

cytogenes とリファンピシン無添加の PALCAM 培地, MOX 培地および Oxford 培地が使用されているが^{14)~21)}, これは, 培地黒色化付着菌や培地指定の選択剤で生育が抑制できない付着菌の菌数が少ないことから可能であったと考えられる。

3. キュウリ浅漬冷蔵保存中のリファンピシン耐性 *L. monocytogenes* の生育挙動

キュウリ浅漬に rr-*L. monocytogenes* (JCM 7671 と JCM 7679 の混合菌液) を接種し, 4°C および 10°C, 10 日間保存し, Table 1 に示す r-PALCAM 培地 (1/100) を用いて rr-*L. monocytogenes* 菌数を, TSA 平板培地を用いて生菌数を測定した (Fig. 1)。

4°C で保存したキュウリ浅漬中の rr-*L. monocytogenes* 菌数 (2 菌株の総数) は, 接種菌数 (5.0×10^1 /g および 6.7×10^3 /g) のいずれにおいても, 10 日後まで初発菌数をほぼ維持した (Fig. 1A)。生菌数は, rr-*L. monocytogenes* のいずれの接種菌数においても, 4 日後まで初発菌数 (1.7×10^5 /g) をほぼ維持したが, その後増加し, 10 日後には 10^7 /g レベルとなった (Fig. 1A)。浅漬液の pH 値は, 初発が 6.2, 10 日後には 6.3 であり, 浅漬保存中の rr-*L. monocytogenes* 菌数が維持されたのは pH 値の低下によるものではないといえる。

10°C で保存したキュウリ浅漬における rr-*L. monocytogenes* 菌数は, いずれの接種菌数においても, 2 日後まで初発菌数をほぼ維持したが, その後増加した (Fig. 1B)。生菌数は, rr-*L. monocytogenes* のいずれの接種菌数においても, 初発菌数 1.7×10^5 /g から徐々に増加した (Fig. 1B)。浅漬液の pH 値は, 初発が 6.3, 10 日後には 5.6 であった。

L. monocytogenes は, 0°C 以下でも生育できるという低温増殖性を有するが²²⁾, 本研究の結果においては, キュウリ浅漬中の *L. monocytogenes* の増殖は, 4°C, 10 日間の保存期間中抑制された。これは, スモークサーモンに *L. monocytogenes* を接種し, 4°C および 5°C で保存した場合に, 7 日間増殖が抑制されたという報告¹⁶⁾¹⁹⁾ と類似する。このように *L. monocytogenes* が増殖しなかった理由として競合細菌の影響が考えられる。競合細菌が存在する牛挽肉に接種された *Escherichia coli* O157 (10°C 保存) は, 滅菌された牛挽肉に接種された場合と比較して増殖が抑制されると報告されている²³⁾。本研究においても, 共存するキュウリ付着菌との競合が, *L. monocytogenes* の増殖が抑制された原因の 1 つと推察される。

4. 抗菌物質を添加した冷蔵キュウリ浅漬におけるリファンピシン耐性 *L. monocytogenes* の生育挙動

各抗菌物質を添加したキュウリ浅漬に rr-*L. monocytogenes* (JCM 7671 と JCM 7679 の混合菌液) を接種後 10°C, 6 日間保存し, r-PALCAM 培地 (1/100) を用いて rr-*L. monocytogenes* 菌数を, TSA 平板培地を用いて生菌数を測定した (Fig. 2)。

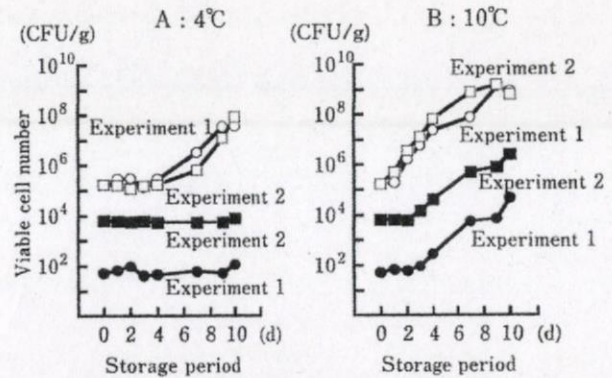


Fig. 1 Changes in the viable cell number of rifampicin-resistant *L. monocytogenes* (● and ■) and aerobic total plate counts (○ and □) in packed, lightly pickled cucumber during storage at 4°C and 10°C

In the experiments 1 and 2, rifampicin-resistant *L. monocytogenes* was artificially inoculated at 5.0×10^1 cfu/g and 6.7×10^3 cfu/g on day 0, respectively. Viable cell numbers of rifampicin-resistant *L. monocytogenes* and aerobic total plate counts were enumerated using the r-PALCAM (1/100) agar plates shown in Table 1 and Trypticase soy agar plates, respectively. Data are presented as the means of duplicate cultures. The results shown are representative of three independent experiments.

保存 6 日後の rr-*L. monocytogenes* 菌数 (初発菌数 5.4×10^5 /g) は, 0.05%, 0.1% キトサン添加区, 3% 乳酸 Na 単独添加区および 3% 乳酸 Na と 0.2% 酢酸 Na 混合添加区において, 抗菌物質無添加区と比較して有意に低く, キトサン添加区では初発菌数より減少した (Fig. 2A)。牛肉での試験において, 2.5% 乳酸 Na と 0.2% 酢酸 Na の混合添加は, 2.5% 乳酸 Na 単独添加と比較して, *L. monocytogenes* の生育を抑制すると報告されているが¹⁷⁾, 今回のキュウリ浅漬での試験では, 乳酸 Na 単独添加との間に有意な効果の差は生じなかった。また浅漬に多用される 0.2% 酢酸 Na と 0.5% グリシンの各単独添加および混合添加は, rr-*L. monocytogenes* に対する増殖抑制効果を有しなかった (Fig. 2A)。生菌数 (初発菌数 6.1×10^5 /g) についても同様に, 0.05% および 0.1% キトサン添加区で保存 6 日間の増殖抑制効果が高かった (Fig. 2B)。浅漬液の pH 値は, 初発が 6.0, 各キトサン添加区の 6 日後には 6.3~6.4 であり, 本試験においても rr-*L. monocytogenes* 菌数の減少は pH 値の低下によるものではないと考えられる。

また白菜浅漬に各種抗菌物質を添加した試験においても, キュウリ浅漬と同様に, 0.05% および 0.1% キトサンの添加が rr-*L. monocytogenes* およびその他の細菌の生育を抑制した (データ未掲載)。これまでに, 0.1% キトサンを添加した白菜浅漬に *L. monocytogenes* を接種し, 10°C で保存した場合に, *L. monocytogenes* 菌数は初めは減少する

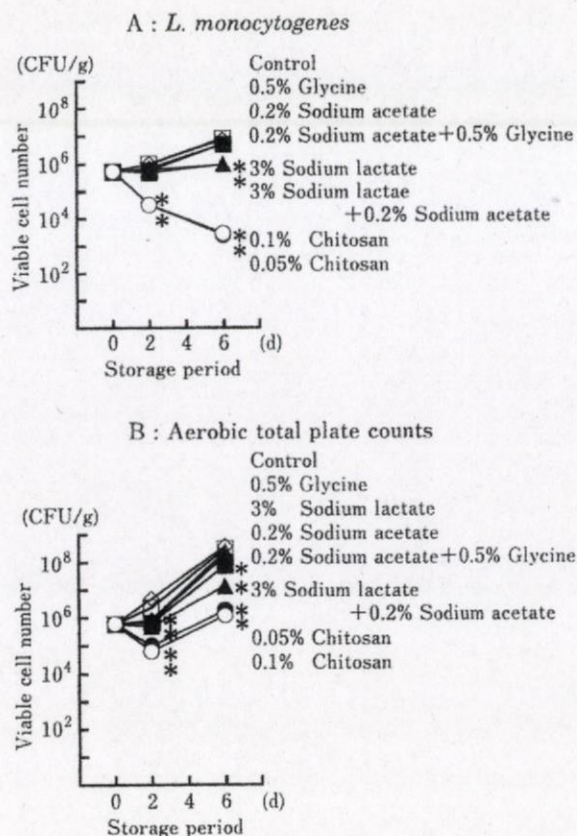


Fig. 2 Changes in the viable cell number of rifampicin-resistant *L. monocytogenes* and aerobic total plate counts in packed, lightly pickled cucumber with various antimicrobial substances added during storage at 10°C

The viable cell numbers of rifampicin-resistant *L. monocytogenes* and aerobic total plate counts were enumerated using the r-PALCAM (1/100) agar plates shown in Table 1 and Trypticase soy agar plates, respectively. Data are presented as the means of duplicate cultures. The results shown are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with control group on the same day (Tukey HSD test).

が、3日後から増加したと報告されている²⁴⁾。しかし、著者らの実験結果では、10日間の保存期間中、菌数が増加に転じることはなかった(データ未掲載)。

次に、Fig. 2の実験において効果の高かったキトサンの抗菌作用に対する酢酸Naの影響を検討した(Fig. 3)。これは、浅漬ではpH調整の目的で酢酸Naを添加することがあるが、酢酸Naの共存がキトサンの抗菌作用を低下させると報告²⁵⁾されているためである。キトサン単独添加区(0.05%、0.1%)および0.05%キトサンと0.2%酢酸Naの混合添加区のいずれにおいてもrr-*L. monocytogenes*菌数(初発菌数 $6.7 \times 10^5/g$, 10°C, 10日間保存)は、抗菌物質無添加区と比較して保存初期にいったん有意に減少し、その

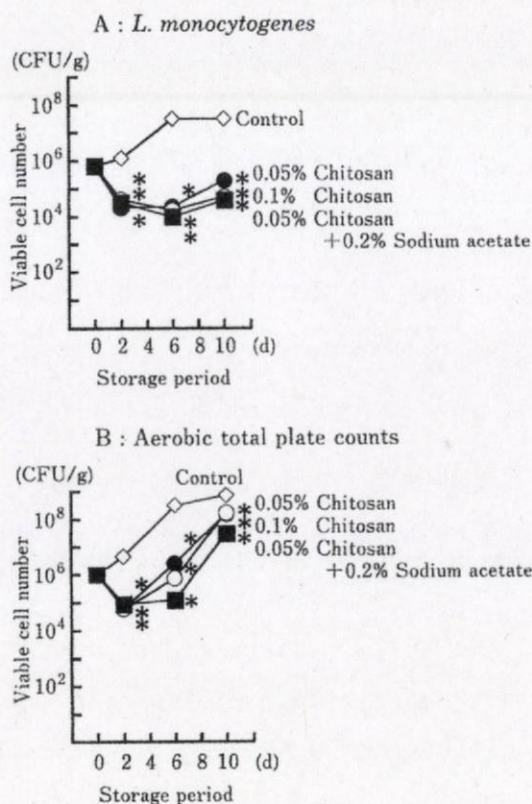


Fig. 3 Changes in the viable cell number of rifampicin-resistant *L. monocytogenes* and aerobic total plate counts in packed, lightly pickled cucumber with chitosan and sodium acetate added during storage at 10°C

The viable cell numbers of rifampicin-resistant *L. monocytogenes* and aerobic total plate counts were enumerated using the r-PALCAM (1/100) agar plates shown in Table 1 and Trypticase soy agar plates, respectively. Data are presented as the means of duplicate cultures. The results shown are representative of three independent experiments. * $P < 0.05$ compared with control group on the same day (Tukey HSD test).

後増加したが、10日後でも初発菌数より低いレベルを維持した(Fig. 3A)。なお、繰り返しの実験において、0.1%キトサン+0.2%酢酸Na添加区は、0.1%キトサン添加区よりrr-*L. monocytogenes*菌数が高く推移する場合と低く推移する場合があった(データ未掲載)。生菌数(初発菌数 $1.0 \times 10^6/g$)は、いずれの抗菌物質添加区においても、抗菌物質無添加区と比較して有意に低い菌数レベルを維持した(Fig. 3B)。なお、繰り返しの実験において、浅漬中のキュウリ付着菌の初発菌数は $10^5/g$ 程度ではば一定であった。

以上の結果から、キュウリ浅漬への0.05%キトサン、0.1%キトサン、0.05%キトサン+0.2%酢酸Naの添加が、rr-*L. monocytogenes*およびその他の細菌の生育抑制に有

効であると考えられる。

要 約

キュウリ浅漬保存時の浅漬中 *L. monocytogenes* の菌数変化を解析する方法を検討した結果、抗生物質リファンピシン耐性 *L. monocytogenes* の浅漬への人為的接種と、50 µg/ml リファンピシンおよび指定選択剤(種々の抗生物質等含有)を規定の1/100量添加したPALCAM培地を使用して菌数測定する方法が適していた。本法で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* の生育挙動を検討した結果、4°C保存時には10日後まで初発菌数レベルが維持され、10°C保存時には7日後に初発菌数の約100倍に増加した。また、各種抗生物質のうちキトサンの添加が10°C保存時のキュウリ浅漬中の *L. monocytogenes* 菌数を有意に減少させ、*L. monocytogenes* の生育抑制に有効であった。

文 献

- 五十君静信, リステリア—注目されるようになった食品媒介感染症菌—食品衛生研究, 53, 11-16 (2003).
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.-M. and Cossart, P., E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells, *Cell*, 84, 923-932 (1996).
- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J.-P., Berche, P. and Gaillard, J.-L., Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system, *Infect. Immun.*, 66, 747-755 (1998).
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J., *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants, *Clin. Microbiol. Rev.*, 14, 584-640 (2001).
- 仲真晶子, 食品媒介リステリア症, 防菌防黴誌, 34, 149-154 (2006).
- Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S. and Igimi, S., Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan, *Int. J. Food Microbiol.*, 93, 131-140 (2004).
- 五十君静信, 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, 19-23 (2003).
- Makino, S.-I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S. and Igimi, S., An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001, *Int. J. Food Microbiol.*, 104, 189-196 (2005).
- 厚生労働省, リステリア, 「食品衛生検査指針微生物編」, 初版, (日本食品衛生協会, 東京), pp. 249-265 (2004).
- USDA/FSIS, Chapter 8 Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples, Microbiology Laboratory Guidebook, 3rd edition, (1998, Revision 2; 11/08/99).
- USDA/FSIS, Chapter 8 Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples, Microbiology Laboratory Guidebook, 3rd edition, (2006, Revision 5; 8/1/06, PDF only).
- Inatsu, Y., Bari, M.L., Kawasaki, S. and Isshiki, K., Survival of *Escherichia coli* O157 : H7, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* in kimuchi, *J. Food Prot.*, 67, 1497-1500 (2004).
- Inatsu, Y., Maeda, Y., Bari, M.L., Kawasaki, S. and Kawamoto, S., Prewashing with acidified sodium chlorite reduces pathogenic bacteria in lightly fermented Chinese cabbage, *J. Food Prot.*, 68, 999-1004 (2005).
- Bedie, G.K., Samelis, J., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J. A. and Smith, G.C., Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on frankfurters stored at 4°C in vacuum packages, *J. Food Prot.*, 64, 1949-1955 (2001).
- Samelis, J., Bedie, G.K., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J. A. and Smith, G.C., Control of *Listeria monocytogenes* with combined antimicrobials after postprocess contamination and extended storage of frankfurters at 4°C in vacuum packages, *J. Food Prot.*, 65, 299-307 (2002).
- Yoon, K.S., Burnette, C.N., Abou-Zeid, K.A. and Whiting, R.C., Control of growth and survival of *Listeria monocytogenes* on smoked salmon by combined potassium lactate and sodium diacetate and freezing stress during refrigeration and frozen storage, *J. Food Prot.*, 67, 2465-2471 (2004).
- Mbandi, E. and Shelef, L.A., Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in meat by combinations of sodium lactate and diacetate, *J. Food Prot.*, 64, 640-644 (2001).
- 仲真晶子, 魚卵加工品の保存時における *Listeria monocytogenes* の挙動, 食品の安全性高度化推進研究事業 細菌性食中毒の予防に関する研究 平成16年度総括・分担研究報告書, pp. 235-242 (2005).
- 荻原博和, 伊澤浩泰, 石津麻衣, 柿澤 毅, 松田敏生, 非加熱水産食品に接種した *Listeria monocytogenes* の挙動と発酵乳酸ナトリウムによる制御, 日本食品微生物学会雑誌, 23, 72-78 (2006).
- 神真知子, 楠くみ子, 池島伸至, 新井輝義, 入倉善久, 鈴木敬子, 平田一郎, 小久保彌太郎, 丸山 務, スモークサーモンにおける *Listeria monocytogenes* の汚染状況および低温保存時の挙動, 日本食品微生物学会雑誌, 11, 107-111 (1994).
- 楠くみ子, 神真知子, 池島伸至, 新井輝義, 入倉善久, 鈴木敬子, 平田一郎, 小久保彌太郎, 丸山 務, 非加熱食肉製品保存時における *Listeria monocytogenes* の挙動, 東京都立衛生研究所年報, 44, 111-114 (1993).
- 仲真晶子, 低温下で増殖できる食品病原微生物—特に *Listeria monocytogenes* について—, 食品のストレス環境と微生物, 第1版, 伊藤 武, 森地敏樹編 (サイエンスフォーラム, 東京), pp. 33-51 (2004).
- Tamplin, M.L., Growth of *Escherichia coli* O157 : H7 in raw ground beef stored at 10°C and the influence of competitive bacterial flora, strain variation, and fat level, *J. Food Prot.*, 65, 1535-1540 (2002).
- Inatsu, Y., Bari, M.L., Kawasaki, S. and Kawamoto, S., Effectiveness of some natural antimicrobial compounds in controlling pathogen or spoilage bacteria in lightly fermented Chinese cabbage, *J. Food Sci.*, 70, 393-397 (2005).
- 橋本俊郎, 浅漬けの変敗乳酸菌に対するキトサンの抗菌作用, 食料工, 45, 368-374 (1998).

(平成19年10月2日受付, 平成20年1月25日受理)

Ⅱ. 分担研究報告書

Ⅱ-3. 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

分担研究者 五十君静信 (国立医薬品食品衛生研究所)

Ⅱ-3-1. 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

Ⅱ-3-2. カンピロバクター試験法に関する検討

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。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。前年度の食品製造工場の現地調査では、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、バイオフィルムの形成されやすい箇所を特定することが出来た。本年度も食品製造工場の協力をお願いし、形成されたバイオフィルムからリステリアをどのように検知し、どのように制御するかに関する研究を進めた。本年度は塩タラコの製造工場をフィールドとし、各作業工程について、バイオフィルムの形成危険箇所の特定と形成されたバイオフィルムの解析を行った。リステリアの分離されたバイオフィルムについては、構成細菌を分離し、細菌学的に解析した。バイオフィルム構成菌を遺伝子レベルで解析し、どのような菌叢でバイオフィルムが形成されているかを明らかにした。バイオフィルムに関する文献を調べ、バイオフィルムモデル系の検討と、形成されたバイオフィルムの除去方法を整理した。

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

北川雅彦 北海道立釧路水産試験場

麻生真悟 同上

蛭谷幸司 同上

武田浩郁 同上

信太茂春 同上

飯田訓之 同上

武士甲一 帯広畜産大学

山崎栄樹 帯広畜産大学

西川絵梨子 同上

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

昨年度に引き続き、文献調査と web 情報等の収集により、バイオフィルムに関する情報収集を行った。バイオフィルムのモデル実験系に関する情報収集を強化した。

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行った。塩タラコ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。調査施設は北海道釧路にあり、原料は北海道東部沿岸で漁獲されたスケトウダラを用い、塩タラコ製品を製造している。原魚裁割から魚卵の取り出しと原卵漬け込み処理、塩タラコ製品の箱詰めに至る工程で使用される器材、並びに作業環境よりバイオフィルムを採集した。

バイオフィルムは滅菌済みのマイクロスパーテルあるいはスクレイパーを用いて、バイオフィルムを器材および作業環境より剥離し、滅菌済み蓋付き小型試験管（樹脂製）に採集した。各バイオフィルムの採集箇所（採集箇所：26）および細菌検査に供した重量を記録した。採集したバイオフィルムは、直ちに釧路水産試験場の微生物実験室に搬入し、一般生菌数、リステリア (*Listeria monocytogenes*) について、定量的に調べた。

バイオフィルム調整液を接種した標準寒天培地およびクロモアガーリステリア寒天培地については、形成された集落を分離し、菌叢の DNA 分

析とリステリア属菌の同定を帯広畜産大学で行った。リステリアが検出された木製パレット由来のバイオフィルムのマイクロフロー解析を行った。分離菌株から鋳型 DNA を抽出・精製した後、常法にしたがって塩基配列を決定した。これを Gene Bank から出されている 16S-rRNA をコードする DNA の塩基配列に対してホモロジー検索を行って、分離株の菌種を推定した。

実験方法の詳細は、各協力研究者の報告書に記載した。

（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生産ラインからの除去を目指した管理法を検討している。

本年度は昨年に引き続き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。文献等の調査から、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。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。

バイオフィルムのモニターには、綿棒による拭き取りでは界面活性作用のある Tween80 を含む希釈液を用いることが有効である。バイオフィルムの除去は殺菌剤の処理や洗剤による

洗浄では充分ではなく、ミク로스パーテルやスクレイパーなどを使って物理的にはぎ取ることが重要である。殺菌作用のある洗浄剤とブラッシングなど物理的な処理を組み合わせると効果が高い。バイオフィルムの形成箇所によっては蒸気による処理も有効と思われる。

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、塩タラコ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、塩タラコ製造施設において、26箇所より採集したバイオフィルムのうち、10箇所のバイオフィルムからリステリア属が疑われる菌を検出し、このうち1カ所(木製パレット)からは *Listeria monocytogenes* が検出された。特定の作業工程において、バイオフィルムの一般生菌数の高い傾向が観察された。

バイオフィルムを形成している菌叢の検討では、リステリア属菌は7検体から検出され、このうち木製パレットのみから *Listeria monocytogenes* が検出された。木製パレット由来のバイオフィルムから *Psychrobacter* spp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* spp., *Flavobacterium* spp., *Chryseobacterium* spp.,

Deinococcus radiopugnans, *Pusillimonas* spp., *Brevundimonas* spp. など8菌種・菌群が検出された。

D. 考察

バイオフィル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。バイオフィルムを人工的に作成する方法が報告されていることから、生産現場でバイオフィルムの解析と併行して、これらの情報を基にリステリアに関するバイオフィルムのモデル実験系を確立すること、そのバイオフィルムの性質の解析、形成されたバイオフィルムからのリステリアの検出方法の提供、およびバイオフィルムの処理方法の検討を進めた。今年度は、製造工程のバイオフィルムからリステリアが検出されたことから、モデル系の開発実験は、このバイオフィルムから分離された菌株について検討することとした。

塩タラコ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、リステリアが1箇所、選択培地でリステリア属が疑われるコロニーが、10箇所のバイオフィルムから検出された。リステリアの分離されたバイオフィルムについては、構成細菌について知見を得ることが出来た。原魚処理用作業台(木製)でリステリア属菌を検出していることから、原魚裁割工程における原卵への汚染や、*L. monocytogenes* の木製パレットから原卵への交叉汚染が容易に推測される。

本調査で採集したバイオフィルムは、リステリア属菌を含まないもの、含むもの、*L.*

*monocytogenes*を含むものの3種類に分類できることから、これら3種類のバイオフィルムを構成する菌叢を把握することにより、当該菌の消長に関する情報を得られるのではないかと考え、その解析を進めることにした。今後、バイオフィルムについて化学的(薬剤)および物理的(スクレイピング等)処理を行い、処理前後のバイオフィルム菌叢の変化とリステリアの挙動を検討する。

前年度検討したイカ塩辛製造工程では、細断機のキャスターと作業台の脚からバイオフィルム固着が確認され、一般生菌数も $10^5 \sim 10^9$ cfu/100cm² と高い値を示した。こういった箇所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示された。本年度の塩タラコの製造工程では、リステリア属菌が疑われるバイオフィルムが10箇所認められたが、この様なバイオフィルム形成箇所は、洗浄が行われていない箇所や目立ちにくい箇所などといった傾向がある。

洗浄が不十分な箇所や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、バイオフィル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ことは重要である。このような箇所は、一般生菌数が高いだけでなく、リステリアのバイオフィルムの形成されやすい箇所でもある。そこで来年度は、形成されたバイオフィルムを除去する方法の検討、処理箇所の除去後の状況などを明らかにし、どの程度の処理を行えば、リステリアを製造工程から除去可能であるかの検討を行う。ATP法など、短時間で汚れを検査する方法でのバイオフィルムのモニター方法についても検討を進める。

発見したバイオフィルムを機械的にはぎ取り、サンプリングしたバイオフィルムについて、構成菌叢の検討を行った。リステリアの分離の見られたバイオフィルムを構成している菌が、9菌種・菌群であった。今回の調査で得られたリステリア属を含むバイオフィルムや、リステリア属を含まないバイオフィルムの菌叢の検討も進めており、これらの結果を比較検討することによりバイオフィルムに関する細菌学的な情報が得られるものと思われる。これらの知見は、バイオフィルムの制御に関し重要な知見を与えるものと思われる。

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の整理を進めた。

塩タラコの製造施設において、製造環境からバイオフィルムを採集し、バイオフィルム中の一般生菌数とリステリアの有無について調査を行った。このうち、原魚処理用作業台など10カ所から採集したバイオフィルムでは、クロモアガーリステリア寒天培地によりリステリア属陽性であることを示した。木製パレットから *Listeria monocytogenes* を分離した。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。形成されたバイオフィルムについて、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。

リステリア菌が検出されたバイオフィルムからは 8 菌種・菌群が分離されたが、これらはいずれも自然界に広く分布する細菌である。これらバイオフィルムを形成する細菌とリステリア属菌あるいはリステリア・モノサイトゲネスとの競合あるいは拮抗との関係を考察するためには、リステリア属菌が検出された試料と検出されなかった試料の菌叢を比較検討し解析することが今後の検討課題として必要と思われる。

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. (2008) Identification and analysis of the osmotolerance associated genes in *Listeria monocytogenes*. Food Additives and Contaminants. 25(9):1089-1094.
- ② Takeshi K., Kitagawa M., Kadohira M., Igimi S., Makino S. (2009) Hazard Analysis of *Listeria monocytogenes* Contaminations in Processing of Salted Roe from Walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*) in Hokkaido, Japan. J. Vet. Med.Sci. 71(1):1-3.
- ③ 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)
- ④ 五十君静信、岡田由美子。(2008) 食品を介したリステリア症に関する現状と考察。病原微生物検出情報. 29:222-223.

2. 学会発表

- ① 五十君静信。食品を介したリステリア症の

制御の考え方。第 82 回日本細菌学会総会。名古屋。2009. 3. 13.

- ② 岡田由美子、鈴木穂高、岡田信彦、五十君静信、山本茂貴。*Listeria monocytogenes* の酸化ストレス応答における $\sigma 54$ の役割。第 82 回日本細菌学会総会。名古屋。2009. 3. 13.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

平成 20 年度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）
（分担研究報告書）

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 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 影山 亜紀子
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 五十君 静信
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 岡田 由美子

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、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、食品における汚染実態は改善されると予測していたが、食品における低いレベルの汚染が報告されている。この原因として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、本菌はより物理的刺激や薬剤に対して抵抗性を示すことになる。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ういうものか、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が、本年度はまずバイオフィームの実験室レベルでのモデル系の作成を行うこととし、更なる具体的な文献調査を行うとともにバイオフィーム除去に有効と思われるモデル評価系のプロトコールを作成した。

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、大量死を引き起こすことが知られている。本菌は幅広い pH 域や温度域で成育が可能であり、特に冷蔵庫内の低温でも成育が可能であることは

食品衛生上重要である^{1,2)}。近年の発症例としては ready-to-eat 食品の製造過程でのコンタミによるものが多く報告されている。ready-to-eat 食品の製造工場の設計や洗浄・殺菌の方法が改良されたが、相変わらず製造過程での汚染が問題となっている³⁾。

この原因として本菌がバイオフィルムを形成することにより、より抗生物質や抗菌剤に対して耐性となることが考えられている^{4, 5, 6, 7)}。昨年度行った文献調査をもとに実際に実験室レベルでのバイオフィルム制御に有効と思われるモデル実験系の作成を試みることにし、具体的な方法に関する更なる文献調査と具体的なモデル系の作成を試みる。

B. 研究方法

1. インターネット (PubMed を用いた文献検索等) を利用し、リステリア・モノサイトゲネスのバイオフィルムを形成させる際に影響を及ぼす因子に関する情報収集を行った。文献調査の結果、実験室レベルでのモデル系の構築には Pan らが 2006 年に報告した論文⁸⁾を参考にするのが適当と思われ、この論文の方法に従い実験プロトコルの作成を行った。
2. 支持素材及び使用菌株：バイオフィルムを形成させる素材としてステンレスとテフロン[®]の 2 種類について検討することとし、5 株のリステリア・モノサイトゲネス株の混合液を使用することとした。使用するリステリア・モノサイトゲネス株は国立医薬品食品衛生研究所に保存してある分離株のうちバイオフィルムを形成しやすいと考えられている血清型 1/2a、1/2c、そしてバイオフィルムを形成しにくいと考えられている血清型 1/2b、4b からそれぞれ選択し用いることとする。
3. 菌液の調整：培地には、終濃度 0.6% となるように yeast extract を加えた

Bacto tryptic soy agar または broth (TSA-YE または TSB-YE) を用いる。保存されている菌株から TSA-YE 平板培地で 37°C、48 時間培養後、1-2 コロニーを 10 ml の TSB-YE 液体培地に植え 37°C、18-20 時間培養し、更に 250 ml/500 ml の TSB-YE に液体培地に植え継ぎ 37°C、18-20 時間培養、5000g で 10 分間、10°C にて遠心後、生理食塩水にけん濁する。これを 2 度行った後に OD₆₃₀=0.5 に調整する。5 株についてそれぞれ調整した後に同量ずつ混合する。

4. バイオフィルムの形成方法：ステンレスはあらかじめ 25% 硝酸に室温で 8 時間浸しておく、その後ステンレスとテフロンフィルムを 2% Micro-90 に浸して超音波で 1 時間洗浄する。表面を蒸留水で洗った後、オートクレーブにて滅菌する。これをリステリア混合液に 37°C で 3 時間浸した後、菌液を取り除き生理食塩水で 3 回洗浄する。コーニングチューブ (50 ml) にそれぞれ 1 つずつ入れ、30 ml の 1/10 TSB-YE を加え、22.5°C で 48 時間培養し、バイオフィルムを成長させる。バイオフィルムが形成されたかどうかは、サンプルを 0.01% アクリジンオレンジにより、室温で 5 分間染色した後に蛍光顕微鏡で観察する。

C. 研究結果

文献調査：リステリア・モノサイトゲネスのバイオフィルムを形成させる際に影響を及ぼす因子として考えられるものとしては ①株の性質②バイオフィルムを形成させる

素材③菌の phase、使用する増菌培地④共存する他の微生物などがあげられる^{4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15)}。使用するリステリア・モノサイトゲネス株についてであるが、リステリア・モノサイトゲネス株にはいくつかの血清型が存在するが、この血清型によりバイオフィルムの形成しやすさに違いがあると考えられている。しかし研究者により結果に違いがみられるため状況により変動するのかもしれない。多く報告されている結果としては、素材への粘着性を調べた結果 1/2c は 1/2a や 4b と比較して粘着性が良いという報告がなされている^{16, 17, 18, 19)}。

一方、すべてに共通に報告されている事実としてはバイオフィルムから常に分離される (persistent) 株は突発的にまたは、たまにしか分離されない (sporadic) 株と比較してバイオフィルムが形成しやすいという点である¹⁸⁾。バイオフィルムを形成させる素材についてであるが、実際に食品製造工場で生産ラインに用いられているステンレス (表面加工の違いや素材自体の金属の配合の違いにより非常に様々なタイプが存在している) やベルトコンベアと同素材のゴム、パッケージングのプラスチック、その他のガラス、テフロンフィルムなどについての検討報告がなされていることが明らかとなった²⁰⁾。

D. 考察

昨年度に引き続き文献調査を行ったが、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、多様である。食品衛生関係では、感染症を予防するため、食品汚染を防ぐためといった目的で研究が行

われている。バイオフィルムに対する関心は非常に高く、これからますます発展していく分野であると思われる。今回研究班が特に注目している、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いる。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、バイオフィルムを人工的に作成する情報を集めて、モデル系を作ることを検討した。

生産現場におけるバイオフィルムの検討から、昨年度はリステリアの分離されたバイオフィルムは見つからなかったため、文献を基にステンレス上にリステリアのモデルバイオフィルム形成について実験を開始した。一方、本年度の検討により、リステリアの分離されたバイオフィルムが見つかったため、モデル系の作成は、こちらの菌叢解析のデータが揃ったところで、改めて検討をすすめることにした。実際の現場で得られた菌株を検討中のモデル系に加えて検討を行う予定である。

塩タラコの製造工程のバイオフィルムからは、リステリア属菌も複数のバイオフィルムから見つかっており、モデル系として検討していた素材以外のバイオフィルムから高率にリステリア属が得られていた。こちらについても、構成菌叢の検討が進んでから、改めてモデル系を構築することにした。

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。

共同研究者の製造工程から、リステリアの分離されたバイオフィルムが見つかったことから、この菌叢解析の結果を待って、それに対応したバイオフィルムモデル系を作成することとした。このモデルを利用することにより、素材によりバイオフィルムの形成がどの様に異なるのか、また実際に

形成されたバイオフィルムに様々な抗菌剤などを施し、バイオフィルムが除去できるかの検討を行うことが可能になると思われる。

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

参考文献

- 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) 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.
- 9) Briandet R, Leriche V, Carpentier B, Bellon-Fontaine M. (1999) Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. J Food Prot 62:994-998.
- 10) Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, Bellon-Fontaine M-N, Hebraud M. (2002) *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. Appl Environ Microbiol 68:728-737.
- 11) Kalmokoff ML, Austin JW, Wan X-D, Sanders G, Banerjee S, Farber JM. (2001) Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. J Appl Microbiol 91:725-734.
- 12) Mafu AA, Roy D, Goulet J, Savoie L. (1991) Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. Appl Environ Microbiol 57:1969-1973.
- 13) Norwood DE, Gilmour A. (2001) The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. Lett Appl Microbiol 33:320-324.

- 14) Norwood DE, Gilmour A. (2000) The growth and tolerance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J Appl Microbiol* 88:512-520.
- 15) Wong ACL. (1998) Biofilms in food processing environments. *J Dairy Sci* 81:2765-2770.
- 16) Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call R. (2003) Variation in Biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 69:7336-7342.
- 17) McLauchlin J. (1987) *Listeria monocytogenes*, recent advances in taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *J Appl Bacteriol* 63:1-11.
- 18) Norwood DE, Gilmour A. (1999) Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *J Appl Microbiol* 86:576-582.
- 19) Lunden JM, Miettinen MK, Autio TJ, Korkeala HJ. (2000) Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *J Food Prot* 63:1204-1207.
- 20) Krysinski EP, Brown LJ, Marchisello TJ. (1992) Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *J Food Prot* 55:246-251.

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）
食中毒菌の高度衛生管理に関する研究
水産加工場におけるリステリア菌に対する危害分析

研究協力者 帯広畜産大学畜産衛生学研究部門
食品衛生学分野 武士甲一（教授）
山崎栄樹（助教）
西川絵梨子（獣医学課程）

研究要旨

近年、わが国では水産物のリステリア・モノサイトゲネス（以下、リステリア菌）による汚染が注目され、食中毒発生防止の観点から、危害分析と衛生管理構築の試みがなされている。本菌の工場内環境汚染を考察するとき、バイオフィルムの除去は実施すべき重要な一般的衛生管理事項の一つと考えられる。

今回、我々は、スケトウダラの一次加工を主たる業務とするS水産加工施設からバイオフィルムを採種し、そのマイクロフローラの解析を行った。その結果、リステリア属菌は7検体から検出され、このうち木製パレットのみからリステリア菌が検出された。木製パレット由来のイオフィルムから *Psychrobacter* spp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* spp., *Flavobacterium* spp., *Chryseobacterium* spp., *Deinococcus radiopugnans*, *Pu. illimonas* spp., *Brevundimonas* spp. など8菌種が検出された。これらの結果をもとに、水産加工施設から採取されたバイオフィルム中のマイクロフローラを形成する細菌とリステリア菌との競合あるいは拮抗との関係を考察した。

A. 研究目的

今回、我々は、安全で衛生的な水産加工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、バイオフィルムに着目して実験を行った。

B. 研究方法

1. 調査期間及び調査施設

本調査は、平成20年10月から平成21年2月の間に、北海道後釧路管内でスケトウダラの一次加工を主たる業務とするS水産加工施設において調査を実施した。

2. 調査試料

(1) バイオフィルム

S水産加工施設で採取されたバイオフィルムは26検体で、その内訳を表1に示す。

(2) 細菌の分離

検出対象を一般性菌数及びリステリア属菌とした。試料の調製から細菌の検出ならびに計測までは、北海道立釧路水産試験場の研究員が委託研究の一環として実施した。細菌検出後の分離平板は帯広畜産大学に冷蔵状態で送付された。なお、分離されたリステリア属菌の同定は、当大学で実施した。

(3) 細菌遺伝子のホモロジー検索

本年度においては、リステリア菌が検出された木製パレット由来のバイオフィルムのマイクロフローラ解析を行った。送付された分離平板をCCDカメラ装着の生物顕微鏡で観察し、集落の形態や色調等によって分別し、各々の集落数を算定した。各集落の代表株を保存すると共に、添付資料1に示したプロトコールにしたがって鋳型DNAを抽出し、これを精製した後、常法にしたがって塩基配列を決定した。これをGene Bankから出されている16S-rRNAをコードするDNAの塩基配列に対してホモロジー検索を行って、分離株の菌種を推定した。

(倫理面への配慮)

当該施設名、従業員名、バイオフィルムに関する情報を匿名とした。

C. 研究結果

(1) リステリア属菌の検出

リステリア属菌は7検体から検出され、このうちリステリア属菌は木製パレット-4からのみ検出された。検出されたリステリア属菌は *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. innocua*であった（表2）。

(2) バイオフィルムのマイクロフローラの解析

リステリア菌が検出された木製パレット由来のバイオフィルムから *Psychrobacter* spp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* spp., *Flavobacterium* spp., *Chryseobacterium* spp., *Deinococcus radiopugnans*, *Pusillimonas* spp., *Brevundimonas* spp. など 8 菌種が検出された。標準寒天培地上での最近の発育状況を図 1 に、ホモロジー検索の結果を添付資料 2 に示す。

D. 考察

バイオフィルムは細菌、真菌、藻類、原生動物などの微生物から構成される粘液状物質である。近年、食品の微生物による汚染源として、食品製造設備表面に形成されたバイオフィルムの関与が指摘されており、食中毒発生防止の観点から、本菌の工場内環境汚染を考察するとき、バイオフィルムの除去は実施すべき重要な一般的衛生管理事項の一つと考えられる。

リステリア属菌は 7 検体から検出され、このうちリステリア菌は木製パレット-4 からのみ検出された。検出されたリステリア属菌はフィレマシン魚体洗浄部・フォークリフトタイヤ側面・フォークリフトアクセルペダルから *L. seeligeri*, 原魚処理用作業台-1 から *L. grayi*, 木製パレット-3・原魚処理用作業台-2 から *L. innocua* が各々検出され、同一フロアの作業場においても、作業箇所によってリステリア属菌の分布が異なることが判明した。

リステリア菌が検出された木製パレット-4 由来の *Psychrobacter* spp., *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* spp., *Flavobacterium* spp., *Chryseobacterium* spp., *Deinococcus radiopugnans*, *Pusillimonas* spp., *Brevundimonas* spp. など 8 菌種はいずれも自然界に広く分布する細菌である。これらマイクロフローラを形成する細菌とリステリア属菌あるいはリステリア菌との競合あるいは拮抗との関係を考察するためには、リステリア属菌が検出された試料と検出されなかった試料のマイクロフローラ解析も今後の検討課題として必要と考える。

E. 結論

今回、我々は、北海道釧路管内の S 水産加工施設からバイオフィルムを採種し、そのマイクロフローラの解析を行った。その結果、リステリア属菌は 7 検体から検出され、このうち木製パレット-4 の 1 検体からのみリステリア菌が検出された。木製パレット由来のバイオフィルムは好気性細菌 8 菌種から構成され、これらマイクロフローラを形成する細菌とリステリア属菌あるいはリステリア菌の競合あるいは拮抗との関

係を考察するためには、更なる検討が必要である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

1. Nguyen Thi Bich Thuy, Koichi Takeshi, Keiko Kawamoto, Sou-ichi Makino. 2008. Characterization of *Salmonella* spp. isolates from Pig Slaughter Pigs in Hokkaido, Japan and Potential Transfer of antimicrobial resistance. J. Vet. Med. Sci., in press.
2. 22 K. Takeshi, M. Kitagawa, M. Kadohira, S. Igimi, S. Makino. 2009. Hazard Analysis of *Listeria monocytogenes* Contaminations in Processing of Salted Roe from Walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*) in Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci. 71(1):1-3.
3. 23) K. Takeshi, S. Itoh, H. Hosono, H. Kono, V. T. Tin, N. Q. Vinh, N. T. B. Thuy, K. Kawamoto, S. Makino. 2009. Detection of *Salmonella* spp. Isolates from Specimens due to Pork Production Chains in Hue City, Vietnam. J. Vet. Med. Sci., 71(4):in press.
4. 24) 武士甲一, 2009. IV-B-3. ボツリヌス症, 青木洋介, 岩田 敏, 大西健児, 清田 浩, 草地信也, 古西 満, 館田一博, 満田年宏監修, IV 新興・再興感染症とバイオテロ, 感染症専門医テキスト (日本感染症学会編集), (株)南江堂, 東京, pp.101-102. (in press)

該当なし

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

表1 S水産加工施設における調査試料の内訳

No.	採集箇所	SPC BF重量(g)	一般生菌数 (cfu/寒天平板)	一般生菌数 (cfu/mgハイオフィルム)	リステリア属菌
2	テーブル側面	0.1734	1.2E+06	7.E+03	陰性
3	サイドテーブル側面	0.0001	1.2E+06	1.E+07	陰性
4	サイドテーブル・キヤスターハウジング	0.0657	1.6E+05	2.E+03	陰性
5	魚卵処理台(ステン)表面	0.0118	1.8E+05	2.E+04	陰性
6	床タイル	0.0034	1.2E+05	4.E+04	陰性
7	ポリ容器底面	0.0284	2.8E+06	1.E+05	陰性
9	計量器秤量台周囲	0.0012	5.1E+05	4.E+05	陰性
10	台車(緑)表面	0.0013	1.4E+05	1.E+05	陰性
14	床タイル	0.0090	7.5E+04	8.E+03	陰性
16	排水ピット・枠受け部	0.1052	1.5E+06	1.E+04	陰性
18	フイレーマシキヤスター	0.0602	9.6E+07	2.E+06	陰性
19	フイレーマシキヤスター	0.1586	7.5E+06	5.E+04	陰性
21	スキナー・ローラー受け部横	0.0175	7.6E+05	4.E+04	陰性
22	フォークリフト・タイヤ側面	0.1446	2.2E+06	2.E+04	陽性
23	フォークリフト・アクセルペダル	0.0562	1.1E+06	2.E+04	陽性
24	天井雨漏り部	0.1094	5.9E+03	5.E+01	陰性
25	天井ドレイン	0.0298	2.6E+07	9.E+05	陰性
28	原魚処理作業台-1(木製板)	0.0398	1.4E+07	4.E+05	陽性
30	貯水タンク	0.0352	7.5E+06	2.E+05	陰性
32	木製パレット-1	0.0185	6.0E+04	3.E+03	陰性
33	木製パレット-2	0.0256	4.9E+05	2.E+04	陰性
34	木製パレット-3	0.0297	1.1E+06	4.E+04	陽性
35	原魚処理作業台-2(木製板)	0.0451	4.0E+07	9.E+05	陽性
36	プラスチック製まな板	0.0153	1.0E+06	7.E+04	陰性
38	原魚置き場壁	0.0176	7.1E+05	4.E+04	陰性
47	木製パレット-4	0.0085	3.2E+04	4.E+03	陽性

表2 分離されたリステリア属菌の菌種の同定

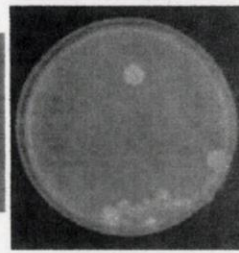
場所 No.	コロニーNo.	通し No.	Halo 形 成	ラムノース	キシロー ス	マンニット	判定
19	1	1	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>
	2	2	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>
	3	3	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>
22	1	4	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>
	2	5	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>
	3	6	-	-	+	-	<i>L. seeligeri</i>
23	1	7	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>
	2	8	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>
	3	9	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>
28	1	10	-	-	-	+	<i>L. grayi</i>
	1	11	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>
34	2	12	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>
	3	13	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>
	1	14	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>
35	2	15	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>
	3	16	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>
	1	17	+	+	-	-	<i>L. monocytogenes</i>
47A	2	18	+	+	-	-	<i>L. monocytogenes</i>
	1	19	+	+	-	-	<i>L. monocytogenes</i>
47B	2	20	+	+	-	-	<i>L. monocytogenes</i>

No.47 木製ハレット-4

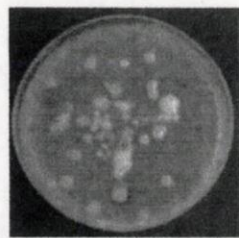
培地:
コロニーの陥没がみられた



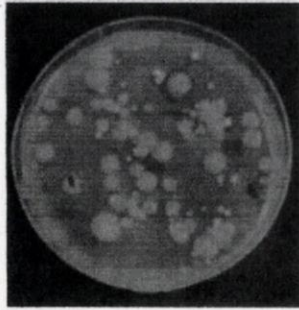
培地:
ハロの形成が見られた



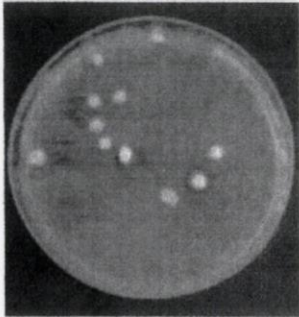
標準寒天培地
(一般性菌)



No.19 フィレーマシン魚体搬送部



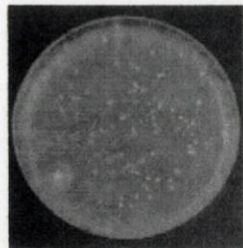
No.14 床タイル



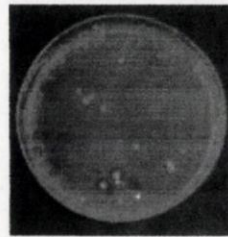
No.22 フォーグリアフト・タイヤ側面



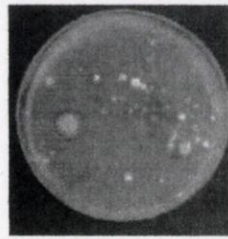
No.23 フォーグリアフト・アグセルペダル



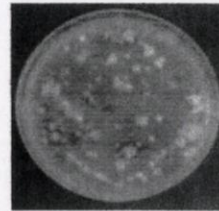
No.34 木製ハレット-3



No.35 原集処理用作業台-2(木製板)



No.18 フィレーマシンキャスター



No.28 原集処理用作業台-1(木製板)

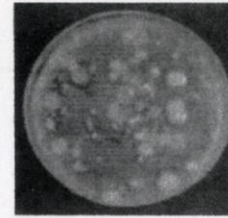


図1 拭き取り試料の標準寒天培地上での集落の状況