ピザ用チーズ中の *Listeria monocytogenes* の 保存および加熱調理時の挙動

斎藤章暢^{*1}・徳丸雅一^{*1}・青木敦子^{*1}・安藤佳代子^{*1}
正木宏幸^{*1}・板屋民子^{*1}・丸山 務^{*2}

(^{*1} 埼玉県衛生研究所, ^{*2} 国立公衆衛生院)

(受付 平成5年11月4日)

(受理 平成6年2月22日)

Behavior of *Listeria monocytogenes* in Shredded Cheese During Storage and Cooking

Akinobu SAITO^{*1}, Yoshikazu TOKUMARU^{*1}, Atsuko AOKI^{*1}, Kayoko ANDO^{*1},
Hiroyuki MASAKI^{*1}, Tamiko ITAYA^{*1} and Tsutomu MARUYAMA^{*2}

(^{*1} Saitama Institute of Public Health, 639-1, Kamiokubo, Urawa-shi, Saitama 338)

(^{*2} Institute of Public Health, 4-6-1, Shiroganedai, Minato-ku, Tokyo 108)

Listeria monocytogenes (*L.m.*) in shredded cheese was examined for its growth behavior during cold storage and cooking. During storage at 5°C, the concentration after inoculation decreased up to day 20 and thereafter increased. On day 77, the concentration was recovered to almost the same level as that at the time of inoculation, in shredded cheese inoculated with 10^4 or 10^6 /g *L.m.* and increased by 1-2 orders in shredded cheese inoculated with 10^1 /g *L.m.*. Also during storage at 10°C, the inoculated *L.m.* decreased up to day 20 and thereafter increased, each bacterial concentration increased by 1-4 orders. Organoleptically, fungigenesis occurred from days 20 and 15 at 5°C and 10°C, respectively. The number of bacteria surviving in the pizza inoculated with 10^6 /g *L.m.* was 3.6-23/100 g after heating at 200°C for 5 min, while heating at 250°C for 5 min caused the death of all the inoculated bacteria, that is 10^6 /g. The change of the temperature at the center of the pizza while cooking tended to decrease with the increases in the temperature of storage and in the volume of ingredients, and these changes were also macroscopically recognizable.

The above findings suggested that *L.m.* in shredded cheese does not proliferate during the allowable period of storage before consumption and becomes extinct with general methods of cooking.

Key words: *Listeria monocytogenes*, Shredded cheese, Pizza, Cooking, Central temperature.

緒 言

現在、人のリステリア症は食品を介して感染することが明らかとなっている^{2,6,7,10}。その原因食品は、畜産食品が中心であり、ナチュラルチーズによる感染報告が多い^{6,7}。しかし、それらはすべてソフトタイプのナチュラルチーズによるものである。また、リステリア症の起因菌である *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) の

チーズにおける汚染状況は、一般にハードタイプのものよりソフトタイプのチーズからの検出率が高いことが知られている^{1,4,5,8,11}。

最近、著者らは埼玉県内のチーズ製造工場で生産された主としてハードタイプのナチュラルチーズを原料としているピザ用シュレッドチーズから *L. monocytogenes* を検出した。当該チーズによるリステリア症は発生していないが、チーズの安全性を確保する目的から、低温保存時ならびにピザ加熱調理時のチーズ中の *L. monocytogenes* の挙動、さらに、チーズのみおよび種々の具

〒338 浦和市上大久保 639-1

〒108 東京都港区白金台 4-6-1

を載せた状態での温度変化についても実験的に検討した。

材料および方法

1. 供試菌株

実験に供試した *L. monocytogenes* の菌株は、当所でピザ用ナチュラルチーズから分離した CH190 (血清型 4b) および東京都立衛生研究所より分与を受けたピザ用ナチュラルチーズ由来の C3 (血清型 1/2b) を用いた。この菌株を使用に当たって Brain Heart Infusion broth (BBL) で 30℃, 18~20 時間, 2 回, 継代培養した。

2. 使用培地

増菌培地には *Listeria* Enrichment Broth (EB; Difco) を, 分離培地には Oxford 寒天培地 (Oxoid) を用いた。

3. *L. monocytogenes* 接種チーズの低温保存実験

実験に用いたチーズは, *Listeria* 属菌に汚染されていないことを確認した市販のピザ用シュレッドタイプナチュラルチーズである。

名菌株をチーズ 1 g 当たり 10^1 (以下低濃度), 10^4 (以下中濃度), 10^6 (以下高濃度) レベルの 3 濃度となるように添加したものを試料とし, それぞれ 5℃ ならびに 10℃ に保存して経日的に直接平板法または MPN 3 本法による *L. monocytogenes* 菌数および標準寒天平板による一般生菌数を測定した。また, 実験開始時および終了時 (77 日目) の水素イオン濃度 (pH) を, 岩城硝子 (株) 製 M-225 pH メーターを用いて測定した。

4. ピザの加熱調理実験

1) チーズのみを載せたピザの中心温度変化

L. monocytogenes 未接種のチーズ 40 g を直径 125 mm, 重量 50 g のピザ用クラストに載せてピザを各条件で 3 枚ずつ作製し, 中心温度が 10℃ と 20℃ になるように保管した。加熱は, 庫内をあらかじめ設定温度まで上昇させたオープンレンジ (シャープ RE-711) で 200℃ と 250℃ 各々 5 分間行い, 1 分ごとの中心温度の変化をみた。また, 開始時に 10℃ であったものは, 加熱終了後庫外にてさらに 2 分間測定を継続した。

中心温度は, 巾 2 mm, 長さ 50 cm のフィルム状センサーを接続した安立 HL-100 を用い, ピザ中央部でチーズ直下の温度を測定し, 3 枚ずつの平均値とした。

2) 種々の条件におけるピザの中心温度変化

通常, 家庭で食されるピザは, 具としてチーズ以外にピザソース, 野菜などが加えられている。これらの具が添加されたときの同一加熱条件下での調理時の温度変化を検討するために, チーズ 40 g に, 市販のピザソース 15 g, スライスしたタマネギとピーマン 5 g を加えたものを準備し, ピザの中心温度が 0℃, 10℃ および 20℃ になるように保管した。20℃ については, 前記の具のほかに, ツナ 15 g を加えたものについても検討した。加熱は 250℃ で 5 分間行い, その後庫外で 5 分間放置し, その間 1 分間隔で中心温度測定を行った。

Fig. 1. Growth of *L. monocytogenes* on shredded cheese at 5℃.

Fig. 2. Growth of *L. monocytogenes* on shredded cheese at 10℃.

3) *L. monocytogenes* 接種チーズによるピザ加熱調理実験

前記の低温保存実験で用いた低, 中, 高の各濃度に調製した *L. monocytogenes* 接種チーズ各 40 g をクラストに載せてピザを作製し, 200℃ 5 分間オープンで加熱した。加熱終了後直ちにピザをストッカー用ポリ袋に入れて, 冷水中で急冷し, *L. monocytogenes* の生残菌数を直接平板法または MPN 3 本法により測定した。また, 高濃度接種チーズのピザについては, 250℃ 加熱も行い, 1 分ごとに 5 分間の *L. monocytogenes* 菌数の経時の変化をみた。これらはすべて 3 枚ずつ実施し, 菌数はその平均とした。

結 果

1. *L. monocytogenes* 接種チーズの低温保存実験

L. monocytogenes 接種チーズを 5℃ および 10℃ に 77 日目まで保存した時の *L. monocytogenes* 菌数の推移を Fig. 1 および Fig. 2 に示した。

5℃ 保存では, 20 日目まで *L. monocytogenes* 菌数は減少しており, 特に中濃度接種では 20 日目には $<10/g$ まで減少した。しかしその後増加傾向を示し, 77 日目には $10^4 \sim 10^5/g$ と接種時濃度とほぼ同レベルとなった。低および高濃度接種でも 56 日目から増加傾向を示し, 77 日目に低濃度接種では $10^2 \sim 10^3/g$ と接種時より 1~

2 オーダー増加し、高濃度接種も $10^5 \sim 10^6/\text{g}$ と接種時濃度と同レベルとなった。

10℃ 保存では、20 日目まで *L. monocytogenes* 菌数は減少傾向を示したが、その後増加に転じて 77 日目には各接種菌濃度とも当初よりも 1~4 オーダー高くなった。

一般生菌数は、10℃ 保存では 14 日目、5℃ 保存では 28 日目にはほぼ最大値となり、その後そのままのレベルで推移した。

pH は、実験開始時には 5.9~6.0 であったが、77 日目の実験終了時には 5℃ 保存が 7.6~7.9、10℃ 保存が 7.9~8.1 に上昇していた。

肉眼的には、10℃ 保存では 14 日目、5℃ 保存では 20 日目ごろからカビの発生が認められ、28~35 日目以降はチーズ表面はカビにおおいつくされていた。

2. ピザの加熱調理実験

1) チーズのみを載せたピザの中心温度変化

ピザの中心温度の変化は、Fig. 3 に示すとおりである。

加熱開始時の温度が 20℃ と 10℃ では、いずれの加熱温度でも 10℃ の方が低い温度で推移する傾向がみられた。20℃ で開始した場合の 250℃ 加熱では、4 分後に 80℃ を越え、5 分後の最高温度は 98.2℃ であったが、200℃ 加熱では最高温度が 5 分後の 82.1℃ であった。10℃ で開始したピザを 5 分加熱後庫外で放置した場合の中心温度は、いずれの加熱温度でも終了後 2 分間は終了時点の温度が保持されていた。

加熱 5 分後の肉眼的な状態は、250℃ ではチーズ表面が色づき、焦げ目がついていたが、200℃ ではチーズが溶けたのみで、表面の色調に変化はみられなかった。

2) 種々の条件におけるピザの中心温度変化

各条件における中心温度変化を Fig. 4 に示した。

加熱開始時の温度との関係を見ると、20℃ 保管では、最高温度が 72℃ であり、10℃ および 0℃ と低温に保管されたものでは、チーズのみの場合と同様に、経時的な温度の上昇も低く推移し、最高温度は 60℃ に達しなかった。

また加熱開始時の温度が同じ 20℃ では、ツナ 15 g を加えて具を増やしたものの方が、野菜のみに比べて、最高温度 4~5℃ 低かった。肉眼的なピザの状態は、すべての条件ともチーズは溶けていたが、焦げ目はなく表面の色調に変化はなかった。

3) *L. monocytogenes* 接種チーズによるピザ加熱調理実験

L. monocytogenes 接種ピザの加熱調理後の同菌の検出状況を Table 1 に示した。

接種した *L. monocytogenes* は、低および中濃度では 200℃ 5 分間の加熱調理後に検出されなかったが、高濃度接種の場合、CH190 株では 3 回中 3 回、C3 株では 3 回中 2 回の割合で接種菌が検出されたが、菌量は 3.6~

Fig. 3. Movement for the central temperature of pizza during and after cooking with 200℃ and 250℃ oven: Times when the cooking were finished are shown by arrow.

Fig. 4. Movement for the central temperature of pizza on various ingredients and starting temperature during and after cooking with 250℃ oven: Times when the cooking were finished are shown by arrow.

Table 1. Recovery of *L. monocytogenes* from pizza experimentally inoculated *L. monocytogenes* CH 190 and C3 after cooking at 200℃ and 250℃ oven for 5min

Inoculation level	<i>L. monocytogenes</i> strain No. (serotype)	200℃	250℃
10 ¹ /g	CH190 (4b)	0/3 ^a	NT ^b
	C3 (1/2b)	0/3	NT
10 ⁴ /g	CH190 (4b)	0/3	NT
	C3 (1/2b)	0/3	NT
10 ⁶ /g	CH190 (4b)	3/3 (3.6, 3.6, 23) ^c	0/3
	C3 (1/2b)	2/3 (3.6, 3.6)	0/3

^a) Number of positive samples/number of samples examined.

^b) Not tested.

^c) Surviving number of *L. monocytogenes*/100 g.

23/100 g とわずかであった。また、高濃度接種ピザでのみ行った 250℃ 5 分の加熱調理では、*L. monocytogenes* は増菌培養においても検出されなかった。

250℃ 加熱による *L. monocytogenes* 菌数の経時的変化および Fig. 3 でみた加熱中の中心温度変化を同一グラフ上にまとめ、Fig. 5 に示した。

L. monocytogenes の菌数は、加熱前には 10⁶ オーダーであったものが加熱 3 分後には半減し、4 分後には不検出となった。それぞれの中心温度は、3 分後が 55.3℃、

Fig. 5. Survival curve of *L. monocytogenes* from pizza experimentally inoculated *L. monocytogenes* CH 190 and movement for the central temperature of pizza during cooking at 250°C oven for 5 min.

4分後が82.6°Cであった。

考 察

従来から食品媒介リステリア症の原因食品としてのナチュラルチーズの重要性は、ソフトタイプのものを中心に考えられている。これは過去における事例報告およびナチュラルチーズの汚染状況からも当然のことと言える。これに対して、実験的に原料乳に *L. monocytogenes* を接種して作製したチェダーやパルメザンなどのハードタイプのナチュラルチーズでは、熟成中に *L. monocytogenes* 菌量が減少していること^{9, 13)}、さらにピザ用チーズは加熱して食することなどを考慮するとピザ用チーズがリステリアの原因となる可能性は低いと推察される。しかしながら、*L. monocytogenes* に汚染されたピザ用チーズ中で *L. monocytogenes* が増殖しないこと、および加熱調理によって *L. monocytogenes* が死滅するという実験的裏付けはない。

L. monocytogenes 接種チーズを5°Cおよび10°Cに保存した場合、最終的には *L. monocytogenes* 菌数は増加していたが、増加傾向を示したのはカビの発生が認められてからで、それまでは減少傾向にあった。船渡川らは、*L. monocytogenes* を接種した原料乳を用いて、カマンベールチーズを製造し、*L. monocytogenes* の生残性をみているが、白カビの増殖によりチーズのpHが上昇し、*L. monocytogenes* が増殖することを報告している³⁾。今回我々の実験においても、*L. monocytogenes* 菌数が減少から増加に転じたが、その理由としては、カビの発生によりpHが上昇したことが推察された。

ピザの調理条件に関しては様々な条件が考えられるが、今回我々は某食品メーカーの調理マニュアルを基にして2種類の加熱温度を設定した。チーズのみを載せたピザの中心温度は、250°C加熱では4分後に82.6°Cとなり、200°C加熱では5分後に82.1°Cまで上昇した。しかし、実際のピザ調理においては、クラストにはピザソースを塗布した上に様々な具が加わる。また、調理直前のピザの温度状態も冷凍、冷蔵、室温など異なった状態が考えられる。そこでそれら条件の異なったピザ調理

時の中心温度を測定した。その結果、すべての条件下でチーズのみをのせた場合の加熱調理実験の200°C加熱の中心温度を下回っていた。一方、*L. monocytogenes* 接種チーズによるピザの調理実験において、250°C5分間の加熱調理を実施すれば10⁶/gの大量の *L. monocytogenes* が存在していても4分後にはすべて死滅していることが確認されたが、200°C5分間の加熱調理では、10⁶/g接種において100g中3.6~23個とわずかながら *L. monocytogenes* の生残が認められた。これらの結果と先に述べた *L. monocytogenes* 未接種ピザにおける中心温度からみると、250°C加熱のように中心温度が80°Cを越える温度域に達し、さらにその温度が保持される必要があると言える。また、このことは具の増加や保存時の温度によっては、調理後の *L. monocytogenes* 生残の可能性があることも示唆している。加熱調理実験で *L. monocytogenes* がすべて死滅していた250°C5分間加熱のピザと、*L. monocytogenes* が生残していた200°C5分間加熱および各種条件下における中心温度が低かったピザとの肉眼的差異としては焦げ目の有無がある。そこで「250°C5分間加熱」という調理条件を肉眼的に判断するとしたら、「ピザの表面に焦げ目ができる程度に十分加熱する」ということになるのではないだろうか。前述のマニュアルにも、表面の50%に焦げ目がついてる状態という指示事項の記載があったように、実際の調理行為においては、加熱の温度や時間はあくまでも目安とし、調理完了の最終的判断は肉眼的変化によって行うべきである。ナチュラルチーズ中の *L. monocytogenes* 汚染菌量に関する報告^{5, 8, 12)}では<500~10⁷/gと様々であるが、それらはすべてソフトタイプを中心としたもので、ピザ用チーズおよびその原料となるハードタイプ系のナチュラルチーズに関する報告はない。著者らによって *L. monocytogenes* が検出されたピザ用チーズの事例では、-20°C7日間冷凍保存した陽性検体から定量試験を試みたが、4検体の陽性検体すべてが菌量が少なく定量不能であった。ピザ用チーズが10⁶/gもの大量の *L. monocytogenes* に汚染されている可能性は低い。

以上のことからピザ用ナチュラルチーズが仮に *L. monocytogenes* に汚染されていても賞味可能期間内に増殖することはないこと、および家庭での調理に際しても、焦げ目ができる程度の十分な加熱によって *L. monocytogenes* は死滅することが確認されたものと考えられる。

要 約

ピザ用ナチュラルチーズの安全性を検討する目的から、低温保存時ならびに加熱調理時のチーズ中の *L. monocytogenes* の挙動をみた。

1. 5°C保存では各接種菌濃度とも、菌数は20日目まで減少した後増加傾向を示し、77日目には10⁶、10⁴/g接種のチーズでは接種時とほぼ同レベルまで回復し、10¹/g接種のものでは1~2オーダー増加していた。

10℃ 保存でも 20 日目まで接種菌種は減少したが、その後増加して 77 日目には各菌濃度とも 1~4 オーダー高くなった。官能的には 5℃ では 20 日目、10℃ では 14 日目からカビの発生が認められた。

2. ピザ調理時の中心温度の変化は、ピザの加熱前の保存温度および具の量によって影響を受ける傾向がみられた。また、チーズのみを載せたピザの加熱調理後の肉眼的な状態は、200℃ 加熱では変化がなかったが 250℃ では焦げ目ができていた。

3. *L. monocytogenes* 接種ピザの加熱調理後の接種菌の生残性は、200℃ 5 分間の加熱では 10^6 /g の接種菌量において 3.6~23/100 g の生残が認められたが、250℃ 5 分間の加熱では 10^6 /g の接種菌量でもすべて死滅していた。

以上のことから、ピザ用チーズ中の *L. monocytogenes* は賞味可能な保存期間中に増殖することはなく、焦げ目ができる程度の加熱調理を十分に行えば死滅することが示唆された。

謝 辞

菌株の分与ならびに血清型別を実施していただいた、東京都立衛生研究所乳肉衛生研究科飯田 孝博士に深謝致します。

文 献

- 1) Beckers, H. J., Soentoro, P. S. S. and Delfgouvan Asch, E. H. M.: The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. *Inter. J. Food Microbiol.*, **4**, 249-256 (1987).
- 2) Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. and Reingold, A. L.: Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New Engl. J. Med.*, **312**, 404-407 (1985).
- 3) 船渡川圭次, 羽石博行, 針谷光二: *Listeria monocytogenes* のチーズ中における抵抗性とマウス感染実験. 食品衛生研究, **42**, 53-58 (1992).
- 4) Gledel, J.: Epidemiology and significance of listeriosis in France. Listeriosis-joint WHO/ROI consultation on prevention and control, In Schonberg, A. (eds.), p. 9-20 West Berlin. (1986).
- 5) Greenwood, M. H., Roberts, D. and Burden, P.: The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products; a national survey in England and Wales. *Inter. J. Food Microbiol.*, **12**, 197-206 (1991).
- 6) Kvenberg, J. E.: Outbreaks of listeriosis/*Listeria*-contaminated foods. *Microbiol. Sci.*, **5**, 355-358 (1988).
- 7) Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D. W., Yonekura, M. L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L., Kleks, A. and Broome, C. V.: Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New Engl. J. Med.*, **319**, 823-828 (1988).
- 8) Pini, P. N. and Gilbert, R. J.: The occurrence in the U. K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. *Inter. J. Food Microbiol.*, **6**, 317-326 (1988).
- 9) Ryser, E. T. and Marth, E. H.: Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. *J. Food Prot.*, **50**, 7-13 (1987).
- 10) Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Martin, R. S., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. and Broome, C. V.: Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.*, **308**, 203-206 (1983).
- 11) 竹葉和江, 梅木富士郎, 村上文子, 仲真晶子, 井草京子, 丸山 務, 松本昌雄: 輸入チーズの衛生学的品質評価. 東京衛生年報, **42**, 102-111 (1991).
- 12) Van Renterghem, R., Waes, G. and de Ridder, H.: Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese by DNA-colony hybridization. *Milchwissenschaft*, **45**, 426-427 (1990).
- 13) Yousef, A. E. and Marth, E. H.: Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of Colby cheese. *J. Food Prot.*, **50**, 7-13 (1987).