カマンベールチーズ製造時に殺菌乳又は加塩槽水を リステリア菌で人為的に汚染させた場合の中間製品 及び製品中における本菌の消長

(平成2年11月29日受理)

松崎 静枝^{*1} 片山 淳^{*1} 岡田 雅裕^{*1}
遠藤 隆二^{*1} 田中 一成^{*1} 関屋 建三^{*2}
柴田 寛二^{*2}

Behavior of *Listeria monocytogenes* during the Manufacture, Ripening and Storage of Camembert Cheese after Contamination of Pasteurized Milk and Brine with this Organism

Shizue MATSUSAKI^{*1}, Atsushi KATAYAMA^{*1}, Masahiro OKADA^{*1}, Ryuji ENDO^{*1},
Kazushige TANAKA^{*1}, Kenzo SEKIYA^{*2} and Kanji SHIBATA^{*2}

(^{*1}Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health: 2-5-67, Aoi, Yamaguchi City, Japan;

^{*2}Yamaguchi Prefectural Ato Health Center: 91-2, Ikumonaka, Ato Town,
Abu District, Yamaguchi, Japan)

The ability of *Listeria monocytogenes* to survive or grow during Camembert cheese manufacturing, ripening and storage was examined. Two experimental methods were applied for manufacturing Camembert cheese: using *Listeria*-contaminated milk (1.6×10^4 cells/ml), and using *Listeria*-contaminated brine (1.5×10^6 cells/ml).

Listeria counts decreased in both cases during the beginning of the ripening process; in the later stage an increase of the count occurred. The count of this organism after ripening was about the same as in the initial stage. After that the number increased gradually, and *Listeria* counts of 1.7×10^5 cells/g and 1.5×10^8 cells/g were attained after 50 days, respectively.

Listeria monocytogenes survived in 18% brine at 12°C for more than 21 days.

(Received November 29, 1990)

Key words: リステリアモノサイトゲネス *Listeria monocytogenes*; チーズ cheese; カマンベールチーズ Camembert cheese

緒 言

リステリア症は人畜共通感染症として古くから知られており、ヒトでは髄膜炎、敗血症、流産などを起こすが、感染源、感染経路などについては不明な点が多い¹⁾。最

近、乳及び乳製品をはじめとした食品を原因とするリステリア症の集団発生が相次いで報告され^{2), 3)}、食品衛生の分野でも重視されるようになってきた。なかでも注目を集めている食品は、ソフト及びセミソフトタイプのチーズで、近年我が国におけるチーズの生産、輸入、消費量が増えていることもあって、厚生省は各自治体に対し、チーズ製造工場のリステリア菌による汚染防止指導

^{*1} 山口県衛生公害研究センター：山口市葵 2-5-67

^{*2} 山口県阿東保健所：山口県阿武郡阿東町生雲中 91-2

Manufacturing process	No. of samples	Time (days)
Raw milk		
— pasteurization (72°C, 1 min)		
— cooling 33°C	①	1
— add starter (33°C, stir for 2 hr)	②	1
— add rennet (33°C, leave for about 80 min)		
Curd		
— (before curd cutting)	③	1
— curd cutting		
— fill into hoops		
— turn 2 or 3 times during night (room temp.)		
— (after 2nd turn)	④	1
Wheyless curd		
— (before dipping)	⑤*	2
— dip into 18% brine (12°C, 1 hr)		
— (after dipping)	⑤’**	2
— ripening (12°C, 10 days)		
— (after 3 days)	⑥	5
— (after 6 days)	⑦	8
— (after 10 days)	⑧	12
— package and store (5°C, 1 week)		
Cheese		
— (9 days after package)	⑨	21
— (38 days after package)	⑩	50

Scheme 1. Manufacture and sampling of Camembert cheese

*: ⑤ The case of using *Listeria* contaminated milk

** : ⑤’ The case of using *Listeria* contaminated brine

の強化を通知した⁴⁾。

本研究では、ソフトタイプの代表的な製品であるカマンベールチーズの製造工程において、殺菌牛乳及び加塩用 18% 食塩水（以下加塩槽水）にリステリア菌を人為的に加えた場合の中間製品、加塩槽水及び製品中における本菌の動態を実験的に検討した。

材料及び方法

1. チーズの製造方法及び保存方法

チーズ工場での製造方法を参考にして作成した Scheme 1 に従って、実験的にカマンベールチーズを次のように製造した。製造開始日：原料乳 1.5 L をビーカーに入れ、湯煎で 72°、1 分加熱後流水中で 33° に冷やした。これにスターター（乳酸菌と真菌）を添加して 2 時間攪拌した後、レンネットを加え軟らかい豆腐状に固まるまで（約 80 分）33° に保持した。カードカットを行い、カットされたカードからホエイが分離したところで、ホエイごと直径 11 cm、高さ 16 cm、容積 1.5 L のステンレス製の型枠に入れ、途中 2 回型枠ごと反転させ室温で 1 晩放置した。製造 2 日目：ホエイが切れて容積が約 1/5 に減少し最終製品とほぼ同じ大きさとなったカードを型枠からはずし、12° に保った加塩槽水に 1 時間浸漬（途中でカードを 1 回反転）した後取り出し、すこの上に並べた。製造 3～12 日目：12° で 10 日間、まん

べんなく白カビを生やすために毎日 1 回反転しながら熟成させた。製造 13～21 日目：その後アルミ箔で包装して 5° で 9 日間、更に熟成させた。まだ食べるには若すぎるが、本研究の参考とした工場では製造 21 日目に出荷を開始するので、この時点チーズの出来上り日とした。製造 22～50 日：5° で賞味限度と思われる製造 50 日目まで保存した。その間も熟成が進み、好みにもよるが、製造開始日より 4 週間後位が食べ頃といわれている。

2. チーズの製造方法及び供試試料

チーズ製造中に起こるリステリア菌汚染の原因は汚染された原料乳の使用、使用器具、作業員などからの汚染の移行が考えられる。工場では、型枠など製造第 1 日目に使う器具は煮沸消毒されており、これが汚染源になる可能性は少ないと考えられる。作業員からの汚染も作業状況を見る限りでは、容易に起こるとは考えられなかった。加塩槽の 18% 食塩水は全部を一度に取り替えることはなく、20 日ごとに 1/4 程度ずつ交換されているにすぎない。したがって、カードがリステリア菌で汚染されていた場合は、これを浸漬（1 時間）している間に本菌が加塩槽水を汚染、残存して次々とカードの汚染源になる可能性が高いと考えられる。

a. リステリア菌で汚染させた殺菌乳を用いてチーズ

を製造した場合

リステリア菌で汚染された原料乳が殺菌不十分のまま使われたとの想定で、殺菌後の牛乳にリステリア菌を加え、Scheme 1 に従ってチーズを製造した。原料乳ではなく殺菌後の牛乳にリステリア菌を加えた理由は、牛乳中の細菌叢の違いによってリステリア菌の発育が左右されると思われるので、今回は常在菌の影響をできるだけ避けた形で実験計画をたてた。接種菌数は現実の汚染の可能性と菌数測定の便宜の両方を考慮して 10^4 /ml とした。

試料の採取は Scheme 1 の①～⑩で行った。すなわち、①汚染直後の牛乳、②スターター添加2時間後の牛乳、③レンネット添加約80分後、カードカット直前のカード、④型詰め後約4時間、2回目の反転を終えたカード（①～④製造1日目）、⑤18%食塩水浸漬直前のカード（製造2日目）、⑥熟成3日目の中間製品のチーズ（製造5日目）、⑦熟成6日目の中間製品のチーズ（製造8日目）、⑧熟成10日目の中間製品のチーズ（製造12日目）、⑨5°保存後9日目の製品のチーズ（製造21日目）、⑩製造50日目のチーズ（製品）を試料として用い、リステリア菌数を測定した。

b. リステリア菌で汚染させた加塩槽水を用いてチーズを製造した場合

リステリア菌を 1.5×10^6 /ml の割に加えた加塩槽水を用いて、Scheme 1 に従って製造したカードを浸漬した。

試料採取は Scheme 1 の⑤' 加塩槽水浸漬直後のチーズと⑥～⑩で行い、リステリア菌数を測定した。

また、あわせて加塩槽水中でのリステリア菌の消長を知るために、加塩槽水2L中にリステリア菌を 10^5 /ml の割に接種し、チーズ製造時と同じ12°に保存し、3日ごとにその一部を試料として、21日までリステリア菌数を測定した。

c. リステリア菌で汚染させない系でチーズ製造を行った場合

理化学分析用にリステリア菌で汚染しないチーズを製造した。

試料採取は Scheme 1 の①～⑨で行い、pH、水分含量、水分活性、塩分濃度の測定を行った。

チーズの製造はa, b, c とも3回ずつ行った。1回にそれぞれ2個ずつ、計6個、全体では18個のカマンベールチーズを製造した。

3. 使用菌株

使用したリステリア菌は、国立予防衛生研究所の福井正信博士に分与して頂いた *Listeria monocytogenes* 4b 株を、チーズ作成のためのスターターは市販の *Streptococcus cremoris*, *S. Lactis*, *S. diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris* の混合物及び *Penicillium candidum* (Laboratorium Wiesby GmbH & Co. KG. 製) を用いた。

4. 検査方法

a. リステリア菌数の測定

試料を滅菌生理食塩水で10倍段階希釈したもの0.1 ml を2枚のリステリア分離培地（メルク社製）に塗抹、35°で48時間培養後、培地上に発育したリステリア菌の疑わしい集落を釣菌し、グラム陽性小桿菌、半流動培地での傘状発育、VP試験陽性、カタラーゼ陽性の性状を示すものをリステリア菌として算定した。

18%食塩水中でのリステリア菌数の測定には、上記の測定法と併せてブレインハートインヒュージョン寒天培地（日水製薬(株)製）による方法を用いた。ブレインハートインヒュージョン寒天培地は35°24時間培養後、上述した性状試験を行い、リステリア菌数を算定した。2種の測定法を併用した理由は、栄養分の少ない高濃度の食塩水中では、リステリア菌が衰弱や、損傷を受け、選択分離培地では発育しにくくなっている可能性を考えたためである。

b. 理化学分析

pH は試料の10倍水溶液をpHメーターで測定した。また、水分含量は常圧加熱乾燥法により、水分活性は公定法⁵⁾により測定した。塩分濃度は乾式灰化した後、0.25 N の塩酸に溶解し、ろ過したものを検液とし、原子吸光法でナトリウムをはかり、食塩に換算することにより求めた。

結 果

1. リステリア菌で汚染させた殺菌乳を用いてチーズ製造を行った場合

Fig. 1 に示すように、①汚染直後の牛乳 1.6×10^4 /ml、②スターター添加2時間後の牛乳 2.7×10^4 /ml、③レンネット添加約80分後、カードカット直前のカード 1.7×10^4 /g、④型詰め後約4時間、2回目の反転を終えたカード（①～④製造1日目） 5.2×10^5 /g、⑤18%食塩水浸漬直前のカード（製造2日目） 1.8×10^4 /g、⑥熟成3日目のチーズ（製造5日目） 4.3×10^3 /g、⑦熟成6日目のチーズ（製造8日目） 5.0×10^1 /g、⑧熟成10日目のチーズ（製造12日目） 2.3×10^4 /g、⑨5°保存後9日目のチーズ（工場生産では出荷時、製造21日目） 3.6×10^4 /g、⑩製造より50日目のチーズ 1.7×10^5 /g であった。リステリア菌の測定菌数は⑦（熟成6日後）では著しく減少した。⑧（熟成12日目）には接種菌数とほぼ同数になり、その後はゆるやかに増加する傾向がみられた。

2. リステリア菌で汚染させた加塩槽水を用いてチーズ製造を行った場合

Fig. 2 に示すように、⑤'（加塩槽水に浸漬直後のチーズ） 1.8×10^6 /g、⑥ 6.0×10^4 /g、⑦ 2.1×10^3 /g、⑧ 1.3×10^6 /g、⑨ 2.2×10^6 /g、⑩ 1.5×10^8 /g であった。この場合も、1の汚染殺菌乳を用いた場合と同様、⑦（熟成6日目）までは菌数が減少し、⑧（熟成10日目）で汚染直後とほぼ同数になり、その後ゆるやかに増加した。

Fig. 1. Number of *L. monocytogenes* in the various specimens during manufacture, ripening and storage of Camembert cheese when pasteurized milk was contaminated with 10^4 cells/ml

See Scheme 1, for explanation of No. of samples

Fig. 2. Number of *L. monocytogenes* in the various specimens during manufacture, ripening and storage of Camembert cheese when brine was contaminated with 10^6 cells/ml
See Scheme 1 for explanation of No. of samples

加塩槽々中でのリステリア菌の消長は Fig. 3 に示した。リステリア分離培地を用いた測定ではリステリア菌数は接種直後 9.5×10^4 /ml, 3 日目 1.6×10^2 /ml, 6 日目 0/ml, 9 日目 1.3×10^3 /ml, 12, 15, 21 日目は 0/ml であったのに対し, ブレインハートインヒュージョン寒天培地を用いた方法では, 接種直後 2.2×10^5 /ml, 3 日目 2.2×10^5 /ml, 6 日目 1.7×10^5 /ml, 9 日目 1.4×10^5 /ml, 12 日目 9.4×10^4 /ml, 15 日目 1.1×10^5 /ml, 21 日目 1.2×10^5 /ml のリステリア菌数となった。

3. 理化学試験の結果

理化学試験の結果は Table 1 に示した。pH は① (殺菌乳で 6.55 であったが, スターター添加後から下がりはじめ⑤ (加塩槽水浸漬直前のカード) で 4.41 まで低下した。その後は徐々に上がり, ⑨ (5°保存 9 日目のチーズ) では 6.15 であった。水分含量は①で 87.4% であったがホエイの流出に伴い低下, ④型詰め後約 4 時間, 2 回目の反転を終えたカード) では 64.1%, ⑨では 60.3% を示した。水分活性は①で 1.00 で, ⑤までは変化がなく⑥ (熟成 3 日目のチーズ) で 0.97, ⑨で 0.96 であった。塩分濃度は①で 0.13% であったが, ホエイの流出により低下して④で 0.09% になった後, 加塩により⑥で

Fig. 3. Survival of *L. monocytogenes* in 18% brine at 12°C

○—○: CFU/ml by Brain Heart Infusion agar

●—●: CFU/ml by Listeria agar

Table 1. Physical and Chemical Properties of Various Specimens during the Manufacturing of Camembert Cheese

Step (days)			pH	Moisture (%)	Water activity	Salt (%)
①	Pasteurized milk	(1)	6.55	87.4	1.00	0.13
②	Milk with starter	(1)	6.44	87.4	1.00	0.14
③	Curd before cutting	(1)	6.08	88.4	1.00	0.12
④	Curd after 2nd turn	(1)	5.13	64.1	1.00	0.08
⑤	Curd before brine	(2)	4.41	65.2	1.00	0.09
⑥	Wheyless curd	(5)	4.43	61.9	0.97	2.95
⑦	"	(8)	4.43	59.5	0.96	2.55
⑧	"	(12)	4.87	58.1	0.96	2.31
⑨	Cheese	(21)	6.15	60.3	0.96	2.36

2.95% と上昇した。その後はまた徐々に低下、⑨では2.36% であった。

考 察

リステリア菌で人工的に汚染させた殺菌乳を用いてカマンベールチーズを製造したところ、熟成期間中にリステリア菌数はいったん減少した後、比較的急速に増加し、汚染当初と同程度に達した。その後の工程においても本菌はゆるやかな増加を続けた。また、リステリア菌で汚染させた18%食塩水を加塩に用いてチーズを製造した場合も、上記と同様の結果が得られた。殺菌乳や加塩槽水中のリステリア菌が製品に移行し、本菌による汚染が長期間継続することが判明した。Ryser ら⁶⁾はリステリア菌4株を使って、 5×10^2 /mlの割合に殺菌乳を汚染してカマンベールチーズを製造したところ、4株のうち3株は熟成初期にリステリア菌数が減少したのに対して、1株は減少が認められなかったが、4株とも熟成18日目(製造19日目)からリステリア菌数が増え、熟成65日目(製造66日目)で $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 個/gに達したことを報告している。さらに、Ryser ら^{7)~9)}は人工的にリステリア菌で汚染させた殺菌乳を用いてカテージチーズ、ブリックチーズ、チェダーチーズを製造したとき、いずれのチーズ中でも本菌が長期間生残することを認めている。また、Yousef¹⁰⁾らはリステリア菌を $10^2 \sim 10^3$ /mlの割合に加えた殺菌乳を用いてカルビーチーズを製造した場合、製造40日ぐらいで菌数が最高(10^4 /ml)を示し、その後はゆるやかに減少すると報告している。これらの報告はいずれも殺菌乳にリステリア菌を加えて行ったものであるが、チーズ中ではその種類にかかわらず、リステリア菌の汚染が長期間継続することが確認された。チーズ製造の場合、一般に原料乳の殺菌温度が低く、時間も短いうえに、Doyle ら¹¹⁾、Northolt ら¹²⁾、Bunning ら¹³⁾の報告によれば、Phagocyteの中にとり込まれたリステリア菌は耐熱性が強い。従って殺菌不十分になる恐れは強いと考えられる。また、チーズの種類によっては生乳をそのまま使用するのでこのようなチーズでは危険性はさらに高まると思われる。

加塩に使う18%食塩水中でのリステリア菌の動態を調べた結果、リステリア分離培地を用いた場合、本菌は12日以後は検出されなかったが、ブレインハートインヒュージョン培地を用いた場合は、21日目まで接種時とほぼ同じ菌数であった。測定方法の違いによりリステリア菌数が大きく異なった理由としては、栄養分のない、高濃度(18%)の食塩水中でリステリア菌が何らかの形で損傷を受け、あるいはいわゆる休眠状態に入るなどの増殖しにくい状態におかれたために、リステリア分離培地のような選択培地地上では発育しにくくなっていた可能性が考えられる。本研究で観察された熟成期間中におけるリステリア菌数の比較的急激な減少には、低pHや、乳酸菌、真菌との相互関係などが直接的、間接的に

関与している可能性が考えられるが、さらに、リステリア菌が加塩水の場合と同様に何らかのダメージを受け、リステリア分離培地上で増殖できなくなっているだけにすぎない可能性も考えられる。Ryser ら⁶⁾はカマンベールチーズの熟成初期に、使用菌株によってリステリア菌数が減少するものとししないものがあることを認めているが、このことは、菌株によってダメージの影響が異なることを示している可能性もうかがわれる。したがって、チーズの製造工程におけるリステリア菌の動態の解析については、さらに注意深く詳細な検討が必要と思われる。

さらに本研究では、チーズの製造工程で加塩に使う18%食塩水中でリステリア菌は長期間生残することが実験的に証明された。

Ryser ら⁶⁾はリステリア菌で汚染した殺菌乳を用いて製造したブリックチーズを浸した加塩槽水中で、増菌法により6日後にもリステリア菌を回収できたと報告している。チーズ工場では加塩槽水は一度に全部取り替えることはなく、20日に1/4程度交換されているに過ぎない。このような状態では、いったん加塩槽水がリステリア菌の汚染を受けると本菌は長期にわたって生残して製品の汚染源になりうる可能性が高い。したがって、加塩槽水の適切な衛生管理方策の確立も今後の重要な課題の一つと考えられる。

ま と め

殺菌乳と加塩槽水(18%食塩水)をリステリア菌でそれぞれ 1.6×10^4 /ml、 1.5×10^6 /mlの割合に、人為的に汚染させてカマンベールチーズの製造を行い、中間製品及び製品中のリステリア菌の動態を検討した。いずれの場合も、熟成期間中に中間製品のリステリア菌数はいったん減少した後、比較的急速に増加して汚染直後と同程度に達した。その後の工程においても本菌はゆるやかに増加を続け、製造50日後のチーズ中で、殺菌乳汚染の場合は 1.7×10^5 /g、加塩槽水汚染の場合は 1.5×10^8 /gのリステリア菌数が認められた。

また、本菌は18%食塩水中で長く(12°で少なくとも21日)生残することも確認された。

本論文の要旨は日本食品衛生学会第58回学術講演会(1989年10月、山口市)において発表した。

文 献

- 1) 永井龍夫: メディアサークル 29, 1~15 (1984).
- 2) 勝部泰次: モダンメディア 34, 477~485 (1988).
- 3) 丸山 務: 食品と微生物 6, 3~15 (1989).
- 4) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知: “ソフト及びセミソフト・タイプのナチュラルチーズのリステリア菌汚染防止について” 昭和63年2月2日, 衛乳第3号(1988).
- 5) 厚生省環境衛生局乳肉衛生課長通知: “水分活性の測定方法について” 昭和49年12月12日, 環乳第82号(1974).
- 6) Ryser, E. T., Marth, E. H.: J. Food Prot. 50, 372~378

- (1987).
- 7) Ryser, E. T., Marth, E. H., Doyle, M. P.: *ibid.* **48**, 746~750 (1985).
- 8) Ryser, E. T., Marth, E. H.: *J. Dairy Sci.* **72**, 838~853 (1989).
- 9) Ryser, E. T., Marth, E. H.: *J. Food Prot.* **50**, 7~13 (1987).
- 10) Yousef, A. E., Marth, E. H.: *ibid.* **51**, 12~15 (1988).
- 11) Doyle, M. P., Glass, K. A., Beery, J. T., Garcia, G. A., Pollard, D. J., Schultz, R. D.: *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1,433~1,438 (1987).
- 12) Northolt, M. D., Beckers, H. J., Vecht, U., Toepoel, L., Soentoro, P. S. S., Wisselink, H. J.: *Neth. Milk Dairy J.* **42**, 207~219 (1988).
- 13) Bunning, V. K., Donnelly, C. W., Peeler, J. T., Briggs, E. H., Brandshaw, J. G., Crawford, R. G., Belieu, C. M., Tierney, J. T.: *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 364~370 (1988).