

図 ボツリヌス菌の分離培養法

厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

*Listeria monocytogenes* の標準試験法に関する研究

研究分担者	仲真晶子	東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 科長
	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部 主任研究官
研究協力者	樋脇 弘	福岡市保健環境研究所保健科学課 主任研究員
	江渕寿美	福岡市保健環境研究所保健科学課 研究員
	中村寛海	大阪市立環境科学研究所 研究員
	大塚佳代子	埼玉県衛生研究所 専門研究員
	金子誠二	東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科 主任研究員
	井田美樹	東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科 研究員
	竹村 壘	財団法人日本冷凍食品検査協会 関西事業所 微生物試験課 課長補佐
	長田共未	財団法人日本冷凍食品検査協会 横浜試験センター 微生物試験課

研究要旨

*Listeria monocytogenes*（以下リステリア）は土壌、河川水や家畜及び鳥類を含む野生動物の腸管内など自然界に広く分布し、ヒト及び動物に脳脊髄膜炎、流死産或いは敗血症を引き起こすリステリア症の原因菌である。人への感染源としては本菌による汚染食品の摂取と、胎児または新生児に対しては母体からの垂直感染や産道感染が主となっている。本菌は環境中に遍在する上、食塩耐性、低温増殖能などの高度な環境抵抗性を持つため、食品やその原料への1次汚染や食品製造工程での2次汚染、保存過程での増殖の抑制は容易ではない。欧米では過去数十年に亘ってナチュラルチーズや食肉製品を原因食品とするヒトのリステリア症の集団事例が報告されている。わが国でも年間80例ほどの散发例の発生が推測されているが、髄膜炎等の重篤なリステリア症では潜伏期間が約1ヶ月と長期にわたる場合があり、その原因食品が特定されないことが多い。一方で国内流通食品の中に輸入食品の占める割合が極めて高いわが国において、輸入検疫時の微生物試験法を国際的な試験法と同等のものにすることが急務である。現在国内では本菌の乳・乳製品からの検査法として、1993年の乳等省令で定められた方法が行われているが、この検査法が準拠しているIDF法（IDF143A）は近年ISO法に移行した。これらの理由からわが国でも、早急に本菌の標準的試験法を検討・改訂する必要がある。本研究では、現在国際的に用いられているリステリア試験法を比較検討し、国内での標準的試験法を定めるにあたって必要となる事項を検討した。その結果、リステリアの標準試験法としてISO法を採用し、数箇所の変更・検討事項について国内での改良点の妥当性を複数の研究機関で検討していくこととした。

## A. 研究目的

リステリア症の原因菌 *L. monocytogenes* は人へは主に汚染食品の摂取を通じて感染する。本菌は4℃以下でも増殖可能な低温増殖能や20%もの高食塩濃度下でも生残できる高塩濃度耐性能を持ち、さまざまな食品から分離されて、その保存中に増殖することが知られている。本菌は加熱により比較的容易に殺菌が可能であるため、食品媒介リステリア症の原因食品としては、低温で長期間保存・熟成されるナチュラルチーズや、生ハム等の非加熱食肉製品、サラダなどのいわゆる ready-to-eat 食品が多くみられる。近年の食生活の多様性に対応して、生ハム、サラミソーセージ等の非加熱食肉製品やナチュラルチーズの輸入量は増大しているが、輸入時の検疫などの微生物試験により本菌の汚染が明らかとなって自主回収、積戻しとなる食品もしばしば見られる。一方で、様々な食品汚染細菌の試験法において、その国際的整合性が輸入時のトラブルとなっている例も見られている。リステリアにおいても、現行の国内における標準的試験法が準拠している国際酪農連盟 (IDF) の試験方法が International Standard Organization (ISO) に合流したことから、極めて早急に国際的整合性のある標準試験法を定める必要に迫られている。本研究ではわが国における、国際的に通用しうる食品中のリステリアの標準的試験法を作成することを目的として、国際的に用いられている本菌の試験方法を比較検討し、国内の標準法作出時に変更・検討が必要な箇所について国際的な試験法との同等性の検証を行った。

## B. 研究方法

試験法の検討及び同等性の検証等は、本研究

の研究分担者及び研究協力者が所属する、国内の5ヶ所の公的試験研究機関において実施した。

### 1. 使用菌株

共通菌株として、東京都健康安全研究センターより各試験機関に分与された *Listeria monocytogenes* 食品由来株3株を全試験に使用し、酵素基質培地寒天平板保存試験及び *L. monocytogenes* 及び *L. innocua* 混合接種試験には各研究機関の独自の菌株として研究所保有株をそれぞれ2株ずつ使用した (表1、各自株1-10)。βリジンディスク試験には、上記の株に加え表1の各自株11-52を使用した。混合接種試験及びβリジンディスク試験に用いた *L. innocua* 及び *L. ivanovii* は表2に示した。

### 2. 使用培地

今回のリステリア標準試験法検討に使用した培地類を表3に示した。

### 3. 試験法の比較検討

現在国際的機関や米国において行われているリステリア試験法について調査し、使用培地、培養期間等について現行の国内法との比較検討を行った。

### 4. 酵素基質培地寒天平板保存試験 (別添1)

酵素基質培地寒天平板の長期保存による劣化の有無を調べるため、各試験機関で同時期に作成した同一ロットの自家調整培地2種と、同一製品の市販寒天平板 (生培地) を4℃で4週間まで保存し、リステリアの分離性能について比較検討した。試験菌株は共通株を3株と、各所の保有株2株の計5株ずつを使用した (表1)。各菌株は Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地 (Difco) 上に塗布し、単一コロニーを BHI 液体培地に接種し、30℃の静置培養で2代継代培養した。培養した菌液を滅菌生理食塩水で段階希釈して25μlあたり10コロニー程度になる

よう調整した菌液を作成した。自家調整の寒天平板は基礎培地、サプリメントともに全機関同一ロットの試薬を購入し、試験を実施する週に全試験に必要な枚数を作成し、乾燥による劣化を防ぐためにビニールテープで保護した後にビニール袋に入れ、密封して4℃で保管した。市販の寒天平板は全機関同一ロットのものを購入し、自家調整平板と同様に保管して使用した。菌液を25μl接種した各平板を35℃又は37℃で培養し、21、24、27及び48時間に発育したコロニー数とその形状を記録した。

#### 5. *L. monocytogenes* 及び *L. innocua* 混合接種試験(別添2)

酵素基質培地寒天平板は上記の酵素基質培地寒天平板保存試験と同様に準備し、保存2週目に試験を実施した。その他に、従来用いられているリステリア属菌の選択分離培地であるPALCAM寒天平板、Oxford寒天平板、非選択培地である tryptone soya agar 及び Yeast extract を添加した tryptone soya agar も使用した。*L. monocytogenes* 及び *L. innocua* についても上記の酵素基質培地寒天平板保存試験と同様の希釈液を作成し、*L. monocytogenes* 単独で100μl或いは *L. monocytogenes* と *L. innocua* 各100μlの混合菌液をそれぞれ寒天平板に塗布し、35℃又は37℃で培養し、21、24、27及び48時間に発育したコロニー数とその形状を記録した。

#### 6. βリジンディスク試験

従来法で用いられている *L. monocytogenes* の鑑別試験であるCAMP試験とβリジンディスク試験の同等性を確認する目的で、共通株3株と各自株それぞれ10株について、比較試験を行った。CAMP試験は東京都健康安全研究センターより各試験機関に分与された *Staphylococcus aureus* と *Rhodococcus equi*

を用い、定法に従って行った。βリジンディスク試験は市販のβリジンディスク (Remel) を用いて、説明書にしたがって行った。

### C. 研究結果

#### 1. 食品からのリステリア試験法の比較検討

現在国内で行われている衛乳第169号の試験法と、ISOのMicrobiology of food and animal feeding stuffs; Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* part 1 (ISO11290-1:2004(E))、更に米国FDAとUSDAで定められたリステリア試験方法について使用培地、培養時間等の詳細を比較検討した(表4)。5試験機関からなるリステリア試験法作業部会内での議論と国内の有識者からなる「食品からの微生物標準試験法検討委員会」での検討を経て、ISO法を新しいリステリアの標準的試験法の基礎とし、国内の状況にあわせた改変の可能性についてその方法と原法の同等性の検証を実施することとなった。改変点の候補及び検討すべき事項として、(1) 酵素基質培地の培養温度及び時間(2) 酵素基質培地の種類(3) 作成又は購入した酵素基質培地の保存期間(4) *L. monocytogenes* の増殖を抑制する株が存在することが知られている *L. innocua* との混在時の酵素基質培地の性能(5) βリジンディスク試験によるCAMP試験の代替が挙げられた。(1) - (3) の検討のため、下記の酵素基質培地寒天平板保存試験を、(4) の検討のため *L. monocytogenes* 及び *L. innocua* 混合接種試験、(5) の検討のため、同一株を用いたβリジンディスク試験とCAMP試験の比較試験をおこなった。

#### 2. 酵素基質培地寒天平板保存試験

ISO 法で使用される酵素基質培地寒天平板について、指定されているものと同等とされる製品の自家調整培地と生培地、更に国内でこれまで多く使用され、フランス AFNOL で ISO 指定培地と同等性が検証されている別種の酵素基質培地(自家調整)の3種の性能比較を行った。5試験機関において0、2及び4週間保存した3種類の酵素基質培地寒天平板上で共通菌株1-3及び各自株各2株を35℃及び37℃で培養し、21、24、27及び48時間に集落の数及び形状を観察した。平板上の全集落が *L. monocytogenes* に典型的形状となるのに要した培養時間を記録し、結果を取りまとめてグラフにした(共通株の結果:図1-1及び1-2、各自株の結果:図1-3及び1-4)。結果は全集落が典型的となった培養時間を記録した試験機関の数で示した。その結果、3種の培地とも37℃48時間の培養を行えば全ての集落が *L. monocytogenes* に典型的形状を示すことが明らかとなった。培養時間は35℃よりも37℃が優れている傾向が示された。長期保存による影響は24時間前後の培養では若干見られたが、48時間培養時間では見られなかった。

### 3. *L. monocytogenes* 及び *L. innocua* 混合接種試験

寒天平板保存試験と同様に、5試験機関において2週間保存した3種類の酵素基質培地寒天平板上で共通菌株1-3及び各自株2株を35℃及び37℃で培養し、21、24、27及び48時間に集落の数及び形状を観察した。平板上に典型的な *L. monocytogenes* 集落が出現するのに要した培養後の観察時間を記録し、結果を取りまとめてグラフにした(図2)。結果は典型的な *L. monocytogenes* 集落が最初に出現した観察時間が *L. monocytogenes* 単独培養と混合培養で単

独培養が早い結果(M>I)とグラフ中に表記)、同じ結果(M=I)及び遅い結果(M<I)を示した試験機関の数で示した。その結果、生培地であるB培地では35℃と37℃のいずれの培養温度でも共通株、各自株ともに混合培養の影響は全く見られなかった。A培地ではいずれの培養温度でも単独培養が早く典型的集落を形成する場合と、混合培養が早い場合が見られた。C培地では37℃では混合培養の影響はほとんど見られず、35℃において共通株2及び3で影響があり、共通株3では試験機関によって単独培養が早く典型的集落を形成する場合と、混合培養が早い場合の両方が見られた。また、データは示していないが、35℃と37℃のいずれの培養温度でもOxford培地ではほとんどの株において21時間で典型的集落が形成されたが、PALCAM培地では全集落が典型的になるまでに27時間以上を要した。非選択培地2種についてはいずれの培養温度でもその発育性に差は見られなかった。

### 4. $\beta$ リジンディスク試験

5試験機関において共通株3株と各自株10株を使用して、CAMP試験と $\beta$ リジンディスク試験を実施した結果を表5に示した。それぞれの機関の各自株については全て両試験で同一の結果が得られたが、溶血性の弱い共通株2及び3については3機関で両試験での結果に不一致が見られた。その内2機関についてはCAMP試験で溶血性が陰性、 $\beta$ リジンディスク試験で弱い陽性と判定され、1機関については逆の結果が得られた。これらの結果から、 $\beta$ リジンディスク試験はCAMP試験とほぼ同等の結果が得られるが、溶血性の弱い株については判定に注意が必要であることが示された。

### D. 考察

1. 今回の研究により、国際的に整合性のある食品からのリステリア試験法として、ISO 法を基礎とした国内標準試験法を作成することとなり、国内の状況にあわせた改変点の検証をいくつかについて実施したところ、(1) 3種の酵素基質培地のいずれを用いても 37°C48 時間まで培養する必要があること (2) 酵素基質培地は4週間までの保存で大きな性能の劣化を示さないこと (3) 自家調整培地は近縁の菌との混合培養によって典型的集落の形成が遅れる場合があり注意が必要であること (4)  $\beta$ リジンディスク試験はほぼ CAMP 試験と同等の結果を示すが、溶血性の極めて弱い株については両試験法ともに判定に注意が必要であることが示めされた。これらの問題点への対応として、特に自家調整培地を使用する場合には、溶血性が弱く、酵素基質培地での典型的集落形成の遅い株をコントロールとして用い、精度管理をする必要があると思われた。

なし

#### E. 結論

本研究の結果、わが国において、国際的に整合性のある食品からのリステリア試験法として、ISO 法を基礎とすることとなった。現在、国内の状況にあわせた改変点の検証を実施しており、来年度以降食品への添加回収試験を含めた更に詳細な検討を実施していく予定である。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

## 別添 1. リステリア酵素基質培地平板保存試験

### 1. 試験の概要

リステリアの酵素基質培地 3 種（メルク自家調整、メルク生培地、クロモアガーリステリア自家調整）に、共通菌株 3 株と各自保有株 2 株の計 5 株を、単一コロニーを形成する条件で接種し、35℃または 37℃で培養して 21 時間、24 時間、27 時間及び 48 時間でのコロニーとハローの形状を観察する。培地の調整直後、調整 2 週間後、調整 4 週間後の 3 期について同じ実験を行う。

### 2. 使用器具、装置

- ①オートクレーブ
- ②マグネティックスターラー
- ③スターラーバーを入れてオートクレーブ滅菌した小ビーカー
- ④天秤
- ⑤シェーカー付き恒温水槽
- ⑥ふらん器（35±1℃及び 37±1℃）
- ⑦温度履歴記録計
- ⑧滅菌シャーレ
- ⑨マイクロピペット（20－100  $\mu$  l）及びチップ
- ⑩階段希釈列作成用及び前増菌用滅菌試験管
- ⑪試験管立て
- ⑫三角フラスコ又は耐熱瓶
- ⑬白金線、白金耳

### 3. 培地及び試薬

#### ①純培養用培地

- ・TSA 培地：121℃で 15 分間滅菌し、平板を作成する。

#### ②前増菌液

- ・Brain Heart Infusion broth：121℃で 15 分間滅菌する。無菌的に滅菌試験管に分注して使用する。

#### ③酵素基質培地：自家調整のものは 11 月 13 日または 14 日に全試験分作成する。(平板保存試験用に各 6 枚、混合試験用に各 20 枚、予備も含め合計各 35 枚ずつ)

- ・メルク ALOA 培地 (自家調整)：製法に基づいて作成する。概略は、沸騰水中で加温溶解する。溶解後、48℃に保存し、選択サプリメント及び 48℃の増菌サプリメントを無菌的に添加し、平板を作成する。
- ・メルク ALOA 培地 (生培地)：乾燥しない状態で 4℃に保管する。
- ・クロモアガーリステリア培地：121℃で 15 分間滅菌する。滅菌終了後、48℃に保存し、滅菌水を加えてから 30 分スターラーで攪拌した選択サプリメントを無菌的に添加し、平板を作成する。

#### ④希釈水

- ・BPW



#### 4. 試験手順

##### 予備試験

##### 1) 各菌株の前増菌条件での増殖性の確認

(共通株 3 株と各自株 2 株、各自保有の Linn 株 1 株 (平板保存試験では使用しないが、混合接種試験で使用するため) について行う)

①各菌株を TSA 寒天平板に、単一コロニーを形成するように塗布し、 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ・18-24 時間培養する。使用するまで  $4^{\circ}\text{C}$  に保管する。或いは、初めから室温で 3 晩培養する。

②形成された単一コロニーを、白金線を用いて試験管に分注した 3 ml の BHI ブロスに接種し、 $30^{\circ}\text{C}$ ・18 時間静置培養する。

③②の菌液を、白金耳を用いて試験管に分注した 3 ml の BHI ブロスに接種し、 $30^{\circ}\text{C}$ ・18 時間静置培養する。

④③の菌液を、BPW を用いて 10 ml (菌液 1 ml + 希釈液 9 ml) の 10 段階希釈で -7 乗まで希釈する。

⑤-5, 6, 7 乗の希釈菌液を各  $100\mu\text{l}$  ずつ ALOA 寒天平板 (8 月に送付されたもの) に塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$  24 時間 培養する。

⑥希釈菌液  $25\mu\text{l}$  あたり 10 個程度の菌体を含む希釈条件を算出する。

##### 本試験

##### 1) 菌株の保存

①TSA 寒天平板に使用菌株を、単一コロニーを形成するように塗布し、 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ・18-24 時間培養する。

②各研究所の常法に従って菌株を保存する。

##### 2) 前増菌 (2 段階)

①保存菌株を TSA 寒天平板に、単一コロニーを形成するように塗布し、 $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ・18-24 時間培養する。

②形成された単一コロニーを、白金線を用いて試験管に分注した 3 ml の BHI ブロスに接種し、 $30^{\circ}\text{C}$ ・18 時間 静置培養する。

③前日の培養液の一部を、白金耳を用いて試験管に分注した 3 ml の BHI ブロスに接種し、 $30^{\circ}\text{C}$ ・18 時間静置培養する。

##### 3) 希釈菌液作成

①②) ③の一夜培養菌液を、BPW を用いて 10 ml (菌液 1 ml + 希釈液 9 ml) の 10 段階希釈で、希釈菌液  $25\mu\text{l}$  あたり 10 個程度の菌体を含む希釈条件まで希釈する。

②希釈済み菌液を 2 時間  $37^{\circ}\text{C}$  で乾燥させ 5 分画した平板 (3 種) 2 枚に各  $25\mu\text{l}$  ずつマイクロピペットを用いて接種する。

③35℃と 37℃で培養する。

④21 時間、24 時間、27 時間及び 48 時間で観察し、結果を記録用紙に記載する。

## 5. フローチャート

T S A 平板上の単一コロニー

↓

3 ml の B H I プロスに接種

↓ 30±0.5℃・18 時間静置培養

1 白金耳を 3 ml の B H I プロスに接種

↓ 30±0.5℃・18 時間静置培養

10 倍階段希釈液作成 (菌株ごとに予備試験で確認した希釈条件で)

↓

3 種の酵素基質培地 (5 分画) 2 枚に希釈菌液 25 μ l ずつ接種

↓ 35℃及び 37℃・21、24、27、48 時間

コロニー及びハローの観察

↓

結果の記録

## 別添 2. *Listeria monocytogenes*・*L. innocua* 混合接種試験

### 1. 試験の概要

リステリアの酵素基質培地 3 種（メルク自家調整、メルク生培地、クロモアガーリステリア自家調整）と選択培地 2 種（PALCAM 及び Oxford）、非選択培地 2 種（TSYEA 及び TSA）に、*Listeria monocytogenes* 共通菌株 3 株と各自保有株 2 株の計 5 株を、単独又は等量の *L. innocua* と混合して、単一コロニーを形成する条件で接種し、35℃または 37℃で培養して 21 時間、24 時間、27 時間及び 48 時間でのコロニー数（酵素基質培地についてはコロニーの色毎に）と、コロニー及びハローの形状を観察する。

### 2. 使用器具、装置

- ①オートクレーブ
- ②マグネティックスターラー
- ③スターラーバーを入れてオートクレーブ滅菌した小ビーカー
- ④天秤
- ⑤シェーカー付き恒温水槽
- ⑥ふらん器（35±1℃及び 37±1℃）
- ⑦温度履歴記録計
- ⑧滅菌シャーレ
- ⑨マイクロピペット（20-100µl）及びチップ
- ⑩階段希釈列作成用及び前増菌用滅菌試験管
- ⑪試験管立て
- ⑫三角フラスコ又は耐熱瓶
- ⑬白金線
- ⑭コンラージ棒

### 3. 培地及び試薬

#### ①純培養用培地

- ・ TSA 培地：121℃で 15 分間滅菌し、平板を作成する。

#### ②前増菌液

- ・ Brain Heart Infusion broth：121℃で 15 分間滅菌する。無菌的に滅菌試験管に分注して使用する。

#### ③寒天平板

<酵素基質培地>自家調整のものは 11 月 13 日または 14 日に全試験分作成する。(平板保存試験用に各 6 枚、混合試験用に各 20 枚、予備も含め合計各 35 枚ずつ)

- ・ メルク ALOA 培地 (自家調整)：製法に基づいて作成する。概略は、沸騰水中で加温溶解する。溶解後、48℃に保存し、選択サプリメント及び 48℃の増菌サプリメントを無菌的に添加し、平板を作成する。
- ・ メルク ALOA 培地 (生培地)：乾燥しない状態で 4℃に保管する。
- ・ クロモアガーリステリア培地：121℃で 15 分間滅菌する。滅菌終了後、48 度に保存し、滅菌水を加えてから 30 分スターラーで攪拌した選択サプリメントを無菌的に添加し、平板を作成する。

#### <選択培地>

- ・ PALCAM 及び Oxford 培地を、用法に従って調整する。

#### <非選択培地>

・

#### ④希釈水

- ・ B P W

#### 4. 試験手順

##### 予備試験（酵素基質培地平板保存試験と共通）

##### 1) 各菌株の前増菌条件での増殖性の確認

（共通株 3 株と各自株 2 株、各自保有の Linn 株 1 株）

- ①各菌株を T S A 寒天平板に、単一コロニーを形成するように塗布し、 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ・18-24 時間培養する。
- ②形成された単一コロニーを、白金線を用いて試験管に分注した 3 ml の B H I プロスに接種し、 $30^{\circ}\text{C}$ ・18 時間静置培養する。
- ③②の菌液を、白金耳を用いて試験管に分注した 3 ml の B H I プロスに接種し、 $30^{\circ}\text{C}$ ・18 時間静置培養する。
- ④③の菌液を、BPW を用いて 10 ml（菌液 1 ml + 希釈液 9 ml）の 10 段階希釈で 7 乗まで希釈する。
- ⑤ 5, 6, 7 乗の希釈菌液を各  $100 \mu\text{l}$  ずつ ALOA 寒天平板（8 月に送付されたもの）に塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$  24 時間 培養する。
- ⑥希釈菌液  $25 \mu\text{l}$  あたり 10 個程度の菌体を含む希釈条件を算出する。

##### 本試験

##### 1) 菌株の保存

- ① T S A 寒天平板に使用菌株を、単一コロニーを形成するように塗布し、 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ・18-24 時間培養する。
- ②各研究所の常法に従って菌株を保存する。

##### 2) 前増菌(2 段階)

- ① Lm 及び Linn の保存菌株を T S A 寒天平板に、単一コロニーを形成するように塗布し、 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ・18-24 時間培養する。
- ②形成された単一コロニーを、白金線を用いて試験管に分注した 3 ml の B H I プロスに接種し、 $30^{\circ}\text{C}$  18 時間 静置培養する。
- ③②の菌液を、白金耳を用いて試験管に分注した 3 ml の B H I プロスに接種し、 $30^{\circ}\text{C}$ ・18 時間静置培養する。

##### 3) 希釈菌液作成

- ① 2) ③の Lm 一夜培養菌液を、BPW を用いて 10 ml（菌液 1 ml + 希釈液 9 ml）の 10 段階希釈で、菌株ごとに予備試験で確認した希釈条件で希釈する。
- ② ①の希釈済み菌液を 2 時間  $37^{\circ}\text{C}$  で乾燥させた平板（7 種）各 2 枚に各  $100 \mu\text{l}$  ずつマイクロピペットを用いて接種し、コンラージ棒で塗布する。
- ③ 3) の①で希釈した Lm 菌液と、同様に予備試験で確認した希釈条件で希釈した Linn 菌

液を 3 ml ずつ混和する (合計 6 ml)。

- ④ ③希釈・混合済み菌液を 2 時間 37°C で乾燥させた平板 (7 種) 各 2 枚に各 200  $\mu$ l ずつマイクロピペットを用いて接種し、コンラージ棒で塗布する。
- ⑤ ②及び④を 35°C と 37°C で培養する。
- ⑥ 21 時間、24 時間、27 時間及び 48 時間で観察し、結果を記録用紙に記載する。

## 5. フローチャート

TSA 平板上の単一コロニー

↓

3 ml の BHI ブロスに接種

↓ 30 ± 0.5°C ・ 18 時間 静置培養

3 ml の BHI ブロスに接種

↓ 30 ± 0.5°C ・ 18 時間 静置培養

10 倍階段希釈液作成 (菌株ごとに予備試験で確認した希釈条件で)

↓

① 7 種の寒天平板各 2 枚に Lm 希釈菌液 100  $\mu$ l ずつ塗布

② Lm 希釈菌液と Linn 希釈菌液の混合液 200  $\mu$ l ずつを 7 種の寒天平板各 2 枚に塗布

↓ 35°C 及び 37°C ・ 21、24、27、48 時間

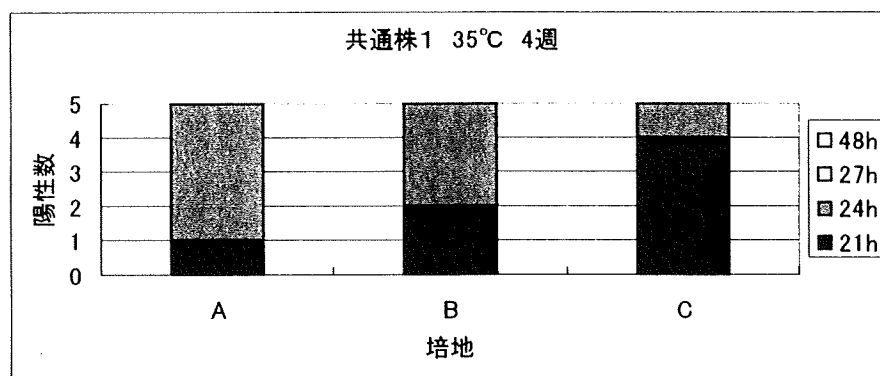
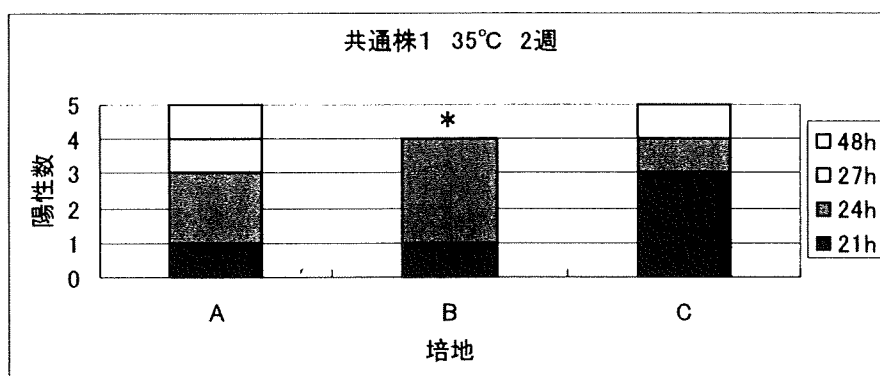
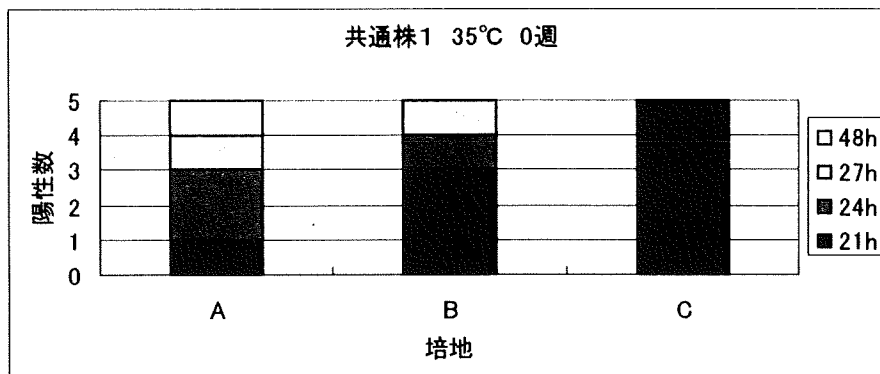
コロニー数計測 (色別に)、コロニー及びハローの観察

↓

結果の記録

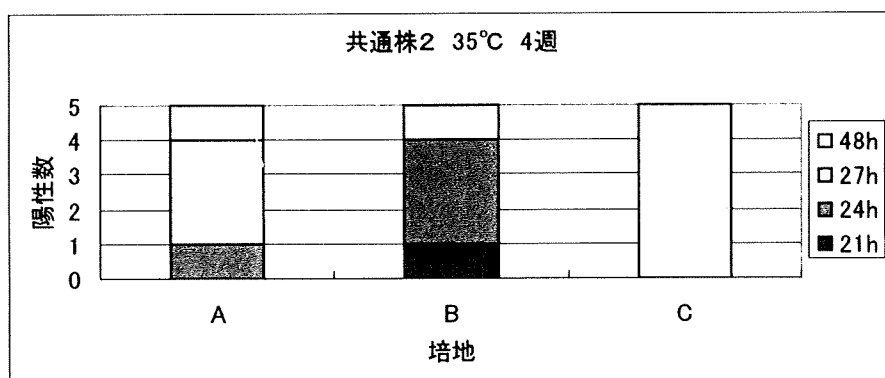
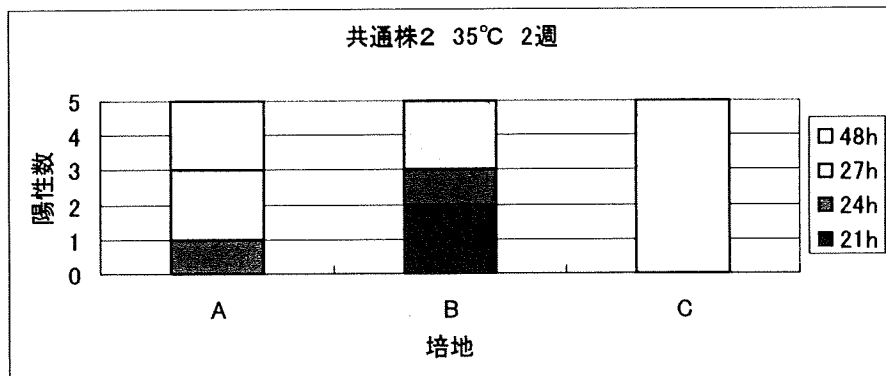
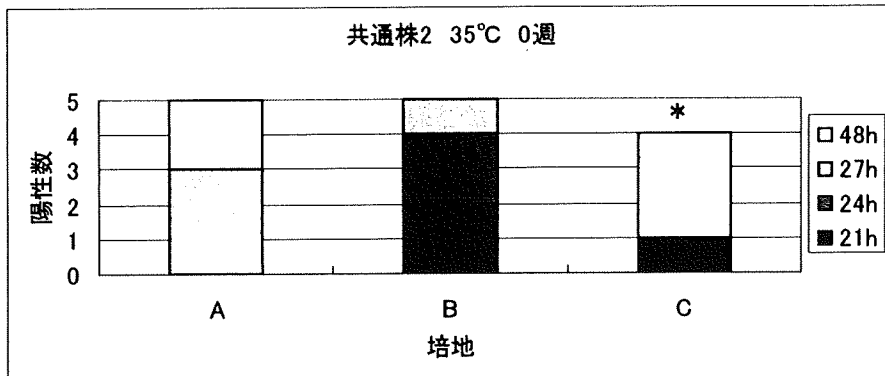
図1. 酵素基質培地寒天平板保存試験の結果

図1-1 共通株1 35°C



\* : 1試験機関で希釈過剰による判定不能

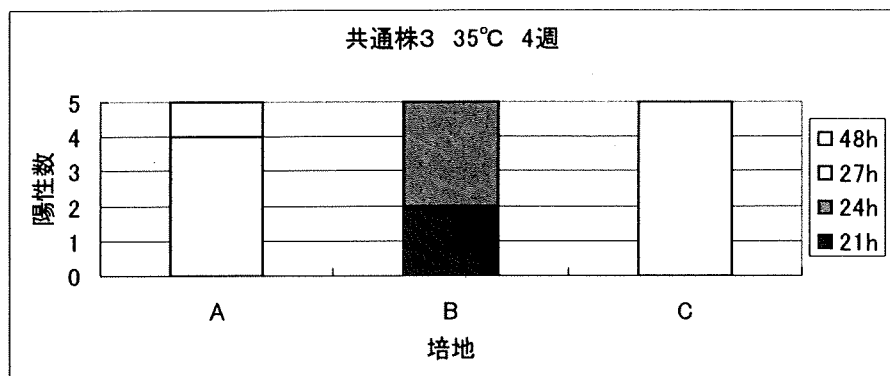
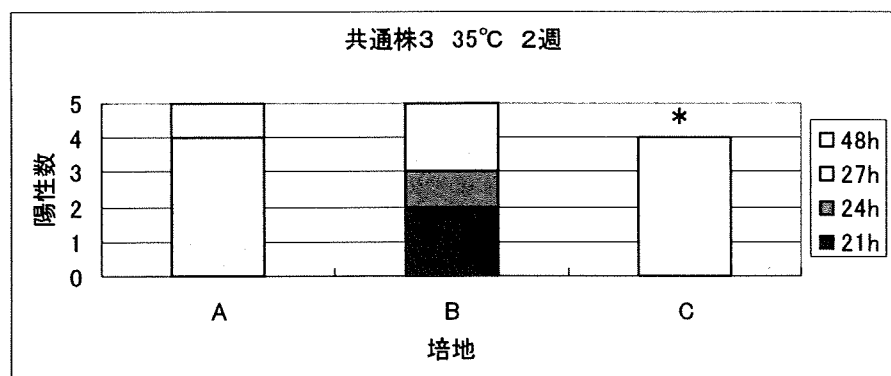
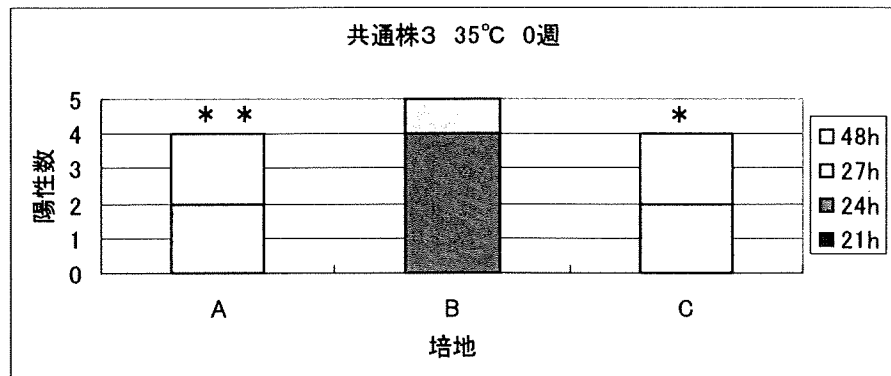
図1-1続き 共通株2 35°C



\* : 1試験機関で希釈過剰による判定不能



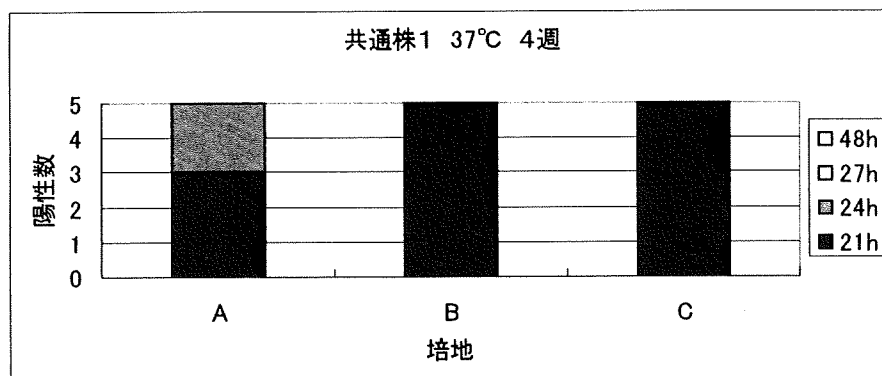
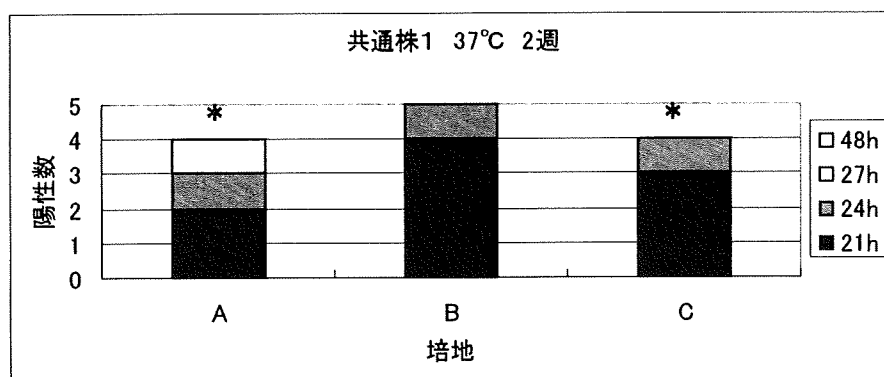
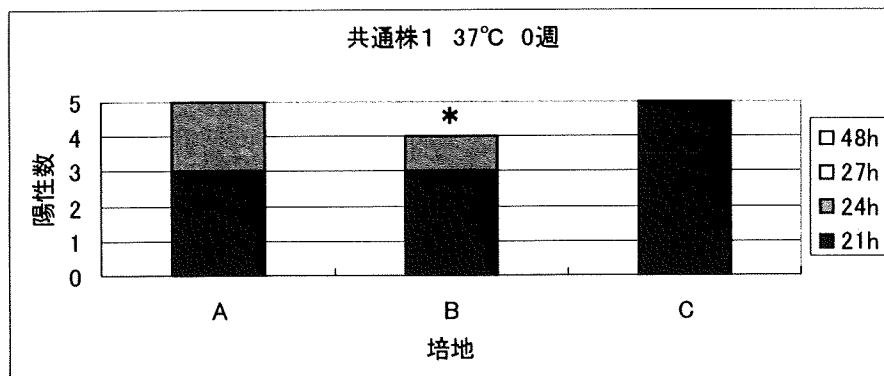
図1-1 続き 共通株3 35°C



\* : 1試験機関で希釈過剰による判定不能

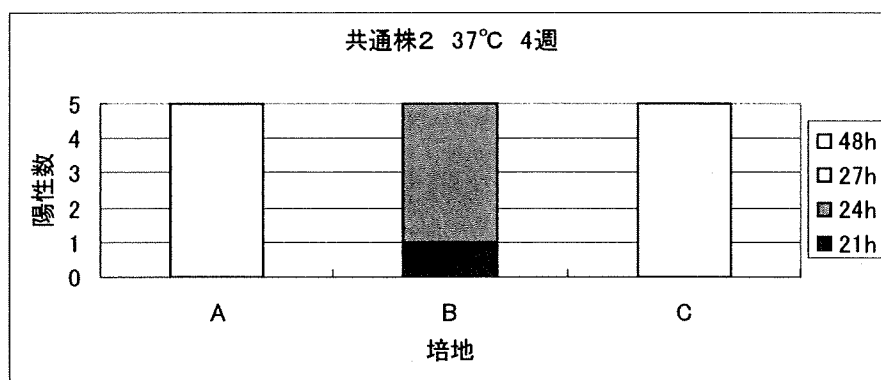
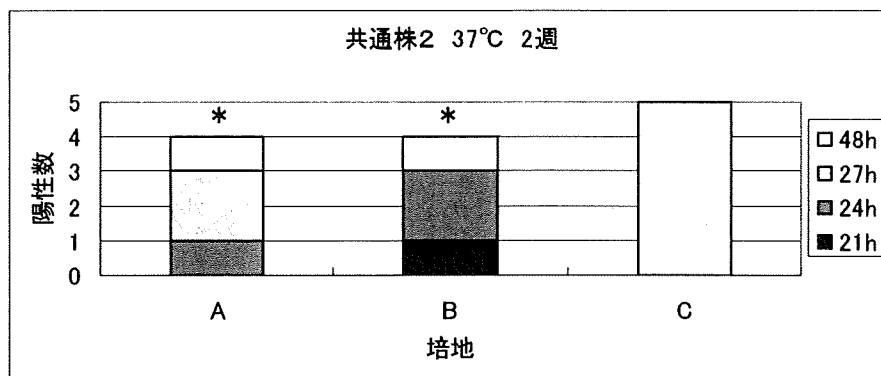
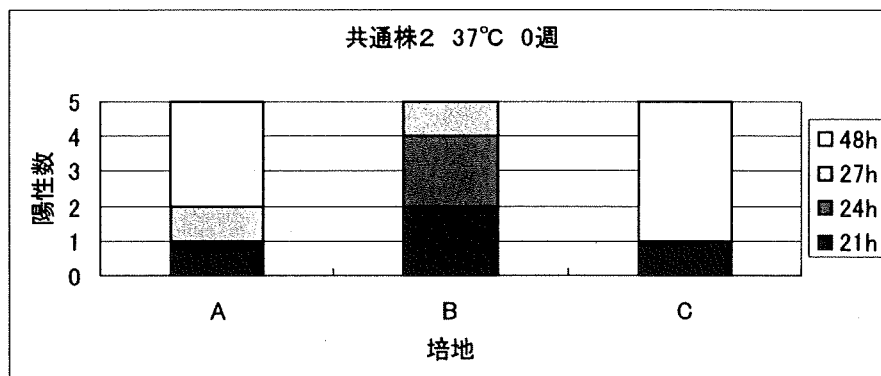
\*\* : 1試験機関で48時間以内に全集落が典型的とならなかった

図1-2 共通株1 37°C



\* : 1試験機関で希釈過剰による判定不能

図1-2 続き 共通株2 37°C



\* : 1試験機関で希釈過剰による判定不能

図1-2 続き 共通株3 37°C

