

真空調理食品におけるリステリア菌の消長

坂倉 有紀 (管理栄養学科・助手)・山口 尚子 (管理栄養学科・助手)
大中 佳子 (管理栄養学科・講師)・吉田 啓子 (家政保健学科・教授)

Behavior of *Listeria innocua* in Foods Prepared by Vacuum-packed Pouch Cooking

Yuki Sakakura・Naoko Yamaguchi・Yoshiko Ohnaka・Keiko Yoshida

Abstract

Listeriosis has been positioned as one of the important foodborn infections. This study investigated the behavior of *Listeria innocua* in foods prepared by vacuum-packed pouch cooking. In corn potage soup, *Listeria innocua* increased 2 log at 2 °C and 6 log at 10°C after 10 days. The growth of *Listeria innocua* was slightly inhibited in the vacuum-packed pouch. The addition of 0.1% acetic acid strongly inhibited the growth of *Listeria innocua*.

Keywords: *Listeria innocua*, controlled storage temperature, microbiological investigation, vacuum-packed pouch cooking

キーワード：リステリア菌、温度管理、微生物学的調査、真空調理

目的

近年、食品の保存、流通において、真空包装および真空調理食品が多く利用されている。これらは、食品の味や風味が保たれ、加工状態によっては長期保存にも耐えうるとされる。また、大量調理においても、真空調理は、歩留まりがよく、取扱が簡便で、コストカットの面でも有効な調理法とされている。家庭用の小型の真空包装機なども出回っており、家庭での冷蔵、冷凍保存に利用されている。

リステリア属菌は、動物、植物、土壌、海など環境中に広く生息するグラム陽性、無芽胞、通性嫌気性の短桿菌である。リステリア属菌には8種があり、このうちヒトに対する病原性を示すのは、

Listeria monocytogenes である。リステリア症は、*Listeria monocytogenes* を原因とする動物由来感染症で、重症化した際の致死率が高いことでも知られている⁽¹⁾。わが国では、食品によるリステリア症は少なかったが、近年ナチュラルチーズの *Listeria monocytogenes* によるとみられる北海道の集団食中毒事報告例や、輸入生ハムからの検出報告など関心は高まっている。リステリア菌の特徴として、低温増殖性があげられる。リステリア菌は4°Cでも増殖するため、低温での流通時や家庭での保存の間に、発症に十分な菌数にまで増殖する可能性がある。また、耐塩性が高いため^(2,3)、食肉製品から漬物などの塩蔵食品を含むあらゆる食品が汚染のターゲットとなりえる。欧米の食中

毒事例においても、チーズ、ハム、スモークサーモン、本菌に汚染されたキャベツを使ったコールスローサラダなど、原因食品は多岐にわたる。食品への汚染では、*Listeria monocytogenes* の単独の汚染は少なく、本菌を含めたリステリア属菌で汚染されていることが多い。

これまでに、真空調理食品におけるリステリア菌の消長について検討したものは少なく、真空包装処理や真空調理によって、リステリア菌がどのような挙動を示すかは明らかになっていない。わが国の真空調理食品に対する細菌学的検討においては、一般生菌数や大腸菌群、耐熱性芽胞形成菌についての検討は見られるが、リステリア菌の消長については検討されていない。本研究では、リステリア属菌のうち非病原性で、*Listeria monocytogenes* に汚染されている食品から同時に検出され、またその性質も近いとされる *Listeria innocua* を使用し、真空包装および真空調理におけるリステリア菌の消長について検討を行った。

方法

供試菌株および培養方法

供試菌株として *Listeria innocua* ATCC 33090 (Remel) (以後リステリア菌) を用いた。リステリア菌は、普通寒天斜面培地 (栄研) で前培養を行った。菌数の測定には、PALCAM 選択培地 (OXOID) を使用した。30℃、48時間培養後に PALCAM 選択培地上で生育しエスクリン分解能を有し、且つ中央が凹んだ緑灰色集落をリステリア菌と判定した。

真空包装によるリステリア菌の消長

コーンポタージュスープ (名古屋製酪 (株)) をフィルムバッグ (旭化成フィルム, 飛竜N-4) に入れ、普通寒天培地斜面で継代培養したリステリア菌をリン酸緩衝生理食塩水で希釈し 10^3 CFU/g となるように接種した。これをそのまま封じたもの (密封包装) および真空包装機 ((株) エフ・エム・アイ, FV-330TTE) にて 10mbar で真空包装したものを作製した。家庭および業務用の保存を考慮して 2℃、4℃および 10℃で保存し

たのち、経時的に菌数を測定した。酢酸を添加する場合は、10%の酢酸を調製し、試料に対して 0.05%もしくは 0.1%となるように加えた。

真空調理によるリステリア菌の消長

真空調理におけるリステリア菌の消長は、牛肉を試料として村上らの方法⁽⁴⁾により検討した。牛肉試料は、1枚あたり約 12-15g の牛モモスライス肉 (約 30×50×5 mm) を、鎌倉市内の生肉店にて購入した。牛肉をフィルムバッグに 2枚重ねていれ、リン酸緩衝生理食塩水で希釈した 10^4 CFU のリステリア菌を、2枚の牛肉スライス間にサンドイッチ状になるように接種した。これを真空包装したのち、加熱した。加熱の条件は、真空調理において肉を調理する際に使われるレシピを参考に、58℃で40分、67℃で40分および80℃で15分の3条件とした。氷冷による急冷後、2℃において7日間保存した。保存後は、再加熱を行って暖かい状態で提供する。牛肉の場合、一般的には80℃で10分の再加熱を行うため、本実験においても、この条件で再加熱を行った。各調理段階ごとにサンプルを採取し、リン酸緩衝生理食塩水を加えて1分間のストマッキングを行い (IUL instrument, マスティケーター)、その懸濁液を適宜希釈して、一般生菌数、大腸菌群数およびリステリア菌の検出を行った。一般生菌数は標準寒天培地 (栄研) で、大腸菌群数はデソキシコレート寒天培地 (栄研) で、リステリア菌は PALCAM 選択培地で培養を行った。

結果および考察

真空包装したコーンポタージュスープ中のリステリア菌の消長

リステリア菌の調理工程での汚染を想定し、食品に本菌を人為接種して検討を行った。食品を調理後、もしくは保存のためにフィルムバッグに充填する際の汚染を想定して、コーンポタージュスープの真空包装保存におけるリステリア菌の消長について検討した。コーンポタージュスープの pH および食品成分を Table 1 に示した。リステリア菌の生育可能 pH は 4.4-9.4 であり、至適 pH は 7

Table 1 Properties of corn potage soup

pH	6.5
Energy (kcal/100g)	66
Protein (g/100g)	1.4
Lipid (g/100g)	4.0
Carbohydrates (g/100g)	6.2
Sodium (mg/100g)	212

である。また栄養成分からも本菌の増殖に対し良好な生育条件であると考えられた。

リステリア菌を人為接種したコーンポタージュスープの密封包装および真空包装したものを2℃、4℃および10℃にて14日間保存し、経時的に菌数の測定を行った。結果をFig. 1に示した。保存期間中は、密閉包装と比べて真空包装の菌数が若干低い、ほぼ同レベルで推移した。真空包装では2日目において、10℃では2オーダーの菌数の

増加がみられたが、2℃および4℃では増加が認められなかった。10日目では、2℃および4℃において、2オーダーの増加がみられ、10℃では6オーダーの菌数の増加が認められた。14日目も同様の結果であった。大量調理に有効な新調理システムとして運用されているクックチルシステムにおいては、調理後の食材の保存は0-3℃で保存することとされている。本菌のように低温増殖性のある食中毒菌では、速度は遅いものの、チルド帯であっても増殖するため、調理後や包装時に汚染しないように注意が必要である。また、10℃では、真空包装保存後、2℃および4℃と比較して極めて高い増殖を示した。家庭用冷蔵庫における保存では、頻繁なドアの開閉や食品の詰め込みすぎによって庫内の温度が10℃以上に上昇する。家庭においても温度管理を徹底することにより本菌の増殖が抑えられることが示唆された。

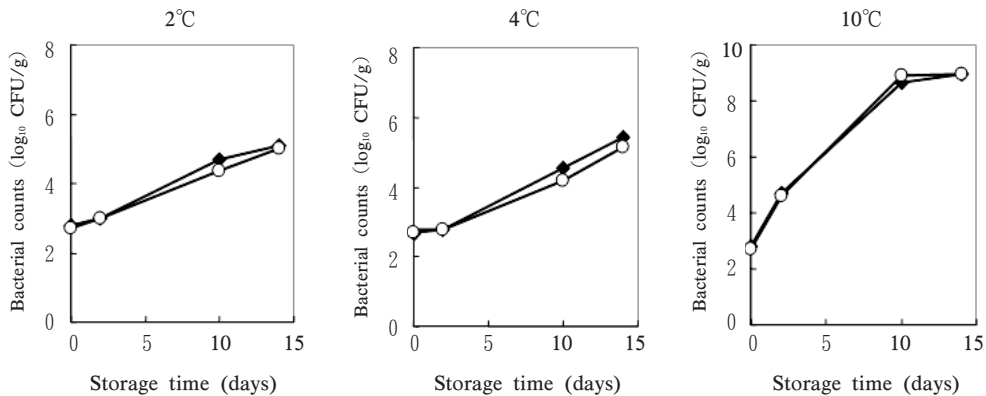


Fig.1 Behavior of *Listeria innocua* in corn potage soup of vacuum packed (○) or aerobic (◆) storage at 2, 4 and 10°C.

コーンポタージュスープに0.05%および0.1%の酢酸を添加し、真空包装して保存し、経時的に菌数を測定した。結果をFig. 2に示した。コーンポタージュスープに酢酸を添加すると、0.05%ではpH 5.4を示し、0.1%ではpH 5.0を示した。2℃および4℃において、酢酸を添加したものは、10日目までにリステリア菌の増加は認められなかった。10℃では、10日目までに0.05%の酢酸添加で4オーダー程度の増加がみられ、0.1%の酢酸添加ではリステリア菌の増加は認められなかつ

た。酢酸は、*Listeria monocytogenes* に対して0.05%以上の濃度で食品に対して増殖抑制効果が認められ、クエン酸や乳酸と比較して効果が高い⁽⁵⁾。食味は、0.1%の酢酸添加では酢の味がやや強く感じられ、0.05%の酢酸添加では、酢の味はあまり感じられなかった。酢酸の添加においては、0.1%は強いリステリア菌増殖抑制効果を示すが、酢の味が強いいため適用できる食材が限定され、0.05%では、本食材においては味の邪魔をせずに、4℃以下に温度管理された条件下において、真空

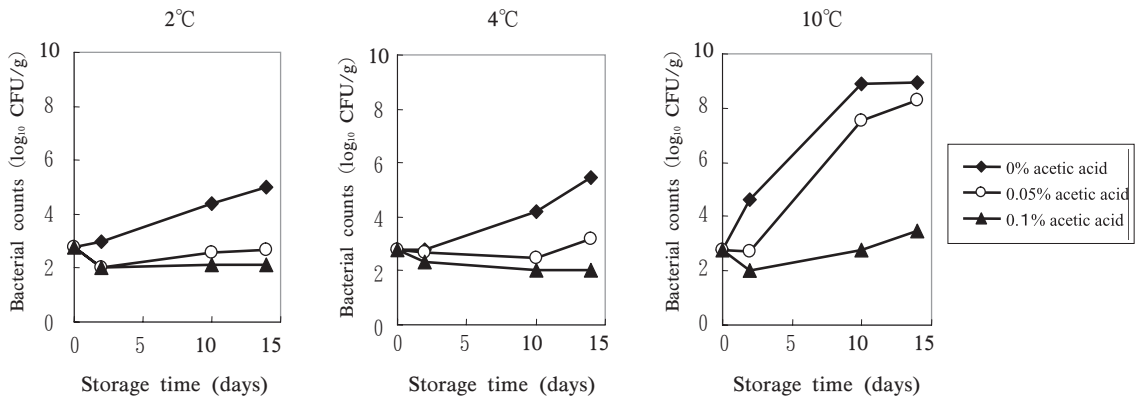


Fig. 2 Behavior of *Listeria innocua* in corn potage soup with or without acetic acid stored at 2, 4 and 10 °C.

包装における保存性を高めることが示唆された。

真空調理した牛肉中のリステリア菌の消長

牛肉の真空調理におけるリステリア菌の消長を検討した。使用した牛肉試料の加熱前における細菌汚染状況を、Table 2 に示した。牛肉の一般生菌数は、 7.2×10^5 CFU/g の菌数であり、大腸菌群数は 1.0×10^3 CFU/g であった。宮沢らの報告では、牛肉の一般生菌数は 1.4×10^5 CFU/g であり、大腸菌群数は 4.8×10^2 CFU/g であり⁽⁶⁾、村上らの報告⁽⁴⁾では一般生菌率は 2.8×10^4 CFU/g であった。一般的な牛肉の菌数と比較しても、本検討に用いた牛肉の衛生状態はおおむね良好であると考えられた。

Table 2 Bacterial contaminants in beef

Test subject	Bacterial counts (CFU/g)
Standard plate counts	7.2×10^5
Coliforms	1.0×10^3

真空調理過程における一般生菌数の推移を Table 3 に、大腸菌群数の推移を Table 4 に示した。加熱前に 7.2×10^5 CFU/g であった一般生菌数は、58°C・40分の加熱後に 9.0×10^2 CFU/g に、67°C・40分および80°C・15分の加熱後では、い

れも不検出であった。好気性菌や通性嫌気性菌は、67°C・40分および80°C・15分の加熱により死滅し、58°C・40分では残存することが明らかとなった。大腸菌群については、3つの加熱条件において、いずれも検出されなかった。次に、各サンプルを氷冷した後、食事を提供する前の再加熱80°C・10分を行った。その結果、いずれの温度条件においても、一般生菌数は検出されなかった。大腸菌群においても、各加熱段階でデソキシコレート寒天培地での検出は認められなかった。

次にリステリア菌を人為接種して、真空調理におけるリステリア菌の消長を検討した。リステリア菌は、感染した動物との接触、排泄物から汚染する機会が多く、肉製品やチーズなどの乳製品から検出される場合が多い。Iida らは、市販の食品の *Listeria monocytogenes* の汚染調査において、牛肉で34.2% (225検体中)、豚肉で36.4% (209検体中)、魚介で1.3% (781検体中)、輸入チーズで2.6% (1142検体中) の汚染を検出したと報告している⁽⁷⁾。リステリア菌に汚染した牛肉を想定して、本菌を人為接種して真空調理における推移を検討した。結果を Table 5 に示した。58°C・40分、67°C・40分および80°C・15分の3条件のいずれも、PALCAM 選択培地でリステリア菌は検出されなかった。また、再加熱においても同様に検出は認められなかった。

Table 3 Standard plate counts in beef on the process of vacuum-packed pouch cooking

Bacterial counts (CFU/g)		
	First heating	Second heating (80°C・10min)
58°C・40min	9.0×10 ²	(-)*
67°C・40min	(-)	(-)
80°C・15min	(-)	(-)

*(-) means not detected.

Table 4 Coliforms in beef on the process of vacuum-packed pouch cooking

Bacterial counts (CFU/g)		
	First heating	Second heating (80°C・10min)
58°C・40min	(-)*	(-)
67°C・40min	(-)	(-)
80°C・15min	(-)	(-)

*(-) means not detected.

Table 5 *Listeria innocua* in beef on the process of vacuum-packed pouch cooking

Bacterial counts (CFU/g)		
	First heating	Second heating (80°C・10min)
58°C・40min	(-)*	(-)
67°C・40min	(-)	(-)
80°C・15min	(-)	(-)

*(-) means not detected in PALCAM selective agar.

病原微生物に対する代表的な加熱殺菌条件としては、米国のFDAの牛肉のFood Codeに示されている57.8°C・32分間や大量調理施設衛生管理マニュアルの75°C・1分間がある⁽⁴⁾。これらの条件と比較すると、本検討における加熱条件はより厳しいものであり、58°C・40分において残存した一般生菌数も、食事を提供する前の80°C・10分の加熱により死滅した。また、人為接種したリステリア菌においては、いずれの加熱条件においても

PALCAM 選択培地上で検出は認められなかった。*Listeria innocua* のD値（残存生菌数が1/10に減少するのに要する加熱所要時間）は、57.5°Cで7.65分、65.0°Cで0.47分である⁽⁸⁾。これを踏まえても、本菌の死滅に十分な加熱条件であると考えられる。今回検討した条件においては、リステリア菌を含め、一般生菌および大腸菌群に対して、おおむね安全と考えられた。また、保存温度においても、クックチルシステムにおいては冷蔵保存する場合は、加熱調理後、30分以内に冷却を開始し、90分以内に芯温を0-3°C以下に下げ、保管の際にも3°C以下とされている。リステリア菌は、最低増殖温度が-0.4°Cであり、低温でも増殖するものの、本検討においても、10°Cに比べ、2°Cの保存では、増殖性が低く、本菌自体も加熱により死滅した。一方、耐熱性芽胞形成菌であるセレウス菌とボツリヌス菌は、それぞれ最低増殖温度が4°C、3.3°Cである。これを踏まえても、3°C以下の保存は安全性を保つ上で厳守すべきと考えられる。また、喫食においても、大量調理施設衛生管理マニュアルでは再加熱後2時間以内とされている。仮にセレウス菌芽胞の混入があり、発芽した場合、分裂速度が15分（35°C）をもとに計算すると、約200分で発症菌量の10⁵ CFU/g レベルに到達すると見られる⁽⁹⁾。このことから、真空調理においては、加熱温度を保つこと、保管温度を管理するとともに、なるべく早く喫食することが望まれる。

参考文献

1. 中村寛海、西川禎一（2006）水産品のリステリア汚染 生活衛生 vol.50, 175-184.
2. Conner DE, Brackett RE, Beuchat LR. (1986) Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. Appl. Environ. Microbiol. 52, 59-63
3. Boziaris IS, Skandamis PN, Anastasiadi M, Nychas GJ. (2007) Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. J. Appl. Microbiol. 102, 796-805.
4. 村上和保、門出清香、表彩子、佐藤佑子、竹森真由

- 美、立道洋子、和田貴臣、三好真理（2006）真空調理過程におけるセレウス菌の消長 日本家政学会誌 57, 793-798
5. 坂倉有紀、吉田啓子（2008）*Listeria monocytogenes* の増殖抑制に及ぼす有機酸の効果 鎌倉女子大学紀要 第15号 35-42
6. 宮沢文雄、衛藤君代、栗林弘恵、金井美恵子、酒井裕子（1992）真空調理食品の微生物学的検討と危害度分析 食品工業 3, 52-59
7. Iida T, Kanzaki M, Nakama A, Kokubo Y, Maruyama T, Kaneuchi C. (1998) Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. J. Vet. Med. Sci. 60, 1341-1343.
8. Miller FA, Brandão TR, Teixeira P, Silva CL. (2006) Recovery of heat-injured *Listeria innocua*. Int. J. Food. Microbiol. 112, 261-265
9. 小島正昭、大野説夫、林克己、玉井憲二、粉山晴市、高倉謙造、澁谷いづみ（2007）真空調理の微生物学的危害分析および制御について 食品衛生研究 57, 49-54

要旨

リステリア症は、*foodborne disease* のひとつである。リステリア菌は低温増殖性をもつため、低温流通下や家庭での保存の間に発症に十分な菌数にまで増殖する可能性がある。本研究では、非病原性株 *Listeria innocua* を真空調理食品に人為接種し、その消長を検討した。真空包装したコンポタージュスープ中で、10日の保存試験において、2℃で2 log、10℃で6 logの本菌の増殖が認められた。真空包装により、わずかな菌数の低下がみられた。また、0.1%の酢酸を添加することにより、その増殖は抑制された。

(2008.10.23受稿)