

表7. 一般生菌の菌種と存在比率 検体C群

| リステリアの有無 | バイオフィルム採取場所 | 株名 | 数 | % | 遺伝子解析 |
|----------|-------------|-----|----|------|---|
| - | 剥皮機 | 158 | 1 | 3.7 | <i>Caulobacter crescentus</i> |
| - | | 159 | 10 | 37.0 | <i>Flavobacteriaceae bacterium</i> |
| - | | 160 | 4 | 14.8 | <i>Nocardia farcinica</i> |
| - | | 161 | 2 | 7.4 | <i>Arthrobacter aurescens</i> |
| - | フレームジン | 163 | 10 | 37.0 | <i>Rhodococcus erythropolis</i> |
| - | | 164 | 15 | 33.3 | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> |
| - | | 165 | 14 | 31.1 | <i>Rhodococcus erythropolis</i> |
| - | | 166 | 16 | 35.6 | <i>Pseudomonas entomophila</i> |
| - | 作業台 | 167 | 12 | 63.2 | <i>Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida</i> |
| - | | 168 | 7 | 36.8 | <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| - | ザル・カゴ | 172 | 8 | 27.6 | <i>Comamonas testosteroni</i> |
| - | | 173 | 21 | 72.4 | <i>Flavobacteriaceae bacterium</i> |
| - | 木製パレット | 174 | 14 | 35.0 | <i>Flavobacteriaceae bacterium</i> |
| - | | 175 | 12 | 30.0 | <i>Arthrobacter sp.</i> |
| - | | 176 | 12 | 30.0 | <i>Kytococcus sedentarius</i> |
| - | | 177 | 2 | 5.0 | <i>Deinococcus geothermalis</i> |
| - | | 169 | 18 | 60.0 | <i>Kocuria rhizophila</i> |
| | フォークリフト・ベダル | 170 | 5 | 16.7 | <i>Flavobacteriaceae bacterium</i> |
| | | 171 | 7 | 23.3 | <i>Psychrobacter sp.</i> |

表8. バイオフィルム中のリステリア属菌の有無と一般生菌の検出割合

| 一般生菌 | リステリア属陽性 | | | リステリア属陰性 | | |
|--------------|----------|-------|----|----------|----|-------|
| | 陽性 | 割合(%) | 陰性 | 割合(%) | 陽性 | 割合(%) |
| フラボバクテリウム属 | 4 | 50.0 | 4 | 50.0 | 8 | 53.3 |
| クラビバクター属 | 4 | 50.0 | 4 | 50.0 | 6 | 40.0 |
| ロドコッカス属 | 3 | 37.5 | 5 | 62.5 | 8 | 53.3 |
| グラメラ属 | 2 | 25.0 | 6 | 75.0 | 1 | 6.7 |
| バラコッカス属 | 2 | 25.0 | 6 | 75.0 | 1 | 6.7 |
| サイクロバクター属 | 2 | 25.0 | 6 | 75.0 | 1 | 6.7 |
| カルコバクター属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 3 | 20.0 |
| オーソロバクター属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 3 | 20.0 |
| スタフィロコッカス属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 |
| プロテウス | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 |
| ミニバクテリウム属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 |
| エロモナス属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 1 | 6.7 |
| デインコッカス属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 1 | 6.7 |
| ボルデテラ属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 |
| シュードモナス属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 4 | 26.7 |
| アシネトバクター属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 4 | 26.7 |
| アゼトバクター属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 |
| マイクロコッカス属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 |
| コクリア属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 |
| エンテロバクテリウム属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 |
| セラチア属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 |
| Gordonia属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 |
| Pedobacter属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 |
| ノカルシア属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 |
| Comamonas属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 |
| Kyotococcus属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 |

表9. バイオフィルム中のリステリア属菌と一般生菌の関係(フィッシュヤーの直接確率法)

| 一般生菌 | リステリア属陽性BF | | | | | | リステリア属陰性BF | | | | | | フィッシュヤーの確率計算法 | | | | | |
|---------------|------------|------|-----|------|-----|------|------------|------|-------|-------|-------|-------|---------------|-------|-----|-------|-----|-----|
| | 陽性 | | | 陰性 | | | 陽性 | | | 陰性 | | | 確率値 | | | 計(Σp) | | |
| | 実測値 | 期待値 | 実測値 | 期待値 | 実測値 | 期待値 | 実測値 | 期待値 | 実測値 | 期待値 | 実測値 | 期待値 | 実測値 | 期待値 | 実測値 | 期待値 | 実測値 | 期待値 |
| アラボバクテリウム属 | 4 | 50.0 | 4 | 50.0 | 8 | 53.3 | 7 | 46.7 | 0.322 | 0.267 | 0.104 | 0.018 | 0.001 | 0.722 | | | | |
| クラビバクター属 | 4 | 50.0 | 4 | 50.0 | 6 | 40.0 | 9 | 60.0 | 0.306 | 0.147 | 0.083 | 0.006 | 0.027 | 0.517 | | | | |
| ロドコッカス属 | 3 | 37.5 | 5 | 62.5 | 8 | 53.3 | 7 | 46.7 | 0.267 | 0.104 | 0.018 | 0.001 | - | 0.369 | | | | |
| ガラメラ属 | 2 | 25.0 | 6 | 75.0 | 1 | 6.7 | 14 | 93.3 | 0.237 | 0.237 | 0.032 | - | - | 0.506 | | | | |
| バラコッカス属 | 2 | 25.0 | 6 | 75.0 | 1 | 6.7 | 14 | 93.3 | 0.237 | 0.237 | 0.032 | - | - | 0.506 | | | | |
| サイコロバクター属 | 2 | 25.0 | 6 | 75.0 | 4 | 26.7 | 11 | 73.3 | 0.325 | 0.088 | - | - | - | 0.414 | | | | |
| シュドモナス属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 4 | 26.7 | 11 | 73.3 | 0.325 | 0.088 | - | - | - | 0.414 | | | | |
| アンネトバクター属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 3 | 20.0 | 12 | 80.0 | 0.411 | 0.154 | - | - | - | 0.565 | | | | |
| カルコバクター属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 3 | 20.0 | 12 | 80.0 | 0.411 | 0.154 | - | - | - | 0.565 | | | | |
| オーソロバクター属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 1 | 6.7 | 14 | 93.3 | 0.474 | 0.059 | - | - | - | 0.534 | | | | |
| エロモナス属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 1 | 6.7 | 14 | 93.3 | 0.474 | 0.059 | - | - | - | 0.534 | | | | |
| テイニコッカス属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 | 15 | 100 | 0.348 | - | - | - | - | 0.348 | | | | |
| スタフィロコッカス属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 | 15 | 100 | 0.348 | - | - | - | - | 0.348 | | | | |
| プロテウス | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 | 15 | 100 | 0.348 | - | - | - | - | 0.348 | | | | |
| ミニバクテリウム属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 | 15 | 100 | 0.348 | - | - | - | - | 0.348 | | | | |
| ホルテチラ属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 | 15 | 100 | 0.348 | - | - | - | - | 0.348 | | | | |
| アゼトバクター属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 | 15 | 100 | 0.348 | - | - | - | - | 0.348 | | | | |
| マイクロコッカズ属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 | 15 | 100 | 0.348 | - | - | - | - | 0.348 | | | | |
| コクリア属 | 1 | 12.5 | 7 | 87.5 | 0 | 0.0 | 15 | 100 | 0.348 | - | - | - | - | 0.348 | | | | |
| エンテロバクテリウム属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 | 14 | 93.3 | 0.652 | - | - | - | - | 0.652 | | | | |
| セラチア属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 | 14 | 93.3 | 0.652 | - | - | - | - | 0.652 | | | | |
| Gordonia属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 | 14 | 93.3 | 0.652 | - | - | - | - | 0.652 | | | | |
| Pedobacter属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 | 14 | 93.3 | 0.652 | - | - | - | - | 0.652 | | | | |
| ノカルシア属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 | 14 | 93.3 | 0.652 | - | - | - | - | 0.652 | | | | |
| Coimonomas属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 | 14 | 93.3 | 0.652 | - | - | - | - | 0.652 | | | | |
| Kyato.coccus属 | 0 | 0 | 8 | 100 | 1 | 6.7 | 14 | 93.3 | 0.652 | - | - | - | - | 0.652 | | | | |

表9. バイオフィルム中のリステリア属菌と一般生菌の関係(フィッシュヤーの直接確率法)

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）
（受託事業報告書）

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
非加熱製造・非加熱喫食型水産加工食品製造施設におけるリステリアを中心とする
バイオフィルムの採集と、その基礎的性状に関する調査研究

北海道立釧路水産試験場 利用部・加工部

担当者 阪本 正博（利用部・主任研究員）
信太 茂春（加工部・保蔵流通科長）
麻生 真悟（利用部・利用技術科長）
蛭谷 幸司（利用部・原料化学科長）
北川 雅彦（利用部長）

研究要旨

バイオフィルム形成が見られるリステリアについて、非加熱製造・非加熱喫食食品の製造工程における衛生管理の最適なモニタリング手法を確立することを目的とする。

今年度も、水産加工施設において、製造環境からバイオフィルムを採集し、バイオフィルムの一般生菌数とリステリア菌の有無について調査を行った。その結果、採集したバイオフィルムの一般生菌数は、たらこ室入り口戸の取手部で 10^3 cfu/g biofilm 台を除き、 $10^5 \sim 10^9$ cfu/g biofilm に分布していた。このうち、剥皮機の上面カバー部、フォークリフトのアクセルペダル部の2箇所（3検体）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コロニーを検出した。しかし、*L. monocytogenes* を含むものであると推定できるバイオフィルムは、確認できなかった。なお、細菌検査終了後の標準寒天培地およびクロモアガーリステリア寒天培地からの分離株については、DNA分析とリステリア属菌の同定を担当する帯広畜産大学畜産学部応用獣医学講座へ提供した。

バイオフィルムが付着しているザルカコ（持ち手部）を用いて、洗浄（ブラッシング）、スチーム処理、塩素浸漬、洗剤浸漬を行い、バイオフィルムの防除方法を検討した。その結果、従来行われている塩素浸漬および洗剤浸漬単独では除菌・殺菌効果が認められなかった。しかし、洗浄（ブラッシング）処理でバイオフィルムを除去後に洗剤浸漬を行うことにより、除菌・殺菌効果等の効果が顕著に認められた。

モニタリングの方法の検討として、バイオフィルムの溶解のために生理食塩水に添加している Tween 80 の効果を検討した。その結果、今回検討したバイオフィルムでは、無添加と 0.1% 添加において一般生菌数の差は認められなかった。

A. 研究目的

バイオフィルム形成が見られるリステリアについて、非加熱製造・非加熱喫食食品の製造工程における衛生管理の最適なモニタリング手法を確立することを目的とする。

今年度は、昨年に引き続き、水産加工施設に

おける製造環境からバイオフィルムを採集し、バイオフィルムの一般生菌数と大腸菌およびリステリア属菌の有無について調査を行う。さらに、細菌検査を行った寒天培地については、バイオフィルムにおける微生物の菌叢把握とリステリア属菌の同定を分担する帯広畜産大

学畜産学部応用獣医学講座へ提供する。また、バイオフィルムのブラッシング等による物理的除去と、洗剤・薬剤等による化学的除去について検討し、一般生菌数と大腸菌およびリステリア属菌を指標として、その除去効果を評価する。さらに、一般生菌数等の細菌検査の希釈液に添加し、バイオフィルムの溶解に用いる Tween 80 の効果を検討する。

B. 研究方法

1. 調査期間及び調査施設

本調査の実施期間は平成 21 年 8 月から平成 21 年 11 月とした。調査施設 A は北海道釧路管内にあり、塩タラコ製品をはじめスケトウダラフィレーなどの水産加工品を製造している。

2. 調査試料

(1) バイオフィルム

上述の調査施設 A では、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、水揚げ当日に施設に搬入して裁割を行っている。当該施設において、原魚裁割から製品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 8 月と 11 月の 2 回採集した。11 月は 8 月に採集した 20 箇所中 6 箇所について、再度、バイオフィルムの採集を試み、ヘッドカッターのベルト部を除いた 5 箇所から採集した。また、新たに木製パレット上面部からも採取した。バイオフィルムの採集は、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および細菌検査に供した重量を表 1, 2 に示した。

(2) 細菌検査

採集したバイオフィルムは、直ちに当該微生物実験室に搬入し、一般生菌数、大腸菌、リステリア (*Listeria monocytogenes*) について、以下に示す方法により試験を行った。なお、本検査終了後の標準寒天培地およびクロモアガーリステリア寒天培地からの分離株については、DNA 分析とリステリア属菌の同定を担当する

帯広畜産大学畜産学部応用獣医学講座へ提供した。

一般生菌数: 表 1 に示したように、バイオフィルム数 mg から数百 mg を滅菌チューブに無菌的に精秤し、これに滅菌済みの 0.1% Tween 80-生理的食塩水を 10 ml 加えて激しく攪拌し、10 倍乳剤を調製した。この乳剤を適宜希釈し、標準寒天培地(日水製薬(株))による塗抹培養(35°C, 48 時間)から一般生菌数を推定した。

大腸菌: 一般生菌と同様にバイオフィルムを精秤し、これに滅菌済みの 0.1% Tween 80-生理的食塩水を 10 ml 加えて激しく攪拌し、10 倍乳剤を調製した。この乳剤を適宜希釈し、クロモアガーECC 培地(CHROMagar 社, 推定培地)による塗抹(35°C, 24 時間)から大腸菌の有無を推定した。

リステリア: 表 1 に示したように、バイオフィルム数 mg から数百 mg を滅菌チューブに無菌的に精秤し、これにハーフフレイザー培地(一次増菌培地(Oxoid 社))10ml を加えて激しく攪拌した後、30°C で 24 時間培養した(一次増菌培養)。この培養液 1.0ml をフレイザー培地(二次増菌培地(Oxoid 社))10ml に接種し、37°C にて 24~48 時間培養した(二次増菌培養)。一次増菌培養および二次増菌培養した試料は、クロモアガーリステリア寒天培地(CHROMagar 社)を用いて、37°C 24~48 時間画線培養を行い、水色の定型的集落およびハローの有無によりリステリア属菌の検出と *Listeria monocytogenes* の推定を行った。

(3) バイオフィルムの防除試験

バイオフィルムが付着しているザルカコ(持ち手部)を使用し、洗浄(ブラッシング, 洗剤:3%レディクリーン エコラボ社), スチーム(スチームクリーナーSC1402 ケルヒャジャパン社), 塩素浸漬(100ppm 次亜塩素酸ナトリウム)または、洗剤浸漬(1%プリンシパル エコラボ社)をそれぞれ行った後、水洗し、拭き取りを行い、一般生菌数を測定した。

また、洗浄後にスチーム処理を行い、さらに、各浸漬をする処理区、および洗浄後にスチーム

処理を行わず、各浸漬をする処理区を作製し、各工程中の拭き取りを行い、一般生菌数とATP発光量を測定し、洗浄効果を比較した。ATP発光量の測定は、ルミテスターPD20（キッコーマン社）を用いた。

なお、スチーム処理はスチーム温度 50～70℃、ノズルから 5～10cm の距離で 30 秒間行い、各浸漬処理の浸漬時間は 18 時間であった。

(4) Tween 80 添加効果試験

原料作業台（上面）より 0%、0.1%、0.25%、0.5% の各濃度の Tween 80-生理的食塩水（滅菌済み）に浸漬した綿棒で一定面積を拭き取り、10 倍量の乳剤を調整後、適宜、同濃度の Tween 80-生理的食塩水で希釈し、一般生菌数を測定した。フィレーマシンの出口部カバー部については、0%（無添加）および 0.1% 濃度の Tween 80-生理的食塩水を用いて比較した。

また、各バイオフィームでは、0% および 0.1% Tween 80-生理的食塩水（滅菌済み）を加え、乳剤を調整、希釈し、一般生菌数を比較した。

なお、有意差検定は、tukey 法による多重検定を用いた。

(倫理面への配慮)

当該施設名、従業員名、製品に関する情報を匿名とした。

C. 研究結果

(1) バイオフィームにおける細菌検査結果

採集した各バイオフィームのリスティア菌検査における一次増菌培地および二次増菌培地について、これら培地の黒色化の有無と、クロモアガーリスティア寒天培地 (CHROMagar 社) による水色の定型的集落およびハローの有無について確認した結果を表 3、4 に示した。その結果、二次増菌培養では、8 月で剥皮機の上面カバー部、フォークリフトのアクセルペダル部の 2 箇所、11 月ではフォークリフトのアクセルペダル部の 1 箇所の計 2 箇所（3 検体）から得られたバイオフィームの培地で、黒色化を観察した。また、黒色化したすべての箇所でリスティア属菌と推定される水色の定型的集

落を確認した。しかし、ハローを生じるものはなく、*L. monocytogenes* を含むものであると推定できるバイオフィームは、確認できなかった。

すべての一次増菌培地について、培地の黒変化とクロモアガーリスティア寒天培地による水色の定型的集落およびハローの有無について検討したところ、二次増菌培養で確認できた剥皮機の上面カバー部、フォークリフトのアクセルペダル部で培地の黒色化と水色の定型的集落が確認できた。また、二次増菌培養で確認できなかった採集箇所のうち、ヘッドカッターのベルト部、フィレーマシンの出口下部カバー、ザルカゴの持ち手部（2 箇所）、原料作業台、井戸水タンクのホース部、たらこ室床面タイルのねじ部、原料処理場の床面、木製パレット、フォークリフトのタイヤホイール部の 10 カ所で黒色化を確認し、そのうち井戸水タンクのホース部を除く 9 カ所で水色の定型的集落を確認したが、発色が 48 時間後と遅く、二次増菌培養で陰性であることよりリスティア属菌とは推定しなかった。

図 1、2 に各バイオフィームの一般生菌数を、クロモアガーリスティア寒天培地によるコロニー観察結果と合わせて示した。これによると、採集したバイオフィームの一般生菌数は、たらこ室入り口戸の取手部で 10^3 cfu/g biofilm 台と低い値であったが、これを除く検体では 10^5 ~ 10^9 cfu/g biofilm に分布しており、このうち 8 月と 11 月を合わせた全体の約 77% となる 20 検体で 10^7 cfu/g biofilm 以上であった。なお、たらこ室入り口戸の取手部の一般生菌数が他と比べて顕著に低い値を示したが、これは採集した試料の大部分が鉄錆等であり、バイオフィームがほとんど含まれていなかったことによるものと推測した。

クロモアガーリスティア寒天培地によりリスティア属菌と推定したバイオフィームの一般生菌数は、 10^7 ~ 10^9 cfu/g biofilm に分布し、8 月の剥皮機の上面カバー部で 1.3×10^9 cfu/g biofilm と最も高い値を示した。また、8 月にリスティア属菌陽性と推定した剥皮機の上

面カバー部は11月では陰性で一般生菌数は 10^6 cfu/g biofilm 台であった。

なお、大腸菌は採集したすべてのバイオフィルムにおいて、陰性と推定された(表3, 4)。

(2) バイオフィルムの防除試験結果

バイオフィルムが付着しているザルカコ(持ち手部)を洗浄(ブラッシング)、スチーム処理、塩素浸漬、洗剤浸漬をそれぞれ行った時の拭き取りによる一般生菌数の変化を図3に、処理後のバイオフィルムの付着状況を写真1に示した。それぞれ単独処理では、一般生菌数はスチーム処理が洗浄前の 10^6 cfu/25cm²台から 10^4 cfu/25cm²台に減少した以外、他の処理は減少しなかった。また、バイオフィルムは洗浄(ブラッシング)処理で除去されるが、スチーム処理では一部残り、塩素浸漬、洗剤浸漬では除去できなかった。

そこで、洗浄(ブラッシング)処理を行いバイオフィルムを除去後に、スチーム処理、塩素浸漬、洗剤浸漬を行った時の拭き取りによる一般生菌数およびATP発光量の変化を図4, 5に示した。一般生菌数は、洗浄前が 10^7 cfu/25cm²台であったものが、洗浄後にスチーム処理、塩素浸漬、洗剤浸漬をすることにより、それぞれ 10^5 cfu/25cm²台、 10^5 cfu/25cm²台、 10^2 cfu/25cm²台に減少し、特に、洗浄後に洗剤浸漬を行うことにより一般生菌数の減少が著しかった。また、ATP発光量では、洗浄前に比べ、洗浄後に洗剤浸漬を行うことにより著しく減少した。

(3) Tween 80 添加効果試験結果

原料作業台(上面)及びフィレーマシンの出口部カバー部より各濃度のTween 80-生理的食塩水(滅菌済み)に浸漬した綿棒で拭き取り、適宜、同濃度のTween 80-生理的食塩水で希釈した時の一般生菌数を図6, 7に示した。原料作業台では0%, 0.1%に比べ0.25%, 0.5%でやや高い傾向を示したが、著しい差は認められなかった。また、フィレーマシンの出口部カバー部では、0%と0.1%では差は認められなかった。

各バイオフィルムに0%(無添加)および0.1%Tween 80-生理的食塩水(滅菌済み)を加え、乳剤を調整、希釈し、一般生菌数を比較した結果を図8に示した。各バイオフィルムとも無添加と0.1%添加では著しい差は認められなかった。

D. 考察

*L. monocytogenes*は比較的乾燥に強く、低温でも増殖することが知られている。近年、水産加工施設の塩タラコ製造過程において、ローラーコンベヤ、パレットおよび魚卵漬け込み容器外壁より当該菌を含むバイオフィルムが検出されており、非加熱で製造・喫食される水産加工品では、衛生管理の最適なモニタリング手法の確立が求められると同時に、その防除方法が大きな課題となっている。

今回の水産加工施設において、21箇所26検体(8月:20箇所, 11月:6箇所)より採集したバイオフィルムのうち、2箇所(3検体)のバイオフィルムからリステリア属菌を推定した。*L. monocytogenes*は検出しなかったが、工場内において属菌を検出したことから、原魚裁割工程における原卵への交叉汚染が容易に推測される。

当該施設で採集したバイオフィルムにリステリア属菌が陽性を示した理由の一つとして、当該施設が未舗装の道路に隣接しており、運搬作業や気象条件等により、土壌が施設内に持ち込まれやすい環境にあるためと考えられる。

バイオフィルムの防除方法の検討として、バイオフィルムが付着しているザルカコ(持ち手部)を用いて、洗浄(ブラッシング)、スチーム処理、塩素浸漬、洗剤浸漬を行った。塩素浸漬、洗剤浸漬では、単独の処理では一般生菌数の減少が認められなかったが、洗浄処理後に各浸漬処理を行うことにより減少し、特に、洗剤浸漬で著しかった。これは、洗浄処理によりバイオフィルムが除去されたことにより、各浸漬処理の除菌・殺菌が進行したものと考えられる。

洗浄後の処理では、スチーム処理、塩素処理は一般生菌数の減少に一定の効果を示したがATP発光量の減少は少なかった。また、スチーム処理により、バイオフィルムの表面が熱変性を生じ、剥離等が困難になる可能性があり、付着箇所の状況を判断して使用する必要がある。これに対して、洗剤浸漬は一般生菌数、ATP発光量とも著しく減少した。これらのことから、洗浄（ブラッシング）処理でバイオフィルムを除去後に洗剤浸漬を行うことにより、除菌・殺菌等の効果が顕著に認められた。

モニタリングの方法として、一般生菌数等の測定に、バイオフィルムを溶解させ、均一な乳剤を得るために、生理食塩水に0.1%のTween 80を添加している。今回、バイオフィルム生成箇所におけるふき取り及び各バイオフィルムのTween 80添加の有無による一般生菌数の比較を行った。ふき取りにおいては、0.25%、0.5%の高濃度で比較的高い傾向を示したが、0.1%では無添加に比べ差は認められなかった。また、各バイオフィルムにおいても差は認められなかった。今回使用したバイオフィルムは比較的ウェットなものであり、溶解しやすいものであったと考えられる。今後、難溶のバイオフィルムについても検討する必要がある。

E. 結論

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（採集箇所：20箇所、26検体）を採集し、バイオフィルムの一般生菌数とリステリア菌の有無について調査を行った。その結果、採集したバイオフィルムの一般生菌数は、たらこ室入り口戸の取手部の 10^3 cfu/g biofilm台を除き、 $10^5 \sim 10^9$ cfu/g biofilmに分布していた。このうち、剥皮機の上面カバー部など2箇所（3検体）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推定した。しかし、*L. monocytogenes*を含むものであると推定できるバイオフィルムは、確認でき

なかった。なお、細菌検査終了後の標準寒天培地およびクロモアガーリステリア寒天培地からの分離株については、DNA分析とリステリア属菌の同定を担当する帯広畜産大学畜産学部応用獣医学講座へ提供した。

バイオフィルムが付着しているザルカコ（持ち手部）を用いて、洗浄（ブラッシング）、スチーム処理、塩素浸漬、洗剤浸漬を行い、バイオフィルムの防除方法を検討した。その結果、従来行われている塩素浸漬および洗剤浸漬単独では除菌・殺菌効果が認められなかった。しかし、洗浄（ブラッシング）後に洗剤浸漬を行うことにより除菌・殺菌効果等の効果が顕著に認められた。

モニタリングの方法の検討として、バイオフィルムを溶解するために生理食塩水へのTween 80の添加効果を検討した。その結果、今回検討したバイオフィルムでは、無添加と0.1%添加において一般生菌数の差は認められなかった。

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

表1 各バイオフィルムの採集箇所の採集箇所と細菌検査に供した重量
(8月)

| No. | 採 集 箇 所 | 一般細菌数等測定用 バイオフィルム重量 (g) | リステリア測定用 バイオフィルム重量 (g) |
|-----|------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 1 | ヘッドカッター ベルト部 | 0.0222 | 0.0481 |
| 2 | フイレーマシン1 出口下部カバー | 0.1132 | 0.0634 |
| 3 | フイレーマシン2 上面カバー | 0.0442 | 0.0140 |
| 4 | ザルカゴ1 底部 | 0.0083 | 0.0091 |
| 5 | ザルカゴ2 持ち手部 | 0.0242 | 0.0308 |
| 6 | ザルカゴ3 持ち手部 | 0.0427 | 0.0569 |
| 7 | 原料作業台 上面 | 0.1288 | 0.1395 |
| 8 | 井戸水タンク ホース部 | 0.0057 | 0.0056 |
| 9 | 床面1 たらこ室タイル ねじ部 | 0.0788 | 0.0481 |
| 10 | 床面2 原料処理場 | 0.0364 | 0.0659 |
| 11 | 原料処理場 排水溝カバー みぞ部 | 0.0726 | 0.0500 |
| 12 | 魚箱 持ち手部 | 0.0085 | 0.0099 |
| 13 | 木製パレット 側面部 | 0.0199 | 0.0143 |
| 14 | 剥皮機 上面カバー部 | 0.0122 | 0.0150 |
| 15 | たらこ室水切り台 側面部 | 0.0044 | 0.0062 |
| 16 | たらこ室電子秤荷台 上面 | 0.0638 | 0.0258 |
| 17 | たらこ処理テーブル 上面 | 0.0365 | 0.0173 |
| 18 | たらこ室入り口戸 取手部 | 0.0338 | 0.0181 |
| 19 | フォークリフト タイヤホイール部 | 0.0542 | 0.0239 |
| 20 | フォークリフト アクセルペダル部 | 0.0532 | 0.1033 |

表2 バイオフィルムの採集箇所と細菌検査に供した重量
(11月)

| No. | 採 集 箇 所 | 一般細菌数等測定用 バイオフィルム重量 (g) | リステリア測定用 バイオフィルム重量 (g) |
|-----|------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 2 | フレイマジン1 出口下部カバ一部 | 0.1834 | 0.1029 |
| 5 | ザルカゴ2 持ち手部 | 0.0642 | 0.0409 |
| 7 | 原料作業台 上面 | 0.1369 | 0.0615 |
| 14 | 剥皮機 上面カバ一部 | 0.0770 | 0.0366 |
| 20 | フォークリフト アクセルペダル部 | 0.1720 | 0.2577 |
| 21 | 木製パレット 上面部 | 0.0449 | 0.0187 |

表3 各バイオフィルムにおけるリステリア属菌と大腸菌の検出結果
(8月)

| No. | 採集箇所 | リステリア一次増菌培養 | | | | リステリア二次増菌培養 | | | | 大腸菌 |
|-----|------------------|-------------|-------------|-----------------|-------|-------------|-------------|-----------------|-------------------------------|-----|
| | | 一次増菌培地 | | クロモアガーリステリア寒天培地 | | 二次増菌培地 | | クロモアガーリステリア寒天培地 | | |
| | | 変色 | 水色集落 24H | 水色集落 48H | ハロー形成 | 変色 | 水色集落 24H | 水色集落 48H | ハロー形成 | |
| 1 | ヘッドカッター ベルト部 | + | - | + | - | - | - | - | 10 ³ 以下 (cfu/g) | |
| 2 | フレイマシ1 出口下部カバー | + | - | + | - | - | - | - | 陰性 | |
| 3 | フレイマシ2 上面カバー | - | - | - | - | - | - | - | 陰性 | |
| 4 | ザルカゴ1 底部 | - | - | - | - | - | - | - | 陰性 | |
| 5 | ザルカゴ2 持ち手部 | + | - | + | - | - | - | - | 陰性 | |
| 6 | ザルカゴ3 持ち手部 | + | - | + | - | - | - | - | 陰性 | |
| 7 | 原料作業台 上面 | + | - | + | - | - | - | - | 陰性 | |
| 8 | 井戸水タンク ホース部 | + | - | - | - | - | - | - | 陰性 | |
| 9 | 床面1 たらこ室タイル ねじ部 | + | - | + | - | - | - | - | 陰性 | |
| 10 | 床面2 原料処理場 | + | - | + | - | - | - | - | 陰性 | |
| 11 | 原料処理場 排水溝カバー みぞ部 | - | - | - | - | - | - | - | 陰性 | |
| 12 | 魚箱 持ち手部 | - | - | - | - | - | - | - | 陰性 | |
| 13 | 木製パレット 側面部 | + | - | + | - | - | - | - | 陰性 | |
| 14 | 剥皮機 上面カバー部 | + | + | + | - | - | - | + | 陰性 | |
| 15 | たらこ室水切り台 側面部 | - | - | - | - | - | - | - | 陰性 | |
| 16 | たらこ室電子秤荷台 上面 | - | - | - | - | - | - | - | 陰性 | |
| 17 | たらこ処理テーブル 上面 | - | - | - | - | - | - | - | 陰性 | |
| 18 | たらこ室入り口戸 取手部 | - | - | - | - | - | - | - | 陰性 | |
| 19 | フォークリフト タイヤホイール部 | + | - | + | - | - | - | - | 陰性 | |
| 20 | フォークリフト アクセルペダル部 | + | + | + | - | - | - | + | 陰性 | |

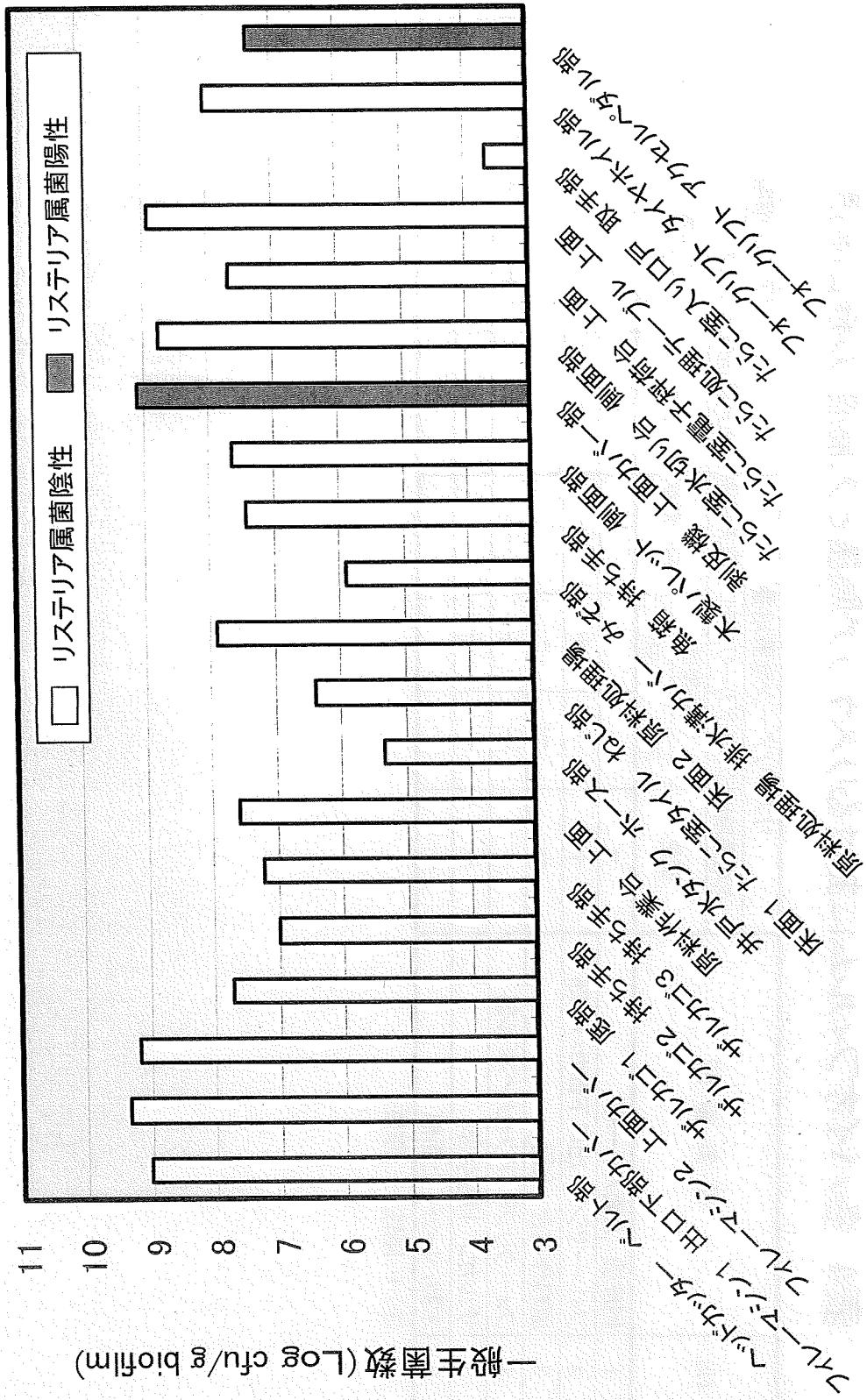
注) +:陽性、 -:陰性

表4 各バイオフィルムにおけるリステリア属菌と大腸菌の検出結果

(11月)

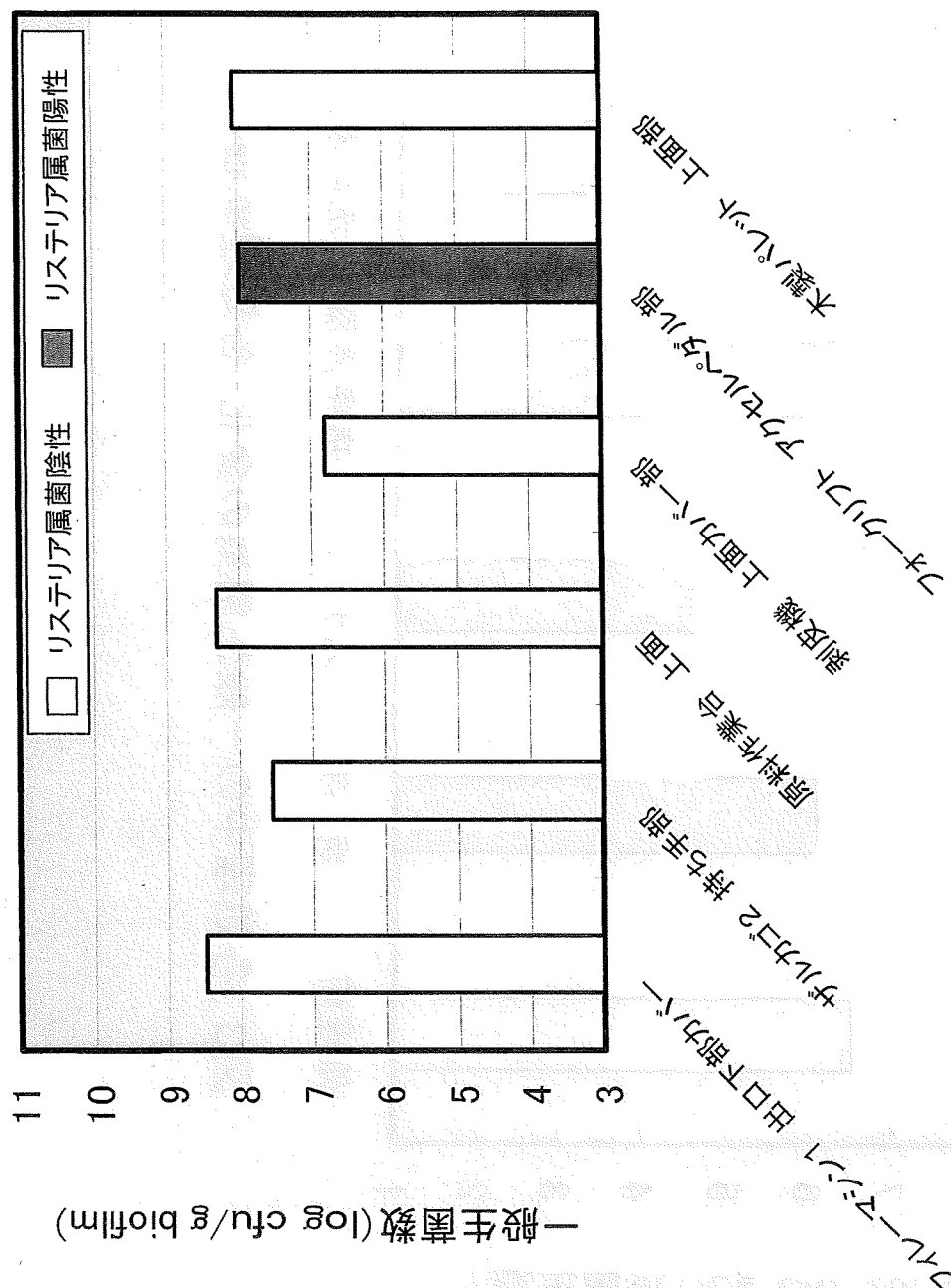
| No. | 採集箇所 | リステリア一次増菌培養 | | | | リステリア二次増菌培養 | | | | 大腸菌 |
|-----|------------------|-------------|-------|-----------------|-------|-------------|-------|-----------------|-------|-------------------------------|
| | | 一次増菌培地 | | クロモアガーリステリア寒天培地 | | 二次増菌培地 | | クロモアガーリステリア寒天培地 | | |
| | | 変色 | ハロ一形成 | 変色 | ハロ一形成 | 変色 | ハロ一形成 | 変色 | ハロ一形成 | |
| 1 | 剥皮機 上面カバー部 | - | - | - | - | - | - | - | - | 10 ³ 以下 (cfu/g) |
| 2 | フレーマシン 出口下部カバー部 | + | + | - | - | - | - | - | - | 陰性 |
| 3 | 原料作業台 上面 | + | - | - | - | - | - | - | - | 陰性 |
| 4 | フォークリフト アクセルペダル部 | + | + | + | - | + | + | + | + | 陰性 |
| 5 | ザルカゴ 持ち手部 | + | - | - | - | - | - | - | - | 陰性 |
| 6 | 木製パレット 上面部 | - | - | - | - | - | - | - | - | 陰性 |

注) +:陽性、 -:陰性



バイオフィルム採集箇所

図1 水産加工施設で採集したバイオフィルムの一般生菌数とリステリア属菌 (8月)



バイオフィルム採集箇所

図2 水産加工施設で採集したバイオフィルムの一般生菌数とリステリア属菌 (11月)

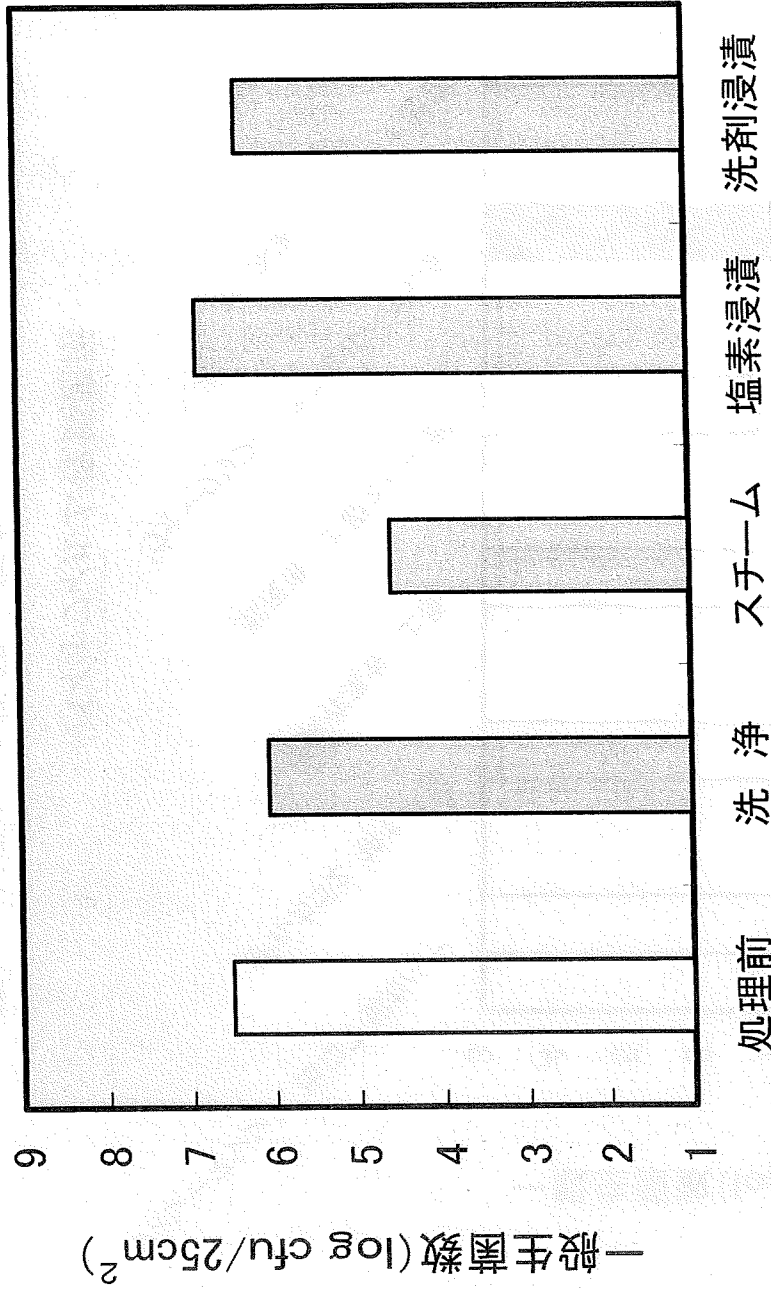
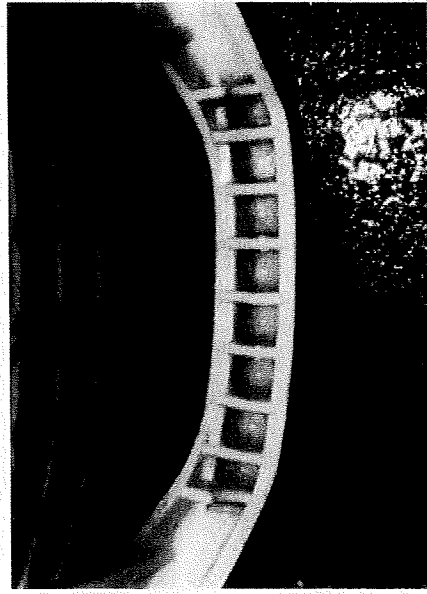
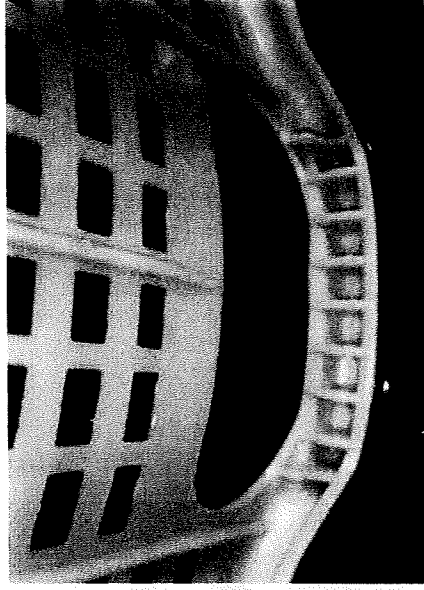


図3 各処理中の一般細菌数の変化(各処理単独)



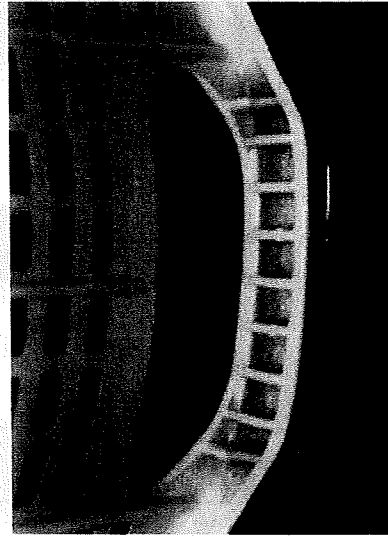
処理前



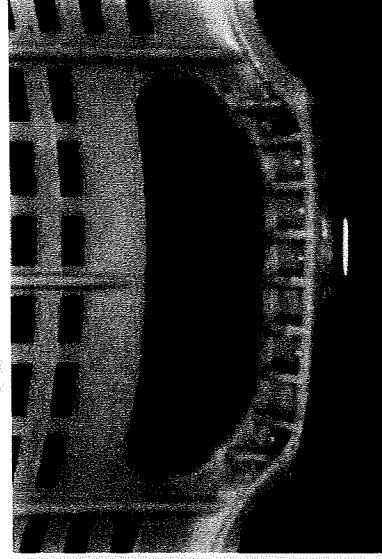
洗浄(ブラッシング)後



スチーム



塩素浸漬



洗剤浸漬

写真1 ザルカゴ(手持ち部)の各処理後のバイオフィーム
付着状況(各処理単独)

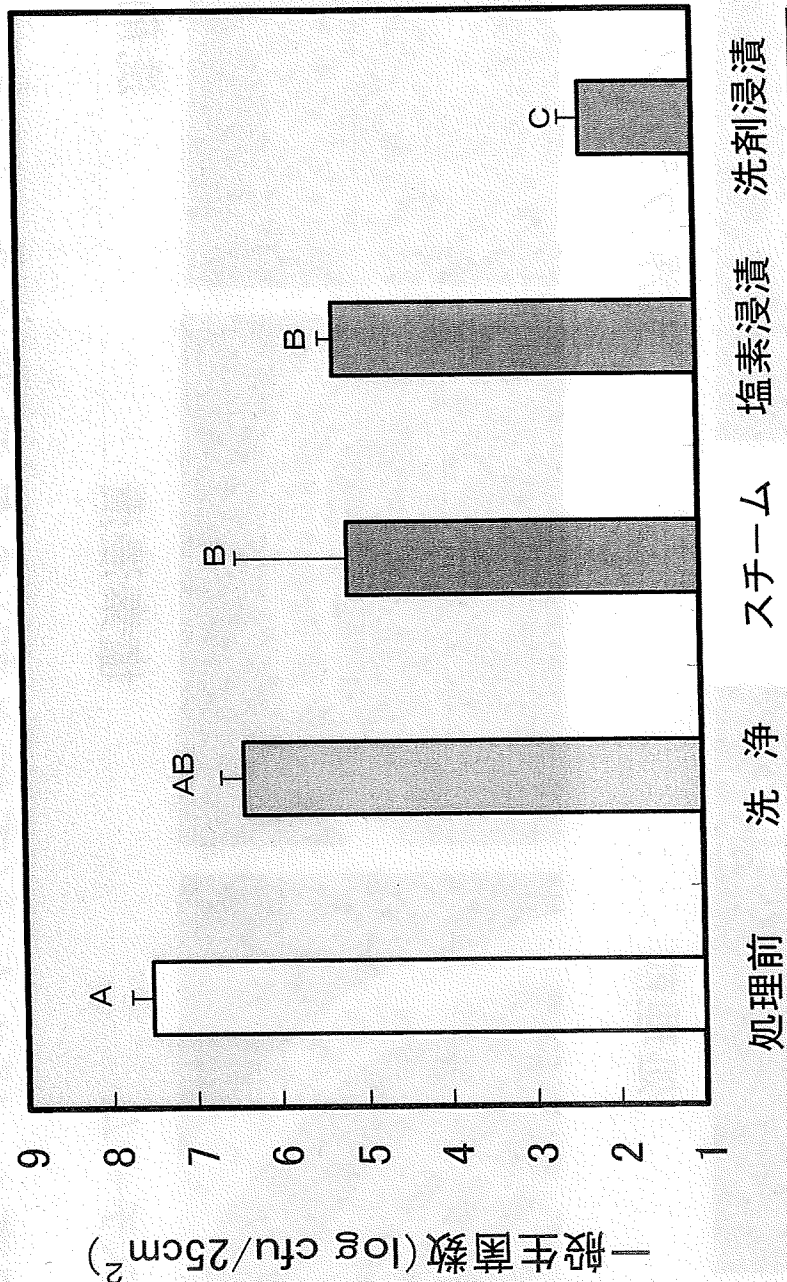


図4 各処理中の一般細菌数の変化

* 異なるアルファベットは有意差有り(有意水準5%)

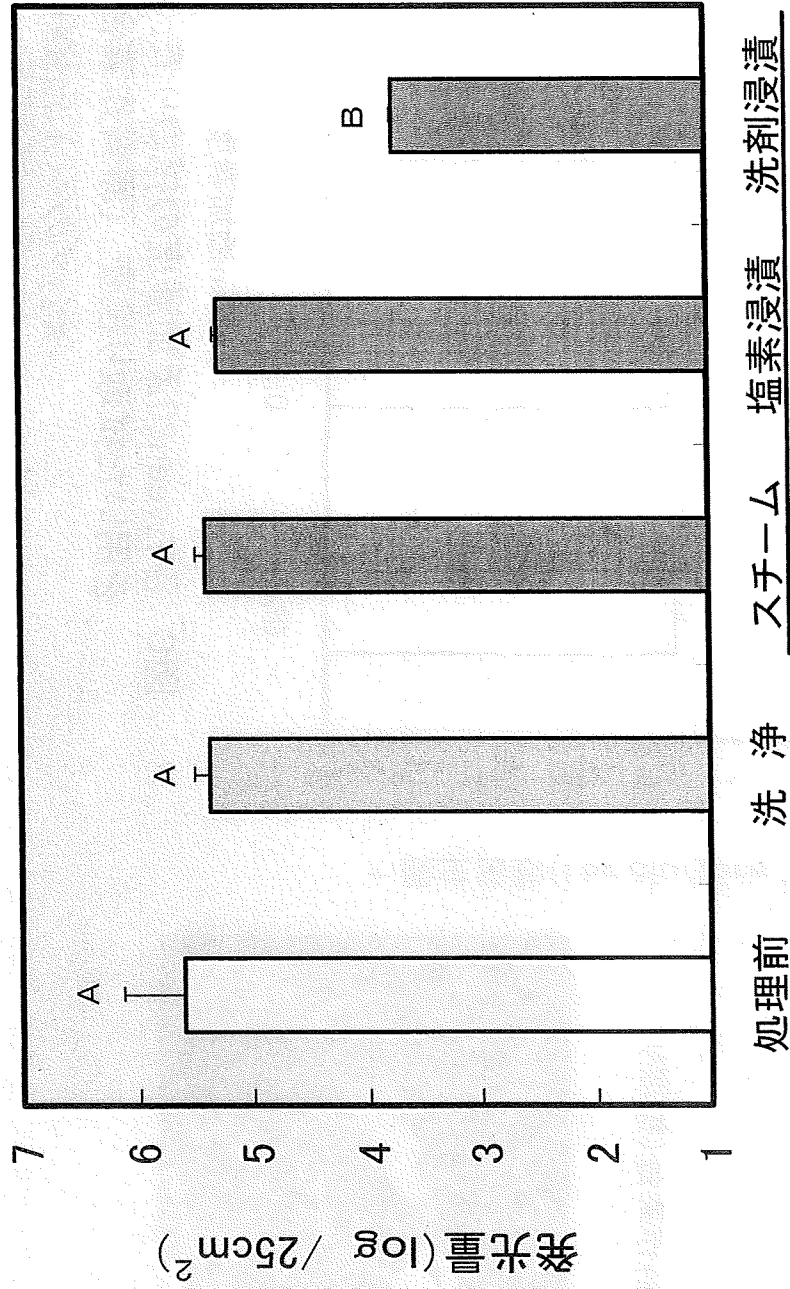


図5 各処理中のATP発光量の変化

* 異なるアルファベットは有意差有り(有意水準5%)

原料作業台(拭取り)

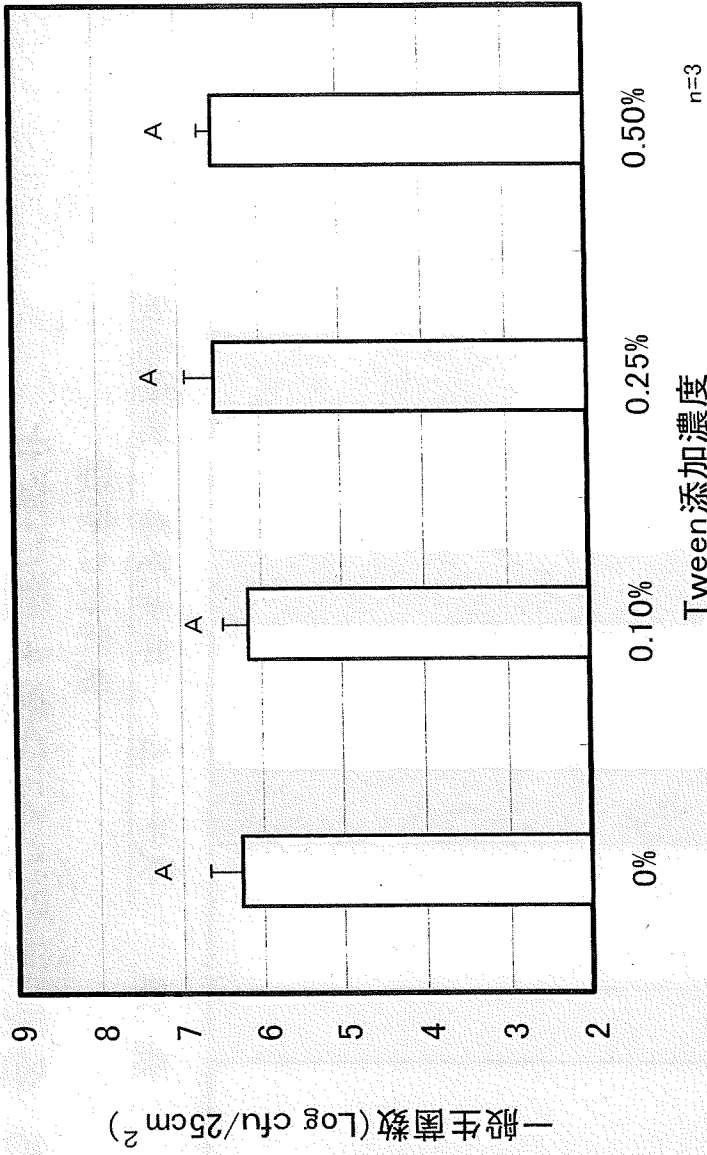
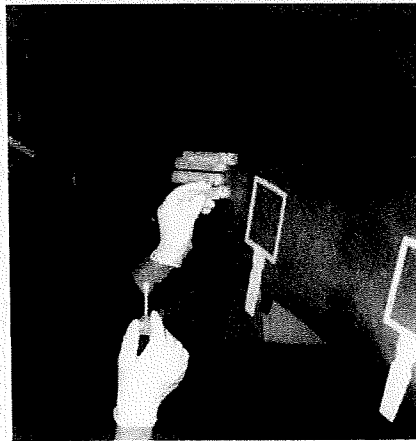


図6 各Tween80添加濃度の拭取り液、希釈液を用いた拭取り検査 (原料作業台)

* 異なるアルファベットは有意差有り(有意水準5%)
(tukey法による多重検定)

フイレーマシンの拭取り

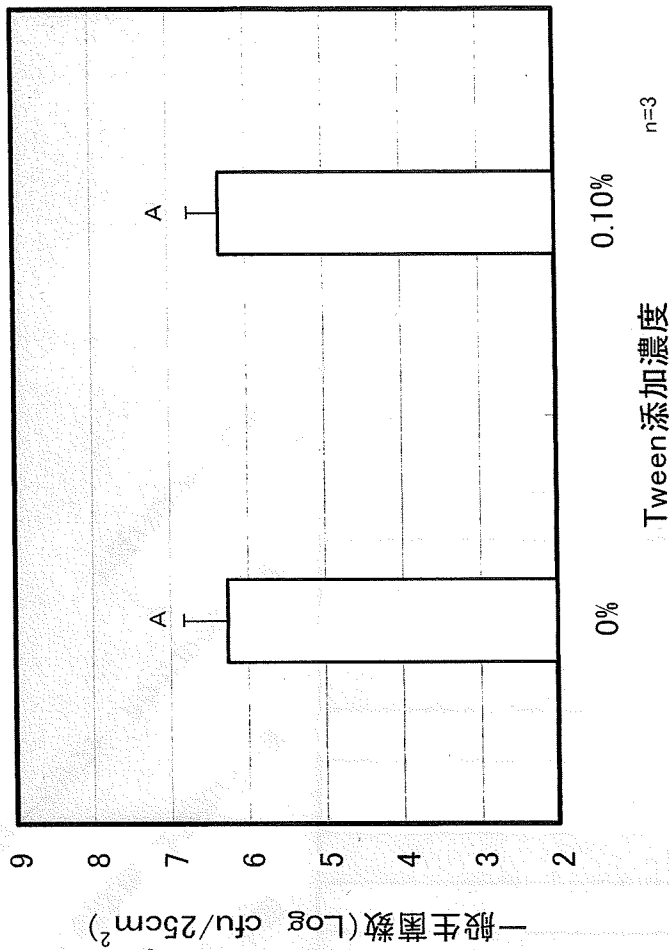
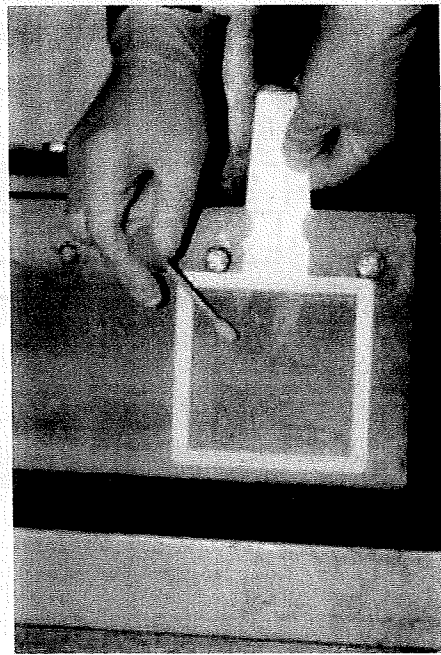
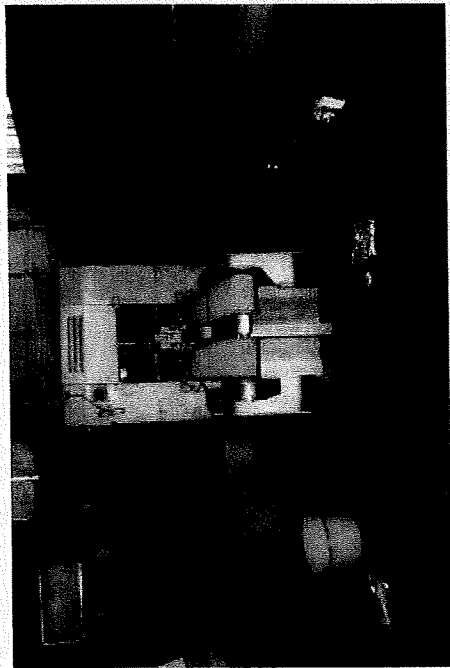


図7 各Tween80添加濃度の拭取り液、希釈液を用いた拭取り検査 (フイレーマシ)

* 異なるアルファベットは有意差有り(有意水準5%)
(tukey法による多重検定)