

が表面だけでなく内部にまで汚染していたことが考えられた。さらに、製品中の身欠きニシンの水分活性や pH から、保管状況によってリステリア菌が急増することも考えられた。

野菜類については、野菜表面の泥に菌数が多く付着していたことが明らかとなり、カット後の野菜へ汚染させないためにも、作業手順を遵守することが重要と考えられた。

今後、原料となる身欠きニシンにおいては、その製造工程での衛生管理技術の開発が必要である。

#### **E. 結論**

ニシン漬け製造において、原材料から最終製品に至る過程で食中毒菌に対する危害分析を行った。使用した身欠きニシン冷凍原料から *L. monocytogenes* が検出され、製品に汚染していたことが明らかとなった。また、使用した身欠きニシンの製造業者は特定されなかったことから、購入原料の履歴を明らかにすることも重要と考えられた。

なお、当該工場の衛生管理は、概ね良好であったが、一般的衛生管理事項の再点検と改善および定期的に身欠きニシンの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

### 身欠きニシンの微生物制御予備試験

前述のとおり、身欠きニシンの大腸菌群及びリステリア菌による汚染が著しく、このため最終製品からこれらの細菌が検出されるにつながったと推察される。したがって、身欠きニシンの制御は大変重要と考える。本年度において我々は、低温殺菌による制御を試み、若干の知見を得たので報告する。

身欠きニシンを乾熱および湿熱により加熱処理した。その処理は乾熱の場合 60℃及び 70℃で 30 分間、また、湿熱の場合は 50℃、60℃、70℃で各 30 分間行った。乾熱処理の場合は身欠きニシンをそのままの状態、湿熱処理においては、身欠きニシンをビニール袋に入れた後、真空包装して加熱処理を行った。その結果、乾熱処理の場合は皮が剥がれて筋肉が劣化し、実用に供しえない旨漬物工場の担当者から報告があった(図 1)。湿熱処理の場合は 60℃30 分で効果が認められたが(図 3)、筋肉の若干の変性が確認されたので、漬物に使用できるかどうか検討が必要と思われた(図 2)。

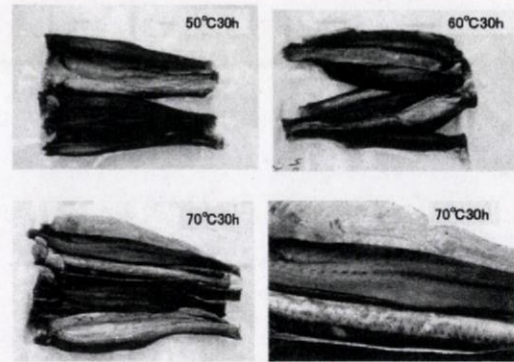


図2:微生物制御(真空包装後、湯煎による加熱後の写真)

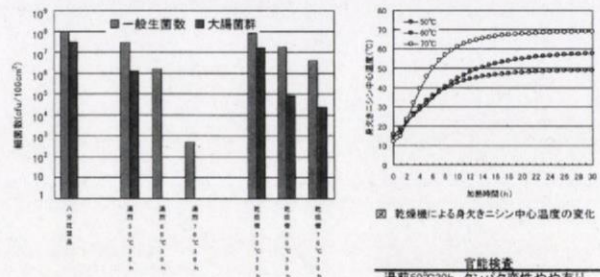


図3:追加試験 加熱条件による菌数変化

官能検査	
湿熱50℃30分	タンパク変性やや有り
湿熱60℃30分	タンパク変性有り
湿熱70℃30分	タンパク変性有り
乾熱50℃30分	タンパク変性やや有り
乾熱60℃30分	タンパク変性有り
乾熱70℃30分	タンパク変性有り



図1:微生物制御(乾燥機による加熱前、加熱後の写真)

拭き取り検査(100cm<sup>2</sup>)

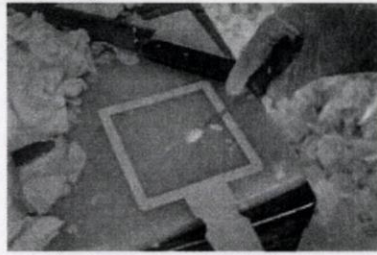
1日目

### 1. テーブル



一般:  $9.7 \times 10^3$  大腸菌群: 300以下  
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

### 2. まな板



一般:  $1.5 \times 10^4$  大腸菌群: 300以下  
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

### 3. 包丁



一般:  $2.3 \times 10^4$  大腸菌群: 300以下  
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

### 4. 作業員1



一般:  $1.9 \times 10^4$  大腸菌群: 300以下  
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

拭き取り検査(100cm<sup>2</sup>)

1日目

### 5. 作業員2



一般:  $2.4 \times 10^4$  大腸菌群: 300以下  
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

### 6. 床



一般:  $1.4 \times 10^4$  大腸菌群: 300以下  
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

### 7. 野菜用タンク



一般: 300以下 大腸菌群: 300以下  
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

### 8. 塩水溶解タンク

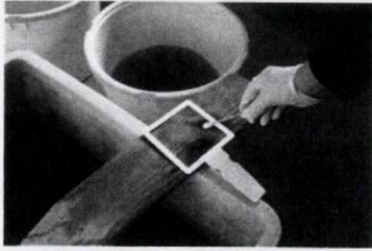


一般: 300以下 大腸菌群: 300以下  
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

拭き取り検査(100cm<sup>2</sup>)

1日目

9. 塩水攪拌棒



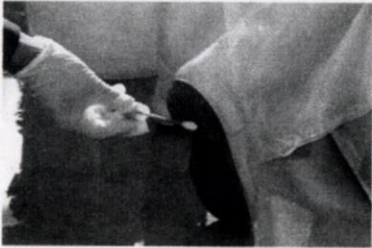
一般:300以下 大腸菌群:300以下  
大腸菌:陰性 食中毒菌:陰性

10. 長靴表面



一般: $3.9 \times 10^3$  大腸菌群:300以下  
大腸菌:陰性 食中毒菌:陰性

11. 長靴裏



一般: $1.4 \times 10^4$  大腸菌群:300以下  
大腸菌:陰性 食中毒菌:陰性

12. 大根用の容器



一般: $1.4 \times 10^4$  大腸菌群:300以下  
大腸菌:陰性 食中毒菌:陰性

試料検査(g)

1日目

キャベツ カット前



一般: $2.0 \times 10^7$  大腸菌群: $1.0 \times 10^4$   
大腸菌:陰性 食中毒菌:陰性

キャベツ カット後



一般: $5.3 \times 10^3$  大腸菌群:300以下  
大腸菌:陰性 食中毒菌:陰性

大根 カット前



一般: $4.6 \times 10^6$  大腸菌群: $1.8 \times 10^4$   
大腸菌:陰性 食中毒菌:陰性

大根 カット後

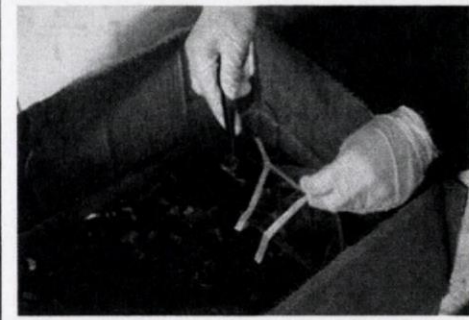


一般: $4.1 \times 10^3$  大腸菌群:300以下  
大腸菌:陰性 食中毒菌:陰性

試料検査(g)

1日目

身欠きニンシ



身欠きニンシ1	一般: $6.1 \times 10^7$	大腸菌群: $2.9 \times 10^7$	大腸菌: 陰性	リステリア: 陽性
身欠きニンシ2	一般: $3.4 \times 10^7$	大腸菌群: $1.8 \times 10^7$	大腸菌: 陰性	リステリア: 陽性
身欠きニンシ3	一般: $5.6 \times 10^7$	大腸菌群: $2.9 \times 10^7$	大腸菌: 陰性	リステリア: 陽性

試料検査(g, ml)

2日目

水戻し 身欠きニンシ



一般: $5.6 \times 10^7$	大腸菌群: $3.4 \times 10^7$
大腸菌: 陰性	リステリア菌: 疑陽性

カット/ニンジン



一般: $1.2 \times 10^3$	大腸菌群: 300以下
大腸菌: 陰性	リステリア菌: 疑陽性

水戻し後 液処理 身欠きニンシ



身欠きニンシ1	一般: $6.4 \times 10^7$	大腸菌群: $3.2 \times 10^7$
	大腸菌: 陰性	リステリア: 陽性
身欠きニンシ2	一般: $8.2 \times 10^7$	大腸菌群: $3.7 \times 10^7$
	大腸菌: 陰性	リステリア: 陽性
身欠きニンシ3	一般: $7.0 \times 10^7$	大腸菌群: $4.0 \times 10^7$
	大腸菌: 陰性	リステリア: 陽性

13. 作業員1



一般:  $6.4 \times 10^3$  大腸菌群:  $2.2 \times 10^3$   
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

14. 作業員2



一般:  $5.3 \times 10^3$  大腸菌群:  $2.4 \times 10^3$   
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

15. 青ザル



一般:  $1.1 \times 10^4$  大腸菌群:  $9.4 \times 10^2$   
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

最終製品



一般:  $3.5 \times 10^7$  大腸菌群:  $3.3 \times 10^7$   
大腸菌: 陰性 食中毒菌: 陰性

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）

果実・野菜・漬物等における食中毒菌の衛生管理に関する研究

分担研究報告書－4

（市販食品から分離されたリステリア菌の遺伝型の研究）

小班総括者：牧野壮一（国立大学法人帯広畜産大学・理事・副学長）

研究協力者：川本 恵子（国立大学法人帯広畜産大学・大動物特殊疾病研究センター・准教授）

研究要旨 近年、各種食品製造施設において、食品の安全性確保についてより一層の向上を図るため、危害分析重要管理点方式（HACCP）を導入した衛生管理システムの構築が進められている。HACCP 導入にあたっては、対象食品について発生しうる危害を科学的データに基づいて評価し、原料の搬入から製品となる製造の各段階で発生する危害を分析し、その管理手法を確立することが重要である。本研究では、果実・野菜・漬け物類を対象食品とし、各製造工程における危害分析を行い、その有害微生物の制御手法を確立するとともに、安全な食品製造における HACCP モデルを作成する。

本分担研究は、生鮮野菜を原材料とし、非加熱で摂取する「浅漬け」において、工場内外の環境、製造工程および半製品、製品での微生物汚染状況調査を行い、安全で衛生的な食品製造を行うための科学的根拠となるデータを得るために行った。特に、平成 19 年度の調査研究から、リステリアの制御を重点的に行うために、市販食品から分離されたリステリア菌について、それらの遺伝型の違いについて検討し、それらの汚染の相関性等について議論した。

A. 研究目的

本研究は、生鮮野菜を原材料とし、非加熱で摂取する「浅漬け」において、工場内外の環境、製造工程および半製品、製品での微生物汚染状況調査を行い、安全で衛生的な食品製造を行うための科学的根拠となるデータを得ることを目的としている。また、平成 19 年度の検査結果を踏まえ、リステリアの遺伝子型別を実施した。

B. 研究方法

B-1. 浅漬けより分離されたリステリア菌の解析

前年度の研究において、市販の浅漬け食品サンプル 108 個中 12 個からリステリア属菌が分離された。これらの分離株について、血清型、病原遺伝子解析を行った。

- 1) *L. monocytogenes* の血清型別  
血清型は市販のリステリア型別用免疫血清（デンカ生研）を用いて行った。

2) PCR法による分離株の病原遺伝子プロファイル

標的とした病原遺伝子および使用したプライマー配列を表1に示す。BHIで増殖させた菌からMORA-Extractキット(極東製薬)を用いてDNAを抽出した。10 ngを鋳型量として、Takara ExTaqポリメラーゼにより、熱変性94°C-30秒、アニーリング59.5°C-30秒、伸長反応72°C-1分を35サイクル行った。PCR反応はBio-rad iCyclerを用いて行った。

3) PFGE (パルスフィールドゲル電気泳動) 型の解析

B社浅漬けから分離されたリステリア株のうち、4b株3株について、CHEF-DRIII(Bio-rad)を使用して、FDA PulseNetで推奨する方法に準じて行い、制限酵素はAscI(New England Biolabs)およびApaI(Takara)を使用した。

#### B-2. HACCP指導後の汚染調査

HACCP指導後のB社の市販浅漬けについてリステリアの汚染状況をモニタリングした。地元の小売店でB社浅漬けを14サンプル購入し、一般生菌数および*L. monocytogenes*汚染について調べた。細菌の分離同定方法は食品衛生検査指針に従い、行った。すなわち、浅漬け検体25 gを無菌的にとり、ブレンダーで細かく粉碎した後、225 mlの増菌培地(half FRASER+Supplement)を加えて、30秒間ストマッキングを行い、30°Cで一晩培養し1次増菌を行った。増菌培養液から1 mlを採取し、9倍量のhalf FRASER brothを加えて、さらに増菌を行い、1白金耳をCHROMagar Listeria培地に塗抹し、37°Cで培養し、24~48時間後のコロニーの形態を観察した。

#### C. 研究結果

##### C-1. 浅漬けより分離されたリステリ

##### A菌の解析

分離株の血清型を表2に示す。ヒトのリステリア症で主に分離される1/2a、1/2b、4bはそれぞれ16.37%、8.33%、58.33%であった。最も多い血清型は4bであった。続いて、PCR法により分離株におけるリステリアの特異的病原遺伝子11種類について調べたところ(図1および表3)、病原遺伝子の保有パターンは様々であった。このうち、1/2b型1株と4b型3株において、病原遺伝子11種類全てが検出された。これら4b型3株はB社の浅漬けサンプルより分離されたものである。そこで、これら3株についてPFGE型を調べたところ、同一のPFGE型を示した(図2)。

##### C-2. HACCP指導後の汚染調査

HACCP指導後のB社の市販浅漬けサンプルからは、リステリア菌は検出されなかった(表4)。

#### D. 考察

前年度の研究で分離されたリステリア株について、血清型および病原遺伝子プロファイルにより*L. monocytogenes*の詳細な解析を行った。12の分離株からは集団食中毒事例で多く報告されている1/2a、1/2bおよび4bが検出された。これらの血清型の全ての菌株が高病原性ではないことが知られるため、*hlyA*を含め*L. monocytogenes*に特異的な病原遺伝子11種類についてPCRにより調べたところ、1/2b型1株と4b型3株の計4株で11種類全てを保有しており、これらの株は高病原性であることが示された。我々の調査で最も汚染率の高かったB社由来のサンプルのうち、4b株3株が同一のPFGE



型を示したことから、同社の工場環境においてリステリア菌が恒常的に存在し、製造過程において食品への汚染をもたすものと考えられた。

このような結果を踏まえ、B社に対し HACCP 指導を行い、その後の同社の市販浅漬食品のモニタリング調査を実施した。その結果、現在のところ指導以降、同社サンプルからリステリア菌は検出されていない。このことは HACCP 指導により、衛生管理が徹底され、同社の食品衛生環境が向上したことを示す。また、同時に HACCP がリステリア菌対策に適切であることが具体的に示された。

浅漬は加熱しないで喫食するため、このような食品においてのリステリア菌汚染は公衆衛生上大きなリスクとなりうる。今後も定期的なモニタリングや調査による汚染実態を把握し、適宜指導を行い、衛生管理の向上に努めることが重要と思われる。

#### E. 結 論

市販浅漬食品から分離されたリステリアには高病原性のものが存在していた。HACCP はリステリア菌対策に適切であることが示された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

1. Asakura H, Kawamoto K, Haishima Y, Igimi S, Yamamoto S, Makino S. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Res Microbiol.* 2008. 159:709-717.
2. Okada Y, Makino S, Okada N, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S. Identification and analysis of the osmotolerance associated genes in *Listeria monocytogenes*. *Food Addit Contam.* 2008. 15:1-6.
3. Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino SI. Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Appl Microbiol.* 2008. 104:1815-1823.

#### H. 知的財産の出願・登録状況 特になし

Primer pair	DNA Sequence (5'-3')	Fragment size (bp)	Gene
prfA1/prfA2	CAGCTGAGCTATGTGCGAT/ ACCAATGGGATCCACAAG	467	<i>prfA</i>
CO3/CO4	CGCGGATGAATTCGATAG/ GTCATACCCGGGAAATCAATG	316	<i>hly</i>
actA1/actA2	ACGGGACCAAGATACGAA/ GCATGCTAGAATCTAAGTCAC	411	<i>actA</i>
Mpl1/MSZ2	TTGCCAGATTCCTGCGAA/ GCGCCGGTTTCTACGTCACTTG	428	<i>Mpl</i>
CO1/CO2	TTCGGGGAATTCATGATTAG/ CACTACTCCCGGGACTGAG	392	<i>plcA</i>
CO5/CO6	CCAGTAGGATCCACTGTATC/ CTTATTTCCCGGGTTTGCTAAATG	419	<i>plcB</i>
SCI420/CO8	GTGATATAACTCCACTTGGG/ GGTTAAGTTCGCAAGTGAGC	425	<i>iclA</i>
IntC3/BBAM	AATTGGTTACAAAATGCAG/ CAAGCGAGATAAACAAGCACTTGG	420	<i>intC</i>
MonoA/Lis1B	CAAACCTGCTAACACAGCTACT/ TTATACGCGACCGAAGCCAAC	660	<i>lap</i>
clpCA1/clpCB1 <sup>1</sup>	TAGGGCTTGTAAGAGAAG/ CCACGATATTTGTAAGT	645	<i>clpC</i>
opuCA1/opuCB1 <sup>1</sup>	AACGAAGACTTATAAAGGGG/ ATAATTACGATACGGGTCTGC	608	<i>opuCA</i>

表1 本研究で用いたリステリア病原遺伝子のプライマー配列

Serotype	No. of isolates	Prevalence
1/2a	2	16.67
1/2b	1	8.33
3b	1	8.33
4b	7	58.33
4c	1	8.33
Total	12	100

表2 分離株のリステリア血清型別

浅漬けから検出された*L.monocytogenes*の血清型を調べたところ、4bが最も多かった。

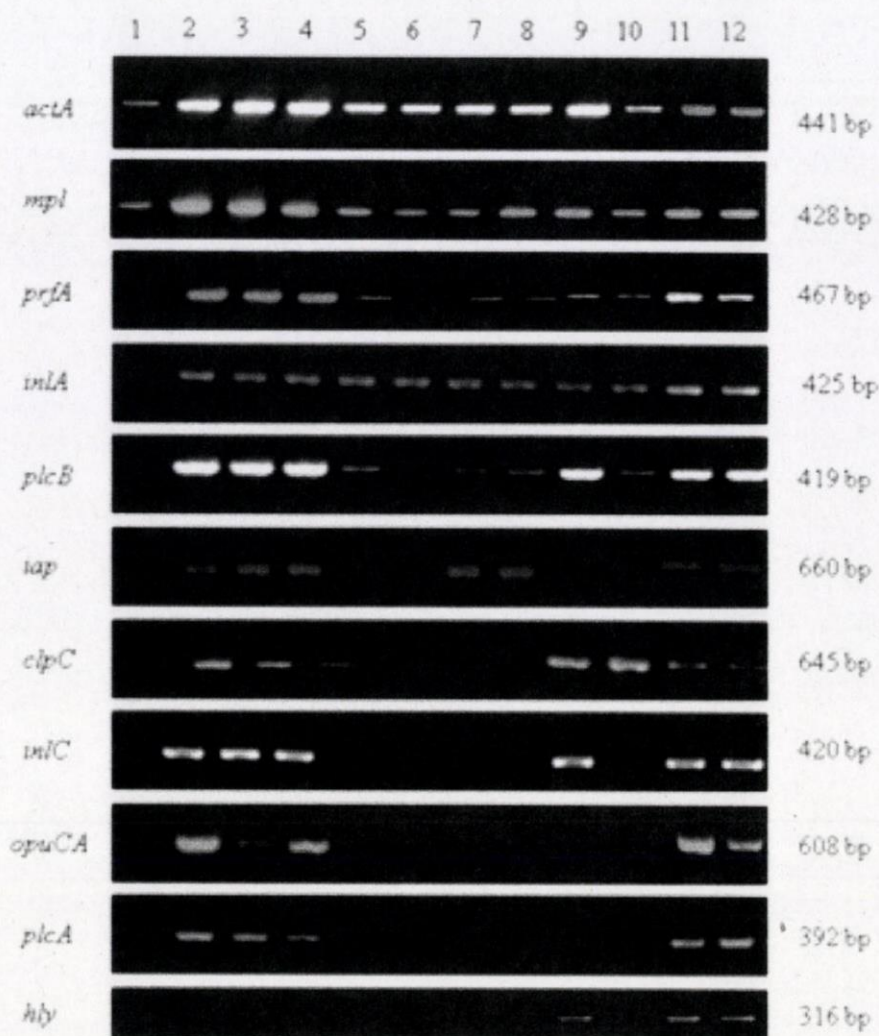


図1 PCRによる病原遺伝子の検出結果

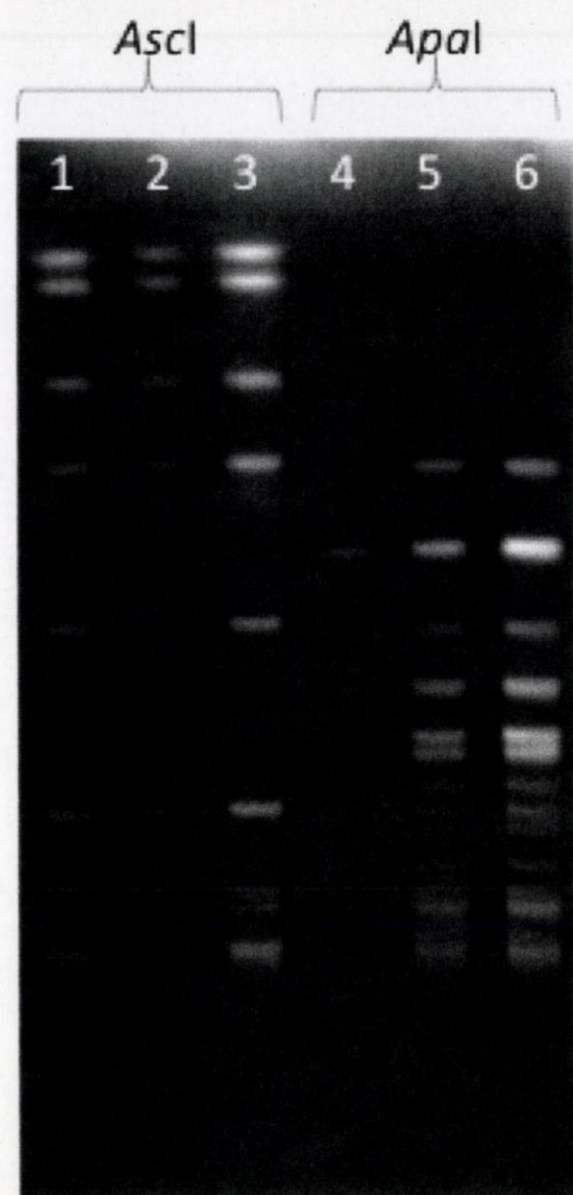


図2 B社由来リステリア分離株のPFGE パターン  
 Lanes 1 & 4: isolate No.9, lanes 2 & 5: isolate No.  
 10, lanes 3 & 6: isolate No. 12.

Isolate No.	Serotype	<i>astA</i>	<i>hly</i>	<i>ptxA</i>	<i>intA</i>	<i>pilB</i>	<i>hly</i>	<i>eipC</i>	<i>hly</i>	<i>spvCA</i>	<i>pilA</i>	<i>hly</i>
1	4c	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	1/2a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3	1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
4	1/2a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	4b	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
6	4b	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
7	4b	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
8	3b	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
9	4b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	4b	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
11	4b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	4b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表3 PCRによる病原遺伝子の検出結果(まとめ)

Sample No.	<i>Listeria monocytogenes</i>	SPC(CFU/g)
1	Negative	$1.65 \times 10^5$
2	Negative	$1.35 \times 10^5$
3	Negative	$1.11 \times 10^4$
4	Negative	$1.09 \times 10^3$
5	Negative	$4.85 \times 10^3$
6	Negative	$2.70 \times 10^3$
7	Negative	$2.55 \times 10^4$
8	Negative	$1.32 \times 10^5$
9	Negative	$3.55 \times 10^5$
10	Negative	$4.40 \times 10^5$
11	Negative	$8.00 \times 10^4$
12	Negative	$1.55 \times 10^5$
13	Negative	$3.15 \times 10^5$
14	Negative	$2.50 \times 10^3$

表4 HACCP指導後のB社市販浅漬け品の一般生菌数およびリステリア菌陽性率

果実・野菜・漬物等における食中毒菌の衛生管理に関する研究

分担研究報告書－5

小班総括者：牧野壮一（国立大学法人帯広畜産大学・理事・副学長）

研究協力者：宮尾茂雄（東京家政大学・食品加工学研究室・教授）

**研究要旨** 近年、各種食品製造施設において、食品の安全性確保についてより一層の向上を図るため、危害分析重要管理点方式（HACCP）を導入した衛生管理システムの構築が進められている。HACCP 導入にあたっては、対象食品について発生しうる危害を科学的データに基づいて評価し、原料の搬入から製品となる製造の各段階で発生する危害を分析し、その管理手法を確立することが重要である。本研究では、果実・野菜・漬物類を対象食品とし、各製造工程における危害分析を行い、その有害微生物の制御手法を確立するとともに、安全な食品製造における HACCP モデルを作成する。

漬物は日本特有の一夜漬け、たくあん漬などや、外来のキムチ、ピクルスなど多様である。また、日本特有の漬物にしても外国から原材料が入ってくるケースもある。そのため、海外の衛生状況により、輸入品の汚染状況も変化する。漬物は塩分含有量などから食中毒の原因として考えることは一般的ではない。しかし、過去には一夜漬けや浅漬けが原因の食中毒は実際に起こっている。この原因は、原材料の加熱工程を経ずに喫食される加工品であるため、食中毒の原因となりうる、と考えられるからである。例えば、鶏肉にサルモネラ汚染があっても、加熱工程を経るので相当なところまでリスクは軽減できるが、漬物、特に浅漬けは生である。帯広 O157 事件の際の再現実験でも、塩をふったキュウリの薄切りでは一晩で O157 やサルモネラの増殖が確認されており、原材料における汚染が大きく作用するが、汚染された漬物は食中毒の原因になる確率は相当に高いといえる。このような漬物の衛生に関しては、規格基準はなく、指導基準である衛生規範があるのみである。すなわち、営業者が自ら行う衛生上の管理のガイドラインとも言うべきものである。さらに、漬物製造に関して、HACCP の導入を視野に入れた高度衛生管理についての提言も示されているが、実際は漬物の汚染が確認されている。そこで、漬物の製造は自主管理に任されている現状で、どの程度の汚染があり、ヒトへの健康被害の可能性について明らかにする必要がある。

昨年度、市販食品や製造工場においてリステリア菌が分離されたことにより、リステリア菌が漬物、特に浅漬けにおいて重要な危害因子になると考えられた。工場の衛生管理の改善が最も重要ではあるが、有効な製品内でのリステリア菌の制御法が開発されれば、さらに安全性が確保できるといえる。そのため、リステリア菌制御に関する研究について紹介する。

#### A. 研究目的

昨年度、市販食品や製造工場においてリステリア菌が分離されたことにより、リステリア菌が漬物、特に浅漬けにおいて重要な危害因子になると考えられた。工場の衛生管理の改善が最も重要ではあるが、有効な製品内でのリステリア菌の制御法が開発されれば、さらに安全性が確保できるといえる。そのため、リステリア菌制御に関する研究について紹介する。

#### B. 研究方法

別紙参照

#### C. 研究結果

別紙参照

#### D. 考察

別紙参照

#### E. 結論

別紙参照

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

別紙参照

#### H. 知的財産の出願・登録状況

特になし



## キュウリ浅漬冷蔵保存中の *Listeria monocytogenes* の 菌数変化と各種抗菌物質添加の影響

伊藤康江<sup>§</sup>, 細井知弘, 宮尾茂雄

東京都農林総合研究センター食品技術センター

### Changes in Growth of Artificially Inoculated Rifampicin-resistant *Listeria monocytogenes* in Refrigerated Lightly Pickled Cucumber Induced by Addition of Antimicrobial Food Additives

Yasue Ito<sup>§</sup>, Tomohiro Hosoi and Shigeo Miyao

Food Technology Research Center, Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry  
Research Center, 1-9 Kanda Sakuma-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0025

*Listeria monocytogenes* is a bacterium with wide distribution in natural environments that causes contamination of various food ingredients. *L. monocytogenes* contamination in ready-to-eat foods such as lightly pickled vegetables creates a risk of foodborne listeriosis outbreaks. To estimate the *L. monocytogenes* levels in foods, *Listeria*-selective media such as PALCAM and MOX supplemented with specified antibiotics are usually used. However, when estimating the growth of *L. monocytogenes* artificially inoculated to lightly pickled cucumber using these media, the high levels of bacteria associated with the cucumbers inhibit the formation of *L. monocytogenes* colonies and certain bacteria other than *L. monocytogenes* form colonies with morphology similar to that of *L. monocytogenes*. In this study, we therefore established a new method to estimate the growth of *L. monocytogenes* in lightly pickled cucumber by artificially inoculating rifampicin-resistant *L. monocytogenes* and using PALCAM-*Listeria*-Selective-Agar-Base supplemented with rifampicin (50 µg/ml) and 1/100 of a specified concentration of PALCAM-*Listeria*-Selective-Supplement. Analyses using this method showed that initial artificial inoculation levels of live *L. monocytogenes* were maintained during storage for 10 days at 4°C and for 2 days at 10°C, respectively. The addition of 0.05 and 0.1% chitosan significantly decreased the levels of live *L. monocytogenes*.

(Received Oct. 2, 2007; Accepted Jan. 25, 2008)

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, lightly pickled cucumber, chitosan, PALCAM medium, rifampicin

キーワード: リステリア, キュウリ浅漬, キトサン, パルカム培地, リファンピシン

*Listeria monocytogenes* は、グラム陽性、通性嫌気性の短桿菌で周毛性の鞭毛を有し運動性がある<sup>1)</sup>。本菌は、菌体側の表層蛋白 internalin A をヒト小腸の上皮細胞の側底部に存在する E-cadherin と結合させて上皮細胞内に侵入したり<sup>2)</sup>、Peyer's patches から取り込まれたりして<sup>3)</sup>、体内に侵入する。侵入後、listeriolysin O 等の一連の病原因子の作用で細胞内の殺菌機構から逃れて、隣接細胞への拡散を繰り返して血管内に侵入し、その後、脾臓や肝臓を経て拡散することにより全身性の感染を引き起こす<sup>4)</sup>。本感染によるリステリア症は、初期に発熱、頭痛等の風邪様症状を示し、免疫不全者、高齢者、乳幼児では脳・髄膜炎、敗血症にまで進展する場合があります、重症になると致死率は

15~20%に及ぶ<sup>5)</sup>。*L. monocytogenes* は、多くの食中毒菌が増殖できない低温下でも増殖性を有し、耐塩、耐酸性が高いという特徴をもつことから、河川水、汚泥、土壌、植物、サイレージなどあらゆる環境から分離されており、自然界にきわめて広く分布していると考えられている<sup>1)</sup>。

食品の *L. monocytogenes* 汚染頻度も高く、欧米諸国では野菜サラダ、乳製品、食肉加工品などの食品を介した集団感染が報告されている<sup>1)</sup>。日本では食肉、魚介類、乳製品、野菜など広範囲の食品に *L. monocytogenes* 汚染が進んでいることが明らかとなっている<sup>6)</sup>。2000~2003年の東京周辺地域に流通する食品の汚染状況調査においても、様々な食品から *L. monocytogenes* が検出されており、欧米諸国での集団感染の主な原因食品である乳製品や食肉加工品以外に漬物からも検出されている<sup>5)</sup>。仮に、漬物のよ

〒101-0025 東京都千代田区神田佐久間町1-9

<sup>§</sup> 連絡先 (Corresponding author), yasue-ito@food-tokyo.jp

うな、摂食前の加熱処理が通常されない食品が *L. monocytogenes* に汚染されると、食中毒発生の可能性が高まるため、このような ready-to-eat 食品の *L. monocytogenes* 汚染には特に注意を払わなければならない<sup>9)</sup>。2001年に北海道で発生したナチュラルチーズによる食中毒は、食品を介した *L. monocytogenes* の集団事例であったと報告されている<sup>9)</sup>。ready-to-eat 食品では、加熱に頼らない技術により、食品中の *L. monocytogenes* の生育を防ぐ対策が求められている。

食品中の *L. monocytogenes* 菌数測定法は、リアルタイムPCR法と培養法が代表的なものであり、低い菌数レベルのリステリアを比較的容易に測定するためには、培養法が通常用いられる。日本では、リステリア検出用培地として、PALCAM (polymixin B, acriflavin, lithium chloride, ceftazidime, aesculin, mannitol) 培地が食品衛生検査指針に示されている。また米国 USDA/FSIS のガイドブックには、MOX (Modified Oxford) 培地を用いた直接平板塗抹法が記載されていた<sup>10)</sup>が、本方法では損傷菌が発育しにくいことなどから菌数が実際より低く算定される可能性があると指摘されており<sup>10)</sup>、現在のガイドブックには UVM (University of Vermont Medium) 培地を用いた MPN 法のみが記載されている<sup>11)</sup>。

本研究では、漬物のうちキュウリ浅漬を取り上げ、キュウリ付着菌懸濁液に接種した少数の *L. monocytogenes* の菌数測定を、定法である指定選択剤 (PALCAM-*Listeria*-Selective-Supplement および Modified Antimicrobial Supplement) を添加したリステリア選択培地 (PALCAM 培地および MOX 培地) を用いる方法で最初に試みた。その結果、共存するキュウリ付着菌の生育により、*L. monocytogenes* 菌数の測定が困難であることが判明した。そこで検討を加えた結果、抗生物質リファンピシン耐性 *L. monocytogenes* を接種するとともに、指定選択剤濃度を減少させた培地を用いることにより、キュウリ付着菌共存下においても少数の *L. monocytogenes* の菌数測定が可能であることを見出した。次に、キュウリ浅漬に人為的に接種したリファンピシン耐性 *L. monocytogenes* の生育挙動を解析するとともに、各種抗菌物質添加時のキュウリ浅漬中リファンピシン耐性 *L. monocytogenes* 生育挙動を解析し、効果的な *L. monocytogenes* 生育抑制方法を明らかにした。

## 実験方法

### 1. キュウリ付着菌と共存する *L. monocytogenes* の菌数測定

#### (1) *L. monocytogenes* 菌液の調製

*L. monocytogenes* JCM 7671 (血清型 1/2a) 株を理化学研究所より購入し、Brain Heart Infusion broth (BHI broth; 日水製薬) を用いて 35°C、24 時間培養後、遠心分離 (780 × g, 10 分間) とリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate

buffered saline, PBS) による菌体洗浄を 2 回繰り返す、PBS に再懸濁した液を *L. monocytogenes* JCM 7671 菌液とした。

#### (2) キュウリ付着菌液の調製

キュウリ 100 g を浅漬調味液 (蒸留水 100 g, 食塩 2 g, グルタミン酸ナトリウム調味料 0.1 g) に入れ、4°C、9 日間保存した漬液をキュウリ付着菌液とした。菌数は、PBS で 10 倍段階希釈した菌液 0.1 ml を Trypticase Soy Agar (TSA, BBL, BD, Sparks, MD, USA) 平板培地に表面塗抹後、35°C、2 日間培養して測定した。

#### (3) キュウリ付着菌と共存する *L. monocytogenes* JCM 7671 の各種培地における菌数測定

上記 *L. monocytogenes* JCM 7671 菌液を PBS で希釈した *L. monocytogenes* 単独菌液、およびその *L. monocytogenes* 菌液とキュウリ付着菌液を 1:1 の割合で混合した *L. monocytogenes*・キュウリ付着菌混合菌液 0.1 ml ずつを、Oxford Medium Base (Difco, BD) に規定濃度の選択剤 (Modified Antimicrobial Supplement) を添加した MOX 培地、および PALCAM *Listeria*-Selective agar (Base) (MERCK, Darmstadt, Germany) に濃度を変えて選択剤 (PALCAM-*Listeria*-Selective-Supplement) を添加した培地に表面塗抹後、35°C で培養して、*L. monocytogenes* 菌数を測定した。培養日数はリステリアの定型的コロニーが出現して計数が可能となる日までとした。また各培地への *L. monocytogenes* 接種菌数は、BHI broth に 1.5% agar を添加した平板培地 (BHI agar) に菌液 0.1 ml ずつを表面塗抹後、35°C、2 日間培養して測定した。

#### (4) 菌種推定

規定濃度の選択剤を添加した PALCAM 培地上で純粋分離した培地黒色化キュウリ付着菌の蒸留水菌懸濁液から DNA を抽出キット (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) により抽出し、16S rRNA gene 領域をユニバーサルプライマー (5'-AGTTTGATCCTGGCTC-3', 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')、および HotStarTaq Master Mix (Qiagen) を用いて増幅した (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。PCR のサイクリング条件は、熱変性を 94°C、45 秒間、アニーリングを 52°C、60 秒間、伸長反応を 72°C、180 秒間で 40 サイクルとした (ramp rate は 1°C/s)。PCR 増幅産物を QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) にて精製後、同プライマーと BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems) を用いてサイクルシーケンシング反応をおこない、反応産物を DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) を用いて精製した。DNA シークエンサー (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) を使用して得られた DNA 塩基配列を遺伝子データベース、日本 DNA データバンク (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>) にて BLAST 検索し、菌種を推定した。

## 2. リファンピシン耐性 *L. monocytogenes* の菌数測定

### (1) リファンピシン耐性 *L. monocytogenes* 菌液の調製

リファンピシン耐性 *L. monocytogenes* (以下, rr-*L. monocytogenes* と記す) 菌液の調製は, BHI broth 5 ml に酵母エキス 0.5% (Difco), リファンピシン 50 µg/ml (和光純薬) を添加した培地で *L. monocytogenes* JCM 7671 を 35°C, 48~72 時間の条件で 3 代継代培養後<sup>12)13)</sup>, 1 (1) と同様にして rr-*L. monocytogenes* JCM 7671 菌液を調製した。

### (2) リファンピシン耐性 *L. monocytogenes* JCM 7671 の各種培地における菌数測定

PBS で希釈した rr-*L. monocytogenes* JCM 7671 菌液とキュウリ付着菌液 (1 (2) 参照) を 1:1 の割合で混合した混合菌液 0.1 ml 中の rr-*L. monocytogenes* 菌数を, 1 (3) と同様に選択剤の濃度を変え, さらにリファンピシンを 50 µg/ml 添加した平板寒天培地 (r-MOX 培地および r-PALCAM 培地) を用いて測定した。rr-*L. monocytogenes* の接種菌数の測定は, BHI agar を用いて 1 (3) と同様におこなった。

なお BHI broth および浅漬調味液 (ともに滅菌済) に rr-*L. monocytogenes* を接種し, 10°C, 10 日間保存後, BHI agar, 50 µg/ml リファンピシンと選択剤を規定の 1/100 量添加した PALCAM 培地 (r-PALCAM 培地 (1/100) と記す) を用いて菌数を測定した結果, 両培地の菌数がほぼ一致したことから, 試験中の *L. monocytogenes* のリファンピシン耐性は持続すると判断した (データ未掲載)。

## 3. キュウリ浅漬へのリファンピシン耐性 *L. monocytogenes* 接種試験

### (1) リファンピシン耐性 *L. monocytogenes* 菌液の調製

*L. monocytogenes* (JCM 7671 および JCM 7679 (血清型 4c)) を別々に 2 (1) と同じ培地を用いて, 35°C, 72 時間の条件で 3 代継代培養後, それぞれを 1 (1) と同様に PBS に再懸濁・希釈した液を混合して, リファンピシン耐性リステリア試験菌液とした。試験菌液の菌数測定は, rr-*L. monocytogenes* JCM 7671 および JCM 7679 の各菌液, およびそれらの混合菌液を PBS で 10 倍段階希釈し, BHI agar 平板培地を用いて 1 (3) と同様におこなった。

### (2) キュウリ浅漬にリファンピシン耐性 *L. monocytogenes* JCM 7671 および JCM 7679 を接種した際の菌数測定

蒸留水 100 g に対して食塩 2 g, グルタミン酸ナトリウム調味料 0.1 g の割合で加えて調製した調味液 40 g とキュウリ 20 g を滅菌ポリ袋に入れ, リファンピシン耐性リステリア試験菌液 (JCM 7671 と JCM 7679 の混合, 最終濃度  $5.0 \times 10^1$ /g および  $6.7 \times 10^3$ /g) を接種後, 気泡を抜いて袋の口を密閉クリップで留め, 4°C および 10°C で保存した。菌数測定日ごとに, 新たに 2 袋ずつをそれぞれ蠕動式ブレンダー処理したのち, PBS を用いて作製した 10 倍段階希釈液 0.1 ml を, r-PALCAM 培地 (1/100) に表面塗抹後,

35°C, 4 日間培養した。出現したリステリア定型的コロニーを計数し, 2 袋の平均値を rr-*L. monocytogenes* 菌数とした。またキュウリ付着菌と rr-*L. monocytogenes* 菌数を含む生菌数は, 10 倍段階希釈液 0.1 ml を TSA 平板培地に表面塗抹後, 35°C, 2 日間培養して得られた 2 袋のコロニー数の平均値とした。さらに pH メーター (HM60G, 東亜ディーケーケー) を用いて, 保存開始日と 10 日後にブレンダー処理後の浅漬液の pH 値を測定した。

## 4. 抗菌物質を添加したキュウリ浅漬へのリファンピシン耐性 *L. monocytogenes* 接種試験

(1) リファンピシン耐性 *L. monocytogenes* 菌液の調製  
リステリア 2 菌株それぞれを, 35°C, 24~72 時間の条件で 3 代継代培養後, 3 (1) と同様に 2 菌株混合の試験菌液を調製し, 菌数を測定した。

### (2) 供試抗菌物質

酢酸ナトリウム (和光純薬, 特級。以下, 酢酸 Na と記す), 乳酸ナトリウム (和光純薬, 濃度 70%。以下, 乳酸 Na と記す), グリシン (和光純薬, 特級), キトサン (コーヨーキトサン FM-80, 粘度 30 mPa·s, 脱アセチル化率 81.7%, 甲陽ケミカル) を使用した。

### (3) 各種抗菌物質添加キュウリ浅漬にリファンピシン耐性 *L. monocytogenes* を接種した際の菌数測定

3 (2) と同様に調製した調味液に, 各種抗菌物質 (最終濃度: 0.2% 酢酸 Na, 0.5% グリシン, 0.2% 酢酸 Na + 0.5% グリシン, 3% 乳酸 Na, 3% 乳酸 Na + 0.2% 酢酸 Na, 0.05% キトサン, 0.1% キトサン) を添加し計 7 種類の調味液を作製した。なお, キトサン添加調味液は, 蒸留水にキトサンを加えた懸濁液に, キトサン 1g につき 1 ml の酢酸 (和光純薬) を加えて溶解後, 調味液に添加して作製した。また, 各抗菌物質添加調味液は, 水酸化ナトリウム溶液 (和光純薬) および塩酸 (和光純薬) で pH 6.0 に調整した。この各抗菌物質添加調味液 40 g とキュウリ 20 g を滅菌ポリ袋に入れ, リファンピシン耐性リステリア試験菌液 (JCM 7671 と JCM 7679 の混合, 最終濃度  $5.4 \times 10^5$ /g) を接種後, 気泡を抜いて袋の口を密閉クリップで留め, 10°C, 6 日間保存した。3 (2) と同様にして, 保存開始日, 保存 2 日後, 6 日後に菌数を測定し, また保存開始日と 6 日後にブレンダー処理後の浅漬液の pH 値を測定した。また, 白菜浅漬についても同様に試験を実施した。

### (4) キトサン単独添加およびキトサン・酢酸 Na 混合添加キュウリ浅漬にリファンピシン耐性 *L. monocytogenes* を接種した際の菌数測定

抗菌物質添加調味液 (最終濃度: 0.05% キトサン, 0.1% キトサン, 0.05% キトサン + 0.2% 酢酸 Na, 0.1% キトサン + 0.2% 酢酸 Na) を用いたキュウリ浅漬にリファンピシン耐性リステリア試験菌液 (JCM 7671 と JCM 7679 の混合, 最終濃度  $6.7 \times 10^3$ /g) を接種後, (3) と同様に保存し, rr-*L. monocytogenes* 菌数, 生菌数および pH 値を測定した。

Table 1 Growth of rifampicin-resistant *L. monocytogenes* in the presence of bacteria associated with cucumber on the modified *Listeria*-selective media containing rifampicin (50 µg/ml) and the specified supplement at different concentrations

Basal Culture medium	Concentration of specified supplement	The number of rr- <i>L. monocytogenes</i> colonies formed (/plate) and the rate of colony formation (%)	Culture period until counting rr- <i>L. monocytogenes</i> colonies	Growth of bacteria associated with cucumber <sup>1</sup>	Black colony formation due to the bacteria associated with cucumber other than rr- <i>L. monocytogenes</i>
BHI agar	—	53 (100%)	2 days	—	—
r-MOX <sup>2</sup>	1/1 (as directed)	43 ( 81%)	3 days	Strongly inhibited	Negative
r-MOX <sup>2</sup>	1/ 10	48 ( 91%)	2 days	Slightly inhibited	Negative
r-PALCAM <sup>3</sup>	1/ 10	50 ( 94%)	2 days	Strongly inhibited	Negative
r-PALCAM <sup>3</sup>	1/100	54 (102%)	2 days	Strongly inhibited	Negative

Rifampicin-resistant (rr-) *L. monocytogenes* (pretreated with 50 µg/ml rifampicin) with cucumber-associated bacteria (not pretreated with rifampicin) were plated at the concentrations shown on each kind of agar plate other than BHI agar plates. On the BHI agar plates, only rr-*L. monocytogenes* was plated. Data are presented as the means of duplicate cultures. The results shown are representative of three independent experiments.

<sup>1</sup>The number of simultaneously inoculated bacteria associated with cucumber :  $3.4 \times 10^7$ /plate

<sup>2</sup>r-MOX and <sup>3</sup>r-PALCAM : Each medium was supplemented with 50 µg/ml rifampicin.

## 5. 統計解析

Fig. 2 および Fig. 3 に示す実験において、各サンプリング日における各実験区間の菌数 (対数に変換) の平均値の差を、母集団が正規分布、等分散であると仮定し、統計解析ソフト SPSS version 13.5 (SPSS, Chicago, IL) を用いて Tukey HSD 法により比較した (有意水準を 0.05 に設定)。同図においては、異なるキュウリ試料を用いておこなった 3 回の繰り返し実験の解析結果のうち、代表的なものを示した。

### 実験結果および考察

#### 1. キュウリ付着菌と共存する *L. monocytogenes* の菌数測定における各種培地の適性評価

MOX 培地および培地指定の選択剤を規定濃度、規定の 1/5, 1/10, 1/100 量添加した PALCAM 培地計 5 種類の培地に *L. monocytogenes* JCM 7671・キュウリ付着菌混合菌液 (接種菌数 : *L. monocytogenes* 30/plate, キュウリ付着菌  $2.5 \times 10^6$ /plate) を平板塗抹し、*L. monocytogenes* 菌数の測定を試みた。その結果、いずれの培地もキュウリ付着菌や、*L. monocytogenes* と同様に培地を黒く変色させるキュウリ付着菌 (以下、培地黒色化キュウリ付着菌) の生育を強く抑制することが不可能であり、*L. monocytogenes* のコロニーを判別、計数することは出来なかった (データ未掲載)。培地黒色化キュウリ付着菌の菌種は、16S rRNA gene の塩基配列の解析により、*Microbacterium testaceum*, *Microbacterium arborescens*, *Sanguibacter keddiei*, *Intrasporangiaceae* の 4 種 (いずれも *Micrococccineae* に属する) と推定された (データ未掲載)。

#### 2. キュウリ付着菌と共存するリファンピシン耐性 *L. monocytogenes* の菌数測定における各種培地の適性評価

1 の結果から、培地に 50 µg/ml リファンピシンを添加 (r- と表記) して<sup>12)13)</sup> キュウリ付着菌のコロニー形成を抑制するとともに、リファンピシン耐性 *L. monocytogenes* (rr-*L. monocytogenes* と表記) を人為的に接種して、キュウリ付着菌共存下の rr-*L. monocytogenes* 菌数を測定する方法を検討した (Table 1)。

rr-*L. monocytogenes* のコロニー形成率は、キュウリ付着菌接種菌数  $3.4 \times 10^7$ /plate の場合、供試した中では r-PALCAM 培地 (1/100, 指定選択剤の規定添加濃度に対する添加濃度を括弧内に記す、以下同様) 上が優れていた。本培地は 1 で問題となった培地黒色化キュウリ付着菌や他のキュウリ付着菌の生育を強く抑制した (Table 1)。

r-PALCAM 培地 (1/1 および 1/5) については検討しなかったが、その理由は、前項 1 のリファンピシン無添加 PALCAM 培地 (1/1 および 1/5) において、*L. monocytogenes* 単独菌液塗抹時のコロニー形成率が BHI agar と比較して低い場合があったためである。指定選択剤を無添加とし、リファンピシンのみを添加した r-PALCAM 培地、r-MOX 培地、r-TSA<sup>12)</sup> および r-BHI agar では、キュウリ付着菌の生育が認められ、rr-*L. monocytogenes* 菌数を正確に計数することが出来なかった (データ未掲載)。

以上の結果から総合的に評価して、r-PALCAM 培地 (1/100) が rr-*L. monocytogenes* の菌数測定に最も適していると判断した。

フランクフルトソーセージ、スモークサーモン、魚卵等の食肉加工品や水産加工品中の *L. monocytogenes* の生育挙動解析において、リファンピシン無処理の *L. mono-*