

ヨーネ菌の牛乳プラント内HTST殺菌条件の検証

五十君静信[#], 入口翔一, 門田修子, 岡田由美子, 山本茂貴, 森 康行^{*}

Study on the effects of HTST pasteurization temperatures on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in an industrial fluid milk-processing system

Shizunobu Igimi[#], Shoichi Iriguchi, Shuko Monden, Yumiko Okada, Shigeki Yamamoto and Yasuyuki Mori^{*}

Johne disease is ruminant chronic granulomatous enteritis caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). The domestic animals infected with this pathogen present severe weight loss due to chronic diarrhea and a reduction in lactation yield. These result in enormous economic loss since the affected animals are subsequently subject to artificial selections and disinfection of the environment are absolutely necessary. Furthermore, MAP has been suspected to have pathological relationship to Crohn's disease, human chronic granulomatous enteritis. The bacterium grows slower on solid culture and its colony becomes visible after two months of culture. In Japan, there has been almost no investigation on pasteurization temperature of commercial milk using MAP. It comes from the fact that the growth rate of MAP is very slow and that MAP is a related species to *Mycobacterium tuberculosis*, which pasteurization condition has been well defined.

The studies on the pasteurization conditions of commercial milk have been mainly targeted to reduce the risk of infection to *Coxiella* and *Mycobacterium tuberculosis*. However, there has been a concern about the possibility that MAP is remained in pasteurized milk because MAPs form an aggregate and the bacterium at its center may not receive enough heat to get pasteurized. From these reasons, the present study aims to investigate validity of the current pasteurization conditions of commercial milk by implementing experimental pasteurization at various pasteurization temperatures using milk experimentally infected with MAP, and to clarify if MAP is eliminated at these temperatures in order to achieve smooth enforcement of the current ministry order.

We conducted plant pasteurization experiment at four pasteurization conditions (high temperature, short time (HTST); 82, 77, 72°C for 15 seconds and low temperature, long time (LTLT); 63°C for 30 minutes) using two MAP strains, ATCC19698 and OKY-20. In conclusion, there appeared no colony of the two MAP strains formed from the milk pasteurized at the four pasteurization conditions examined.

Keywords: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, milk, pasteurization, plant

[#]To whom correspondence should be addressed:

Shizunobu Igimi; 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: +81-3-3700-1141 ex. 502, Fax: +81-3-3700-9246; E-mail: igimi@nihs.go.jp

^{*}(独)動物衛生研究所 ヨーネ病研究チーム Johne Disease Research group, National Institute of Animal Health

緒言

ヨーネ病は、ヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; MAP) により引き起こされる反芻獣の慢性肉芽腫性腸炎である。本感染症に罹患した家畜は慢性の下痢による消瘦を呈し、泌乳量の低下から淘汰や環境の消毒などが必要となり、経済的損失が大きいため¹⁾、家畜伝染病予防法により患畜の殺処分が定められている。また、MAPはヒトのクローン病との関連性が

疑われている²⁾。本菌は患畜の糞便を通じて乳や食肉を汚染する可能性があるが³⁾、人工培地での発育が遅く、コロニーを目視で確認できるまでおよそ2ヶ月を要するため、早期診断が困難である。

牛乳の殺菌条件は、主にQ熱や結核菌を対象に感染リスクの低減を目的として検討されてきた。昭和26年に発令され、平成19年に最終改正された「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令」においては、牛乳の殺菌は「保持式により摂氏63度で30分間加熱殺菌するか、又はこれと同等以上の殺菌効果を有する方法で加熱殺菌すること」とされ、63℃ 30分の加熱は低温保持殺菌 (LTLT) 法とよばれる。現在わが国で一般的に行われている殺菌方法は、120℃から135℃で1から3秒加熱する超高温瞬間殺菌 (UHT) 法である。加熱温度が高温になるほど生乳中に含まれる耐熱性細菌の除去効率が高まり、品質保持期限を長く設定することができる。一方で、加熱温度が低く、加温時間が短いほど牛乳の味がよいとされることがあり、一部メーカーは72℃から85℃で15秒程度加熱する高温短時間殺菌 (HTST) 法で殺菌した牛乳と、上記LTLT法を用いたものを「低温殺菌乳」として販売している。

これまでに、国内ではMAPを用いた牛乳における加熱殺菌温度の検討はほとんど行われていない。その理由としては、前述のように発育速度が遅いことや、既に加熱殺菌条件が検討されている結核菌と近縁である事が挙げられる。しかしながら、ヨーネ菌は液体中で塊状を呈する場合があるため、食品の加熱殺菌時に中心部への加熱が十分にいき渡らず、低温殺菌の条件によっては完全な殺菌が困難になる事が懸念されており⁴⁾、実験室内の検討では結核菌よりも強い耐熱性を持つことを示唆する報告も見られる⁵⁾。本研究では、牛乳の殺菌条件の妥当性を確認するため、ヨーネ菌を実験的に接種した牛乳を用いて、ミルクプラントにおける各種HTST及びLTLT殺菌温度条件でヨーネ菌が死滅するか検討を行い、乳等省令の円滑な施行に資する事を目的とした。

実験方法

1. 菌株

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* ATCC19698

M. avium subsp. *paratuberculosis* OKY-20

2. 培地

Middlebrook 7H10 Agar with mycobactin and antibiotics (MMA, Becton, Dickinson and Company)

3. 菌数の測定

接種菌数の測定：-80℃に凍結保存した菌液を牛乳で10⁴倍希釈したものを、MMA平板培地に20μl塗抹後、37℃で2ヶ月間培養し、形成コロニーを計数することを6回実施し、菌数を確定した。使用した2株は、2ヶ月の培養で、計数可能な集落を形成した。

添加回収後の菌数測定：50mlの予熱した検体を遠心分離し、沈さを10mlの0.75% Hexadecylpyridiniumchloride monohydrate (HPC) に懸濁した後、室温で5時間培養した。遠心分離後、MAXIMUM RECOVERY DILUENT (MRD) で洗浄し、1mlのMRDに懸濁した (HPC treatment)。加熱処理した検体については、200μlずつ5枚の平板に接種、加熱処理前の検体の場合は更に、10、10²及び10³に希釈し、それぞれ20μlを4枚のMMAに塗布した。平板は37℃で2ヶ月間培養し形成された集落数を判定した。発育の認められない平板はその後最大4ヶ月まで観察を続けたが増殖は確認されなかった。

4. 加熱媒体

それぞれの加熱条件について、市販牛乳 (E社製造、LTLT 63℃ 30分殺菌商品) 30 lを加熱媒体として使用した。

5. 殺菌条件の設定

殺菌処理装置は、(株) イズミフードマシナリ社製、SO 4型プレート式熱交換器を用いた (図1及び2)。82℃ 15秒、77℃ 15秒又は72℃ 15秒 (HTST)、63℃ 30分 (LTLT) の各温度帯及び時間にて殺菌を行った。加熱条件を最も短くするため、ホモゲナイズ工程を行わず、サーバータンクから直接プレート式熱交換機へ流し、殺菌を行った。

6. サンプリング

加熱殺菌後、ミルク検体を添加回収後の菌数測定法に示した処理を行い、3. 菌数測定法に従って計数した。

7. 殺菌効果

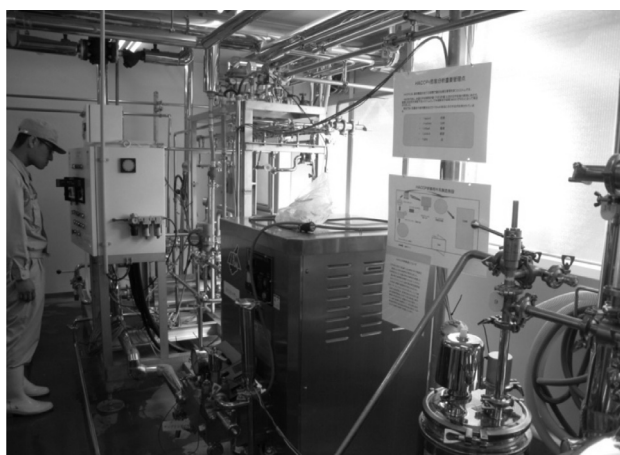
各加熱条件の殺菌効果は、殺菌前の菌数 (対数値) と殺菌後の菌数 (対数値) との差で示した。

殺菌効果 (nD) = log₁₀ (殺菌前の菌数) - log₁₀ (殺菌後の菌数)

結果及び考察

実験プラントを用いた牛乳中のヨーネ菌殺菌試験の結果をTable 1及び2に、72℃ 15秒のHTST処理工程における検体の温度変化の実測値をFig. 2に示した。2株ともいずれの殺菌条件においても、コロニー形成が検出限

Panel A



Panel B



Fig. 1 Panel A: Plate heat exchanger, Type SO4 (IZUMI Food Machinery Co., Ltd.)
Panel B: Milk sampling from SO4.

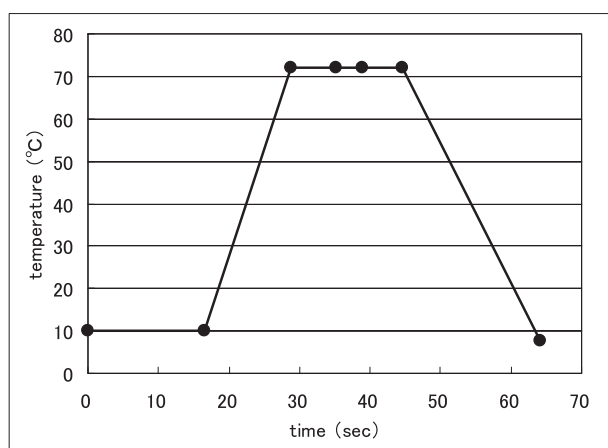


Fig. 2 Monitored temperature of milk during the HTST pasteurization at 72°C for 15sec.

界以下となっており、ATCC19698では6.7D以上、OKY-20では5.4D以上の殺菌効果が認められた。したがって、本プラント実験ではHTST殺菌の内最も低温である72°C 15秒での殺菌条件であっても、ヨーネ菌の制御に効果があると考えられた。主に本菌の加熱条件検討を5 ml以下の小規模な試験管内実験として実施している過去の研究では、72°C 15秒の殺菌条件が充分とは限らないとする報告⁶⁾と、充分であるとする報告⁷⁾がみられる。そのため、それらの結果が必ずしも牛乳製造現場で応用しうるとは限らないと思われる。一方、5株のヨーネ菌と120 lの生乳を用いた報告では、72°C 15秒の殺菌で生菌は分離されなかった⁸⁾。今回、実際のわが国における製造環境により近い実験用ミルクプラントを使用した本研究で、30 lの牛乳を用いた検討による情報は、製造現場

Table 1 Effect of pasteurization on MAP ATCC19698.

| Pasteurization Method | Pasteurization condition | Heating medium | Plating Method | Cultured Medium | CFU/ml (log10) | Pasteurization Effect (nD) |
|-----------------------|--------------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------------------|
| before pasteurization | — | milk | direct plating | MMA | 5.0 | — |
| LTLT | 63°C 30min | milk | direct plating | MMA | < -1.7* | >6.7 |
| | 82°C 15sec | milk | direct plating | MMA | < -1.7* | >6.7 |
| HTST | 77°C 15sec | milk | direct plating | MMA | < -1.7* | >6.7 |
| | 72°C 15sec | milk | direct plating | MMA | < -1.7* | >6.7 |

*: under the detection limit (0.02cfu/ ml)

Table 2 Effect of pasteurization on MAP OKY-20.

| Pasteurization Method | Pasteurization condition | Heating medium | Plating Method | Cultured Medium | CFU/ml (log10) | Pasteurization Effect (nD) |
|-----------------------|--------------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------------------|
| before pasteurization | — | milk | direct plating | MMA | 3.7 | — |
| LTLT | 63°C 30min | milk | direct plating | MMA | < -1.7* | >5.4 |
| | 82°C 15sec | milk | direct plating | MMA | < -1.7* | >5.4 |
| HTST | 77°C 15sec | milk | direct plating | MMA | < -1.7* | >5.4 |
| | 72°C 15sec | milk | direct plating | MMA | < -1.7* | >5.4 |

*: under the detection limit (0.02cfu/ ml)

における牛乳中の微生物制御に有益な情報となると思われる。今回プラント実験で評価したATCC19698株は標準的に用いられている菌株で、人工培地での継代数が多いのに対し、OKY-20株は分離後の人工培地での継代数が少ないことから、おそらく集塊形成能はより高いと思われる。OKY-20株のD値が数値上高く出たのは集塊形成の影響とも考えられるが、初期菌数が異なっており、今回使用した2株のD値の差は主に初期接種菌量の違いに起因しており、本質的な耐熱性の違いではないと思われる。

謝辞

本研究は、平成20年度厚生労働省食品等試験検査費により行われた。プラント実験は、横浜検疫所の輸入食品検査・検査センター内のプラント施設で行った。施設の提供並びに実験期間中のご協力をいただきました滝本センター長、検疫所職員に深謝いたします。

参考文献

- 1) Stabel, J. R.: *J. Dairy Sci.*, 81, 283-288 (1998)
- 2) Mendoza, J. L., Lana, R. and Díz-Rubio, M.: *World J Gastroenterol.* 28, 417-422 (2009)
- 3) Ayele, W. Y., Svastova, P., Roubal, P., Bartos, M. and Pavlik, I.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 1210-1214 (2005)
- 4) Keswani, J. and Frank, J. F.: *J. Food. Prot.*, 61, 974-978 (1998)
- 5) Sung, N. and Collins, M. T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 999-1005 (1998)
- 6) Gao, A., Mutharia, L., Chen, S., Rahn, K. and Odumeru, J.: *J. Dairy Sci.*, 85, 3198-3205 (2002)
- 7) Stabel, J. R., Steadham, E. M. and Bolin, C. A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4975-4977 (1997)
- 8) Pearce, L. E., Troung, H. T., Crawford, R. A., Yates, G. F., Cavaignac, S. and de Lisle, G. W.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 3964-3969 (2001)