

令和元年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
小規模事業者等における HACCP 導入支援に関する研究
分担研究報告書

低温保存のチーズ中のリステリアの菌数の変動に関与する要因に関する研究

研究分担者 五十君 静信 東京農業大学 教授

研究要旨

海外におけるリステリア症は乳・乳製品を原因食品とする事例が多く、その中でも特に熟成後、加熱処理を行わずに喫食されるナチュラルチーズが原因食品となる割合が高い。日本では、発酵乳製品の製造、加工において、加熱殺菌乳が使用されているが、フランスなどヨーロッパで伝統的に造られているナチュラルチーズには *Listeria monocytogenes* (LM) に汚染されている可能性がある未加熱乳を原料としているものがある。一方、2001 年の北海道の事例では、殺菌乳を用いていたが、熟成中に環境から汚染を受けたため、チーズ中で LM が増殖し、食中毒事例に結びついている。

チーズは乳酸菌を利用した代表的な食品の一つである。乳酸菌はチーズ中に占有することや有機酸等の物質を産生することなどにより、食品中の雑菌の増殖を抑制していることが知られている。中でも、一部の乳酸菌が産生するバクテリオシンという抗菌活性物質は近年注目されており、*Lactococcus lactis* の一部の菌株が産生するナイシン A は食品添加物として日本を含む世界 50 カ国以上で利用されている。これらの働きがあるにもかかわらず、チーズ熟成中や低温保存中に低温増殖性のあるリステリアが増殖し、実際には前述したように、ナチュラルチーズを原因食品とする多くの集団食中毒事例に結びついている。

そこで、本研究では低温保管中のチーズにおける本菌の消長を明らかにすることにし、低温増殖性を有する LM のナチュラルチーズでの制御に有用な情報を得ることを目指した。市販されている様々な種類のナチュラルチーズについて低温保存中の LM の生残曲線を明らかにし、生残・増殖に及ぼす影響や各チーズの特性などを評価した。

青カビタイプのチーズでは、LM の菌数が低下する傾向、セミハードタイプのチーズでは、静菌的に推移し菌数は維持される傾向、ソフトタイプのカマンベールチーズでは、保存中に明らかな増殖が認められる傾向があることが示された。ソフトタイプチーズでは、ヒトでの発症菌数に到達すると思われる明らかな増殖が認められた。これらの傾向の違いは、チーズの水分活性、pH、共存する乳酸菌や真菌などの微生物の影響が関わっていることが示された。

研究協力者

横田 健治 東京農業大学
梶川 揚申 東京農業大学
千葉 寛之 東京農業大学
江面 早季子 東京農業大学
川本 柊志郎 東京農業大学
五十嵐 史佳 東京農業大学

ているが、フランスなどヨーロッパで伝統的に造られているナチュラルチーズには LM に汚染されている可能性がある未加熱乳を原料としているものがある。また、2001 年の北海道の事例のように、チーズ熟成中に製造環境から汚染した LM が熟成・保管中に増殖したことによる集団事例も報告されている。

チーズは乳酸菌を利用した代表的な食品の一つである。乳酸菌などの微生物はチーズ中に占有することや有機酸等の物質を産生することなどにより、食品中の雑菌の増殖を抑制していることが知られている。中でも、一部の乳酸菌が産生するバクテリオシンという抗菌活性物質は近年注目されており、*Lactococcus lactis* の一部の菌株が産生するナイシン A は食品添加物として日本を

A. 研究目的

海外におけるリステリア症は乳・乳製品を原因食品とする事例が多く、その中でも特に熟成後、加熱処理を行わずに喫食されるナチュラルチーズ、とりわけソフトタイプのナチュラルチーズが原因食品となる割合が高い。日本では、発酵乳製品の製造、加工において、加熱殺菌乳が使用され

含む世界 50 カ国以上で利用されている。これらの働きがあるにもかかわらず、前述したように、実際にはナチュラルチーズを原因食品とする多くの集団食中毒事例が報告されている。

そこで、市販されている様々な種類のナチュラルチーズが LM の汚染を受けた場合、低温保存中に LM の増殖に及ぼす影響や各チーズの特性などを評価することで、チーズ中の本菌の制御に有用な知見が得られるものと思われる。本研究では、ナチュラルチーズを対象食品として、冷蔵保管中のチーズ中の LM の消長に着目して、LM の増殖に影響を及ぼす因子を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

ナチュラルチーズの分類は図 1 に示した。今回の実験ではセミハードタイプ、ソフトタイプ（白カビタイプ、カマンベール）、青カビタイプ 2 製品の 3 つのタイプのチーズの 4 製品について検討を行った（図 2）。

チーズ中における LM の挙動を調べるため、市販のチーズに 2 菌株の LM を接種し、4℃・10℃で 40 日間観察を行った。供試菌株として *L. monocytogenes* ScottA, 4456 株の 2 菌株を使用した（図 2）。リステリアの菌数は、CHROMagar™ *Listeria* 培地を用いて、CFU を経日的に測定し生育曲線を作成した。また、チーズの水分活性、pH、リステリア塗抹寒天平板上の阻止円を測定し、ナisin換算の抗菌活性を記録した。

検討を行ったチーズの菌叢を調べるため、乳酸菌、真菌などの分離を行った。ストマッカー袋にチーズと PBS(-)を加えて乳液にし、MRS 寒天培地、M17 寒天培地、ローズベンガル添加 MRS 寒天培地、GYP 培地、ポテトデキストロス寒天培地（PDA）などを用いて培養し、微生物を分離した。その後、細菌については生化学的性状と 16S rRNA 解析、真菌については形態学的な観察と性状などを基に菌種同定を行った。

チーズの LM に対する抗菌活性は、LM を混釈した BHI 寒天培地にコルクポラーで穴を開け、LM 混釈穿孔培地を作成した。作成した LM 混釈穿孔培地に各チーズ断片、各チーズから分離した乳酸菌の培養液、及び培養上清を添加し、一晚培養後、阻止円の大きさを計測した。代表的なバクテリオシンであるナisinが持つ LM 増殖抑制効果を指標として乳酸菌の増殖抑制効果を評価した。

水分活性は、日本生活協同組合連合商品検査センターの協力により測定した。pH は、半固形

食品用 pH メーターにより各チーズの pH を測定した。

C. 研究結果

3 種類のタイプのチーズは、それぞれのタイプ毎、リステリアの増殖曲線の傾向が異なっていた。

青カビタイプでは接種時と比べ低温保管中の菌数は減少する傾向がみられた。ダナブルーとゴルゴンゾーラでは、製品の違いにより減数の割合は異なっていたものの、両者とも保存中にリステリアの菌数は低下した。図 3 に、ダナブルーの LM 接種後の生育曲線を示した。4℃と 10℃では、10℃保管の方が菌数の低下速度が速いことが観察された。初発菌数 10^6 個で、30~40 日後には検出限界値に近い菌数レベルまで低下した（図 3）。

セミハードタイプでは菌数が維持される傾向が見られた（図 4）。所謂静菌的に作用しているものと思われる。4℃、10℃保管とも同様な傾向で、初発菌数 10^4 個で、30~40 日後には、0.5log 程度の緩やかな減数が観察された（図 4）。

一方、ソフトタイプのカマンベールでは顕著な菌数の増加が観察された（図 5）。 10^4 個の初発菌数の接種で、4℃で 10 日後に 10^6 個、10℃で 10 日後に 10^7 個を記録し、既に発症菌数に相当する菌数レベルまで増殖した。この増殖は以前行った標準的な培地における増殖のデータに匹敵するほど明確な増殖である。4℃での増殖がやや遅いとはいえ、20 日~30 日の保存で菌数はこれ以上増殖しない約 10^8 個レベルに達している。

LM 混釈穿孔培地に一定量のナisinを添加して阻止円の直径を測定し、ナisin換算の抗菌活性の測定を行った。検量線を図 6 に示した。チーズ断片の抗菌活性を評価したところ、ゴルゴンゾーラで、明らかな阻止円が観察されたが、ゴダ、カマンベールでは活性が確認できなかった（図 6）。それぞれのチーズから分離された乳酸菌の培養液を評価したところ、分離された全ての株が活性を示すわけではなく、一部の株のみに抗菌活性が観察された。活性の認められた株について図 6 に示した。ゴルゴンゾーラでは非常に高い活性が、ゴダ分離株では、中等度の活性、カマンベール分離株では弱い活性が観察された。

D. 考察

ナチュラルチーズは、図 1 に示されるように山羊乳を原料とするセーブルを加えると、6 タイプに分けられる。今回はこの中からセミハー

ド、白カビ（ソフトタイプ）、青カビの3タイプについて LM 接種による低温下での菌数の消長を観察した。

3つのタイプのチーズは、それぞれ異なった LM 菌数の消長を示した。青カビタイプ（ダナブルー、ゴルゴンゾーラ）では菌数が低下した。セミハードタイプ（ゴータ）では菌数が維持されているが長期の保存でゆっくりと菌数の低下傾向が見られた。一方、白カビタイプ（カマンベール）では、顕著な増殖が認められた。この傾向の違いは何によるものかを評価するために、それぞれの水分活性と pH の結果をまとめたのが図7である。増殖可能域や至適値に関しては、食品安全委員会がまとめた食品中のリステリア・モノサイトゲネスに係る評価書より値を引用した。

カマンベールとゴータは、水分活性、pH 共に LM の増殖可能域に入っており、カマンベールの pH は、ほぼ至適値であった。青カビタイプでは、pH に関してゴルゴンゾーラでは至適値に近い 6.56 を示したのに対し、ダナブルーでは 5.18 と増殖可能域の下限値に近い値を示した。水分活性のデータは、ゴルゴンゾーラでは測定しなかったため不明であるが、ダナブルーは、生育限界の 0.92 以下の 0.91 であったことから、LM は増殖できないものと思われる。

以上に加えて抗菌活性のデータを加えまとめたのが、図8である。白カビタイプは、水分活性、pH 共に LM の増殖抑制に働かず、分離された乳酸菌の抗菌活性（バクテリオシン）もチーズからは確認できなかった。チーズから分離された乳酸菌の一部からバクテリオシン産生株が得られたもののその活性は低かった。チーズ中ではおそらく産生されていないと思われる。これにより、白カビタイプのカマンベールでは、培地での増殖と同様なレベルの LM の増殖が観察されたものと思われる。

セミハードタイプのゴータでは、水分活性、pH 共に LM の増殖可能域に入っているものの、至適値からは離れており、限界値に近い。分離した一部の乳酸菌の抗菌活性がやや高いことも影響している可能性もある。今回チーズを直接評価しても抗菌活性は確認できなかったが、分離された乳酸菌には、バクテリオシンと思われる抗菌物質を産生する能力はあることからこの活性が機能する可能性は否定できない。これらが相加的に作用して、LM に対し静菌的となっている可能性があると思われる。

青カビタイプのダナブルーは、水分活性が LM の下限値を下回っておりこれだけで LM の増殖はできないものと思われる。pH も 5.18 とかなり低く、分離された乳酸菌の一部には、抗菌活性の高いバクテリオシン産生株が認められた。チーズを直接評価しても LM に対する抗菌活性が認められたことから、菌数の低下が起きているものと思われる。真菌（カビ）についてはまだ評価していないが、青カビタイプチーズの抗菌活性は青カビの産生する抗生物質の可能性もあると思われる。

E. 結論

3つのタイプのチーズについて、低温保存中の LM の消長を評価したところ、青カビタイプでは LM が減数する事が示された。また、セミハードでは LM は静菌的に、ソフトタイプのカマンベールでは、容易に増殖することが示された。これらの違いは、チーズのタイプにより pH、水分活性、抗菌物質の産生などが異なっており、これらが相加的に作用して LM の増殖性の違いに影響しているものと思われる。低温下で LM が増殖しやすい特性のソフトタイプのカマンベールでは、LM に汚染された場合リスクが特に高いと思われるので、その衛生管理に特に注意する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- ① 千葉 寛之, 榊田 和彌, 布藤 聡, 中曾 譲, 高崎 一人, 梶川 揚申, 横田健治, 五十君 静信. *L. monocytogenes* のヒト腸管上皮細胞への接着・侵入の評価。第93回日本細菌学会総会。令和2年2月。ウインクあいち
- ② 千葉寛之、梶川揚申、横田健治、五十君静信。 *Listeria monocytogenes* の腸管上皮細胞への腸管上皮細胞への接着・侵入に関わるイン ターナリン A の評価。第40回日本食品微生物学会学術総会。令和元年 11月。タワーホール船堀

3. 講演会等での情報発信

- ① 五十君静信。食品衛生法改正に伴う HACCP 制度化の動きとその対応。2019. 5. 23、高齢者住宅新聞社食品衛生法改正対策セミナー。大阪ガス ハグミュージアム
 - ② 五十君静信。HACCP 制度化の概要。2019. 6. 26、日本生活協同組合連合会・店舗 HACCP 学習会、日本生協連検査センター
 - ③ 五十君静信。食品衛生法改正に伴うリスクマネジメントにおける課題。2019. 6. 27、2019 年度コープデリ品質保証研修会、埼玉会館
 - ④ 五十君静信。食品衛生法改正における国際整合性の重要性。2019. 6. 29、茨城大学農学部フードイノベーション棟竣工記念講演会、茨城大学農学部
 - ⑤ 五十君静信。HACCP 制度化における微生物試験法の選択の考え方。2019. 7. 3、AFI テクノロジー食の安全安心技術情報セミナー、大阪ホテル阪急インターナショナル
 - ⑥ 五十君静信。食品衛生法改正に伴う HACCP 制度化の動きとその対応。2019. 7. 6、第 14 回雪の市民会議 in 東京農業大学、東京農大横井講堂
 - ⑦ 五十君静信。食品のリスクマネジメントにおける課題～消費者意識との乖離やサステナビリティ～について。2019. 10. 27、NPO 食の安全と安心を科学する会、食のリスクコミュニケーション・フォーラム 2019、東京大学農学部フードサイエンス棟
 - ⑧ 五十君静信。HACCP 制度化における微生物試験法の選択の考え方。2019. 8. 2、AFI テクノロジー食の安全安心技術情報セミナー、フクラシア品川
 - ⑨ 五十君静信。食品衛生管理の国際標準化はなぜ必要か。2019. 9. 17、感染予防協会セミナー、グランフロント大阪
 - ⑩ 五十君静信。微生物試験法における妥当性確認と試験法を選択する上での考え方。2019. 10. 4、スリーエムジャパンセミナー大阪、トラストシティカンファレンス新大阪
 - ⑪ 五十君静信。微生物試験法における妥当性確認と試験法を選択する上での考え方。2019. 10. 11、スリーエムジャパンセミナー東京、フクラシア丸の内オアゾ
 - ⑫ 微生物試験法における妥当性確認と試験法を選択する上での考え方。2019. 11. 25、スリーエムジャパンセミナー名古屋、名古屋ゲートタワー
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- 1. 特許取得 なし
 - 2. 実用新案登録 なし
 - 3. その他

牛乳(水牛乳・羊)

山羊乳

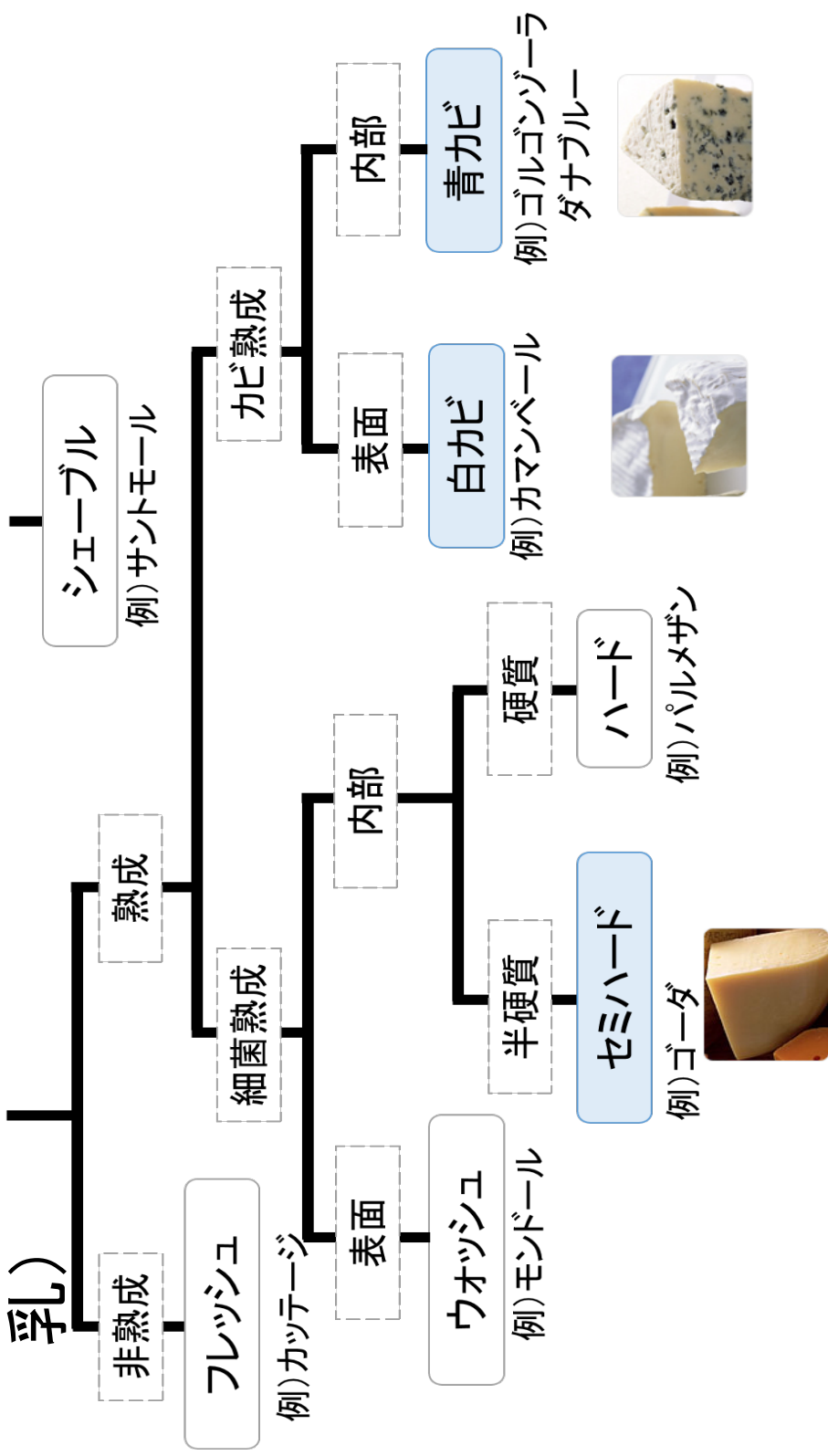


図1. ナチュラルチーズの分類

<使用チーズ>

青カビタイプ



ダナブルー



ゴルゴンゾーラ

セミハードタイプ



ゴーダ

白カビタイプ



カマンベール

<供試菌株>

菌名	株	血清型	分離源
<i>L. monocytogenes</i>	ScottA	4b	臨床
<i>L. monocytogenes</i>	4456	1/2a	臨床

図2. 実験に使用したナチュラルチーズとLM菌株

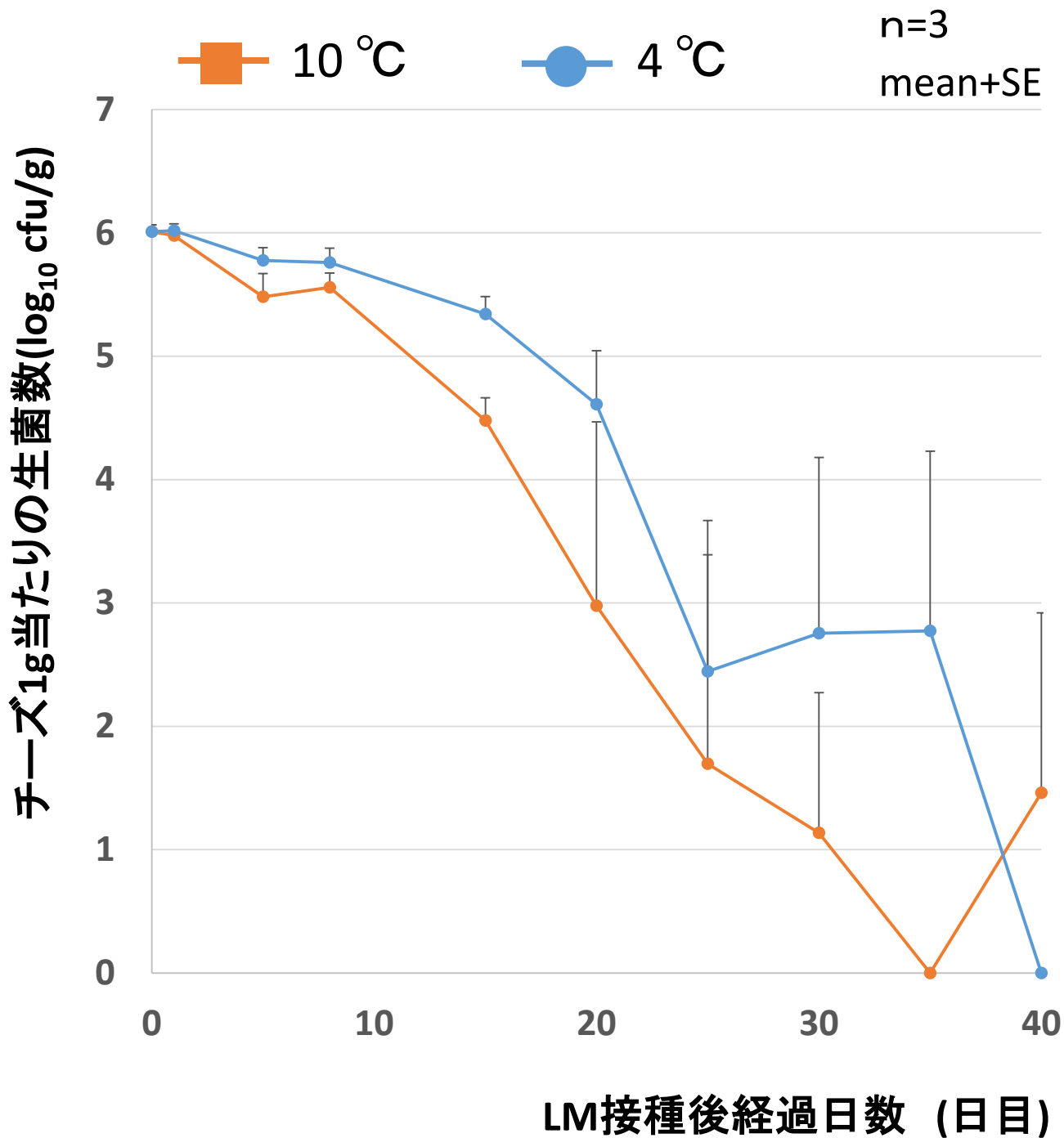


図3. 青カビタイプ(ダナブルー)LM接種後生育曲線

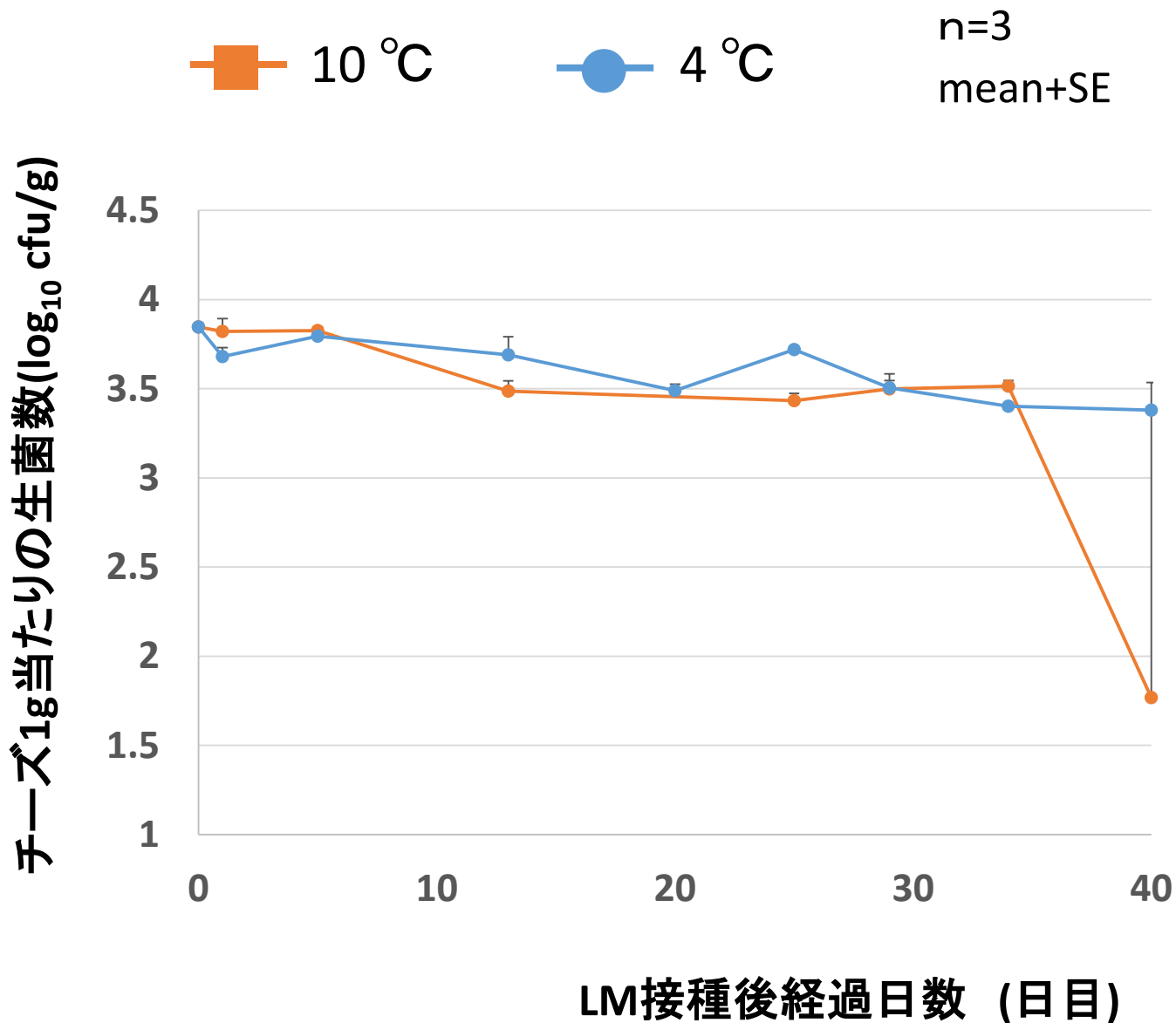


図4. セミハードタイプ(ゴーダ)LM接種後生育曲線

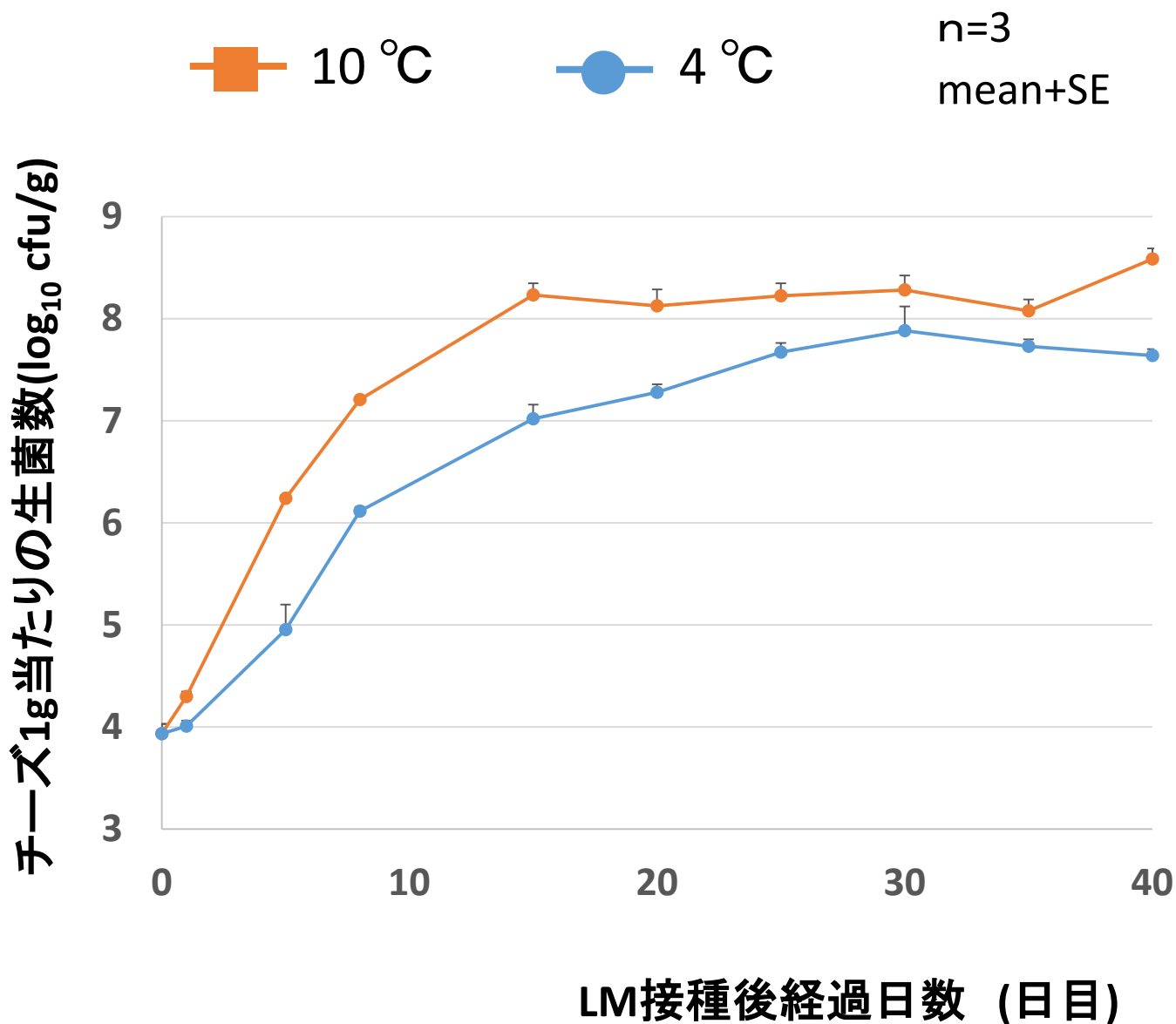
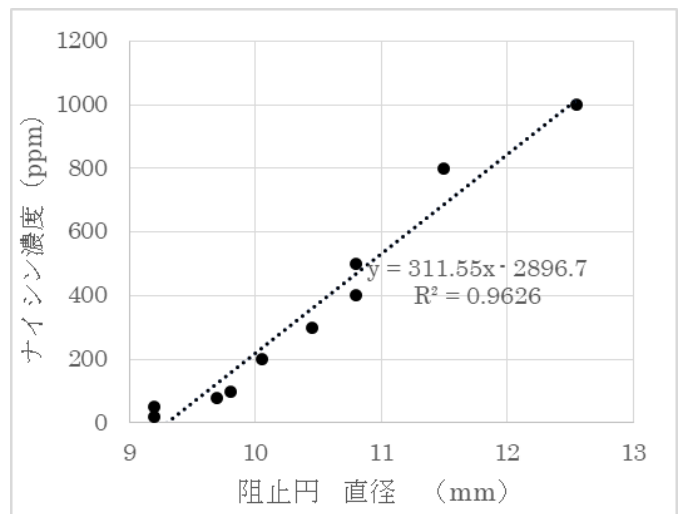
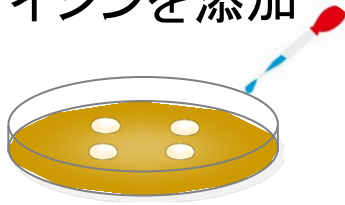


図5. ソフトタイプ(カマンベール)LM接種後生育曲線

LM混釈穿孔培地に
ナイシンを添加



ナイシン換算時バクテリオシン量推定の為の検量線

チーズ	菌株名	培養上清(ppm)
ゴルゴンゾーラ	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>torerans</i>	1000以上
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	748.4
	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	1000以上
ゴード	<i>Lactobacillus curvatus</i>	655
カマンベール	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	218.8
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	421.3

ゴルゴンゾーラ



ゴード



カマンベール



図6. LMの増殖抑制効果の評価

分離菌株の上清およびチーズ断片について
ナイシンを指標として換算し、活性値を評価

<水分活性>

(食品中のリステリア・モノサイトゲネスに係る評価書より 食品安全委員会)

LMの増殖可能域

← 0.96 カマンベール
← 0.95 ゴーダ

LMの生育限界水分活性 **0.92**

← **0.91** ダナブルー (青カビタイプ)

乳酸菌の生育限界水分活性 **0.90**

低い水分活性であることがLMの増殖抑制に関与している

微生物の生育不能域 **0.50**

(水分活性測定協力: 日本生活共同組合連合商品検査センター微生物検査グループ)

<pH>

11

10

LMの増殖可能域

8

7

至適

← 7.06 カマンベール
← 6.56 ゴルゴンゾーラ

6

← 5.37 ゴーダ
← 5.18 ダナブルー

4

図7. 各種チーズの水分活性とpHに関する考察

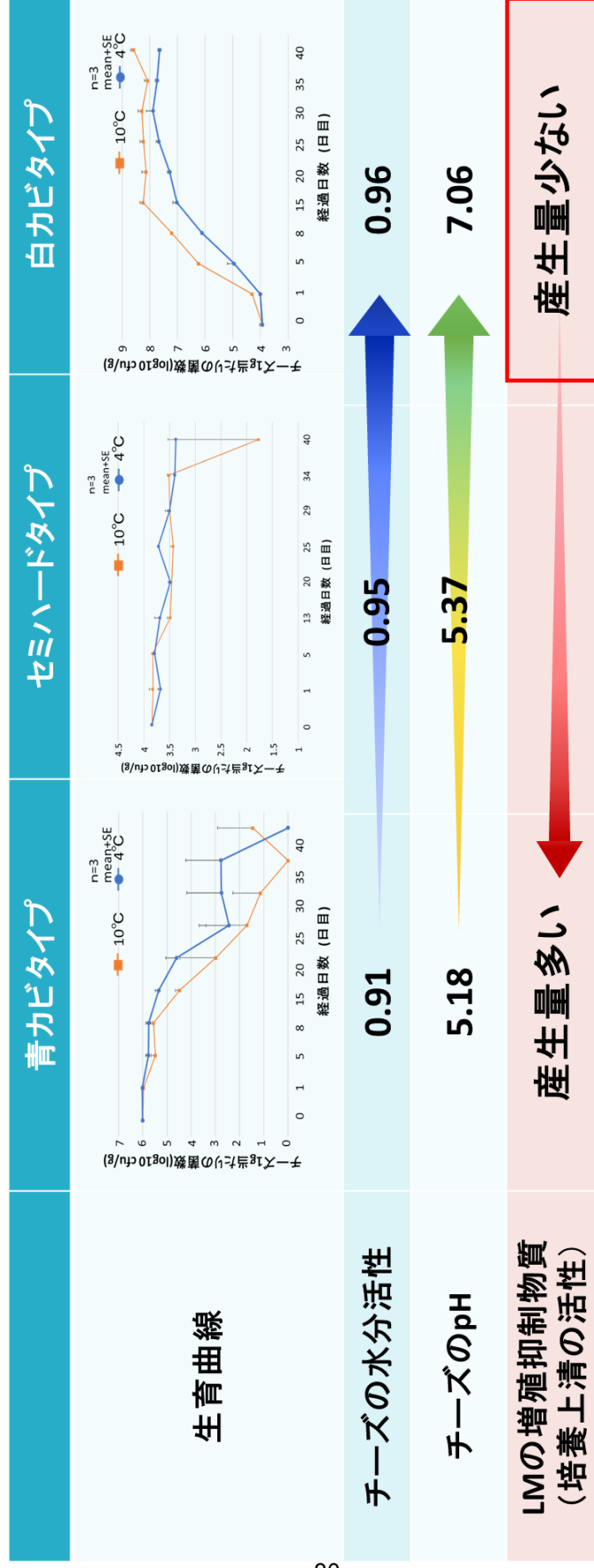


図8. 各種チーズの水分活性とpHと菌代謝抑制物質に関する考察