



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	乳・乳製品中の好気性芽胞菌に関する研究
Author(s)	大久保, 慈輝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第7095号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r7095
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/79370
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshiaki_okubo.pdf



乳・乳製品中の好気性芽胞菌に 関する研究

大久保 慈輝

目次

略語一覧

第一章 序論

第一節	食の安全の考え方	1
第二節	牛乳の消費期限と賞味期限	1
第三節	乳の殺菌の歴史	2
第四節	乳の殺菌技術の変遷	3
第五節	乳・乳製品の殺菌条件	4
第六節	HTST 殺菌で残存する微生物	5
第七節	UHT 殺菌で残存する微生物	5
第八節	製造ラインで増殖する微生物	6
第九節	乳・乳製品の微生物学的品質に影響を及ぼす好気性芽胞菌	6
第十節	<i>Paenibacillus</i> 属	7
第十一節	<i>Bacillus cereus</i>	8
第十二節	<i>Anoxybacillus flavithermus</i> および <i>Geobacillus</i> <i>stearothermophilus</i>	10
第十三節	本論文の目的と構成	12

第二章 β -ガラクトシダーゼ活性を選択基準とした簡便なメンブラン フィルター法による生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞数レベルの 評価

第一節	緒言	17
第二節	材料および方法	

1. 供試菌株	18
2. 芽胞懸濁液調製	18
3. メンブランフィルター法	19
4. MALDI TOF-MS による菌種同定	20
5. 16S rDNA による菌種同定	20
6. 0.45 μm および 0.65 μm 孔メンブランフィルターを用いた芽胞 回収試験	21
7. 低温性芽胞菌の芽胞中から <i>Paenibacillus</i> 属芽胞を選択的に検 出するための培養温度の影響調査	21
8. 生乳中の <i>Paenibacillus</i> 属芽胞の分布調査	22
9. 統計解析	23
第三節 結果	
1. <i>Paenibacillus</i> 属芽胞の回収に適したフィルター孔サイズの選 択	23
2. <i>Paenibacillus</i> 属芽胞の効率的計測に適した培養条件	23
3. 生乳中の <i>Paenibacillus</i> 属芽胞の分布	25
第四節 考察	25
第五節 小括	27

第三章 北海道の生乳中の *Bacillus cereus* およびその低温性株の芽胞数レ ベルの季節変動および菌株多様性の評価

第一節 緒言	32
第二節 材料および方法	
1. 生乳のサンプリング	33

2. 生乳中の <i>B. cereus</i> 芽胞数測定	34
3. <i>B. cereus</i> の低温性株の識別	34
4. <i>B. cereus</i> の MLVA タイピング	35
5. 統計解析	37
第三節 結果および考察	
1. 生乳中の <i>B. cereus</i> 芽胞の分布および季節変動	37
2. 生乳中の <i>B. cereus</i> 低温性芽胞の分布および季節変動	38
3. 季節別に見た生乳中の <i>B. cereus</i> の菌株多様性	40
4. 年間を通じて検出される <i>B. cereus</i> の存在	41
第四節 小括	42

第四章 乳業環境中の高耐熱性 *Bacillus cereus* の分布から評価した 120 °C

2 秒殺菌 UHT 牛乳の微生物学的安全性

第一節 緒言	49
第二節 材料および方法	
1. 乳業環境からの <i>B. cereus</i> の分離	51
2. 芽胞懸濁液調製	51
3. 耐熱性試験	52
4. <i>D</i> 値および <i>z</i> 値の決定	52
5. 殺菌前および殺菌後汚染条件における高耐熱性株の UHT 牛乳中での 10 °C および 12 °C 増殖性試験	53
第三節 結果	
1. 乳業環境中の高耐熱性株の分布	54

2. 殺菌前および殺菌後汚染条件における高耐熱性株の UHT 牛乳中での 10 °C および 12 °C 増殖性	55
第四節 考察	55
第五節 小括	57
第五章 リアルタイム PCR による乳製品中の <i>Anoxybacillus flavithermus</i> および <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 芽胞の種特異的計測法	
第一節 緒言	63
第二節 材料および方法	
1. 供試菌株	65
2. 菌株培養液調製	66
3. 芽胞懸濁液調製	66
4. 菌数および芽胞数測定	67
5. 特異性試験用の DNA の抽出	67
6. 芽胞懸濁液からの検出感度および定量性試験用の標準 DNA の抽出	68
7. プライマー設計	68
8. リアルタイム PCR 分析	69
9. 特異性試験	69
10. 検出感度および定量性試験	70
11. 乳、10%還元脱脂乳、クリームの DNA 抽出前の処理	70
12. EMA 処理	71
13. 前処理サンプルあるいは EMA 処理サンプルにおける芽胞からの DNA の抽出	71

1 4．プロテイナーゼ K 処理によるクリームの C_t 値への影響調査	71
1 5．EMA 処理による芽胞の特異的定量における効果試験	72
1 6．芽胞および死菌をスパイクしたサンプルの芽胞定量試験	72
第三節 結果	
1．プライマーの特異性	73
2．リアルタイム PCR の検出感度および定量性	73
3．プロテイナーゼ K 処理によるクリームの C_t 値への影響	74
4．EMA 処理による芽胞の特異的定量における効果	74
5．芽胞および死菌をスパイクしたサンプルの芽胞定量	75
第四節 考察	75
第五節 小括	77
第六章 総括	
第一節 緒言	85
第二節 総合討論	86
要約	92
謝辞	
参考文献	
論文	

略語一覽

LL;	long-life
LTLT;	low-temperature long-time
HTST;	high-temperature short-time
UHT;	ultra-high-temperature
UP;	ultra-pasteurization
ITS;	internal transcribed spacer
RAPD;	randomly amplified polymorphic DNA
X-Gal;	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
MALDI TOF-MS;	matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry
NCBI;	National Center for Biotechnology Information
rep-PCR;	repetitive element palindromic PCR
AFLP;	amplified fragment length polymorphism
MLVA;	multiple-locus variable-number tandem repeat analysis
MYP;	mannitol-egg yolk-polymyxin agar
<i>cspA</i> ;	cold shock protein A gene
dNTP mixture;	deoxynucleoside triphosphate mixture
VNTR;	variable-number tandem repeat
ESL;	extended-shelf-life
<i>spo0A</i> ;	stage 0 sporulation protein A gene
EMA;	ethidium monoazide
PMA;	propidium monoazide

ATCC;	American Type Culture Collection
IFO;	Institute for Fermentation, Culture Collection of Microorganisms
JCM;	Japan Collection of Microorganisms
SDS;	sodium dodecyl sulfate
TE;	Tris-EDTA buffer
T_m ;	melting temperature
C_t ;	threshold cycles
E ;	amplification efficiency
CTAB;	cetyltrimethylammonium bromide

第一章 序論

第一節 食の安全の考え方

レトルト食品など、いわゆる商業的無菌食品を除き、あらゆる食品には微生物が残存している可能性がある。乳・乳製品も例にもれず、無菌の LL (long-life) 製品を除き、乳・乳製品中には芽胞菌などの微生物が残存する可能性がある。しかしながら、「微生物の残存」＝「危険な食品」というわけではなく、定められた方法により保存した場合において、賞味期限内に危害となるレベルにまで増殖を示さなければ、食としての安全性は保たれる。これが食の安全の考え方である。

無菌の製品はその名の通り、微生物が残存していないので安全といえるだろう。しかし、無菌を目的とした殺菌は高温で行なうため、食品成分の化学変化が生じ、官能的な劣化が生じる。つまり、微生物学的には安全ではあるが、おいしくない製品となり、消費者に敬遠される結果となる。そのため、食品業界では微生物の残存と官能特性のバランスを考えて殺菌を行ない、適切な賞味期限を設定し、消費者に安全でおいしい製品を提供しているのである。

第二節 牛乳の消費期限と賞味期限

食品の貯蔵寿命 (shelf life) の表示法としては、「消費期限」と「賞味期限」があり、日本ではいずれかを表示することが食品衛生法および JAS 法で義務付けられている。消費期限とは、定められた方法により保存した場合において、腐敗、変敗その他の品質の劣化に伴い安全性を欠くこととなるおそれがないと認められる期限を指し、品質が急速 (おおむね 5 日以内) に劣化しやすい食品に表示される。一方、賞味期限とは、定められた方法により保存した場合において、期待されるすべての品質の保持が十分に可能であると認められる期限を指す。

牛乳の貯蔵寿命の表示法も食品衛生法および JAS 法に準じており、チルド製品については日本の流通温度である 10℃、常温保存可能品については常温で保存し、保存中、微生物試験、理化学試験、官能試験を行なうことにより期限を設定している。10℃ という保存温度では LTLT (low-temperature long-time) 牛乳や HTST (high-temperature short-time) 牛乳は品質劣化が早いため、消費期限表示となるが、UHT (ultra-high-temperature) 牛乳や LL 牛乳は賞味期限表示となる。

一方、海外では日本に比べて流通温度が低いため、HTST 牛乳などの低温殺菌牛乳の貯蔵寿命は 2-3 週間と長く、日本の消費期限表示の概念に当てはまらない。そのため、本論文では、「貯蔵寿命」をより一般的な「賞味期限」という用語を用いて統一した。

第三節 乳の殺菌の歴史

動物の乳の利用は、紀元前 8000 年頃よりカスピ海周辺の遊牧民がヤギ乳を利用したことから始まる。その後、紀元前 3000 年頃より中近東でウシの家畜化が進み、牛乳の利用が始まったとされる。乳の利用の歴史は古いにもかかわらず、「殺菌」という概念がもたらされたのはごく最近になってからである。

殺菌の原点は、1860 年代の Louis Pasteur のワインの研究である。彼は、ワインを 50-60℃ で数分加熱することで微生物による腐敗が抑えられたり、遅くなることを発見した。その後まもなくして、乳業界にも殺菌の概念が導入されるに至った。当時、腸チフス、ジフテリア、ブルセラ症、結核などの病気が生乳を介して発生することが認識されるようになってきてはいたものの、乳中の病原菌の死滅に関する情報はごく限られていた。

20 世紀に入ると、飲用乳工場で徐々に乳の加熱処理が採用されるようになったが、各工場で用いられる殺菌条件はさまざまであった。殺菌についての共通認

識を構築するため、当時乳中で最も耐熱性の高い病原菌と考えられていた *Mycobacterium tuberculosis* を死滅させるのに必要な加熱処理に関して幅広い研究が行われた^{28, 68, 88, 93)}。これらの研究により、加熱処理した乳の公衆衛生上の重要性が広く認識されるようになり、近代の殺菌工程の基礎が築かれるに至った。殺菌条件は *M. tuberculosis* の死滅条件を基本に設定されたが、現在ではより耐熱性の高い *Coxiella burnetii* (Q 熱の病原体) を 10^5 分の 1 以下まで減少させる条件を基準としている¹⁸⁾。

第四節 乳の殺菌技術の変遷

1882 年、ドイツの Albert Fesca により初めて商業的な殺菌機が製造された^{34, 105)}。この殺菌機は 74–77 °C で殺菌できるものであったが、保持時間は規定されていなかった。

19 世紀末期から 20 世紀初頭の初期の殺菌工程は、62–65 °C で 30 分以上タンクで保持する LTLT 殺菌が一般に使用されていた。しかし、1923 年にプレート式熱交換器を用いた 72–74 °C で 15 秒以上殺菌する HTST 殺菌技術が開発されると、この殺菌技術は 1930 年代後半から 1940 年代前半にかけて急速に普及した。プレート式熱交換器では、プレート (仕切り板) を挟んで乳と加熱媒体が流れ、プレートを介して熱が伝達される。乳と加熱媒体が接触しないことから間接加熱と呼ばれる。HTST 殺菌は、現在もなお主要な殺菌技術となっている。HTST 殺菌は LTLT 殺菌に比べ、加熱による成分の損傷や風味の変化が少なく、コスト面、効率、処理能力で優れている⁴⁶⁾。

1950 年代になると、HTST 殺菌よりさらに残存微生物を減らし、賞味期限を長くすることを目的とした、130–150 °C で 2 秒以上殺菌する UHT 殺菌技術が開発された¹⁰⁵⁾。UHT 殺菌技術では、従来のプレート式熱交換器を用いる間接加熱

法と、蒸気と乳を接触させる直接加熱法が用いられる。直接加熱法には、乳に蒸気を吹き込むスチームインジェクション法と、蒸気中に乳を吹き込むスチームインフュージョン法がある。直接加熱法は間接加熱法に比べて、熱伝達が効率的で、加熱臭が少ない製品が得られる¹²⁾。

第五節 乳・乳製品の殺菌条件

「殺菌」の目的は、生乳中に存在する病原菌のリスクを排除、あるいは低減させることである。しかし、一般的には、より高温で処理することで微生物の死滅効果は増すが、乳成分の化学変化も増大し、官能特性に影響を及ぼす。そのため、乳・乳製品の殺菌に利用される温度と時間の組み合わせは、国によって、また製品によってさまざまな形態を取る (Table 1)。日本では、牛乳の殺菌条件は「乳及び乳製品の成分規格等に関する省令 (乳等省令)」⁴⁴⁾ で規定されている (Table 2)。また、クリームや脱脂粉乳などの乳製品の殺菌は牛乳の例によることとされている。

世界で市販されている牛乳は、主に HTST 殺菌あるいは UHT 殺菌で製造されている。HTST 殺菌はほとんどの国で 72 °C 15 秒の殺菌条件を採用している³⁹⁾。HTST 牛乳は生乳に近い風味を有しており、アメリカやイギリス、北欧諸国等で好まれ、市販されている牛乳のほとんどが HTST 牛乳である³³⁾。HTST 牛乳は殺菌条件が弱く、芽胞菌が残存するため、賞味期限が短く設定されている。

UHT 殺菌は芽胞菌も不活性化させることを目的とした殺菌法である。世界的には 130–150 °C 2–8 秒程度の条件が採用され^{6,31)}、製造された UHT 牛乳は常温流通される。UHT 牛乳は HTST 牛乳に比べて殺菌条件が強いため、加熱臭を生じ、HTST 牛乳が好まれる国々では敬遠されるが、フランスやスペイン、ポルトガルでは好まれており、市販されている牛乳の大半を占めている³³⁾。海外の UHT

牛乳は日本の LL 牛乳に相当する。

また、海外には UHT 殺菌の殺菌条件を弱めて、完全には芽胞菌を不活性化しないが、チルド流通することで風味の劣化を抑え、賞味期限も長く確保できるウルトラパストリゼーション (ultra-pasteurization; UP) と呼ばれる 125–138 °C 2–4 秒程度の殺菌条件が存在する³⁴⁾。

日本における UHT 殺菌の条件は 120–150 °C で 1–3 秒とされている (Table 2)。完全に芽胞菌を不活性化するような UHT 殺菌条件は加熱臭が生じ、日本では好まれないため、120–130 °C 2 秒の UHT 殺菌条件で殺菌する牛乳が一般的で、UP 殺菌条件に近い。常温流通する海外の UHT 牛乳に比べて殺菌条件が弱いため、日本における UHT 牛乳は UP 牛乳同様、多くの場合、芽胞を完全には不活性化することはできないが、チルド流通により長い賞味期限が保たれている。

第六節 HTST 殺菌で残存する微生物

通常、HTST 殺菌で残存する微生物は、生乳中に存在する耐熱性を有する微生物菌叢を反映する。HTST 牛乳からは、*Bacillus* 属や *Paenibacillus* 属、*Clostridium* 属などの芽胞菌、*Microbacterium* 属、*Micrococcus* 属、*Enterococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Arthrobacter* 属、*Lactobacillus* 属が分離されている^{25, 37, 47, 57, 70, 75)}。

第七節 UHT 殺菌で残存する微生物

第五節で論じたように、世界で利用されている UHT 殺菌は芽胞菌も不活性化させることを目的とした殺菌法である。そのため、海外の常温流通の UHT 牛乳で微生物が検出される場合、包材からの汚染¹⁰³⁾、製造ラインからの汚染¹¹⁾と考えられている。

日本で一般的に流通している UHT 牛乳は海外に比べて殺菌条件が弱く、芽胞

菌が残存する可能性があるにもかかわらず、残存する微生物に関する報告は見られない。一方、UP 牛乳からは *Bacillus licheniformis*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus pumilus*、*Bacillus cereus*、*Bacillus insolitus*、*Bacillus coagulans*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Brevibacillus brevis* などの芽胞菌が分離されている^{5, 59, 100}。UP 牛乳は日本の UHT 牛乳の殺菌条件に近い⁵ため、日本の UHT 牛乳の菌叢も UP 牛乳とほぼ同様と考えられる。

第八節 製造ラインで増殖する微生物

乳・乳製品中に残存する好気性芽胞菌としては、第六節、第七節で述べた原料である生乳に由来する芽胞菌のほかに、製造中にラインで増殖し、粉乳などの乳製品を汚染する芽胞菌が存在する。粉乳からは *Anoxybacillus flavithermus*、*Geobacillus stearothermophilus*、*Geobacillus thermoleovorans* などの高温性芽胞菌の他に、中温性芽胞菌である *B. subtilis*、*B. licheniformis*、*B. coagulans* などが分離されている^{23, 90}。

第九節 乳・乳製品の微生物学的品質に影響を及ぼす好気性芽胞菌

乳・乳製品中に残存する好気性芽胞菌は、増殖特性により低温性芽胞菌、中温性芽胞菌、高温性芽胞菌に大別される (Fig. 1)。

低温性芽胞菌は 20–30 °C に最適生育温度を有し、10 °C 以下でも増殖できるという特徴を持つ。生乳中には少ないが、牛乳などチルド製品に残存すると、冷蔵流通中に増殖し、腐敗や風味欠陥の原因となる^{25, 35, 58, 64, 76-78, 91}。代表的な低温性芽胞菌として、*Paenibacillus* 属、*B. cereus* が挙げられる。

中温性芽胞菌は 35 °C 近傍に最適生育温度を有し、一般的に 10 °C 以下、45 °C 以上では増殖できない。生乳中の芽胞菌の大半が中温性芽胞菌に属し、代表的な

中温性芽胞菌として、*B. subtilis*、*B. licheniformis* が挙げられる。LL 製品を除き、乳・乳製品中には残存するが、冷蔵流通中での増殖、製造ラインでの増殖はほとんど発生せず、原料である生乳に多量に存在した場合にのみ、最終製品の細菌数規格を逸脱する可能性がある。しかし、現代の生乳の微生物管理は徹底されているため、中温性芽胞菌の問題が発生するケースはほとんどない。

高温性芽胞菌は 40–70 °C に最適生育温度を有し、冷蔵下では増殖しない。生乳中には少ない⁶¹⁾ が、粉乳製造において長時間運転中に増殖することが知られている^{65, 90, 94)}。代表的な高温性芽胞菌として、*A. flavithermus*、*G. stearothermophilus* が挙げられる。一般的に、高温性芽胞菌は非病原性であるが、製品に大量に存在することは、工場の衛生面に課題が残る。また、高温性芽胞菌は耐熱性が高いため、多量に含まれた製品を原料として用いると、最終製品の微生物学的品質を低下させる危険性がある。

したがって、乳・乳製品の微生物学的品質に影響を及ぼす芽胞菌は、冷蔵中に増殖する低温性芽胞菌、製造ライン中で増殖する高温性芽胞菌となる。第十、十一、十二節において、代表的な芽胞菌である *Paenibacillus* 属、*B. cereus*、*A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* について詳述する。

第十節 *Paenibacillus* 属

Paenibacillus 属はもともと *Bacillus* 属に含まれていたが、16S rDNA 分析により、1993 年に新属として *Bacillus* 属から別属へと分類された²⁾。2000 年代になると、*Paenibacillus* 属は植物、土壌、昆虫、食品から分離されるようになり、数多くの菌種が新種として登録され、現在では *Paenibacillus* 属は 211 の菌種で構成されている⁸⁹⁾。2000 年代初期には *Paenibacillus* 属の芽胞は生乳や HTST 牛乳中では優勢種ではないものの、その存在が認識されていた³²⁾。サイレージや濃

厚飼料からも分離されているため、*Paenibacillus* 属の芽胞は家畜の飼料を介して生乳に混入すると考えられている^{99, 101)}。

HTST 牛乳において、*Paenibacillus* 属が冷蔵保存中に増殖することを初めて報告したのは、2004 年の Fromm と Boor によるものである²⁵⁾。彼らは、アメリカで市販されている HTST 牛乳を 6℃ で保存すると、賞味期限末期に *Paenibacillus* 属が主要菌となることを示し、*Paenibacillus* 属が HTST 牛乳の賞味期限を決定づける要因の一つであるとした。その後、Boor のグループは *Paenibacillus* 属に関する研究を継続し、農家の生乳に微量存在した *Paenibacillus* 属の芽胞が HTST 牛乳に移行し、6℃ で保存した場合、*Bacillus* 属は賞味期限初期に主要菌となるのに対し、*Paenibacillus* 属は賞味期限後期に主要菌となり、HTST 牛乳の風味欠陥を引き起こすこと^{35, 58, 76, 77)}、農家の敷き藁や糞便、土壌中に *Paenibacillus* 属の芽胞が存在すること³⁶⁾、生乳中の *Paenibacillus* 属の大部分が β-ガラクトシダーゼ陽性であること⁴²⁾ を報告した。

Boor のグループの研究では、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞が少ないため、6℃ での増菌培養後、伝統的な平板法にてコロニーを検出し、同定する方法を採用していた。その後、*Paenibacillus* 属のみを定量するリアルタイム PCR による測定方法を開発した⁷⁹⁾ が、分析感度の向上には事前の増菌が必要であるとしている。

しかし、増菌法を用いると、生乳本来の *Paenibacillus* 属菌叢を反映しないので、今のところ、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞を精度良く測定する方法はない。そのため、生乳を管理する上で重要な生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数レベルに関する基礎的情報が不足している。

第十一節 *Bacillus cereus*

B. cereus group は現在 18 種の近縁種から構成されており、互いを区別することは非常に困難である。乳業界では、*B. cereus* group は液状乳や乳製品の腐敗に関与するため、多くの文献で“*B. cereus*”は“*B. cereus* group (*B. cereus sensu lato*)”として扱われている³⁸⁾。したがって、本論文においても“*B. cereus* group (*B. cereus sensu lato*)”を“*B. cereus*”として取り扱うこととする。

B. cereus も *Paenibacillus* 属と同様に 10 °C 以下でも良好に増殖する低温性芽胞菌であるが、*Paenibacillus* 属は *B. cereus* よりも、より低温側で良好に増殖する⁶⁴⁾。*B. cereus* は 7 °C 以下で増殖可能な低温性株と 7 °C 以上で増殖する中温性株に分類される。*B. cereus* は HTST 牛乳の腐敗の主な原因菌である⁹¹⁾ ため、HTST 牛乳が一般に流通しているヨーロッパ諸国では多くの研究がなされている。

1887 年、*B. cereus* は牛舎の空气中より分離され、新種として登録された。*B. cereus* は環境に広く分布し、多くの食品から分離されている。1960 年代までには、生乳中の芽胞が製品に移行し、HTST 牛乳の凝固や「ビッティ・クリーム (クリームが顆粒状に凝固していること)」の原因となることが知られるようになっていた^{4, 14)}。

一般に、生乳中の *B. cereus* の芽胞数は非常に少なく、生乳を遠心して芽胞を濃縮し、伝統的な平板法で測定する方法⁴⁹⁾ や、最確法により芽胞数を測定する方法²⁶⁾ が一般的に用いられていた。しかし、これらの方法では精度や感度が十分ではなかった。1997 年、Christiansson ら¹⁶⁾ により生乳中の芽胞を測定するメンブランフィルター法が開発されると、ヨーロッパ諸国では生乳における分布および季節変動^{51, 91, 96, 97)}、生乳への汚染経路^{15, 54-56)} など、幅広い研究が行われた。その結果、*B. cereus* の芽胞が生乳 1L あたり 10^2 – 10^3 spores 存在すること、低温性株の割合は 30–50%程度であること、*B. cereus* およびその低温性株の芽

胞数レベルは夏に高くなること、*B. cereus* の芽胞はウシの乳頭の汚れを介して生乳を汚染することが示されている。HTST 牛乳が広く普及しているヨーロッパ諸国では、これらのデータが生乳の衛生管理に利用されている。

日本においては接種試験による UHT 牛乳中での増殖性に関する報告¹⁾はあるものの、HTST 牛乳を製造する上で重要な衛生指標となる生乳中の *B. cereus* 芽胞数レベルに関する報告は見られない。そのため、生乳の衛生管理に重要な基礎的データが不足している。

また、*B. cereus* の耐熱性についても数多くの研究^{5, 19, 43, 60)}があり、一般に *B. cereus* の芽胞の耐熱性は比較的低いとされているが、Stadhouders ら⁹⁴⁾ は乳中の *B. cereus* の芽胞をすべて不活性化するには 125 °C で 10-20 秒の殺菌が必要であると述べている。日本の UHT 牛乳は UP 牛乳に殺菌条件が近いいため、UP 牛乳同様に *B. cereus* 芽胞が残存している可能性が疑われる。しかし、UHT 殺菌で残存するような高耐熱性 *B. cereus* の乳業環境中の分布を網羅的に調査した例はなく、日本の UHT 牛乳は長い間安定的に販売されているという実績はあるものの、微生物学的品質の科学的解析事例は見当たらない。

第十二節 *Anoxybacillus flavithermus* および *Geobacillus stearothermophilus*

A. flavithermus は以前は *Bacillus flavothermus* と呼ばれていた菌で、1982 年に温泉より分離され、新種として登録された。2000 年に *Anoxybacillus* 属が新たに *Bacillus* 属より独立し、現在の名称に変更されている⁷²⁾。*G. stearothermophilus* も以前は *Bacillus stearothermophilus* と呼ばれていた菌で、1920 年に缶詰より分離され、2001 年に *Geobacillus* 属が新たに *Bacillus* 属より独立し、*Geobacillus* 属に組み込まれている⁶⁶⁾。

食品において、*G. stearothermophilus* は耐熱性が高いため、缶詰中に残存し、

腐敗させる原因菌であった。缶詰が膨化せず、酸性化することから「フラットサワー菌」と呼ばれていた。乳製品では、1960年代には粉乳に存在することが既に知られており、1980年代になると、製造中に増殖することが認識されるようになった⁹⁴⁾。2000年代になると、16S rDNA ライブラリーの充実に加え、遺伝子解析による菌株比較が可能となり、*A. flavithermus* が粉乳の主要菌の一つとして登場するようになった。Flint ら²³⁾ は、16S-23S の内部転写 (internal transcribed spacer; ITS) 領域の増幅プロファイルを用い、粉乳の主要菌叢が *A. flavithermus* と *G. stearothermophilus* であることを示した。Rückert ら⁸⁴⁾ は、18カ国の粉乳の菌叢を RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) 法を用いて解析し、*A. flavithermus* と *G. stearothermophilus* が主要菌叢であることを示した。これら2つの菌種は粉乳の主要菌であり、90年以上前の粉乳からも分離されている⁸³⁾。現在では、*A. flavithermus* と *G. stearothermophilus* は工場の衛生性の一般的指標と考えられており、製品に大量に存在すると、微生物学的品質の劣る製品とみなされる。

粉乳の製造工程は、加温工程、分離工程、予備加熱工程、殺菌工程、濃縮工程、乾燥工程に大別される。このうち、加温工程、分離工程、予備加熱工程、濃縮工程は 40–65 °C の温度帯であるため、60 °C 付近に最適増殖温度を有する *A. flavithermus* と *G. stearothermophilus* が増殖しやすい環境といえる。これら2つの菌種はステンレス表面に容易にバイオフィルムを形成することが実験室レベルでの実験で示されており^{9, 21)}、通常、生乳中には少ない (10 spores mL⁻¹ 以下)⁶¹⁾ が、製造中に工場の 40–65 °C の温度帯でバイオフィルムを形成し、増殖すると考えられている。また、これらの菌種は耐熱性や増殖温度が異なる¹⁰⁹⁾ ため、異なる場所にバイオフィルムを形成する傾向にある。しかし、バイオフィルム形成、芽胞形成の発生時間や発生場所に関する情報は不足している。この理由として、

両菌種の芽胞を精度よく迅速に測定する方法がないことが挙げられる。

A. flavithermus と *G. stearothermophilus* は伝統的な培養法で測定できるが、時間と手間を要する。作業コストを減らす、製品を早く出荷する、そして製造工程全体をよりよく制御するという観点から、迅速測定法が開発されてきた。迅速測定法には Flint らによるフローサイトメトリー法^{20, 22)} と、Rueckert らによるリアルタイム PCR 分析法⁸⁵⁻⁸⁷⁾ がある。しかし、フローサイトメトリー法では、培養法との相関が悪く、感度が不十分であった。また、リアルタイム PCR 分析法では十分な感度が得られず、特異性に欠けていた。工場の実用的な衛生管理には、*A. flavithermus* と *G. stearothermophilus* の芽胞を迅速に特異的かつ高感度で測定できる方法が望まれる。

第十三節 本論文の目的と構成

乳・乳製品の微生物学的品質に影響を及ぼす好気性芽胞菌は、冷蔵中に増殖する低温性芽胞菌、製造ライン中で増殖する高温性芽胞菌に大別される。低温性芽胞菌のうち、*Paenibacillus* 属や *B. cereus* は生乳中には少ないとされているが、HTST 牛乳中に残存し、流通中に増殖して、製品を劣化させる。しかし、日本において生乳中の芽胞数レベルの報告はなく、生乳の品質管理に重要な基礎データが不足している。また、日本の UHT 牛乳の殺菌条件では、*Paenibacillus* 属は不活性化されるが、*B. cereus* は残存する可能性があるにもかかわらず、UHT 牛乳の微生物学的安全性は科学的には証明されていない。一方、粉乳においては、高温性芽胞菌である *A. flavithermus* と *G. stearothermophilus* が製造中にラインで増殖し、最終製品を汚染する。工場の衛生管理を行なう上で、これら 2 菌種の芽胞を区別して精度よく迅速に測定する方法が望まれるが、今のところ測定方法が存在しない。このような背景を踏まえ、本論文では乳・乳製品の微生物学的品

質の向上につながる技術開発、基礎的データの取得を目指し、牛乳などのチルド製品における低温性芽胞菌、粉乳などの乳製品における高温性芽胞菌に焦点を当て、以下のように研究を進めた。

第二章では、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞を簡便かつ高感度で計測する実用的なメンブランフィルター法の開発検討を行なった。また、本分析法を用いて北海道十勝地域 6 地区の生乳の *Paenibacillus* 属芽胞数レベルを 1 年間調査し、生乳中の分布について考察した。

第三章では、北海道の異なる 2 つの乳業工場の生乳中の *B. cereus* およびその低温性株の芽胞数レベルを 1 年間調査し、日本国内の生乳中の分布、季節変動について考察し、海外の報告との比較検討を行なった。

第四章では、乳業環境中の高耐熱性 *B. cereus* の分布について網羅的に調査し、高耐熱性 *B. cereus* の 10 °C 増殖性から、日本で販売されている 120 °C 2 秒殺菌 UHT 牛乳の微生物学的安全性を評価した。

第五章では、乳製品工場の衛生性をよりよく管理する技術構築のため、乳・乳製品中の *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* の芽胞のみを特異的かつ高感度で定量する実用的なリアルタイム PCR 分析法の開発に取り組んだ。

第六章では、本研究によって得られた知見を総括した。

Table 1. Major heat treatments used in the dairy industry.

Heat treatments (Temperature–time conditions)	Applications
Thermization (57–68 °C / 5 s–30 min)	● Extending shelf-life of raw milk prior to further processing ● Manufacture of some cheeses
Pasteurization (72–80 °C / 15–30 s)	● Drinking milk ● Cheese manufacture
Pasteurized with ESL (Extended Shelf Life) processing (125–140 °C / 1–10 s)	● Drinking milk with ESL at refrigeration temperature
UHT (Ultra High Temperature) processing (135–150 °C / 1–10 s)	● Drinking milk with long shelf-life at ambient temperature
In-container sterilization (110–120 °C / 10–20 min or 125 °C / 5 min)	● Evaporated / condensed milk, drinking milk with long shelf-life at ambient temperature
90–95 °C / 5–10 min	● Yoghurt manufacture
72–80 °C / 15–30 s	● Low-heat skim milk powder (SMP)
85 °C / 1 min; 90 °C / 30 s; 105 °C / 30 s	● Medium-heat SMP ● Pre-heating in UHT processing ● Whole milk powder
90 °C / 5 min; 120 °C / 1 min; 135 °C / 30 s	● High-heat SMP
> 120 °C / > 40 s	● High-high-heat or high-heat-high-stable SMP

Source: IDF. (2018). Heat Treatment of Milk–Overview. IDF Factsheet 001/2018-02.

Brussels, Belgium: International Dairy Federation.³⁹⁾

Table 2. Pasteurization conditions of milk in Japan, as specified by the Ministerial Ordinance on Milk and Milk Products Concerning Compositional Standards, Etc⁴⁴⁾.

Heat treatments	Temperature–time conditions
LTLT (low-temperature long time)	63 °C / 30 min
HTST (high-temperature short-time)	≥ 72 °C / ≥ 15 sec
HTLT (high-temperature long-time)	≥ 75 °C / ≥ 15 min
UHT (ultra-high-temperature)	120–150 °C / 1–3 sec

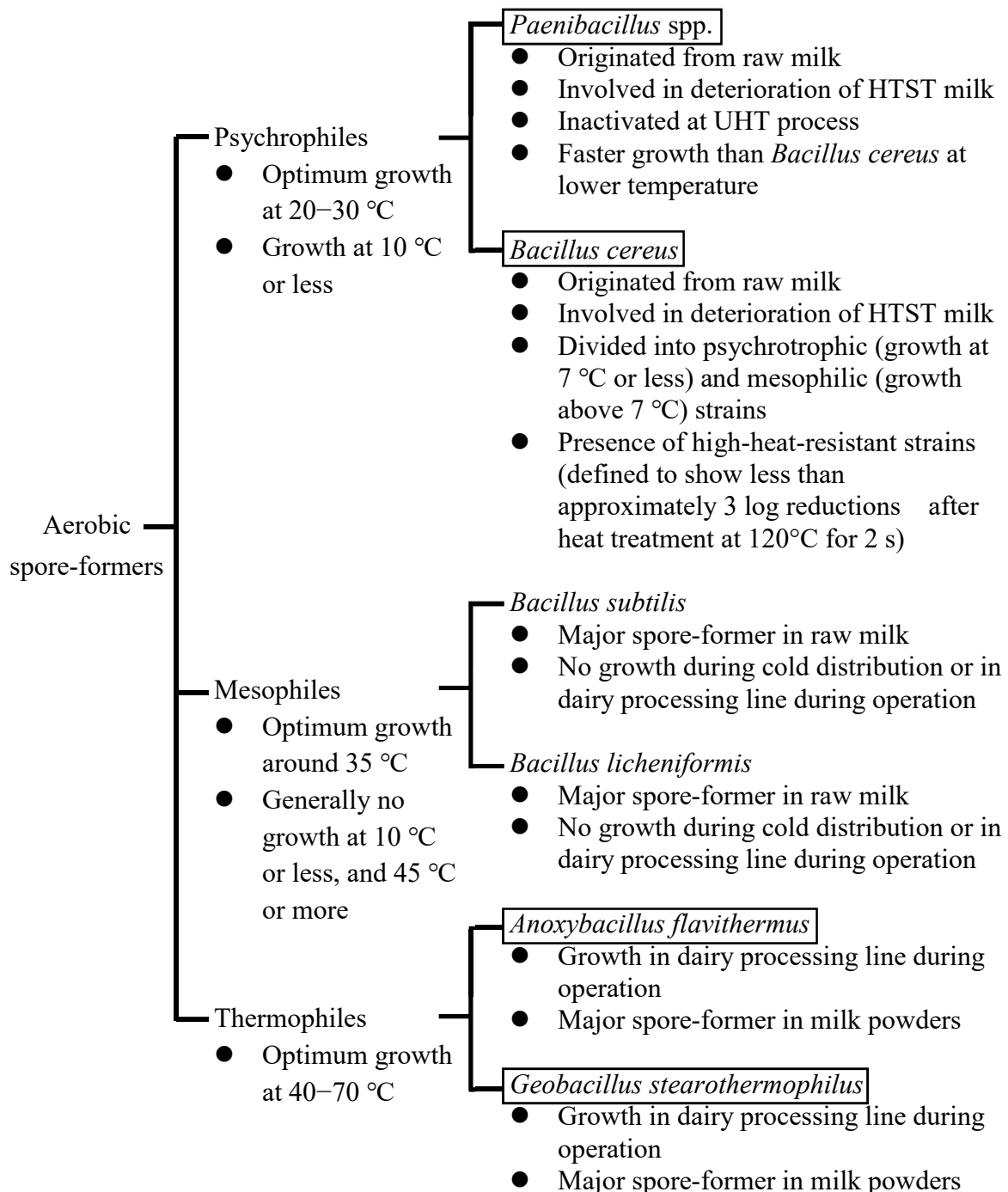


Fig 1. Major aerobic spore-forming bacteria found in milk and dairy products. The bacteria surrounded by squares were used in this study.

第二章 β -ガラクトシダーゼ活性を選択基準とした簡便な メンブランフィルター法による生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞数レベルの評価

【本章の内容は *International Dairy Journal*, 96, 10–14 (2019) に掲載済みである】

第一節 緒言

生乳中に存在する芽胞菌は耐熱性を有する芽胞を形成するため、HTST 殺菌で死滅せず、HTST 牛乳に残存する。日本において、市販されている牛乳の法定流通温度は 10 °C 以下と規定されており、残存する芽胞菌のうち、*Bacillus* 属や *Paenibacillus* 属が 10 °C 以下でも増殖可能な低温性芽胞菌の主要な菌種である。特に、*Bacillus* 属の中でも *Bacillus cereus* は HTST 牛乳において 10 °C 以下で良好に増殖するため、冷蔵流通中に発芽、増殖し、HTST 牛乳を腐敗させる要因となっている。一方、*Paenibacillus* 属は *B. cereus* よりも低温で良好に増殖し⁶⁴⁾、HTST 牛乳の風味欠陥を引き起こす⁵⁸⁾。Boor のグループ^{25,76,77)}によると、HTST 牛乳を 6 °C で保存した場合、*Bacillus* 属は賞味期限初期に主要菌となるのに対し、*Paenibacillus* 属は賞味期限後期に主要菌となる。*B. cereus* および *Paenibacillus* 属が事実上、HTST 牛乳の賞味期限を決定づける要因となっているため、HTST 牛乳製造において、これらの菌を生乳から管理することが重要である。

B. cereus の芽胞は生乳中に少なく、リッターあたり 10^2 – 10^3 spores といわれている⁹¹⁾。Christiansson ら¹⁶⁾ が報告したメンブランフィルター法は *B. cereus* の芽胞を検出するのに広く用いられ、生乳における分布および季節変動⁹⁷⁾、生乳への汚染経路⁵⁴⁻⁵⁶⁾ など、幅広い研究に利用されている。

一方、*Paenibacillus* 属も生乳中に少ないとされており^{35, 36, 58, 78)}、*B. cereus* 同様、従来の平板培養法で測定することは困難である。Ranieri ら⁷⁹⁾ は、生乳中の *Paenibacillus* 属をリアルタイム PCR を用いて測定する方法を報告しており、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数が少ないため、分析感度を向上させるには事前の増菌が必要であるとしている。しかし、増菌法を用いると、生乳中に本来存在する芽胞数を正確に得られず、結果として、生乳の菌叢を反映しないことになる。したがって、今のところ生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞を精度良く測定する方法はない。

生乳中の *Paenibacillus* 属の大部分、および *Bacillus* 属の一部は β -ガラクトシダーゼ活性を有すると報告されている⁴²⁾。そこで本章では、メンブランフィルター法と β -ガラクトシダーゼ活性を組み合わせることで、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞を簡便かつ高感度で計測する実用的な分析法を開発し、北海道十勝地域 6 地区の生乳の *Paenibacillus* 属芽胞の分布を 1 年間調査したので、その結果を記載する。

第二節 材料および方法

1. 供試菌株

本章で使用した菌株は、筆者らの実験室で乳製品より分離し、16S rDNA の部分塩基配列分析により同定した *Paenibacillus odorifer* PO1 および *Paenibacillus amylolyticus* PA3 である (データ示さず)。菌株はグリセロールストック (15%、v/v) として、 -80°C にて保存した。

2. 芽胞懸濁液調製

P. odorifer PO1 あるいは *P. amylolyticus* PA3 のグリセロールストックをニュー

トリエントブロス (Becton, Dickinson and Company 社) 5 mL に一白金耳接種し、30 °C で一晩培養した。培養液を改良トリプトン-酵母エキスイ寒天 [1L 中の組成: トリプトン (Becton, Dickinson and Company 社) 10 g、酵母エキス (Becton, Dickinson and Company 社) 2 g、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 25 mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250 mg、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 300 μg 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mg、寒天 15 g、NaOH にて pH 7.0 に調整] 平板に表面塗抹し、30 °C 7-10 日間培養した。平板培地表面に生じた菌体を芽胞として回収し、1/15 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いて 4 °C で 5000×g で 10 分間の遠心により 2 回洗浄した。遠心後の芽胞のペレットを同緩衝液に懸濁し、芽胞懸濁液とした。芽胞懸濁液中の芽胞数は、ブレインハートインフュージョン寒天培地 (日水製薬社) へ混釈後、30 °C 2 日間培養により測定した。すべての芽胞懸濁液について芽胞数が約 10^7 spores mL⁻¹ であることを確認した。芽胞懸濁液は使用するまで 2 °C にて保存した。

3. メンブランフィルター法

メンブランフィルター法は Christiansson ら¹⁶⁾ の方法を一部変更して実施した。生乳 100 mL を 63 °C 30 分殺菌して細菌の栄養細胞を除去した。殺菌した生乳 100 mL に対し、脂質乳化剤としてポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル (1%滅菌溶液; 和光純薬社) 100 mL、タンパク質分解試薬としてフィルター滅菌したトリプシン溶液 [0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.8) にトリプシン (ナカライテスク社) を 2%溶解] 25 mL、フィルター滅菌したプロテアーゼ N 溶液 [0.1M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.8) にプロテアーゼ N (天野エンザイム社) を 2%溶解] 5 mL を添加し、良く混合した。タンパク質分解反応を 55 °C 15 分間実施後、直ちに Durapore メンブランフィルター (0.65 μm 孔; Merck Millipore 社) を用いて吸引濾過した。濾過装置は Nalgene Reusable Filter Holders with Receiver

(Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。フィルターを滅菌水でリンス後、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド (X-Gal) を 40 mg L^{-1} 添加したブレインハートインフュージョン寒天平板に貼り、 7°C 14 日間培養した。培養後、 β -ガラクトシダーゼ反応により青色を呈したコロニーを *Paenibacillus* 属としてカウントした。必要に応じて、青色コロニーをブレインハートインフュージョン寒天平板に画線分離して純粋培養し、MALDI TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) あるいは 16S rDNA シーケンシングによる菌種同定を実施した。

4. MALDI TOF-MS による菌種同定

MALDI TOF-MS による分離株の同定は、MALDI Biotyper system (Bruker Daltonics 社) を用い、製造元の仕様に従い実施した。方法を簡潔に述べる。分離株のコロニーを MALDI target plate (Bruker Daltonics 社) に薄く塗抹し、70%ギ酸を $1 \mu\text{L}$ 重層し、室温で乾燥した。次に、HCCA matrix solution (Bruker Daltonics 社) を $1 \mu\text{L}$ 重層し、室温で乾燥した。測定は FlexControl (v. 3. 4) ソフト (Bruker Daltonics 社) を搭載した Microflex LT 装置 (Bruker Daltonics 社) にて実施した。マススペクトル分析および相同性検索は MALDI Biotyper Compass (v. 4. 1. 80) ソフト (Bruker Daltonics 社) にて実施した。製造元の推奨する基準に従い、相同性スコアが ≥ 2.0 を種までの同定、 < 2.0 および ≥ 1.7 を属までの同定とした。本データベースには *Paenibacillus* 属は 65 菌種が登録されている。

5. 16S rDNA による菌種同定

MALDI TOF-MS 同定で種レベルの同定ができなかった株について、Johnson の方法⁴⁵⁾ に従って 16S rDNA 同定を実施した。方法を簡潔に述べる。InstaGene

Matrix Kit (Bio-Rad Laboratories 社) を用いて製造元の仕様に従い、分離株より DNA を抽出した。これをテンプレートとして 16S rDNA を増幅した。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) および ABI PRISM Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems 社) を用いて、16S rDNA の 5' 末端から約 300 塩基をシーケンシングした。相同性検索は国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information; NCBI) の BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) を用いて実施した。相同性スコアが $\geq 99\%$ を種までの同定、 $< 99\%$ および $\geq 97\%$ を属までの同定とした。

6. 0.45 μm および 0.65 μm 孔メンブランフィルターを用いた芽胞回収試験

芽胞回収におけるメンブランフィルターの孔サイズの影響を調査するため、0.45 μm および 0.65 μm 孔メンブランフィルターを用いて、*P. odorifer* PO1 および *P. amylolyticus* PA3 芽胞の回収量を比較した。*P. odorifer* PO1 および *P. amylolyticus* PA3 の芽胞懸濁液を希釈して約 50 spores mL^{-1} の芽胞懸濁液を調製し、1 mL 中の芽胞数を混釈法およびメンブランフィルター法で測定した。混釈法では、希釈した芽胞懸濁液 1 mL をブレインハートインフュージョン寒天培地に混釈し、30 $^{\circ}\text{C}$ 2 日間培養した。メンブランフィルター法では、希釈した芽胞懸濁液 1 mL を滅菌水 100 mL に懸濁し、0.45 μm または 0.65 μm 孔の Durapore メンブランフィルターを用いて直接吸引濾過した。フィルターをブレインハートインフュージョン寒天平板に貼り、30 $^{\circ}\text{C}$ 2 日間培養した。両者の方法で得られる芽胞数を 5 連で比較した。

7. 低温性芽胞菌の芽胞中から *Paenibacillus* 属芽胞を選択的に検出するための培養温度の影響調査

生乳中には *Paenibacillus* 属に加え、*B. cereus* などの低温性芽胞菌が存在する。これらの低温性芽胞菌の芽胞の中から *Paenibacillus* 属芽胞を選択的に計測できる培養条件について検討した。北海道十勝地域の異なる 2 地区 (A および B) の生乳 100 mL を第二章第二節 3 項に記載したメンブランフィルター法に供した。フィルターを X-Gal を 40 mg L^{-1} 添加したブレインハートインフュージョン寒天平板に貼り、 7°C 14 日間あるいは 10°C 10 日間培養した。培養後、それぞれの培養条件で得られた青色コロニーおよび白色コロニー数を比較した。両培養条件で得られたすべての青色コロニー、 7°C で得られたすべての白色コロニー、および 10°C で得られた白色コロニーのうち任意の 10 コロニーを第二章第二節 3 項に記載した方法で分離し、第二章第二節 4 項、5 項に記載した MALDI TOF-MS あるいは 16S rDNA シーケンシングによる菌種同定を実施した。

8. 生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞の分布調査

生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞の分布を評価するため、北海道十勝地域の異なる 6 地区の生乳 (A-F) 中の芽胞数レベルを 1 年間調査した。サンプリングは 2017 年 4 月から 2018 年 1 月の期間、季節ごとに 4 回 [春 (4 月)、夏 (7 月)、秋 (10 月)、冬 (1 月)] 行なった。季節ごとのサンプルは連続 3 日間とした。生乳 200 mL を 250 mL 滅菌ポリプロピレンボトルに採取した後、 -20°C で凍結し、供試するまで凍結状態で保存した。生乳サンプルを 10°C のウォーターバスで解凍後、直ちにサンプル 100 mL を第二章第二節 3 項に記載したメンブランフィルター法に供した。得られた青色コロニーを第二章第二節 3 項に記載した方法で分離し、第二章第二節 4 項、5 項に記載した MALDI TOF-MS あるいは 16S rDNA シーケンシングによる菌種同定を実施した。

9. 統計解析

統計解析は Mann-Whitney の *U* 検定を用いた。

第三節 結果

1. *Paenibacillus* 属芽胞の回収に適したフィルター孔サイズを選択

0.45 μm または 0.65 μm 孔のメンブランフィルターを用いて、*P. odorifer* PO1 あるいは *P. amylolyticus* PA3 芽胞を約 50 spores mL^{-1} 含む芽胞懸濁液からの芽胞の回収量を比較した。*P. odorifer* PO1 では、混釈法により回収された芽胞数の平均値 ($\pm$ SD) は 44.8 ± 6.8 spores であり、メンブランフィルター法により回収された芽胞数の平均値は 0.45 μm 孔のフィルターで 50.0 ± 5.0 spores、0.65 μm 孔のフィルターで 45.0 ± 8.4 spores であった。*P. amylolyticus* PA3 では、混釈法により回収された芽胞数の平均値は 74.8 ± 7.9 spores、メンブランフィルター法により回収された芽胞数の平均値は 0.45 μm 孔のフィルターで 60.4 ± 16.0 spores、0.65 μm 孔のフィルターで 68.6 ± 10.9 spores であった。*P. odorifer* PO1、*P. amylolyticus* PA3 とともに、3 種類の方法における芽胞の回収量に統計的な有意差は認められなかった。実用上、孔サイズの大きい方がより多くの生乳を濾過できるため、メンブランフィルター法には孔サイズ 0.65 μm のメンブランフィルターを用いることとした。

2. *Paenibacillus* 属芽胞の効率的計測に適した培養条件

異なる 2 地区の生乳をメンブランフィルター法に供し、7 $^{\circ}\text{C}$ 14 日間および 10 $^{\circ}\text{C}$ 10 日間の培養条件で得られる青色および白色コロニーの数を比較した。両地区の生乳ともに培養条件による青色コロニー数に有意な差は見られなかった。一方、白色コロニー数は 10 $^{\circ}\text{C}$ 10 日間の培養条件で多く検出される傾向にあっ

た (Table 3)。両培養条件ともに、青色コロニーのサイズは直径 1–3 mm であった。

7 °C で得られたすべてのコロニー、10 °C で得られたすべての青色コロニー、および 10 °C で得られた白色コロニーのうち任意の 10 コロニーを分離し、MALDI TOF-MS あるいは 16S rDNA シーケンシングによる菌種同定を実施した。地区 A の生乳では、青色コロニー分離株は 7 °C では *P. amylolyticus* (7 株) および *Paenibacillus pabuli* (1 株)、10 °C では *P. amylolyticus* (8 株) および *P. pabuli* (1 株) と同定された。地区 B の生乳では、それらは 7 °C では *P. amylolyticus* (5 株) および *P. odorifer* (1 株)、10 °C では *P. amylolyticus* (3 株) および *P. odorifer* (2 株) と同定された。両培養条件ともに、青色コロニー分離株はすべて *Paenibacillus* 属で構成されており、*Bacillus* 属は含まれていなかった。

一方、白色コロニー分離株は *Paeniaceillus* 属以外の芽胞菌で構成されていた。地区 A の生乳では、それらは 7 °C では *Psychrobacillus psychrodurans* (2 株)、*Sporosarcina globispora* (2 株)、および *B. cereus* (1 株)、10 °C では *B. cereus* (3 株)、*Bacillus megaterium* (3 株)、*Ps. psychrodurans* (2 株)、*Solibacillus silvestris* (1 株)、および *Sp. globispora* (1 株) と同定された。地区 B の生乳では、それらは 7 °C では *S. silvestris* (2 株) および *Bacillus simplex* (1 株)、10 °C では *Bacillus pumilus* (3 株)、*B. cereus* (2 株)、*S. silvestris* (2 株)、*B. megaterium* (1 株)、*B. simplex* (1 株)、および *Lysinibacillus fusiformis* (1 株) と同定された。

予備試験において、7 °C では 38 株、10 °C では 73 株の白色コロニー分離株を同定した結果、すべての分離株が *Paeniaceillus* 属以外の芽胞菌であり (Table 4)、両培養条件ともに白色コロニーには *Paeniaceillus* 属は含まれていなかった。

10 °C 10 日間の培養条件に比べ、7 °C 14 日間の培養条件では白色コロニーを形成する芽胞菌が抑えられ、青色コロニーを形成する *Paenibacillus* 属を効率よ

く計測できた。加えて、両培養条件において検出される *Paenibacillus* 属の芽胞数に有意な差は見られなかった。したがって、メンブランフィルター法の培養条件は 7℃ 14 日間とした。

3. 生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞の分布

メンブランフィルター法を用いて 6 地区の生乳の *Paenibacillus* 属芽胞の分布を 1 年間調査した。生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数レベルは、年間を通じて生乳 100 mL あたり 0–10 spores であり (Table 5)、地区間、季節間の芽胞数に有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

本調査において、168 株の *Paenibacillus* 属を分離し、同定を実施した (Table 6)。MALDI TOF-MS 同定では、168 株中 148 株が異なる 5 菌種、すなわち *P. amylolyticus* (85 株)、*P. odorifer* (46 株)、*P. pabuli* (14 株)、*Paenibacillus anaericanus* (2 株)、*Paenibacillus barcinonensis* (1 株) と同定された。残りの 20 株は MALDI TOF-MS 同定では属レベルの同定までもできなかったため、これらの株については 16S rDNA 同定を実施した。16S rDNA 同定では *Paenibacillus* 属と同定されたが、菌種までは決定できなかった。高頻度に検出された菌種は *P. amylolyticus* および *P. odorifer* で、全分離株の 50.6%、27.4%をそれぞれ占めていた。

第四節 考察

本章において、筆者は β -ガラクトシダーゼ活性を選択基準として用いるメンブランフィルター法により、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞を簡便かつ高感度で計測する実用的な方法を開発した。本分析法により、生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞を解析することを可能にした。

メンブランフィルター法を用いた生乳中の芽胞の計測方法としては、*B. cereus*¹⁶⁾ および *Clostridium tyrobutyricum*⁷⁾ について報告がある。両方法ともに、対象菌の芽胞が大きいため、0.8 μm 孔のメンブランフィルターが用いられている。一方、*Paenibacillus* 属の芽胞は *B. cereus* や *C. tyrobutyricum* の芽胞ほど大きくはないため、より小さな孔サイズのフィルター (0.45 μm および 0.65 μm 孔) を試験した。その結果、両方の孔サイズともに、*Paenibacillus* 属芽胞を効率よく回収できることが分かった。0.65 μm 孔のフィルターでは 100 mL の生乳や HTST 牛乳を容易に濾過できるので、実用的な理由から、0.65 μm 孔のメンブランフィルターを選択した。

Ivy ら⁴²⁾ は生乳、殺菌乳、農場環境から分離した *Paenibacillus* 属の β -ガラクトシダーゼ活性を調査し、大部分の *Paenibacillus* 属が β -ガラクトシダーゼ陽性であるが、一部 β -ガラクトシダーゼ陰性の *Paenibacillus* 属も存在すると述べている。筆者の試験では、生乳より分離した β -ガラクトシダーゼ陽性菌はすべて *Paenibacillus* 属であったのに対し、 β -ガラクトシダーゼ陰性菌は *Paenibacillus* 属以外の芽胞菌であった。したがって、本分析法は生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞を計測するのに十分実用的である。

Paenibacillus 属の選択手段として低温での培養条件を利用したが、低温条件では平板上で目視できるコロニーを形成するのに時間を要した。HTST 牛乳製造における汚染源調査に実際に利用するためには迅速性が求められるため、*Paenibacillus* 属を迅速に検出できる選択培地の開発が必要であろう。

筆者が実施した生乳中の *B. cereus* の芽胞数レベルの調査では、*B. cereus* は 100 mL あたり 10 spores 以下であった (データ示さず)。本調査において、生乳中に存在する *Paenibacillus* 属の芽胞数は *B. cereus* の芽胞数レベルと同程度であることが示された (Table 5)。筆者の知る限り、本調査によって生乳中の *Paenibacillus*

属の芽胞数レベルが初めて明らかとなった。

本分析法は、生乳や HTST 牛乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数を調査するための手段を提供し、高品質な生乳の選定や HTST 牛乳製造における *Paenibacillus* 属の衛生管理に応用できることが期待される。

第五節 小括

生乳中の *Paenibacillus* 属は低温性芽胞菌で、乳製品の品質に影響を及ぼす。しかし、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数レベルは極めて低く、適当な測定方法が今のところ存在しない。生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞を測定する簡便なメンブランフィルター法の開発検討を行なった結果、 β -ガラクトシダーゼ活性と低温での培養条件を組み合わせることで、効率的に *Paenibacillus* 属芽胞を計測することができた。本分析法を用いて北海道十勝地域 6 地区の生乳における *Paenibacillus* 属芽胞の分布を 1 年間調査した結果、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数レベルは 100 mL あたり 10 spores 以下であり、地区間、季節間の芽胞数に有意差は認められなかった。高頻度に検出された菌種は *P. amylolyticus* および *P. odorifer* であった。本調査により、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数レベルが初めて明らかとなった。本分析法は、生乳や HTST 牛乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数を調査するための手段を提供し、高品質な生乳の選定や HTST 牛乳製造における *Paenibacillus* 属の衛生管理に応用できることが期待される。

Table 3. Influence of incubation conditions on the enumeration of *Paenibacillus* spp. spores using membrane filtration method.^a

Colony color	Spore numbers (spores 100 mL ⁻¹)	
	A	B
Incubation at 7 °C for 14 days		
Blue	8	6
White	5	3
Incubation at 10 °C for 10 days		
Blue	9	5
White	60	158

^a Raw milk samples were collected from two different areas (A and B) in the Tokachi region of Hokkaido, Japan. Blue colonies are β -galactosidase-positive; white colonies are β -galactosidase-negative.

Table 4. Identification of isolates purified from white colonies that formed at 7 °C for 14 days or at 10 °C for 10 days.^a

Incubation conditions	Strains
7 °C for 14 days (38 isolates)	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i> (8) <i>Psychrobacillus</i> spp. (8) <i>Solibacillus silvestris</i> (8) <i>Sporosarcina globispora</i> (5) <i>Sporosarcina</i> spp. (3) <i>Solibacillus</i> spp. (2) <i>Bacillus cereus</i> (1) <i>Bacillus plakortidis</i> (1) <i>Bacillus simplex</i> (1) <i>Bacillus</i> spp. (1)
10 °C for 10 days (73 isolates)	<i>Bacillus pumilus</i> (29) <i>Solibacillus silvestris</i> (8) <i>Solibacillus</i> spp. (7) <i>Bacillus cereus</i> (5) <i>Bacillus megaterium</i> (5) <i>Bacillus</i> spp. (4) <i>Sporosarcina</i> spp. (3) <i>Bacillus gibsonii</i> (2) <i>Lysinibacillus</i> spp. (2) <i>Psychrobacillus psychrodurans</i> (2) <i>Psychrobacillus</i> spp. (2) <i>Bacillus murimartini</i> (1) <i>Bacillus plakortidis</i> (1) <i>Bacillus simplex</i> (1) <i>Lysinibacillus fusiformis</i> (1)

^a Strains were identified using MALDI TOF-MS or 16S rDNA sequencing; number of isolates in each species is shown in parentheses.

Table 5. Numbers of *Paenibacillus* spp. spores in 100 mL of raw milk sampled from six different areas over 1 year.^a

Sampling occasion	Spore numbers (spores 100 mL ⁻¹)					
	A	B	C	D	E	F
Spring (April)						
Day 1	0	1	1	0	1	7
Day 2	0	0	0	3	1	1
Day 3	0	2	1	1	0	0
Summer (July)						
Day 1	0	2	0	0	5	0
Day 2	1	4	1	3	7	2
Day 3	5	5	0	4	7	0
Autumn (October)						
Day 1	2	1	1	1	2	1
Day 2	9	3	0	0	3	2
Day 3	10	4	0	8	1	3
Winter (January)						
Day 1	2	0	2	8	1	0
Day 2	8	1	2	10	0	0
Day 3	6	0	0	10	1	1

^a Raw milk samples were collected from six different areas (A to F) in the Tokachi region of Hokkaido, Japan.

Table 6. Distribution of *Paenibacillus* species isolated from raw milk from six different areas over 1 year.^a

Strains	Spore numbers						Number of isolates	Percentage of isolates
	A	B	C	D	E	F		
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	24	12	4	24	15	6	85	50.6
<i>Paenibacillus odorifer</i>	11	8	4	14	7	2	46	27.4
<i>Paenibacillus pabuli</i>	4	2		6	1	1	14	8.3
<i>Paenibacillus anaericanus</i>		1		1			2	1.2
<i>Paenibacillus barcinonensis</i>				1			1	0.6
<i>Paenibacillus</i> spp.	4			2	6	8	20	11.9
Total	43	23	8	48	29	17	168	100.0

^a Raw milk samples were collected from six different areas (A to F) in the Tokachi region of Hokkaido, Japan. Strains were identified using MALDI TOF-MS or 16S rDNA sequencing. Spore numbers are total numbers from the 1-year investigation.

第三章 北海道の生乳中の *Bacillus cereus* およびその低温性株の芽胞数レベルの季節変動および菌株多様性の評価

【本章の内容は *International Dairy Journal*, 97, 209–215 (2019) に掲載済みである】

第一節 緒言

HTST 牛乳には生乳中に存在する芽胞菌が残存する。残存する芽胞菌のうち、*Bacillus cereus* は低温で増殖可能であり、冷蔵流通中に発芽、増殖し、最終的には HTST 牛乳を腐敗させる。そのため、*B. cereus* が実質上、HTST 牛乳の賞味期限を決定づける要因となっている⁶⁹⁾。*B. cereus* は環境に広く分布するグラム陽性の通性嫌気性の芽胞形成桿菌であり、4–50 °C において増殖することができる³⁸⁾。*B. cereus* は 7 °C 以下で増殖可能な低温性株と 7 °C 以上で増殖する中温性株に分類される。

日本において、市販されている牛乳の法定流通温度は国際的なものに比較して高く、10 °C 以下となっている。そのため、HTST 牛乳は *B. cereus* の影響を受けやすく、日本における HTST 牛乳の賞味期限（一般的には 1 週間以下）は海外に比べて短く設定されている。一般に、*B. cereus* は中温性株であっても 10 °C では良好に増殖する³⁰⁾ が、低温性株は中温性株に比べて増殖が速い⁹⁸⁾。したがって、HTST 牛乳製造において、原料生乳中の低温性株と中温性株両方の *B. cereus* 芽胞数レベルを管理することが重要である。

ヨーロッパ諸国では、生乳や HTST 牛乳中の *B. cereus* の分布に関する研究が広く行われてきた^{3, 51, 97)}。これらの情報は生乳の衛生管理に重要と考えられる

が、筆者の知る限り、日本において生乳中の *B. cereus* 芽胞の分布を調査した報告はない。

汚染源調査や菌株多様性の評価では分離株のタイピングが実施される。*B. cereus* のタイピング方法に関しては、RAPD 法⁶⁷⁾、rep-PCR (repetitive element palindromic PCR) 法¹³⁾、AFLP (amplified fragment length polymorphism) 法⁸¹⁾、MLVA (multiple-locus variable-number tandem repeat analysis) 法¹⁰²⁾ など、多くの方法が報告されている。MLVA 法は疫学調査でよく用いられる方法で、再現性が高く、データベース化が容易という利点を有する。MLVA 法において、同一の MLVA パターンを有する株は同一株、あるいは遺伝的に極めて近縁な株であるとみなすことができる¹⁰⁷⁾。

本章では、北海道の異なる 2 つの地域の乳業工場の生乳中の、特に低温性株の芽胞に関連した *B. cereus* 芽胞数レベルを 1 年間調査し、芽胞数レベルの季節変動、菌株多様性について評価したので、その結果を記載する。

第二節 材料および方法

1. 生乳のサンプリング

生乳サンプルは、北海道十勝地域、釧路地域にある 2 つの乳業工場のサイロタンクより採取した。十勝地域は北海道中西部、釧路地域は北海道西部に位置する。2 つの乳業工場は約 120 km 離れており、それぞれの地域の生乳が集乳される。それぞれのサイロタンクには十勝地域の約 15 戸、釧路地域の約 25 戸の農家の生乳が集められる。サンプリングは 2017 年 4 月から 2018 年 1 月の期間、季節ごとに 4 回 [春 (4 月)、夏 (7 月)、秋 (10 月)、冬 (1 月)] 行なった。季節ごとのサンプルは、春、冬は連続 10 日間、夏、秋は連続 7 日間サンプリングした。サンプリングは生乳 1 L を 1 L 滅菌ポリプロピレンボトルに採取した後、-20 °C

で凍結し、供試するまで凍結状態で保存した。

2. 生乳中の *B. cereus* 芽胞数測定

生乳中の *B. cereus* 芽胞数の測定は Christiansson ら¹⁶⁾ のメンブランフィルター法を一部変更して実施した。方法を簡潔に述べる。生乳 1 L を 250 mL 滅菌ポリプロピレンボトル 10 本に 100 mL ずつ分注し、第二章第二節 3 項に記載した方法で殺菌、濾過を行なった。フィルターをヒツジ脱繊維血液 (ジャパン・ラム社) を 5%、ポリミキシン B 硫酸塩を 10 ppm 添加した血液寒天 (血液寒天基礎培地 No.2; Oxoid 社) 平板に貼り、20 °C 2 日間培養した。培養後、溶血環を示すコロニーをすべてニュートリエント寒天 (Becton, Dickinson and Company 社) 平板に画線分離し、30 °C 一晚純粋培養した。*B. cereus* の確認試験は ISO 7932 法⁴⁰⁾ に従って実施した。純粋培養コロニーを MYP (mannitol-egg yolk-polymyxin agar; Merck Millipore 社) 平板に画線し、30 °C 一晚培養後、典型的なマンニトール陰性の卵黄反応を示すコロニーを上記血液寒天平板に画線した。30 °C 一晚培養した後、溶血環を示すコロニーを *B. cereus* としてカウントし、芽胞数とした。このようにして生乳から得られたすべての *B. cereus* はグリセロールストック (15%、v/v) として、-80 °C にて保存した。

3. *B. cereus* の低温性株の識別

生乳より分離した *B. cereus* の低温性株の識別は、Francis ら²⁴⁾ の報告に従い、cold shock protein A 遺伝子 (*cspA*) をターゲットとした PCR 分析法を用いて実施した。*cspA* を保有する *B. cereus* は 7 °C 以下で増殖できると報告されている²⁴⁾。方法を簡潔に述べる。分離株の DNA 抽出は InstaGene Matrix Kit (Bio-Rad Laboratories 社) を用いて実施した。PCR 用のプライマーは以下の 3 種

類を用いた²⁴⁾。

BcAPF1 : 5'-GAGGAAATAATTATGACAGTT-3'

BcAPR1 : 5'-CTT(C/T)TTGGCCTTCTTCTAA-3'

BcFF2 : 5'-GAGATTTAAATGAGCTGTAA-3'

反応溶液 25 μ L 中の組成は、TaKaRa *Taq* (タカラバイオ社) 1 U、10 $\times$ PCR buffer (タカラバイオ社) 2.5 μ L、デオキシヌクレオシド三リン酸混合物 (dNTP mixture) 0.2 mM、MgCl₂ 2.0 mM、各プライマー 50 pmol、テンプレート DNA 5.0 μ L とした。PCR 反応は 95 $^{\circ}$ C 5 分の初期変性の後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、50 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒の増幅反応を 30 サイクル行ない、最終伸長反応を 72 $^{\circ}$ C 2 分行なった。増幅産物はアガロースゲル電気泳動にて確認した。284 塩基の増幅産物は低温性株および中温性株の両方から得られるのに対し、160 塩基の増幅産物は低温性株からのみ得られる。

4. *B. cereus* の MLVA タイピング

生乳より分離した *B. cereus* のタイピングは MLVA 法により実施した。MLVA タイピングでは、反復配列多型 (variable-number tandem repeat; VNTR) 領域の増幅に 4 種類のプライマー対 (Valjevac ら¹⁰²⁾ が報告した *B. cereus* group のスクリーニングに用いた Bcms 08 および Bcms 19、Le Flèche ら⁵³⁾ が報告した *Bacillus anthracis* および *B. cereus* のタイピングに用いた Ceb-Bams 13 および Ceb-Bams 22) を用いた (Table 7)。GenBank より *B. cereus* ATCC 14579^T (アクセッション番号 : AE016877.1)⁴¹⁾ の全ゲノム配列を入手し、NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いてそれぞれのプライマー

対で増幅される塩基配列を得た。これらの塩基配列から、Tandem Repeats Finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.submit.options.html>) を用いて MLVA タイピングに適当な反復配列を選択した。

分離株の MLVA タイピングは、第三章第二節 3 項に記載した DNA をテンプレートとして実施した。Bcms 08 は 6-FAM (Applied Biosystems 社)、Bcms 19 は NED (Applied Biosystems 社)、Ceb-Bams 13 は VIC (Applied Biosystems 社)、Ceb-Bams 22 は PET (Applied Biosystems 社) でフォワードプライマーの 5' 末端をそれぞれ蛍光標識して使用した。反応溶液 10 μ L 中の組成は、Gflex DNA polymerase (タカラバイオ社) 0.25 U、2 $\times$ Gflex PCR buffer (タカラバイオ社) 5.0 μ L、フォワードおよびリバースプライマー 各 3 pmol、テンプレート DNA 1.0 μ L とした。PCR 反応は 94 $^{\circ}$ C 1 分の初期変性の後、98 $^{\circ}$ C 10 秒、56 $^{\circ}$ C 15 秒、68 $^{\circ}$ C 30 秒の増幅反応を 35 サイクル行なった。それぞれの蛍光色素の蛍光強度を考慮し、Bcms 08 増幅産物 1.0 μ L、Bcms 19 増幅産物 1.5 μ L、Ceb-Bams 13 増幅産物 0.5 μ L、Ceb-Bams 22 増幅産物 2.0 μ L を 1 本のチューブに採取し、滅菌水 48.0 μ L を加え、良く混合した。チューブに混合物 1.0 μ L を採取し、Hi-Di Formamide (Applied Biosystems 社) 24.0 μ L、GeneScan 1200 LIZ dye Size Standard (Applied Biosystems 社) 0.5 μ L を加え、94 $^{\circ}$ C 3 分で加熱変性させた後、POP-4 polymer (Applied Biosystems 社) を使用した ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) によりキャピラリー電気泳動を行なった。キャピラリー電気泳動は泳動電圧 15 kV で 60 $^{\circ}$ C 60 分行なった。それぞれの VNTR 領域のサイズは GeneMapper (v. 4.1) ソフト (Applied Biosystems 社) を用いて決定した。得られた VNTR 領域のサイズ、オフセット値 (反復配列を含まない領域のサイズ)、および反復配列のサイズから、それぞれの VNTR 領域の反復配列数を算出した。それぞれの分離株の MLVA パターンは、Bcms 08、Bcms 19、Ceb-Bams 13、

および Ceb-Bams 22 のプライマー対を用いて得られる増幅産物から計算される反復配列数の組み合わせで表した。例として、*B. cereus* ATCC 14579^T の MLVA パターンは 20-6-7-22 と表される (Table 7)。MLVA パターンを比較することで、分離株を MLVA グループに分類した。

5. 統計解析

生乳中の *B. cereus* およびその低温性株の芽胞数レベルの季節変動を評価するため、それぞれの地域の芽胞数について統計解析を実施した。Mann-Whitney の *U* 検定を用いて、それぞれのサンプルから得られる芽胞数を季節ごとに比較した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

第三節 結果および考察

1. 生乳中の *B. cereus* 芽胞の分布および季節変動

生乳中の *B. cereus* 芽胞数の分布および季節変動を評価するため、メンブランフィルター法を用いて 2 つの乳業工場のサイロタンクより採取した生乳中の *B. cereus* 芽胞数レベルを 1 年間調査した。

十勝地域、釧路地域の生乳サンプルからそれぞれ全 399 株、全 606 株の *B. cereus* を分離した (Table 8)。また、*B. cereus* 芽胞数は年間を通して $1-10^2$ spores L⁻¹ であった (Fig. 2)。一般に、ヨーロッパ諸国では *B. cereus* 芽胞数は 10^2-10^3 spores L⁻¹ と報告されており⁹⁾、北海道における生乳中の芽胞数レベルは比較的低いことが分かった。

十勝地域の *B. cereus* 芽胞数レベルは、春は $1-6$ spores L⁻¹ (中央値 : 3 spores L⁻¹)、夏は $9-22$ spores L⁻¹ (中央値 : 12 spores L⁻¹)、秋は $20-62$ spores L⁻¹ (中央値 : 25 spores L⁻¹)、冬は $2-10$ spores L⁻¹ (中央値 : 5 spores L⁻¹) であった

(Fig. 2)。十勝地域の芽胞数レベルは、秋が他の季節よりも有意に高く ($p < 0.01$)、夏が春および冬に比べて有意に高かった ($p < 0.01$)。

釧路地域の *B. cereus* 芽胞数レベルは、春は 6–17 spores L⁻¹ (中央値 : 9 spores L⁻¹)、夏は 13–88 spores L⁻¹ (中央値 : 38 spores L⁻¹)、秋は 7–22 spores L⁻¹ (中央値 : 16 spores L⁻¹)、冬は 3–14 spores L⁻¹ (中央値 : 9 spores L⁻¹) であった (Fig. 2)。釧路地域の芽胞数レベルは、夏が他の季節よりも有意に高く ($p < 0.01$)、秋が冬に比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。

ヨーロッパ諸国では、生乳中の *B. cereus* 芽胞数は一般に夏に高く、冬に低いことが報告されており^{51, 96, 97)}、夏に高レベルとなることは放牧期間と密接に関係している。Slaghuis ら⁹²⁾ は、放牧牛から得られる生乳は舎飼い牛からの生乳よりも *B. cereus* 芽胞に汚染されやすいことを報告している。Christiansson ら¹⁵⁾ は、RAPD 法により生乳中の *B. cereus* が土壌由来であることを示し、放牧中に乳頭が土で汚れることが主要な汚染経路であると述べている。北海道における放牧期間は 5 月から 10 月であり、そのため北海道の生乳においても夏、秋に *B. cereus* 芽胞数レベルが高いと考えられる。

2. 生乳中の *B. cereus* 低温性芽胞の分布および季節変動

生乳中の *B. cereus* 低温性株芽胞数の分布および季節変動を評価するため、十勝地域、釧路地域の生乳から分離したそれぞれ 399 株、606 株の *B. cereus* (Table 8) について、低温性株の識別を実施した。予備試験として、筆者らの菌株コレクションから低温性株 13 株を含む 42 株の *B. cereus* を用いて PCR 法による識別を実施した結果、低温性株のみが *cspA* を保有していることが判明し、Francis ら²⁴⁾ の PCR 分析法の報告と一致していた (データ示さず)。したがって、低温性株の識別には PCR 法を採用した。

PCR 分析の結果、十勝地域では、全分離株 399 株中 22 株 (5.5%) が低温性株であった (Table 8)。季節ごとの低温性株芽胞数レベルは、春は 0–1 spores L⁻¹ (中央値 : 0 spore L⁻¹)、夏は 0–3 spores L⁻¹ (中央値 : 0 spore L⁻¹)、秋は 0–7 spores L⁻¹ (中央値 : 0 spore L⁻¹)、冬は 0–2 spores L⁻¹ (中央値 : 0 spore L⁻¹) であった (Fig. 2)。十勝地域の低温性株芽胞数において、季節間の有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

釧路地域では、全分離株 606 株中 98 株 (16.2%) が低温性株であった (Table 8)。季節ごとの *B. cereus* の低温性株芽胞数レベルは、春は 0–5 spores L⁻¹ (中央値 : 4 spores L⁻¹)、夏は 1–5 spores L⁻¹ (中央値 : 3 spores L⁻¹)、秋は 1–6 spores L⁻¹ (中央値 : 2 spores L⁻¹)、冬は 0–7 spores L⁻¹ (中央値 : 2 spores L⁻¹) であった (Fig. 2)。釧路地域の低温性株芽胞数においても、季節間の有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。

Svensson ら⁹⁷⁾ はスウェーデンの 8 工場の生乳を調査し、*B. cereus* 低温性株芽胞数レベルは *B. cereus* 全体の芽胞数同様、夏に多いと報告している。彼らの報告では、夏の分離株の 48%、冬の分離株の 35%が低温性株であった。一方、本調査では *B. cereus* 低温性株芽胞数レベルの季節変動は確認されず、十勝地域、釧路地域の全分離株のそれぞれ 5.5%、16.2%のみが低温性株であった。したがって、北海道における生乳中の低温性株芽胞数レベルも比較的低いことが分かった。

te Giffel ら⁹⁸⁾ は、オランダでは *B. cereus* 低温性株は土壌中から最も高レベル検出され (*B. cereus* 全体の 66%)、土壌が *B. cereus* 低温性株の主要汚染源であると報告している。von Stetten ら¹⁰⁴⁾ は、気候による土壌中の *B. cereus* 低温性株の割合への影響について調査し、熱帯、温帯、高山の土壌での割合はそれぞれ 0%、45%、98%であったと報告している。スウェーデン、オランダ、北海道も寒

冷な気候に属するが、土壌中の低温性株の割合は地域によりかなり変動するの
だろう。

日本では、流通温度が海外に比べて高い (10 °C 以下) ため、HTST 牛乳の品
質は *B. cereus* に強く影響を受けると考えられる。HTST 牛乳の微生物学的安全
性は、*B. cereus* 中温性株、低温性株両方の芽胞数レベルの低い生乳を使用して製
造するのと同時に、適切な賞味期限を設定し、10 °C 以下での温度管理を行なう
ことで事実上確保できる。

3. 季節別に見た生乳中の *B. cereus* の菌株多様性

生乳中の *B. cereus* の季節ごとの菌株多様性を評価するため、本調査で分離し
た *B. cereus* について季節別に MLVA タイピングを実施した。Nilsson ら⁶⁷⁾ の
RAPD 法と本試験で用いた MLVA 法を比較した予備試験の結果、筆者らの菌株
コレクションの *B. cereus* 118 株は RAPD 法では 41 グループ、MLVA 法では 48
グループに分類された (データ示さず)。MLVA 法は RAPD 法より識別能が高く、
得られた MLVA パターンは比較が容易であったため、*B. cereus* のタイピングに
は MLVA 法を採用した。

季節別に分類した *B. cereus* 分離株の MLVA グループ数を Table 9 に示す。十
勝地域では、春の分離株 28 株、夏の分離株 90 株、秋の分離株 233 株、冬の分離
株 48 株 (Table 8) は、それぞれ 25、23、59、26 の MLVA グループに分類され
た。10 株以上で構成される MLVA グループは夏に 2 グループ、秋に 2 グルー
プ、冬に 1 グループ見られた。1 株のみで構成される MLVA グループの割合は
春、夏、秋、冬でそれぞれ 88.0%、65.2%、72.9%、80.8%であり (Table 9)、次い
で数株で構成される MLVA グループが多く見られた。

釧路地域では、春の分離株 97 株、夏の分離株 321 株、秋の分離株 103 株、冬

の分離株 85 株 (Table 8) は、それぞれ 72、116、74、75 の MLVA グループに分類された。10 株以上で構成される MLVA グループは夏に 5 グループ見られた。1 株のみで構成される MLVA グループの割合は春、夏、秋、冬でそれぞれ 79.2%、68.1%、79.7%、90.7%であった (Table 9)。

MLVA 解析から、生乳中の *B. cereus* は非常に菌株多様性が高いことが示された (Table 9)。しかし、10 株以上で構成される MLVA グループが夏、秋に多く見られ、放牧期間に発生しやすいことが示された。特に、十勝地域の秋の生乳では、139 株が MLVA パターン 19-5-6-19 で表される MLVA グループを構成しており (Table 10)、秋の分離株の 59.7%を占めていた (分離株 233 株中 139 株、Table 8)。一つの MLVA グループに属する株が多数検出されることは、特定の汚染源が存在することを強く示唆するものである。生乳の品質向上には、*B. cereus* の汚染源を特定し、衛生性を向上させることが重要である。本試験では生乳サンプルを乳業工場のサイロタンクから採取しているため、汚染源としてはサイロタンクでの汚染、あるいは特定農家の生乳での汚染の二つが考えられる。しかしながら、本調査結果からは汚染源を特定することはできなかった。汚染源を特定するには、サイロタンクの衛生性の調査、農家の生乳の *B. cereus* 芽胞数レベルの調査など、更なる調査が必要であろう。

4. 年間を通じて検出される *B. cereus* の存在

年間を通じて検出される *B. cereus* の存在を評価するため、*B. cereus* 全分離株について MLVA パターンを比較した。その結果、十勝地域の全分離株 399 株、釧路地域の全分離株 606 株はそれぞれ 107、260 の MLVA グループに分類された (Table 9)。1 株のみで構成されるグループの割合はそれぞれ 76.6%、68.5%であった (Table 9)。

3 シーズン以上検出された同一の MLVA パターンを示す *B. cereus* の分離株数を Table 10 に示す。十勝地域では、MLVA パターン 19-6-7-17 で表される 1 つの MLVA グループが年間を通じて検出され、3 シーズン検出された MLVA グループは 8 グループ存在した。釧路地域では、年間を通じて検出されたグループは MLVA パターン 19-6-6-15、20-5-5-19、20-5-6-17、20-5-6-20 で表される 4 つの MLVA グループが年間を通じて検出され、3 シーズン検出された MLVA グループは 15 グループ存在した。MLVA パターン 19-6-7-17、19-6-6-15、20-5-5-19 で表される 3 つの MLVA グループは、両地域から 3 シーズン以上検出された。十勝地域、釧路地域に存在する 2 つの乳業工場は地理的にも離れている (約 120 km) ため、両工場のサイロタンクに同一の生乳が入ることはない。したがって、これら 3 つの MLVA グループは北海道に広く分布しているものと考えられる。

本調査により、日本における生乳中の *B. cereus* 芽胞の分布レベルが初めて明らかとなった。本試験結果は、生乳中の *B. cereus* 芽胞の衛生管理における基礎的情報を提供し、HTST 牛乳製造における生乳の品質向上につながることを期待される。

第四節 小括

原料としての生乳の微生物学的品質は、HTST 牛乳を製造する上で重要である。特に、*Bacillus cereus* は耐熱性を有する芽胞菌で、HTST 牛乳の品質に悪影響を及ぼす。そこで、メンブランフィルター法を用いて北海道の異なる 2 つの地域の乳業工場の生乳における *B. cereus* 芽胞数レベルを 1 年間調査した。生乳中の *B. cereus* 芽胞数レベルは、夏、秋に有意に高く、海外の報告と一致する結果であった。一方、低温性株の芽胞数レベルは季節間で有意な差は見られなかった。北海道における生乳中の *B. cereus* 芽胞数レベルおよび低温性株の芽胞数レベルは

比較的低かった。よって、*B. cereus* 中温性株、低温性株両方の芽胞数レベルの低い生乳を使用するのと同時に、適切な賞味期限を設定し、10℃以下での温度管理を行なうことで、HTST牛乳の微生物学的安全性は事実上確保できると考えられた。MLVA分析から、生乳中の*B. cereus*は菌株多様性が高いことが示されたが、それでも北海道の生乳に広く分布している株も数株存在していた。しかし、10株以上で構成されるMLVAグループが夏、秋に多く見られ、特定の汚染源が存在することが示唆された。本調査により、日本における生乳中の*B. cereus*芽胞の分布レベルが初めて明らかとなった。本試験結果は、生乳中の*B. cereus*芽胞の衛生管理における基礎的情報を提供し、HTST牛乳製造における生乳の品質向上につながることを期待される。

Table 7. Primers used for MLVA typing of *Bacillus cereus*.^a

Primer name	Sequence	Tandem repeat length (bp)	No. of tandem repeats	Expected PCR product length (bp)
Bcms 08	F: GTGCTGGWGCAAACACAGAC R: TGGTCGCCTGCTTTATAACC	18	20	739
Bcms 19	F: GGAATAGAAGATGAAGAAGAAGTTACG R: TTTCGGTTTTATTGGTGGTTG	23	6	363
Ceb-Bams 13	F: AATTGAGAAATTGCTGTACCAAACCT R: CTAGTGCATTTGACCCTAATCTTGT	36	7	553
Ceb-Bams 22	F: ATCAAAAATTCTTGGCAGACTGA R: ACCGTTAATTCACGTTTAGCAGA	19	22	888

^a Abbreviations are: F, forward; R, reverse. The number of tandem repeats and expected PCR products length were derived from the sequencing data of *Bacillus cereus* ATCC 14579^T (accession number AE016877.1).

Table 8. Total numbers of *Bacillus cereus* isolates and numbers of psychrotrophic isolates.^a

Season	Number of <i>B.cereus</i> isolates	
	Total	Psychrotrophic
Tokachi region		
Spring	28	2 (7.1)
Summer	90	6 (6.7)
Autumn	233	9 (3.9)
Winter	48	5 (10.4)
All seasons	399	22 (5.5)
Kushiro region		
Spring	97	30 (30.9)
Summer	321	22 (6.9)
Autumn	103	18 (17.5)
Winter	85	28 (32.9)
All seasons	606	98 (16.2)

^a The percentage of psychrotrophic isolates (relative to total isolates) is given in parentheses.

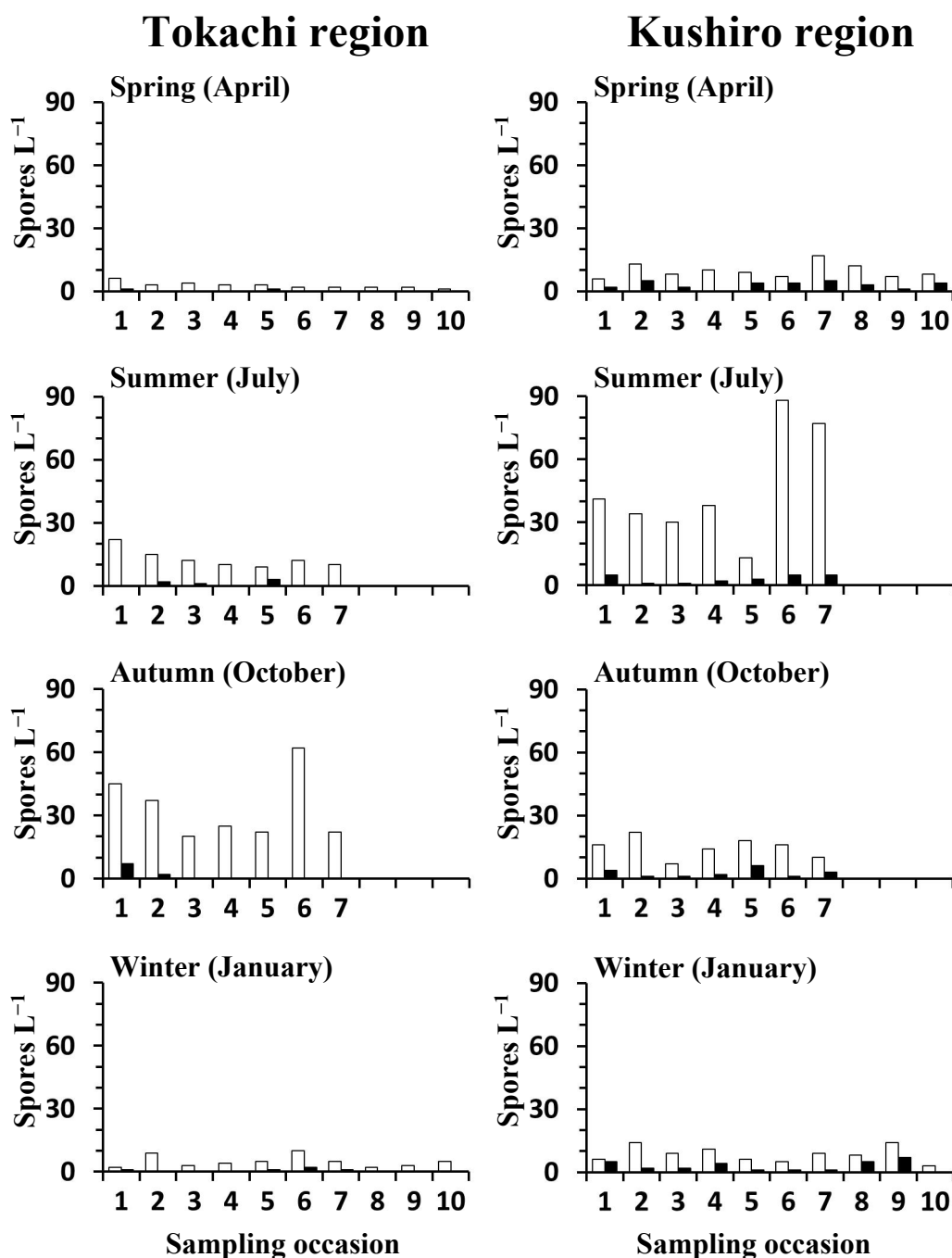


Fig. 2. Numbers of *Bacillus cereus* spores and numbers of psychrotrophic spores in 1-L samples of raw milk taken from dairy plants in two different regions over 1 year. Seasonal samples were taken for 10 consecutive days in spring and winter, and 7 consecutive days in summer and autumn. White column, total number of *B. cereus* spores; black column, number of *B. cereus* psychrotrophic spores.

Table 9. Numbers of MLVA groups classified according to the number of *Bacillus cereus* isolates within each MLVA group.^a

Season	Numbers of MLVA groups					Total MLVA groups
	1	2–9	10–49	50–99	≥100	
Tokachi region						
Spring	22 (88.0%)	3 (12.0%)				25
Summer	15 (65.2%)	6 (26.1%)	2 (8.7%)			23
Autumn	43 (72.9%)	14 (23.7%)	1 (1.7%)		1 (1.7%)	59
Winter	21 (80.8%)	4 (15.4%)	1 (3.8%)			26
All seasons	82 (76.6%)	20 (18.7%)	3 (2.8%)	1 (0.9%)	1 (0.9%)	107
Kushiro region						
Spring	57 (79.2%)	15 (20.8%)				72
Summer	79 (68.1%)	32 (27.6%)	4 (3.4%)	1 (0.9%)		116
Autumn	59 (79.7%)	15 (20.3%)				74
Winter	68 (90.7%)	7 (9.3%)				75
All seasons	178 (68.5%)	73 (28.1%)	8 (3.1%)	1 (0.4%)		260

^a *Bacillus cereus* isolates were classified into MLVA groups by MLVA typing in each season or through the year. Because several MLVA groups were detected in multiple seasons, the total number of MLVA groups through the year was less than the sum of MLVA groups in each season. The percentage of a MLVA group classified according to the number of isolates within each MLVA group per season is given in parentheses.

Table 10. MLVA groups detected in three or more seasons, and number of isolates belonging to each MLVA group.^a

MLVA group	Seasons (number of isolates detected)	
	Tokachi region	Kushiro region
19-6-7-17	SPR(1), SMR (4), AUT (4), WTR (1)	SPR (2), SMR (3), WTR (3)
19-6-6-15	SMR (2), AUT (5), WTR (2)	SPR (2), SMR (6), AUT (6), WTR (3)
20-5-5-19	SMR (3), AUT (2), WTR (1)	SPR (3), SMR (6), AUT (1), WTR (1)
20-5-6-17		SPR (2), SMR (4), AUT (1), WTR (1)
20-5-6-20		SPR (1), SMR (4), AUT (1), WTR (3)
19-5-6-19	SMR (2), AUT (139), WTR (13)	
19-5-7-19	SMR (3), AUT (1), WTR (6)	
20-5-6-18	SPR (1), AUT (1), WTR (1)	
20-5-6-19	SPR (1), AUT (2), WTR (1)	
20-5-6-21	SPR (1), SMR (18), AUT (3)	
20-5-7-20	SMR (37), AUT (12), WTR (4)	
18-3-7-19		SPR (1), AUT (2), WTR (2)
19-3-7-19		SPR (1), SMR (3), AUT (2)
19-3-7-21		SPR (1), SMR (6), WTR (1)
19-5-5-20		SPR (1), SMR (9), AUT (1)
20-5-4-19		SPR (3), SMR (1), AUT (1)
21-3-5-0		SPR (1), SMR (3), AUT (1)
21-4-5-27		SMR (3), AUT (3), WTR (1)
21-4-6-20		SPR (3), SMR (3), AUT (5)
21-4-7-18		SMR (1), AUT (1), WTR (1)
21-5-6-23		SPR (1), AUT (1), WTR (1)
21-5-7-23		SPR (1), AUT (4), WTR (1)
22-4-7-21		SPR (1), SMR (1), WTR (1)
22-5-0-26		SPR (1), SMR (1), AUT (1)
23-4-5-17		SPR (1), SMR (1), WTR (1)

^a Each MLVA group is represented by an MVLA pattern designated as a combination of the number of tandem repeats calculated from amplification products obtained using Bcms 08, Bcms 19, Ceb-Bams 13, and Ceb-Bams 22 as primers. Abbreviations are: SPR, spring; SMR, summer; AUT, autumn; WTR, winter.

第四章 乳業環境中の高耐熱性 *Bacillus cereus* の分布から 評価した 120 °C 2 秒殺菌 UHT 牛乳の微生物学的安全 全性

【本章の内容は *International Dairy Journal*, 91, 36–40 (2019) に掲載済みである】

第一節 緒言

牛乳の製造においては HTST 殺菌 (72 °C 15 秒) と UHT 殺菌が主流の殺菌技術である。HTST 殺菌は官能的にもっとも生乳に近い風味を有しているが、芽胞菌が製品に残存し、賞味期限が短く設定されている (一般的には 10 °C 以下で 1 週間以下)。特に、残存する芽胞菌のうち、10 °C 以下でも増殖可能なものは低温性芽胞菌と呼ばれ、*Bacillus cereus* とその類縁菌がその中心をなしている。*B. cereus* は環境に広く分布するグラム陽性の通性嫌気性の芽胞形成桿菌であり、4–6 °C でも増殖可能である^{52,63)} ため、冷蔵保存中に増殖し、実質上、HTST 牛乳の賞味期限を決定づける要因となっている⁶⁹⁾。

HTST 殺菌とは対照的に、牛乳の UHT 殺菌の条件はこのような芽胞菌も不活性化させることを目的とした殺菌法である。UHT 殺菌条件は国際的にはかなり幅があるが、チルド流通の UHT 牛乳製造では典型的には 125–138 °C 2–4 秒の条件が利用される。この殺菌条件は国際的には“ウルトラパスツリゼーション”と呼ばれるが、日本にはこのような呼称はない。常温流通の UHT 牛乳 (“ロングライフミルク” と呼ばれる) の製造では、130–150 °C 2–8 秒殺菌し、無菌充填する方法が一般的である^{6,31)}。

牛乳の法定流通温度も国によって異なっており、例えばイギリス、アメリカで

は 6 °C ⁷⁸⁾、ドイツでは 8 °C ¹⁷⁾ となっているが、日本は国際的に比較して高く、10 °C となっている。

日本においては、UHT 殺菌の条件は“乳及び乳製品の成分規格等に関する省令 (乳等省令)”で規定されており、120–150 °C 1–3 秒とされている ⁴⁴⁾。完全に芽胞菌を不活性化するような UHT 殺菌条件は最終製品において好ましくない加熱臭が生じるため、できるだけ弱い UHT 殺菌条件 (例えば 120–130 °C 2 秒) で殺菌し、チルド流通 (10 °C 以下) する牛乳が市場の大半を占めている (流通量の 95%)。換言すれば、日本における UHT 牛乳は国際的な UP 牛乳に近く、多くの場合、芽胞を完全には不活性化することはできないが、チルド流通することで長い賞味期限が保たれている (10 °C 以下で約 2 週間)。このような UHT 殺菌条件では、生乳が芽胞でひどく汚染している場合、低頻度であっても芽胞が残存している可能性が疑われる。しかし、このような UHT 牛乳が日本の市場で長い間、安定して販売されているという実績があり、これらの製品は十分に安全であると考えられている。

一般に *B. cereus* の芽胞の耐熱性は比較的低いとされているが、Stadhouders ら ⁹⁴⁾ は乳中の *B. cereus* の芽胞をすべて不活性化するには 125 °C で 10–20 秒の殺菌が必要であると述べている。*B. cereus* の耐熱性に関する文献 ^{5, 19, 43, 60)} は多く、120 °C 以上の加熱処理で *B. cereus* が残存する可能性を示唆する報告も見られる。生乳中に芽胞が多く存在した場合、UHT 牛乳に残存し、製品の劣化を早める可能性がある。しかし、筆者の知る限り、乳業環境中の高耐熱性 *B. cereus* の分布を網羅的に調査した例はない。

そこで本章では、120 °C 2 秒殺菌に注目し、乳業環境中の高耐熱性 *B. cereus* の分布について網羅的な調査を実施し、UHT 牛乳の微生物学的安全性について評価したので、その結果を記載する。

第二節 材料および方法

1. 乳業環境からの *B. cereus* の分離

生乳、市販の HTST 牛乳 (72 °C 15 秒殺菌) および UHT 牛乳 (120 °C 2 秒殺菌)、および牛乳製造環境 (殺菌後の牛乳製造ライン、充填機、牛乳製造工場の床やドレイン等) の拭き取りサンプルより *B. cereus* の分離を実施した。生乳は 78 サンプル (それぞれ 100 mL)、HTST 牛乳は 90 サンプル (それぞれ 100 mL)、UHT 牛乳は 36 サンプル (それぞれ 1 L) について調査した。特に生乳、HTST 牛乳、UHT 牛乳中には *B. cereus* は微量にしか存在しないため、生乳、HTST 牛乳に関してはメンブランフィルター法¹⁶⁾、UHT 牛乳に関しては 30 °C 7 日間増菌培養後、MYP (Merck Millipore 社) 平板を用いた表面塗抹法を用いた。メンブランフィルター法は第三章第二節 2 項に記載した方法で行なった。拭き取りサンプルからの分離は、増菌培養を除いた UHT 牛乳と同様の方法で実施した。*B. cereus* の確認試験は第三章第二節 2 項に記載した方法で行なった。すべての菌株はグリセロールストック (15%、v/v) として、-80 °C にて保存した。

2. 芽胞懸濁液調製

B. cereus のグリセロールストックをニュートリエントブロス (Becton, Dickinson and Company 社) に一白金耳接種し、30 °C で一晚培養した。培養液を $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 25 mg L⁻¹、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250 mg L⁻¹、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 300 µg L⁻¹、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mg L⁻¹ を添加したトリプトン-グルコース-酵母エキス寒天 (Oxoid 社) 平板に表面塗抹し、30 °C 7-10 日間培養した。平板培地表面に生じた菌体を芽胞として回収し、第二章第二節 2 項に記載した方法で芽胞懸濁液を調製した。芽胞懸濁液は使用するまで 2 °C にて保存した。

3. 耐熱性試験

耐熱性試験では、高耐熱性株を 120 °C 2 秒の加熱処理で約 3 桁以内の減少を示す株と定義した。*B. cereus* の z 値を 7–9 °C と仮定すると、120 °C 2 秒の加熱処理で 3 桁の減少は、100 °C 5 分の加熱処理で 3 桁以内の減少とほぼ同等となる。一般的な耐熱性の低い *B. cereus* は同条件で 5 桁以上減少する。そこで、高耐熱性株の予備スクリーニングとして 100 °C 5 分の加熱処理を用いた。

芽胞懸濁液を終濃度が約 10^7 spores mL⁻¹ となるように 1/15 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で希釈し、80 °C 10 分の処理で加熱活性化した。希釈した芽胞懸濁液 2 mL をガラスチューブ (内径 7 mm、長さ 122 mm) に加えて封管し、オイルバスにて 100 °C 5 分間加熱した。氷冷後、芽胞懸濁液をニュートリエント寒天培地 (Bectone, Dickinson and Company 社) に混釈し、30 °C 2 日間培養した。培養後、ニュートリエント寒天平板上のコロニーを残存芽胞数として計測した。予備スクリーニングは 2 連で実施した。

予備スクリーニングにおいて、芽胞数の減少が約 3 桁以内の株については、いくつかの温度帯での D 値および z 値を得るために、さらに詳細に耐熱性試験を実施した。

4. D 値および z 値の決定

加熱活性化した芽胞懸濁液をガラスチューブに加えて封管し、90.0–105.0 °C で適度な間隔で加熱処理を行なった。残存芽胞数は第四章第二節 3 項に記載した方法で計測した。 D 値および z 値を決定するための耐熱性試験は 2 連で実施した。温度ごとに生残曲線を描き、生残曲線の直線部分から得られる回帰直線を用いて D 値を算出した。また、 D 値の対数値をそれぞれの加熱温度に対して

ロットし、直線部分から得られる回帰直線を用いて z 値を算出した。本試験で得られた D 値、 z 値を用いて、120 °C 2 秒の加熱処理における芽胞数減少の対数値を計算した。

5. 殺菌前および殺菌後汚染条件における高耐熱性株の UHT 牛乳中での 10 °C および 12 °C 増殖性試験

4 株の高耐熱性 *B. cereus* (HR1、HR2、CL6、CL21) の芽胞を用いて、殺菌前および殺菌後汚染条件において増殖性試験を 2 連で実施した (Fig. 3)。両条件において、試験開始時の UHT 牛乳中の芽胞数は約 10^3 spores mL⁻¹ に調製した。

殺菌前汚染条件は、高耐熱性 *B. cereus* の芽胞で高濃度に汚染された生乳から UHT 牛乳を製造したことを想定している。高耐熱性株が 120 °C 2 秒殺菌で約 3 桁減少することを考慮し、高耐熱性株の芽胞懸濁液を UHT 牛乳 [市販の 120 °C 2 秒殺菌牛乳; よつ葉乳業社 (脂肪分 3.7%、無脂乳固形分 8.5%)] に約 10^6 spores mL⁻¹ となるように接種した。接種した牛乳を実験室規模のプレート式 UHT 殺菌機 (STS-100; 日阪製作所社) を用いて、120 °C 2 秒加熱処理した。加熱処理した乳を滅菌 1 L ポリプロピレンボトルに採取し、10 °C あるいは 12 °C で保存した。

殺菌後汚染条件は、UHT 牛乳が UHT 殺菌後に高耐熱性 *B. cereus* の芽胞で高濃度に汚染されたことを想定している。上記芽胞懸濁液を 80 °C 10 分加熱活性化し、滅菌 1 L ポリプロピレンボトルに採取した UHT 牛乳 (上記同様) に約 10^3 spores mL⁻¹ となるように接種した。これらの高耐熱性 *B. cereus* の芽胞で人工的に汚染させた UHT 牛乳を 10 °C あるいは 12 °C で保存した。

保存中、同一ボトルよりサンプルを適度な間隔で採取し、ニュートリエント寒天培地を用いた混釈法により菌数を測定した。

対照実験として、生乳由来の耐熱性の低い株 4 株を任意に選抜し、10 °C 増殖性試験を実施した。生乳中に存在する耐熱性の低い株は UHT 殺菌で不活性化されるので、殺菌後汚染条件でのみ試験を実施した。

第三節 結果

1. 乳業環境中の高耐熱性株の分布

120 °C 2 秒殺菌で残存する可能性のある *B. cereus* の乳業環境中における分布を評価するため、乳業環境から 200 株の *B. cereus* を分離した。*B. cereus* は生乳から 105 株、HTST 牛乳から 54 株、牛乳製造環境から 41 株分離された。一方、UHT 牛乳 (1 L 紙容器) 36 サンプルからは *B. cereus* は検出されなかったが、31 サンプルから中温性 *Bacillus* 属が検出された (データ示さず)。

高耐熱性株取得のための予備スクリーニングでは、200 株中 18 株が 100 °C 5 分の加熱処理で 3 桁以内の減少を示し、1 株は HTST 牛乳由来、残り 17 株は牛乳製造環境由来であった。生乳由来株 105 株中 100 株 (95.2%)、HTST 牛乳由来株 54 株中 49 株 (90.7%)、牛乳製造環境分離株 41 株中 15 株 (36.6%) が 100 °C 5 分の加熱処理で 5 桁以上の減少を示し、製造環境由来株に比べて生乳由来株、HTST 牛乳由来株は耐熱性が低いことが示された。生乳や HTST 牛乳で同程度の割合となっているのは、HTST 殺菌は殺菌温度が低く (72 °C)、原料である生乳中の *B. cereus* の芽胞がそのまま HTST 牛乳へ移行するため、生乳由来株と HTST 牛乳由来株が同一とみなせることを意味している。

また、*D* 値、*z* 値から 120 °C 2 秒の加熱処理における芽胞数減少の対数値を計算した (Table 11)。その結果、4 株 (HR1、HR2、CL6、CL21) のみが 120 °C 2 秒の加熱処理で約 3 桁以内の減少を示す高耐熱性株と見積もられた。これらの株はすべて UHT 殺菌後の製造ラインから分離された株であった。

2. 殺菌前および殺菌後汚染条件における高耐熱性株の UHT 牛乳中での 10 °C および 12 °C 増殖性

高耐熱性 *B. cereus* が UHT 牛乳を汚染した場合の増殖性を評価するため、高耐熱性株 HR1、HR2、CL6、CL21 を用いて殺菌前および殺菌後汚染条件での 10 °C および 12 °C 増殖性試験を実施した (Fig. 4)。両条件ともに 10 °C では 20 日まで増殖する株は見られなかったのに対し、12 °C ではすべての株が増殖を示した。しかし、殺菌前汚染条件では、120 °C 2 秒の加熱処理によって加熱損傷が生じ、誘導期が長く、増殖の遅延が観察された。初発芽胞数と対数増殖期の回帰直線との交点より、殺菌後汚染条件での HR1、HR2、CL6、CL21 の誘導期はそれぞれ 2.3 日、4.0 日、3.6 日、2.0 日と計算された。一方、殺菌前汚染条件ではそれぞれ 3.8 日、8.6 日、9.7 日、3.5 日と計算された。

興味深いことに、任意に選抜した生乳由来の耐熱性の低い株 4 株は 10 °C で良好に増殖した (Fig. 5)。このうち 2 株 (BCC1 および BCC2) は 5 °C でも増殖を示した (データ示さず)。このことは、高耐熱性株が増殖温度帯を変化させ、低温で増殖しにくくなっていることを示唆している。

第四節 考察

筆者の知る限り、本研究は乳業環境中の高耐熱性 *B. cereus* の分布を網羅的に調査した初めての報告である。高耐熱性 *B. cereus* は生乳、HTST 牛乳、UHT 牛乳からは検出されないが、牛乳製造環境に存在することが明らかとなった。

生乳中の *B. cereus* は少なく、 10^2 – 10^3 spores L⁻¹ といわれており⁹¹⁾、第三章に記載した調査においても 1 – 10^2 spores L⁻¹ であった。また、生乳中の *B. cereus* は耐熱性が低いことから、120 °C 2 秒殺菌で十分に安全なレベルにまで不活性化さ

れる。これが市販の UHT 牛乳から *B. cereus* が検出されなかった理由である。

それにもかかわらず、高耐熱性株は牛乳製造環境に存在する傾向が見られ、殺菌前汚染であっても、UHT 牛乳に残存する可能性が本試験から示唆された。市販の牛乳中に *B. cereus* が低レベル残存すること自体は、チルド製品としての牛乳の安全性に疑義を与えるものではない^{50, 69)}。チルド流通の UHT 牛乳の場合、*B. cereus* が低レベル残存しても、与えられた流通条件で賞味期限中に増殖性を示さなければ、安全性を十分に確保できる。それが牛乳の食品としての新鮮さと安全性の両方を確保する考え方である。本調査から、高耐熱性 *B. cereus* は 10 °C 増殖性が失われていることを見出した (Fig. 4)。したがって、たとえ高耐熱性 *B. cereus* が UHT 牛乳に残存したとしても、10 °C 以下での流通中に増殖することではなく、UHT 牛乳の微生物学的安全性は保たれる。

一般的に、ほとんどの *B. cereus* は 10 °C で良好に増殖する²⁷⁾。本調査においても、任意に選抜した生乳由来の耐熱性の低い 4 株は 10 °C で良好に増殖した (Fig. 5)。本調査において、高耐熱性株が一般の *B. cereus* とは異なり、10 °C で増殖しなかった理由としては、高耐熱性株が 10 °C での増殖性を持たない *B. cereus* の新種である可能性、あるいは環境ストレスにより高い耐熱性を獲得した反面、10 °C での増殖性が抑制された可能性のいずれかと考えられる。これを解明するには、高耐熱性変異株を作成し、親株と増殖温度帯を比較するなど、更なる調査が必要である。

Mayr ら⁵⁹⁾ は 127 °C 5 秒殺菌の extended-shelf-life (ESL) 牛乳を調査し、10 °C 23 週間保存では *B. cereus* は検出されなかったが、引き続き 30 °C 10 日間保存して *B. cereus* を検出した。ESL 牛乳の 10 °C 保存で検出されなかった理由として、*B. cereus* の低温での増殖性が加熱損傷による影響を受けたためと彼らは述べている。本調査においても、120 °C 2 秒の加熱処理後に加熱損傷による増殖性への

影響が見られ、12 °C では回復するまでに数日を要した (Fig. 4)。120 °C 2 秒の UHT 殺菌ではすべての高耐熱性 *B. cereus* を完全に不活性化することはできないものの、加熱損傷により低温での増殖性が低下する。たとえ UHT 牛乳中で高耐熱性 *B. cereus* が増殖したとしても、増殖が遅れるので、UHT 牛乳の微生物学的安全性の観点からは有利に働く。

増殖性試験で用いた汚染条件 (10^3 – 10^6 spores mL⁻¹) は極端で現実的ではない。実際にはこのような汚染が UHT 牛乳で発生することはない。結論として、120 °C 2 秒殺菌の UHT 牛乳においては、牛乳製造環境からの *B. cereus* による汚染をなくし、10 °C 以下での温度管理と適切な賞味期限を設定することで、事実上、微生物学的安全性を確保できる。

第五節 小括

日本で“UHT 牛乳”と呼ばれる牛乳は海外で一般的に“UHT 牛乳”と呼ばれているものとは異なり、120–130 °C で 2 秒殺菌し、10 °C 以下でチルド流通する。このような殺菌条件では *Bacillus cereus* の芽胞を完全には不活性化することはできない。UHT 乳の微生物学的安全性を評価するため、特に UHT 殺菌でも残存する可能性がある高耐熱性 *B. cereus* (120 °C 2 秒の加熱処理で約 3 桁以内の減少を示す株と定義) の乳業環境における分布を調査した。乳業環境から分離した 200 株の *B. cereus* (生乳由来 105 株、HTST 牛乳由来 54 株、牛乳製造環境由来 41 株) について耐熱性試験を実施した結果、牛乳製造環境由来の 4 株の *B. cereus* のみが高耐熱性を示し、高耐熱性株が牛乳製造環境に存在することが明らかとなった。高耐熱株は 4 株すべてが 10 °C では増殖できず、12 °C では増殖したが、比較的長い誘導期 (2–4 日) を示した。また、120 °C 2 秒の加熱殺菌により誘導期がさらに長くなった (3–9 日)。一方、任意に選抜した生乳由来の耐熱性の

低い株 4 株は 10 °C で良好に増殖した。120 °C 2 秒殺菌ではすべての高耐熱性 *B. cereus* を完全に不活性化することはできないが、10 °C 以下での流通中に増殖することはない。また、たとえ UHT 牛乳中で高耐熱性 *B. cereus* が増殖したとしても、加熱損傷により増殖が遅れるので、UHT 牛乳の微生物学的安全性の観点からは有利に働く。したがって、120 °C 2 秒殺菌の UHT 牛乳においては、特に牛乳製造環境由来の *B. cereus* による汚染をなくし、適切に設定した賞味期限の期間中 10 °C 以下に保つことで、微生物学的安全性を確保することができる。本調査は乳業環境中の高耐熱性 *B. cereus* の分布を網羅的に調査した初めての報告である。

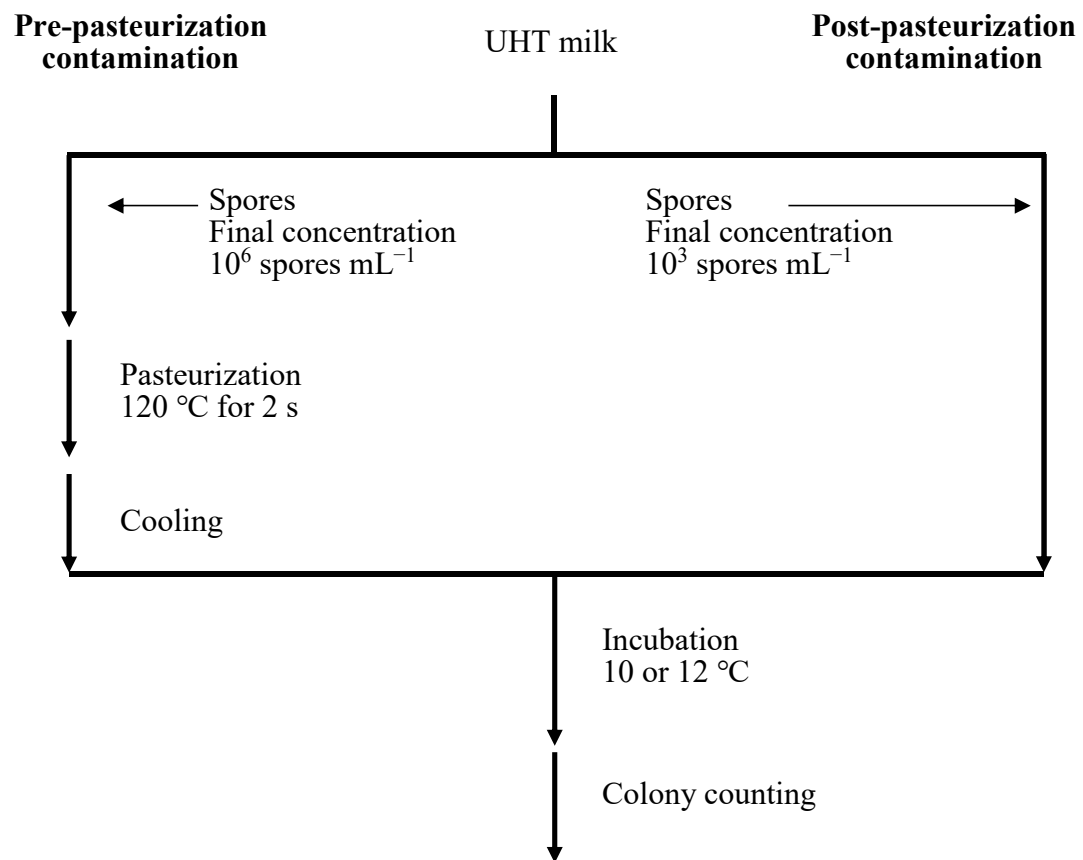


Fig. 3. Schematic flow diagram of pre- and post-pasteurization contamination experiments.

Table 11. *D*-values, *z*-values, and estimated log reductions after heating at 120 °C for 2 s for the 18 strains of *Bacillus cereus* that exhibited less than approximately 3 log reductions in pre-screening at 100 °C for 5 min.^a

Strain	Source	<i>D</i> -value (min) at heating temperature (°C)									<i>z</i> -value (°C)	Log reduction
		90.0	92.5	95.0	97.5	98.0	100.0	102.0	102.5	105.0		
KH2	HTST			4.8 (1.000)	2.4 (0.998)		1.2 (0.994)				8.3 (1.000)	7.1
HR1	ENV						11.7 (0.993)		6.2 (0.990)	2.2 (0.998)	6.9 (0.981)	2.3
HR2	ENV					13.8 (0.993)	7.1 (1.000)	3.8 (0.993)			7.1 (1.000)	3.1
CL1	ENV		7.7 (1.000)	3.5 (0.999)	1.8 (1.000)						7.9 (0.998)	13.9
CL2	ENV		5.7 (1.000)	2.6 (0.997)	1.2 (1.000)						7.4 (1.000)	30.6
CL6	ENV			8.9 (0.998)	4.7 (1.000)		2.3 (0.998)				8.5 (0.999)	3.3
CL10	ENV			14.3 (1.000)	6.4 (1.000)		2.7 (1.000)				6.9 (1.000)	9.8
CL18	ENV			5.6 (0.999)	2.5 (0.999)		1.2 (0.997)				7.5 (0.999)	12.9
CL21	ENV				9.4 (0.998)		4.7 (1.000)		2.1 (0.999)		7.7 (0.998)	2.8
CL24	ENV			10.3 (0.998)	4.8 (1.000)		2.0 (0.999)				7.0 (0.998)	12.0
CL25	ENV	13.1 (0.998)	5.2 (1.000)	2.9 (1.000)							7.6 (0.983)	22.4
CL26	ENV	11.5 (0.996)	4.6 (0.998)	2.2 (0.998)							7.0 (0.996)	56.5
CL27	ENV	13.2 (1.000)	6.8 (0.999)	3.0 (0.989)							7.8 (0.996)	17.8
CL31	ENV			9.2 (1.000)	4.2 (0.998)		2.1 (0.998)				7.8 (0.999)	5.8
CL32	ENV			5.8 (0.999)	2.7 (1.000)		1.2 (1.000)				7.3 (1.000)	15.3
CL34	ENV		5.7 (1.000)	2.8 (0.998)	1.5 (0.998)						8.6 (0.999)	9.6
CL36	ENV			6.1 (0.990)	2.8 (0.995)		1.3 (0.999)				7.4 (1.000)	12.9
CL37	ENV			6.4 (0.999)	3.0 (0.998)		1.6 (0.996)				8.3 (0.997)	5.4

^a Abbreviations are: HTST, high-temperature short-time pasteurized milk; ENV, milk plant environment. Correlation coefficients (R^2) are given in parentheses; log reductions are estimated after heating at 120 °C for 2 s.

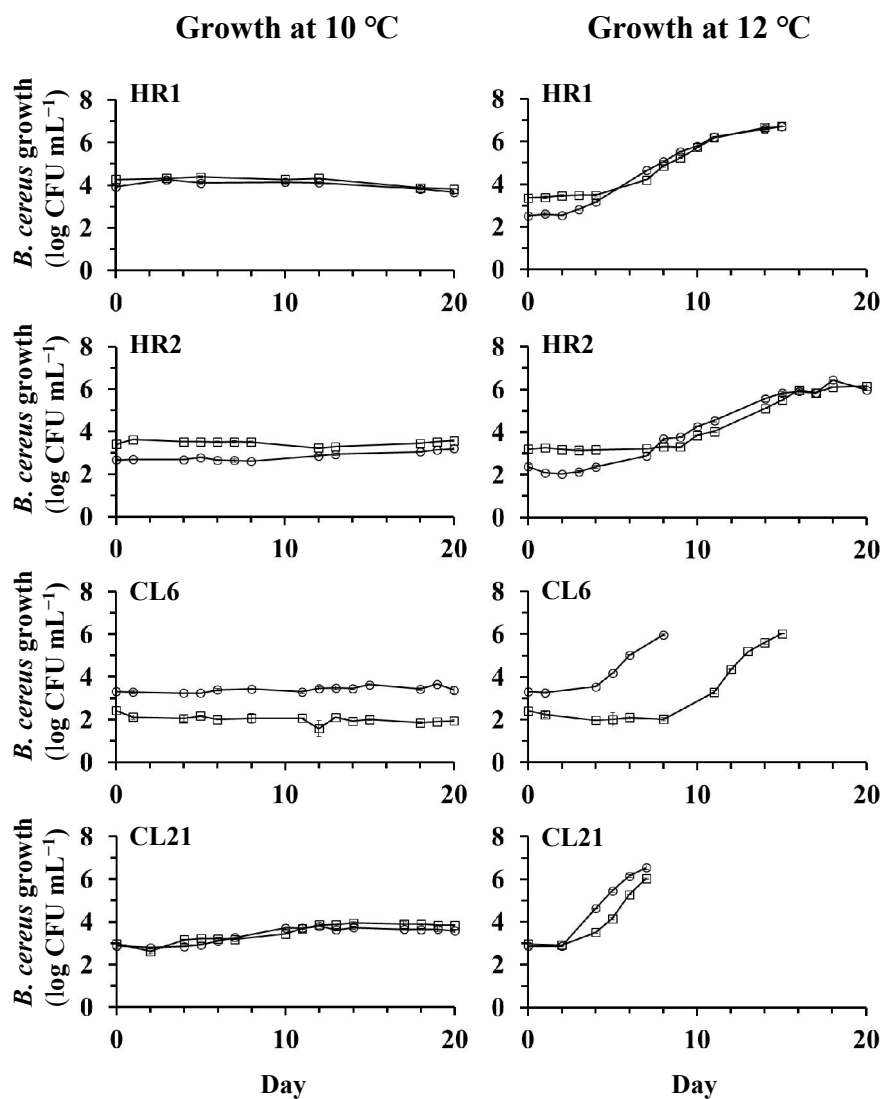


Fig. 4. Growth curves of high-heat-resistant *Bacillus cereus* HR1, HR2, CL6, and CL21 at 10 °C (left column) and 12 °C (right column) in UHT milk under pre- and post-pasteurization contamination conditions. For pre-pasteurization contamination, spores were inoculated into UHT milk, and the inoculated milk was pasteurized at 120 °C for 2 s (□). For post-pasteurization contamination, spores were heated for spore activation at 80 °C for 10 min and then inoculated into UHT milk (○).

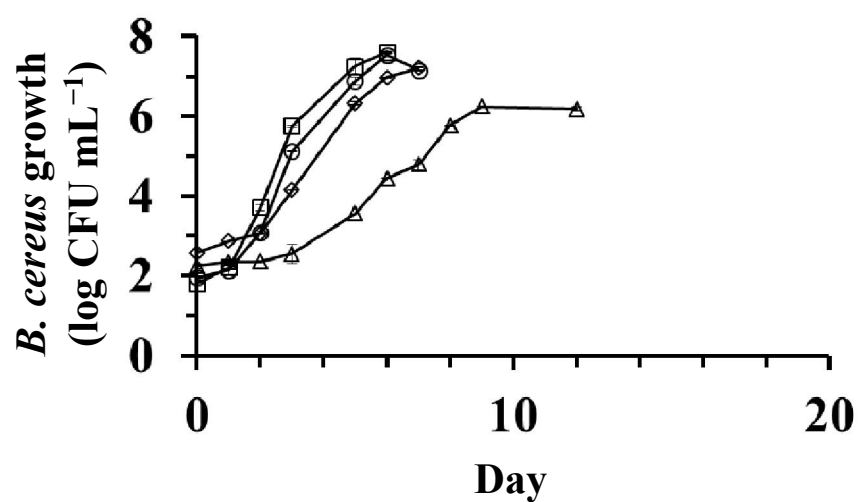


Fig. 5. Growth curves of heat-labile *Bacillus cereus* BCC1, BCC2, BCM4, and BCM5 at 10 °C in UHT milk under post-pasteurization contamination conditions. Spores were heated for spore activation at 80 °C for 10 min and inoculated into UHT milk. All strains were isolated from raw milk and showed more than 5 log reductions at 100 °C for 5 min. Strains: BCC1 (○), BCC2 (□), BCM4 (Δ), and BCM5 (◇).

第五章 リアルタイム PCR による乳製品中の *Anoxybacillus flavithermus* および *Geobacillus stearothermophilus* 芽胞の種特異的計測法

【本章の内容は *International Dairy Journal*, 93, 15–21 (2019) に掲載済みである】

第一節 緒言

高温性芽胞菌は約 40–70 °C の範囲に至適増殖温度を有する菌で、粉乳などの乳製品から分離される^{10, 65, 90)}。高温性芽胞菌は偏性好熱菌 (obligate thermophiles) と通性好熱菌 (facultative thermophiles) の二つのグループに分類される¹⁰⁾。偏性好熱菌はおよそ 40–70 °C の温度帯でのみ増殖する菌で、*Anoxybacillus flavithermus* や *Geobacillus stearothermophilus* などが含まれる^{23, 82, 90)}。

通性好熱菌は株により中温、高温の両方で増殖する菌で、*Bacillus licheniformis*、*Bacillus coagulans*、*Bacillus subtilis* などが含まれる^{23, 82)}。通常、高温性芽胞菌は生乳中には少ない (10 spores mL⁻¹ 以下)⁶¹⁾ が、粉乳製造においては長時間運転中に製造ラインで増殖し、最終製品を大量に (10⁴ spores g⁻¹ 以上) 汚染することがある。特に予備加熱温度の高い粉乳の製造において、偏性好熱菌は約 16 時間の連続運転中に増殖しやすく、最終的には *A. flavithermus* と *G. stearothermophilus* のみが主要菌叢となる。偏性好熱菌は非病原性であるが、工場の衛生性の一般的指標と考えられている。

A. flavithermus と *G. stearothermophilus* はステンレス表面に容易にバイオフィームを形成することが実験室レベルでの実験で示されている^{9, 21)}。これらの菌種は乳製品製造工場の 40–65 °C の温度帯でバイオフィームを形成すると考えられ

ており、この温度帯の工程には粉乳製造における予備加熱前のクリーム分離工程、予備加熱工程や濃縮工程などが含まれる¹⁰⁾。Scott ら⁹⁰⁾ は、全粉乳製造ラインにおいて、予備加熱工程では *A. flavithermus* が優勢であるが、濃縮工程では *Geobacillus* 属と *A. flavithermus* が混在することを報告している。しかし、乳製品製造中、いつ、どこでバイオフィーム形成、芽胞形成が発生するかに関する情報は少ない。Burgess ら¹⁰⁾ は、乳製品製造ライン中でのバイオフィーム形成、およびこれに関連した芽胞形成をより深く把握することが、より効果的な制御方法の開発に必要であると述べている。

A. flavithermus と *G. stearothermophilus* は耐熱性や増殖温度が異なることが知られている¹⁰⁹⁾。そのため、これらの菌種は製造ラインの異なる場所にバイオフィームを形成する傾向にあり、工場の衛生性をより良く管理するには菌種を区別することが重要である。しかし、伝統的な培養法で同定するには労力がかかり、時間を要する。

一般的な高温性芽胞菌の迅速定量法としては、Rueckert ら⁸⁵⁻⁸⁷⁾ が開発したりアルタイム PCR 分析法がある。これらの方法では DNase I により栄養細胞由来の DNA を分解することで、栄養細胞と芽胞を別々に定量することができる。彼らの方法は 16S rDNA および stage 0 sporulation protein A 遺伝子 (*spo0A*) をターゲットとした分析法であり、1-1.5 時間で粉乳中の高温性芽胞菌の栄養細胞と芽胞を別々に定量することができる。しかし、16S rDNA を標的とした分析法では、高温性芽胞菌の種間でコピー数が変動するため定量性に欠けること、*spo0A* を標的とした分析法では、*Bacillus cereus* などの *Bacillus* 属も DNA が増幅されるため、検出感度や特異性が十分でないことを Burgess ら¹⁰⁾ は指摘している。Rueckert ら⁸⁷⁾ の *spo0A* を標的とした定量法は縮重プライマーを用いて広く高温性芽胞菌を定量する方法であり、粉乳の汚染菌である *A. flavithermus* や *G.*

stearothermophilus を特異的に定量する方法ではない。また、これら 2 菌種を特異的に定量する方法は今のところ報告されていない。

A. flavithermus や *G. stearothermophilus* が殺菌工程前の製造ラインで増殖した場合、栄養細胞は殺菌され、最終製品には芽胞のみが存在することとなる。一方、殺菌工程後の製造ラインで増殖した場合、栄養細胞と芽胞の両方が存在することとなる。栄養細胞は増殖温度帯より低い温度では徐々に減少することが知られている²⁹⁾。また、粉乳などの原料乳製品中に大量の芽胞が存在することは、これらの原料を用いて製造された最終製品の衛生性を脅かすことにつながる。したがって、実用的な衛生管理においては、芽胞のみを高感度に測定することがより重要となる。製品中に残存する栄養細胞は 80 °C 10 分の加熱処理で容易に殺菌することができるが、PCR による検出法では死菌と芽胞の DNA を区別することができない。死菌の DNA は、エチジウムモノアジド (EMA) やプロピジウムモノアジド (PMA) などの DNA インターカレート色素を用いることで不活性化することができる^{71,80)}。これらの色素は選択的に死菌に浸透し、DNA を不活性化する。その他の方法として、死菌の DNA を分解する DNase I が利用されている⁸⁶⁾。

本章では、EMA 処理を用いて、乳、脱脂乳、クリームなどの乳製品中の *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* の芽胞のみを特異的かつ高感度で定量する SYBR Green I を用いた実用的なリアルタイム PCR 分析法を開発したので、その結果を記載する。

第二節 材料および方法

1. 供試菌株

本章で使用した菌株を Table 12 に示す。これらの株はアメリカン・タイプ・カ

ルチャー・コレクション (American Type Culture Collection; ATCC)、発酵研究所 (Institute for Fermentation, Culture Collection of Microorganisms; IFO)、理化学研究所微生物材料開発室 (Japan Collection of Microorganisms; JCM) より購入した株、あるいは筆者が生乳や乳製品から分離・同定した株である。筆者が分離・同定した株は RAPD 法⁸²⁾によりそれぞれ異なる株であることを確認している (データ示さず)。すべての菌株はグリセロールストック (15%、v/v) として、-80 °C にて保存した。

2. 菌株培養液調製

Table 12 に示す高温性芽胞菌の培養液は、サーモファイルブロス [1L 中の組成：トリプトン (Becton, Dickinson and Company 社) 5 g、酵母エキス (Becton, Dickinson and Company 社) 5 g、溶性デンプン (和光純薬社) 10 g、K₂HPO₄ 1 g、FeSO₄·7H₂O 10 mg、MgSO₄·7H₂O 20 mg、NaOH にて pH 7.5 に調整] 5 mL にグリセロールストックを一白金耳接種し、55 °C で一晩培養して調製した。Table 12 に示す中温性 *Bacillus* 属、生乳常在菌、およびグラム陰性菌の培養液は、ニュートリエントブロス (Bectone, Dickinson and Company 社) 5 mL に同様にグリセロールストックを一白金耳接種し、30 °C で一晩培養して調製した。

3. 芽胞懸濁液調製

A. flavithermus AF1 および *G. stearothermophilus* ATCC 12980 の芽胞懸濁液は次のように調製した。第五章第二節 2 項に記載した方法で調製した菌株培養液を改良トリプトン-酵母エキス寒天 [1L 中の組成：トリプトン (Becton, Dickinson and Company 社) 10 g、酵母エキス (Becton, Dickinson and Company 社) 2 g、MnCl₂·4H₂O 25 mg、MgSO₄·7H₂O 250 mg、FeSO₄·7H₂O 300 µg、CaCl₂·2H₂O 150 mg、

寒天 15 g、NaOH にて pH 7.0 に調整] 平板に表面塗抹し、55 °C 14 日間培養した。平板培地表面に生じた菌体を芽胞として回収し、10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.8) にて 5,000× g で 4 °C 10 分間の遠心により 2 回洗浄した。洗浄した芽胞ペレットを同緩衝液 9.5 mL に懸濁し、残存する細胞を溶解するために 10% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 0.5 mL、プロテイナーゼ K (> 600 mAU mL⁻¹; QIAGEN 社) 100 µL を添加して、37 °C で一晩保持した。100 °C 8 分の加熱処理でプロテイナーゼ K を失活させ、遠心後の芽胞ペレットを 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.8) 1.8 mL に懸濁し、栄養細胞由来の DNA を分解するため DNase I (10 U µL⁻¹、Roche Diagnostics 社) 20 µL、incubation buffer (Roche Diagnostics 社) 200 µL を添加し、37 °C で 15 分間保持した。80 °C 10 分の加熱処理で DNase I を失活させ、遠心後の芽胞ペレットを 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.8) にて 2 回洗浄した。洗浄した芽胞ペレットを同緩衝液 10 mL に懸濁し、芽胞懸濁液とした。芽胞懸濁液は使用するまで -20 °C にて保存した。

4. 菌数および芽胞数測定

A. flavithermus AF1 および *G. stearothermophilus* ATCC 12980 の培養液の菌数、および芽胞懸濁液の芽胞数は、サーモファイル寒天培地 (サーモファイルブロスに寒天 15g L⁻¹ 添加) へ混釈し、55 °C で 2 日間培養して測定した。

5. 特異性試験用の DNA の抽出

標的株あるいはネガティブコントロール株の培養菌体からの DNA の抽出は InstaGene Matrix Kit (Bio-Rad Laboratories 社) を用い、メーカーの使用説明に従って実施した。抽出した DNA は NanoDrop ND-1000 (Nano-Drop Technologies 社) を用いて濃度を測定し、特異性試験に用いた。

6. 芽胞懸濁液からの検出感度および定量性試験用の標準 DNA の抽出

芽胞定量用の標準 DNA はビーズ破砕法により、*A. flavithermus* AF1 は 5.9×10^1 – 1.2×10^6 spores mL⁻¹、*G. stearothermophilus* ATCC 12980 は 6.4×10^1 – 1.3×10^6 spores mL⁻¹ の芽胞懸濁液から調製した。芽胞懸濁液 1 mL を遠心して得られるペレットをトリス-EDTA 緩衝液 (TE) 200 μL に懸濁し、0.2–0.3 g のジルコニアシリカビーズ (直径 0.2 mm; バイオメディカルサイエンス社) を添加した 2.0 mL チューブ (マスターチューブハード; バイオメディカルサイエンス社) に全量移し、ボルテックスミキサー (Delta Mixer Se-04; タイテック社) にて 5 分間ボルテックス処理した。13,000×g で 3 分遠心後の上清を芽胞定量用の標準 DNA として用いた。

7. プライマー設計

GenBank より *A. flavithermus* isolate B (アクセッション番号: AY672767.1)⁸⁷⁾ および *G. stearothermophilus* BB4419 (アクセッション番号: U09977.1)⁸⁾ の *spo0A* の部分塩基配列を入手した。これらの塩基配列をテンプレートとし、NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて、増幅産物サイズ 80–150 塩基、プライマーサイズ 17–25 塩基、GC 含量 40–60%となる条件で、*A. flavithermus*、*G. stearothermophilus* にそれぞれ特異的なプライマー対を設計した。それぞれの増幅産物のサイズは 135 塩基、140 塩基であった。*A. flavithermus* 特異的プライマー対および *G. stearothermophilus* 特異的プライマー対の塩基配列を以下に示す。

A. flavithermus 特異的プライマー対

AF-F1 (フォワードプライマー) : 5'-ACATTACAAGCCAAGGAGATATGG-3'

AF-R1 (リバースプライマー) : 5'-CAGCCAAGCCGTCTAAATGC-3'

G. stearothermophilus 特異的プライマー対

GS-F2 (フォワードプライマー) : 5'-ACGCCGGTTGTGAGGAAAGC-3'

GS-R2 (リバースプライマー) : 5'-GCCTCGCGCAAATACAAATAGC-3'

8. リアルタイム PCR 分析

リアルタイム PCR 分析は LightCycler DX-400 (Roche Diagnostics 社) を用いて実施した。反応溶液 20 μL 中の組成は、FastStart DNA Master PLUS SYBR Green I Master Mix (Roche Diagnostics 社) 4 μL 、フォワードおよびリバースプライマー (10 μM) 各 1 μL 、テンプレート DNA 5 μL 、滅菌水 (PCR グレード) 9 μL とした。

リアルタイム PCR の条件は 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 分の初期変性の後、95 $^{\circ}\text{C}$ 10 秒、65 $^{\circ}\text{C}$ 10 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ 6 秒の増幅反応を 50 サイクル行なった。増幅後、リアルタイム PCR 分析で単一かつ特異的産物が得られていることを確認するため、融解曲線分析を実施した。増幅産物を 70 $^{\circ}\text{C}$ に冷却し、0.1 $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ の速度で 97 $^{\circ}\text{C}$ に加熱した。分析中、蛍光シグナルを連続的にモニターし、得られる融解温度 (T_m) から特異性を確認した。

9. 特異性試験

設計したプライマー対の特異性は、標的株あるいはネガティブコントロール株の培養菌体から抽出した DNA を使い、エンドポイント PCR/リアルタイム PCR 分析により確認した。テンプレート DNA の濃度はリアルタイム PCR における標的株のみ 2 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ とし、ネガティブコントロール株については 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ を

使用した。

10. 検出感度および定量性試験

リアルタイム PCR 分析の検出感度および定量性試験は、*A. flavithermus* AF1 および *G. stearothermophilus* ATCC 12980 の芽胞懸濁液から抽出した標準 DNA を用いて実施した。標準 DNA を用いてリアルタイム PCR を 3 連で行ない、threshold cycle (C_t 値) を 1 mL あたりの芽胞数の対数に対してプロットして検量線を作成した。増幅効率 (E) は 次式より算出した。 E 値は 0.8–1.2 が適正值とされている。

$$E = 10^{(-1 / \text{検量線の傾き})} - 1$$

11. 乳、10%還元脱脂乳、クリームの DNA 抽出前の処理

乳製品中には様々な PCR 抑制物質が含まれており^{62, 95, 106)}、特にクリームでは PCR 分析で定量性が悪くなる。乳、脱脂乳、クリームの DNA 抽出前の処理は Rueckert ら⁸⁵⁾の方法を一部改良して実施した。方法を簡潔に述べる。サンプル 1 mL にタンパク質可溶化剤として 1.2 M クエン酸三ナトリウムを 200 μ L 添加し、良く混合した。20,000 $\times g$ で 5 分遠心後のペレットを滅菌水 1 mL に懸濁し、1.2 M クエン酸三ナトリウム 200 μ L、脂肪可溶化剤として n-デカン 200 μ L を添加して良く混合し、20,000 $\times g$ で 5 分遠心した。乳、脱脂乳から得られたペレットを滅菌水 200 μ L に再懸濁し、20,000 $\times g$ で 5 分遠心した。クリームの前処理では、上述のクエン酸三ナトリウム、n-デカン処理後のペレットを滅菌水 200 μ L に再懸濁し、残存する増幅抑制物質を溶解するためにプロテイナーゼ K 20 μ L を添加し、56 $^{\circ}\text{C}$ 5 分保持した。その後、95 $^{\circ}\text{C}$ 5 分保持してプロテイナーゼ K を

失活させ、 $20,000\times g$ で 5 分遠心し、芽胞および死菌を含むペレットを得た。

1 2. EMA 処理

乳製品から DNA を抽出すると、芽胞、栄養細胞の両方から DNA が抽出される。したがって、実際にリアルタイム PCR により芽胞のみを測定するためには、DNA 抽出前に栄養細胞の DNA を不活性化する必要がある。そこで、栄養細胞の DNA を不活性化するのに EMA を用いた。EMA は損傷した細胞膜から栄養細胞に侵入し、光により活性化して DNA と共有結合する。EMA と結合した DNA は増幅されない。乳、脱脂乳、クリーム の 1 mL サンプルから第五章第二節 11 項に記載した方法で調製したペレットを滅菌水 45 μL に懸濁した。懸濁液に氷上で EMA (1 mg mL^{-1} ; Sigma-Aldrich 社) を 5 μL 添加し、暗所で 5 分保持し、LED ライト [LDA7LA1 (450 nm、6.9 W); パナソニック社] を 2 cm の高さから 5 分照射した。その後、 $20,000\times g$ で 5 分遠心してペレットを回収した。この操作を 3 回繰り返した。なお、最終の LED ライトの照射は 15 分行なった。 $20,000\times g$ で 5 分遠心後、ペレットを TE 200 μL で 1 回洗浄し、同緩衝液 200 μL に懸濁した。

1 3. 前処理サンプルあるいは EMA 処理サンプルにおける芽胞からの DNA の抽出

前処理サンプルあるいは EMA 処理サンプルにおける芽胞からの DNA の抽出は、第五章第二節 6 項に記載したビーズ破碎法により実施した。抽出した DNA はリアルタイム PCR 分析に用いた。

1 4. プロテイナーゼ K 処理によるクリームの C_t 値への影響調査

プロテイナーゼ K 処理によるクリームの C_t 値への影響調査では、乳およびク

リームに *A. flavithermus* AF1 カルチャーを 2.0×10^2 cells mL⁻¹ となるように接種したサンプルを調製した。クリームサンプルについては、第五章第二節 11 項に記載した前処理をプロテイナーゼ K 処理あり、なしで行なった。乳サンプルについてはプロテイナーゼ K 処理なしで前処理を行なった。前処理後、InstaGene Matrix Kit による DNA 抽出、リアルタイム PCR 分析を実施し、得られた C_t 値を 2 連で比較した。芽胞の定量性への前処理の影響調査では、*A. flavithermus* AF1 および *G. stearothermophilus* ATCC 12980 の芽胞懸濁液を 10^2 – 10^4 spores mL⁻¹ となるように乳、脱脂乳、クリームに接種し、前処理、DNA 抽出、リアルタイム PCR による定量を 3 連で行なった。

1 5. EMA 処理による芽胞の特異的定量における効果試験

EMA による死菌の抑制効果を調査するため、第五章第二節 2 項に記載した方法で *A. flavithermus* AF1 および *G. stearothermophilus* ATCC 12980 を培養し、80 °C 10 分処理して死菌を調製し、 10^4 – 10^6 cells mL⁻¹ となるように滅菌水に添加した。これら接種混合物 1 mL について第五章第二節 12 項に記載した EMA 処理を行なった後、DNA 抽出、リアルタイム PCR 分析を行なった。

1 6. 芽胞および死菌をスパイクしたサンプルの芽胞定量試験

乳、脱脂乳、クリームに *A. flavithermus* AF1 あるいは *G. stearothermophilus* ATCC 12980 の死菌を約 10^4 cells mL⁻¹、芽胞を 10^2 – 10^4 spores mL⁻¹ となるようにそれぞれ接種した。各サンプル 1 mL について前処理、EMA 処理、DNA 抽出、リアルタイム PCR 分析による定量を 3 連で行なった。

第三節 結果

1. プライマーの特異性

新たに設計した AF-F1/AF-R1 および GS-F2/GS-R2 プライマー対の特異性は、エンドポイント PCR およびリアルタイム PCR により確認した。結果を Table 12 に示す。高温性芽胞菌 17 株、中温性 *Bacillus* 属 3 株、生乳常在菌 3 株、グラム陰性菌 5 株を用いたエンドポイント PCR 分析では、AF-F1/R1 プライマー対においては 5 株すべての *A. flavithermus* のみ 135 塩基の増幅産物が認められた。同様に、GS-F2/R2 プライマー対においては 5 株すべての *G. stearothermophilus* のみ 140 塩基の増幅産物が認められた。

高温性芽胞菌 11 株、生乳常在菌 2 株、グラム陰性菌 3 株を用いたリアルタイム PCR 分析では、AF-F1/AF-R1 プライマー対においては 5 株すべての *A. flavithermus* のみ増幅が認められ、 C_t 値、 T_m の平均 ($\pm$ SD) はそれぞれ 16.89 ± 0.77 、 83.95 ± 0.01 °C であった。同様に、GS-F2/R2 プライマー対では 5 株すべての *G. stearothermophilus* のみ増幅が認められ、 C_t 値、 T_m の平均はそれぞれ 16.06 ± 0.43 、 87.63 ± 0.02 °C であった。したがって、AF-F1/AF-R1 および GS-F2/GS-R2 プライマー対は *A. flavithermus*、*G. stearothermophilus* にそれぞれ特異的であることが示された。

2. リアルタイム PCR の検出感度および定量性

リアルタイム PCR の検出感度および定量性を確認するため、*A. flavithermus* AF1 および *G. stearothermophilus* ATCC 12980 の芽胞懸濁液についてリアルタイム PCR 分析を行ない、得られた C_t 値を 1 mL あたりの芽胞数の対数に対してプロットして検量線を作成した (Fig. 6)。*A. flavithermus* AF1 芽胞の検量線は $C_t = -3.75 \log(\text{spores mL}^{-1}) + 43.39$ で、 5.9×10^1 – 1.2×10^6 spores mL⁻¹ の範囲で直線が得られた ($r^2 = 0.99$ 、 $E = 0.85$)。同様に、*G. stearothermophilus* ATCC 12980 芽胞

の検量線は $C_t = -3.70 \log(\text{spores mL}^{-1}) + 39.34$ で、 $6.4 \times 10^1 - 1.3 \times 10^6 \text{ spores mL}^{-1}$ の範囲で直線が得られた($r^2 = 0.99$ 、 $E = 0.86$)。

3. プロテイナーゼ K 処理によるクリーム の C_t 値への影響

Rueckert ら⁸⁵⁾ が全粉乳や脱脂粉乳に用いた DNA 抽出前の処理方法は迅速で簡便な方法ではあったが、大量の増幅抑制物質を含むクリームには適用できなかった。そのため、彼らの方法について改良を行なった。

A. flavithermus AF1 を接種した乳およびクリームをクエン酸三ナトリウム、n-デカンで前処理し、DNA 抽出、リアルタイム PCR 分析を行なった結果、乳に比べ、クリームでは沈殿物が多く見られ、リアルタイム PCR 分析において C_t 値が約 4 サイクル遅かった (Table 13)。クリームの沈殿物は主にタンパク質と考えられたため、クリームにおいてはクエン酸三ナトリウム、n-デカンによる処理後にプロテイナーゼ K 処理を適用した。この処理により、沈殿物はほとんど除去され、クリームの C_t 値は乳の値と同等となった (Table 13)。

この前処理が芽胞の定量性に与える影響を考察するため、*A. flavithermus* AF1 あるいは *G. stearothermophilus* ATCC 12980 の芽胞を乳、脱脂乳、クリームに接種し、リアルタイム PCR 分析による芽胞の定量を行なった。その結果、接種した芽胞数とリアルタイム PCR 分析で得られた芽胞数の差は $-0.33 \sim 0.25 \log(\text{spores mL}^{-1})$ の範囲にあり (Table 14)、十分定量性があることが示された。

4. EMA 処理による芽胞の特異的定量における効果

EMA による死菌由来の DNA の不活性化を評価するため、*A. flavithermus* AF1 あるいは *G. stearothermophilus* ATCC 12980 の死菌を $10^4 - 10^6 \text{ cells mL}^{-1}$ 含む滅菌水について EMA 処理を行ない、DNA 抽出、リアルタイム PCR 分析を行なった。

その結果、*A. flavithermus* AF1 においては、 10^4 – 10^5 cells mL⁻¹ の死菌を含む細胞懸濁液では増幅が認められなかったが、 10^6 cells mL⁻¹ の死菌を含む細胞懸濁液で増幅が認められた。一方、*G. stearothermophilus* ATCC 12980 においては、 10^4 – 10^6 cells mL⁻¹ の死菌を含む細胞懸濁液で増幅が認められなかった。したがって、EMA 処理により、*A. flavithermus* AF1 では 10^5 cells mL⁻¹、*G. stearothermophilus* ATCC 12980 では 10^6 cells mL⁻¹ の死菌由来の DNA を不活性化できることが示された。

5. 芽胞および死菌をスパイクしたサンプルの芽胞定量

実際の乳製品には芽胞および死菌が含まれていることを想定して、乳、脱脂乳、クリームに *A. flavithermus* AF1 あるいは *G. stearothermophilus* ATCC 12980 の死菌を約 10^4 cells mL⁻¹、芽胞を 10^2 – 10^4 spores mL⁻¹ の異なる濃度で接種し、リアルタイム PCR 分析により芽胞のみを定量した。その結果、接種した芽胞数とリアルタイム PCR 分析で得られた芽胞数の差は $-0.46 \sim 0.23 \log (\text{spores mL}^{-1})$ の範囲にあり (Table 15)、これらのサンプル中の芽胞のみを十分定量できることが示された。

第四節 考察

本章において、乳製品中の *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* の芽胞のみを測定する実用的な方法を確認した。本分析法のフローダイアグラムを Fig. 7 にまとめた。

筆者は、*A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* にそれぞれに特異的なプライマー対を *spo0A* の塩基配列から設計し、SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR 分析法を開発した。本分析法は EMA 処理を適用することで乳製品中の芽胞のみを高感度で定量することができた。本分析法では、乳製品中の芽胞を

2.5 時間以内で定量することができる。

予備試験において、16S rDNA を標的としてリアルタイム PCR 分析に用いるプライマー対を設計したが、十分な特異性を得ることはできなかった (データ示さず)。そこで、芽胞菌に広く分布している *spo0A* を標的としてプライマー対を設計した。*spo0A* には良く保存された領域と変化に富んだ領域が存在する¹⁰⁸⁾。また、Kuisiene ら⁴⁸⁾ は *Geobacillus* 属における *spo0A* の可変性を調査し、*spo0A* による *Geobacillus* 属の種間識別を評価した結果、*Geobacillus* 属の *spo0A* の塩基配列の種間比較により、*G. stearothermophilus* が識別できることを報告している。これらの点から、*spo0A* が *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* をそれぞれ特異的に定量できるマーカーとして期待された。

筆者のプライマー対は、*G. stearothermophilus* isolate A の *spo0A* のアミノ酸配列番号 (GenBank、アクセッション番号：AY672766.1)⁸⁷⁾ を基準として、AF-F1/AF-R1 プライマー対では 22-28 番目 (フォワードプライマー) および 60-65 番目 (リバースプライマー)、GS-F2/GS-R2 プライマー対では 125-130 番目 (フォワードプライマー) および 165-170 番目 (リバースプライマー) にそれぞれ対合する。*Bacillus* 属の DNA を増幅する Rueckert ら⁸⁷⁾ の方法とは異なり、筆者のプライマー対は、*A. flavithermus*、*G. stearothermophilus* の DNA をそれぞれ特異的に増幅することで、乳製品中のこれらの主要な高温性芽胞菌を区別して定量することを可能にしている。

クリームからの DNA 抽出に関しては、SDS や臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) を用いて抽出する方法が報告されている^{73,74)}。しかし、いずれも高純度 DNA を得るためにフェノール/クロロホルム処理やエタノール沈殿の操作が含まれるため、操作が煩雑となり、時間を要する。筆者の方法では、プロテイナーゼ K 処理が PCR 抑制物質を容易にかつ効率よく除去できることが明らか

となった。

乳製品中には、死菌由来の DNA が大量に含まれていることが予想される。本試験では芽胞のみを定量するために、EMA を用いて死菌由来の DNA を不活性化した。EMA の不活性化効果は十分であったが、EMA 処理操作に時間を要した。EMA 以外の方法としては DNase I や PMA を用いる方法がある。しかしながら、予備試験では DNase I では十分な不活性化効果は得られなかった。本分析法に要する時間を短縮するには、これらの試薬の処理条件を最適化するなど、更なる調査が必要であろう。

本分析法は乳製品製造ラインにおける *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* の芽胞形成を調査するための手段を提供し、乳製品工場における衛生管理に応用できることが期待される。

第五節 小括

高温性芽胞菌である *Anoxybacillus flavithermus* および *Geobacillus stearothermophilus* は、特に粉乳製造ラインで容易に増殖するため、工場の衛生管理上重要な菌種である。しかし、これら 2 菌種を特異的かつ迅速に定量する方法は今のところ報告されていない。そこで、乳製品中の *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* の芽胞を測定する SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR 分析法の開発を検討した。*spo0A* の塩基配列からそれぞれの菌種に特異的なプライマー対を新たに設計し、EMA 処理により、栄養細胞由来の DNA の増幅を抑制し、芽胞のみを定量することができた。また、タンパク質含量が高い乳製品においては、プロテイナーゼ K 処理を行なうことで芽胞を精度よく定量することができた。本分析法は定量能力に優れており、芽胞数と高い直線性 ($r^2 = 0.99$)、広い定量範囲 ($10^1 - 10^6$ spores mL⁻¹) を有していた。本分析法は乳、脱脂乳、クリ

ーム中の芽胞の定量に適用可能で、乳製品中の芽胞を 2.5 時間以内に定量することができる。本分析法は乳製品製造ラインにおける *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* の芽胞形成を調査するための手段を提供し、乳製品工場における衛生管理に応用できることが期待される。

Table 12. Bacterial strains used in this study and the results of primer specificity tests.^a

Species	Strain	Specificity test results			
		AF-F1/AF-R1 primers for <i>A. flavithermus</i>		GS-F2/GS-R2 primers for <i>G. stearothermophilus</i>	
		EP-PCR	RT-PCR	EP-PCR	RT-PCR
Thermophilic spore-forming bacteria					
Obligate thermophiles					
<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	AF1	+	+	—	—
	AF2	+	+	—	—
	AF3	+	+	—	—
	AF4	+	+	—	—
	AF5	+	+	—	—
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 12980	—	—	+	+
	GS1	—	—	+	+
	GS2	—	—	+	+
	GS3	—	—	+	+
	GS4	—	—	+	+
<i>Geobacillus thermoamylovorans</i>	GT1	—	NT	—	NT
Facultative thermophiles					
<i>Bacillus licheniformis</i>	BL1	—	—	—	—
	BL2	—	NT	—	NT
	BL3	—	NT	—	NT
	BL4	—	NT	—	NT
	BL5	—	NT	—	NT
<i>Bacillus subtilis</i>	BS1	—	NT	—	NT
Mesophilic <i>Bacillus</i> spp.					
<i>Bacillus cereus</i>	BC1	—	NT	—	NT
<i>Bacillus megaterium</i>	JCM 2506	—	NT	—	NT
<i>Bacillus pumilus</i>	BP1	—	NT	—	NT
Raw-milk flora					
<i>Microbacterium lacticum</i>	JCM 1379	—	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12600	—	—	—	—
<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 4698	—	NT	—	NT
Gram-negative bacteria					
<i>Escherichia coli</i>	IFO 15034	—	—	—	—
<i>Enterobacter cloacae</i>	IFO 13535	—	NT	—	NT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 10145	—	NT	—	NT
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525	—	—	—	—
<i>Acinetobacter baumannii</i>	JCM 6841	—	—	—	—

^a Abbreviations are: ATCC, American Type Culture Collection; IFO, Institute for Fermentation, Culture Collection of Microorganisms, Osaka; JCM, Japan Collection of Microorganisms (all other strains were isolated from milk products and identified in our laboratory; EP-PCR, end-point PCR; RT-PCR, real-time PCR; +, positive; –, negative; NT, not tested. Template DNA concentration was 2 ng μL^{-1} for target strains and 10 ng μL^{-1} for negative control strains.

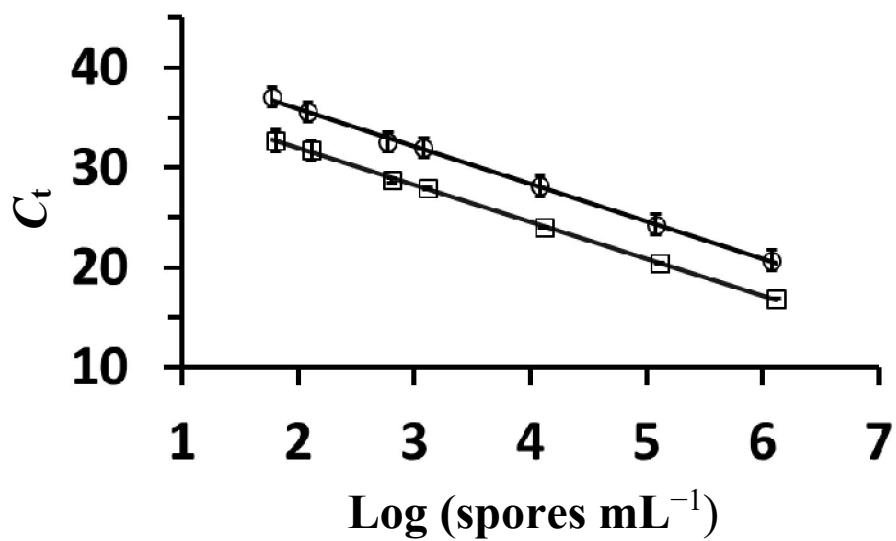


Fig. 6. Standard curves for quantifying *Anoxybacillus flavithermus* AF1 (○) and *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 (□) spores by real-time PCR assay. Spore suspensions containing 10^1 – 10^6 spores mL⁻¹ were subjected to DNA extraction using zirconium-silica beads, and the PCR reactions were performed in triplicate. Error bars indicate standard deviations for triplicate tests.

Table 13. Influence of proteinase K treatment on C_t values from milk and cream.^a

Milk (-)	Cream (-)	Cream (+)
35.74	39.99	35.09

^a All samples were spiked with *Anoxybacillus flavithermus* AF1 cells at log (cells mL⁻¹) = 2.30. Values are the mean of duplicate C_t values from real-time PCR assay; (+), with proteinase K treatment; (-), without proteinase K treatment.

Table 14. Quantification of spores of *Anoxybacillus flavithermus* AF1 and *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 in artificially spiked milk, skimmed milk, or cream using real-time PCR assay.^a

Inoculated conc. [log (spores mL ⁻¹)]	Spore numbers ± SD [log (spores mL ⁻¹)]		
	Milk	Skimmed milk	Cream
<i>A. flavithermus</i> AF1			
4.38	4.39 ± 0.08	4.16 ± 0.11	4.05 ± 0.08
3.38	3.44 ± 0.05	3.40 ± 0.06	3.29 ± 0.04
2.38	2.35 ± 0.22	2.48 ± 0.07	2.32 ± 0.10
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980			
4.41	4.62 ± 0.03	4.66 ± 0.01	4.33 ± 0.28
3.41	3.64 ± 0.02	3.64 ± 0.03	3.41 ± 0.03
2.41	2.26 ± 0.06	2.40 ± 0.16	2.19 ± 0.19

^a Milk and skimmed milk were pretreated with trisodium citrate and n-decane. Cream received additional pretreatment with proteinase K. Values are the mean of triplicate spore numbers ± standard deviation.

Table 15. Quantification of spores of *Anoxybacillus flavithermus* AF1 and *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 12980 in artificially spiked milk, skimmed milk, or cream using real-time PCR assay with ethidium monoazide (EMA) treatment.^a

Inoculated conc. [log (spores mL ⁻¹)]	Spore numbers ± SD [log (spores mL ⁻¹)]		
	Milk	Skimmed milk	Cream
<i>A. flavithermus</i> AF1			
4.59	4.26 ± 0.19	4.49 ± 0.27	4.26 ± 0.09
3.59	3.36 ± 0.26	3.54 ± 0.05	3.32 ± 0.25
2.59	2.35 ± 0.00	2.55 ± 0.08	2.80 ± 0.20
<i>G. stearothermophilus</i> ATCC 12980			
4.59	4.55 ± 0.24	4.66 ± 0.05	4.18 ± 0.18
3.59	3.68 ± 0.04	3.82 ± 0.03	3.13 ± 0.06
2.59	2.42 ± 0.17	2.65 ± 0.20	2.13 ± 0.05

^a Milk, skimmed milk, and cream were spiked with both dead cells and spores of *A. flavithermus* AF1 or *G. stearothermophilus* ATCC 12980 to a concentration of approximately 10⁴ dead cells mL⁻¹ and 10² to 10⁴ spores mL⁻¹, respectively. Values are the mean of triplicate spore numbers ± standard deviation.

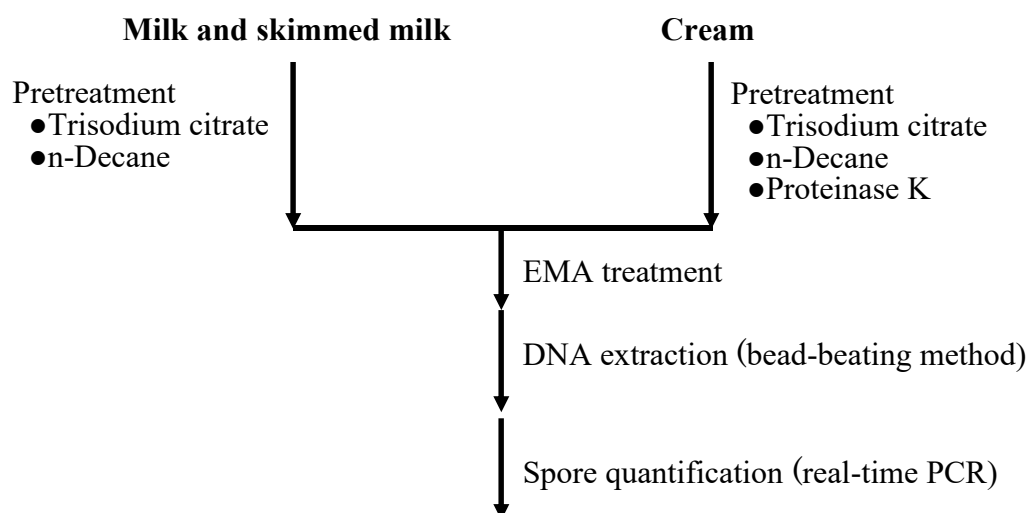


Fig. 7. Flow diagram of our method for the practical quantification of only spores in milk, skimmed milk, and cream. EMA, ethidium monoazide.

第六章 総括

第一節 緒言

芽胞菌は耐熱性を有する芽胞を形成するため、殺菌条件によっては不活性化されず、乳・乳製品に残存する可能性がある。牛乳などチルド流通する製品では、10℃以下でも増殖可能な低温性芽胞菌が残存すると、流通中に増殖し、風味異常や腐敗を引き起こす可能性がある。特に、殺菌温度の低い HTST 牛乳の品質は、生乳の微生物学的品質に大きく影響される。主要な低温性芽胞菌は *Paenibacillus* 属や *Bacillus cereus* であり、これらの菌は生乳中には少ないとされている。しかし、日本において生乳中の芽胞数レベルの報告はなく、生乳の品質管理に重要な基礎データがないことが課題であった。*Paenibacillus* 属においては世界的にも精度の良い測定方法も開発されていない。

また、日本で用いられる主要な UHT 牛乳の殺菌条件では、*Paenibacillus* 属は不活性化されるが、*B. cereus* は耐熱性の高い株の存在が報告されており、HTST 牛乳同様、品質劣化を招く恐れがあるにもかかわらず、UHT 牛乳は安定的に販売されている実績があり、安全であると考えられている。しかし、これを裏付ける科学的根拠は皆無である。

粉乳においては、高温性芽胞菌である *Anoxybacillus flavithermus* と *Geobacillus stearothermophilus* が製造中にラインで増殖し、最終製品を汚染する。工場の衛生管理を行なう上で、これら 2 菌種の芽胞を区別して精度よく迅速に測定する方法が望まれるが、今のところそのような測定方法が存在しない。

そこで筆者は、乳・乳製品の微生物学的品質の向上を目指し、乳・乳製品中の好気性芽胞菌に関して、これらの課題を解決すべく検討を行なった。その結果、 β -ガラクトシダーゼ活性と低温での培養を組み合わせることで、生乳中の

Paenibacillus 属芽胞を測定する簡便なメンブランフィルター法の開発に成功し、生乳中の芽胞数レベルを明らかにした (第二章)。 *B. cereus* については生乳中の芽胞数レベルを調査し、 *B. cereus* 芽胞数は夏、秋に有意に高いが、低温性株芽胞数は季節変動せず、北海道の生乳中の両芽胞数が低いレベルであることを明らかにし、生乳中の *B. cereus* は菌株多様性が高いことを見出した (第三章)。また、乳業環境中の高耐熱性 *B. cereus* の分布を網羅的に調査し、高耐熱性株は生乳からは検出されないが、牛乳製造環境に存在することを明らかにした。加えて、高耐熱性株は 10 °C 以下での流通中に増殖しないことを見出し、120 °C 2 秒殺菌の UHT 牛乳の微生物学的安全性が確保されていることを証明した (第四章)。 *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* については *spo0A* の塩基配列からそれぞれの菌種に特異的なプライマー対を設計し、EMA 処理を適用することで、乳・乳製品中の芽胞のみを定量する実用的なリアルタイム PCR 分析法を開発することに成功した。また、クリームではプロテイナーゼ K 処理を行なうことで増幅抑制物質を容易にかつ効率よく除去でき、芽胞を精度よく定量できることを見出した (第五章)。この章では、これらの結果に対する総合討論を記述する。

第二節 総合討論

乳・乳製品の微生物学的品質に影響を与える好気性芽胞菌は、牛乳などチルド製品における低温性芽胞菌、粉乳などの乳製品における高温性芽胞菌である。そこで、筆者はこれらの好気性芽胞菌に焦点を当て、乳・乳製品の微生物学的品質向上につながる技術開発、基礎的データの取得に取り組んだ。

HTST 牛乳においては、*Paenibacillus* 属および *B. cereus* が通常の平板法では初発菌数として検出されないレベルであったものが冷蔵流通中に増殖し、賞味期限末期に製品を腐敗させることがある。これらの芽胞は HTST 殺菌では不活性

化されないため、HTST 牛乳の微生物学的品質向上には、*Paenibacillus* 属および *B. cereus* の芽胞のできる限り少ない生乳を用いて製造することがポイントとなる。これらの菌が少ない生乳を選択したり、汚染源を特定して対策を取るためには、これら極めて低レベルにしか存在しない菌を正確に測定する方法が必須である。低レベルの芽胞を計測する方法として、メンブランフィルターで濾過濃縮してカウントする方法がある。*B. cereus* についてはメンブランフィルター法による測定方法が報告されてはいたものの、*Paenibacillus* 属については報告がないため、第二章において測定方法を検討し、*Paenibacillus* 属の芽胞を効率よく、選択的に測定できるメンブランフィルター法の開発に成功した。

本分析法は生乳の濾過までは *B. cereus* の測定法と同様であるので、培地と培養条件を変更するだけで、生乳中の *Paenibacillus* 属と *B. cereus* の両者の芽胞を測定できる点で優れている。上述したように、HTST 牛乳製造において、生乳の衛生管理が重要であるので、両芽胞菌を測定する技術が確立されたことは産業上大きな進展であると考ええる。

Paenibacillus 属の測定方法を確立したので、第二章ではその方法を用いて *Paenibacillus* 属、第三章ではすでに確立されているメンブランフィルター法を用いて *B. cereus* の生乳中の芽胞数レベルをそれぞれ調査した。その結果、北海道の生乳においては、両者ともにリッターあたり $1-10^2$ の芽胞数レベルであり、*Paenibacillus* 属は *B. cereus* と同レベル存在することが初めて明らかとなった。また、*B. cereus* についてはその低温性株についても調査し、両芽胞数ともに海外に比べて低いことを明らかにした。

日本において、食品の腐敗に関与する微生物の情報はメーカーが公開したがないため、このような基礎データが不足している。産学官で情報を共有し、協力し合いながら食品の微生物学的品質の向上に努めることこそが、日本の食の

安全を守ることにつながる。本基礎データは生乳の衛生管理の指標となるデータであり、酪農業界にとって非常に価値あるデータと考える。

また、*Paenibacillus* 属には β -ガラクトシダーゼ陰性の菌種も存在するが、生乳から低温培養により分離された β -ガラクトシダーゼ陰性菌には *Paenibacillus* 属が含まれていなかったことは興味深い。生乳中の糖質の 99.8%がラクトースであるため、生乳に存在する *Paenibacillus* 属菌叢はラクトース分解能を有する β -ガラクトシダーゼ陽性の菌種が優勢となっていると考えられる。

一方、日本の UHT 牛乳は、海外の常温流通する UHT 牛乳のような芽胞菌を完全に不活性化する殺菌条件では加熱臭が生じ、消費者に好まれないため、120–130 °C で 2 秒殺菌し、チルド流通する牛乳が一般的である。このような殺菌条件では *Paenibacillus* 属は不活性化されるが、*B. cereus* が不活性化されない可能性があり、HTST 牛乳同様、冷蔵流通中に風味異常を引き起こす恐れがある。*B. cereus* は全般的に耐熱性が低いが、その中でも UHT 殺菌で残存する高耐熱性株が存在することが知られている。このような高耐熱性株は弱い UHT 殺菌条件 (例えば 120 °C 2 秒) では残存する可能性があるので、第四章では 120 °C 2 秒殺菌で残存する可能性のある高耐熱性 *B. cereus* の分布から、120 °C 2 秒殺菌の UHT 牛乳の微生物学的安全性を評価した。その結果、このような高耐熱性株は原料には存在せず、牛乳製造環境に由来することを見出した。また、高耐熱性株は日本の流通温度である 10 °C では増殖しないことを示し、120 °C 2 秒殺菌の UHT 牛乳の微生物学的安全性を証明した。また、本章には記述しなかったが、増菌調査から 120 °C 2 秒殺菌 UHT 牛乳には *Bacillus licheniformis*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus sonorensis*、*Aneurinibacillus aneurinilyticus* など、*B. cereus* 以外の *Bacillus* 属が残存していた。しかし、これらの菌種はすべて 10 °C では増殖できず、120 °C 2 秒殺菌 UHT 牛乳の微生物学的安全性を脅かす存在ではなかった。

一般に、*B. cereus* は 10 °C で良好に増殖するが、他の残存する芽胞菌と同様に、高耐熱性株が 10 °C で増殖を示さなかったことは非常に興味深い。高耐熱性株は *B. cereus* の新種という可能性もあるが、筆者は生乳由来の株が変異したものと推測する。その理由としては、牛乳製造において *B. cereus* の供給源となりうるものは生乳のみであること、微生物はさまざまなストレスに対抗して容易に変異すること、一般的に生育至適温度が低い菌よりも高い菌の方が高い耐熱性を有することが挙げられる。筆者は、生乳に存在する株が、牛乳製造環境中に残存し、変異を続けて高耐熱性株となったが、生育温度が高温側に若干シフトし、10 °C で増殖できなくなったと考えている。これを証明するには、変異株獲得試験などが必要である。

また、このような高耐熱性の *B. cereus* は牛乳製造環境で増加する可能性が示唆されたことから、工場の洗浄条件の改善や殺菌剤の併用によって、高耐熱性 *B. cereus* の出現を抑えることができると考える。

以上のように、チルド製品で問題となりうる低温性芽胞菌について、生乳中の分布を解明し、生乳の品質向上につながる基礎データを得ることができた。また、UHT 牛乳においては高耐熱性 *B. cereus* が残存する可能性があるが、10 °C では増殖しないことから、微生物学的安全性を証明した。しかし、10 °C 以上では残存する低温性芽胞菌が増殖するので、温度管理を徹底することも重要である。

法的な流通温度の基準は、日本は諸外国に比べて高く、10 °C 以下と規定されている。このような高い流通温度においては、HTST 牛乳を含め、豆腐など多くの食品が低温性芽胞菌の影響を受けやすい。そのため、低温性芽胞菌に影響されやすい食品は 1 週間程度という短い賞味期限が設定されている。一方、アメリカなどでは流通温度は 6 °C であり、HTST 牛乳の賞味期限は 2–3 週間設定されている。一般に、6 °C 以下では *B. cereus* による腐敗を抑えられるとされており、

Paenibacillus 属も 6 °C 以下では増殖が遅い。日本の食品の微生物学的品質は世界でもトップレベルであるのに、流通温度が高いために短い賞味期限となっていることを筆者は残念に思う。流通温度をわずかに下げただけで、腐りやすい食品は倍以上の賞味期限を設けることも可能となり、それにより販路拡大も期待できる。メーカーにとって販路拡大は大きなメリットであるが、消費者にとっても口にする機会が増えることにつながる。また、腐敗のリスクも減じられるので、「食品ロス」が減ることも期待できる。消費者においしい製品を長く安心して食べていただくためにも、日本の法的な流通温度の基準を下げるべきと筆者は考える。

一方、高温性芽胞菌は低温性芽胞菌に比べて生乳中の存在量が少ないが、粉乳やクリームなどの乳製品の製造では、製造温度が高温性芽胞菌の増殖温度と一致するため、連続製造を続けるとこれらの菌が製造中に増殖し、製品を汚染する可能性が高い。そのため、製造ラインでの増殖を抑えることがポイントとなるが、製造中にどの程度増殖するか、リアルタイムでできるだけ早く知ることが重要である。粉乳の主要な高温性芽胞菌である *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* は、製造ラインの異なる場所にバイオフィルムを形成する傾向にあるため、第五章において、これら 2 菌種の芽胞を区別して精度よく迅速に測定する方法の開発に取り組んだ。その結果、EMA 処理を適用することで、乳・乳製品中の芽胞のみを定量する実用的なリアルタイム PCR 分析法を開発することに成功した。

高温性芽胞菌対策としては、1) 増殖前に製造を終了する、2) 処理設備を複数設備し、増殖前に切り替える、3) 増殖し始めたら製造を休止し、ラインを洗浄した後、再び製造を行なう（中間洗浄）、といった方法がある。しかし、1) では製造時間短縮による処理量の減少、2) では製造ラインの増設など多大な投資が

必要といった産業的なデメリットが発生する。そのため、現実的な対策としては、3) の中間洗浄が効果的と考える。しかし、日々の製造において、高温菌性芽胞菌の増殖のタイミングは異なるため、微生物学的に高品質を維持しつつ、最大の製造時間を確保するタイミングで中間洗浄を行なうことが望ましい。本分析法は迅速性かつ定量性に優れており、製造工程をリアルタイムでモニタリングすることができる。したがって、洗浄のタイミングを計るには実用的であり、産業上、高品質な粉乳やクリームの効率的な製造に果たす役割は大きいと考える。

多くの食品は、おいしさと安全のバランスを考えて殺菌されているため、無菌ではない。食の安全の考え方は、賞味期限内に危害となるレベルにまで増殖させないことであり、製品に残存する微生物をできる限り減らすことが重要である。本論文では、今まで測定できなかった生乳中の *Paenibacillus* 属芽胞の検出法、および製造工程をリアルタイムでモニタリングできる高温性芽胞菌の測定方法を開発した。また、低温性芽胞菌の生乳における分布を明らかにし、生乳の衛生管理の指標となる基礎データを取得することができた。これらの分析技術や基礎データは、生乳の衛生管理、乳製品製造ラインでの芽胞菌の増殖の抑制に寄与し、乳・乳製品の微生物学的品質のさらなる向上につながるが大いに期待される。

要約

第二章～第五章で得られた実験結果を以下に要約する。

1. 生乳中の *Paenibacillus* 属は低温性芽胞菌で、乳製品の品質に影響を及ぼす。

しかし、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数レベルは極めて低く、適当な測定方法が今のところ存在しない。そこで、 β -ガラクトシダーゼ活性を選択基準として、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞を測定する簡便なメンブランフィルター法の開発検討を行なった。*Paenibacillus* 属の芽胞は比較的小さいが、 $0.65\ \mu\text{m}$ 孔のメンブランフィルターを用いることで、生乳を容易に濾過することができ、芽胞の回収率も良好であった。7 °C 14 日間の培養条件により他の芽胞菌のコロニー形成を抑え、X-Gal を添加したブレインハートインフュージョン寒天平板に貼ったフィルター上に β -ガラクトシダーゼ陽性のコロニーを検出することで、*Paenibacillus* 属芽胞を選択的かつ効率的に計測することができた。本分析法を用いて北海道十勝地域 6 地区の生乳における *Paenibacillus* 属芽胞の分布を 1 年間調査した結果、芽胞数は年間を通じて生乳 100 mL あたり 0–10 spores であり、地区間、季節間の芽胞数に有意差は認められなかった。高頻度に検出された菌種は *Paenibacillus amylolyticus* および *Paenibacillus odorifer* で、全芽胞数の 50.6%、27.4%をそれぞれ占めていた。本調査により、生乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数レベルが初めて明らかとなった。本分析法は、生乳や HTST 牛乳中の *Paenibacillus* 属の芽胞数を調査するための手段を提供し、高品質な生乳の選定や HTST 牛乳製造における *Paenibacillus* 属の衛生管理に応用できることが期待される。

2. 原料としての生乳の微生物学的品質は、HTST 牛乳を製造する上で重要であ

る。特に、*Bacillus cereus* は耐熱性を有する芽胞菌で、HTST 牛乳の品質に悪影響を及ぼす。そこで、メンブランフィルター法を用いて北海道の異なる2つの地域の乳業工場の受け入れ生乳における *B. cereus* 芽胞数レベルを1年間調査した。生乳中の *B. cereus* 芽胞数は年間を通して $1-10^2$ spores L⁻¹ であり、比較的低いレベルであった。十勝地域では秋（中央値：25 spores L⁻¹）、釧路地域では夏（中央値：38 spores L⁻¹）に他の季節より有意に高く、放牧期間に芽胞数レベルが高いとする海外の報告と一致する結果であった。一方、低温性株の芽胞数レベルは両地域ともに季節変動は見られなかった。低温性株の割合は十勝地域で 5.5%、釧路地域で 16.2%と低く、生乳中の低温性株芽胞数レベルも比較的低いことが判明した。よって、*B. cereus* 中温性株、低温性株両方の芽胞数レベルの低い生乳を使用すると同時に、適切な賞味期限を設定し、10 °C 以下での温度管理を行なうことで、HTST 牛乳の微生物学的安全性が事実上確保できると考えられた。MLVA 解析から、1株のみで構成される MLVA グループの割合は十勝地域、釧路地域でそれぞれ全 MLVA グループの 76.6%、68.5%であり、生乳中の *B. cereus* は菌株多様性が高いことが示されたが、北海道の生乳に広く分布している株も数株存在していた。また、10株以上で構成される MLVA グループが夏、秋に多く見られ、特定の汚染源が存在することが示唆された。本調査により、日本における生乳中の *B. cereus* 芽胞の分布レベルが初めて明らかとなった。本試験結果は、生乳中の *B. cereus* 芽胞の衛生管理における基礎的情報を提供し、HTST 牛乳製造における生乳の品質向上につながることを期待される。

3. 日本で“UHT 牛乳”と呼ばれる牛乳は海外で一般的に“UHT 牛乳”と呼ばれているものとは異なり、120–130 °C で2秒殺菌し、10 °C 以下でチルド流

通する。このような殺菌条件では *Bacillus cereus* の芽胞を完全には不活性化することはできないため、最終製品に *B. cereus* が残存する可能性がある。日本における UHT 牛乳の微生物学的安全性を評価するため、特に UHT 殺菌でも残存する可能性がある高耐熱性 *B. cereus* (120 °C 2 秒の加熱処理で約 3 桁以内の減少を示す株と定義) の乳業環境における分布を調査した。乳業環境から分離した 200 株の *B. cereus* (生乳由来 105 株、HTST 牛乳由来 54 株、牛乳製造環境由来 41 株) について耐熱性試験を実施した結果、牛乳製造環境由来の 4 株の *B. cereus* のみが高耐熱性を示した。高耐熱性 *B. cereus* は生乳、HTST 牛乳、UHT 牛乳からは検出されないが、牛乳製造環境に存在することが明らかとなった。高耐熱株は 4 株すべてが 10 °C では増殖できず、12 °C では加熱損傷による増殖の遅延が見られた。一方、任意に選抜した生乳由来の耐熱性の低い株 4 株は 10 °C で良好に増殖した。一般に *B. cereus* は 10 °C で良好な増殖性を示すが、高耐熱性 *B. cereus* は 10 °C での増殖性がないことが示された。120 °C 2 秒の UHT 殺菌ではすべての高耐熱性 *B. cereus* を完全に不活性化することはできないものの、10 °C 以下での流通中に増殖することはない。また、加熱損傷により低温での増殖性に悪影響を及ぼし、たとえ UHT 牛乳中で高耐熱性 *B. cereus* が増殖したとしても、増殖が遅れるので、UHT 牛乳の微生物学的安全性の観点からは有利に働く。したがって、120 °C 2 秒殺菌の UHT 牛乳においては、特に牛乳製造環境由来の *B. cereus* による汚染をなくし、適切に設定した賞味期限の期間中 10 °C 以下に保つことで、微生物学的安全性を確保することができる。本調査は乳業環境中の高耐熱性 *B. cereus* の分布を網羅的に調査した初めての報告である。

4. 高温性芽胞菌である *Anoxybacillus flavithermus* および *Geobacillus*

stearothermophilus は、特に粉乳製造ラインで容易に増殖するため、工場の衛生管理上重要な菌種である。しかし、これら 2 菌種を特異的かつ迅速に定量する方法は今のところ報告されていない。そこで、乳製品中の *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* の芽胞を測定する SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR 分析法の開発を検討した。*spo0A* の塩基配列から新たに設計した AF-F1/AF-R1 および GS-F2/GS-R2 プライマー対は *A. flavithermus*、*G. stearothermophilus* にそれぞれ特異的であり、リアルタイム PCR 分析において芽胞数と高い直線性 ($r^2 = 0.99$)、広い定量範囲 (10^1 – 10^6 spores mL⁻¹) を有していた。抑制物質を多く含むクリームでは、DNA 抽出の前処理においてクエン酸三ナトリウム、n-デカン処理の後、プロテイナーゼ K 処理を行なうことで増幅抑制物質を容易にかつ効率よく除去でき、芽胞を精度よく定量できることが明らかとなった。また、EMA 処理により、 10^5 – 10^6 cells mL⁻¹ の死菌由来の DNA を不活性化でき、芽胞および死菌を含む乳製品から芽胞のみを定量することができた。本分析法は乳、脱脂乳、クリーム中の芽胞の定量に適用可能で、乳製品中の芽胞を 2.5 時間以内で定量することができる。本分析法は乳製品製造ラインにおける *A. flavithermus* および *G. stearothermophilus* の芽胞形成を調査するための手段を提供し、乳製品工場における衛生管理に応用できることが期待される。

謝辞

本論文は筆者がよつ葉乳業株式会社中央研究所においてこれまで行なってきた研究の一部をまとめたものです。本論文の作成にあたり終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました北海道大学大学院農学研究院微生物生理学研究室の横田篤教授に心から深謝の意を表します。また、本論文のご校閲、ご指導を賜りました北海道大学大学院農学研究院動物機能栄養学研究室の小林泰男教授、同応用食品科学研究室の玖村朗人教授に厚くお礼申し上げます。

本研究を行なう機会を与えてくださり、ご助言を賜りましたよつ葉乳業株式会社高橋秀一取締役、同執行役員研究統括部長片野直哉中央研究所長に感謝申し上げます。また、本研究の遂行及び論文の作成に関して、終始懇切丁寧にご指導、ご助言を賜りましたよつ葉乳業株式会社中央研究所の元島英雅技監に心からお礼申し上げます。

試験の実施にあたり、ご指導、ご協力をいただきましたよつ葉乳業株式会社中央研究所内田健治主任研究員に厚く感謝申し上げます。また、さまざまな方面にわたりご助言、ご協力をいただきましたよつ葉乳業株式会社中央研究所の皆様にもお礼を申し上げます。

参考文献

1. Agata, N., Mori, M., Konuma, H., & Shinagawa, K. (1994). Studies on behaviors of *Bacillus cereus* in milk. *Japanese Journal of Food Microbiology*, 10, 211–213.
2. Ash, C., Priest, F. G., & Collins M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal of the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64, 253–260.
3. Bartoszewicz, M., Hansen, B. M., & Swiecicka, I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology*, 25, 588–596.
4. Billing, E. & Cuthbert, W. A. (1958). Bitty cream: the occurrence and significance of *Bacillus cereus* spores in raw milk supplies. *Journal of Applied Bacteriology*, 21, 65–78.
5. Blake, M. R., Weimer, B. C., McMahon, D. J., & Savello, P. A. (1995). Sensory and microbial quality of milk processed for extended shelf life by direct steam injection. *Journal of Food Protection*, 58, 1007–1013.
6. Boor, K. J. & Murphy, S. C. (2002). Microbiology of market milks. p. 91–122. In R. K. Robinson (Ed.), *Dairy microbiology handbook*, 3rd edn. John Wiley and Sons, Inc, New York, NY, USA.
7. Bourgeois, C. M., Le Parc, O., Abgrall, B., & Cleret, J. J. (1984). Membrane filtration of milk for counting spores of *Clostridium tyrobutyricum*. *Journal of Dairy Science*, 67, 2493–2499.

8. Brown, D. P., Ganova-Raeva, L., Green, B. D., Wilkinson, S. R., Young, M., & Youngman, P. (1994). Characterization of *spo0A* homologues in diverse *Bacillus* and *Clostridium* species identifies a probable DNA-binding domain. *Molecular Microbiology*, 14, 411–426.
9. Burgess, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K.M., & Flint, S. H. (2009). The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1012–1018.
10. Burgess, S. A., Lindsay, D., & Flint, S. H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 215–225.
11. Burton, H. (1988). Ultra-High Temperature Processing of Milk and Milk products. Elsevier Applied Science, London, UK.
12. Bylund, G. (1995). Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Sweden.
13. Cherif, A., Brusetti, L., Borin, S., Rizzi, A., Boudabous, A., Khyami-Horani, H., & Daffonchio, D. (2003). Genetic relationship in the ‘*Bacillus cereus* group’ by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 1108–1119.
14. Christiansson, A. (2002). *Bacillus cereus*. p. 123–128. In H. Roginski, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Science*. Academic Press, London, UK.
15. Christiansson, A., Bertilsson, J., & Svensson, B. (1999). *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of Dairy Science*, 82, 305–314.

16. Christiansson, A., Ekelund, K., & Ogura, H. (1997). Membrane filtration method for enumeration and isolation of spores of *Bacillus cereus* from milk. *International Dairy Journal*, 7, 743–748.
17. Doll, E. V., Scherer, S., & Wenning, M. (2017). Spoilage of microfiltered and pasteurized extended shelf life milk is mainly induced by psychrotolerant spore-forming bacteria that often originate from recontamination. *Frontiers in Microbiology*, 8, 135.
18. Enright, J. B., Sader, W. W., & Thomas, R. C. (1957). Thermal inactivation of *Coxiella burnetii* and its relation to pasteurization of milk. *Public Health Monograph*, 47, 1–30.
19. Faille, C., Fontaine, F., & Bénézech, T. (2001). Potential occurrence of adhering living *Bacillus* spores in milk product processing lines. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 892–900.
20. Flint, S., Drocourt, J. L., Walker, K., Stevenson, B., Dwyer, M., Clarke, I., & McGill, D. (2006). A rapid, two-hour method for the enumeration of total viable bacteria in samples from commercial milk powder and whey protein concentrate powder manufacturing plant. *International Dairy Journal*, 16, 379–384.
21. Flint, S., Palmer, J., Bloemen, K., Brooks, J., & Crawford, R. (2001). The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 151–157.
22. Flint, S., Walker, K., Waters, B., & Crawford, R. (2007). Description and validation of a rapid (1 h) flow cytometry test for enumerating thermophilic bacteria in milk powders. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 909–915.

23. Flint, S. H., Ward, L. J. H., & Walker, K. M. R. (2001). Functional grouping of thermophilic *Bacillus* strains using amplification profiles of the 16S–23S internal spacer region. *Systematic and Applied Microbiology*, 24, 539–548.
24. Francis, K. P., Mayr, R., von Stetten, F., Stewart, G. S. A. B., & Scherer, S. (1998). Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3525–3529.
25. Fromm, H. I. & Boor, K. J. (2004). Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *Journal of Food Science*, 69, M207-214.
26. Griffiths, M. W. & Phillips, J. D. (1990). Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* sp. found in raw and pasteurized milk. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 43, 62–66.
27. Guinebretière, M-H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, Heyndrickx, C., & de Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology*, 10, 851–865.
28. Hammer, B. W. (1948). *Dairy Bacteriology* (3rd edn). John Wiley and Sons, Inc, New York, NY, USA.
29. Hashizume, S., Sekiguchi, T., & Nosoh, Y. (1976). Effect of temperature on the viability of *Bacillus stearothermophilus*. *Archives of Microbiology*, 107, 75–80.
30. Heyndrickx, M. (2011). The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. *Applied and Environmental Soil Science*, 2011, 1–11.

31. Heyndrickx, M., Marchand, S., De Jonghe, V., Smet, K., Coudijzer, K., & De Block, J. (2010). Understanding and preventing consumer milk microbial spoilage and chemical deterioration. p. 97–135. *In* M. W. Griffiths (Ed.), *Improving the safety and quality of milk*, vol. 2. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK.
32. Heyndrickx, M. & Scheldeman, P. (2002). Bacilli associated with spoilage in dairy and other food products. p. 64–82. *In* R. Berkeley, M. Heyndrickx, N. Logan, & P. De Vos (Eds.), *Applications and systematics of Bacillus and relatives*. Blackwell Science, Oxford, UK.
33. Hickey, M. (2009). Current legislation of markets milks. p. 101–138. *In* A. Y. Tamime (Ed.), *Milk processing and quality management*. John Wiley and Sons, Inc, New York, NY, USA.
34. Holsinger, V. H., Rajkowski, K. T., & Stabel, J. R. (1997). Milk pasteurization and safety: a brief history and update. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*, 16, 441–451.
35. Huck, J. R., Hammond, B. H., Murphy, S. C., Woodcock, N. H., & Boor, K. J. (2007). Tracking spore-forming bacteria contaminants in fluid milk-processing systems. *Journal of Dairy Science*, 90, 4872–4883.
36. Huck, J. R., Sonnen, M., & Boor, K. J. (2008). Tracking heat-resistant, cold-thriving fluid milk spoilage bacteria from farm to packaged product. *Journal of Dairy Science*, 91, 1218–1228.
37. Hull, R., Toyne, S., Haynes, I., & Lehmann, F. (1992). Thermotolerant bacteria: A re-emerging problem in cheesemaking. *Australian Journal of Dairy Technology*, 47, 91–94.

38. IDF. (2016). *Bacillus cereus* in Milk and Dairy Products. IDF Factsheet-December 2016. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
39. IDF. (2018). Heat Treatment of Milk—Overview. IDF Factsheet 001/2018-02. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
40. ISO. (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*—Colony-count technique at 30 °C. ISO 7932: 2004. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
41. Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D’Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Ehrlich, S. D., Overbeek, R., & Kyrpides, N. (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 423, 87–91.
42. Ivy, R.A., Ranieri, M. L., Martin, N. H., den Bakker, H. C., Xavier, B. M., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2012). Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 1853–1864.
43. Janštová, B. & Lukášová, J. (2001). Heat resistance of *Bacillus* spp. spores isolated from cow’s milk and farm environment. *Acta Veterinaria Brno*, 70, 179–184.
44. Japanese Ordinance. (1951). Ministerial Ordinance on Milk and Milk Products Concerning Compositional Standards, Etc. Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan.

45. Johnson, J. L. (1994). Methods for general and molecular bacteriology. p. 683–700.
In P. Gerhardt (Ed.), Similarity analysis of rRNAs. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
46. Kelly, A. L. & O'Shea, N. (2002). Pasteurizers, design and operation. p. 2237–2244.
In H. Roginski, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.), Encyclopedia of Dairy Science. Academic Press, London, UK.
47. Kikuchi, M., Matsumoto, Y., Sun, X. M., & Takao, S. (1996). Incidence and significance of thermotolerant bacteria in farm milk supplies and commercial pasteurized milk. *Animal Science and Technology*, 67, 265–272.
48. Kuisiene, N., Raugalas, J., & Chitavichius, D. (2009). Phylogenetic, inter, and intraspecific sequence analysis of *spo0A* gene of the genus *Geobacillus*. *Current Microbiology*, 58, 547–553.
49. Labots, H. & Hups, G. (1964). *Bacillus cereus* in raw and pasteurized milk. I. Enumeration of *B. cereus* spores in milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 18, 112–126.
50. Langeveld, L. P. M., van Spronsen, W. A., van Beresteijn, E. C. H., & Notermans, S. H. W. (1996). Consumption by healthy adults of pasteurized milk with a high concentration of *Bacillus cereus*: a double-blind study. *Journal of Food Protection*, 59, 723–726.
51. Larsen, H. D. & Jørgensen, K. (1997). The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 179–186.
52. Larsen, H. D. & Jørgensen, K. (1999). Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk products. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 173–176.

53. Le Flèche, P., Hauck, Y., Onteniente, L., Prieur, A., Denoeud, F., Ramisse, V., Sylvestre, P., Benson, G., Ramisse, F., & Vergnaud, G. (2001). A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiology*, 1: 2.
54. Magnusson, M., Christiansson, A., & Svensson, B. (2007). *Bacillus cereus* spores during housing of dairy cows: factors affecting contamination of raw milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 2745–2754.
55. Magnusson, M., Christiansson, A., Svensson, B., & Kolstrup, C. (2006). Effect of different premilking manual teat-cleaning methods on bacterial spores in milk. *Journal of Dairy Science*, 89, 3866–3875.
56. Magnusson, M., Svensson, B., Kolstrup, C., & Christiansson, A. (2007). *Bacillus cereus* in free-stall bedding. *Journal of Dairy Science*, 90, 5473–5482.
57. Martin, J. H. (1981). Heat resistant mesophilic microorganisms. *Journal of Dairy Science*, 64, 149–156.
58. Martin, N. H., Ranieri, M. L., Murphy, S. C., Ralyea, R. D., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2011). Results from raw milk microbiological tests do not predict the shelf-life performance of commercially pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 94, 1211–1222.
59. Mayr, R., Gutser, K., Busse, M., & Seiler, H. (2004). Indigenous aerobic sporeformers in high heat treated (127°C, 5 s) German ESL (extended shelf life) milk. *Milchwissenschaft*, 59, 143–146.
60. Mazas, M., López, M., Martínez, S., Bernardo, A., & Martin, R. (1999). Heat resistance of *Bacillus cereus* spores: effects of milk constituents and stabilizing additives. *Journal of Food Protection*, 62, 410–413.

61. McGuiggan, J. T. M., McCleery, D. R., Hannan, A., & Gilmour, A. (2002). Aerobic spore-forming bacteria in bulk raw milk: factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spores. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 100–107.
62. McKillip, J. L. & Drake, M. (2004). Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *Journal of Food Protection*, 67, 823–832.
63. Meer, R. R., Baker, J., Bodyfelt, F. W., & Griffiths, M. W. (1991). Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *Journal of Food Protection*, 54, 969–979.
64. Mugadza, D. T. & Buys, E. (2018). *Bacillus* and *Paenibacillus* species associated with extended shelf life milk during processing and storage. *International Journal of Dairy Technology*, 71, 301–308.
65. Murphy, P. M., Lynch, D., & Kelly, P. M. (1999). Growth of thermophilic spore forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *International Journal of Dairy Technology*, 52, 45–50.

66. Nazina, T. N., Tourova, T. P., Poltarau, A. B., Novikova, E. V., Grigoryan, A. A., Ivanova, A. E., Lysenko, A. M., Petrunyaka, V. V., Osipov, G. A., Belyaev, S. S., & Ivanova, M. V. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: description of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 433–446.
67. Nilsson, J., Svensson, B., Ekelund, K., & Christiansson, A. (1998). A RAPD-PCR method for large-scale typing of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*, 27, 168–172.
68. North, C. E. & Park, W. H. (1927). Standards for milk pasteurization. *The American Journal of Hygiene*, 7, 147–154.
69. Notermans, S., Dufrenne, J., Teunis, P., Beumer, R., te Giffel, M., & Weem, P. P. (1997). A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk. *Food Microbiology*, 14, 143–151.
70. Olson, J. C. Jr. & Mocquat, G. (1980). Milk and Milk Products. p. 470–485. In J. H. Silliker, R. P. Elliott, A. C. Baird-Parker, F. L. Bryan, J. H. Christion, D. S. Clark, J. C. Olson, & T. A. Roberts (Eds.), *Microbial Ecology of Foods*, vol. 2. Academic Press, New York, NY, USA.

71. Pan, Y. & Breidt, Jr, F. (2007). Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 8028–8031.
72. Pikuta, E., Lysenko, A., Chuvilskaya, N., Mendrock, U., Hippe, H., Suzina, N., Nikitin, D., Osipov, G., & Laurinavichius, K. (2000). *Anoxybacillus pushchinensis* gen. nov., sp. nov., a novel anaerobic, alkaliphilic, moderately thermophilic bacterium from manure, and description of *Anoxybacillus flavithermus* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 2109–2117.
73. Pirondini, A., Bonas, U., Maestri, E., Visioli, G., Marmiroli, M., & Marmiroli, N. (2010). Yield and amplificability of different DNA extraction procedures for traceability in the dairy food chain. *Food Control*, 21, 663–668.
74. Poms, R. E., Glössl, J., & Foissy, H. (2001). Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *European Food Research and Technology*, 213, 361–365.
75. Ralyea, R. D., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (1998). Bacterial tracking in a dairy production system using phenotypic and ribotyping methods. *Journal of Food Protection*, 61, 1336–1340.
76. Ranieri, M. L. & Boor, K. J. (2009). Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the United States. *Journal of Dairy Science*, 92, 4833–4840.
77. Ranieri, M. L. & Boor, K. J. (2010). Tracking and eliminating sporeformers in dairy systems. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 65, 74–80.

78. Ranieri, M. L., Huck, J. R., Sonnen, M., Barbano, D. M., & Boor, K. J. (2009). High temperature, short time pasteurization temperatures inversely affect bacterial numbers during refrigerated storage of pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 92, 4823–4832.
79. Ranieri, M. L., Ivy, R. A., Mitchell, W. R., Call, E., Masiello, S. N., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2012). Real-time PCR detection of *Paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5855–5863.
80. Rawsthorne, H., Dock, C. N., & Jaykus, L. A. (2009). PCR-based method using propidium monoazide to distinguish viable from nonviable *Bacillus subtilis* spores. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2936–2939.
81. Ripabelli, G., McLauchlin, J., Mithani, V., & Threlfall, E. J. (2000). Epidemiological typing of *Bacillus cereus* by amplified fragment length polymorphism. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 358–363.
82. Ronimus, R. S., Parker, L. E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., & Morgan, H. W. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 45–61.
83. Ronimus, R. S., Rueckert, A., & Morgan, H. W. (2006). Survival of thermophilic spore-forming bacteria in a 90⁺ year old milk powder from Ernest Shackelton's Cape Royds hut in Antarctica. *Journal of Dairy Research*, 73, 235–243.
84. Rückert, A., Ronimus, R. S., & Morgan, H. W. (2004). A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 263–272.

85. Rueckert, A., Ronimus, R. S., & Morgan, H. W. (2005). Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders. *Journal of Microbiological Methods*, 60, 155–167.
86. Rueckert, A., Ronimus, R. S., & Morgan, H. W. (2005). Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1246–1255.
87. Rueckert, A., Ronimus, R. S., & Morgan, H. W. (2006). Development of a real-time PCR assay targeting the sporulation gene, *spo0A*, for the enumeration of thermophilic bacilli in milk powder. *Food Microbiology*, 23, 220–230.
88. Russell, H. L. & Hastings, E. G. (1900). Thermal death point of tubercle bacilli under commercial conditions. Wisconsin Agricultural Experimental Station, 17th Annual Report. University of Wisconsin, Madison, WI, USA.
89. Sáez-Nieto, J. A., Medina-Pascual, M. J., Carrasco, G., Garrido, N., Fernandez-Torres, M. A., Villalón, P., & Valdezate, S. (2017). *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. *New Microbes and New Infections*, 19, 19–27.
90. Scott, S. A., Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M. R., & Flint, S. H. (2007). The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, 60, 109–117.
91. Shaheen, R., Svensson, B., Andersson, M. A., Christiansson, A., & Salkinoja-Salonen, M. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiology*, 27, 347–355.

92. Slaghuis, B. A., Te Giffel, M. C., Beumer, R. R., & André, G. (1997). Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *International Dairy Journal*, 7, 201–205.
93. Smith, J. L. (1899). The thermal death point of tubercle bacilli in milk and other fluids. *Journal of Experimental Medicine*, 4, 217–224.
94. Stadhouders, J., Hup, G., & Hassing, F. (1982). The conceptions index and indicator organisms discussed on the basis of the bacteriology of spray-dried milk powder. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 36, 231–260.
95. Straub, J. A., Hertel, C., & Hammes, W. P. (1999). A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction–based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal of Food Protection*, 62, 1150–1156.
96. Sutherland, A. D. & Murdoch, R. (1994). Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 279–292.
97. Svensson, B., Ekelund, K., Ogura, H., & Christiansson, A. (2004). Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International Dairy Journal*, 14, 17–27.
98. te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Slaghuis, B. A., & Rombouts, F. M. (1995). Occurrence and characterization of (psychrotrophic) *Bacillus cereus* on farms in the Netherlands. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 49, 125–138.
99. te Giffel, M. C., Wagendorp, A., Herrewegh, A., & Driehuis, F. (2002). Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 625–630.

100. Touch, V. & Deeth, H. C. (2009). Microbiology of raw and market milks. p. 48–71.
In A. Y. Tamime (Ed.), Milk processing and quality management. John Wiley and Sons, Inc, New York, NY, USA.
101. Vaelewijk, M. J., De Vos, P., Lebbe, L., Scheldeman, P., Hoste, B., & Heyndrickx, M. (2001). Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1074–1084.
102. Valjevac, S., Hilaire, V., Lisanti, O., Ramisse, F., Hernandez, E., Cavallo, J. D., Pourcel, C., & Vergnaud, G. (2005). Comparison of minisatellite polymorphisms in the *Bacillus cereus* complex: a simple assay for large-scale screening and identification of strains most closely related to *Bacillus anthracis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 6613–6623.
103. Varnam, A. H. & Sutherland .J. P. (2001). Milk and Milk Products–Technology, Chemistry and Microbiology. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, USA.
104. von Stetten, F., Mayr, R., & Scherer, S. (1999). Climatic influence on mesophilic *Bacillus cereus* and psychrotolerant *Bacillus weihenstephanensis* populations in tropical, temperate and alpine soil. *Environmental Microbiology*, 1, 503–515.
105. Westhoff, D. C. (1978). Heating milk for microbial destruction: a historical outline and update. *Journal of Food Protection*, 41, 122–130.
106. Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3741–3751.

107. Wolffs, P. F. G., Geelen, T. H., & van Alphen, L. B. (2017). Molecular diagnostics of bacterial pathogens. p.1–20. *In* E. van Pelt-Verkuil, W. B. van Leeuwen, & R. te Witt (Eds.), *Molecular Diagnostics : Part 2: Clinical, Veterinary, Agrobotanical and Food Safety Applications*. Springer Nature Singapore Pte Ltd, Singapore, Singapore.
108. Wunderlin, T., Junier, T., Roussel-Delif, L., Jeanneret, N., & Junier, P. (2013). Stage 0 sporulation gene A as a molecular marker to study diversity of endospore-forming Firmicutes. *Environmental Microbiology Reports*, 5, 911–924.
109. Zhao, Y., Caspers, M. P. M., Metselaar, K. I., de Boer, P., Roeselers, G., Moezelaar, R., Groot, M. N., Montijn, R. C., Abee, T., & Kort, R. (2013). Abiotic and Microbiotic factors controlling biofilm formation by thermophilic sporeformers. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 5652–5660.

主論文に関連する公表論文リスト

1. **Ohkubo, Y.**, Uchida, K., Motoshima, H., & Katano, N. (2019). Simple membrane filtration method for estimating numbers of *Paenibacillus* spp. spores in raw milk, using β -galactosidase activity as a selection criterion. *International Dairy Journal*, 96, 10–14.
2. **Ohkubo, Y.**, Komori, K., Uchida, K., Motoshima, H., & Katano, N. (2019). Seasonal variation in spore levels of *Bacillus cereus* and its psychrotrophic strains in raw milk in Hokkaido, Japan, and evaluation of strain diversity. *International Dairy Journal*, 97, 209–215.
3. **Ohkubo, Y.**, Uchida, K., Motoshima, H., & Katano, N. (2019). Microbiological safety of UHT milk treated at 120 °C for 2 s, as estimated from the distribution of high-heat-resistant *Bacillus cereus* in dairy environments. *International Dairy Journal*, 91, 36–40.
4. **Ohkubo, Y.**, Uchida, K., Motoshima, H., & Katano, N. (2019). Species-specific real-time PCR assay for enumeration of *Anoxybacillus flavithermus* and *Geobacillus stearothermophilus* spores in dairy products. *International Dairy Journal*, 93, 15–21.