

令和5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」
分担研究報告書

フローゼンチルド管理における *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 後藤 大響、榎本 友香、檜木 真吾、岡野 花梨
I HSUN HUANG、Abdullah Jubair （東京農業大学）

研究要旨

Listeria monocytogenes (LM) はグラム陽性、通性嫌気性の短桿菌で、芽胞は形成しない。運動性、耐塩性、低温増殖性を持つことから河川、下水、魚類や家畜の飼育環境など自然界に幅広く存在する。本菌の増殖至適温度は 37 °C であるが、増殖可能温度は 0~45 °C と幅広く冷蔵庫内の温度でも増殖が可能である。

LM によって引き起こされるリステリア感染症の主な原因は非加熱喫食食品（RTE 食品）であり、ソフトタイプのナチュラルチーズや食肉加工品などは海外でこれまで多数の集団事例が記録されており、主なハイリスク食品と考えられている。一方、国内の食品の汚染実態調査では、一部の魚介類加工品で LM 汚染率が高い傾向にあることが報告されている。汚染率が高いといっても、その菌数は高くない。

低温保存期間が長くなると、LM は選択的に増殖してくる。比較的長い低温管理が行われているスモークサーモンでの汚染率が高いことは、リスク管理において注意が必要である。

スモークサーモンや魚卵など魚介類加工品は微生物制御の観点から冷凍出荷され、解凍後、消費期限を設定し低温管理をするいわゆるフローゼンチルド管理を行うことが一般的となっている。このような管理を行ったスモークサーモンでは 10 °C 以下で 10 日間程度の消費期限設定が設けられている。フローゼンチルド管理において、培地の増殖挙動をワーストシナリオと考えてよいかについては検証が必要と思われたため、菌株を用いた実証的な実験を行うことにした。

LM の菌株を用いて、フローゼンチルド管理した培地とスモークサーモンでの増殖挙動を検証したところ、培地においてはフローゼンチルド管理を行ったことで LM の増殖の立ち上がりが遅れ、10 °C の保管で発症菌数まで増殖するのには 14 日ほどを要し、4 °C の保管では 20 日目まで増殖が見られなかった。市販製品の消費期限はこのような培地での増殖挙動から安全係数をかけて設定されていたと思われる。しかし、スモークサーモンにおいては培地で観察されたフローゼンチルドによる LM の増殖遅延が認められなかった。初期菌数 10^2 cfu/g となるように接種したスモークサーモンにおいては 10 °C で保管をしたものは 5 日程度で発症菌数（目安である 10^6 CFU/g）まで増殖をし、4 °C 保管においても、消費期限とされていた 10 日以内に発症菌数を超える増殖が見られた。フローゼンチルド管理において、LM の増殖挙動は培地のデータがワーストシナリオではないため、当該食品への接種試験を行い、科学的根拠のある消費期限設定を行う必要があることが示された。

A. 研究目的

Listeria monocytogenes (LM) は、運動性、

耐塩性、低温増殖性を持つことから河川、下水、
魚類や家畜の飼育環境など自然界に幅広く存

在する。本菌の増殖至適温度は 37 ℃であるが、増殖可能温度は 0～45 ℃と幅広く、国内の低温管理の目安である 10℃以下の冷蔵庫内でも増殖する。

LM によって引き起こされるリステリア感染症の主な原因は非加熱喫食食品（RTE 食品）であり、ソフトタイプのナチュラルチーズや食肉加工品などは海外でこれまで多数の集団事例が記録されており、主なハイリスク食品と考えられている。一方、国内の食品の汚染実態調査では、一部の魚介類加工品で LM 汚染率が高い傾向にある。汚染率が高いといっても、その菌数は低いため、低温で長期間の保存を行わなければ、感染する可能性は低いと思われる。EU では、4℃で 5 日以内に消費される食品は、LM の増殖しない食品と見なしてよいとしている。国内の LM の微生物基準は、現在ハイリスクな RTE 食品に設定されており 100 CFU/g である。

低温保存下では、主な食中毒起因細菌では増殖が抑えられ増殖がほとんど見られないが、低温増殖性を有する LM は菌数が低くても選択的に増殖してくるため注意を要する。比較的長い低温管理が行われているスモークサーモンで汚染率が高いことから、当該製品の LM のリスクマネジメントに関しては、菌の増殖挙動を明らかにし、適切な対応を行う必要がある。

スモークサーモンや魚卵など魚介類加工品は冷凍出荷され、解凍後、消費期限を設定し低温管理をするいわゆるフローゼンチルド管理を行うことが一般的となっている。凍結期間中は LM などの低温増殖菌も増殖はほぼないため、この管理方法は広く用いられている。そして、このような管理を行った食品においては、例えば、市販のスモークサーモンで 10 ℃以下で 10 日～2 週間程度の消費期限設定が行われている。このような期限設定は、予測微生物学のデータベースで用いられる、培地での LM の増殖挙動のデータを基に決められていると思われるが、フローゼンチルド管理において、培地の増殖挙動がワーストシナリオと考えてよいのかについては検証が必要と思われる。そのため菌株を用いた実証的な実験を行うことにした。これらの検証実験の結果から、消費期限の設定など本菌

の制御に有効と思われる情報を提供することを目的とした。

B. 研究方法

（１）材料と方法

供試菌株

①LM Scott A 株、血清型 4b、臨床由来

②LM 4456 株、血清型 1/2a、臨床由来

培地

増殖評価：Brain Heart Infusion (BBL)

菌数測定：CHROMagar™ Listeria（関東化学）
スモークサーモン

商品名：スモークサーモン（切落し）

製品表示：食塩、砂糖、調味料（有機酸等）、酸化防止剤（VC）

原産国：チリ

購入：都内スーパーマーケット A 店

（２）菌の接種実験

①各菌株を BHI 液体培地 37℃24 時間培養した菌液を 10^9 CFU/g と仮定し、希釈により、初期菌数を 1×10^4 cfu/g になるように調整し菌液を作成した。

②LM を接種した BHI 液体培地を発砲スチロール内でエタノールと粉碎したドライアイスを用いて急速冷凍を行い、このような急速冷凍を行わないで凍結させた BHI 液体培地（緩慢凍結）と共に -30 ℃の冷凍庫に移し 7 日間冷凍をした。7 日後に BHI 液体培地を冷凍庫から冷蔵庫へ移動し、一晚解凍を行う。解凍をした後に 4 ℃、10 ℃で低温恒温水槽にて保管を行った。また比較対象として冷凍を行わない菌液を用意し、冷凍を行った菌液と同様に 4 ℃、10 ℃で、低温恒温水槽で保温した。

③LM を接種した BHI 液体培地を経日的に 3 サンプルを低温恒温水槽から取り出し、BHI 寒天培地に 100 μ L を表面塗抹した。初期菌数 1.0×10^4 cfu/mL で 4 ℃、10 ℃、急速冷凍、緩慢冷凍の 4 条件で LM ScottA 株、4456 株、それぞれ 3 連で菌数測定を行った。サンプリングは 4 ℃、10 ℃共に冷凍前、解凍日を 0 日目とし、1 日目、2 日目、3 日目、5 日目、7 日目、10 日目、14 日目、20 日目で言い増殖曲

線を作成した。

④スモークサーモン接種では、2 g にカットしたスモークサーモンで行った。カットしたスモークサーモンに作成した LM の ScottA 株、4456 株の菌液を 1.0×10^4 CFU/g、あるいは 1.0×10^2 CFU/g になるように接種をした。菌液を接種したサーモンをストマッカー袋に入れ、シーラーで封をし、浸水を防ぐために二重で袋に入れ低温水槽中で温度を維持した。

⑤LM を接種したスモークサーモンを -30°C の冷凍庫で 7 日間冷凍した。7 日後にスモークサーモンを冷蔵庫へ移動し一晩解凍を行った。解凍した後、 4°C 、 10°C で低温恒温水槽にて保温した。

⑥LM を接種したスモークサーモンを 3 サンプル低温恒温水槽から取り出し、滅菌済み生理食塩水を 18 mL 加えた後、ストマッカーにてスモークサーモンを粉砕し 10 %試料液を作成した。10 %試料液をリステリアの選択培地である CHROMagar™ Listeria 平板に 100 μL 表面塗抹した。初期菌数 1.0×10^4 cfu/g、 1.0×10^2 cfu/g、 4°C 、 10°C の 4 条件で LM ScottA 株、4456 株、それぞれ 3 連で行った。サンプリングは 4°C 、 10°C 共に冷凍前、解凍日を 0 日目とし、1 日目、2 日目、3 日目、5 日目、7 日目、10 日目、14 日目、20 日目でを行い増殖曲線を作成した。

C. 研究結果

(1) BHI 培地における冷凍前と冷凍後の LM 菌数変化

4°C で保管をした BHI 培地において、冷凍を行う前の LM の菌数と冷凍を行い、一晩解凍した後の LM の菌数では冷凍方法（緩慢冷凍または急速冷凍）や菌株（Scott A、4456）に関わらず差はなかった（図 1）。また、 10°C で保管した BHI 培地も 4°C の結果と同様に保管をした BHI 培地において、冷凍を行う前の LM の菌数と冷凍を行い、一晩解凍した後（フローゼンチルド）の LM の菌数では冷凍方法や菌株に関わらず変化はなかった（図 2）。

(2) BHI 培地におけるフローゼンチルド管理による LM の増殖挙動評価

両菌株（Scott A、4456）共に冷凍方法による増殖挙動への影響の違いはなかった。ScottA 株において、 4°C で保管を行ったものに関しては 20 日目まで発症菌数に達しなかった（図 3）。 10°C で保管をしたものに関しては 14～20 日目の間に発症菌数に達した（図 4）。また、コントロールの冷凍を行っていないものに関しては 4°C で保管をしたものは 7 日目（図 3）、 10°C で保管をしたものでは 2 日目に発症菌数に達した（図 4）。4456 株においては、 4°C で管理をしたものは ScottA 株同様に 20 日目までに発症菌数に達しなかった（図 5）。 10°C で保管をしたものは 14 日目に発症菌数に達した（図 6）。また、コントロールの冷凍を行っていないものに関しては 4°C で保管をしたものは 5 日目（図 5）、 10°C で保管をしたものは 1～2 日目の間に発症菌数に達した（図 6）。

(3) スモークサーモンにおける冷凍前と冷凍後の LM 菌数変化

LM を接種し、冷凍をしたスモークサーモンにおいて初期菌数 10^4 cfu/g（図 7、8）、 10^2 cfu/g（図 9、10）共に冷凍前と冷凍後の菌数変化は温度、菌株に関わらず差はなかった。

(4) スモークサーモンにおけるフローゼンチルド管理による LM の増殖挙動評価（初期菌数 10^4 cfu/g）

今回使用したスモークサーモンにおいて LM の初期汚染はなかった。初期菌数が 10^4 cfu/g と高いため、ScottA 株、4456 株共に 10°C で保管をしたものは 2～3 日の間で発症菌数を超えた。また、 4°C で保管をしたものは 7～10 日目の間に発症菌数を超えた（図 11、12）。しかし、実際の食品での汚染はかなり低い菌数（ 10^2 cfu/g 以下）であり、 10^4 cfu/g の結果では実際の汚染実態との考察に相応しくないため、初期菌数 10^2 cfu/g での検討を行うことにした。

(5) スモークサーモンにおけるフローゼンチルド管理による LM の増殖挙動評価（初期菌数 10^2 cfu/g）

初期菌数 10^4 cfu/g の実験同様に LM の初期汚染はなかった。ScottA 株、4456 株共に 10°C で保管をしたものは 5 日程度で発症菌数を超え、 4°C で保管をしたものでは 10 日程度で発症菌

数を越えた（図13，14）。

D. 考察

培地でのフローゼンチルド管理後の LM の増殖挙動は 4℃では両菌株共に 20 日目までに発症菌数（目安とされる 10^6 CFU/g）まで増殖せず、増殖が見られなかった。10℃の保管では両菌株共に発症菌数に達するまでに 14 日ほどを要した。培地においてはフローゼンチルド管理を行った当該食品の消費期限とされていた 10 日以内には発症菌数まで増殖をしないことがわかった。おそらく、この商品の消費期限は培地での結果に安全係数をかけて設定されていたものと思われる。

今回の培地を用いた実証実験結果では、LM 自身は、緩慢凍結、急速凍結を行った後の凍結融解では生菌数は変化していなかった。フローゼンチルド管理を行うことで菌の増殖の立ち上がりが遅れた。また、フローゼンチルド管理後は低温で保管をすることで LM の増殖を緩やかにすることができることが示された。

一方、スモークサーモンでのフローゼンチルド管理後の LM の増殖挙動は両菌株ともに初期菌数 10^4 cfu/g となるように接種したものは、4℃の保管では 7～10 日目ほどで発症菌数に達し、10℃での保管では 2～3 日の間で発症菌数に達した。

初期菌数を下げて 10^2 cfu/g となるように接種をしたスモークサーモンにおいては 4℃の保管では両菌株共に 10 日ほどで発症菌数に達し、10℃の保管では 5 日ほどで発症菌数に達した。これらの結果から、スモークサーモンにおいては食品の成分がフローゼンチルド処理において、LM の凍結損傷から回復し増殖にプラスに働いて、培地の結果より速やかに増殖することができるよう働いていると思われる。そ

して、スモークサーモンではフローゼンチルド管理後は、新鮮な菌体とほぼ同じように LM の低温での増殖を示すようである。このため、今回の実験結果から、スモークサーモンでは LM は菌株、初期菌数に関わらず、設定されている消費期限内に発症菌数まで増殖してしまう可能性を示唆した。予測微生物学等で用いられている培地などによる菌の増殖挙動は、フローゼンチルド管理においては、慎重に扱わないといけないものと思われる。消費期限設定の保管温度や期間日数などの条件は、食品への接種実験等により検証し決めることが必要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

投稿準備中

2. 学会発表

- 1) 五十君静信。HACCP制度下の微生物検査の考え方。日本防菌防黴学会。千里ライフサイエンスセンター。2023. 8. 29
- 2) 五十君静信。食品における食中毒起因細菌制御の重要性。日本食品衛生学会シンポジウム。ハイブリッド開催。2024. 6. 7

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

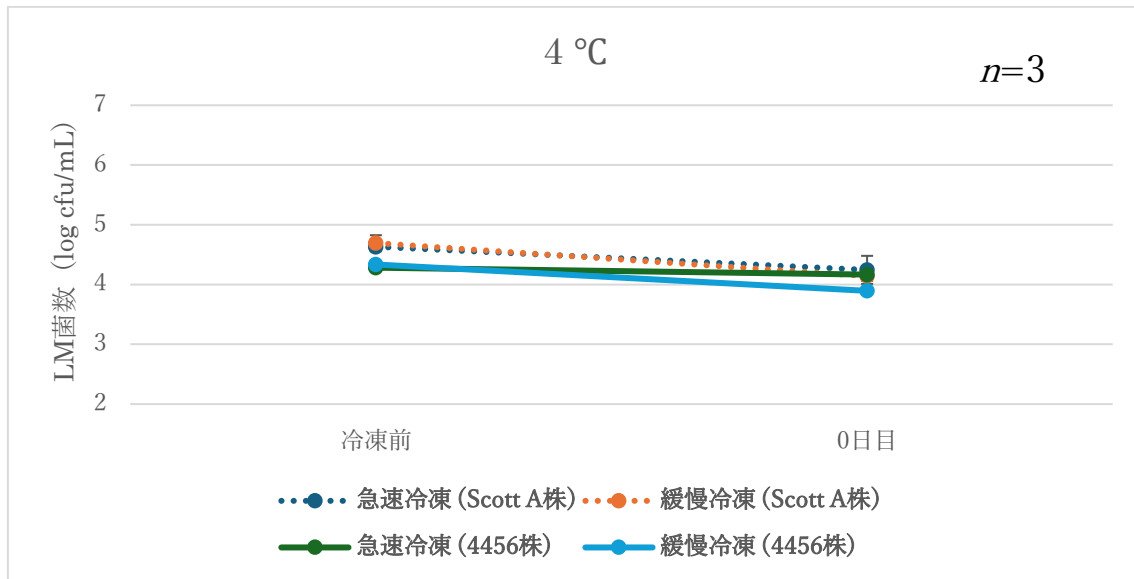


図 1. BHI 培地における 4 °Cでの冷凍前と解凍後の LM の菌数変化

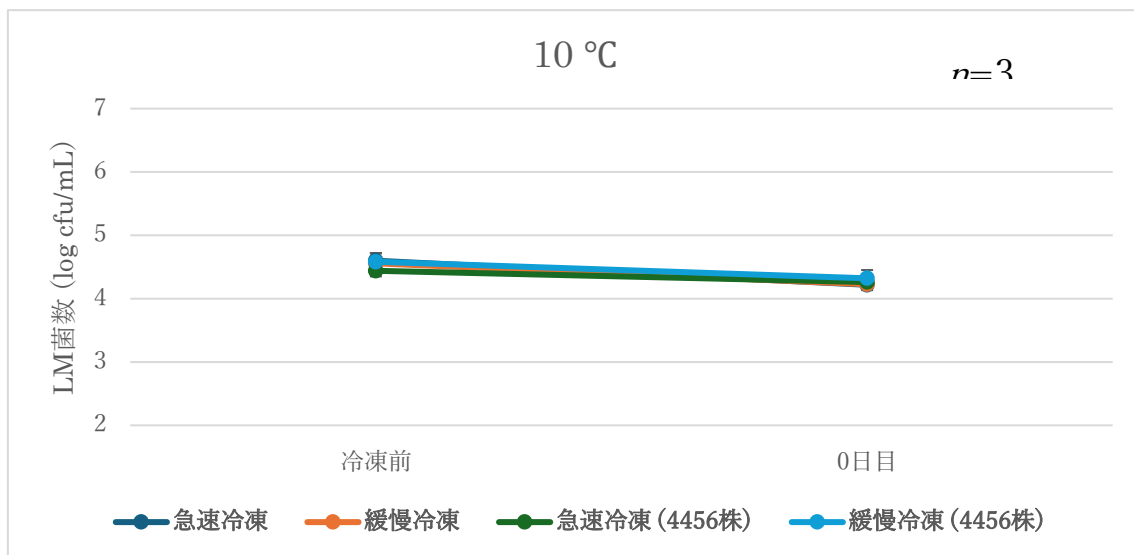


図 2. BHI 培地における 10 °Cでの冷凍前と解凍後の LM の菌数変化

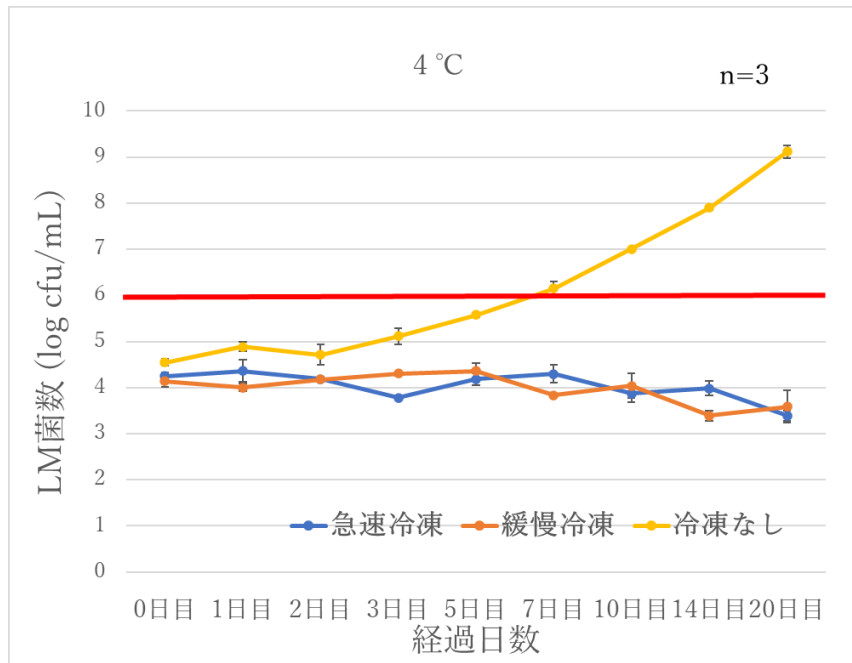


図3. BHI 培地における 4 °Cでのフローズンチルド管理後の LM の増殖挙動(ScottA 株 4 °C) 赤線は発症菌数(10^6 cfu/g)

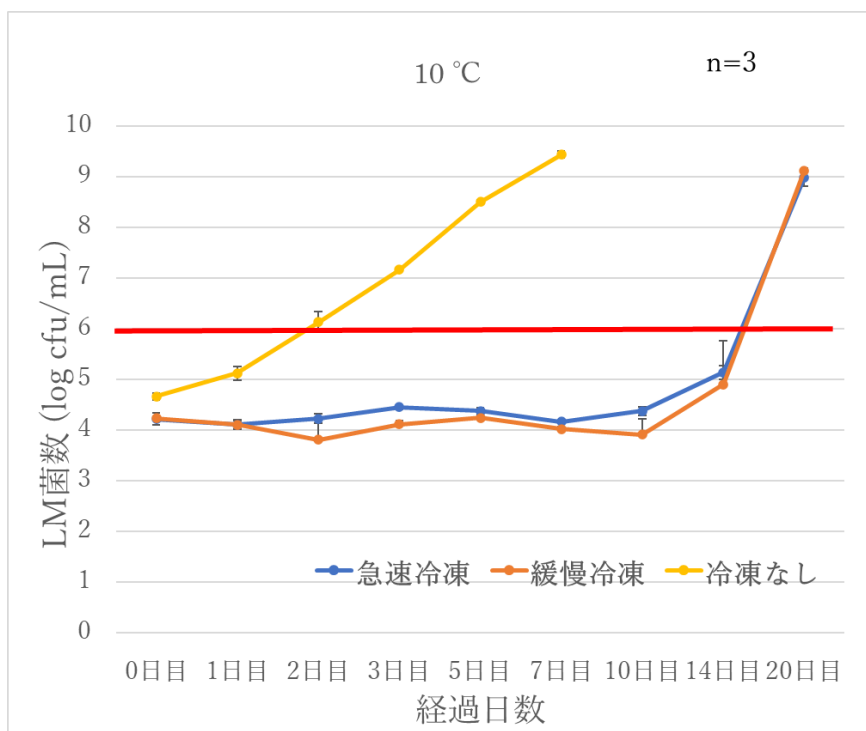


図4. BHI 培地における 10 °Cでのフローズンチルド管理後の LM の増殖挙動(ScottA 株 10 °C)

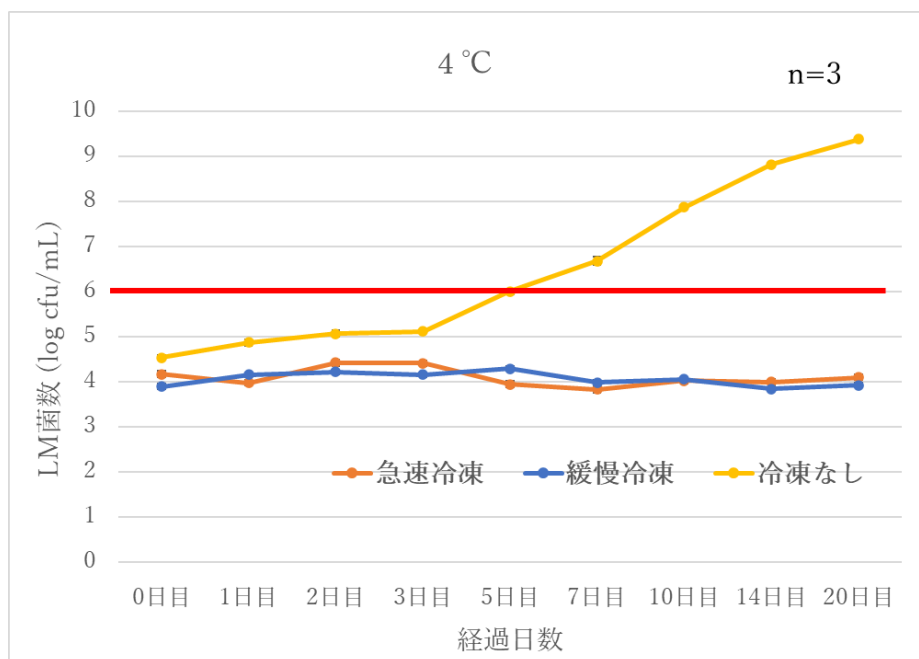


図5. BHI 培地における 4 °Cでのフローズンチルド後の LM の増殖挙動 (4456 株 4 °C)

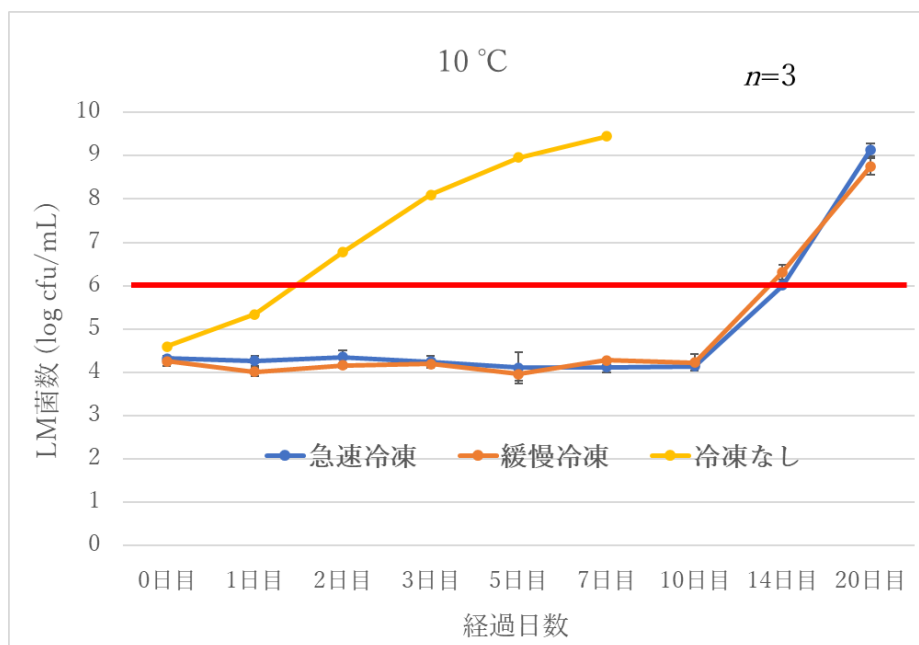


図6. BHI 培地における 4 °Cでのフローズンチルド後の LM の増殖挙動 (4456 株 10 °C)

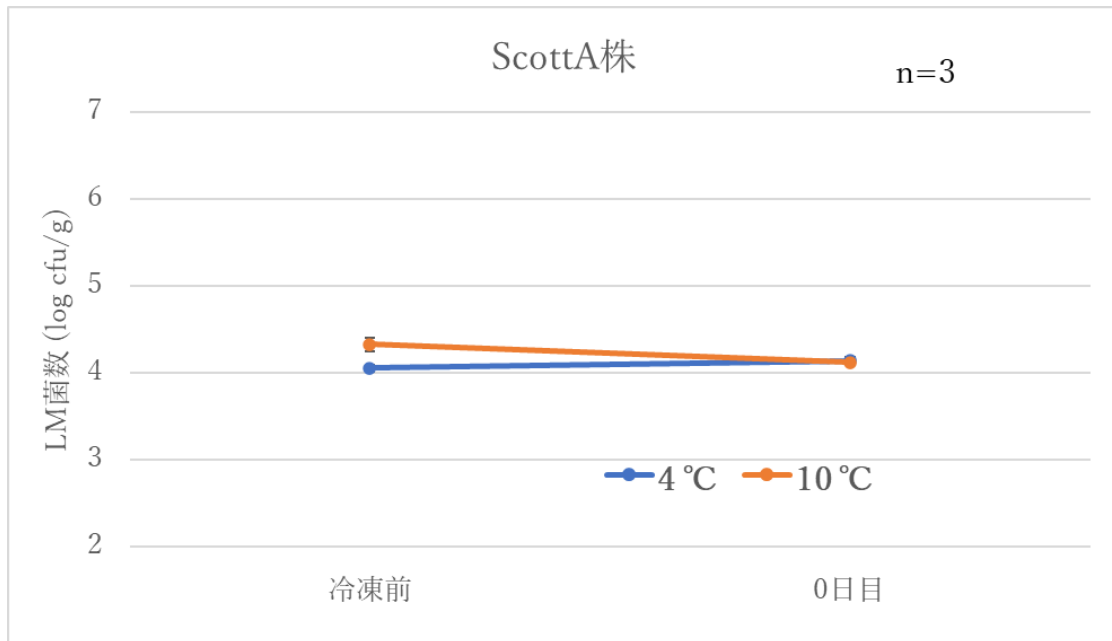


図7. スモークサーモンにおける冷凍前と解凍後の LM 菌数変化
(ScottA 株 初期菌数 10^4 cfu/g)

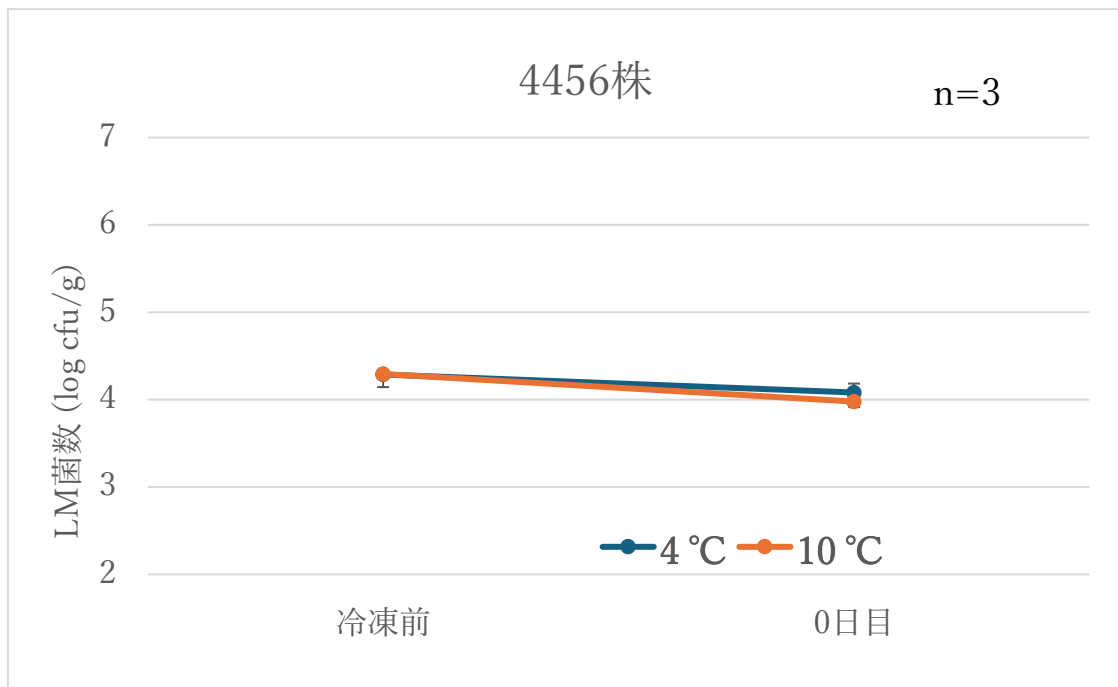


図8. スモークサーモンにおける冷凍前と解凍後の LM 菌数変化
(4456 株 初期菌数 10^4 cfu/g)

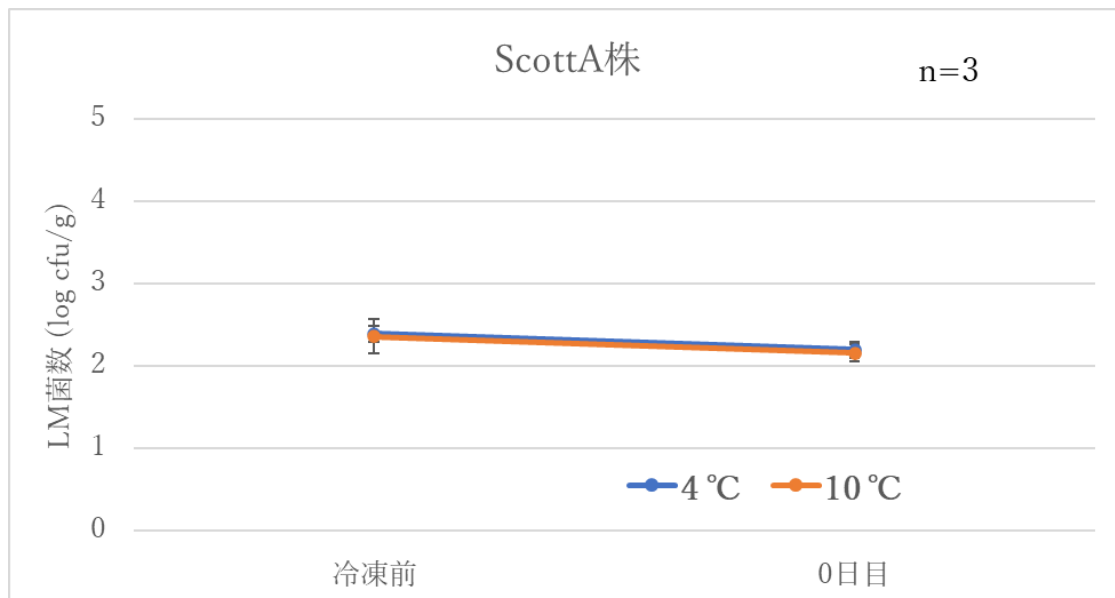


図 9. スモークサーモンにおける冷凍前と解凍後の LM 菌数変化
(ScottA 株 初期菌数 10^2 cfu/g)

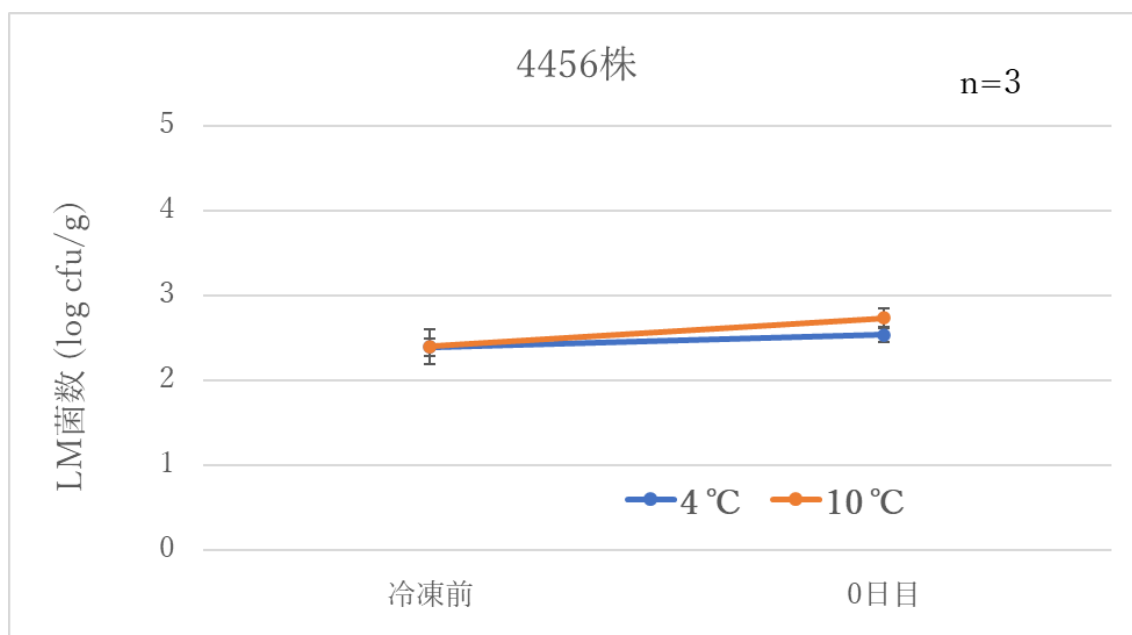


図 1 0. スモークサーモンにおける冷凍前と解凍後の LM 菌数変化
(4456 株 初期菌数 10^2 cfu/g)

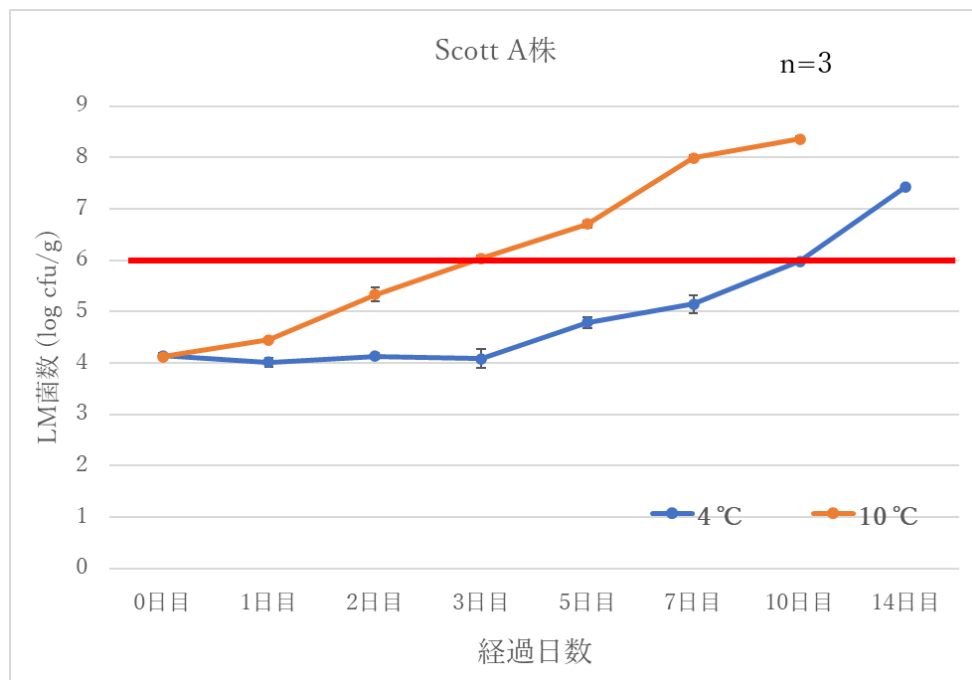


図1 1. スモークサーモンにおけるフローゼンチルド後の LM の増殖挙動 (ScottA 株)

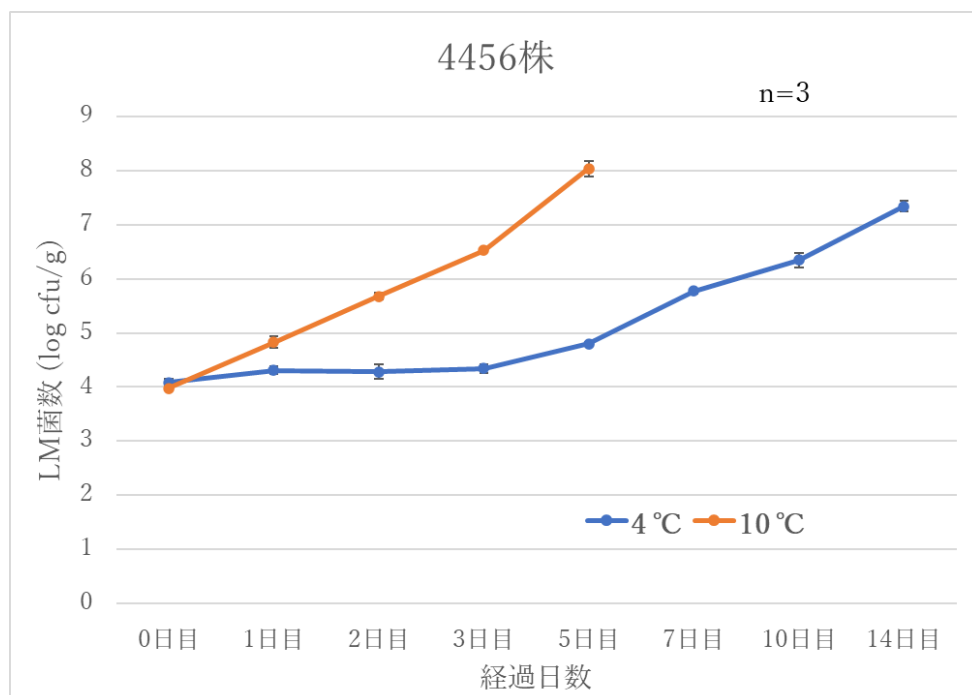


図1 2. スモークサーモンにおけるフローゼンチルド後の LM の増殖挙動 (4456 株)

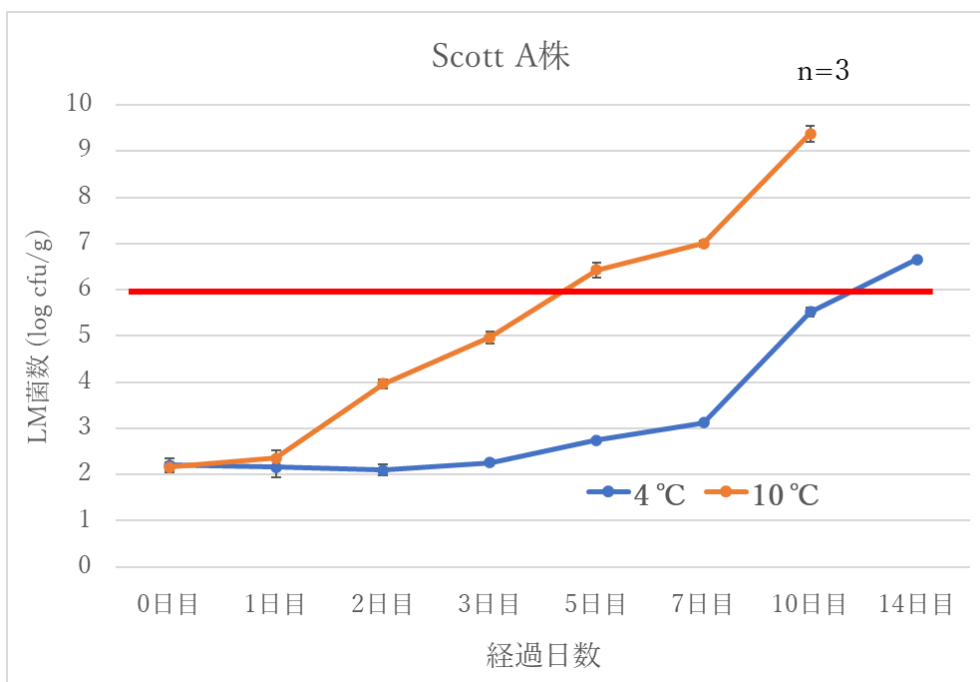


図1 3. スモークサーモンにおけるフローゼンチルド後の LM の増殖挙動 (ScottA 株)

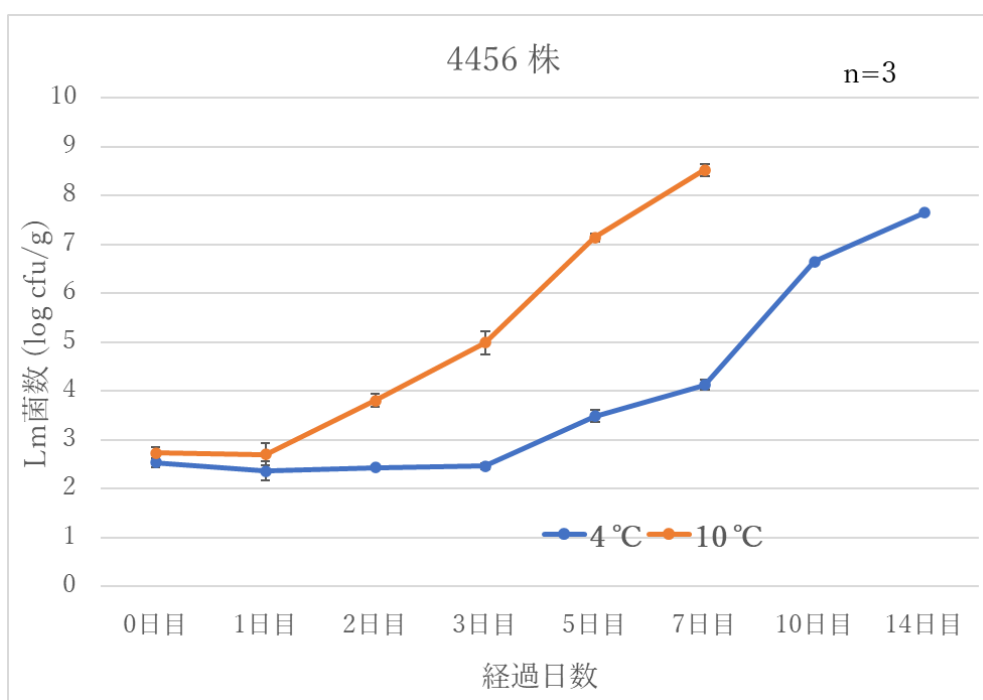


図1 4. スモークサーモンにおけるフローゼンチルド後の LM の増殖挙動 (4456 株)