

[短報]

実験的小規模サイレージによる *Listeria monocytogenes* の増殖条件の検討芹川 慎^{*1} 高橋 雅信^{*1} 糟谷 広高^{*1} 藤田眞美子^{*2} 扇 勉^{*1}

サイレージ中での *Listeria monocytogenes* (以下, L.m菌) の発育条件を小規模のコンテナでサイレージを調製して検討した。L.m菌と同時に分離され、発育条件が類似する非病原性 *Listeria innocua* (以下, L.i菌) を含めた *Listeria* 属菌 (以下, L属菌) で発育条件を評価した。梱包袋の表面に空気漏れの穴を設けなかったコンテナでは120検体のうち1検体のみからL.i菌が少数分離された。一方、梱包袋に穴を設けた場合、穴の周辺はカビが発育してpHが高く、L属菌が分離された。L属菌の分離菌数は高水分は中・低水分より少なく、表層は内部より多かった。ギ酸の添加でサイレージのpHは非添加より低くなったが、L属菌の発育抑制効果は認められなかった。

結 言

欧米では *Listeria monocytogenes* (以下, リステリア菌またはL.m菌) は乳製品、特に非殺菌乳を用いた製品など各種食品から人に集団感染を起こし、食品衛生上問題となっている⁴⁾。わが国でもリステリア症の発生は1958年の初確認以来、1990年12月末までに681症例を数えるが、感染源、伝播経路、食品との関連が証明された事例、および集団での発生例は確認されていない⁴⁾。生乳のリステリア菌汚染については諸外国では多くの報告があり^{4), 5)}、わが国でも1991年の埼玉県での報告⁷⁾以来、長野県¹⁰⁾、北海道⁸⁾で報告されている。生乳のリステリア菌汚染は例え混入していても実際は殺菌された安全な製品が流通するので問題とならないことから、規制等はされていない。しかし、本菌は低温でも増殖可能であるため自家消費や加工において生乳を殺菌しないで利用したり、加熱殺菌しても二次汚染が起きた場合は人の健康上の危害が生じる可能性がある。

生乳のリステリア菌汚染の原因として環境、糞便、サイレージが主要な汚染源と考えられている⁵⁾。サイレージのリステリア菌汚染については動物のリステリア症の発生に際し感染源の調査として、また生乳への汚染源の調査として広く行われている。さらに、英国のFenlon¹⁾はサイレージの調整条件や梱包状態とリステリア菌の増殖との関係を検討しているが、わが国では報告がない。そこで、サイレージの調整条件とリステリア菌の発育との関連を実験的に小規模のサイレージを調製して検討した。

材料および方法

1. サイレージの調製

平成8年6月27日、チモシー主体の一番牧草(マメ科乾物割合15%)を出穂期に刈り、細切した各水分の牧草をプラスチック・コンテナの中に置いたポリ袋の中に詰め込んだ(図1)。表1のような調整条件(穴数、牧草水分、加重およびギ酸添加の有無)のコンテナを36個調製した(以下、コンテナ・サイレージ)。詰め込んだ草量は低加重処理では低水分15kg、中水分20kg、高水分25kgであり、高加重処理では各水分とも倍量詰め込んだ。ギ酸の添加量は牧草重量の5%量とし、牧草をポリ袋に詰めるときにスプレーした。調製時の牧草の水分は高水分牧草で83%、中水分牧草で70%、低水分牧草で55%であった。

リステリア菌を1g当たり500個接種した牧草200gをポリエチレンメッシュ袋に入れ、同じ水分のサイレージを調製するコンテナ内の2カ所(表層①と中間層③)に置き、空気を追い出して密閉した(図1)。その後、いくつかのコンテナのポリ袋表面に直径2mmの穴を3個または30個あけた(以下、穴処理コンテナ・サイレージ)。コンテナ内のポリ袋の上に砂袋を置いて圧力を1.3g/cm²としたものを低加重処理、砂袋と低加重処理コンテナを置いて圧力を40g/cm²としたものを高加重処理とした。その結果、密度は中水分の高加重で0.52g/cm³、低加重で0.26g/cm³となり、また低水分では高加重で0.39g/cm³、低加重で0.20g/cm³となった。なお高水分の密度は測定していない。穴を設けたコンテナは全て低加重処理にした。コンテナは全体にビニールシートを架けて開封まで放置し、調製後53日(8月19日)~70日(9月5日)で開封した。サイレージのサンプリングは①、③の袋の回収と表層②、中間層④および底部⑤の部位から行った。

2000年6月20日受理

^{*1}北海道立根釧農業試験場, 086-1153 中標津町^{*2}北海道農政部農業改良課, 060-8588 札幌市

①③：L.m菌接種袋
①～⑤：採取部位

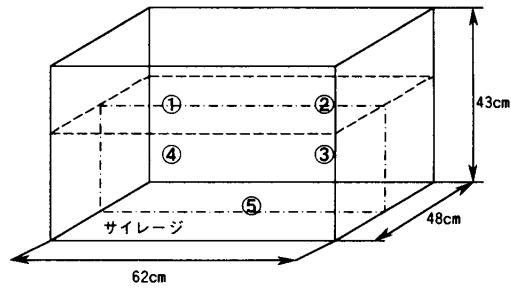


図1 コンテナ・サイレージのL.m菌接種部位とサンプリング部位

表1 コンテナ・サイレージの調製条件と調製個数

コンテナ数	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
穴数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	30	30	30	30	30
水分 ¹⁾	高	高	中	中	低	低	高	高	中	中	低	低	高	高	中	中	低	低	高	高	中	中	低
加重 ²⁾	高	高	高	高	高	高	低	低	低	低	低	低	低	低	低	低	低	低	低	低	低	低	低
ギ酸添加	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

¹⁾高：高水分、中：中水分、低：低水分

²⁾高：高加重、低：低加重

2. *Listeria*属菌（以下、L属菌）の培養

サイレージ20 gにサブリミットI加UVM培地（Oxoid）200mlを加え、ストマッカーで攪拌した後、同培地で 10^{-6} まで段階希釈したものを30℃で24時間一次増菌培養した。菌の発育で混濁したものをサブリミットII加UVM培地（Oxoid）に移植して24～48時間二次増菌した。二次増菌で混濁したものをOxford培地（Oxoid）に移植した。疑わしい集落を5%子牛血液加トリプトソイ寒天（ニッスイ）で純培養し、同定はIDF Standard³⁾に従った。菌数はL属菌が分離された最大希釈で示し、以下のとおり表示した。

- ：サイレージ20 g中に陰性

+ ：サイレージ20 g中に陽性

0～6： $10^0 \sim 10^6$ 個/g

また、菌数を比較する場合は、-は0、+は1、0は2、以下同様に6は8と補正して計算した。

3. pHの測定

高水分サイレージは100 g、中水分サイレージは50 g、低水分サイレージは35 gを蒸留水140mlに浸漬し、冷蔵庫に18～24時間置いた後pHを測定した。

なお、成績を取りまとめる際、部位①②を表層、部位③④⑤を内部とし、統計分析はFisherの直接法で行った。

結果および考察

1. 密封コンテナ・サイレージのpHとL属菌分離成績

梱包ポリ袋の表面に穴を設けなかった場合、表面に小さなカビの発育が散見されたコンテナが2、3個あったが、大部分のコンテナにカビの発育は認められなかった。

コンテナ24個の120部位からL属菌が分離されたのはたった1検体（高加重、低水分、ギ酸非添加の表層）で、分離菌は非病原性の*Listeria innocua*（以下、Li菌）で菌数は 10^0 個/gと少なかった。封入後に空気のポケット状態⁹⁾があったため例外的に生き残ったのであろう。pHは各コンテナのどの部位もL.m菌の発育が一般に抑制されるといわれているpH5.0以下であった⁶⁾。

2. 穴処理コンテナ・サイレージのpHとL属菌分離成績

梱包ポリ袋の表面に穴を設けたコンテナ・サイレージの成績を表2に示した。また、図2は全コンテナ・サイレージの成績を理解しやすくするために示した。

穴処理コンテナでは穴の近くの表面にカビの発育が認められ、穴が30個ではほとんど表面全域に広がっていた。サイレージのpHは大部分のコンテナで表層は内部より高かった。平均pHは高水分で4.7、中水分で4.9、低水分で5.5と水分が低くなるにつれて高くなった。特に表層ではこの傾向が顕著であった。穴数が30個のコンテナのpHはどの水分でも穴が3個のコンテナより高く、また水分が低下するにつれその差は大きくなった。特に表層では水分が低下するにつれ、その差は大きくなった。L属菌の分離は穴が3個の場合、高水分サイレージでは分離されず、中水分では7/10部位から、低水分では4/10部位から分離された。穴が30個の場合、L属菌は高水分で7/10部位、中水分で10/10部位、低水分で5/5部位からと穴が3個のコンテナより高率に分離された。穴処理コンテナ全体でみても高水分は7/20部位(35%)で中水分の17/20部位(85%)、低水分の9/15部位(60%)よりも低く、水分の低いサイレージの方が高いサイレージよりL属菌が

表2 穴処理コンテナ・サイレージのpHおよびL属菌分離成績

水分	処理	加水	ギ酸	穴数	コンテナ 個数	検査 部位数	平均pH			L属菌分離 部位数	L属菌分離数		
							表層	内部	全体		表層	内部	全体
高水分	低加重	+	+	3	1	5	4.3	4.1	4.2	0	-	-	-
			-	3	1	5	5.0	4.3	4.5	0	-	-	-
		-	+	30	1	5	5.4	4.8	5.0	5	6.5	3.0	4.0
			-	30	1	5	6.3	4.4	5.2	2	4.5	-	1.8
中水分	低加重	+	+	3	1	5	4.1	4.3	4.2	3	6.0	2.3	2.6
			-	3	1	5	4.9	4.4	4.6	4	3.0	3.0	3.0
		-	+	30	1	5	6.8	4.5	5.4	5	6.0	3.0	4.2
			-	30	1	5	7.0	4.3	5.3	5	8.0	4.7	6.0
低水分	低加重	+	+	3	1	5	4.5	4.4	4.4	1	-	3.0	0.6
			-	3	1	5	6.0	4.6	5.2	3	4.0	1.0	2.2
		-	+	30	1	5	7.8	4.7	5.9	ND	ND	ND	ND
			-	30	1	5	8.2	5.2	6.4	5	8.0	5.7	6.6

ND：培養してない

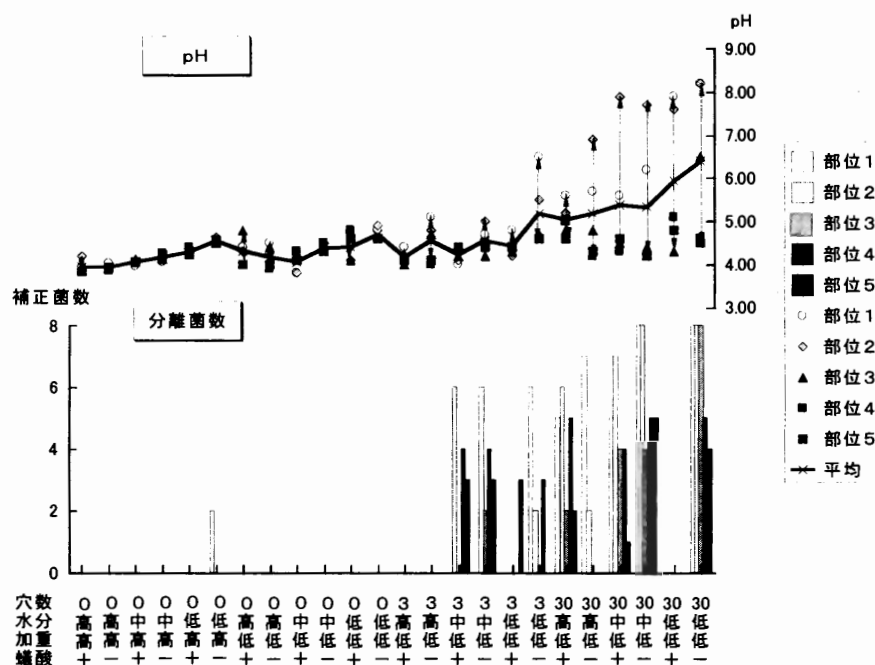


図2 コンテナ・サイレージの部位別のpHとL属菌数

増殖しやすいと考えられた¹⁾。穴を開けたコンテナでL属菌の分離率が高くなったのは穴の存在がL属菌発育の最大の要因であることを示している。穴を開けると空気が侵入し、乳酸発酵が進まない。その結果、pHの低下が小さく、L属菌が発育できる環境となるためである¹⁾。

サイレージ調製に際しギ酸を添加することは詰込み牧草の初期pHを低くして、乳酸菌による乳酸発酵を早期に促進させることを期待している。これは同時にL属菌を抑制することも期待できる。ギ酸添加の効果は密閉コンテナの場合は高水分では添加、非添加でpHに差はなかったが、中水分および低水分ではギ酸添加の方のpHが低かった。一方、穴処理コンテナサイレージでは、穴

が3個ではどの水分でも表層、内部とも添加の方が非添加のものよりpHは低くかった。穴が30個の場合もほぼ同じ傾向を示したが、pHはどの水分でも3個の場合に比べ高かった。しかし、L属菌分離率では添加で14/25検体(56%)、非添加で19/30検体(63%)となり、ギ酸のL属菌に対する発育抑制効果は不明であった。このように、穴のある場合はギ酸を添加してもL属菌の増殖を抑制する効果はないものと思われた。

L.m菌の発育とpHとの関係については多くの報告があり、一般的にはpH5.0以下で発育が抑制されるといわれている⁶⁾。そこで、L属菌が分離された34部位のpHを区分してL属菌の分離率および分離菌数をみた(表3)。

表3 L属菌が分離された34部位の各pH域における菌種別分離率および菌数

pH	L属菌分離		L.m菌分離		L.i菌分離	
	検体数	平均菌数	検体数	平均菌数	検体数	平均菌数
4.0以下	0(0%)		0(0%)		0(0%)	
4.1~4.5	13(38%)	3.9A	10(38%)	3.3A	11(46%)	3.4A
4.6~5.0	8(24%)	3.3A	5(19%)	3.6A	5(21%)	3.4A
5.1以上	13(38%)	6.2B	11(42%)	5.9B	8(33%)	6.9B

A-B間に有意差あり (p<0.01)

L属菌はpH4.0以下の部位からは分離されず、4.1~4.5域で13検体(38%)、4.6~5.0域で8検体(24%)から分離された。これは先に示した発育を抑制するpH域でも分離率が高かったことを示すが、菌数はそれほど多くはなかった。分離菌数はpHが5.1以上の高い部位では明らかに多かった(p<0.01)。L.m菌およびL.i菌単独でみた場合も各pH域での分離割合に差はなかった。Fenlon²⁾も両菌の増殖に対するpH、水分活性度(water activity)および空気存在に対する態度を検討して、あまり差はないとしていることから、サイレージのL.m菌増殖条件の評価にはL.i菌を指標にしても可能と考えられた。従って、成績はL属菌としてまとめた。

以上のことから、サイレージでのリステリア菌の増殖は梱包中の空気の残存または空気漏れが最大の原因であり、次いで高水分より中・低水分の方が発育しやすい環境であると考えられた。従って、実際のサイレージ調製では気密度が低く、傷穴のできやすいロールペールラップサイレージが最も問題となることが示唆された。

引用文献

- 1) Fenlon: Silage and Health(B.A. Stark and J.M. Wilkinson, eds) Chalcombe Publications, Marlow Bottom, Bucks, 7-18, 1988.
- 2) Fenlon, D.R.: The influence of gaseous environment and water availability on the growth of *Listeria*. Microbiologia Alimentis-Nutrition, 7, 165-169, 1989.
- 3) IDF STANDARD (1991年改訂版): 社団法人 日本国際酪農連盟, 862-875.
- 4) 丸山 努ら: 特集: Zoonosisとしてのリステリア症, 獣医畜産新報, 44(12), 753-779, 1991.
- 5) Prentice, G.A.: 生乳中の病原菌 IDF Group A 10/11 A Document 158 (市川意子訳), 乳質改善資料, No.99, 95-105, 1994.
- 6) サイレージの生化学・第2版 (McDonald et al. eds., 内田仙二ら監修), Dairy Japan, 155-162, 1995.
- 7) 齊藤章暢, 徳丸雅一, 正木宏幸, 板屋民子, 青木敦

子: 生乳からの *Listeria monocytogenes* の検査法の較と生乳における *Listeria* 汚染状況. 日獣会誌, 44, 378-393, 1991.

- 8) 笹野 貢: 生乳の品質管理. 酪農総合研究所, 50-51, 1998.
- 9) 須藤 浩: 異常サイレージとサイレージ給与に関連する家畜の病気の問題(3). 畜産の研究, 39(11), 1339-1343, 1985.
- 10) Yoshida, T., Sato, M. and Hirai K.: Prevalence of *Listeria* species in raw milk from farm bulk tanks in Nagano prefecture. Journal of Veterinary Medical Science, 60(3), 311-314, 1998.

Studies on the growth conditions of *Listeria monocytogenes* in the experimental scale of silage

Shin SERIKAWA*, Masanobu TAKAHASHI, Hirota KASUYA, Mamiko FUJITA and Tsutomu OHGI

*Hokkaido Konsen Agricultural Experiment Station, Nakashibetsu, Hokkaido, 086-1153 Japan
and *Agricultural Improvement Division, Department of Agriculture, Hokkaido Government, Sapporo, Hokkaido, 060-8588 Japan