

チーズ製造工程および付属牧場の リステリア菌汚染状況*

山口県衛生公害研究センター (所長: 田中一成)

片山 淳・松崎 静枝・岡田 雅裕・遠藤 隆二
田中 一成

山口県阿東保健所 (所長: 寺山和夫)

関屋 建三・柴田 寛二

Isolation of *Listeria monocytogenes* from Materials during Manufacture of Cheese and Environments of Dairy Farm

Atsushi KATAYAMA, Shizue MATSUSAKI, Masahiro OKADA

Ryuji ENDO, Kazushige TANAKA

Yamaguchi Prefectural Research Institute of Health (Director: Dr. Kazushige TANAKA)

Kenzo SEKIYA, Kanji SHIBATA

Ato Health Center of Yamaguchi Prefecture (Director: Dr. Kazuo TERAYAMA)

はじめに

リステリア菌 (*L. monocytogenes*) は人畜共通感染症の起原菌であり、ヒトでは髄膜炎、妊娠異常 (流産、死産)、ヒツジ等の反芻動物では脳炎、単胃動物では敗血症などの疾病を起こすことが知られている。

我が国におけるヒトのリステリア症は、1987年までに606例が報告¹⁾され、患者は新生児および5歳以下の乳幼児並びに50歳以上に多く、成人では糖尿病、アルコール中毒等の基礎疾患をもち、ステロイド剤等の使用によって感染防御機能が低下すると本症が誘発されるおそれがあるとされている。

近年、リステリア菌に汚染された野菜サラダ、牛乳、ソフトチーズの喫食による集団感染事例が

報告¹⁾され、その存在が注目されるようになってきた。本菌は4℃以下でも発育可能なグラム陽性桿菌で、各種動物、植物、土壌、下水など広く自然界に分布している。しかしながら、我が国における本菌の分布については十分解明されていない。そこで、チーズ製造所におけるチーズ製造工程および付属牧場について本菌の検索を実施し、その汚染状況を調査した。

材料および方法

1 調査時期

1989年7月

2 調査材料

検査材料は、1) チーズ製造工程の材料として某チーズ製造所内のチーズ原料乳1、殺菌乳1、

* 本報告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。

カマンベールチーズの型詰後1, 熟成中1, 製品3, 加塩槽水(18%食塩水)2, テリシッターチーズ熟成中2, 2) 付属牧場の材料として原水2, 牛糞32, 土壌(運動場5, 草地3)8, サイレージ1, 飼料(自家製, 市販品, ビールかす各1)3, 乾燥牧草(アメリカ製, 中国製各1)2, 原乳3件である.

3 分離方法

牛糞は1g, チーズ製造所, 付属牧場の各種検体は25g(ml)を一次増菌培地(検体の10倍量のポリミキシンB50単位/ml含有ブレインハートインヒュージョンブイヨン)に接種し, 5°C8週間低温培養後, さらに二次増菌培地(Nutrient Broth No.2(OXOID)25g, エスクリン1g, クエン酸鉄アンモニウム0.5g, 塩化リチウム5g, 寒天1g, ナリジック・アシド40mg, シクロヘキシミド50mg, アクリフラビン15mg, 水1000ml)で30°C2日間培養したものをOxford培地に接種し, リステリア菌が疑われるコロニーについて確認試験を行った.

4 確認試験

溶血反応には5%ヒツジ血液加ハートインヒュージョン寒天培地を, また, CAMPテストの使用菌株は食中毒由来のブドウ球菌を用いた. 糖分解試験にはPYP基礎培地(ニッスイ)に0.5~1%の糖を添加した.

5 薬剤感受性試験

感受性測定用ブイヨンで30°C18時間培養後, その0.1mlを感性ディスク用培地の入った角1号シャーレ(ニッスイ)に接種後一濃度ディスク(昭和ディスク)をのせ, 37°C18時間培養後阻止円を観察した. 使用薬剤はABPC(アミノベンジルペニシリン), CEZ(セファゾリン), FOM(ホスホマイシン), TC(テトラサイクリン), CP(クロラムフェニコール), EM(エリスロマイシン), SM(ストレプトマイシン), KM(カナマイシン), GM(ゲンタマイシン), NA(ナリジック・アシド)およびPL(ポリミキシンB)である.

結果

1 チーズ製造工程のリステリア菌検出状況

表1に示すように, 各種材料(原料乳, 殺菌乳,

チーズ, 加塩槽水)からはリステリア菌を検出しなかった.

表1 チーズ製造所のリステリア菌検出状況

	件数	一次増菌	二次増菌
チーズ原料乳	1	—	—
殺菌乳	1	—	—
カマンベールチーズ型詰め後	1	—	—
熟成中	1	—	—
製品	3	—	—
加塩槽水	2	—	—
テリシッターチーズ熟成中	2	—	—

2 付属牧場のリステリア菌検出状況

表2に示すように, 牛の運動場の土壌および飼料のビールかすからそれぞれ本菌が検出された. その他の原水, 牛糞, サイレージ, 乾燥牧草, 原乳からは検出されなかった. なお, 陽性検体はいずれも一次増菌培養では陰性であり, 二次増菌培養により検出された.

表2 付属牧場のリステリア菌検出状況

	件数	一次増菌	二次増菌
原水	2	—	—
牛糞	32	—	—
土壌			
運動場	5	—	1/5
草地	3	—	—
サイレージ	1	—	—
配合飼料			
自家製	1	—	—
市販品	1	—	—
ビールかす	1	—	1/1
乾燥牧草			
アメリカ製	1	—	—
中国製	1	—	—
原乳	3	—	—

3 分離菌株の生物学的性状

表3に示すように, 分離株は参照株YH14(国立予防衛生研究所)と完全に一致した. なお, 溶血反応のみが陰性で, 他の生物学的性状がリステリア菌(*L.monocytogenes*)と同じ性状を示す菌株が牛糞5/32, 運動場土壌1/5, ビールかす

1/1 検体、さらに、溶血性とラムノース陰性株が牛糞から4/32検体分離された。これらの菌株はいずれも *L.innocua* と同定された。

表3 リステリア分離菌株の生物学的性状

		分離株	参照株 (YH14)			
グ	ラ	陽	性	菌	+	+
溶				血	+	+
く	今	早	球	菌	+	+
マ	ン	ニ	ット		-	-
				α メチルDマンノシッド	+	+
ラ	ム	ノ	ー	ス	+	+
キ	シ	ロ	ー	ス	-	-
エ	ス	ク	リ	ン	+	+
V				P	+	+
硝	酸	塩	還	元	-	-
力	タ	ラ	ー	ゼ	+	+
運		動		性	+	+
6%	食	塩	耐	性	+	+
5°C	で	の	発	育	+	+

4 薬剤感受性試験成績

表4に示すように、ABPC、CEZ、CP、SM、KM、GMには極めて感受性(++)、NAとPLには耐性(-)を示した。なお、EMは由来によって感受性に差が認められた。すなわち、飼料由来株(ビールカス)は(+++)であるのに対して土壌由来株は(-)であった。

表4 薬剤感受性試験成績

	土壌由来株	飼料由来株	参照株 (YH14)
ABPC	+++	+++	+++
CEZ	+++	+++	+++
FOM	+	++	-
TC	++	+++	+++
CP	+++	+++	+++
EM	-	+++	+++
SM	+++	+++	+++
KM	+++	+++	+++
GM	+++	+++	+++
NA	-	-	-
PL	-	-	-

-:耐性, +:やや感受性, ++:かなり感受性
+++ :きわめて感受性

考 察

1 チーズ製造工程におけるリステリア菌汚染について

我が国における生乳のリステリア菌汚染の報告²⁾はみあたらないが、チーズ製造時の原料乳の殺菌温度は75°C以上にあげると不溶性カルシウムが増加し、また、タンパク質が変質して正常な凝固ができないとされている。なおDoyleら³⁾は71.7-73.9°C 16.4秒では牛乳中のリステリア菌は生残し、76.4-77.8°C 15.4秒では死滅したと報告し、このことから米国の規格である71.7°C15秒殺菌では白血球内にとりこまれた本菌は生残するとしている。

当該製造所における原料乳の殺菌は72°C 1分間行われているので、Doyleらの成績からリステリア菌は完全に殺菌されるものと思われる。

また、Shahamatら⁴⁾は25.5%の食塩水中での生残実験を行い、37°Cでは菌接種後4日、22°Cでは24日で死滅するが、4°Cでは長期間(132日以上)生残することを明らかにしている。今回の調査で加塩槽水(18%食塩水、14.5°C)から検出されなかったことは、これまでに汚染がなかったものと思われる。さらにRyserら⁵⁾は殺菌乳にリステリア菌を500個/ml添加してカマンベールチーズを製造し、リステリア菌の消長を検討したところ65日後には $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 個/gに増加したと報告している。これらの実験からチーズ製造中にリステリア菌がいったん混入するとリステリア菌の増殖を抑制することはできない。今回、チーズ製造工程のいずれからもリステリア菌を検出できなかった。このことから、当該製造施設は本菌による汚染がなかったことを明らかにすることができた。

2 牧場におけるリステリア菌の検出について

今回の調査で飼料として用いられたビールカスから本菌が検出された。したがって、これを食べた牛の糞からも検出可能と思われるが分離できなかった。この理由として、一次増菌培養では検出されず、二次増菌培養で検出されたことから、ビールカス中の菌数が少なく、また、腸管内での増殖が殆んどないためと思われる。なお、さらに牛糞の検体量を1gではなく、さらに増やして再検討する必要があると思われる。

我が国における飼料汚染が原因でリステリア症が発生した報告として、サイレーズの汚染から牛、めん羊の感染例^{6,7)}があり、飼料の汚染調査も大切である。また、牛の運動場の土壌から本菌が検出された。Welshimer⁸⁾は実験的に土壌中での本菌の生残について検討し、リステリア菌を添加した土壌を試験管に入れ綿栓し24~26℃の状態で67日間生残したと報告している。このことから、いったん運動場が汚染されると長期間本菌が生残する可能性も考えられる。

3 二次増菌培地について

今回使用した二次増菌培地は、Nutrient Broth No. 2に寒天を加えた半流動寒天培地にリステリア菌を接種すると、リステリア菌は培地の上部で発育することに着目し、これにOxford培地の処方と増菌培地に使用されている市販のサプリメント (SR141 OXOID)を参考に作製した自家製の増菌培地である。エスクリンを添加しているので本菌が増殖すると培地は黒変し、黒変しない場合は本菌が存在しないことを示すので分離培地に接種する必要がなく、手間が省けるメリットがある。また、本菌は培地の上部の方がよく発育することから、上部部分を採取すれば分離培地の接種量は太めの白金耳量でよいと思われる。なお、この二次増菌培地の有効性については、検査例数が少なく結論はでていないが、今回の調査では二次増菌培養したもののみから本菌が検出され有用性は確認された。

4 薬剤感受性について

分離菌株の薬剤感受性は、リステリア菌分離培養時の選択剤としてよく使用されているNAとPLには耐性を示した。しかしながら、今回分離培地として使用したOxford培地の選択剤に含まれているFOMに対してはやや感受性(+)からかなり感受性(++)の成績であった。しかし、Oxford培地に含まれているFOMの濃度は10 μ g/mlであるのでこの濃度であればリステリア菌の分離には影響しないと思われる。また、EMは土壌由来株は耐性(-)、ビールカす由来株は極めて

感受性(+++)であり、由来により感受性に差がみられた。この感受性の差を利用してさらに調査すれば汚染源追求のてがかりになるものと思われる。

まとめ

チーズ製造所におけるチーズ製造工程および付属牧場についてリステリア菌の検索を実施し以下の結果を得た。

- 1 チーズ製造工程中の各種材料(原料乳、殺菌乳、チーズ、加塩槽水)からは本菌を検出しなかった。
- 2 付属牧場では牛の運動場の土壌および飼料のビールカすから本菌が検出された。その他の原水、牛糞、サイレーズ、乾燥牧草、原乳からは検出されなかった。
- 3 分離菌は一次増菌培養では検出されず、二次増菌培養で検出された。
- 4 分離株の薬剤感受性成績は、PL、NAには耐性、ABPC、CEZ、CP、SM、KM、およびGMには感受性であった。

文 献

- 1) 丸山 務：食品と微生物。6(1)，3~15 (1989)
- 2) Takai, S. et al : Microbiol. Immunol. 34 (7), 631~634 (1990)
- 3) Doyle, M.P. et al : Appl. Environ. Microbiol. 53 (7), 1433~1438 (1987)
- 4) Shahamat M. et al : Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 246, 506~511 (1980)
- 5) Ryser, E.T., Marth, E.H. : J. Food Prot. 50 (5), 372~378 (1987)
- 6) 叶内恒雄ほか：日獣会誌。40, 850~853 (1987)
- 7) 芹川 慎ほか：日獣会誌。42, 781~785 (1989)
- 8) Welshimer, H.J. : J. Bacteriol. 80, 316~320 (1960)