

平成 19 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）

衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究
バイオフィルムを形成するリステリアの食品製造工程における衛生管理に関する研究
分担研究者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

非加熱喫食食品に汚染が認められるリステリア・モノサイトゲネスは、その製造工程におけるバイオフィルム形成が本菌の食品への汚染の原因となっていることが指摘されている。そこで、バイオフィルムに関する文献調査と情報収集を行い、バイオフィルムに関する情報を整理した。リステリアでは、製造工程に形成されたバイオフィルムが、最終製品のリステリア汚染に大きく関わっており、その除去が本菌の管理に重要であることが確認された。一方、食品製造工場の現地調査により、製造工程における一般生菌数、大腸菌群の汚染実態について確認し、バイオフィルムが形成されやすい箇所を特定することが出来た。バイオフィルム形成をどのように検知し、どのように制御するかに関し研究を進めることにした。リステリアのモニタリング方法として増菌培地に添加するアクリフラビンの量について検討し、検出結果に与える影響を評価した。さらに、リステリアの試験法に関する問題点を整理し、今後の試験法の検討項目を明らかにした。それぞれの詳細については、各協力研究報告書を参考にしていきたい。

研究協力者

影山亜紀子 国立医薬品食品衛生研究所
岡田由美子 同上
仲真晶子 東京都健康安全研究センター
井田美樹 同上
加藤玲 同上
平井昭彦 同上
金子誠二 同上
北川雅彦 北海道立釧路水産試験場
宮崎亜希子 同上
麻生真悟 同上
信太茂春 同上

飯田訓之 同上

武士甲一 帯広畜産大学

A. 研究目的

非加熱喫食食品に汚染が認められるリステリア・モノサイトゲネスは、その製造工程におけるバイオフィルム形成が本菌の食品への汚染の原因となっていることが指摘されている。乾燥や高濃度の食塩耐性、低温増殖性といった環境抵抗性を示し、バイオフィルム形成が見られるリステリアの食品製造工程における衛生管理に適したモニタリング方法を提案し、食品

製造工程や保存における増殖性の評価、バイオフィルムの形成防止と本菌の除去を目指した管理法を検討することを目的とした。

B. 研究方法

文献調査と web 情報の収集により、バイオフィルムに関する情報収集を行った。

製造工程におけるバイオフィルム形成の実態調査は、北海道立釧路水産試験場の協力により、イカ塩辛の製造工程における一般生菌数、大腸菌群、リステリアの汚染実態について検討した。本調査の実施期間は平成 20 年 1 月から 2 月とした。調査施設は北海道釧路にあり、イカ塩辛製品をはじめ魚卵、貝類などを原料とした水産加工品を製造している。

リステリアの試験法については、アクリフラビン量の異なる (10~15mg/L) 各種市販 EB 培地を用い、増菌培地について検討を行った。白カビ、ウオッシュ、セミハード、青カビの各タイプのチーズに血清型 4b 菌 (ATCC43256) あるいは血清型 1/2a 菌 (ゴーダチーズからの分離株) を 30~40CFU / 25g 接種して、各種 EB 培地で 48 時間増菌後、増菌液中のリステリア・モノサイトゲネス菌数を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は問題になる研究内容を含まない。

C. 研究結果

乾燥や高濃度の食塩耐性、低温増殖性といった環境抵抗性を示し、バイオフィルム形成が見られるリステリアの食品製造工程における衛生管理に適したモニタリング方法を確立し、バイオフィルムの形成防止と本菌の除去を目指した管理法を検討することとした。本年度はま

ずバイオフィルムに関する文献調査と情報収集を行い、バイオフィルムに関する情報を整理した。リステリアでは、製造工程に形成されたバイオフィルムが、最終製品のリステリア汚染に大きく関わっており、その除去が本菌の管理に重要であることが確認された。バイオフィルムは多分野 (工業、医療、食品、環境等) に渡り研究、報告がなされており、また目的も金属の腐食防止、感染症予防、食品汚染防止、バイオフィルムの性質を利用した汚染海域の浄化と様々であることが明らかとなった。バイオフィルムの研究を行うためのモデルの開発もなされており、排水処理施設におけるシミュレーションモデルやリステリア・モノサイトゲネスのバイオフィルムに対する抗菌剤の効果を調べるモデルとして、表面処理したステンレス片やテフロンフィルム片をリステリア・モノサイトゲネス混合細胞液に浸して培養することにより、バイオフィルムを人工的に作成する方法が報告されている。

リステリアの現場におけるバイオフィルムに関する検討としては、北海道立釧路水産試験場の協力により、イカ塩辛の製造工程における調査を行った。製造工程をとおして、一般生菌数、大腸菌群、リステリアの汚染実態について調査した。今回の調査ではリステリアは検出されなかったが、一般生菌数の高い作業工程において、バイオフィルムの形成が観察された。

リステリアの検出方法では、アクリフラビン量を変え、EB 培地の増菌効果について検討を行った。各種チーズを対象として検討を行った。アクリフラビン量による増菌効果の大きな違いは認められなかった。一方、チーズの種類により増菌後の菌数に違いが認められた。白カビタイプチーズでは $10^7 \sim 10^9$ CFU / ml に増菌さ

れた。一方、青カビタイプチーズでは大部分の試料で 10^3 CFU/ml に達せず、10CFU/ml 未満のものもあった。

D. 考察

バイオフィームに関する情報収集によりその現状が明らかとなり、更にリステリアの除去を具体的にどのように検討していったら良いかについて多くの情報が収集できた。バイオフィームを人工的に作成する方法が報告されていることから、これらの情報を基に次年度以降リステリアに関するバイオフィームのモデル実験系を確立すること、そのバイオフィームの性質の解析、形成されたバイオフィームからのリステリアの検出方法の提供、およびバイオフィームの処理方法の検討を行う予定である。

イカ塩辛の製造工程における調査により、製造工程をとおして、一般生菌数、大腸菌群の汚染実態について確認できた。今回の実態調査では、リステリアは検出されなかったが、バイオフィームの形成されやすい箇所は特定された。細断機のキャスターと作業台の脚ではバイオフィーム固着が確認され、一般生菌数が $10^5 \sim 10^9$ cfu/100cm² と高い値を示した。これら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ため、作業器材の目視しにくい部位について十分な点検を行うと同時に、バイオフィーム除去をはじめとする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。このような箇所は、リステリアのバイオフィームの形成されやすい箇所でもあると思われた。そこで来年度は、いくつかの製造ラインについてこのようなバイオフィームの形成されやすい箇所を調

査し、形成されたバイオフィームについて検討を行う予定である。バイオフィームからのリステリアの検出方法の検討や、殺菌方法の検討のため、発見したバイオフィームを機械的にはぎ取り、サンプリングしたバイオフィームについて、構成細菌の検討やリステリアの検出などについての検討を行うことにした。

Listeria monocytogenes の試験法としてわが国の公定法は、平成5年に通知法として示された、EB培地で48時間増菌培養後分離培養する方法である。この通知は、リステリア症の主な原因食品がチーズなどの乳・乳製品であること、また、チーズからの本菌検出事例が続いたことから、乳・乳製品の汚染防止を目的として示された。この方法を用いて、定期的に製品や施設・設備の拭き取り検査を実施するよう記載されている。通知法の組成表では、EB培地のアクリフラビンの量は、15mg/L (アクリフラビン塩酸塩として)と記載されている。一方、ただし書きで、「IDF処方の市販製品があればそれを使用してもよい」とされている。IDF標準法では、アクリフラビン量は10mg/L (アクリフラビン塩酸塩として)である。市販のEB培地のアクリフラビン量は10~15mg/Lの範囲で各種販売されている。かつて米国FDAがEB培地のアクリフラビン量を15mg/Lから10mg/Lに変更した経緯もあることから、アクリフラビン量の多少が本菌の検出に差異をもたらす可能性があり、その影響を評価した。検討によりこの範囲のアクリフラビン量では、量の差異による検出の違いは認められなかった。むしろ、わが国の公定法の基となった国際酪農連盟 (IDF) 法が、改正されており、早急にそれに対応した試験法に移行してゆくことが必要であると思われた。

E. 結論

非加熱喫食食品に汚染が認められるリステリア・モノサイトゲネスは、その製造工程におけるバイオフィーム形成が本菌の食品への汚染の原因となっていることが指摘されている。そこで、バイオフィームに関する文献調査と情報収集を行い、バイオフィームに関する情報を整理した。リステリアでは、製造工程に形成されたバイオフィームが、最終製品のリステリア汚染に大きく関わっており、その除去が本菌の管理に重要であることが確認された。

製造工程における現地調査により、一般生菌数、大腸菌群の汚染実態について確認し、バイオフィームが形成されやすい箇所が特定された。この結果を基に、いくつかの製造ラインについてバイオフィームの形成されやすい箇所を調査し、形成されたバイオフィームについて、構成細菌の検討やリステリアの検出方法、制御方法などの検討を進める。

リステリアの増菌培地に添加するアクリフラビンの量について検討し、検出結果に与える影響を評価した。さらに、リステリアの試験法に関する問題点を整理し、今後の試験法の検討項目を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Okada Y, Makino SI, Okada N., Asakura H, Yamamoto S and Igimi S. Identification and analysis of the osmotolerance associated genes in *Listeria monocytogenes*. Food Additives

and Contaminants. in press.

- ② 仲真晶子. 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法[11]リステリア. 防菌防黴学会誌, 36(3) :173-182 (2008).
- ③ 仲真晶子. 食品媒介リステリア症について. 食品機械装置, 45(3):47-51(2008).
- ④ 五十君静信. リステリアの汚染実態とその制御. 月刊 HACCP. 14(No.3):20-26(2008)

2. 学会発表

- ① Nakama, A., Konish, N. Shimojima, Y., Obata, H., Monma, C., Kai, A., Igimi, S., Yamada, S. Prevalence of *Listeria* in feces of patients with gastroenteritis and of healthy food handlers in Tokyo, JAPAN, The 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, Savannah, Georgia, USA (2007).
- ② 岡田由美子、石和玲子、高谷幸、山本茂貴、五十君静信. 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. 日本細菌学会 2007. 3. 26.
- ③ 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講演会. 2007. 5. 10.
- ④ 岡田由美子、岡田信彦、山本茂貴、五十君静信. *Listeria monocytogenes* の定常期における増殖性に関わる遺伝子の網羅的解析. 第81回日本細菌学会総会. 2008. 3. 25.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

厚生労働科学研究費補助金（食の安心・安全確保推進研究事業）
（協力研究報告書）

分担課題名：衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究
リステリアのバイオフィーム形成に関する情報収集

研究協力者 影山 亜紀子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
分担研究者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
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

研究要旨

リステリア・モノサイトゲネスは自然界に広範囲に分布しており、食品が汚染されることでリステリア症を引き起こし、集団食中毒などの原因菌として世界的に対策が求められている。主に乳製品や生ハムなどの加工肉製品、生野菜など ready-to-eat 食品への汚染が重要視されているが、冷蔵庫内の温度でも成育可能であることや、高濃度の食塩耐性であるという本菌の特徴が問題をさらに深刻化させている。近年では食品製造工場施設などの衛生管理が厳しく行われるようになり、汚染は減少するものと予測していたが、実際には依然として汚染があることが報告されている。この原因として製品の製造工程に関わる施設や器具でのバイオフィームの存在があげられ、バイオフィームを形成することにより、本菌はより物理的・化学的・薬剤的に対して抵抗性を示す。現在バイオフィームは様々な分野で問題視されており、その生成の仕組み、除去のための対策など多くの研究が報告されている。これらの報告を基にして、食品製造ラインに形成されるバイオフィームをいかに除去していくかについて参考となる情報を収集した。その結果、バイオフィームとはどのようなものか、どのように形成するのか、モデル系の作成方法、モニタリングの方法、実際に検討されている除去方法等に関する情報が収集できた。これらの情報をもとに今後は実際の食品製造工場で形成されたバイオフィームをサンプルとして、具体的に取り除くための有効な方法や薬剤の検討を行っていく予定である。

A. 研究目的

リステリア・モノサイトゲネスはリステリア症の原因微生物であり、ヒトに於いて食品を介した集団事例が知られており、発症した場合髄膜炎・敗血症等の重篤な症状を示し、その致死率が約 20%とされている。本菌は広い pH 域や温度帯でも成育出来、冷蔵庫内の低い温度でも成育が可能で

ある^{1, 2)}。近年 ready-to-eat 食品の製造工程でのコンタミが本菌の食品からの検出に強く関わっていると報告されている。製造工場の設計や洗浄・殺菌の方法が改良されたが、ready-to-eat 食品が相変わらず製造工程で汚染され続けている³⁾。この原因として本菌がバイオフィームを形成することにより、抗生物質や抗菌剤などに対して抵

抗性となることが考えられている^{4,5,6,7)}。そこでこのバイオフィームに関して幅広く情報を収集することを目的として、これらに関する文献調査による情報収集を行った。

B. 研究方法

インターネットを利用し、バイオフィームに関する企業や個人のホームページからの情報収集やPubMedを用いた文献検索を行うことにより、バイオフィーム全般の現在における一般的な情報をはじめとし、バイオフィーム形成の実験モデル、バイオフィーム除去のための抗菌剤の検討などに関する文献を検索した。また同時に書籍による情報収集も行った。

C. 研究結果

1. バイオフィームとは：バイオフィーム（生体膜）は固体の表面に微生物により形成されるぬるぬるした膜状の構造体で、水のある環境に存在している。バイオフィームは水のだよみやすい場所に出来やすいと言われている。すなわち水道管や貯水槽、工業用水の冷却装置などがあげられる。また医療の現場では体内に移植される装置やチューブなどに形成されやすく、また口腔内に形成されるプラークもバイオフィームである。食品分野では、食品製造工場における製造施設の設備でのバイオフィームの形成が問題となり、一般の住環境に関しては浴室や洗面所、台所などの水まわりで見られるピンク色のぬるぬるもバイオフィームである。医療現場での汚染は感染症などの原因となりうるという問題を持っており、食

品製造工場での汚染はそこで製造される食品の汚染を引き起こし、食中毒など深刻な被害を引き起こす恐れがある。住環境においても快適に生活するという点で問題となっている。

2. バイオフィームと生成過程：バイオフィームは細菌、真菌、藻類、原生動物などの微生物と微生物が生産する菌体外多糖などが集合した構造をしている。バイオフィームという名称からフィルム状であると推測されるかもしれないが、実際は密な構造を有している。レーザー顕微鏡を用いた観察により、付着基質上に細胞外多糖類からなるマトリックスに閉じ込められた細菌のマイクロコロニーが点在し、これらのマイクロコロニー間を密度の低いポリマーが埋めており、そこは水が比較的自由に動ける **water channels** となっている⁸⁾ ということが明らかにされている。このような構造のものは外部との物質のやり取りをする能力を持つ、固体に付着した原始的な多細胞構造体であると考えられる。バイオフィームの形成過程は、まず①裸の固体表面へのイオン、有機物の吸着によるコンディショニングフィルムの形成、②コンディショニングフィルムへの細菌細胞の付着、③付着した細胞の増殖とそれに伴う細胞外ポリマー（EPS）の生産、④他の細菌、微生物も含めた共同体としてのバイオフィームの成長⁹⁾ となっている。バイオフィームの形成には高度に組織化された細菌間の協調、相互作用、コミュニケーションが必要不可欠である。食品製造環境における細菌叢を考えた

場合、多くは複合系で存在しており、複合細菌系ではバイオフィルムの形成量は迅速に増加する傾向にある。例えば単独ではほとんどバイオフィルムを形成しない酵母と乳酸菌の組み合わせが上げられる^②)。バイオフィルムの形成がなぜ問題視されるかという点、それは単独で微生物が存在するのと比較してバイオフィルム中の微生物が抗生物質をはじめとする薬剤に対して抵抗性を増すからである。薬剤を投与しても、表面の微生物しか殺菌することが出来ず、ぬるぬるに阻まれて内部の微生物まで殺菌できないのである。

3. バイオフィルム形成モデル：現在では様々な分野でシミュレーションを行うことにより、実際に実験することなく結果を予測することが可能となっている。バイオフィルムのシミュレーションを行うことにより目では直接見ることの出来ないバイオフィルム内の微生物生体構造を可視化することが出来ると考えられる。排水処理施設分野におけるバイオフィルムを利用した微生物反応プロセスの解析にはAQUASIMという既に実用化されているものがある。また微生物生態の観点からバイオフィルムシステムを解析可能な多次元バイオフィルムモデル¹⁰⁾が開発されている。このモデルの基本的な設定はAQUQSIMに倣っているが、細菌をある一定の大きさを持つ粒子として表現している。本モデルにはバイオフィルムからの細菌の剥離^{11, 12, 13, 14)}、微生物間コミュニケーション¹⁵⁾などの様々な因子を組み込むことが可能となってい

る。一方でシミュレーションではなく実際に実験を行うためのバイオフィルム形成モデルも様々な研究者により開発されている。例えば食中毒細菌（黄色ブドウ球菌、セレウス、サルモネラ、リステリア、腸炎ビブリオ）および日和見感染症菌（緑膿菌）の浮遊細胞とバイオフィルム細胞の加熱殺菌耐性の比較検討を行うためのモデルとして、エッペンドルフチューブに培養液を入れ、30℃24時間静置培養を行い、チューブの内壁にバイオフィルムを形成させ、バイオフィルムの量はクリスタルバイオレット染色法により測定するという非常にシンプルな方法¹⁶⁾が報告されている。またリステリア・モノサイトゲネスのバイオフィルムに対する抗菌剤の効果を調べるモデルとして表面処理したステンレス片やテフロンフィルム片を細胞液（5株のリステリア・モノサイトゲネス混合液）に浸して37℃で3時間培養後、細胞液を除き、洗浄したものを更に新鮮な培地に移し変え、22.5℃で48時間培養し、バイオフィルムを成長させるという方法が報告されている¹⁷⁾。

4. リステリアとバイオフィルム：リステリア症 (Listeriosis) はリステリアによる人畜共通感染症（伝染病）で、人や動物の肺血症、髄膜炎など致死率の高い病原菌として知られている。リステリア症の原因菌はリステリア・モノサイトゲネスである。リステリア属はグラム陽性、無芽胞、カタラーゼ陽性、運動性のある短桿菌で、現在8種が存在している。このうちリステリア・モ

ノサイトゲネス、リステリア・イヴァノヴィ、リステリア・セリゲリの3種は溶血性で病原性があると考えられており、残りの5種は非溶血性である。リステリア属は自然界に広く存在しており、土壌、植物、表面水、汚水、屠畜場などの環境中から分離される。また人をはじめ様々な動物からも分離される。このことから、リステリアに感染した家畜などの糞便や乳が感染源となり、牛乳、チーズなどの乳製品の汚染を引き起こし、家畜の排泄物が土壌や野菜の汚染を引き起こしている。また屠畜場での食肉への汚染が原因となり生ハムなどの汚染も引き起こしている。これらの汚染された食品が原因となり、最終的には人に対する害をおよぼすこととなっている。一方、こうした直接的な汚染のみならず、リステリア・モノサイトゲネスの持つ運動能、低温増殖能、食塩耐性能が汚染の拡大を助長していると考えられる。リステリア菌の血清型はO抗原とH抗原により17の血清型に分類されているが、人の臨床例の大部分は1/2a、1/2bおよび4bである。リステリア菌は健康な人に対しては日和見感染菌であると考えられているが、妊婦、胎児、新生児、幼児、高齢者、肝硬変患者、免疫機能の低下している人、ガンや糖尿病や腎臓病患者、エイズ患者、ステロイド治療を受けている患者などでは重症化することがある^{18, 19, 20)}。

リステリア症は世界中の先進国で発生している。近年細菌による感染症は急速に減少しているが、本症は逆に増加

している。日本では1958年に山形県と北海道で1例ずつ報告されたのが最初で、1970年以降発生の増加が報告されている。1980年代になると欧米諸国でコールスロー、牛乳、チーズなどの食品を介してリステリア症の集団発生が相次いでいる。例を挙げると、1981年3月から8月にかけてカナダで34名の新生児と7名の成人が発症し、15名の新生児と2名の成人が死亡した。患者からリステリア・モノサイトゲネス血清4bが検出され、共通の感染源はコールスローであった。キャベツ畑に散布された、リステリア症で死亡したヒツジの糞便が原因であった。1983年には米国マサチューセッツ州において、同一工場で製造された牛乳により49名がリステリア症を発症し、14名が死亡した。工場に原乳を供給している農場のウシからリステリア・モノサイトゲネスが分離された。1985年1月から6月にかけて米国カリフォルニア州において、妊婦58名を含む85名のリステリア症が発生し、うち29名が死亡した。感染源として同一工場で製造されたチーズが疑われ、そのチーズと工場からリステリア・モノサイトゲネス血清4bが検出された。日本では2001年に北海道で国内産ナチュラルチーズによる国内初の集団感染事例が発生した¹⁾。日本での集団発生は1例のみであるが、リステリア症自体は年間約80例程度報告されている²¹⁾。米国のCDCは、毎年国内で約2500例の人感染例が発生し、そのうち約500人が死亡していると報告している。欧米諸国では以前か

らリステリア・モノサイトゲネスによるリステリア症に注目し、食品衛生および公衆衛生の分野で注目されてきたが、日本においても平成5年に乳および乳製品のリステリア菌の汚染防止について、当時の厚生省から通知が出され²²⁾、食中毒原因菌の一つとして検査法が示された。近年ではこれまでの乳製品などに加え、生食用鮮魚介類や魚介類加工品、生食用野菜・果物など生でそのまま食べる食品‘ready-to-eat食品’のリステリア・モノサイトゲネス汚染の報告がみられるようになった。‘ready-to-eat食品’は加熱せずそのまま食べるため、食品がリステリアに汚染されている場合は危険を伴う。近年、製造工場の設計や洗浄・殺菌の方法が改良されたため、衛生環境は非常に向上しているにもかかわらず、ready-to-eat食品が相変わらず製造過程で汚染され続けている¹⁾。この原因としてバイオフィルムの存在が上げられる。単独でリステリアが存在する場合と比較してバイオフィルム中では抗生物質をはじめとする薬剤に対して抵抗性を増すからである。薬剤を投与しても、表面しか殺菌することが出来ず、ぬるぬるに阻まれて内部の微生物まで殺菌できないのである。しかもリステリア・モノサイトゲネスは低温で増殖可能、食塩耐性であるという特徴から、‘ready-to-eat食品’中に含まれている場合、他の病原菌と比較して重大な影響を与えることとなるのである。

5. バイオフィルム除去のための検討：バイオフィルムの構成要因となっている

微生物を制御するためには、物理的方法、物理化学的方法、化学的方法、生物学的方法がある。これらの方法の中で、実用的には加熱処理が最も広く利用されるが、薬剤処理も汎用される。最近では、それぞれの方法特有の原理に基づき、新規な方法も開発・検討され、食品製造をはじめ様々な環境で既に実用化されているものや、現在開発中のものがある。バイオフィルムに効果があると考えられているものには、加熱処理、マイクロ波、高電圧パルス、光パルス、低エネルギー電子線、ガンマ線・X線、オゾン、過酢酸、二酸化チタン、次亜塩素酸塩、強酸性電解水、過酸化水素、エタノール、塩酸、苛性ソーダ、銀ゼオライト、グルタルアルデヒドがあげられる²³⁾。これらの方法はそれぞれ一長一短があるため、状況に応じて選択しなくてはならない。また、バイオフィルム生成のためのモニタリングには光学顕微鏡による観察が最も簡単であり、表面から剥離したものに適応した検出法としては濁度測定やATP定量、熱量測定などが適用できる。バイオフィルムの構造解析には共焦点レーザー走査顕微鏡を用いる技術がある。固定系のバイオフィルムには蛍光プローブの利用やコンピューターによる画像解析が可能となっている。流れる系でのバイオフィルムには、細胞のトリプトファンやNADHなどの蛍光性生体成分のオンラインモニタリング、ATR-FTIRの利用による方法がある²⁴⁾。

薬剤を用いたバイオフィルムの殺菌効

果についてはいくつかの知見が得られているが、カチオン性化合物に比べて適度な疎水性を有する非イオン性化合物がバイオフィームへの浸透性に優れる傾向があるということや、イソプロピルメチルフェノールの歯周病菌浮遊細胞に対する殺菌力は塩化セチルピリジニウムやトリクロサンに比べて 1/10 程度であるのに、バイオフィーム細胞に対してはるかに高い殺菌作用を示すことなどが知られている²⁵⁾。また表面改質によるバイオフィーム形成防止技術として、抗菌性酸化チタン材によるバイオフィーム形成防止と海洋汚損生物付着防除の試み²⁶⁾や、複合めっき法による抗菌性金属面の作成²⁷⁾、カテキンを徐放する抗菌ステントの利用^{28, 29)}が報告されている。洗浄によるバイオフィーム除去技術として、電解水を用いた方法が幅広く研究されている。酸性電解水（強酸性電解水および微酸性電解水）は薄い食塩水や薄い塩酸水の電気分解によって作られる。強酸性電解水は強力な殺菌力を有するが、残留性が低く、使用しやすい殺菌剤として様々な分野で使用されている。食品分野では 2002 年に酸性電解水が次亜塩素酸水の名称で食品添加物として認可されたことを受け、利用範囲が拡大しつつある。最近では野菜^{30, 31, 32)}、魚介類^{33, 34)}、精肉³⁵⁾、鶏卵³⁶⁾など実際の食品の洗浄殺菌効果に関する報告がなされている。また食品製造機器や施設の洗浄殺菌への応用も報告されている^{37, 38, 39)}。バイオフィームは殺菌剤に対して強い抵抗性を示すため、期待する効果

が得られないことが多いが、リステリア・モノサイトゲネスのバイオフィームに対しても電解水に効果があることが報告されている^{40, 41)}。近年、水の電気分解によって直接オゾン水中に発生させる技術が開発され、水中に高濃度のオゾンを含むオゾン水の調整が可能となってきた⁴²⁾。このオゾン水もカット野菜の洗浄殺菌^{43, 44, 45, 46, 47)}などに主に利用されている。リステリア・モノサイトゲネスのバイオフィームにもオゾン、塩素、過酸化水素が効果があることが報告されている⁴⁸⁾。またマイルドな条件で使用が可能であり、安全性も高い酵素を用いたバイオフィームの除去法が注目されるようになった。生体触媒と呼ばれる酵素はたんぱく質で構成されていることから生体への影響が少ない。また基質特異性を持つためバイオフィームの分解酵素はターゲットとなるバイオフィームに特異的に作用し、構造を異にする人体や微生物が付着している固体への影響が少ないという点が大きな長所と考えられている⁴⁹⁾。またリステリア・モノサイトゲネスに競合する微生物を用いる方法としてニシンを生産する微生物がリステリア・モノサイトゲネスのバイオフィームを減少又は消失させるという報告⁵⁰⁾や同じような結果が Zhao and others⁵¹⁾によっても報告されている。ナイシンが直接表面に吸着することによって、リステリア・モノサイトゲネスの集落が減少するという報告⁵²⁾もされている。Al-Makhlafi and others⁵³⁾はリステリア・モノサイトゲネスの付

着においてシリカ表面への吸着にミルクプロテインやBSAが与える影響について検討した。Arizcunら⁵⁴⁾は高いpHがリステリア・モノサイトゲネスのバイオフィルムの不活化に影響することを報告している。近年、クリーニングと抗菌剤の両方を行うことが抗菌剤単独で行うのよりもリステリア・モノサイトゲネスのバイオフィルムに効果がある⁵⁵⁾ことが報告されている。

D. 考察

文献調査を行った結果、バイオフィルムに関連した報告は多分野（工業、医療、食品、環境等）に渡っており、しかも目的に関しても、例えば金属の腐食を防止するため、感染症を予防するため、食品汚染を防ぐため、逆の発想でバイオフィルムの性質を利用して、汚染されてしまった海域などを浄化するために用いるなど様々であることも明らかとなった。このようにバイオフィルムに対する世間の関心は非常に高く、これからますます発展していく分野であるという印象を受けた。今回特に注目している、食品製造ラインにおけるバイオフィルムの形成が原因でおこると考えられる、リステリア症を防ぐという目的に限定しても、様々な抗菌剤の報告がなされており、関心の高さが伺えた。これらの情報を基に、実際の食品製造ラインのバイオフィルム除去に役立てたいと考えている。

E. 結論

リステリア・モノサイトゲネスが原因でおこるリステリア症の感染源として、ready-to-eat食品があげられるが、冷蔵庫内の温度でも成育可能であることや、食塩耐性であるという本菌の特徴が問題をさらに深刻化させている。近年では食品製造工場施設などの衛生管理が向上したが、依然として多くの感染が報告されている。この原因としてバイオフィルムの存在が注目されている。今回バイオフィルムとその取り除き方についての文献を収集したところ、多くの研究事例の存在が明らかとなった。これらの情報を活かし、実際の食品製造ラインに出来たバイオフィルムを用いて、個々に対応する形でバイオフィルム除去の検討を行っていくこととする。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

引用文献

- 1) Donnelly CW, Briggs EH. (1986) Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in milk as a function of milk composition. J Food Prot 49:994.
- 2) Rosenow EM, Marth EH. (1987) Growing of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 13, 21 and 35C. J Food Prot 50:452.
- 3) Tompkin RB. (2002) Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. J Food Prot 65:709-725.
- 4) Blackman IC, Frank JF. (1996) Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. J Food Prot 59:827-831.
- 5) Kumar CG, Anand SK. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. Int J Food Microbiol 42:9-27.
- 6) Vatanyoopaisarn S, Nazli A, Dodd CER, Rees CED, Waites WM. (2000) Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. Appl Environ Microbiol 66:860-863.
- 7) Wong ACL. (1998) Biofilms in food processing environments. J Dairy Sci 81: 2765-2770.
- 8) 古畑勝則, 福山正文 (2006) 防菌防ばい, 34, pp323-328.
- 9) 森崎久雄, 大島広行, 磯部賢治編 (1998) バイオフィルム pp 49-67, (株)サイエンスフォーラム.
- 10) Picioreanu C, Kreft JU, Van Loosdrecht MC. (2004) Particle-based multidimensional multispecies biofilm model. Appl Environ Microbiol 70:3024-40
- 11) Picioreanu C, van Loosdrecht MC, Heijnen JJ. (2001) Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. Biotechnol Bioeng 72:205-18.
- 12) Hunt SM, Hamilton MA, Sears JT, Harkin G, Reno J. (2003) A computer investigation of chemically mediated detachment in bacterial biofilms. Microbiology 149:1155-63.
- 13) Xavier JB, Picioreanu C, Rani SA, van Loosdrecht MC, Stewart PS. (2005) Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix--a modelling study. Microbiology 151:3817-32.
- 14) Chambless JD, Hunt SM, Stewart PS. (2006) A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. Appl Environ Microbiol 72:2005-13.
- 15) Hense BA, Kuttler C, Müller J, Rothballer M, Hartmann A, Kreft JU. (2007) Does

- efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? Nat Rev Microbiol 5:230-9.
- 16) 森川正章「食中毒細菌バイオフィルムの加熱殺菌に関する実験」,平成 18 年度病原微生物データ分析実験作業成果報告書
 - 17) Pan Y, Breidt F, Kathariou Jr-S. (2006) Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. Appl Environ Microbiol 72:7711-7717.
 - 18) FDA/WHO:Joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of microbiological hazards in foods.
 - 19) FDA/CFSA:Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of Ready-To-Eat Foods.
 - 20) U.S. National Food safety Programa and Activities of FDA: Risk Assessment; Quantitative risk assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of Ready-To-Eat foods.
 - 21) 五十君静信 (2003) 食品由来のリステリア菌による健康被害, 食品衛生研究, 53(4), 19-23.
 - 22) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知 “乳及び乳製品のリステリアの汚染防止等について” 平成 5 年 8 月 2 日, 衛乳第 169 号.
 - 23) 土戸哲明 (2008) 微生物制御とその考え方 -バイオフィルムに関連して- pp 123-132, バイオフィルムの基礎と制御 (特性・解析事例から形成防止・有効利用まで), (株) エヌ・ティー・エス.
 - 24) 土戸哲明 (2003) バイオフィルムの生成と衛生管理, 「イーズ」NO. 031.
 - 25) ライオン株式会社 会社案内 発表資料 2004 年 (<http://www.lion.co.jp/press/2004052.htm>)
 - 26) 菊池慎太郎 (2008) レーザー照射による抗菌性酸化チタン材の作成とバイオフィルム形成防止への応用 pp 149-159, バイオフィルムの基礎と制御 (特性・解析事例から形成防止・有効利用まで), (株) エヌ・ティー・エス.
 - 27) 西岡求, 田谷正仁 (2008) 複合めつき法による抗菌性金属面の作成 pp 160-167, バイオフィルムの基礎と制御 (特性・解析事例から形成防止・有効利用まで), (株) エヌ・ティー・エス.
 - 28) Maeyama R, Mizunoe Y, Anderson JM, Tanaka M, Matsuda T. (2004) Confocal imaging of biofilm formation process using fluoroprobed *Escherichia coli* and fluoro-stained exopolysaccharide. J Biomed Mater Res 70A:274-282.
 - 29) Maeyama R, Kwón IK, Mizunoe Y, Anderson JM, Tanaka M, Matsuda T. (2005) Novel bactericidal surface: Catechin-loaded surface-erodible polymer prevents biofilm formation. J Biomed Mater Res 70A:146-155.
 - 30) 吉田恭一郎, 阿知波信夫, 片寄政彦, 木澤由美子, 小関成樹, 五十部誠一郎, 阿部一

- 博 (2005) 電解水によるカットネギの殺菌処理および共焦点レーザー顕微鏡による表面観察 pp266-272, 食品科学工学.
- 31) 吉田恭一郎, 阿知波信夫, 片寄政彦, 小関成樹, 五十部誠一郎, 阿部一博 (2005) カットネギ製造現場における電解水処理の効果 pp273-277, 食品科学工学.
 - 32) Wei H, Brandt MJ, Wolf G, Hammes WP. (2005) Optimization of acidified warm water treatment to improve the microbiological status and sensory quality of iceberg lettuce. *Eur Food Res Technol* 220:168-175.
 - 33) Ozer NP, Demirci A. (2006) Electrolyzed oxidizing water treatment for decontamination of raw salmon inoculated with *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* Scott A and response surface modeling. *J Food Eng* 72:234-241.
 - 34) Loi-Braden MH, Huang TS, Kim JH, Wei CI, Weese J. (2005) Use of electrolyzed oxidizing water for quality improvement of frozen shrimp. *J Food Sci* 70:M310-M315.
 - 35) Fabrizio KA, Cutter CN. (2005) Application of electrolyzed oxidizing water to reduce *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats. *Meat Sci* 71:327-333.
 - 36) Park CM, Hung YC, Lin CS, Brackett RE (2005) Efficacy of electrolyzed water in inactivating *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* on shell eggs. *J Food Prot* 68:986-990.
 - 37) Liu CC, Duan JY, Su YC. (2006) Effects of electrolyzed oxidizing water on reducing *Listeria monocytogenes* contamination on seafood processing surfaces. *Int J Food Microbiol* 106:248-253.
 - 38) Walker SP, Demirci A, Graves RE, Spencer SB, Roberts RF. (2005) Cleaning milking systems using electrolyzed oxidizing water, *Trans. ASAE* 48:1827-1833.
 - 39) Ayebah B, Hung YC. (2005) Electrolyzed water and its corrosiveness on various surface materials commonly found in food processing facilities. *J Food Process Eng* 28:247-264.
 - 40) Ayebah B, Hung YC, Kim C, Frank JF. (2006) Efficacy of electrolyzed water in the inactivation of planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* in the presence of organic matter. *J Food Prot* 69:2143-2150.
 - 41) Ayebah B, Hung YC, Frank JF. (2005) Enhancing the bactericidal effect of electrolyzed water on *Listeria monocytogenes* biofilms formed on stainless steel. *J Food Prot* 68:1375-1380.
 - 42) 吉田幸一 (2004) 新しいオゾン水生成の原理と殺菌・洗浄・脱臭への応用 pp35-46, 食品工業.
 - 43) Yuk HG, Yoo MY, Yoon JW, Moon KD, Marshall DL, Oh DH. (2006) Effect of combined ozone and organic acid treatment for control of *Escherichia coli* O157: H7 and

Listeria monocytogenes on lettuce. J Food Sci 71:M83-M87.

- 44) Koseki S, Isobe S. (2006) Effect of ozonated water treatment on microbial control and on browning of iceberg lettuce (*Lactuca sativa* L.). J Food Prot 69:154-160.
- 45) Ketteringham L, Gausseres R, James SJ, James C. (2006) Application of aqueous ozone for treating pre-cut green peppers (*Capsicum annuum* L.). J Food Eng 76:104-111 .
- 46) Zhang LK, Lu ZX, Yu ZF, Gao X. (2005) Preservation of fresh-cut celery by treatment of ozonated water. Food Control 16:279-283.
- 47) Kim JG, Yousef AE, Chism GW. (1999) Use of ozone to inactivate microorganisms on lettuce. J Food Saf 19:17-34.
- 48) Robbins JB, Fisher CW, Moltz AG, Martin SE. (2005) Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. J Food Prot 68:494-498.
- 49) 金子哲, 吉田誠 (1999) 分解酵素を用いたバイオフィーム除去システム pp 241-251, バイオフィームの基礎と制御 (特性・解析事例から形成防止・有効利用まで), (株) エヌ・ティー・エス.
- 50) Leriche V, Chassaing D, Carpentier B. (1999) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. Int J Food Microbiol 51:169-182.
- 51) Zhao T, Doyle MP, Zhao P. (2004) Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion Microorganisms. Appl Environ Microbiol 70:3996-4003.
- 52) Bower CK, McGuire J, Daeschel MA. (1995) Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. Appl Environ Microbiol 61:992-997.
- 53) Al-Makhlafi H, Nasir A, McGuire J, Daeschel MA. (1994) Influence of preadsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces. Appl Environ Microbiol 60:3560-3565.
- 54) Arizcun C, Vasseur C, Labadie J. (1998) Effect of several decontamination procedures on *Listeria monocytogenes* growing in biofilms. J Food Prot 61:731-734.
- 55) Somers EB, Wong AC. (2004) Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. J Food Prot 67:2218-2229.

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）
（協力研究報告書）

衛生管理における食中毒菌のモニタリング方法に関する研究
Listeria monocytogenes 検出用 EB 培地の増菌効果の比較検討

協力研究者 仲真晶子 東京都健康安全研究センター 微生物部
井田美樹 東京都健康安全研究センター 微生物部
加藤 玲 東京都健康安全研究センター 微生物部
平井昭彦 東京都健康安全研究センター 微生物部
金子誠二 東京都健康安全研究センター 微生物部

研究要旨

アクリフラビン量の異なる（10～15mg/L）各種市販 EB 培地を用い、チーズから *L.monocytogenes* を検出する際の本菌の増菌効果を比較検討した。白カビ、ウオッシュ、セミハード、青カビの各タイプのチーズに血清型 4b 菌（ATCC43256）あるいは血清型 1/2a 菌（ゴーダチーズからの分離株）を 30～40CFU / 25g 接種して、各種 EB 培地で 48 時間増菌後、増菌液中の *L.monocytogenes* 菌数を測定した。その結果、アクリフラビン量による増菌効果の大きな違いは認められなかった。一方、チーズの種類により増菌後の菌数に違いが認められた。白カビタイプチーズでは $10^7 \sim 10^9$ CFU / ml に増菌された。一方、青カビタイプチーズでは大部分の試料で 10^3 CFU/ml に達せず、10CFU/ml 未満のものもあった。このような場合には本菌を検出できない可能性があり、今後、通知法の見直しをも考慮に入れて標準法を作成する必要があると考えられた。

A. 研究目的

Listeria monocytogenes の検査法として公定法として定められているものは、平成 5 年に通知法として示された、EB 培地で 48 時間増菌培養後分離培養する方法である。この通知は、リステリア症の主な原因食品がチーズなどの乳・乳製品であること、また、チーズからの本菌検出事例が続いたことから、乳・乳製品の汚染防止を目的として提出された。この方法を用いて、定期的に製品や施設・設備の拭き取り検査を実施するよう記載されている。本法は、乳・乳製品の世界的な標準法である国際酪農連盟（IDF）の方法に準拠したものである。

通知法の組成表では、EB 培地のアクリフラビンの量は、15mg / L（アクリフラビン塩酸塩として）と記載されている。一方、ただし書きで、「IDF 処方の市販製品があればそれを使用してもよい」とされている。IDF 標準法では、アクリフラビン量は 10mg / L（アクリフラビン塩酸塩として）である。市販の EB 培地のアクリフラビンの量は 10～15mg / L の範囲で各種販売されている。かつて米国 FDA が EB 培地のアクリフラビン量を 15mg / L から 10mg / L に変更した経緯もあることから、アクリフラビン量の多少が本菌の検出に差異をもたらす可能性がある。

本研究では、アクリフラビン量の異なる

各種市販 EB 培地を用い、種々のチーズから *L. monocytogenes* を検出する際の本菌の増菌効果を比較検討した。

B. 研究方法

B-1 供試材料

あらかじめ *Listeria* 属菌に汚染されていないことを確認した白カビタイプ (カマンベール クールドリヨン)、青カビタイプ (スチルトン)、ウオッシュタイプ (ピエダングロワ)、セミハードタイプ (ゴータ) の 4 種類のナチュラルチーズを供試した。

EB 培地は、MERCK、Difco、OXOID から市販されている 5 種類を用いた (表 1)。各培地は会社 (A、B、C) と含まれているアクリフラビン量を組み合わせて表示した。アクリフラビン量が 14mg / L のものもあつたが便宜的に表示は 15mg とした。

供試菌株は、*L. monocytogenes* 血清型 4b (ATCC43256, 米国 California 州で発生したチーズによる集団事例由来株) および血清型 1/2a (MMS01110, ゴータチーズからの分離株) を用いた。保存株を Trypticase soy broth (BBL) で 30°C、18 時間の条件で 3 代継代培養して接種菌液とした。

B-2 実験方法

各種チーズの表面を除いた部分を採取し、細碎、均一化した後 25g ずつ分取した。チーズ 25g 当り 30 ~ 40 CFU の *L. monocytogenes* を接種し、各種 EB 培地を 225ml 加え、30°C で 48 時間増菌培養した。増菌培養液中の *L. monocytogenes* 菌数は PALCAM 培地 (MERCK) を用いてミスラ法によりおこなった。菌数が少ない場合は、PALCAM 培地に増菌培養液を 0.1ml 滴下、塗抹して発育集落を計測した。

各試料 2 検体で実施した。青カビタイプチーズについては増菌されない場合があつ

たため、各試料 3 検体を実験に供した。また、白カビタイプ及びウオッシュタイプチーズについては表面部分 (皮) のみ採取した試料も用いた。

さらに、供試チーズの細菌数を Tryptose Agar (Difco) 平板を用いたミスラ法 (30°C 培養) で測定した。また、*L. monocytogenes* を接種しない試料についても EB 培地で増菌し、増菌後の増菌液中の細菌数を同様の方法で測定した。

C. 研究結果

C-1 白カビタイプチーズ (図 1)

チーズの表面を除いた部分 (中身) では 48 時間培養後、 $10^7 \sim 10^9$ CFU / ml に増菌された。また、アクリフラビン量及びメーカーによる増菌効果の差異は認められなかった。

チーズの皮部分を用い、4b 株を接種した場合の A 社 (15mg) と B 社 (10mg) の EB 培地では、増菌後の菌数が 10^6 CFU / ml とやや少なかった。

C-2 ウオッシュタイプチーズ (図 2)

チーズの中身では大部分の EB 培地で $10^4 \sim 10^6$ CFU / ml に増菌された。ただし、1/2a 株を接種した場合の C 社 (15mg) の EB 培地では増菌後も 10^3 CFU/ml に至らなかった。

チーズの皮部分では、 $10^5 \sim 10^8$ CFU / ml まで増菌された。同じ培地で比較した場合、全ての培地で、チーズの中身に比べ、皮部分で増菌後の菌数が多かった。

C-3 セミハードタイプチーズ (図 3)

増菌培養後の菌数は $10^4 \sim 10^8$ CFU / ml であった。A 社、B 社ともにアクリフラビン量 10mg の EB 培地に比べ 15mg でより増菌効果が高い傾向があつた。一方、C 社の EB 培地はアクリフラビン量が 15mg で

あったが、A社、B社のアクリフラビン量10mgのEB培地と比べ増菌後の菌数が少なかった。

C-4 青カビタイプチーズ (図4)

大部分の試料で48時間増菌後の菌数が 10^3 CFU/mlに達せず、検出限界(10CFU/ml)未満のものもあった。

C-5 供試チーズの細菌数及びEB増菌培養後の細菌数 (表2)

供試チーズの細菌数は、白カビタイプ及びウオッシュタイプで $10^8 \sim 10^9$ CFU/g、セミハードタイプで $10^5 \sim 10^6$ CFU/g、青カビタイプで 10^7 CFU/gであった。

増菌培養後の増菌液中の細菌数はどのタイプのチーズでも、 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mlであった。

D. 考察

チーズに*L. monocytogenes*を接種し、各種市販EB培地の増菌効果を比較したが、アクリフラビン量の差異による大きな違いは認められなかった。一方、チーズの種類により増菌後の菌数に大きな違いがあった。

白カビタイプチーズで最も増菌効果が優れており $10^7 \sim 10^9$ CFU/mlに増菌された。一方、青カビタイプチーズでは大部分の試料で 10^3 CFU/mlに達せず、10CFU/ml未満のものもあった。

ナチュラルチーズの製造には、スターターとして乳酸菌が用いられ、さらに、チーズの種類により、それぞれの熟成方法に応じてカビ、酵母、細菌が添加される。EB培地での増菌過程において、これらの微生物が*L. monocytogenes*の増殖に影響を与えることが考えられる。これら微生物の指標として、各供試チーズの細菌数を測定した。その結果、 10^5 CFU/gを超える細菌がチーズに含まれており、EB培地で30℃48

時間培養した後には $10^8 \sim 10^9$ CFU/mlに増菌されることが明らかになった。

青カビタイプチーズではEB培地での増菌効果が低かったが、これは、青カビをはじめ、チーズに含まれている微生物あるいは熟成過程で生産された物質が*L. monocytogenes*の増殖に抑制的に作用することが考えられた。

供試したセミハードタイプと青カビタイプチーズは外皮が外されており、表面と内側はほぼ同じ状態であった。一方、白カビタイプは白カビ、ウオッシュタイプは細菌による表面熟成型チーズであることから、皮部分と中身とでは菌叢や成分が異なる。そのため、皮部分だけの試料についても同様に増菌効果を調べた。白カビタイプでは、皮部分と中身で増菌効果に大きな差異は認められなかった。ウオッシュタイプチーズでは皮部分が中身と比べ増菌後の*L. monocytogenes*菌数が多かった。中身の菌叢と比較して皮部分の菌叢のほうがEB培地中で競合するものが少ないこと、皮部分の成分が*L. monocytogenes*の増殖に、より適していること等が考えられた。

通知法では検体採取の項で、「表面部分をできるだけ除いた25gをそのまま試料とする」と記載されている。一方、IDF標準法の検体採取の項では、「表面部分(皮)と中身のどちらも採取する場合がある」ことが記載されている。①本菌の汚染はチーズ表面で高いことが多いこと②表面部分(皮)も喫食する場合があること③個別包装されている場合、表面部分を除く必要性が必ずしもあるとは考えられないことから、今後は表面部分を含め検査する場合が考えられる。本実験の結果から、表面部分は内側部分と比べ、EB培地での本菌の増殖は同等あるいはより高いことから、検査に表面部分を含めても検出率が下がることはないと考えられた。

青カビタイプチーズでは、増菌培養後の *L.monocytogenes* の菌数が 10CFU/ml 未満のものもあった。増菌培地から分離培地に塗抹する量が通常 20 μ l 程度であることを考えると、このような場合には *L.monocytogenes* を分離培地に移植できず、本菌を検出できない可能性が考えられる。

最近、国際酪農連盟では乳・乳製品からの *L.monocytogenes* 検査法を国際規格法 (ISO 法) に統一することが決定された。図 5 に通知法と ISO 法を比較して示した。

ISO 法では half Fraser 培地から Fraser 培地に移植する二段階増菌法を採用している。筆者らは EB 培地と half Fraser 培地及び Fraser 培地の増菌効果を比較し、青カビタイプチーズの場合も二段階増菌を用いることにより十分な増菌効果が得られることを明らかにした (第 27 回食品微生物学会学術集会, 表 3, 表 4)。今後、わが国においても、通知法の見直しをも考慮に入れて標準法を作成する必要があると考えられた。

E. 結論

チーズに *L.monocytogenes* を接種し、各種市販 EB 培地の増菌効果を比較したが、アクリフラビン量の差異による大きな違いは認められなかった。

一方、チーズの種類により増菌後の菌数に大きな違いがあった。青カビタイプチーズでは、EB 培地で 48 時間増菌培養後、本菌の菌数は 10^3 CFU/ml に達せず、10CFU/ml 未満のものもあった。このような場合には本菌を検出できない可能性が考えられる。一方、青カビタイプチーズの場合も国際規格法 (ISO 法) で採用されている二段階増菌を用いれば十分増菌される。今後、わが国においても、通知法の見直しをも考慮に入れて標準法を作成する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

仲真晶子. 食品の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 [11] リステリア. 防菌防黴学会誌, 36(3) : 173-182 (2008).

仲真晶子. 食品媒介リステリア症について. 食品機械装置, 45(3) : 47-51(2008).

2. 学会発表

Nakama, A., Konish, N. Shimojima, Y., Obata, H., Monma, C., Kai, A., Igimi, S., Yamada, S. Prevalence of *Listeria* in feces of patients with gastroenteritis and of healthy food handlers in Tokyo, JAPAN, The 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, Savannah, Georgia, USA (2007).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

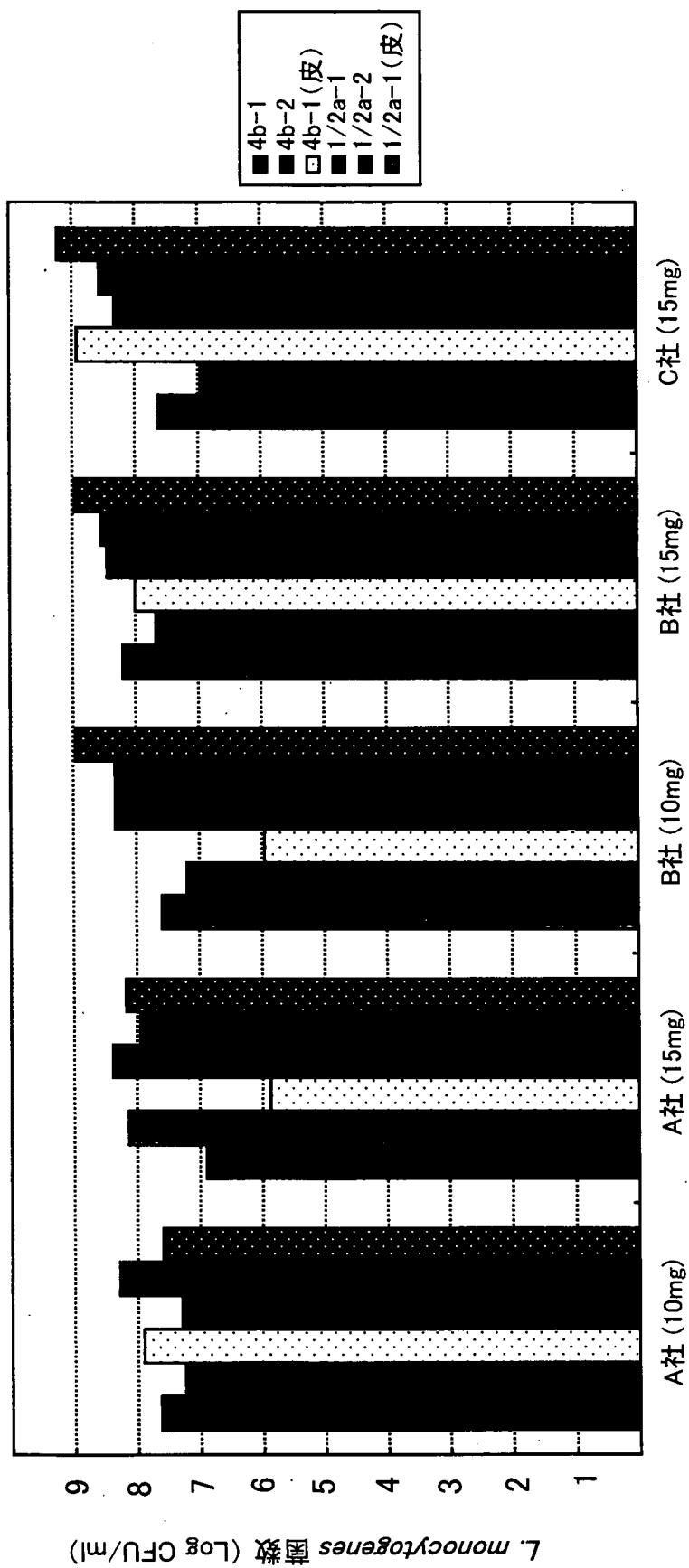


図1 各種EB培地の増菌効果の比較(白カビタイプチーズ)