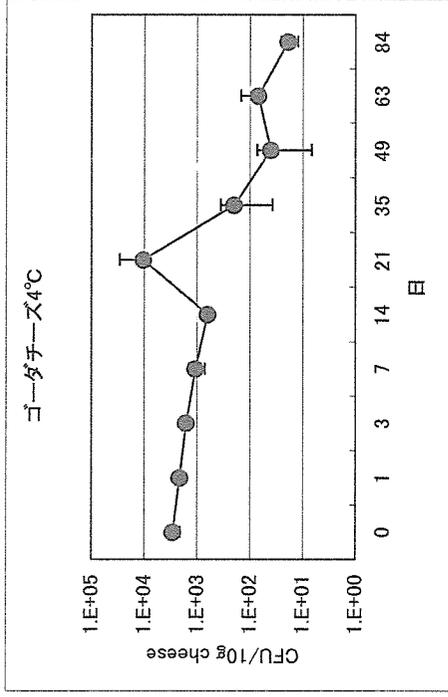
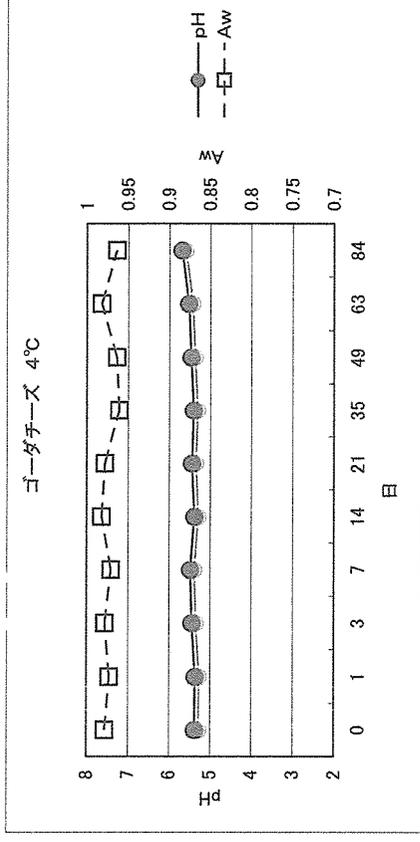


図11 直接培養法によるゴーダチーズ内におけるリステリアの消長の観察

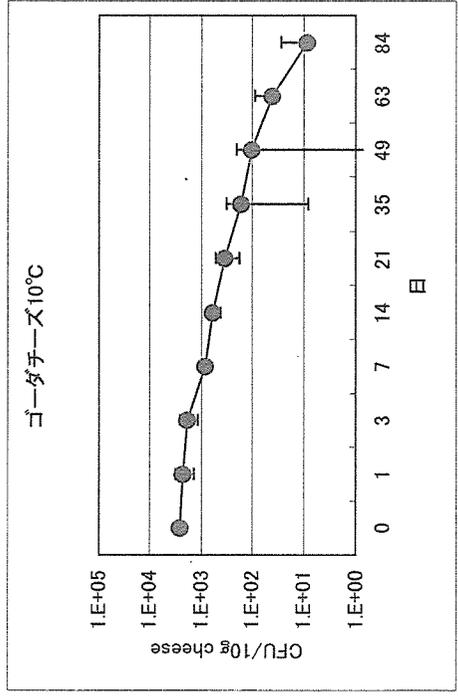
1



2



3



4

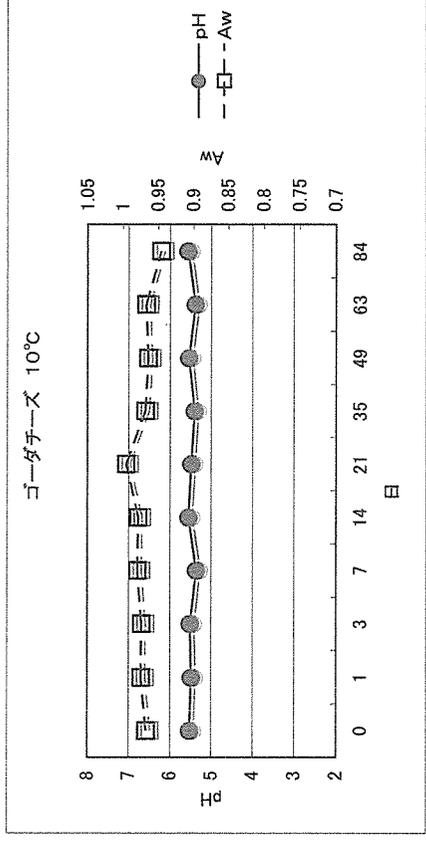
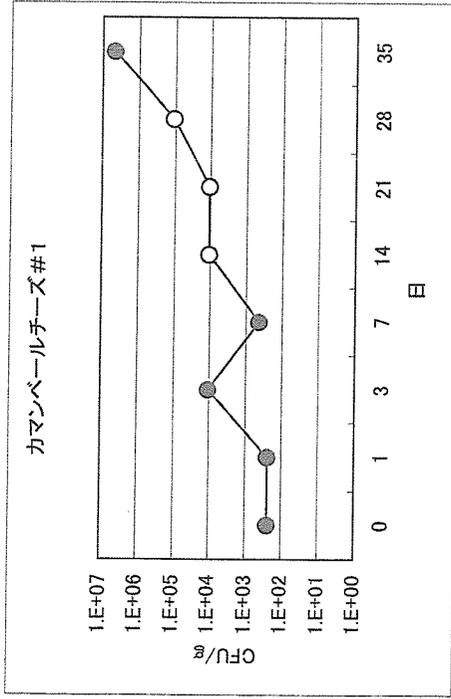
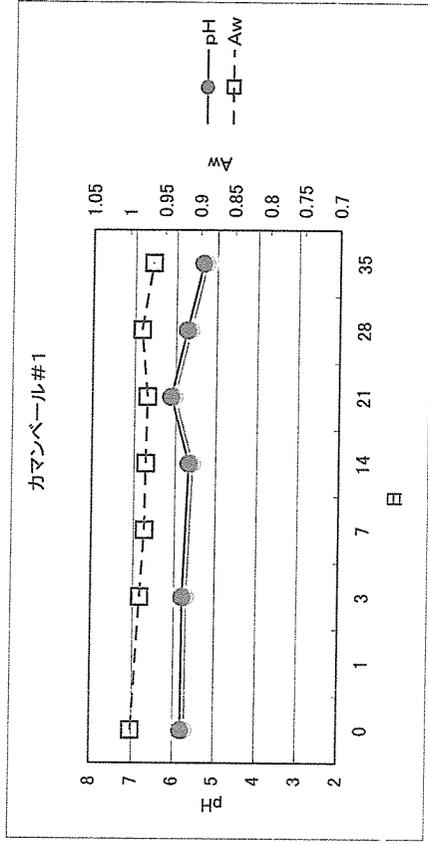


図12 MPN法によるカマンベールチーズ内のリステリアの消長の観察

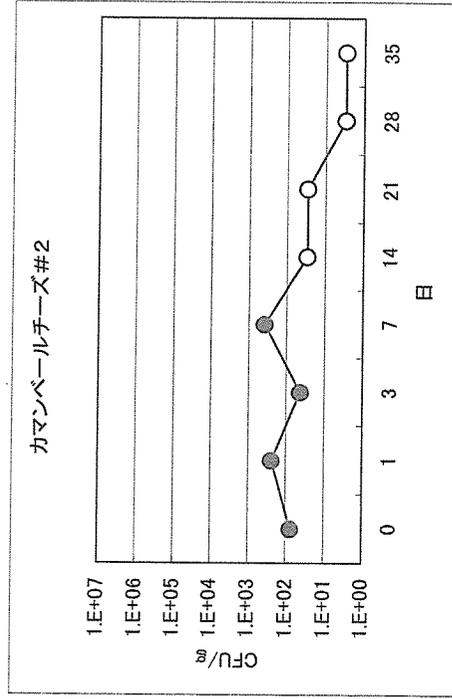
1



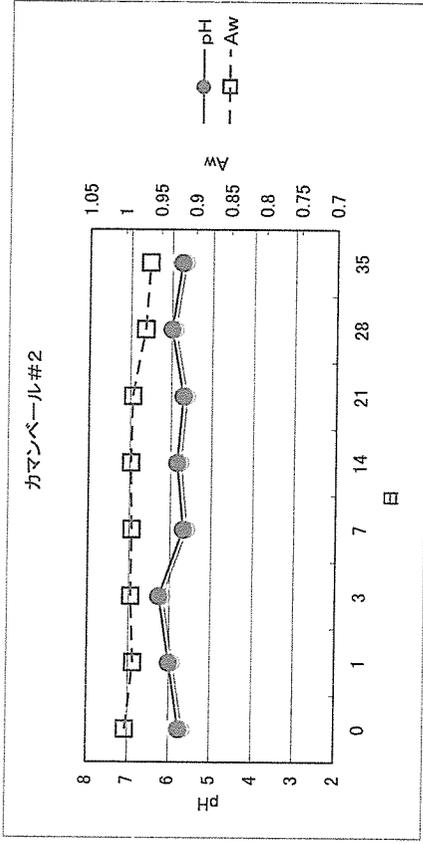
2



3



4



未殺菌ナチュラルチーズ内での *Listeria monocytogenes* の消長

分担研究者 森田邦雄 ((社) 日本乳業協会)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保研究事業）

食品製造の高度衛生管理に関する研究

分担研究報告書

2. 未殺菌ナチュラルチーズ内での *Listeria monocytogenes* の消長

分担研究者 森田邦雄 （社）日本乳業協会

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。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、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1980年代から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。今回我々は、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することを目的として、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リステリアの消長について調査を行った。平成17年度は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。今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。

研究協力者

岡田由美子  
国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部主任  
研究官  
五十君静信  
国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部  
第1室長

A. 研究目的

リステリア症の原因菌 *Listeria monocytogenes* は人には主に汚染食品の摂取を通じて感染する。一方本菌は動物の腸管内や河川水等自然界に幅広く分布しており、また、4℃以下でも増殖可能な低温増殖能や20%もの高食塩濃度下でも生残できる高塩濃度耐性能を持つことから食品原料の一次汚染のみならず製造工程及び保存期間

での二次汚染・食品内増殖を防ぐことも困難となっている。しかしながら近年の食生活の欧米化に伴い、我が国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。また、過去においては大手乳業メーカーにほぼ限られていた国産ナチュラルチーズの製造も畜産の盛んな都道府県において中小規模メーカーにより製造・販売されるようになった。現在国内産のチーズは原料乳を殺菌して製造されているが、フランス等ヨーロッパの国においては未殺菌乳を原料としたナチュラルチーズが製造されており、高い評価を得ている。そのためわが国においても地域の特産品として未殺菌乳を用いたナチュラルチーズを製造することへの要望が出されている。しかしながら欧米ではしばしば未殺菌乳や殺菌不十分な乳から製造された乳製品を原因としたリステリア症の集団感染がみられており、国内でも2001年に初めての集団事例がチーズを原因食品として報告された。また、本研究班が過去に明らかにしてきたように、国内産の生乳には一定の割合で本菌に汚染されていることが示されており、国内の未殺菌乳からのナチュラルチーズ製造にあたってはそのリスクを明らかにする必要がある。今回我々は、未殺菌乳からナチュラルチーズを製造する場合の人への感染リスクを明確にするための研究の一端として、製造工程途中のナチュラルチーズにリステリアを接種し、その消長を観察した。

#### A. 研究方法

##### 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(oxid)を用いた。MPN法による培養には CHROM agar Listeria (関東科学) 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) およびゴータチーズ (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

###### (1) 直接培養

未殺菌乳を原料とするチーズの最終製品を一片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に希釈したものを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 $^{\circ}$ Cまたは10 $^{\circ}$ 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、ゴータチ

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 listeria selective agarに塗布し、37 $^{\circ}$ Cで48時間培養してコロニー数を計測した。

###### (2) MPN法

###### (3) 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。

#### C. 研究結果

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 $^{\circ}$ C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週間までに漸増し、最終的に実験開始時よりもやや多い菌数を示した(図1-1)。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1-2)。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1-3)。また、pHも4週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1-4)。一方10 $^{\circ}$ C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。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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

学会発表

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。200  
7年5月予定（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1-1 直接培養法によるカマンベールチーズ内におけるリステリアの消長(4°C)

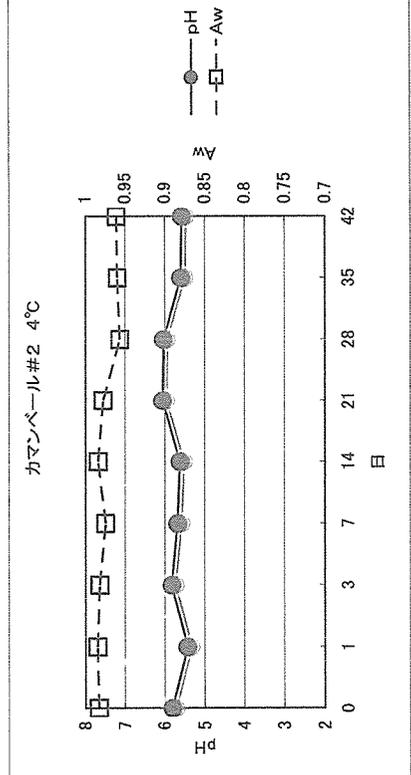
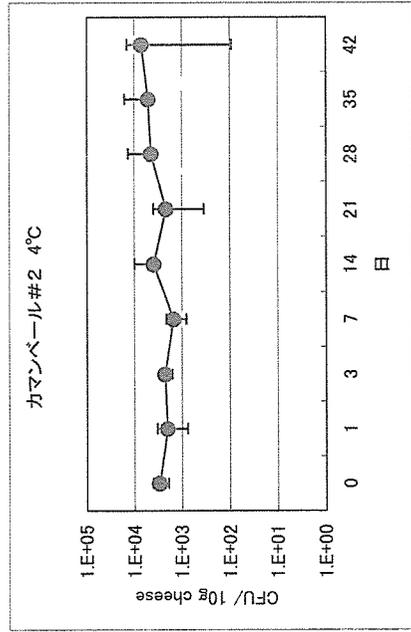
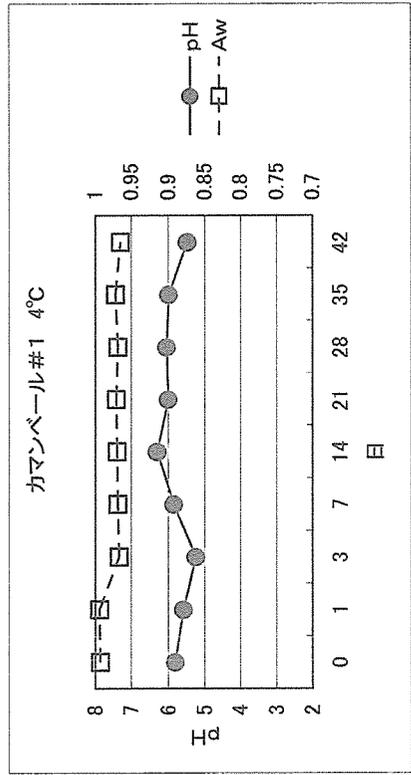
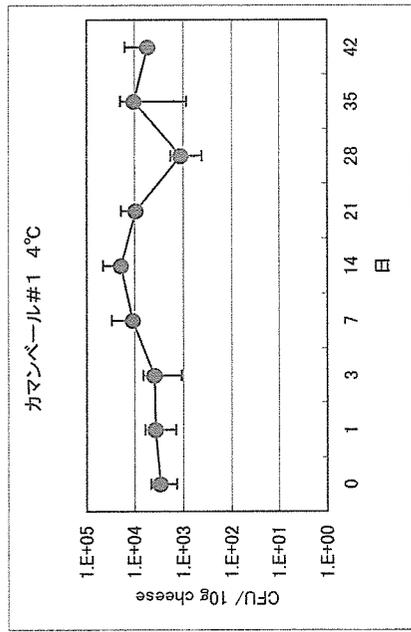


図1-2 直接培養法によるカマンベールチーズ内におけるリステリアの消長の消長(10°C)

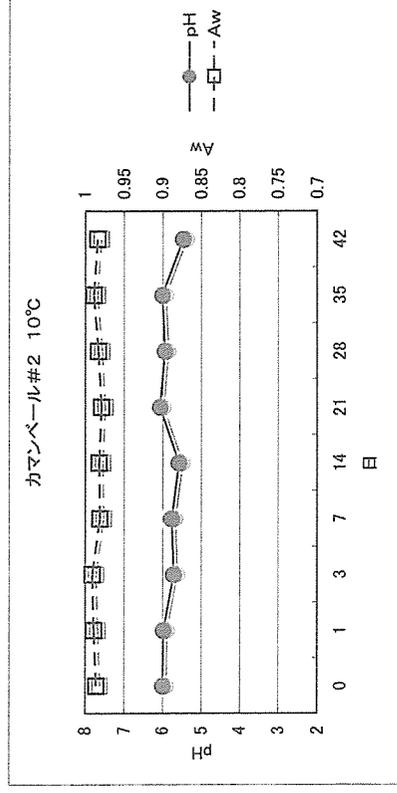
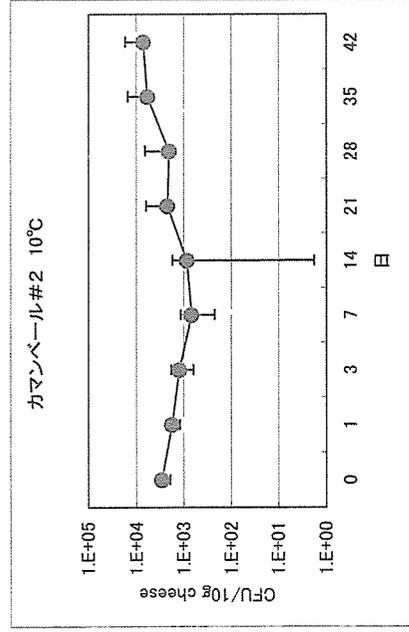
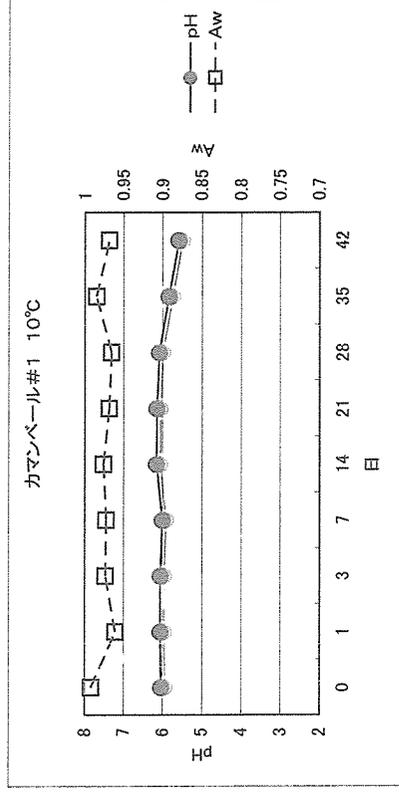
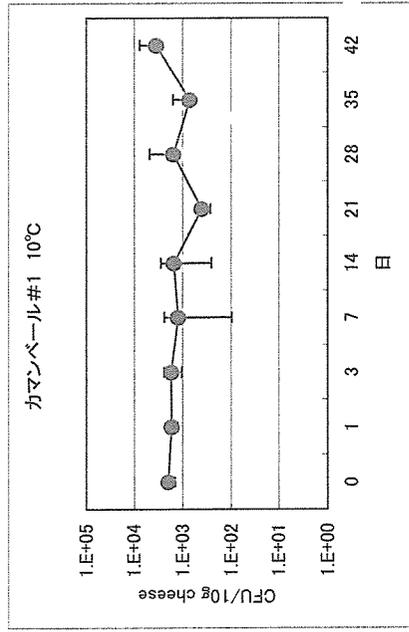


図1-3 直接培養法によるゴーダチーズ内におけるリステリアの消長の観察

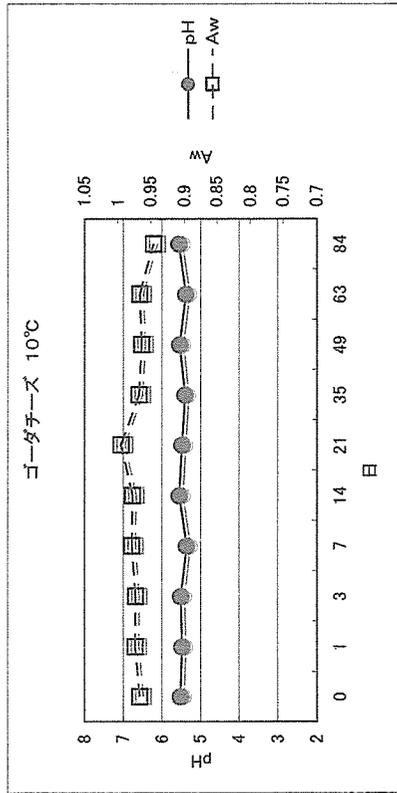
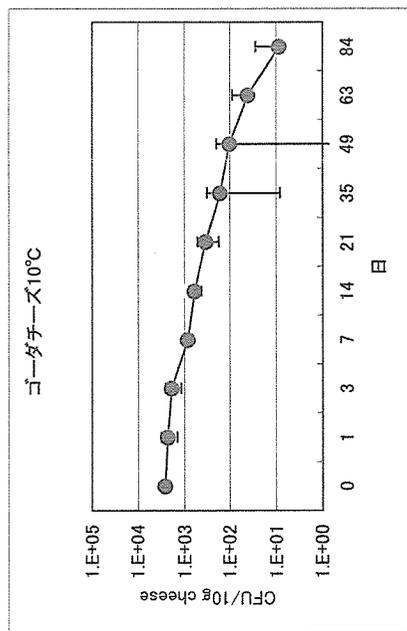
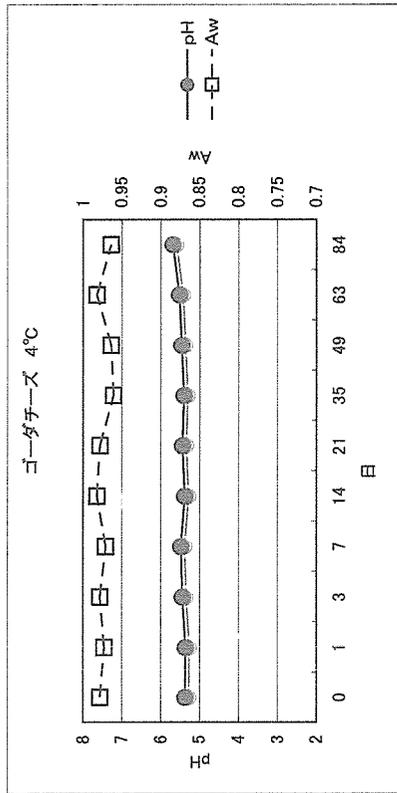
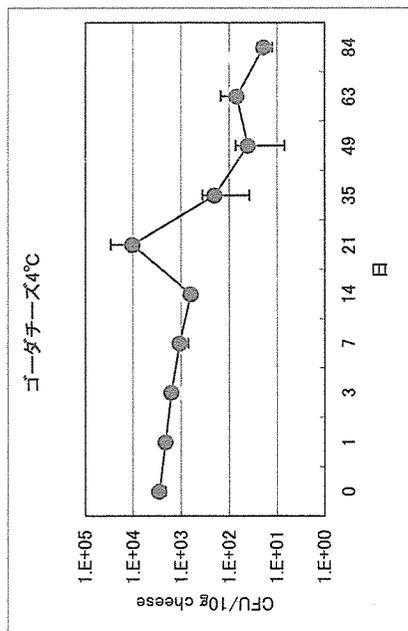
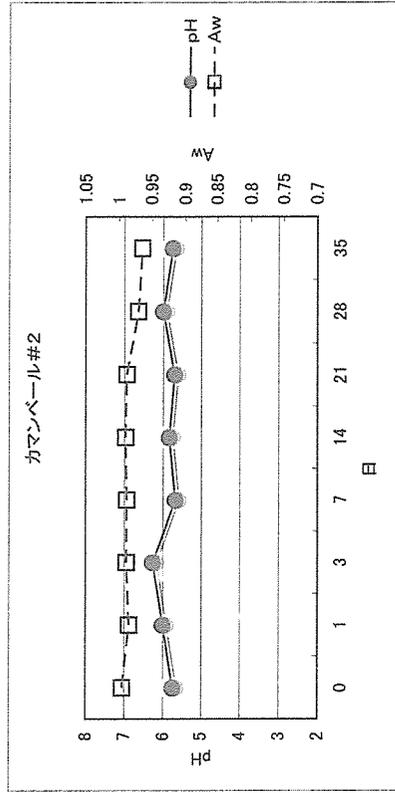
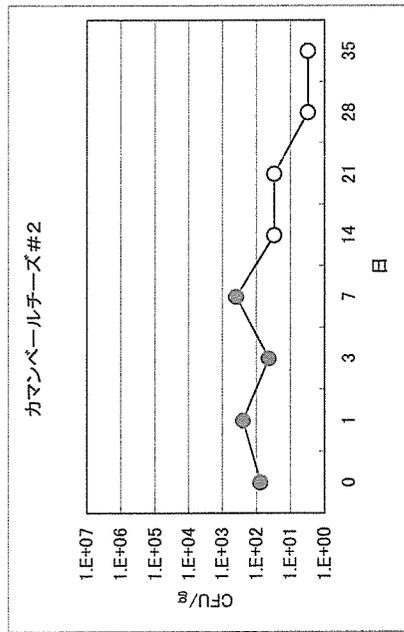
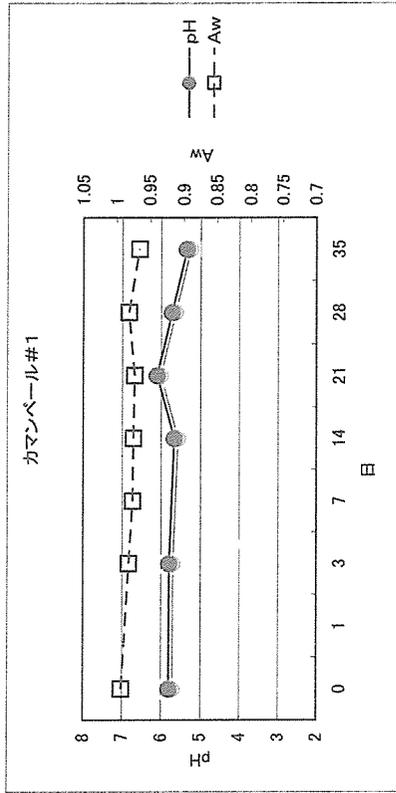
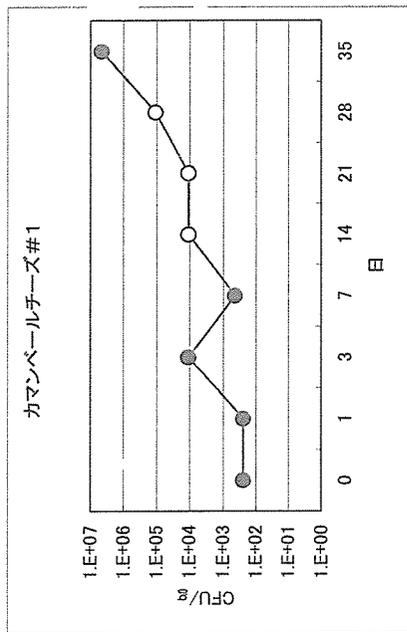


図1-4 MPN法によるカマンペールチーズ内のリステリアの消長の観察



#1の○は以上、#2の○は未満を示す