



図4. ボツリヌスC型およびD型トキソイド・毒素免疫ヤギの抗体価推移(ELISA価)

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食品微生物研究科	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	課長
	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	研究主任
	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
	下島優香子	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	主任
	門田修子	国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部	
	竹村 塁	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
	三山九美	財団法人日本冷凍食品検査協会 東京事業所	
	吉田朋高	財団法人食品分析開発センター SUNATEC	

研究要旨

脳脊髄膜炎・流産・敗血症等を引き起こす人獣共通感染症であり、発症時の致命率は20～30%に上るリステリア症の原因菌である *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ている。人への感染経路は主に本菌による汚染食品の摂取と、母体からの垂直感染及び産道感染であり、高齢者や糖尿病患者などの免疫弱者、乳幼児及び妊産婦がハイリスク群とされている。リステリア症の原因食品としてはナチュラルチーズや食肉製品、サラダなどのいわゆる ready-to-eat 食品が多い。欧米では過去数十年に亘ってこれら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例ほどの散発例が発生しているが、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、原因食品が特定されないことが多い。現在わが国で定められている食品中におけるリステリアの試験方法は乳及び乳製品を対象とした通知法であるが、その試験法が準拠している国際酪農連盟（IDF）の試験方法は数年前に変更され、International Standard Organization (ISO) の試験法に合流している。多くの食品を海外から輸入しているわが国においては、様々な食品汚染細菌の規格基準及び試験法に関して、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。そのため、国際的に整合性のある本菌の標準試験法を新しく定めることが急務となっている。本研究では、平成20年度に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、国内の新規リステリア

標準試験法として ISO 法を採用することとした。その上で本菌の分離培養及び純培養に用いる寒天平板の種類や培養温度、確認試験の代替方法など数箇所の変更・検討事項について純培養の菌液を用いて複数の研究機関で同等性の検証を行い、作業部会案を作成した。平成 21 年度には、作業部会案に従って 2 種類の食品に人工的に添加した本菌の回収を行い、国際的に知られているハイリスク食品であるナチュラルチーズと同様に、わが国特有の食品であるマグロすきみからの回収が可能であることを確認した。平成 22 年度は、ISO 法におけるリステリア試験法及びその修正法の完全逐語訳を作成した上で、原法との同等性を検証した事項について変更・修正を加え、最終的な標準試験法を作成した。

A. 研究目的

Listeria monocytogenes (以下リステリア) は脳脊髄膜炎・流死産・敗血症等を引き起こす人獣共通感染症リステリア症の原因菌であり、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ている。人への感染経路は主に本菌による汚染食品の摂取と、母体からの垂直感染及び産道感染であり、糖尿病などの基礎疾患を持つ人、妊産婦、高齢者等がハイリスク群とされている。本菌は、食肉や魚介類及びその加工品、乳製品、サラダなど惣菜類等様々な食品から分離されている。また、本菌は食塩耐性、低温増殖性等の環境抵抗性を有し、食品製造工程での二次汚染、冷蔵、食塩添加等の保存方法による増殖の制御は困難である。欧米では数年毎に非加熱喫食食品（いわゆる ready-to-eat 食品）を原因とするリステリア症の集団事例が報告されており、その原因食品もナチュラルチーズ、ホットドッグ、サラダ、ローストビーフ等多岐に亘る。わが国は、過去に確認された集団事例は 1 例のみであるが、年間約 80 例の散発例があると推定される。その原因食品はほとんど同定されていないが、輸入食品を含む様々な国内流通食品から本菌が分

離されており、今後社会の高齢化に伴い、患者数の増加が懸念されるため、輸入検疫の強化や製造工程における高度衛生管理の普及、消費者への啓蒙を含めたリステリア症発生防止策が重要となる。しかしながら、現在国内で用いられている食品からのリステリア試験法（通知法）は、1993 年に定められた乳・乳製品の検査法であり、その試験法が準拠していた国際酪農連盟（IDF）の試験法（IDF143A）は、数年前に International Standard Organization (ISO) の定める試験法に合流している。一方、輸入検疫時の微生物試験において、その試験法の科学的整合性が諸外国との間で問題になることがあり、わが国でも当該試験法を国際的な試験法と同等のものにするべく、早急に標準的試験法を検討・改訂する必要がある。本研究では、国内の状況を考慮した、国際的に整合性のある、食品からのリステリア検出標準試験法を作成することを目的とした。

B. 研究方法

[1]平成 20 年度：各国の試験方法の検討と作業部会案の作成
試験法の検討、作業部会案の作成及び同等

性の検証は、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(平成20年度報告書 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階段希釈して25 μ l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25 μ l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(平成20年度報告書 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100 μ l 或いは *L. monocytogenes* と *L. innocua* 各100 μ l 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。

[2]平成21年度：作業部会案を用いた食品への添加回収試験

1. 使用菌株

Listeria monocytogenes の標準菌株として ATCC19115 株(血清型 4b)を使用した。

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平成21年度報告書 表1に示した。

3. 温度ロガー

輸送中及び培養時の温度を記録するため、同一条件に設定した温度トレーサーTL20(3M社製)を用い、30分間隔で温度を記録し、試験終了後にデータを解析した。

4. 食品への *L. monocytogenes* 添加・回収試験(平成21年度報告書 別添1)

リステリアを添加する食品には、国際的にリステリア症のハイリスク食品として知られているナチュラルチーズと、日本特有の食品でその汚染率、汚染菌数が高いことが過去の調査で知られているマグロすきみを用いた。ナチュラルチーズは乳業メーカーの協力により、通常市販製品には実施されている最終製品の加熱殺菌工程を省略した、乳酸菌が生きている状態の国産のカマンベールタイプチーズを冷凍状態で分与を受け、使用直前に解凍して使用した。マグロすきみはメーカーより同一ロットのものを必要量購入し、チーズ、マグロともに *L. monocytogenes* を含まないことを培養により確認した。試料は1検体を10gとし、マグロ検体は東京都健康安全研究

センターで、チーズ検体は国立医薬品食品衛生研究所にて調製し、低菌量群 100-999 CFU/g、高菌量群 1,000-9,999 CFU/g 及び非スパイク群を作成するよう、菌液の接種を行った。各試験機関には、低菌量群各3サンプル、高菌量群各3サンプル及び非スパイク群各3サンプルの合計9サンプルを、温度ロガー及び保冷材とともにクール便にて各機関に到着日を指定して発送し、到着日に試験を開始した。検体調製機関の試験する検体については、試験開始まで温度ロガーとともに4℃で保管した。各検体にそれぞれ Buffered Peptone Water (BPW) 90ml を加え、1分間ストマッキングした(10倍乳剤作成)。10倍乳剤を選択培地3枚に合計1mlとなるよう接種したものを2組つくり、コンラージ棒を用いて塗布した。さらに、10倍乳剤0.1mlを2枚の選択培地に接種し、塗布した。酵素基質培地は37±1℃、PALCAM培地は30±1℃で48時間培養し、典型集落数を計測、菌数を算出した。

5. 統計解析

食品からの微生物試験法のバリデーション方法の確立に向けての試みとして、化学物質分析法で用いられているものと同様の統計解析を実施した。今回実施した、食品からの *L. monocytogenes* の添加回収試験の結果は、食品間、使用培地間及び試験機関間の差の有無について一元配置分散分析、可能なものについては二元配置分散分析により検定を行った。

[3]平成22年度：標準試験法の作成

IS011290-1:1996(定性法)、IS011290-2:1998(定量法)及びそれらの修正法(2004)について、本文及び annexA から D を含む全文を逐語訳した。また、過去2年間

の作業部会による検討箇所について、その妥当性が確認され、変更が可能であるとされた箇所について記載した。

C. 研究結果

[1]平成20年度

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:平成20年度報告書 図1-1及び1-2、各自株の結果:平成20年度報告書 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(平成 20 年度報告書 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. β 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 β 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、β 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、β 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。

[2]平成 21 年度

平成 20 年度に作成した作業部会案を用いた、2 種の食品からのリステリアの添加・回収試験結果を、平成 21 年度報告書 45-46 ページに示した。マグロすきみへの添加菌量は低菌量が 510 ~ 520 CFU/g、高菌量が 5,100 ~ 5,200 CFU/g であり、チーズへの添加菌量は低菌量が 120 ~ 150 CFU/g、高菌量が 1,200 ~ 1,500 CFU/g であった。未接種群のマグロ、チーズ共に *L. monocytogenes* はみられなかったが、いくつかの検体からごく少数の *L. innocua* や *L. ivanovii* が検出された。また、チーズについて 1 機関で試験開始前の輸送・保存期間中での温度逸脱があったためそのデータを除外した他(平成 21 年度報告書 図 1)、他の機関で高菌量接種のチーズ検体の菌数において測定不能のものが各培地につき 1 検体あった。

集計結果は、各試験機関を E、F、G 及び H とし、2 種の酵素基質培地をそれぞれ培地 A、培地 B、選択培地を培地 C と表記した。各食品、各菌量ともに 3 検体ずつの試験を行ったため、それぞれの培地ごとに対数表記した平均値、標準偏差、最大値及び最小値と、測定菌数を接種菌数で割った補正後の数値とその平均を算出した(平成 21 年度報告書 45-46 ページ)。その結果、約 72 時間の輸送期間中に、チーズ内において低菌量で 6.5 から 8.4 倍、高菌量で 6.1 から 10.8 倍増殖し、マグロすきみ内においては低菌量で 1.2 から 2.9 倍、高菌量で 1.1 から 2.8 倍増殖していた。

回収菌数の統計解析結果において、培地間、食品間に差は見られなかった。一方、試験機関間では、マグロすきみのみ差がある結果が得られた。

各試験機関の検体に同封された温度ロガーから抽出した、試験開始前の輸送・保存中の検体温度の積算時間を平成 21 年度報告書図 1 に示した。チーズでは、温度逸脱のため除外した 1 機関を除く 3 機関において、輸送・保存温度に大きな差は見られなかった。一方マグロすきみでは、G、H の 2 機関が E、F よりも低い温度帯にある時間が長い傾向が見られた。

[3]平成 22 年度

2004 年に発表された修正法を含む定性法及び定量法的全訳を平成 22 年度報告書 添付 1 及び 2 に示した。ISO 原文では、2004 年に公表された修正は主に酵素基質培地である Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA 培地) の使用に関連した部分であるため本文の大幅な書き換えは行っておらず、部分的に変更点を挿入、置換している。そのため、原文には誤解や混乱を生じかねない箇所が随所に見られた。今回は、酵素基質培地の使用により明らかに記述を変えるべきであると思われる箇所については、本文下に [作業部会 注] として記述変更の提案を記載した。記載箇所は、ISO11290-2 の訳である定量的試験法本文の 4 箇所である。また、(1) わが国でこれまで使用されており、過去 2 年間の本研究において ISO 法で使用されている ALOA 培地との同等性が確認された CHROMagar *Listeria* の使用、(2) 平成 20 年度の本研究で、ISO 法で規定されているトリプトン・ソーヤ・イーストエクストラクト寒天 (TSYEA) との同等性を確認したトリプトケ

ースソイ寒天の使用、及び (3) 平成 20 年度の本研究で、*L. monocytogenes* の鑑別試験である CAMP 試験との同等性を確認した β リジندیスクの使用について、文末に「リステリア標準試験法での追加、変更点」として記載した。これらの追加・変更点については作業部会での検討内容を、厚生労働省及び国内の食中毒菌の専門家から構成された「食品からの微生物検査標準法検討委員会」に提出し、そこでの討議、承認を経て決定した。微生物試験に関連した専門用語の翻訳は、本研究班の別の分担研究である「バリデーション作業部会」による用語集に則って行った。

D. 考察

3 年間の本研究により、わが国における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した。その際に、国内の状況に合わせて ISO 法に追加、改変すべきであると思われる点がいくつかみられた。特に、ISO 法で規定されている酵素基質培地である ALOA 培地と、わが国で以前から用いられている酵素基質培地である CHROMagar *Listeria* の同等性については、過去 2 年の本研究において純培養菌を用いた接種試験、寒天平板培地を長時間保管した場合の保存試験、諸外国で知られているハイリスク食品であるナチュラルチーズと、ある程度の汚染率が知られているわが国独自の食品であるマグロすきみへの添加回収試験を通じ、検討を行ってきた。その結果、2 種の酵素基質培地からの回収率に大きな差は認められず、また、フランスにおける

公的バリデーション機関である AFNOL でも両培地の同等性評価を実施し、差がないとの結論を出していることから、2種の培地のどちらを用いてもよいとの結論を得た。また、*L. monocytogenes* としての確認試験用の純培養を行う培地についても、国内で一般に市販されているトリプトケースソイ寒天の使用を認めた。*L. monocytogenes* と他のリステリア属菌との鑑別に重要な CAMP 試験には、その溶血性の判定に *Staphylococcus aureus* と *Rhodococcus equi* の2菌株が必要であり、試験所によっては菌株の維持が困難であるところもあるため、簡易に溶血性の判定が行えるβリジンディスクの使用についても検討し、CAMP 試験との同等性が確認された。以上の結果から、わが国における食品からのリステリア標準試験法として、今回提案した方法を採用することに問題はないと思われた。

E. 結論

国際的に互換性のある食品からのリステリア試験法として IS011290-1 及び2を基礎とした標準試験法案を作成し、国内の状況にあわせた改変点について検討した。「食品からの微生物検査標準法検討委員会」での討議を経て、最終的な試験法を策定した。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

井田美樹、金子誠二、仲真晶子、岡田由美子、樋脇弘、江渕寿美、中村寛海、大塚佳代子、竹村墨、長田共未、三山九美、吉田朋高、五十君静信 リステリア検査用酵素基質培地の検討 第30回日本食品微生物学会 東京

2009年10月

M. Ida, Y. Shimojima, S. Kaneko, Y. Higuchi, A. Nakama, A. Kai.

Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated from retail beef, pork and poultry in Japan.

17th International Symposium on Problems of Listeriosis. ポルト市 2010年5月

Y. OKADA, H. SUZUKI, S. MONDEN, S. IGIMI, N. OKADA.

RpoN, the alternative sigma factor, is associated with the growth phase transition and pathogenesis in *Listeria monocytogenes*.

17th International Symposium on Problems of Listeriosis. ポルト市 2010年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. *L. monocytogenes* 使用菌株

菌株番号	血清型	由来	備考
共通株 1	4b	鶏肉	
共通株 2	3a	鶏もも肉	弱溶血性で増殖が遅い
共通株 3	1/2 a	鶏もも肉	弱溶血性で増殖が遅い
各自株 1	4b	ATCC19115	
各自株 2	1/2 b	イベリコハム	
各自株 3	1/2 a	辛子明太子	
各自株 4	3a	辛子明太子	
各自株 5	4b	ATCC19115	各自株 1 と同じだが別途購入したもの
各自株 6	1/2 c	ATCC7644	
各自株 7	4ab	鶏肉	
各自株 8	4b	漬物	
各自株 9	1/2 a	サラミソーセージ	
各自株 10	4b	ホタテ	
各自株 11	1/2 b	ラックスハム	
各自株 12	3b	ラックスハム	
各自株 13	1/2 c	チーズ	
各自株 14	1/2 c	チーズ	
各自株 15	1/2a	生ハム	
各自株 16	4b	生ハム	
各自株 17	1/2a	チーズ	
各自株 18	1/2b	チーズ	
各自株 19	4b	エシャロット	
各自株 20	1/2a	鶏肉	
各自株 21	1/2b	辛子明太子	
各自株 22	1/2b	食品製造環境	
各自株 23	3b	乳製品	
各自株 24	3c	辛子明太子	

各自株 2 5	4b	鶏内臓
各自株 2 6	4b	鶏肉ミンチ
各自株 2 7	4e	食品製造環境
各自株 2 8	1/2a	スライサー
各自株 2 9	3 a	サーモン
各自株 3 0	3b	スモークサーモン
各自株 3 1	1/2a	食品製造環境
各自株 3 2	1/2b	フレッシュスライス
各自株 3 3	4b	スモークサーモン
各自株 3 4	1/2b	たらこ
各自株 3 5	1/2a	ナチュラルチーズ
各自株 3 6	1/2a	マリネスライス
各自株 3 7	1/2a	チーズ
各自株 3 8	4e	鶏肉
各自株 3 9	1/2c	鶏肉
各自株 4 0	1/2a	鶏肉
各自株 4 1	1/2b	漬物
各自株 4 2	1/2c	鶏肉
各自株 4 3	1/2b	漬物
各自株 4 4	4b	漬物
各自株 4 5	1/2a	臨床
各自株 4 6	1/2c	サラミソーセージ
各自株 4 7	1/2b	サラミソーセージ
各自株 4 8	1/2c	生ハム
各自株 4 9	1/2a	串カツ
各自株 5 0	1/2b	食品製造環境
各自株 5 1	1/2 a	生ハム
各自株 5 2	3b	サラミソーセージ

表 2. *L. innocua* 及び *L. ivanovii* 使用菌株

菌種	菌株番号	由来	備考
<i>L. innocua</i>	T1	牛肉	
	F1	ATCC33090	
	O1	ATCC33090	F1と同じだが別途購入したもの
	S1	漬物	
	K1	ホタテ	
<i>L. ivanovii</i>	T2	ATCC19119	
	F2	ATCC19119	
	O1	食品製造環境	
	S2	不明	
	K2	不明	

表 3. 使用選択培地

培地名	メーカー	備考	典型的集落
酵素基質培地			
Listeria Selective Agar Base acc. OTTAVIANI and AGOSTI 及びサプリメント	MERCK	自家調整	白いハローを持つ青色コロニー
Listeria Selective Agar acc. OTTAVIANI and AGOSTI	MERCK	寒天平板(生培地)	白いハローを持つ青色コロニー
クロモアガーリステリア(サプリメント添付)	CHROMagar	自家調整	白いハローを持つ青色コロニー
PALCAM agar base 及びサプリメント	OXOID	自家調整	黒いハローを持つ灰色コロニー
Listeria selective agar base (Oxford Formulation) 及びサプリメント	OXOID	自家調整	黒いハローを持つ灰色コロニー

表 4. 国内外で用いられているリステリア試験法の比較

表 4-1. リステリア試験法の比較

	日本 (IDF) 衛乳第 169 号	ISO (ISO11290-1:2004(E))	FDA	USDA*
試験液の調製 (前増菌)	検体 25g+EB 225mL	検体 Xg+HFB 9XmL	検体 25g+BLEB225mL (30°C、4 時間)	検体 25g+UVM 225mL
			サリチン添加	
一次増菌培養	30°C、48 時間	30±1°C、24±3 時間	30°C、20 時間	30±2°C、22±2 時間
一次増菌液接種		FB10mL に 0.1mL		FB に 0.1mL
二次増菌培養		37±1°C、48±3 時間	30°C、24 時間	35±2°C、26±2 時間
選択分離培地塗沫	OX 又は PAL	ALOA*1 及び OX*2 又は PAL*2	OX、PAL、MOX 他	MOX
選択分離培養	30~35°C、24~48 時間	37±1°C*1、30~35°C*2、24~48 時間	30~35°C、24~48 時間	35±2°C、22±4 時間
集落判定	疑わしい集落 5 個釣菌	疑わしい集落 5 個釣菌	疑わしい集落 5 個釣菌	疑わしい集落 20 個釣菌
純培養	TSYEA 30°C、24 時間	TSYEA 35~37°C、18~24 時間	TSYEA 30°C、24±2 時間	HL (溶血性試験) 35±2°C、22±4 時間
確認試験	①斜光法 ②グラム染色 ③カタラーゼ試験 ④VP 反応 ⑤運動性試験 ⑥糖分解試験 ⑦溶血性・CAMP 試験 ⑧血清型別試験	①斜光法 (オプシオン) ②グラム染色 ③カタラーゼ試験 ④運動性試験 (オプシオン) ⑤糖発酵試験 ⑥溶血性・CAMP 試験	①グラム染色 ②カタラーゼ試験 ③VP 試験 ④運動性試験 ⑤糖発酵性試験 ⑥溶血性・CAMP 試験 ⑦遺伝子試験 ⑧血清型別試験	①検鏡 (形態・運動性) ②同定キット ③CAMP 試験 ④遺伝子試験
試験期間	最短：4 日 最長：6 日	最短：5 日 最長：8 日	最短：4 日 最長：8 日	最短：4 日 最長：11 日

* : USDA 法の二次増菌培地は MOPS-BLEB を用いてもよい。培養温度・時間は 35±2°C、18~24 時間

表 4-2. 増菌培地・培養温度及び時間等の比較

		日本 (IDF) 衛乳第 169 号	ISO (ISO11290-1:2004(E))	FDA	USDA
①	増菌培地	EB 培地	HFB 及び FB	BLEB	UVM 及び FB 又は MOPS-BLEB
②	増菌	一次増菌のみ	一次 (HFB)、二次 (FB)	前増菌 (添加剤無 4 時間) 一次、二次共に BLEB	一次 (UVM) 二次 (FB 又は MOPS-BLEB)
③	増菌培養温度	30℃	一次 30℃、二次 37℃	一次、二次共に 30℃	一次 30℃、二次 35℃
④	増菌培養時間	48 時間	一次 24 時間、二次 48 時間	一次 20 時間、二次 24 時間	一次 22 時間 二次 FB : 26 時間 MOPS-BLEB : 18~24 時間
⑤	選択分離培地	OX 又は PAL	ALOA* ¹ 及び OX* ² 又は PAL* ²	OX、PAL、MOX 等	MOX
⑥	選択分離培養温度	30~35℃	37℃* ¹ 、30~35℃* ²	30~35℃	35℃
⑦	確認試験	ISO 法に VP 試験及び 血清型別試験追加	斜光法及び運動性試験 (オプション)	IDF 法から斜光法を抜き 遺伝子試験を追加	HL で溶血性確認 同定キット使用 遺伝子試験

表 4-3.試験法の対象食品

日本 (IDF) 衛乳第 169 号	ISO (ISO11290-1:2004(E))	FDA	USDA
<ul style="list-style-type: none"> ・乳及び乳製品 ・命令検査 非加熱食肉製品 (加熱せずに食すものに限る) (イタリア・米国) ソフト及びセミソフトタイプのナチュラルチーズ (イタリア・スイス・デンマーク・フランス) ゴルゴンゾーラチーズ (ソフト及びセミソフトタイプに限る) (イタリア) 食肉製品 (加熱せずに食すものに限る) (スペイン) 	<ul style="list-style-type: none"> ・食品全般 ・家畜飼料 	<ul style="list-style-type: none"> ・食品全般 	<ul style="list-style-type: none"> ・食肉及び食肉加工品 ・卵及び卵製品

表 4-4. 培地・試薬・添加剤

4.1 増菌培地・添加剤			
略名	正式名/商品名	メーカー	備考
①EB	: Listeria Enrichment Broth Base acc.to FDA(IDF-FIL)	: Merck 他*4	: ⑧添加
②LEB*1	: Listeria Enrichment Broth(LEB)acc.to FDA/IDF-FIL	: Merck 他*4	: ①の代用品、添加剤入り
③HFB*2	: half Fraser broth (Base)	: Merck, Oxoid, ビオメリュー等	: ⑨-1,2 添加
④FB*2	: Fraser broth (Base)	: Merck, Oxoid, ビオメリュー等	: ③+⑨-2 添加
⑤UVM	: UVM-Listeria Selective Enrichment Broth, modified	: Merck 他*4	: ⑩添加
⑥MOPS-BLEB	: (N-Morpholino)propanesulfonic Acid 加 BLEB	: 詳細不明	: 詳細不明
⑦BLEB	: Buffered Listeria Enrichment Broth Base(FDA/BAM 1995)	: Merck 他*4	: 前増菌(4h)後⑩添加
⑧EB 添加剤*3	: Listeria Selective Enrichment Supplement acc.to FDA-BAM 1992	: Merck 他*4	: 塩酸アクリフラビン 7.5mg サイクロヘキシミド 25mg ナリジクス酸塩 20mg
⑨FB 添加剤	: Fraser Listeria Supplement	: Merck 他*4	: 1.クエン酸鉄(III)アンモニウム 500mg 2.アクリフラビン 12.5mg ナリジクス酸塩 10mg
⑩UVM 選択剤	: UVM-II Supplement	: Merck 他*4	: 塩酸アクリフラビン 13mg
⑪BLEB 添加剤*3	: Listeria Selective Enrichment Supplement acc.to FDA-BAM 1995/IDF-FIL	: Merck 他*4	: 塩酸アクリフラビン 5mg サイクロヘキシミド 25mg ナリジクス酸塩 20mg
<p>*1 : ①EB の代わりに使用可能</p> <p>*2 : ビオメリュー社製は添加剤入り</p> <p>*3 : 基礎培地 500mL に 1 バイアル添加、組成 (備考) は 1 バイアルあたり。</p> <p>*4 : 代表的なメーカーとして Merck 他とした</p>			

4.2 選択分離培地・添加剤

略名	正式名/商品名	メーカー	備考
①OX	: Oxford Listeria Selective agar, Base	: Merck 他*4	: ⑤添加
②PAL	: PALCAM Listeria Selective agar Base	: Merck 他*4	: ⑥添加
③ALOA*1	: Chromocult Listeria Selective Agar Base acc.to Ottaviani and Agosti	: Merck 他*4	: ⑦-1,2 添加
④MOX*2	: Modified Oxford (Oxford Listeria Selective agar, Base)	: Merck 他*4	: ①+⑧添加 (⑤の代わり)
⑤OXA 添加剤*3	: Oxford Listeria Selective Supplement	: Merck 他*4	: シクロヘキシミド 200mg 硫酸コリスチン 10mg アクリフラビン 2.5mg セフトetan 1.0mg ホスфомイシン 5.0mg
⑥PAL 添加剤*3	: PALCAM Listeria Selective Supplement acc.to VAN NETTEN et al.	: Merck 他*4	: 硫酸ホ°リミキシン B5.0mg セフトanジム 10.0mg アクリフラビン 2.5mg
⑦ALOA 添加剤*3	: 1.Chromocult Listeria Selective Supplement 2.Chromocult Listeria Enrichment Supplement	: Merck 他*4	: 1.ナリジキシン酸 20mg セフトanジム 20mg 硫酸ホ°リミキシン B76, 700IU アンホリン B10mg 2.リンチン溶液 40mL
⑧MOX 添加剤	: 詳細不明	: 詳細不明	: 1%コリスチン溶液 1mL 1%モキサラクタム溶液 2mL

			寒天 2.0g
<p>*1：生培地（添加剤入り） Merck : クロモプレートリステリア ビオメリユー：リステリア OAA 寒天培地</p> <p>*2：基礎培地は①OXA と同じ。添加剤を⑧MOX 添加剤に変更</p> <p>*3：組成は培地 500mL に対して</p> <p>*4：代表的なメーカーとして Merck 他とした</p>			

4.3 確認試験用培地			
略名	正式名/商品名	メーカー	備考
①TSYEA	: トリプタイケ-スライ・ブロス+酵母エキス+寒天	: 自家調製	: 純培養用培地
②HL	: 馬血液寒天重層培地	: 自家調製	: 溶血性確認培地
③BHIB	: Brain Heart Infusion Broth	: 栄研、日水等	: 運動性確認培地

表 5. β リジンディスク試験と CAMP 試験の結果比較

試験機関	共通株		各自株	
	一致	不一致	一致	不一致
T	3	0	10	0
F	1	2	10	0
O	3	0	10	0
S	1	2	10	0
K	1	2	10	0