

アイスクリーム製造施設の *Listeria monocytogenes* 汚染状況中村寛海<sup>1)</sup>、西康之<sup>2)</sup>、清水順子<sup>2)</sup>、山本雅由<sup>2)</sup>、宮木行雄<sup>2)</sup>、黒岡伸夫<sup>2)</sup>、小笠原準<sup>1)</sup>*Listeria monocytogenes* contamination in ice cream processing plantsHiromi NAKAMURA<sup>1)</sup>, Yasuyuki NISHI<sup>2)</sup>, Junko SHIMIZU<sup>2)</sup>,  
Masayoshi YAMAMOTO<sup>2)</sup>, Yukio MIYAKI<sup>2)</sup>, Nobuo KUROOKA<sup>2)</sup>, and Jun OGASAWARA<sup>1)</sup>

## Abstract

*Listeria monocytogenes* (LM) cause human listeriosis via variety of foods. Listeriosis is opportunistic infection: healthy group will rarely be affected, while sensitive group, pregnant women, new-born babies, immunocompromised host, and elderlies are easily affected to cause septicemia, meningitis, or meningoencephalitis. Foodborne listeriosis outbreaks have been reported often in advanced countries. A listeriosis outbreak caused by ice cream occurred in the United States in 2015, when 3 of a total of 10 patients were reported to be dead. The relatively long shelf-life of ice cream products, once contaminated by LM, possibly increase the chance of infection. In this study we investigated LM contamination of ice cream processing plant and ice cream products commercially available in Osaka City. As a result, none of the total of 106 samples (89 swab or related samples from 3 plants and 17 products from markets) detected LM nor *Listeria* spp. However, spike and recovery tests revealed that milk fat- and/or milk solid-rich ice cream products tended to retain LM for more than 6 weeks. This result insisted the importance of meticulous management for factory environment, considering the relatively long shelf-life of the ice cream products in the market and the fact that trace amount of LM can cause severe listeriosis to high-risk group.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, ice cream, processing plant, contamination

## I 緒言

*Listeria monocytogenes* (LM)は食品を介してヒトにリステリア症を引き起こす。リステリア症は日和見感染症であり、健康な成人には生菌を大量に摂取(10<sup>7</sup> cfu 以上)した場合に胃腸炎症状を呈する程度であるが、妊婦、新生児、免疫抑制者、HIV 患者、高齢者など感受性の高いグループには少量の菌摂取で感染し、敗血症や髄膜炎、髄膜脳炎などの重篤な症状を呈することから、致死率が高い[1]。リステリア症は、主に先進国において集団事例が毎年のように発生している[2]。Scallan らは、米国ではリステリア症で毎年1,455名が入院し、255名(15.9%)が死亡すると推計するとともに、その99%は食品が媒介していると報告している[3]。乳製品は、LMによる食品媒介集団事例に最も関連性の高い食品群として認識されており[4]、リステリア症が食品媒介感染症として認識されるようになった1980年代から現在に至るまでリステリア症の原因食品として数多く報告されている[2,5]。2015年に米国で発生したアイスクリームによるリステリア症事例

は、患者10名のうち3名が死亡した[6]。本事例は異なる州に存在する2つの病院で低濃度のLMに汚染されたアイスクリームを原料として調製されたミルクシェーキを食べたことが原因とされている[7,8]。当該製造施設において製造されたアイスクリーム2,320検体についてLM検査を実施した結果、2,307検体(99%)から本菌が検出された。LMの汚染菌量は低く、検出されたアイスクリームの92%は<20 MPN/g(0.15~7.1 MPN/g)であった[8]。アイスクリームは賞味期限の表示を省略することができるため、市場に流通する期間が長く、製品が一度LM汚染をうけるとこれらと接触する機会も多くなる。このため、たとえ汚染が低濃度であっても、米国の事例のように高齢者や基礎疾患のある患者が喫食することでリステリア症を発症し、死に至る可能性もある。わが国においても、今後、アイスクリームなどの乳製品を原因とする重篤な食品媒介リステリア症の集団発生が懸念される。

リステリア症事例における汚染源の検討結果や食品由来株の解析結果から、本菌は原材料から持ち込まれ

1) 地方独立行政法人 大阪健康安全基盤研究所 天王寺センター  
〒543-0026 大阪市天王寺区東上町 8-34  
Osaka Institute of Public Health, 8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026, Japan

2) 大阪市保健所食品衛生監視課  
〒545-0051 大阪市阿倍野区旭町 1-2-7-1000  
Food Hygiene Supervision Department, Osaka City Health Center, 1-2-7-1000, Asahi-cho, Abeno-ku, Osaka, 545-0051, Japan

るというよりはむしろ製造・加工工程で食品を汚染すると考えられている[2,9-11]。

そこで、本調査研究では、大阪市内のアイスクリーム製造施設および市販のアイスクリーム類等(アイスクリーム、アイスマイル、ラクトアイス、氷菓)の LM 汚染状況を調べることを目的として、施設内から採取したふきとり水およびアイスクリーム製品等から LM の検出を試みた。また、アイスクリーム類等における冷凍保管中の LM の消長についても検討したので報告する。

## II 材料及び方法

### 1) 調査期間

平成 28 年 6～9 月の間に大阪市内のアイスクリーム製造施設 3 施設(施設 A、施設 B および施設 C)に調査協力を依頼し、立入り調査を実施した。

### 2) 材料

施設 A からふきとり水 26 検体、洗浄水等 2 検体および製品(半製品を含む)3 検体、施設 B からふきとり水 26 検体と製品 2 検体、施設 C からふきとり水 27 検体と製品 3 検体の計ふきとり水 79 検体および洗浄水等 2 検体、施設から採取したアイスクリーム製品および半製品が 8 検体、市販のアイスクリーム類等 17 検体の合計 106 検体を細菌検査に供した。

### 3) LM 検査法

ふきとり水の採取には、Pro-Media SWAB TEST ST-25BPW(エルメックス)を使用した。スワブの先をよくしごき、緩衝ペプトン水(BPW)中に分散させた後に、5 mL をスタマッカー袋に量りとり、9 倍量のハーフフレーザー培地(OXOID)を加えて 50 g とした。アイスクリーム製品および半製品はスタマッカー袋に 25 g を量りとり、9 倍量のハーフフレーザー培地を加えて 250 g とし、1 分間スタマッカー処理を行った。ハーフフレーザー培地は  $30 \pm 1$  で  $24 \pm 3$  時間培養した。培養後、一白金耳を ALOA 寒天平板培地(Merck)に塗抹するとともに 0.1 mL を 10 mL のフレーザー培地(OXOID)に移植した。ALOA 寒天平板培地は  $37$  で  $24 \pm 3$  時間、フレーザー培地は  $37$  で  $48 \pm 3$  時間培養した。フレーザー培地は培養後の培養液一白金耳を ALOA 寒天平板培地に塗抹し、 $37$  で  $24 \pm 3$  時間培養した。寒天平板上にコロニーの発育が見られないサンプルについてはさらに 24 時間培養し、判定した。ALOA 寒天平板培地上で青色を呈した周囲に混濁帯が見られるコロニーを 5 つ釣菌して SIM 培地(日水製薬)に穿刺し、 $25$  で 18～24 時間培養した。SIM 培地上でリステリア属に特徴的な運動性(umbrella motility)を示し、エスクリン加水分解試験陽性でグルコース陽性(ガス非産生)であればリステリア属陽性とした。リステリア属陽性と判定された菌株について、

ヒツジ血液寒天培地上での溶血の有無、 $\beta$ -リジンディスク(Remel 社)を用いた CAMP テスト、ラムノース、キシロース、マンニットの利用能を調べた。その結果、溶血性の確認、CAMP テスト陽性、ラムノース陽性、キシロースおよびマンニット陰性であれば LM と同定した。LM と確定された菌株は、単離した後に DNA を抽出し、PCR により *hlyA* および 16S rRNA 遺伝子の保有[12]の有無を調べた。

### 4) LM 菌数測定法

製造施設から採取した製品および半製品について、LM の菌数測定を ISO11290-2 に準拠して実施した。すなわち、アイスクリーム 25 g をスタマッカー袋に量りとり、9 倍量の BPW を加えて 250 g とし、1 分間スタマッカー処理を行い、 $20 \pm 2$  で 1 時間  $\pm 5$  分インキュベートした。インキュベート後、1 mL を 3 枚の ALOA 培地にコンラージし、 $37 \pm 1$  で  $24 \pm 3$  時間培養した。寒天平板上にコロニーの発育が見られないサンプルについてはさらに 24 時間培養し、最終判定した。培養後、ALOA 寒天平板培地上で青色を呈した周囲に混濁帯が見られるコロニーを全てカウントして 1 mL あるいは 1 g あたりのリステリア菌数を測定するとともに、5 コロニーについて 3) の LM 検査法に従って LM の確認試験を実施した。

### 5) 生菌数、大腸菌群数および大腸菌数の測定

ふきとり水からの大腸菌群数および大腸菌数の測定は、3) LM 検査法で調製したふきとり水(BPW)を、施設から採取した製品および半製品は 4) LM 菌数測定法で調製した BPW を、適宜 9 mL の BPW で希釈した後に各 1 mL を 2 枚の滅菌シャーレに無菌的に分注し、あらかじめ溶解後  $50$  に保温しておいたクロモアガーECC 培地(関東化学)で混釈した。市販のアイスクリーム類等は BPW でなく滅菌生理食塩水で希釈し、大腸菌群の測定にはデソキシコレート寒天培地(日水製薬)を用いて混釈、重層した。製造施設から採取した製品および半製品と市販のアイスクリーム類等のみ、生菌数の測定を標準寒天培地(日水製薬)により同様に行なった。すなわち、固化後、標準寒天培地は  $35 \pm 1$  で  $48 \pm 3$  時間、デソキシコレート培地は  $35 \pm 1$  で  $20 \pm 2$  時間、クロモアガーECC 培地は  $37 \pm 1$  で  $24 \pm 3$  時間培養した。培養後、標準寒天培地に発育したコロニーをカウントして生菌数とした。デソキシコレート培地およびクロモアガーECC 培地上に発育した赤色コロニーを大腸菌群数としてカウントし、クロモアガーECC 培地上に発育した青色コロニーを大腸菌数とした。

### 6) リステリア添加回収実験

添加回収実験には標準菌株 2 株 (ATCC7644 株および ATCC19115 株) と当所で食品あるいは食品製造施設から分離した 3 株 (20-6, C50, C84) の計 5 株を混合して使用した (表 1)。これらの菌株の由来および血清型については表 1 に示した。添加食品には LM を含むリステリア属菌が陰性であることが確認された市販のアイスクリーム類等を使用した (表 2)。これらをアイスクリーム、アイスマイルク、ラクトアイス、氷菓の 4 種類に分類した。すなわち、表 2 中、アイスクリームとして K48 の 1 検体、アイスマイルクとして K35, K39, K40 の 3 検体、ラクトアイスとして K33, K43, K44 の 3 検体、氷菓として K36, K47 の 2 検体を種類毎に混合して 100g とし、添加回収実験に供した。添加する LM 5 株はそれぞれ BHI 寒天平板培地 (日本 BD) に塗抹して 37 °C で一晚培養後 1 コロニーを 3 mL の BHI 培地 (日本 BD) に移植し、37 °C で一晚培養した。一方、-20 °C に保管しておいたアイスクリーム類等を解冻して 2 つの滅菌カップに各 100 g ずつ小分けし、完全に融解させてから BHI 培養液の 10<sup>2</sup> あるいは 10<sup>8</sup> 希釈液 0.5 mL (5 株の培養液を各 100 μL ずつ) を接種してよくふり混ぜて -20 °C に設定された冷凍庫に移して 6 週間

後まで保管した。添加菌数の算出は以下の通りで実施した。すなわち、各培養液 100 μL を 900 μL の滅菌生理食塩水で希釈して 10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup> および 10<sup>7</sup> 希釈液の各 100 μL を 2 枚の BHI 寒天平板培地に塗抹し、37 °C で 48 時間培養後、発育した集落を数えた。その結果、添加菌数は食品 1 g あたり 0.08 cfu (低濃度接種検体) および 8.9 × 10<sup>4</sup> cfu (高濃度接種検体) と算出された。3 週間後および 6 週間後にサンプルを冷凍庫から取り出し、新しいストマッカー袋に無菌的に 25 g を秤量後 9 倍量の滅菌生理食塩水を加えて 250 g とし、1 分間ストマッカー処理を行い、食品の 10 倍希釈液を作製した。10 倍希釈液 1 mL を 9 mL の滅菌生理食塩水で希釈して 100 倍希釈液を、同様に 1000 倍希釈液を調製した。希釈液を各 2 枚の ALOA 寒天平板培地にコンラージ塗抹した。低濃度接種検体については、6 週間後に 25 g を秤量後 9 倍量の TSBYE 培地 (OXOID) を加えて 250 g とし、1 分間ストマッカー処理を行い、30 °C で一晚培養後、2 枚の ALOA 寒天平板に塗抹し、上述の方法によって、リステリアの有無を調べた。

### III 結果

表 1 添加回収試験に使用した *Listeria monocytogenes* 菌株

菌株名	由来	血清型
ATCC7644	標準菌株	1/2c
ATCC19115	標準菌株	4b
C50	食品 (辛子明太子)	1/2a
C84	食品 (たらこ)	1/2b
20 - 6	スモークサーモン製造施設 (大型スライサー刃)	1/2a

表 2 アイスクリーム類等細菌検査結果

No.	環科研 No.	検体の分類	分類	生菌数	大腸菌群	リステリア <sup>*1</sup>
1	K32	食品	氷菓	<10 cfu/g	陰性	陰性
2	K33	食品	ラクトアイス	1.5 × 10 <sup>2</sup> cfu/g	陰性	陰性
3	K34	食品	氷菓	<10 cfu/g	陰性	陰性
4	K35	食品	アイスマイルク	<10 cfu/g	陰性	陰性
5	K36	食品	氷菓	<10 cfu/g	陰性	陰性
6	K37	食品	氷菓	<10 cfu/g	陰性	陰性
7	K38	食品	アイスマイルク	<10 cfu/g	陰性	陰性
8	K39	食品	アイスマイルク	<10 cfu/g	陰性	陰性
9	K40	食品	アイスマイルク	<10 cfu/g	陰性	陰性
10	K41	食品	アイスマイルク	1.5 × 10 <sup>2</sup> cfu/g	陰性	陰性
11	K42	食品	アイスクリーム	3.5 × 10 <sup>2</sup> cfu/g	陰性	陰性
12	K43	食品	ラクトアイス	<10 cfu/g	陰性	陰性
13	K44	食品	ラクトアイス	<10 cfu/g	陰性	陰性
14	K45	食品	ラクトアイス	5.5 × 10 <sup>2</sup> cfu/g	陰性	陰性
15	K46	食品	ラクトアイス	6.9 × 10 <sup>2</sup> cfu/g	陰性	陰性
16	K47	食品	氷菓	<10 cfu/g	陰性	陰性
17	K48	食品	アイスクリーム	1.0 × 10 <sup>2</sup> cfu/g	陰性	陰性

\*1 リステリア・モノサイトゲネスを含むリステリア属菌

表 3 にアイスクリーム製造施設から採取した検体についての細菌検査結果を示した。施設内から採取したふきとり水 79 検体、洗浄水等 2 検体、アイスクリーム製品および半製品 8 検体は全て LM を含むリステリア属菌が陰性であった。ふきとり水および洗浄水等 81 検体のうち 10 検体から大腸菌群が検出された。検出された検体の内訳は、厨房の床面、排水溝 (内側)、二槽シンク (排水口部分)、二槽シンク (下部の棚部分)、ディッシャー洗浄水、フリーザー前部分の床面、フリーザー機器側面下部の表面、フリーザー前面の洗浄水受け皿、スポンジ、冷凍チャンバー内部ビニールカーテン (入口の結露部分) であった。これらのうち、大腸菌群数が 10 cfu/mL を超えたのは、厨房床面 (2.0 × 10<sup>3</sup> cfu/mL)、二槽シンク (排水口部分) (1.5 × 10<sup>3</sup> cfu/mL)、スポンジ (3.0 × 10<sup>7</sup> cfu/mL) の 3 検体のみであり、これらはいずれも製品と直接接することのない場所であった。製品および半製品の大腸菌群および大腸菌は陰性であり、生菌数は 3.0 × 10<sup>1</sup> ~ 1.9 × 10<sup>2</sup> cfu/g であった。

市販のアイスクリーム類等 17 検体 (アイスクリームが 2 検体、アイスマイルクが 5 検体、ラクトアイスが 5 検体、氷菓が 5 検体) は全て LM を含むリステリア属菌および大腸菌群が陰性であった。生菌数は 1 g あたり 10 cfu 未満 ~ 6.9 × 10<sup>2</sup> cfu の間であった (表 2)。

LM を含むリステリア属菌陰性のアイスクリーム類等を、アイスクリーム、アイスマイルク、ラクトアイス、

表3 アイスクリーム製造施設の細菌検査結果

施設	No.	環科研No.	検体の分類	検体名	生菌数	大腸菌群数	大腸菌数	リステリア <sup>3</sup>	リステリア菌数	
					(cfu/ml) <sup>*1</sup>	(cfu/ml) <sup>*1</sup>	(cfu/ml) <sup>*1</sup>			
A	1	K1	ふきとり	厨房 作業台	ND <sup>2</sup>	0	0	陰性	ND <sup>2</sup>	
	2	K2	ふきとり	厨房 床面	ND	2.0×10 <sup>3</sup>	0	陰性	ND	
	3	K3	ふきとり	厨房 アイスパルク容器(合成樹脂製)(内側)	ND	0	0	陰性	ND	
	4	K4	ふきとり	厨房 パステライザー(右)取り出し口	ND	0	0	陰性	ND	
	5	K5	ふきとり	厨房 パステライザー(真ん中)取り出し口	ND	0	0	陰性	ND	
	6	K6	ふきとり	厨房 パステライザー(左)機器正面下部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
	7	K7	ふきとり	厨房 パステライザー(左)取り出し口	ND	0	0	陰性	ND	
	8	K8	ふきとり	厨房 パステライザー(真ん中)機器正面下部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
	9	K9	ふきとり	厨房 パステライザー(右)機器正面下部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
	10	K10	ふきとり	厨房 パステライザー(右)機器上部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
	11	K11	その他	厨房 フリーザー(左)原料投入口の水	0	0	0	陰性	ND	
	12	K12	ふきとり	厨房 フリーザー(左)受け皿	ND	0	0	陰性	ND	
	13	K13	ふきとり	厨房 ステンレスカップ(5L)内側	ND	0	0	陰性	ND	
	14	K14	ふきとり	厨房 排水溝(内側)	ND	3.5	0	陰性	ND	
	15	K15	ふきとり	厨房 排水溝(格子部分)	ND	0	0	陰性	ND	
	16	K16	ふきとり	厨房 二槽シンク(シンク正面の上部)	ND	0	0	陰性	ND	
	17	K17	ふきとり	厨房 二槽シンク(排水口部分)	ND	1.5×10	0	陰性	ND	
	18	K18	ふきとり	厨房 電子はかり 表面	ND	0	0	陰性	ND	
	19	K19	ふきとり	厨房 二槽シンク(下部の棚部分)	ND	2.5	0	陰性	ND	
	20	K20	ふきとり	厨房 4枚庫冷凍冷蔵庫(左上冷蔵庫部分)(扉内側+棚)	ND	0	0	陰性	ND	
	21	K21	ふきとり	厨房 4枚庫冷凍冷蔵庫(右上冷蔵庫部分)(扉内側+棚)	ND	0	0	陰性	ND	
	22	K22	ふきとり	厨房 4枚庫冷凍冷蔵庫(左下冷蔵庫部分)(棚)	ND	0	0	陰性	ND	
	23	K23	食品	アイスマルク(半製品・凍結前)	1.1×10 <sup>2</sup> cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
	24	K24	ふきとり	盛付室 黄色トレイ内側(製造所内使用分)	ND	0	0	陰性	ND	
	25	K25	ふきとり	盛付室 盛付作業台	ND	0	0	陰性	ND	
	26	K26	ふきとり	盛付室 アイスパルク容器(ステンレス製)(内側)(使用后)	ND	0	0	陰性	ND	
	27	K27	その他	ディッシャー洗浄用水(使用中)	1.1×10 <sup>3</sup>	2.5	0	陰性	ND	
	28	K28	ふきとり	盛付室 床面	ND	0	0	陰性	ND	
	29	K29	ふきとり	盛付室 4枚庫冷凍冷蔵庫(左上部分)(棚)	ND	0	0	陰性	ND	
	30	K30	食品	アイスマルク(製品)	1.9×10 <sup>2</sup> cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
	31	K31	食品	アイスマルク(製品)	1.8×10 <sup>2</sup> cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
	B	1	K49	ふきとり	床面:フリーザー(冷蔵チャンパー前)前部分	ND <sup>2</sup>	0	0	陰性	ND <sup>2</sup>
		2	K50	ふきとり	床面:フリーザー(左)前部分	ND	10	0	陰性	ND
3		K51	ふきとり	フリーザー(左)取出口下のステンレス板	ND	0	0	陰性	ND	
4		K52	ふきとり	フリーザー(右)扉部分の横	ND	0	0	陰性	ND	
5		K53	ふきとり	フリーザー(左)機器正面の表面	ND	0	0	陰性	ND	
6		K54	ふきとり	アイスパルク容器(合成樹脂製)(内側)	ND	0	0	陰性	ND	
7		K55	ふきとり	フリーザー(右)機器正面下部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
8		K56	ふきとり	作業台(中央)の下部棚	ND	0	0	陰性	ND	
9		K57	ふきとり	フリーザー(右)機器側面下部の表面	ND	1.5	0	陰性	ND	
10		K58	ふきとり	フリーザー(左)扉部分の蝶番	ND	0	0	陰性	ND	
11		K59	ふきとり	パステライザー(真ん中)下部の取出口	ND	0	0	陰性	ND	
12		K60	ふきとり	パステライザー(真ん中)機器正面下部の表面	ND	0	0	陰性	ND	
13		K61	ふきとり	パステライザー(真ん中)蓋内側	ND	0	0	陰性	ND	
14		K62	ふきとり	パステライザー(真ん中)機器側面の表面	ND	0	0	陰性	ND	
15		K63	ふきとり	冷蔵チャンパー取手	ND	0	0	陰性	ND	
16		K64	ふきとり	冷蔵チャンパー内 冷蔵室 床面	ND	0	0	陰性	ND	
17		K65	ふきとり	冷蔵チャンパー内 合成樹脂製扉重内部	ND	0	0	陰性	ND	
18		K66	ふきとり	冷蔵チャンパー内 冷蔵室 床面	ND	0	0	陰性	ND	
19		K67	ふきとり	(ガスコンロ横)二槽シンク(左)オーバーフロー口部分	ND	0	0	陰性	ND	
20		K68	ふきとり	(ガスコンロ横)二槽シンク(右)オーバーフロー口部分	ND	0	0	陰性	ND	
21		K69	ふきとり	(ガスコンロ横)二槽シンク 下部棚	ND	0	0	陰性	ND	
22		K70	ふきとり	作業台(中央)の表面	ND	0	0	陰性	ND	
23		K71	ふきとり	ごみ箱(丸型) 底部分	ND	0	0	陰性	ND	
24		K72	ふきとり	台車(砂糖)の車輪部分	ND	0	0	陰性	ND	
25		K73	食品	製品(8月17日製造 アイスクリーム)	1.1×10 <sup>2</sup> cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
26		K74	ふきとり	冷蔵チャンパー前床面(扉左側:踏み台部分)	ND	0	0	陰性	ND	
27		K75	ふきとり	冷蔵チャンパー前床面(扉右側:タイルの目地)	ND	0	0	陰性	ND	
28		K76	食品	製品(8月29日製造 アイスクリーム)	4.5×10 <sup>2</sup> cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
C	1	K77	ふきとり	床面:フリーザー前部分	ND <sup>2</sup>	0	0	陰性	ND <sup>2</sup>	
	2	K78	ふきとり	受け皿(白色)内部:フリーザー取出口の蓋の洗浄水の受け皿	ND	0	0	陰性	ND	
	3	K79	ふきとり	受け皿(緑色)内部:フリーザー前面の洗浄水の受け皿	ND	0.5	0	陰性	ND	
	4	K80	ふきとり	パステライザー出口	ND	0	0	陰性	ND	
	5	K81	ふきとり	受け皿(白色)内部:パステライザー前面の洗浄水の受け皿	ND	0	0	陰性	ND	
	6	K82	ふきとり	プラスチックケース(青色)側面:パステライザー前床面に置かれているもの	ND	0	0	陰性	ND	
	7	K83	ふきとり	パステライザー側面:二槽シンク側	ND	0	0	陰性	ND	
	8	K84	ふきとり	パステライザー パネル部分と上面部分の隙間	ND	0	0	陰性	ND	
	9	K85	ふきとり	パステライザー 上面	ND	0	0	陰性	ND	
	10	K86	ふきとり	パステライザー 側面と前面接合部の隙間	ND	0	0	陰性	ND	
	11	K87	ふきとり	フリーザー側面:パステライザー側	0	0	0	陰性	ND	
	12	K88	ふきとり	二槽シンク(右側)内部	ND	0	0	陰性	ND	
	13	K89	ふきとり	床面:二槽シンク下部	ND	0	0	陰性	ND	
	14	K90	ふきとり	作業台	ND	0	0	陰性	ND	
	15	K91	ふきとり	台下冷蔵庫(作業台横)内部	ND	0	0	陰性	ND	
	16	K92	ふきとり	冷凍ショーケース 側面のゴムパッキン	ND	0	0	陰性	ND	
	17	K93	ふきとり	冷凍ショーケース 蓋部分のゴムパッキン	ND	0	0	陰性	ND	
	18	K94	ふきとり	車輪:作業台下部の車輪付グラニュー糖保管箱	ND	0	0	陰性	ND	
	19	K95	ふきとり	台下冷蔵庫(作業台横)側面排気口	ND	0	0	陰性	ND	
	20	K96	ふきとり	台下冷蔵庫(手洗機)内部	ND	0	0	陰性	ND	
	21	K97	ふきとり	台下冷蔵庫(手洗機)天板	ND	0	0	陰性	ND	
	22	K98	ふきとり	スポンジ(9月12日)	ND	3.0×10 <sup>7</sup>	0	陰性	ND	
	23	K99	ふきとり	二槽シンク(右側)排水口	ND	0	0	陰性	ND	
	24	K100	ふきとり	砥石の底面:側面:二槽シンク(右側)上部に置かれていたもの	ND	0	0	陰性	ND	
	25	K101	ふきとり	給湯配管接続部:二槽シンクの壁側	ND	0	0	陰性	ND	
	26	K102	ふきとり	床面:冷蔵チャンパー内部	ND	0	0	陰性	ND	
	27	K103	ふきとり	ビニールカーテン(入口の結露部分):冷蔵チャンパー内部	1.1×10 <sup>3</sup>	2.5	0	陰性	ND	
	28	K104	食品	製品(9月5日製造 水菓)	3.0×10 <sup>2</sup> cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
	29	K105	食品	製品(9月19日製造 アイスマルク)	9.0×10 <sup>2</sup> cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	
	30	K106	食品	製品(9月19日製造 ラクトアイス)	1.0×10 <sup>2</sup> cfu/g	<10 cfu/g	<10 cfu/g	陰性	<100 cfu/g	

\*1 食品以外 \*2 ND: Not Done \*3 リステリア・モノサイトゲネスを含むリステリア属菌

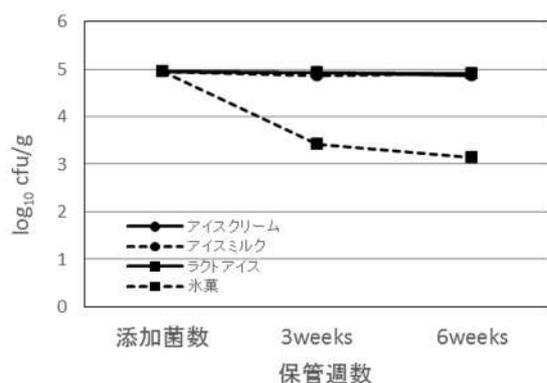


図 1 アイスクリーム類等中での *Listeria monocytogenes* の消長

氷菓の 4 種類に分類し、5 種類の LM を添加して -20 に保管して 3 週間後、6 週間後の LM の消長を調べた。その結果、高濃度 (1 g あたり  $8.9 \times 10^4$  cfu) 接種したアイスクリーム、アイスマルク、ラクトアイスの LM 菌数は 6 週間後、1 g あたり  $7.2 \times 10^4$  cfu、 $7.9 \times 10^4$  cfu、 $8.1 \times 10^4$  cfu となり、ほとんど菌数の変化は見られなかった (図 1)。

これに対し、氷菓は 6 週間後 1 g あたり  $1.4 \times 10^3$  cfu となり、他の 3 種類のアイスクリーム類に比べて約 2 オーダー低い結果となった。低濃度 (1 g あたり 0.08 cfu) 接種では、いずれのアイスクリーム類等からも LM は回収できなかった (10 cfu/g 未満)。

#### IV 考察

大阪市内のアイスクリーム製造施設および市販のアイスクリーム類等の LM 汚染調査を行った。その結果、施設から採取したふきとり水や半製品、市販のアイスクリーム類等を含む製品において、全ての検体から LM を含むリステリア属菌は検出されなかった。平成 26 年に実施した浅漬製造施設の LM 汚染調査では、製造施設から採取した検体のうち 1 施設では 24 検体のうち 8 検体から、別の 1 施設でも 33 検体のうち 1 検体から LM が検出された [13]。漬物は「漬物の衛生規範」[14]に基づいて衛生管理がなされているのに対し、アイスクリーム類、氷菓は食品衛生法で成分規格が定められており、生菌数、大腸菌群の検出で規格基準違反となることから、製造者の衛生管理の意識が高く、製造施設内は厳密に衛生管理が行われているものと推察された。食品の LM 汚染は製造工程中に起こると考えられている [2,9-11]。また、製造施設内では LM は低温で水分が多く、有機物の汚れが存在するところから検出される [15]。今回の調査で LM が検出されなかった一つの要因としては、製造施設内の床、特に冷蔵庫において水たまりなどがなく床が乾燥していたことが考えられる。

市販のアイスクリーム類等に LM を添加して -20 で 6 週間まで保管し、その消長を調べた。その結果、氷菓のみ 3 週間後に約 2 オーダーの LM 菌数の低下が見られた。アイスクリーム、アイスマルク、ラクトアイスでは 6 週間後も菌数の変化は見られなかった。Palumbo ら [16] は、牛ひき肉、七面鳥ひき肉、フランクフルト、コーン缶詰、アイスクリームおよびトマトスープに LM を添加して冷凍し、-18 で保管して生残を調べた。その結果、トマトスープのみで LM が減少した。本報告では、他の食品は全て pH が 5.8 以上であったのに対して、トマトスープのみが pH4.7 と低かったこと、また選択培地上の LM の発育が顕著に低かったことから、トマトスープ中で冷凍された LM が損傷していると推察している。我々が実施した添加回収試験で使用した氷菓にはミカンが含まれており、簡易試験紙で pH を調べたところ約 4 であった。アイスクリーム、アイスマルク、ラクトアイスは約 7 であった。LM が増殖可能な最低 pH は 4.4 とされている [9]、これは食品中でなく培地中での検討結果である。乳脂肪分、乳固形分の少ない食品中では低い pH で冷凍されることにより、LM は損傷を受けると考えられる。氷菓以外のアイスクリーム類では 6 週間後も LM 菌数の低下は見られなかった。また、低濃度接種 (0.08 cfu/g) のアイスクリーム類等も、ラクトアイス以外は増菌培養により LM が検出されたことから、これらの食品中で LM は死滅せずに生残していることが確認された。ラクトアイスの増菌培養で LM が検出されなかったのは、選択性のない増菌培地を使用したためにラクトアイス中にわずかに存在する他の細菌の影響で LM がマスクされてしまったことが原因と考えられる。

大阪市内のアイスクリーム製造施設 3 施設の LM 汚染調査を実施した結果、採取したすべての検体から LM は検出されなかった。また、市販のアイスクリーム類等からも LM は検出されなかった。アイスクリーム類等への LM の添加実験の結果、氷菓を除くこれらの食品中で冷凍保管中に菌数の低下は見られなかった。アイスクリームは賞味期限の表示を省略することができるため、市場に流通する期間が長く、製品が一度 LM 汚染をうけるとこれらと接触する機会も多くなる。そのため、低濃度の汚染であってもリステリア症を引き起こすリスクがあると考えられることから、製造者はアイスクリーム類等を LM に汚染させないよう製造環境に細心の注意を払う必要がある。

(本研究は、平成 28 年度健康局生活衛生課特別調査研究「既製食品の汚染源追究調査」として実施されたものである。)

**謝辞** 本研究の遂行にあたり、アイスクリーム類およびふきとり材料からの細菌検査に関して後藤薫博士、平山

照雄氏、平井有紀氏、瀧野薫氏に大変お世話になりました。ここに深謝致します。

### 参考文献

- 1) 光山正雄. 8. リステリア症集団発生. 化学療法の領域 2012; **28**(6): 1288-1296.
- 2) 中村寛海. 食品媒介リステリア症と食品製造施設のリステリア汚染 リステリアの施設定着株を取り巻く話題 . 日本食品微生物学会雑誌 2015; **32**(1): 1-11.
- 3) Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., *et al.* Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging Infectious Diseases* 2011; **17**: 7-15.
- 4) Greig J. D, Ravel A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology* 2009; **130**: 77-87.
- 5) Norton, D. M., and Burden, C. R. Foodborne listeriosis. : *Listeria*, listeriosis, and food safety, Third edition. Ryser, E.T. and Marth, E.H. (eds), p. 305-356, CRC Press, Boca Raton (2007).
- 6) Centers for disease control and prevention. Multistate outbreak of listeriosis linked to Blue Bell creameries products (final update). <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/ice-cream-03-15/index.html>
- 7) Chen, Y., Allard, E., Wooten, A., Hur, M., Sheth, I., *et al.* Recovery and growth potential of *Listeria monocytogenes* in temperature abused milkshakes prepared from naturally contaminated ice cream linked to a listeriosis outbreak. *Frontiers in Microbiology* 2016; **7**: 764.
- 8) Chen, Y., Burall, L. S., Macarasin, D., Pouillot, R., Strain, E., *et al.* Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ice cream linked to a listeriosis outbreak in the United States. *Journal of Food Protection* 2016; **79**: 1828-1832.
- 9) 食品安全委員会. 微生物・ウイルス評価書 食品中のリステリア・モノサイトゲネス.(2013年5月)
- 10) Tompkin, R.B.. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection* 2002; **65**: 709-725.
- 11) Wesley, I. V.: Listeriosis in Animals.: *Listeria*, listeriosis, and food safety, Third edition. Ryser, E.T. and Marth, E.H. (eds), p. 55-84, CRC Press, Boca Raton (2007).
- 12) Aznar, R., Alarcon. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers. *Systematic and Applied Microbiology* 2002; **25**: 109-119.
- 13) 大阪市立環境科学研究所 調査研究課 微生物保健グループ. 既製食品の汚染源追究調査 浅漬製造施設のリステリア汚染調査 . 平成 26 年度特別調査研究報告書.(2014)
- 14) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長: 漬物の衛生規範の改正等について . 食安監発 1213 第 2 号 (平成 25 年 12 月 13 日)
- 15) Kornacki, J. L., Gurtler, J. B. Incidence and control of *Listeria* in food processing facilities.: *Listeria*, listeriosis, and food safety, Third edition. Ryser, E.T. and Marth, E.H. (eds), p. 681-766, CRC Press, Boca Raton (2007).
- 16) Palumbo, S. A., and Williams, A. C. Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. *Food Microbiology* 1991; **8**: 63-68.

(WEB サイトの内容は 2017 年 4 月 3 日に確認した)