生ハムにおける水分活性と乳酸ナトリウムによる *Listeria monocytogenes* の制御

上崎(堀越)菜穂子^{1*}, 鮫島 隆¹, 大森康雄², 府中英孝², 三明清隆², 森岡 豊³,
小谷健二³, 小齊喜一³, 後藤清太郎⁴, 渡辺 至⁴, 中島誠人⁵, 猪口由美⁵,
西坂嘉代子⁵, 五十君静信⁶, 新村 裕⁵, 服部昭仁⁵

¹ プリマハム株式会社

² 丸大食品株式会社

³ 伊藤ハム株式会社

⁴ 日本ハム株式会社

⁵ 一般社団法人食肉科学技術研究所

⁶ 国立医薬品食品衛生研究所

Effects of Water Activity and Sodium Lactate on the Growth of *Listeria monocytogenes* in Raw Ham

Naoko Kamisaki-Horikoshi^{1*}, Takashi Sameshima¹, Yasuo Omori², Hidetaka Fuchu²,
Kiyotaka Miake², Yutaka Morioka³, Kenji Kotani³, Kiichi Kosai³, Seitaro Goto⁴,
Itaru Watanabe⁴, Yoshito Nakashima⁵, Yumi Inoguchi⁵, Kayoko Nishizaka⁵,
Shizunobu Igimi⁶, Yutaka Shinmura⁵ and Akihito Hattori⁵

¹ PRIMA Meat Packers, Ltd., 635 Nakamukaihara, Tsuchiura-shi, Ibaraki 300-0841

² Marudai Food Co., Ltd., 21-3 Midori-cho, Takatsuki-shi, Osaka 569-8577

³ Itoham Foods Inc., 1-2-1 Kubogaoka, Moriya-city, Ibaraki 302-0104

⁴ Nippon Meat Packers, Inc., 2-1-1 Midorimachi, Chikusei-shi, Ibaraki 308-0042

⁵ Japan Meat Science & Technology Institute, 1-5-6 Ebisu, Shibuya-ku, Tokyo 150-0013

⁶ National Institute of Health Science, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501

To clarify the effects of water activity (a_w) and sodium lactate on the growth of *Listeria monocytogenes* in raw ham, an unheated processed meat product, *L. monocytogenes* ATCC 49594 (serotype 4b, Scott A) was inoculated into raw ham and its growth was investigated in five laboratories. *L. monocytogenes* did not grow in raw ham with an a_w of 0.93 ($0.930 \leq a_w < 0.940$) in any of the laboratories during storage for 56 days at 10°C. It is presumed that an a_w of 0.93 in raw ham acts additively and/or synergistically with the pH of meat, salt content, nitrite and low-temperature storage (10°C) to inhibit the growth of *L. monocytogenes*. On the other hand, in raw ham with an a_w of 0.94 ($0.940 \leq a_w < 0.950$), *L. monocytogenes* growth was completely inhibited by the addition of 2% sodium lactate. As a result, utilization of sodium lactate in raw ham produced in accordance with the Japanese Food Sanitation Law is valuable for the inhibition of *L. monocytogenes* growth.

(Received Feb. 27, 2013; Accepted Apr. 23, 2013)

Keywords : unheated processed meat product, raw ham, *Listeria monocytogenes*, water activity, sodium lactate

キーワード : 非加熱食肉製品, 生ハム, *Listeria monocytogenes*, 水分活性, 乳酸ナトリウム

¹ 〒300-0841 茨城県土浦市中向原 635

² 〒569-8577 大阪府高槻市緑町 21-3

³ 〒302-0104 茨城県守谷市久保ヶ丘 1-2-1

⁴ 〒308-0042 茨城県筑西市みどり町 2-1-1

⁵ 〒150-0013 東京都渋谷区恵比寿 1-5-6

⁶ 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

* 連絡先 (Corresponding author) naoko.kamisaki@primaham.co.jp

Listeria monocytogenes は自然界に広く分布し、髄膜炎や敗血症などを主徴とするリステリア症を起こす人畜共通感染症の起因菌の一つである¹⁾。1980年代に入り、欧米諸国でコールスロー、殺菌乳、ナチュラルチーズなどの食品を感染源とした *L. monocytogenes* による集団食中毒事例が相次いで報告された²⁾³⁾。国内では、2001年に北海道でナ

チュラルチーズによる感染事例が初めて報告された⁴⁾。2003年には厚生労働省の研究班により国内におけるリステリア症の患者数について調査され⁵⁾、FAO/WHOのリステリアのリスクアセスメントの最終レポート(2004年)と比較するとヨーロッパにおける患者数とそれほど違いがないことが示された⁶⁾。さらに、国内におけるリステリアの食品汚染実態は、菌数は低いものの広範囲にわたっており、特に食肉では*L. monocytogenes*の汚染率が高く、その加工品である生ハムなどの非加熱食肉製品からも低率ではあるが検出されることが報告された^{7,8)}。

2009年CODEX委員会は、ready-to-eat食品(以下、RTE食品)における*L. monocytogenes*の基準について、製造終了時から販売時点までに*L. monocytogenes*が増殖する食品では、不検出/25gとすること、また増殖しない食品については100 CFU/gを超えないことを示した⁹⁾。一方、国内では、2012年1月より、食品安全委員会で*L. monocytogenes*の食品健康影響評価の検討が開始されている⁹⁾。

食品でのリステリアの増殖を防ぐためには、pH4.4未満もしくは水分活性(以下、 a_w)0.92未満にする必要があることが報告されている¹⁾。一方、食肉製品では、食塩、亜硝酸塩、pH、 a_w 、保管温度などの微生物制御要因が複数関与し、これらが補完し合うことで微生物の増殖を抑制することが報告されている¹⁰⁾。食品衛生法¹¹⁾では、非加熱食肉製品に分類される生ハムについても、これら微生物制御要因を組み合わせることにより、微生物学的な安全性の確保が図られている。すなわち、pH6.0以下の原料肉を一定量以上の食塩および亜硝酸塩で塩漬した後、熟成、乾燥にて a_w 0.95未満にし、10℃以下で販売することが求められている。これまで著者ら¹²⁾は、生ハムでの*L. monocytogenes*の挙動を調査し、亜硝酸ナトリウムが含まれ、pH6.0以下でかつ a_w 0.93以下であれば、10℃保管60日間*L. monocytogenes*が増殖しないことを示した。しかし、「製造終了時から販売時点までに*L. monocytogenes*が増殖する」か「増殖しない」かを示すためには、原料肉の個体差や各試験機関の製造方法によるばらつきも考慮にいれながら、一試験機関だけではなく、複数機関で製造した生ハムについて検証していくことが重要であると考えられ、さらなる検討が求められていた。

一方、乳酸ナトリウムは、食品に広く利用される食品添加物で、生ハムを含む食肉製品に添加することで、*L. monocytogenes*の増殖を抑制することが知られている^{13)~16)}。しかし、乳酸ナトリウムについて、国内で生産されている生ハムにおける a_w との関係を詳細に検討した例は少ない。

そこで、本研究では、生ハムの保管中における a_w および乳酸ナトリウムによる*L. monocytogenes*の制御についての試験を5試験機関で実施したので報告する。

実 験 方 法

1. 液体培地における*L. monocytogenes*の増殖に及ぼす乳酸ナトリウムの影響

試験用生ハムにおける水分活性および乳酸ナトリウムによる*L. monocytogenes*の制御試験に用いる菌株を選定するため、血清型の異なる複数菌株について液体培地での乳酸ナトリウムに対する感受性の比較試験を行った。

(1) 試験機関

試験は、本研究に参加した5機関(A, B, C, D, Eと示す)のうち、D, Eの2機関で行った。

(2) 供試菌

L. monocytogenes ATCC49594(血清型4b, ScottA), PSC-R100121(血清型1/2a, 鶏肉からの分離株), PSC-R100123(血清型1/2b, 鶏肉からの分離株), PSC-R100126(血清型1/2c, 鶏肉からの分離株)の4株を使用した。本実験では10mlのBrain Heart Infusion(Difco, 以下BHI)で35℃, 24時間、静置培養の条件で3代継代培養したものをを用いた。

(3) 供試添加物

乳酸ナトリウムは、発酵乳酸ナトリウム60%溶液(ピュラック・ジャパン)を使用した。

(4) 液体培地における*L. monocytogenes*の増殖に及ぼす乳酸ナトリウムの感受性比較実験

試験は、荻原ら¹³⁾の手法を参考に行った。すなわち、Nutrient Broth(Difco)を、非加熱食肉製品の原料肉基準であるpH6.0となるように1N HClを用いて調整した後、食塩を市販生ハムの平均的な食塩含量である5%および平均値の2σ下限値付近の3%となるよう添加したものを基礎培地とした¹⁷⁾。基礎培地に乳酸ナトリウムを最終濃度1.00, 2.00, 3.00%となるようそれぞれ添加し、乳酸ナトリウム無添加区と合わせて8種類の調製培地を作製した。3代継代培養した4株の*L. monocytogenes*は、必要に応じて滅菌ペプトン加生理食塩水を用いて希釈し、調製培地中でそれぞれ 10^5 CFU/mlになるよう接種して、35℃で24時間静置した。静置後、必要に応じて静置後の培地の10倍段階希釈試料液を調製した。各10倍段階希釈試料液1mlについて、標準寒天培地(日水製薬)を使用した混釈平板培養法で35℃, 24時間培養し、1ml当たりの細菌数を算定した。

2. 試験用生ハムにおける水分活性および乳酸ナトリウムによる*L. monocytogenes*の制御

(1) 試験機関

試験は、5機関で行った。

(2) 供試菌

1. の試験結果から、*L. monocytogenes* ATCC49594(血清型4b)を選択して使用した。供試菌株は各試験機関にてそれぞれ10mlのBHIで35℃, 24時間、静置培養の条

件で3代継代培養したものを用いた。

(3) 試験用生ハムの製造方法および *L. monocytogenes* 接種方法

食品衛生法の製造基準¹¹⁾に従い、各試験機関にて以下いずれかの製造方法で試験用生ハム原木を作製した。どちらの製造方法で作製するかは各試験機関に委ねた。すなわち、原料肉は pH 6.0 以下の豚肉塊を使用し、塩漬けは肉重量に対し、食塩 6%, 亜硝酸ナトリウム 200 ppm となるように肉表面に塗布するか、もしくは食塩 15%, 亜硝酸ナトリウム 200 ppm の水溶液に浸漬し、 a_w 0.97 未満になるまで、冷蔵保管 (5℃ 以下) した。その後、表面を水洗し、所定の a_w が得られるまで乾燥した後、以降の試験に供した。 a_w の均一性を保つため、所定の a_w となった試験用生ハム原木から表面 5 mm 以上を無菌的に取り除いた後、フードカッターで粉碎した。これらに最終濃度が 0.00, 1.00, 2.00 あるいは 3.00 % となるように乳酸ナトリウムを添加し、再度フードカッターで均一に混合して試験用生ハムとした。

食品衛生法で保存温度 10℃ 以下の生ハムは、 a_w を 0.95 未満にすることが求められているため、乳酸ナトリウム添加後の a_w は 0.94 ($0.940 \leq a_w < 0.950$) と 0.93 ($0.930 \leq a_w < 0.940$) の 2 試験区を設けた。

試験用生ハムは、*L. monocytogenes* 接種試験用と成分分析用に分け、成分分析用はそのまま真空包装して 10℃ に保管した。*L. monocytogenes* 接種試験は、供試菌株を滅菌生理食塩水に適宜希釈して、試験用生ハムでの *L. monocytogenes* 数が 10^3 CFU/g になるように接種し、よく混合した後、真空包装し 10℃ で 56 日間保管した。

(4) 試験用生ハムの成分分析

10℃ で保管した試験用生ハムから 0, 28 および 56 日に各 a_w 区および乳酸ナトリウム添加区 2 検体を採取し、pH, 食塩濃度, a_w , 亜硝酸根, 乳酸ナトリウム量を測定した。各検体をホモジナイザーで粉碎し、均一化したものを定量採取して成分分析に供した。2 検体の各成分分析の結果からその平均値を求めた。

i) pH 測定

試料 10 g に精製水 90 ml を加えてよく混合したものをろ過し、pH メーター (試験機関 A: F-54, 堀場製作所, 試験機関 B: BASIC, Denver Instrument, 試験機関 C: HM-30R, 東亜ディーケーケー, 試験機関 D: F-52, 堀場製作所, 試験機関 E: F-15, 堀場製作所) でガラス電極法により測定した¹⁸⁾。

ii) 食塩濃度測定

ホルハルト法¹⁹⁾により塩化物イオン濃度を求め、食塩含量を算出した。

iii) 水分活性測定

a_w はコンウェイユニット法により測定した²⁰⁾。

iv) 亜硝酸根の測定

亜硝酸根は、ジアゾ化法による発色を分光光度計 (540

nm, 試験機関 A: UV-2700, 島津製作所, 試験機関 B: V-650, 日本分光, 試験機関 C: UV-1700, 島津製作所, 試験機関 D: V-530, 日本分光, 試験機関 E: U-3000, 日立ハイテクノロジーズ) で測定することにより、亜硝酸根として定量した²¹⁾。

v) 乳酸ナトリウムの測定

乳酸ナトリウムは、過塩素酸で抽出した後、液体クロマトグラフ (試験機関 A: LC-20, 島津製作所, 試験機関 B: LaChrom ELITE, 日立ハイテクノロジーズ, 試験機関 C: LC-10, 島津製作所, 試験機関 D: LaChrom ELITE, 日立ハイテクノロジーズ, 試験機関 E: 996UV 検出器付液体クロマトグラフ, Waters) により乳酸として定量し、乳酸ナトリウム量を算出した²²⁾。なお、各試験機関での液体クロマトグラフの使用カラム, 測定条件は以下の通りであった。

カラム:

A: RS pak KC-811 8.0×50 mm, Shodex, Unisan US-C18 6.0×150 mm, Imtakt

B: GL-C610H-S 7.8×300 mm, 日立化成工業

C: Organic Acid 7.8×300 mm, Waters

D: Ionpak KC811 6.0×300 mm, Shodex

E: RS pak KC-811 8.0×50 mm, Shodex, Unisan US-C18 6.0×150 mm, Imtakt

移動相:

A: 17.5 mM 過塩素酸: アセトニトリル = 100:1

B: 3 mM 過塩素酸 (反応液: プロモチモールブルー)

C: 0.1% リン酸

D: 3 mM 過塩素酸 (反応液: プロモチモールブルー)

E: 17.5 mM 過塩素酸: アセトニトリル = 100:1

測定波長:

A: 220 nm, B: 440 nm, C: 220 nm, D: 445 nm, E: 220 nm

移動相流速:

A: 1.0 ml/min., B: 0.5 ml/min., C: 1.0 ml/min., D: 0.8 ml/min., E: 1.0 ml/min.

カラム温度:

A: 50℃, B: 60℃, C: 40℃, D: 55℃, E: 50℃

インジェクション量:

A: 10 μ l, B: 10 μ l, C: 10 μ l, D: 20 μ l, E: 50 μ l

(5) 試験用生ハムの微生物検査

10℃ で保管した各種試験用生ハム (各 a_w 区および乳酸ナトリウム添加区) のそれぞれ 2 検体を経時的に採取し、細菌数および *L. monocytogenes* 数を計測して 2 検体の平均値を求めた。

細菌数の測定は、次の手順で行った。各検体に滅菌ペプトン加生理食塩水を加えて 10 倍乳剤とし、必要に応じてその 10 倍段階希釈試料液を調製した。各 10 倍段階希釈試料液 1 ml について、標準寒天培地 (日水製薬) を使用した混釈平板培養法で 35℃, 24 時間培養し、1 g 当たりの細菌

図1 血清型の異なる *L. monocytogenes* の増殖に対する乳酸ナトリウムの影響

L. monocytogenes 菌株: ATCC49594 4b (■), PSC-R100121 1/2a (□),
PSC-R100123 1/2b (▨), PSC-R100126 1/2c (▤)

数を算定した²³⁾。

いずれの試験機関においても *L. monocytogenes* 数の測定は、ISO11290-2 に従い、以下の手順で行った。各試料に滅菌緩衝ペプトン水を加えて10倍乳剤とし、必要に応じてその10倍段階希釈試料液を調製した。各10倍段階希釈試料液0.1mlをリステリア選択寒天培地 (ALOA 寒天培地, Merck) に塗抹した後、37℃で48時間培養して定型的集落数を計測し、試料1g当たりの *L. monocytogenes* 数を算定した。

実験結果

1. 液体培地における *L. monocytogenes* の増殖に及ぼす乳酸ナトリウムの影響

培地中の乳酸ナトリウムに対する感受性の比較試験結果を図1に示した。食塩濃度5%で、*L. monocytogenes* の増殖は、乳酸ナトリウム2%、3%添加区でやや抑制される

傾向であったが、食塩および乳酸ナトリウムのいずれの濃度においても供試した4菌株間の増殖に差は認められなかった。

2. 試験用生ハムにおける水分活性および乳酸ナトリウムによる *L. monocytogenes* の制御

(1) 試験用生ハムの成分分析結果

10℃で0および56日間保管した試験用生ハムの成分分析結果を表1に示した。

なお、28日間保管した試験用生ハムの成分分析結果は、56日保管したものと同様の傾向であったので記載しなかった。a_w0.94区のa_wは0日で、0.935~0.948、a_w0.93区は0.924~0.938であり、想定した値の範囲から外れるサンプルが数検体認められたが、概ね範囲内だった。また、56日保管後もほぼ同様の値を示した。pHは0日で5.54~5.89、食塩濃度は2.9~5.5%、乳酸ナトリウムは1%添加区0.72~1.24%、2%添加区1.39~2.28%、3%添加区1.83~

表 1 試験用生ハムの成分分析

試験機関	a _w 区 ^a	乳酸 Na(%)	水分活性		pH		亜硝酸根(ppm)		食塩(%) ^b		乳酸(%)		乳酸 Na(%) ^c	
			0 日 ^d	56 日後	0 日	56 日後	0 日	56 日後	0 日	56 日後	0 日	56 日後	0 日	56 日後
A	0.94	0	0.947	0.946	5.70	5.71	2.1	1.3	4.9	5.0	0.55 ^e	0.56	— ^f	—
		1	0.946	0.946	5.72	5.72	2.6	1.7	4.9	4.6	1.14	1.16	0.74	0.74
		2	0.945	0.945	5.72	5.69	2.4	2.3	4.4	4.2	1.74	1.74	1.48	1.47
		3	0.944	0.945	5.68	5.73	2.3	1.9	4.0	3.9	2.31	2.38	2.19	2.26
	0.93	0	0.938	0.936	5.72	5.71	2.5	1.3	4.5	4.9	0.57	0.53	—	—
		1	0.937	0.936	5.69	5.71	2.6	1.0	4.6	4.8	1.15	1.16	0.72	0.78
		2	0.937	0.936	5.70	5.70	2.7	2.4	5.0	4.9	1.69	1.78	1.39	1.55
		3	0.937	0.938	5.73	5.67	2.5	2.1	4.5	4.4	2.04	2.38	1.83	2.30
B	0.94	0	0.942	0.945	5.69	5.59	7.6	5.1	4.6	4.2	0.62	0.64	—	—
		1	0.940	0.943	5.65	5.61	7.1	3.5	4.1	4.0	1.39	1.59	0.96	1.18
		2	0.940	0.942	5.61	5.61	6.2	2.8	3.6	3.6	1.98	2.56	1.69	2.39
		3	0.940	0.937	5.69	5.68	7.5	4.2	3.7	3.7	2.66	3.06	2.54	3.01
	0.93	0	0.936	0.943	5.69	5.63	9.1	3.5	5.3	5.3	0.62	0.69	—	—
		1	0.937	0.938	5.57	5.54	5.7	2.2	4.7	4.7	1.44	1.74	1.02	1.31
		2	0.930	0.933	5.68	5.64	7.6	2.9	5.0	5.0	2.06	2.60	1.79	2.38
		3	0.934	0.939	5.69	5.67	7.1	2.7	3.6	3.6	2.80	3.39	2.71	3.36
C	0.94	0	0.948	0.944	5.86	5.41	18.2	3.6	4.0	3.9	0.46	0.67	—	—
		1	0.946	0.944	5.87	5.50	17.5	2.7	3.7	3.7	1.18	1.36	0.90	0.86
		2	0.948	0.944	5.84	5.46	15.2	2.1	2.9	2.9	1.87	2.03	1.75	1.69
		3	0.945	0.942	5.85	5.47	15.5	1.9	3.0	3.0	2.60	2.72	2.66	2.55
	0.93	0	0.935	0.933	5.89	5.56	8.9	5.0	5.1	4.6	0.52	0.67	—	—
		1	0.934	0.933	5.87	5.88	16.5	19.4	5.1	5.1	1.17	1.17	0.81	0.62
		2	0.938	0.937	5.85	5.77	18.4	4.5	4.1	4.1	1.93	1.99	1.75	1.64
		3	0.938	0.937	5.83	5.47	12.2	3.1	3.4	3.4	2.70	2.87	2.71	2.74
D	0.94	0	0.948	0.947	5.64	5.63	4.8	0.5	4.4	4.1	0.70	0.60	—	—
		1	0.944	0.958	5.66	5.20	3.1	ND ^g	4.1	3.8	1.40	1.50	0.87	1.12
		2	0.942	0.940	5.70	5.50	3.3	0.5	3.7	3.7	2.10	2.20	1.74	1.99
		3	0.935	0.946	5.65	5.35	3.9	0.4	3.3	3.1	2.85	3.00	2.67	2.99
	0.93	0	0.935	0.940	5.54	5.64	4.0	0.8	5.0	5.3	0.65	0.60	—	—
		1	0.936	0.935	5.59	5.61	4.5	0.8	4.8	4.7	1.40	1.40	0.93	1.00
		2	0.926	0.935	5.68	5.72	5.2	0.7	4.6	4.5	2.10	1.90	1.80	1.62
		3	0.924	0.925	5.67	5.72	3.4	0.5	4.1	4.1	2.80	2.70	2.67	2.61
E	0.94	0	0.946	0.948	5.57	5.65	16.9	4.1	4.9	4.4	0.85	0.78	—	—
		1	0.945	0.944	5.57	5.68	19.2	3.3	3.8	3.7	1.85	1.72	1.24	1.18
		2	0.940	0.933	5.70	5.76	20.0	3.0	5.0	4.8	2.53	2.39	2.09	2.01
		3	0.937	0.928	5.58	5.67	12.0	3.5	5.0	4.7	3.63	3.42	3.45	3.28
	0.93	0	0.938	0.937	5.58	5.73	21.7	6.9	5.5	5.1	0.73	0.68	—	—
		1	0.933	0.934	5.64	5.67	13.7	4.4	5.1	5.0	1.71	1.59	1.21	1.13
		2	0.935	0.928	5.68	5.73	20.3	6.0	5.2	5.1	2.57	2.40	2.28	2.14
		3	0.924	0.922	5.60	5.60	12.6	5.0	5.0	5.0	3.63	3.49	3.60	3.50

^a a_w区ではその範囲が, 0.94 では 0.940 ≤ a_w < 0.950, 0.93 では 0.930 ≤ a_w < 0.940 を示す.^b 塩化物イオン濃度より換算した.^c 乳酸 Na 量は, 測定した乳酸値より算出した (計算式: (試験品の乳酸量 - 乳酸 0% 時の乳酸量) × 乳酸ナトリウム分子量 / 乳酸分子量).^d 保管日数を示す.^e 使用した原料生肉由来の値を示す.^f 乳酸 Na 添加 0% 区のため算出せず.^g 検出されず.

図2 $a_w0.94$ 試験用生ハムの細菌数の挙動に対する乳酸ナトリウムの影響 (10°C保管)

試験機関: A (◆), B (■), C (▲), D (○), E (△)

データは2検体の平均値を示す。

3.60%であり、56日保管後とほとんど差は認められなかった。一方、亜硝酸根は、0日で2.1~21.7ppm、56日でND(検出されず)~19.4ppmであり、多くの試験区で減少傾向を示した。

(2) 試験用生ハムにおける水分活性および乳酸ナトリウムによる *L. monocytogenes* の制御

$a_w0.94$ および $a_w0.93$ の生ハムにおける細菌数に対する乳酸ナトリウムの影響を図2 ($a_w0.94$) および図3 ($a_w0.93$) に、*L. monocytogenes* に対する影響を図4 ($a_w0.94$) および図5 ($a_w0.93$) に示した。

細菌数は、いずれの試験区でも保管日数の増加に伴って増加する傾向にあった。細菌数は、乳酸ナトリウムの量が多いほど、また、 a_w が低いほど増加が抑えられる傾向であった。なお、機関Eについては、細菌数用試料保管冷蔵庫の温度が42日目以降基準を逸脱したため、細菌数検査を中止した。

L. monocytogenes は $a_w0.94$ で乳酸ナトリウム0%添加区では、1試験機関(B)を除く4機関(A, C, D, E)で 10^3 CFU/g 接種した *L. monocytogenes* が 10°C 56日間保管中に $10^6 \sim 10^7$ CFU/g まで増殖した。また、乳酸ナトリウム1%添加区では、2機関(C, E)で 10^3 CFU/g 接種した

L. monocytogenes が約 10^4 CFU/g まで増殖し、乳酸ナトリウム2, 3%添加区では、いずれの試験機関でも *L. monocytogenes* の増殖は認められなかった。 $a_w0.93$ の生ハムでは、乳酸ナトリウム0, 1, 2, 3%添加区のいずれでも10°C 56日間保管中 *L. monocytogenes* は増殖しなかった。なお、細菌数の増殖の違いによる *L. monocytogenes* の増殖の違いは認められなかった。

考 察

食肉では *L. monocytogenes* の汚染率が高く、その加工品の非加熱食肉製品である生ハムにおいても汚染の報告例がある⁸⁾²⁴⁾。現在、食品衛生法では生ハムの *L. monocytogenes* の汚染に対し、不検出/25gを求めているが、2009年CODEX委員会は、リステリア症の発生防止の観点から「製造終了時から販売時点までに *L. monocytogenes* が増殖しない RTE 食品では100 CFU/gを超えないこと」と示した¹⁾。国際規格が示されたことから、食品衛生法で規定されている10°Cという保存条件で、賞味期限内に *L. monocytogenes* が増殖しない方法を複数の機関で検証することは、リステリアの菌数制御に有用である。

一方、Maasら²⁵⁾が1989年に七面鳥肉製品に乳酸ナトリ

図 3 $a_w 0.93$ 試験用生ハムの細菌数の挙動に対する乳酸ナトリウムの影響 (10°C保管)

試験機関：A (◆), B (■), C (▲), D (○), E (△)

データは2検体の平均値を示す。

ウムを使用することによって、*Clostridium botulinum* の毒素産生を遅延させることが可能であることを明らかにして以降、乳酸ナトリウムによる *L. monocytogenes* を含む食中毒菌や腐敗細菌の食肉製品での抑制効果に係わる研究が精力的に行われてきた^{26)~30)}。しかし、国内の生ハムでの乳酸ナトリウムによる *L. monocytogenes* の抑制を目的とした調査は、萩原ら¹³⁾ の報告だけであり、この調査も3%の乳酸ナトリウムを添加した場合のみに限定されている。そこで、著者らは国内の食肉製品製造工場で製造されている生ハムを試験材料として、*L. monocytogenes* に対する a_w と乳酸ナトリウムの影響を詳細に調査することとした。

L. monocytogenes による感染症は、血清型 4b, 1/2a, 1/2b によるものが多いと報告されておりⁱⁱ⁾、食肉製品での増殖防止などを目的とした研究では、しばしば *L. monocytogenes* ATCC49594 (血清型 4b, ScottA) が使用されている¹²⁾¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾³¹⁾³²⁾。一方、Okutani ら⁸⁾ は、食品からは血清型 1/2c の検出も多いことを報告している。そこで本研究では、血清型 4b, 1/2a, 1/2b および 1/2c の4株について、Nutrient Broth における乳酸ナトリウムの影響を調べた。その結果、供試した菌株の乳酸ナトリウムに対する感

受性は、菌株間で差がないことが確認された。そこで、以降の生ハムにおける a_w および乳酸ナトリウムによる *L. monocytogenes* の制御試験では、集団発生事例の報告が多く⁷⁾、また食品での挙動や制御に関する多くの研究で使用されている血清型 4b の *L. monocytogenes* ATCC49594 株を用いることとした。

L. monocytogenes ATCC49594 株を接種した試験用生ハムでは、 $a_w 0.94$ 、乳酸ナトリウム 0% で、1 機関 (B) を除く 4 機関で *L. monocytogenes* の増殖が認められた。増殖しなかった機関 B については、他機関に比べ a_w がやや低く、 $a_w 0.93$ に近い数値であったため、増殖しなかったものと考えられる。 $a_w 0.94$ 、乳酸ナトリウム 1% 添加区では、5 機関中 2 機関 (C, E) で *L. monocytogenes* の増殖が認められた。また、乳酸ナトリウム 2, 3% 添加区では、5 機関とも *L. monocytogenes* は増殖しなかった。萩原ら¹³⁾ は、生ハムに乳酸ナトリウムを 3% 添加することによって 10°C 保管した場合、50 日間は *L. monocytogenes* が増殖しないことを報告している (3% 未満はデータなし)。一方、培地系では乳酸ナトリウム単独使用は *L. monocytogenes* を抑制する効果がないが、食塩や亜硝酸塩との組み合わせに

図4 $a_w 0.94$ 試験用生ハムの *L. monocytogenes* の挙動に対する乳酸ナトリウムの影響 (10°C保管)

試験機関: A (◆), B (■), C (▲), D (○), E (△)

データは2検体の平均値を示す。

よって *L. monocytogenes* を抑制することが可能であることを報告している¹³⁾。また, Pelroy ら³²⁾ は, 3% の食塩および 125 ppm の亜硝酸ナトリウムを含むサーモン (pH 6.1) の場合には, 3% 乳酸ナトリウムが存在すると *L. monocytogenes* は 10°C で 40 日間保管しても増殖しないが, 2% 乳酸ナトリウムでは 35 日間の保管によって増殖したことを報告している。これらの報告は, 乳酸ナトリウムが *L. monocytogenes* の増殖抑制効果を発揮するにはその濃度のみならず環境要因が大きく影響することを示唆している。今回の試験で使用したいずれの機関の生ハムも食品衛生法に従って製造したものを試験材料として用いていることから, 低 pH, 高い食塩濃度 (3% 以上) という環境条件にあり, 2% と低い乳酸ナトリウム濃度でも *L. monocytogenes* が増殖しなかったものと考えられる。

$a_w 0.93$ では乳酸ナトリウムの有無に係わらず, いずれの機関でも *L. monocytogenes* は増殖しなかった。著者ら¹²⁾ は, pH 6.0 以下かつ $a_w 0.93$ 以下であれば, 10°C で 60 日間保管しても *L. monocytogenes* が増殖しないことを確認しており, 本試験と同様の結果であった。RTE 食品での *L. monocytogenes* の増殖を抑制するためには, $a_w 0.92$ 未満と示されているが¹⁾, 食品衛生法に従って製造, 販売される

生ハムは a_w が 0.93 ($0.930 \leq a_w < 0.940$) であれば, 原料肉の pH や食塩, 亜硝酸塩および低温保管 (10°C) などの条件が相加, 相乗的に作用して, *L. monocytogenes* の増殖は抑制されるものと推測される。一方, 食品衛生法の製造基準では, $a_w 0.95$ 未満の場合, 10°C 保管となっている。今回の試験では, $a_w 0.94$ であれば, 10°C で 21 または 28 日間保管した段階で *L. monocytogenes* が増殖する可能性が高い (4 機関で確認) が, 2% の乳酸ナトリウム添加によって *L. monocytogenes* の増殖が抑制されることが示された。これらの結果から, 我が国の食品衛生法に従って製造される生ハムでのリステリアの増殖を抑制するために, 乳酸ナトリウムを利用することは効果的であると考えられる。一方, CODEX が示した RTE 食品のリステリア規制が国内でも適用され, リステリアが増殖できない食品の範疇に生ハムが含まれると, リステリアの基準は現在の不検出 /25 g から 100 CFU/g を超えないとなる。このことは, 国内生ハムの生産性向上にも大いに貢献し, 国際的競争力を備えた商品開発の一助にもなると考えられる。

要 約

非加熱食肉製品である生ハムにおける a_w および乳酸ナ

図 5 $a_w 0.93$ 試験用生ハムの *L. monocytogenes* の挙動に対する乳酸ナトリウムの影響 (10°C 保管)

試験機関：A (◆), B (■), C (▲), D (○), E (△)

データは 2 検体の平均値を示す。

トリウムによる *L. monocytogenes* の制御について 5 試験機関で検討した。

(1) 血清型の異なる *L. monocytogenes* の増殖に対する乳酸ナトリウムの影響試験から、供試した菌株の乳酸ナトリウムに対する感受性は、4 種の菌株間で差がないことが明らかとなった。

(2) 試験用生ハムで、いずれの試験機関でも $a_w 0.93$ ($0.930 \leq a_w < 0.940$) では、*L. monocytogenes* (血清型 4b, Scott A 株) は、10°C で 56 日間保管した場合に増殖しなかった。このことから、生ハムでは $a_w 0.93$ であれば、原料肉の pH や食塩濃度、亜硝酸塩および低温保管 (10°C) などの条件が相加、相乗的に作用して、*L. monocytogenes* の増殖が抑制されるものと推測された。

(3) 今回の試験では、 $a_w 0.94$ ($0.940 \leq a_w < 0.950$) であれば、2% の乳酸ナトリウムを添加することによって *L. monocytogenes* の増殖が抑制されることが示唆された。

文 献

1) Hird, D. W., Review of evidence for zoonotic listeriosis. *J.*

Food Prot., **50**, 429-433 (1987).

- 2) Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. D., 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) 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).
- 4) Makino, S., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S. and Igimi, S., An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int. J. Food Microbiol.*, **104**, 189-196 (2005).
- 5) Okutani, A., Okada Y., Yamamoto, S. and Igimi, S., Nationwide survey of human *Listeria monocytogenes* infection in Japan. *Epidemiol. Infect.*, **132**, 769-772 (2004).
- 6) 五十君静信, 海外における食品を介したリステリア症集団事例紹介, 食品衛生研究, **54**, 7-14 (2004).
- 7) 小久保彌太郎, 食肉および食肉製品のリステリア汚染, 食肉の科学, **33**, 23-31 (1992).
- 8) Okutani, A., Okada Y., Yamamoto, S. and Igimi, S., Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *Int. J.*

- Food Microbiol.*, **93**, 131-140 (2004).
- 9) 厚生労働大臣, 食品健康影響評価について, 平成 24 年 1 月 16 日, 厚生労働省発食安 0116 号 (2012).
 - 10) Leistner, L., In "Food design by hurdle technology and HACCP", 1st ed. (Adalbert Raps Foundation, Kulmbach Germany), pp. 1-62 (1994).
 - 11) 食品衛生研究会, 食肉製品, 「平成 25 年版食品衛生小六法 I (法令)」, 初版, 食品衛生研究会編, (新日本法規出版, 愛知), pp. 1071-1078 (2012).
 - 12) 上崎(堀越)菜穂子, 岡田幸男, 竹下和子, 鮫島 隆, 有原圭三, リステリアの食肉加工品での増殖挙動と生ハムでの増殖挙動に対する pH と水分活性の影響. 日本食品科学工学会誌, **59**, 186-191 (2012).
 - 13) 荻原博和, 鵜澤志帆, 佐藤瑛二, 古川壮一, 松田敏生, 非加熱食肉製品(生ハム)に接種した *Listeria monocytogenes* の挙動と発酵乳酸ナトリウムによる制御, 防菌防黴誌, **35**, 557-566 (2007).
 - 14) Stekelenburg, F. K. and Kant-Muermans, M. L. T., Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, **66**, 197-203 (2001).
 - 15) Bedie, G. K., Samelis, J., Sofos, J. N., Belk, K. E., Scanga, J. A. and Smith G. C., Antimicrobials in the formulation to control *Listeria monocytogenes* postprocessing contamination on frankfurters stored at 4°C in vacuum packages. *J. Food Prot.*, **64**, 1949-1955 (2001).
 - 16) Geornaras, I., Belk, K. E., Scanga, J. A., Kendall, P. A., Smith G. C. and Sofos, J. N., Postprocessing antimicrobial treatments to control *Listeria monocytogenes* in commercial vacuum-packaged bologna and ham stored at 10°C. *J. Food Prot.*, **68**, 991-998 (2005).
 - 17) 柴田清弘, 吉田由香, 松永孝光, 中島誠人, 猪口由美, 新村裕, 服部昭仁, 市販非加熱食肉製品の実態調査結果, 「一般社団法人食肉科学技術研究所 試験成績書 No.43」, (食肉科学技術研究所, 東京), pp. 13-25 (2012).
 - 18) 食品衛生研究会, 「平成 25 年版食品衛生小六法 II (通知・実例)」, 初版, 食品衛生研究会編, (新日本法規出版, 愛知), pp. 342 (2012).
 - 19) 堤 忠一, 食肉製品の食塩, 「食品分析法」, 初版, 日本食品工業学会食品分析法編集委員会編, (光琳, 東京), pp. 398 (1982).
 - 20) 食品衛生研究会, 「平成 25 年版食品衛生小六法 II (通知・実例)」, 初版, 食品衛生研究会編, (新日本法規出版, 愛知), pp. 342-343 (2012).
 - 21) 食品衛生研究会, 「平成 25 年版食品衛生小六法 II (通知・実例)」, 初版, 食品衛生研究会編, (新日本法規出版, 愛知), pp. 341-342 (2012).
 - 22) 鈴木 忍, 乳酸及びその塩類, 「食品衛生検査指針 食品添加物編」, 初版, 厚生労働省監修, (社団法人日本食品衛生協会, 東京), pp. 317-321 (2003).
 - 23) 食品衛生研究会, 「平成 25 年版食品衛生小六法 II (通知・実例)」, 初版, 食品衛生研究会編, (新日本法規出版, 愛知), pp. 344 (2012).
 - 24) Farber, J. M., Sanders, G. W. and Johnston, M. A., A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *J. Food Prot.*, **52**, 456-458 (1989).
 - 25) Maas, M. R., Glass, K. A. and Doyle, M. P., Sodium lactate delays toxin production by *Clostridium botulinum* in cook-in-bag turkey products. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2226-2229 (1989).
 - 26) Shelef, L. A., Antimicrobial effects of lactates: A review. *J. Food Prot.*, **57**, 445-450 (1994).
 - 27) Shelef, L. A. and Yang, Q., Growth suppression of *Listeria monocytogenes* by lactates in broth, chicken and beef. *J. Food Prot.*, **54**, 283-287 (1991).
 - 28) 鮫島 隆, 竹下和子, 三木為雄, 有原圭三, 伊藤 良, 近藤洋, 食肉製品の変敗, 酸敗原因菌として分離された乳酸菌に対する亜硝酸ナトリウム, 乳酸ナトリウムの増殖抑制効果. 日本食品微生物学会雑誌, **13**, 159-164 (1997).
 - 29) Miller, R. K. and Acuff, G. R., Sodium lactate affects pathogens in cooked beef. *J. Food Sci.*, **59**, 15-19 (1994).
 - 30) Weaver, R. A. and Shelef, L. A., Antilisterial activity of sodium, potassium or calcium lactate in pork liver sausage. *J. Food Safety*, **13**, 133-146 (1993).
 - 31) Chen, N. and Shelef L. A., Relationship between water activity, salts of lactic acid and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *J. Food Prot.*, **55**, 574-578 (1992).
 - 32) Pelroy, G. A., Peterson, M. E., Holland, P. J. and Eklund, M. W., Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-process (smoked) salmon by sodium lactate. *J. Food Prot.*, **57**, 108-113 (1994).
- 引用 URL
- i) http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10740/CXG_061e.pdf (2013.1.10).
 - ii) http://www.fsc.go.jp/sonota/risk_profile/listeriamonocytogenes.pdf (2013.1.10).
- (平成 25 年 2 月 27 日受付, 平成 25 年 4 月 23 日受理)