

令和4年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

「小規模事業者における HACCP の検証に資する研究」

協力研究報告書

非加熱喫食の水産加工品中の *Listeria monocytogenes* の増殖挙動

研究分担者 五十君 静信（東京農業大学）
研究協力者 榎本 友香、檜木 真吾（東京農業大学）
高澤 秀行、矢野 俊博、多賀 夏代、高澤 慎太郎
（株式会社高澤品質管理研究所）
戸田 政一（学校法人東京農業大学食品安全研究センター）

研究要旨

公益社団法人日本食品衛生協会発行の「HACCP の考え方に基づく衛生管理のための手引書」（小規模な一般飲食店業者向け） 第一グループ「非加熱のもの（冷蔵品を冷たいまま提供）」では「すぐに提供しない場合、冷蔵庫に保存する」とされている。一方、スモークサーモンや魚卵製品等の水産加工品での *Listeria monocytogenes* の汚染が報告されており、これらの製品は低温での保存期間が比較的長い製品でもある。本菌は低温でも増殖できることから当該食品中の本菌の増殖挙動の検討は重要である。一般的な冷蔵庫内温度（10℃）での保存は増殖抑制には十分な温度環境ではないことが示唆される。本菌の培地中の増殖挙動については、以前の研究班の研究から10℃で保存すると4日で発症の目安とされる 10^6 個/gの菌数に達し、4℃で保存した場合においても2週間程度で同様な菌数となる。また、それらの水産加工品の多くは非加熱で喫食する RTE 食品として出回っているため、その温度コントロール管理や適切な消費期限設定は重要と考える。

本研究では、水産加工品における本菌汚染を考慮した場合の冷蔵保存温度と時間の関係について検討する。スモークサーモンや魚卵製品に菌株を接種し、食品中での増殖挙動の検証を行う。

A. 研究目的

公益社団法人日本食品衛生協会発行の「HACCP の考え方に基づく衛生管理のための手引書」（小規模な一般飲食店業者向け） 第一グループ「非加熱のもの（冷蔵品を冷たいまま提供）」では「すぐに提供しない場合、冷蔵庫に保存する」とされている。一方、スモークサーモンや魚卵製品等の水産加工品での *Listeria monocytogenes* の汚染が報告されており、これらの製品は低温での保存期間が比較的長い製品でもある。一般的な冷蔵庫内温度（10℃）での保存は増殖抑制には十分な温度環境ではないことが示唆される。それらの水産加工品の多くは非加熱で喫食する RTE 食品として出回っ

ているため、その温度コントロール管理や適切な消費期限設定は重要と考える。

そこで、水産加工品における本菌汚染を考慮した場合の冷蔵保存温度と時間の関係について検証し、適切なリスク管理法に関する情報を提供することを目的とする。

B. 研究方法

リファレンスとして *L. monocytogenes*（以下 LM と記す）接種菌株（L-43-30, L-44-5）をトリプトンソーヤブロス（+0.5%酵母エキス）に接種し、4℃及び10℃保存、0日～20日間における増殖挙動を確認する。以前、研究班が報告した ATCC 19115 株を用いた培地における LM

の温度の違いによる増殖曲線（図1）と今回用いた国内分離株で増殖挙動に相違があるかを検証する。

「スモークサーモン」（食品添加物無添加品）及び「たらこ」（食品添加物無添加品）にL、Mを接種し、4℃及び10℃保存、0日～30日間におけるL、Mと一般生菌の増殖挙動を明らかにする。実験方法の概要は、図2に示す。

培地・試薬

- ① Buffered peptone water (BPW)
- ② 選択分離培地：クロモアガーリステリア
- ③ 非選択分離培地 標準寒天培地
- ④ 0.5%酵母エキス加トリプトンソーヤブロス

ス

（実験手法）

検体作成

LM 2株（L-43-30・L-44-58）を各々以下の方法でスパイクして検体とする。

リファレンス検体の調製

LM 2株を各々 $10^2 \sim 10^3$ cfu/g となるよう調製し、0.5%酵母エキス加トリプトンソーヤブロスに添加後、4℃恒温槽と10℃冷蔵庫に保存し、0日～20日の増殖変化を見る。

食品検体の調整

フードプロセッサーでミンチした「スモークサーモン」350gにLM $10^2 \sim 10^3$ cfu/g となるようにスパイクし、接種菌が均一になるようにフードプロセッサーで攪拌した後、無菌的に12～15gを54本の殺菌済み50mL遠沈管に小分けした後、4℃恒温槽と10℃冷蔵庫に24本ずつ保存する。

その後リファレンス検体と同様に保存した。フードプロセッサーでミンチした「たらこ」700gにLM 10^2 cfu/g となる様にスパイクした。その後スモークサーモンと同様の操作で保存した

① LMの培地での挙動

菌株を $10^2 \sim 10^3$ cfu/g となるよう添加した0.5%酵母エキス加トリプトンソーヤブロスを4℃、10℃保存、0日～20日の菌数を選択分離培地で確認する。

② 食品検体（スモークサーモン・たらこ）

LM添加回収実験

以下の作業を4℃・10℃保存試料を選択分離

培地・非選択分離培地で共に、0日・2日・4日・7日・10日・16日・21日・25日・30日の間隔で作業する。

C. 研究結果

① LMの培地での挙動

0.5%酵母エキス加トリプトンソーヤブロスにおけるLMの挙動

リファレンスとして2種類の菌株について培地を用いて菌の最適な条件での一般的な菌株自体の増殖の温度差異を見た。0.5%酵母エキス加トリプトンソーヤブロスにおけるリステリア菌株の挙動を調査した。

結果としてLMは10℃保存での増殖速度が速く4日～7日後で食中毒が起こり得る菌数まで増殖した。（図3a、3b）

一方、4℃保存では15日後に食中毒発症菌数まで増殖した。4℃保存では増殖速度は遅くなるものの、経時的に徐々に増殖することが確認された

* 10^6 cfu/g を超える増殖が確認されたのは

・菌株 L-43-30：4℃保存では15日後、10℃保存では7日目後であった。

・菌株 L-44-58：4℃保存では15日後、10℃保存では4日後であった。

② LMの食品中での挙動

「スモークサーモン」へのスパイク実験

「スモークサーモン」へのスパイクでは初発菌数 10^1 cfu/g から4℃保存では30日後でも初発菌数レベルの菌数であったのに対し、10℃保存では25日～30日後に食中毒が起こり得る菌数となり、供試2菌株ともに4℃保存と10℃保存で明らかな増殖挙動の違いが認められた。（図4a、4b）

* 10^6 cfu/g を超える増殖が確認されたのは

・菌株 L-43-30：4℃保存では30日後でも 10^1 cfu/g、10℃保存では30日後で 10^5 cfu/g であった。

・菌株 L-44-58：4℃保存では30日後でも 10^1 cfu/g、10℃保存では25日後で 10^6 cfu/g を超える増殖が確認された。

「たらこ」へのスパイク実験

「たらこ」へのスパイクでは初発菌数 10^1 cfu/g から 4°C 保存では 30 日後、L-43-30 株で初発菌数レベルの菌数、L-44-58 株では菌数の低下が観察された。菌株によって、 10°C での菌数挙動に差がみられたことは、今後さらなる検討が必要と思われる。(図 5a、5b)

10°C 保存においては、L-43-30 株で 25 日後まで菌数の増加が、L-44-58 株では観察期間を通じて菌数の低下が観察された。16~30 日後で 10^1 cfu/g~ 10^3 cfu/g となり何らかの要因により菌数低下が起こっている可能性があることが示唆された。

* 10^6 cfu/g を超える増殖が確認されたのは

- ・菌株 L-43-30 : 4°C 保存では 30 日後まで増殖は確認されない、 10°C 保存では 30 日後で 10^5 cfu/g であった。
- ・菌株 L-44-58 : 4°C 保存、 10°C 保存いずれも菌数の低下が観察された。

③ 一般生菌数の挙動

生食用冷凍鮮魚類の一般生菌数規格基準 10^5 cfu/g を参考として議論を進める。

「スモークサーモン」(図 6a、6b)

* 10^5 cfu/g を超える増殖が確認されたのは

- ・菌株 L-43-30 : 4°C 保存では 10 日後、 10°C 保存では 7 日目後であった。
- ・菌株 L-44-58 : 4°C 保存では 16 日後、 10°C 保存では 7 日目後であった。

「たらこ」(図 7a、7b)

- ・菌株 L-43-30 : 4°C 保存では 10 日後、 10°C 保存では 7 日目後であった。
- ・菌株 L-44-58 : 4°C 保存では 25 日後、 10°C 保存では 7 日目後であった。

D. 考察

培地を用いた LM の増殖の検証では、以前の研究班の報告とほぼ同様な結果が得られた。培地を用いた条件での LM の挙動に対してスモークサーモン・たらこへのスパイクされた LM の挙動は、食品の影響を受け菌数の挙動は培地の

結果と比べ、抑制傾向であることが示された。

これらの原因として食品による pH、塩濃度、水分活性、着色料等、マトリックス効果により増殖が制御されることが考えられた。特に、たらこでは、2 株の挙動が異なり、L-43-30 株では 10°C における菌数の増加が観察されたのに対し、L-44-58 株では、 4°C 、 10°C 共に菌数低下が観察されたことは今後さらなる検討が必要と思われる。

これらにより、食品中の微生物制御実験を行う場合、食品毎、複数の菌株を変えての検討が必要と考えられた。

②一般生菌数において 4°C 保存であっても予想以上の増殖が認められた。

今般の実験では菌を均一化するために、今回はミンチ処理して菌数の均一化を行った。この方法では普通に食する形状ではないため、次回にはミンチ処理をしない条件で再度検討をする必要があると考える。

E. 結論

微生物制御方法において加熱しないで食する RTE では微生物を増やさない方法として温度管理が述べられており、冷蔵では 10°C 以下の保存とされている。しかしながら今回の検証実験の結果により、LM では 4°C 保存と 10°C 保存では微生物増殖速度に明確な差が認められた。

培地での増殖と比べ、検討した食品への接種による評価では LM の菌数は低下する傾向がみられた。しかし、 4°C であっても増殖速度は遅くなるが経時的に増殖することから、温度と時間管理による菌の挙動の結果から、消費・賞味期限の判断基準の設定を明確にすることが必要であると思われる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① 五十君静信。食品関係事業者・消費者などが知っておくべき、チーズにおける

- リステリアの挙動。食の安全と微生物検査(2022)
- ② 五十君静信。食中毒統計には表れないリステリア食中毒発生状況とその対策。－フードケミカル(2023)
2. 学会発表
なし
- 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

4.

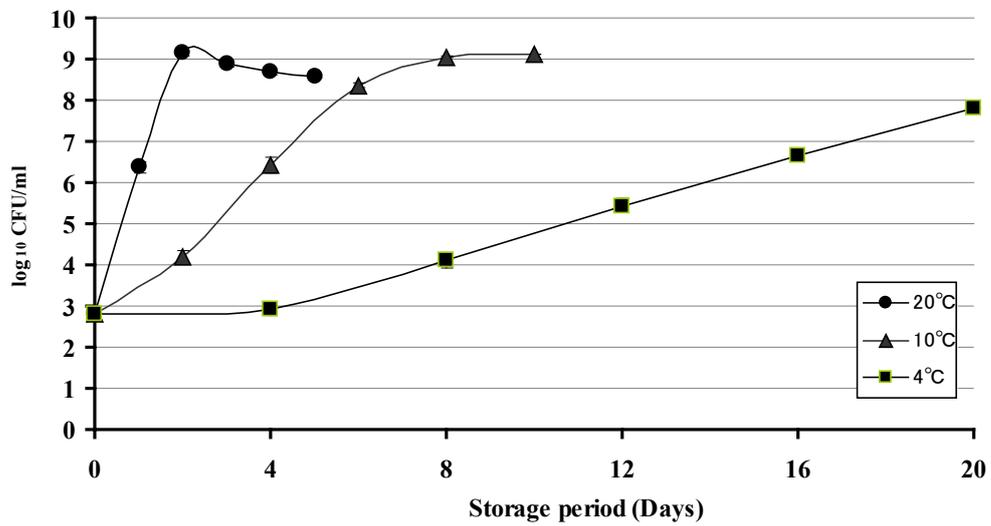


図1. 培地中における *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 株の増殖
(五十君ら、研究報告書より)

検体（無菌試験管に入れた試料 10 g）に 90 mL の BPW を加えて懸濁（n=3）

↓ ストマッカー処理

10 倍段階希釈した検体の希釈液 1ml を滅菌ピペットを用いて各々 2 枚の選択分離培地及び非選択分離培地上に分注後、コンラージ塗抹する

↓ 液が寒天に吸収されるまで 15 分程度放置

培養 35°C 48 時間±2 時間

↓

2 枚の選択分離培地及び非選択分離培地上に形成されたコロニーを計測し、CFU 値を計算する。

図 2. 培地並びに食品への添加による LM 増殖評価実験の概要

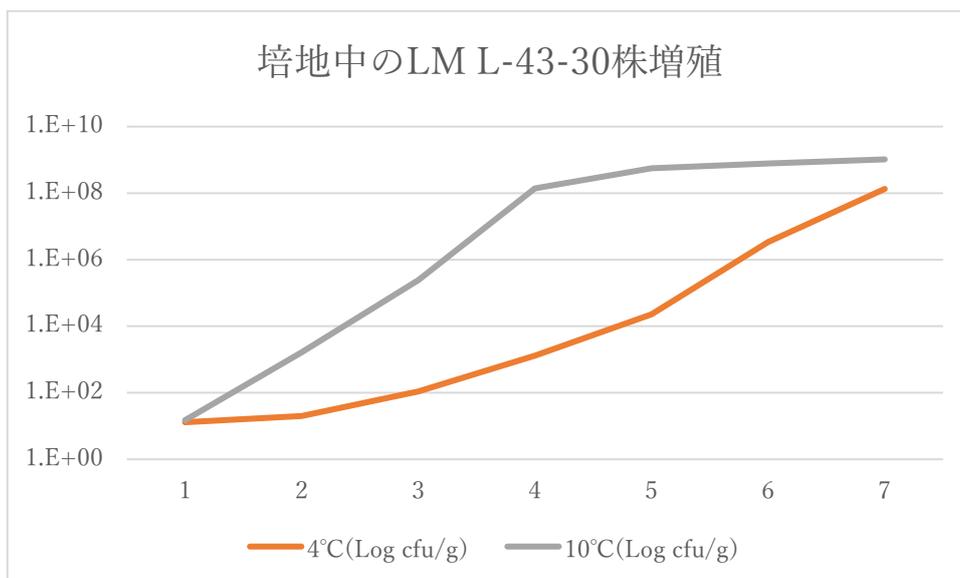


図 3a. 培地中の LM L-43-30 株の増殖曲線

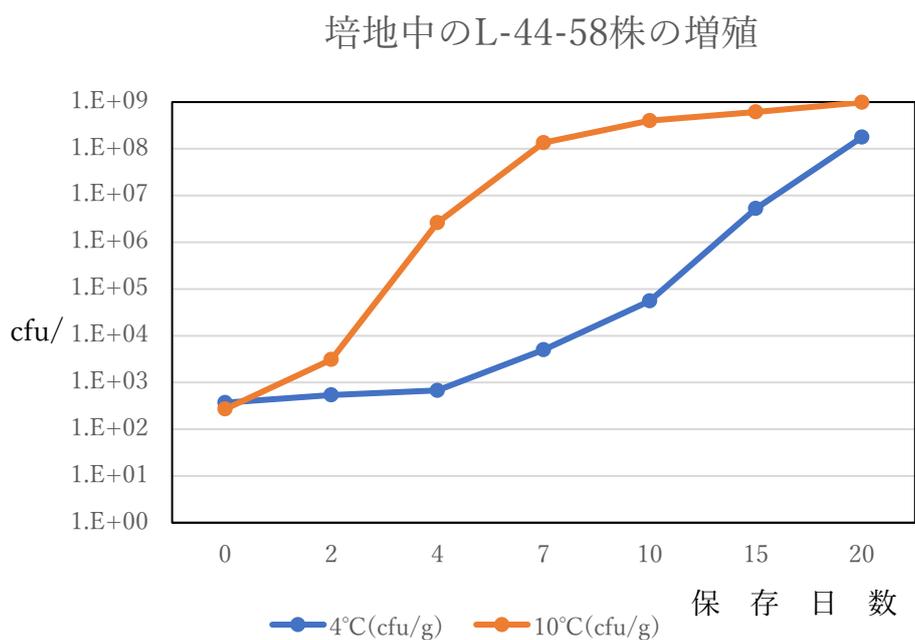


図 3b. 培地中の LM L-44-58 株の増殖曲線

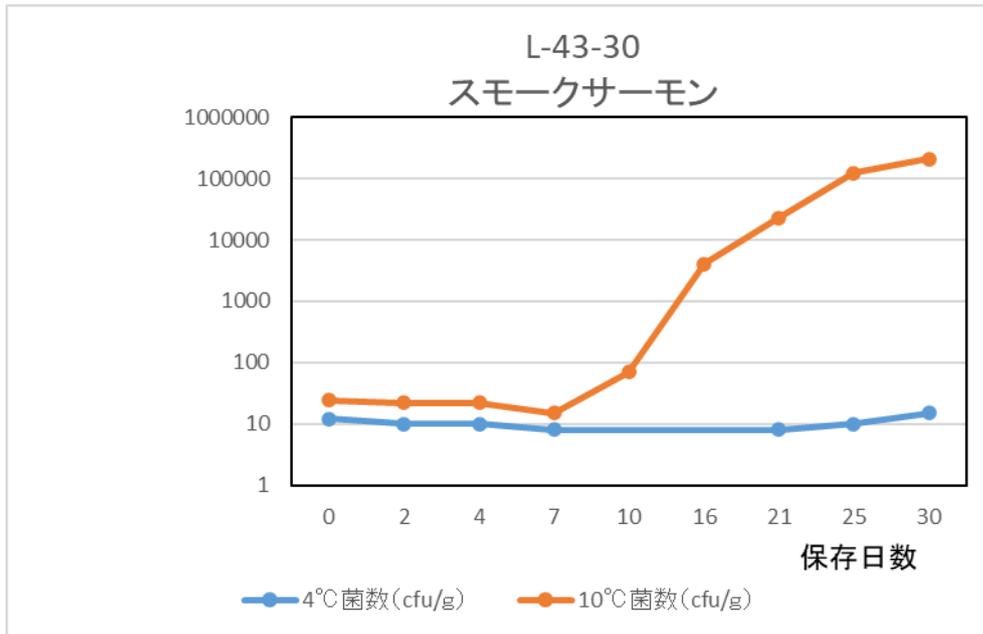


図 4a. スモークサーモン中の LM L-43-30 株の増殖曲線

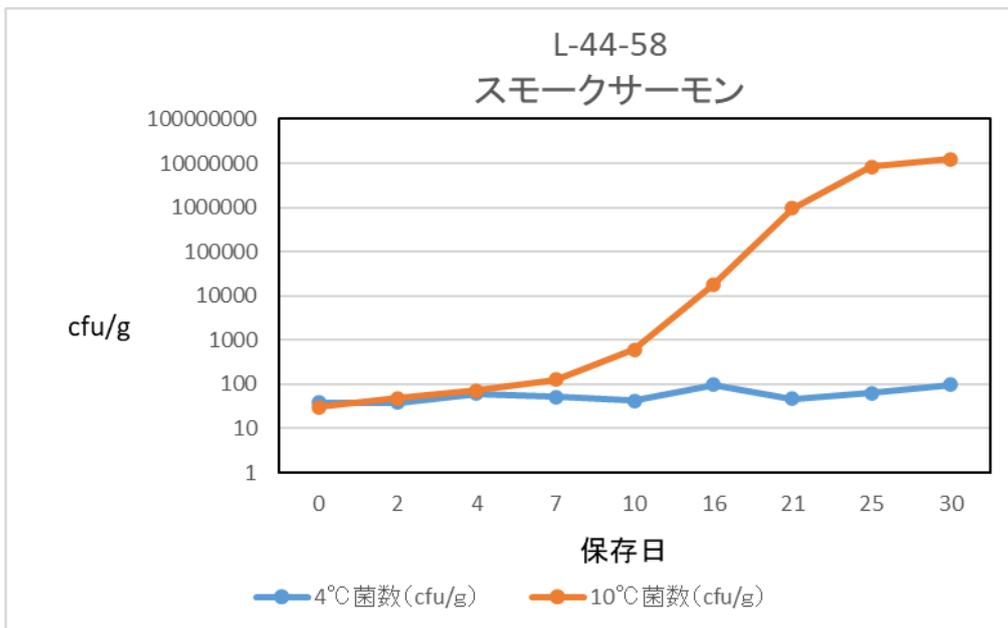


図 4b. スモークサーモン中の LM L-44-58 株の増殖曲線

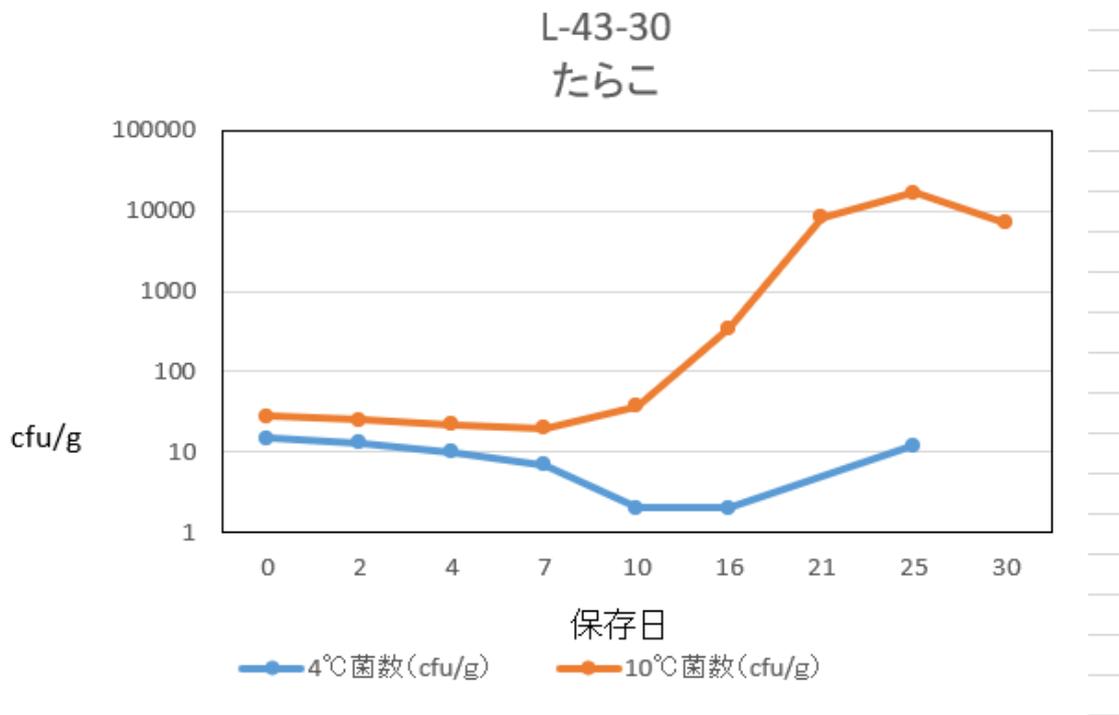


図 5a. タラコ中の LM L-43-30 株の増殖曲線

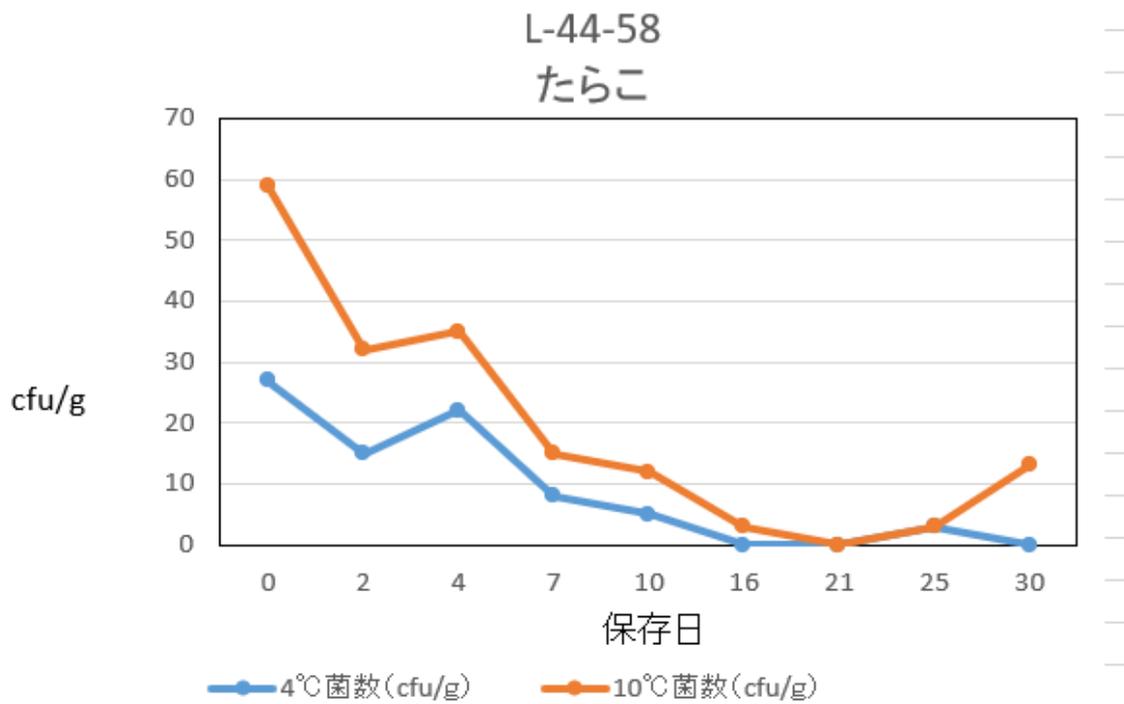


図 5b. タラコ中の LM L-44-58 株の増殖曲線

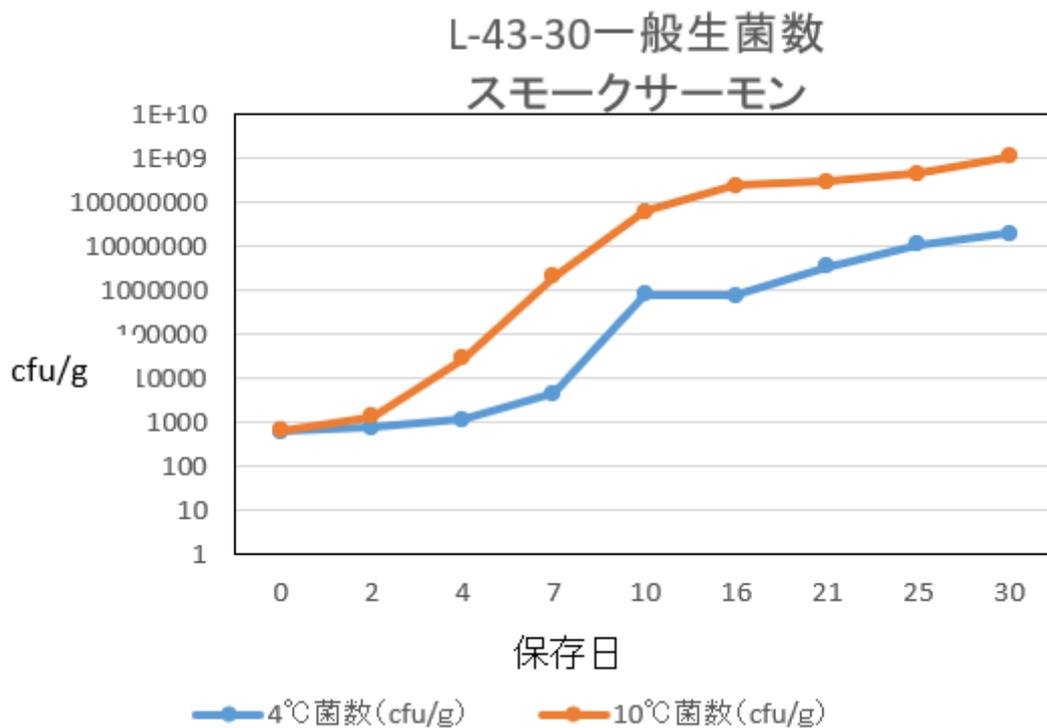


図 6a. LM L-43-30 株接種スモークサーモン中の一般生菌数の推移

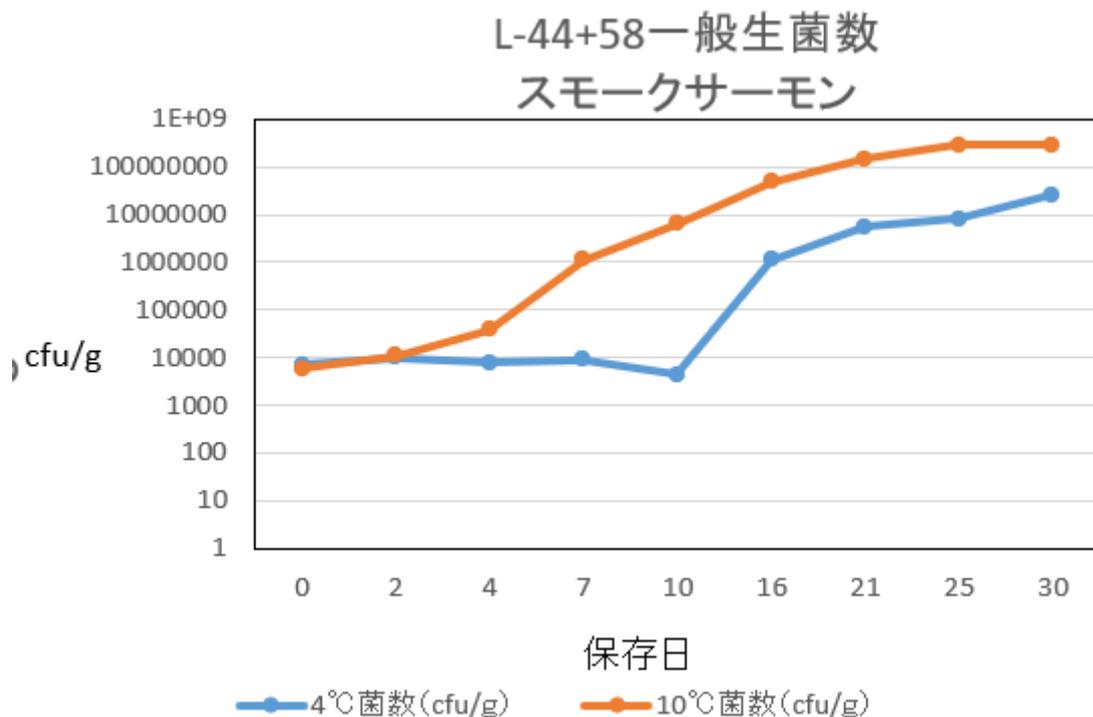


図 6b. LM L-44-58 株接種スモークサーモン中の一般生菌数の推移

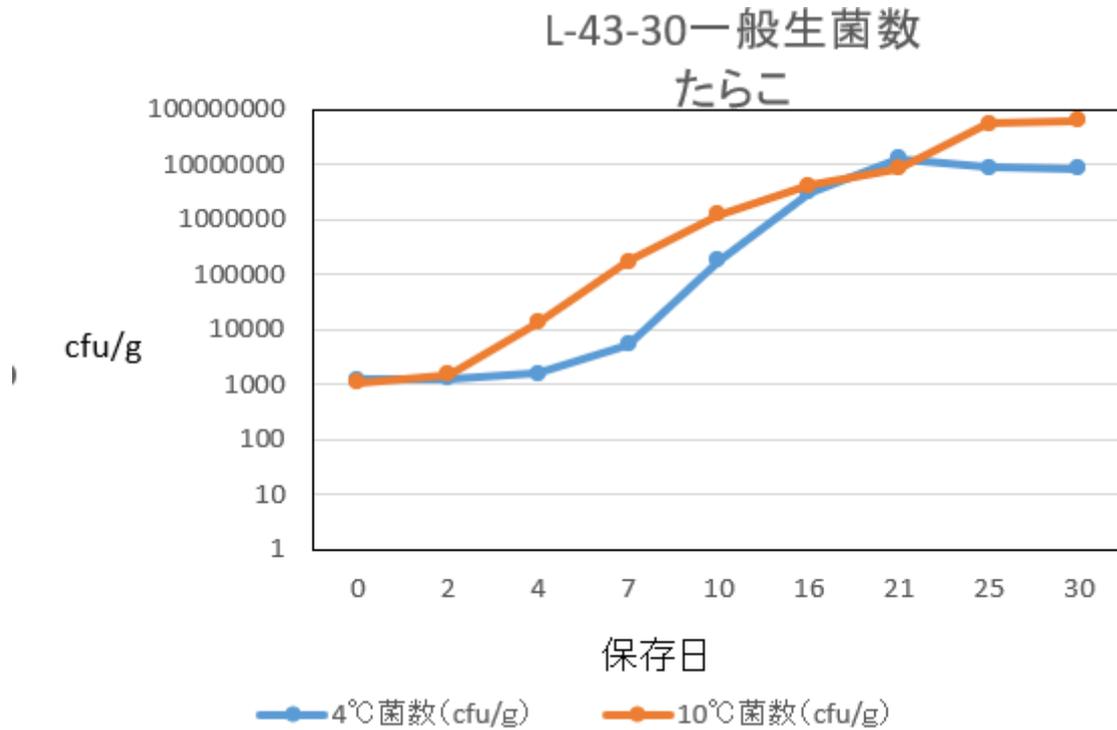


図 7a. LM L-43-30 株接種たらこ中の一般生菌数の推移

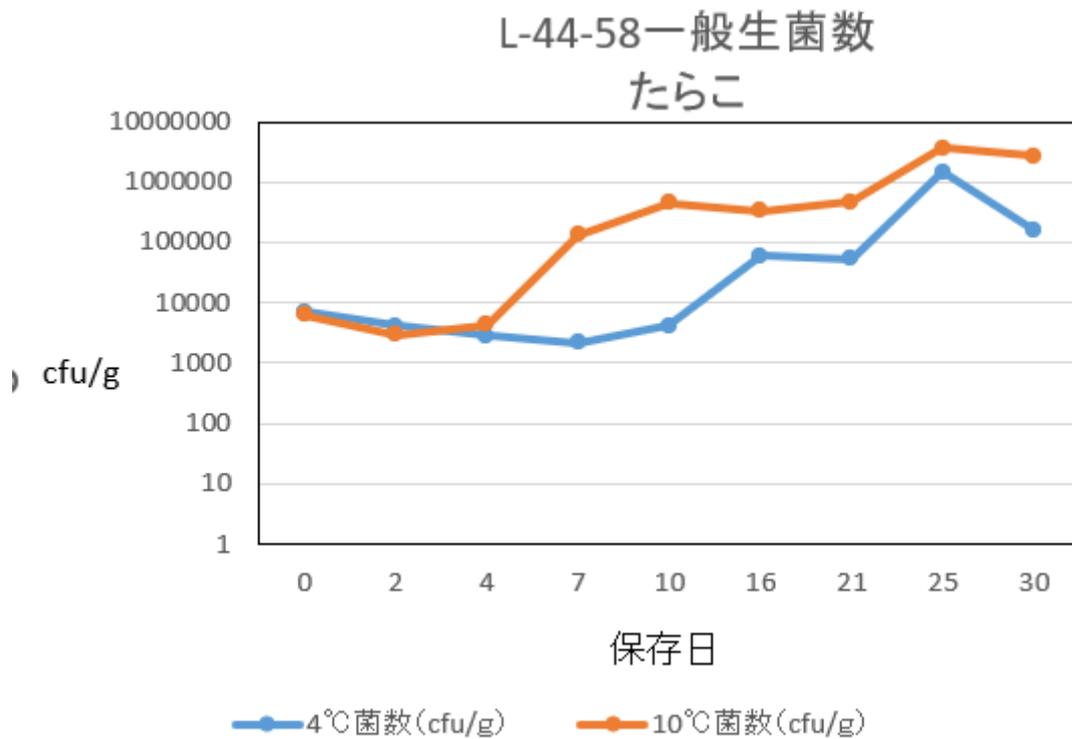


図 7b. LM L-44-58 株接種たらこ中の一般生菌数の推移