

令和 5 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
分担研究報告書

リステリア属菌定性及び定量試験法（技術仕様書）の策定に関する研究

研究代表者	岡田由美子	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
研究協力者	下島優香子	東洋大学	食環境科学部
	井田美樹	東京都健康安全研究センター	微生物部
	西野由香里	東京都健康安全研究センター	微生物部
	三橋華子	東京都健康安全研究センター	微生物部
	都丸亜希子	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部
	西田智子	国立医薬品食品衛生研究所	食品衛生管理部

研究要旨

近年、諸外国では食品製造環境のふき取り検査等において、リステリア属菌を対象菌とすることで、食中毒菌であるリステリア・モノサイトゲネスの汚染指標として施設・設備の衛生環境の維持を図っている。日本国内でもリステリア属菌試験法について技術仕様書（Technical Specification; TS）として整備する目的で、食品からの微生物標準試験法検討委員会において定性試験法（NIHSJ-40TS）並びに定量試験法（NIHSJ-41TS）の作成を行っている。今年度の本研究では作業部会案について実用性を高める目的で、作業部会保有のリステリア属菌菌株を用いて、各種培地上の集落の性状について解析を行うと共に、更に多くの菌株を用いて検討すべき項目の抽出を行った。

A. 研究目的

Listeria monocytogenes（以下 Lm）を原因菌とするリステリア症は脳脊髄膜炎、敗血症及び流死産を引き起こし、その場合の致命率は 20%前後とされている。ヒトへの感染経路は主に汚染食品の喫食によるものであり、原因食品としては乳製品、肉製品、魚介類、野菜果物、惣菜等様々であることが知られている。また、本菌を含むリステリア属菌は 4℃以下でも増殖可能であり、冷蔵保存した食品でも増殖が起こりうる。欧米諸国では頻繁に Lm による集団事例が発生していることから、Lm 汚染の防除が食品衛生上の最重要課題のひとつとされており、

リステリア属菌全体を衛生指標菌とした食品製造環境の衛生管理の実施が国際標準となっている。食品中微生物の国際標準試験法を作成している国際標準化機構（ISO）の TC34/SC9 においても、2017 年にリステリア・モノサイトゲネスの試験法である ISO 11290-1 及び 2 を改訂した際に、その対象にリステリア属菌も含めている。現在日本国内ではリステリア属菌の試験法は整備されていないが、諸外国への食品輸出の際にリステリア属菌を試験対象とした製造施設のふき取り検査等による衛生管理が要求される可能性がある。また、令和 3 年度の HACCP 完全制度化に伴い、日本国内でも

製造工程管理項目の一つとしてリステリア属菌試験の実施を考慮する事業者が増えている。本研究では、国際的な試験法と整合性のあるリステリア属菌の定性及び定量試験法について、ISO 11290-1：2017 及び 2：2017 に準拠し、技術仕様書としての作成を行った。

B. 研究方法

1) リステリア属菌試験法案の検討

第 80 回及び第 81 回食品からの微生物標準試験法検討委員会において、リステリア属菌試験法作業部会案について討議を行った。それらの内容に基づき、リステリア属菌試験法作業部会においてそれぞれが保有するリステリア属菌菌株の性状（各選択分離培地及び確認試験用培地上の集落性状、溶血性等）を試験・確認すると共に、今後データを集積すべき点についての討議を行った。

C. 研究結果

1) リステリア属菌試験法案の検討

第 80 回食品からの微生物標準試験法検討委員会（令和 5 年 10 月 19 日開催）において、NIHSJ-40TS 及び 41TS の作業部会案（ST2 案）についての説明を行ったところ、①NIHSJ/40TS（定性試験法）における二次増菌培養について、Lm とそれ以外の菌種で手順の記載を分けるのではなく、リステリア属菌の検出手順について記述する方が、試験者にとって理解しやすいのではないか②NIHSJ-41TS（定量試験法）においては、準拠する ISO 11290-2：2017 と同様に酵素基質培地のみを用いることとしているが、リステリア属菌の中に酵素基質培地上での発育が抑制されるものがあることから、NIHSJ-40TS と同様に酵素基質培地とその他の選択分離培地の併用とすべきではない

か③血液寒天培地を用いる場合には、使用する血液の動物種を指定したほうがよいのではないかと、との意見が出された。また、第 81 回食品からの微生物標準試験法検討委員会（令和 6 年 2 月 29 日開催）においては、①確認試験の一つである運動性試験に関し、旋回運動が 37℃培養菌でも観察可能か②学術的な細菌分類と食品の検査は主旨が異なるため、本試験法の目的を明確にした上で対象となる菌群の範囲をどのように設定するか、との質問がなされた。それらの意見を元に作業部会案の再検討を行い、試験法案に反映させ、二次培養手順についての記載を変更した（表 1）。溶血性試験に用いる血液の動物種については、ISO 11290 では「羊、仔牛又は牛」とされている。一方、国内で一般的に入手可能な血液の動物種には羊、馬、ウサギ等が挙げられる。作業部会内でのこれまでの経験上溶血性試験に用いる血液は羊が最も適していたことから、羊血液を用いる旨を記載することとした。また、NIHSJ-41TS における酵素基質培地とその他の選択分離培地の併用については、作業部会内での保有菌株を用いた集落形成性の比較検討を行った（表 2）。今回用いた 7 菌種のリステリア属菌のうち、*Listeria seeligeri* の一部の菌株が酵素基質培地の 1 種類で集落形成性が低いことが示された。同様に、*Listeria grayi* 及び *Listeria newyorkensis* でも一部の菌株がその他の選択分離培地において集落形成能が低い結果を示した。また、Lm の一部の菌株は酵素基質培地上でハローの形成能が低く、それらの菌株は血液寒天培地上での溶血性も低かった。その他の選択分離培地上の集落色は黄色、灰色及びオリーブ色など多様性があったが、菌種による違いではなく、同一菌種内でも菌株によって異なる色合いを示すこ

とが明らかとなった。運動性試験については今後の検討項目とし、作業部会内での保有菌株を用いて 25℃から 37℃での運動性を確認することとなった。

D. 考察

リステリア属菌の性状、挙動が Lm と同様であることから、欧米を中心とする諸外国では近年、食品製造環境におけるリステリア属菌のモニタリングを実施し、食品媒介リステリア症のリスク低減をはかっている。日本国内でも、「食品からの微生物標準試験法検討委員会」において、ISO 11290-1:2017 及び ISO 11290-2:2017 に準拠してリステリア属菌定性試験法 (NIHSJ-40TS) 及び定量試験法 (NIHSJ-41TS) を技術仕様書として整備することとなった。今年度の研究と食品からの標準試験法検討委員会における討議から、作業部会案の一部について、作業手順を理解しやすくなるよう修正すると共に、これまでの経験から確認試験で明確な結果を得られると思われる培地組成を明記する等の変更を行った。一方、今年度の検討委員会での指摘事項に、定量試験における酵素基質培地とその他の選択分離培地の併用、運動性試験における 37℃での運動性の有無等、検討にある程度の菌株数が必要となる項目も含まれており、これらについては次年度の検討項目となった。更に、リステリア属菌試験の確認試験である鏡検について、グラム染色を実施する場合があるが、リステリア属菌の染色性を variable とする文献があることから、ISO 7218:2007 に記載されているグラム染色の代替法である劉氏の方法も含め、保有菌株を用いた検討も今後の課題と考えられた。

食品製造環境におけるリステリア属菌の存在が、最終製品を汚染しうる Lm の汚染指標として大変有用であることは、既に国際的に認知されている。現在、我が国は国内で製造された食品の輸出を強化しており、最終製品の衛生管理のみでなく製造施設における衛生管理についても国際標準を取り入れる必要性が高まっている。また、バイオフィルム形成やパーシスター株の存在によって食品製造環境に長期的に生残するリステリア属菌の汚染防止、除去等を徹底することにより、食品製造施設の衛生レベルを高く保つことができられることから、我が国でも食品製造環境でリステリア属菌をモニタリングすることへの関心が高まっている。本研究により当該試験法を技術仕様書として整備することは、国内で完全制度化された HACCP による衛生管理の運用において実用性が高いと考えられた。

E. 結論

食品製造環境におけるリステリア・モノサイトゲネスの汚染指標菌として国際的に重要視されているリステリア属菌の定性法 (NIHSJ-40TS) 並びに定量法 (NIHSJ-41TS) について、選択分離培地上での集落性状及び性状を、作業部会保有株を用いて検討すると共に、更に検討すべき課題を抽出した。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

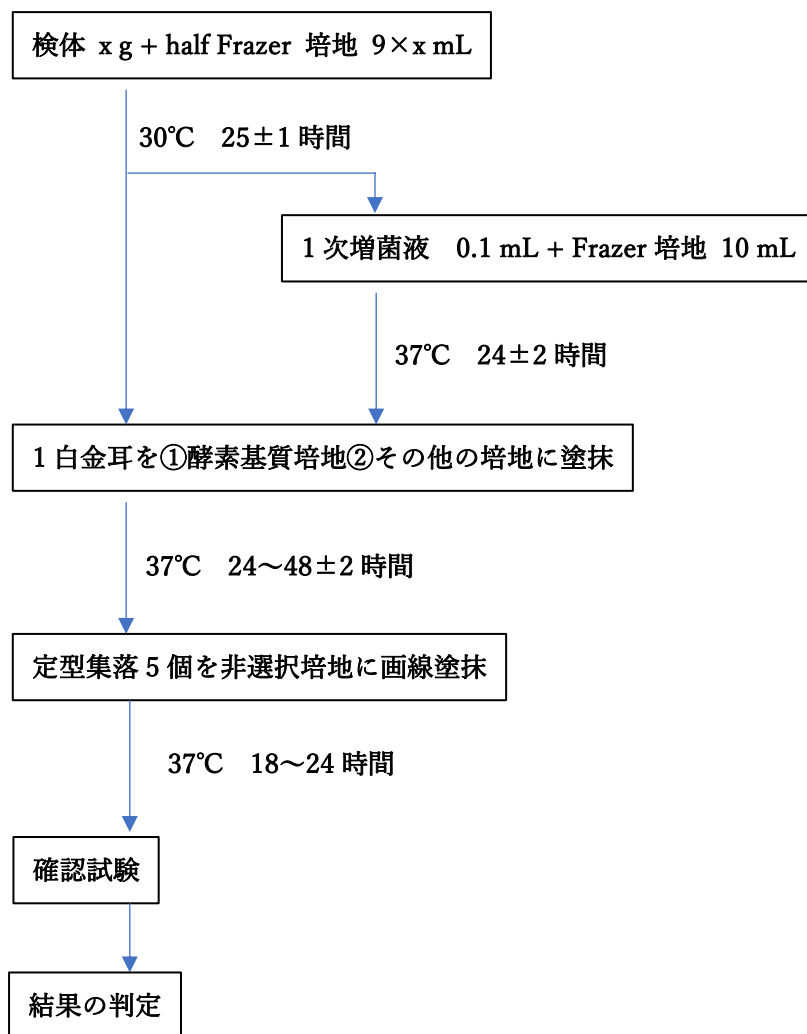


図 1. NIHSJ-40TS (ST2) フロー図

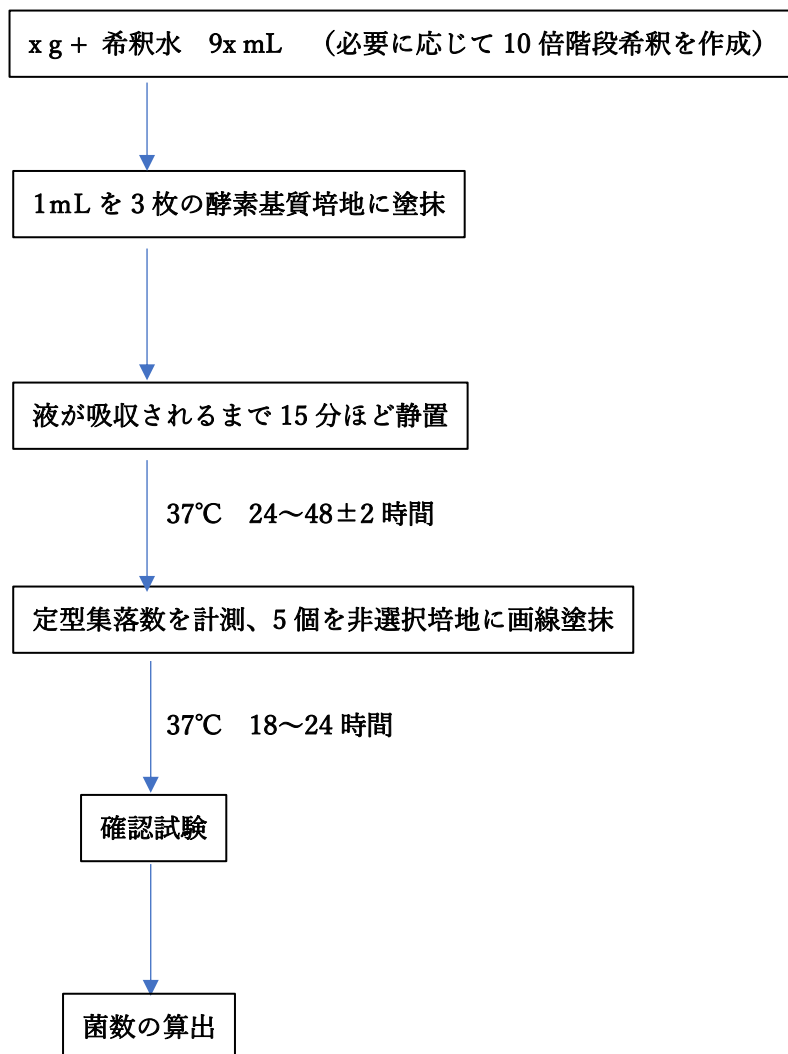


図 2. NIHSJ-41TS (ST2) フロー図

表 1. NIHSJ-40TS の 2 次増菌培養に関する記述の変更

旧	新
5.2.2. 37 °Cで 24 時間 ± 2 時間培養する。<i>L. monocytogenes</i> 以外のリステリア属菌の検出には、更に 24 時間の培養を行うことでより多くの菌種を検出できる。	5.2.2. 37 °Cで 24 時間 ± 2 時間培養する。<i>L. monocytogenes</i> 以外のリステリア属菌の検出には、更に 24 時間の培養を行うことでより多くの菌種を検出できる。

表 2. 作業部会によるリステリア属菌の選択分離培地上の集落形成及び性状試験検討結果

菌種	総菌 株数	酵素基質培地 1			酵素基質培地 2			その他の選択分離培地			血液寒天	
		使用 菌株 数	コロニー	ハロー	使用 菌株 数	コロニー	ハロー	使用 菌株 数	コロニー	ハロー	使用 菌株 数	溶血
<i>L. monocytogenes</i>	13	5	青	小～あり	13	青	小～あり	12	オリーブ/灰色	黒	13	±～+
<i>L. innocua</i>	8	2	青	なし	8	青	なし	8	オリーブ	黒	8	—
<i>L. seeligeri</i>	17	1	青	なし	17	青/ほぼ発育なし	なし	8	オリーブ/灰色	黒	17	—～+
<i>L. welshimeri</i>	8	3	青	なし	8	青	なし	7	オリーブ/灰色	黒	8	—
<i>L. grayi</i>	4	2	青	なし	4	青	なし	4	黄色/発育なし	黒	4	—
<i>L. ivanovii</i>	1	1	青	あり	1	青	あり	1	灰色	黒	1	+
<i>L. newyorkensis</i>	2	2	青	なし	2	青	なし	2	オリーブ/発育なし	黒	2	—
<i>B. cereus</i>	4	2	発育なし	なし	4	ほぼ発育なし	あり/なし	4	白	なし	4	—～+

