

消費者庁食品衛生基準科学研究費補助金
令和6年度分担研究報告書

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

非加熱喫食食品を含む様々な食品から分離され、致死率の高い食中毒を引き起こすリステリア・モノサイトゲネスの食品製造環境における管理は、諸外国における食品衛生上の重要課題となっている。それらの国では、リステリア・モノサイトゲネスを含むリステリア属菌を広く製造環境ふき取り試験における対象とすることで、施設・設備の衛生環境の維持が広く行われている。そのため、近年日本国内でもリステリア属菌を衛生指標とした製造施設のふき取り試験への関心が高まっている。本研究では、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、リステリア属菌試験法における確認試験の範囲を検討するため、作業部会保有のリステリア属菌菌株、購入した標準菌株及び選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株を用いて、確認試験項目における性状について解析を行った。その結果、リステリア属菌の確認試験として TSA 平板上の集落性状、半流動寒天培地を用いた傘状発育の確認及び VP 試験が有用である可能性が示された。

A. 研究目的

リステリア症は *Listeria monocytogenes*（以下 Lm）を原因菌としてヒトに脳脊髄膜炎、敗血症及び流死産を引き起こす食中毒である。これまでに世界各国で発生した集団事例の原因食品としては乳製品、肉製品、魚介類、野菜果物、惣菜等様々なものが挙げられる。本菌は 4℃以下でも増殖可能な低温増殖能を持つこと、バイオフィルムを形

成して食品製造環境に長期間生残することが特徴である。重篤な症状を引き起こす侵襲型リステリア症の致死率は 10～25%とされており、欧米諸国ではリステリア症の発生防止が公衆衛生上の最重要課題の一つとされている。そのため、Lmを含む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的に広く行われている。食品中微生物の国際標準試験法

は国際標準化機構（ISO）の TC34/SC9 において作成されており、作成した試験法は 5 年ごとに見直しされる。2017 年には ISO 11290-1 及び 2 の改定を行い、試験法の対象微生物をリステリア・モノサイトゲネスのみではなくリステリア属菌も含めることとした。現在日本国内ではリステリア属菌の試験法は規定されておらず、当該菌を対象とする食品製造環境のふき取り検査も一般的ではない。しかしながら、食品輸出の際に相手国から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を含む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、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を対象とした環境ふき取り検査の実施を考慮する事業者が増えつつある。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ている。今年度の本研究では、リステリア属菌試験法における確認試験の範囲を検討するため、作業部会保有のリステリア属菌菌株、購入した標準菌株及び選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株を用いて、確認試験項目における性状について解析を行った。

B. 研究方法

1) リステリア属菌試験法案の検討

第 82 回及び第 84 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購入した 8 株のリステリア属菌標準菌株及び保有株、選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成す

る菌株の性状を確認した。検討した項目は、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、カタラーゼ試験、VP 試験、37℃と 30℃における傘状発育の確認とした。選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株については、一部の菌株から Nucleospin Blood Kit (Macherey-Nagel 社) を用いて全 DNA を抽出し、Bacterial 16S rDNA PCR Kit (タカラバイオ株式会社) と Blast を用いた塩基配列解析により菌種同定を行った。更に、リステリア属菌に特異的とされる *prs* 遺伝子の検出を PCR 法により行った。

C. 研究結果

1) リステリア属菌試験法案の検討

第 82 回食品からの微生物標準試験法検討委員会（令和 6 年 8 月 5 日開催）において、NIHSJ-40TS 及び 41TS の作業部会案（ST2 案）について前年度の結果報告を行ったところ、①作業部会メンバー保有株を用いた選択分離培地上の定型集落の検討で、培地ごとの使用菌株数の相違や発育不良株の割合が不明瞭であることから、データの蓄積と表現方法の統一を行うこと②学術的な細菌分類と食品検査で対象とする菌種の違い、及び本検討で対象とする菌種について再確認され、本検討で対象とする菌種についてはワーキンググループにて検討が続けられること、との意見が出された。また、食品衛生におけるリステリア属菌の重要性は、*L. monocytogenes* の衛生指標としてのものであることから、対象とする菌種は、*L. monocytogenes* と同様の挙動、性状を示すものに限定してはどうかとの提案があった。第 84 回食品からの微生物標準試験法検討委員会（令和 7 年 2 月 6 日開催）においては、細胞バンクより購入したリステリア属

菌の標準菌株 8 株を用いた検討の報告（表 1）と、第 82 回検討委員会で報告された、リステリア属菌保有菌株及び選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株を用いた検討に追加データを加えたものが示された（表 2）。委員からは、①検討に定量性をもたせるため、選択分離培地等への画線塗抹ではなく接種菌量の調整を行うべきであること②確認試験等の検討でリステリア・モノサイトゲネス菌株との比較が必要である、との指摘がなされた。今後、定量性を確保するためにミスラ法を用いた検討を行うこととされた。また、現在検討している食品からのリステリア属菌を検出する技術仕様書で対象とする菌の範囲について、学術的な細菌分類とは主旨が異なることから、ISO/TC34/SC9 でも ISO 11290-1 及び 2 の対象としている狭義のリステリア属菌（表 1）とすることが提案された。酵素基質培地とその他の選択分離培地上での集落形成性については、細胞バンクから購入した標準菌株等を用いた比較検討を行った（表 3）。今回用いた 5 菌種 2 亜種（計 8 株）のリステリア属菌のうち、*Listeria grayi* の 2 菌株が ALOA 培地、PALCAM 培地及び TSA 培地上で他のリステリア属菌とは異なる色調を示していた。運動性試験については全ての株で 30℃における傘状発育を示し、一部の株では 37℃でも傘状発育を示していた。VP 試験は 8 株全てで陽性を示した。

選択分離培地上で定型集落と類似の集落を形成する菌株を用いた検討では、類似集落形成菌の多くは TSA 平板上でリステリア属菌よりも着色した集落を形成する傾向が見られた（表 4）。また、リステリア属菌に該当しない菌では VP 反応が陰性で、半流動寒天培地で傘状発育を示さないものが多く見られた。これらの菌株を 16S rDNA

塩基配列解析により同定した結果、*Microbacterium* 属、*Curtobacterium* 属、*Cellulosimicrobium* 属、*Leuconostoc* 属、*Brachybacterium* 属及び *Kocuria* 属に属しており、*Kocuria* 属菌の株は VP 反応陽性で傘状発育を示すなど、*prs* 遺伝子の確認以外の方法でのリステリア属菌との鑑別が困難であった。今回検討した 8 株の中にリステリア属菌は 1 株あり、*prs* 遺伝子を保有しており、VP 反応陽性と半流動寒天培地での傘状発育を示していた。

D. 考察

髄膜炎、敗血症及び流死産を引き起こす侵襲性リステリア症の致死率が 10～25% にもなることから、欧米を中心とする諸外国では近年、食品製造環境での Lm 制御のため、性状、挙動が Lm と類似しているリステリア属菌を衛生管理の指標として、清掃消毒の徹底による除去等を行うことにより、食品製造施設の衛生レベルを維持している。食品の輸出拡大等に伴い、国内でも食品製造事業者による食品製造環境でのリステリア属菌モニタリングへの関心が高まっており、国際的な整合性のあるリステリア属菌試験法を技術仕様書として整備することは社会的ニーズが拡大している状況である。一方で、リステリア属菌の新菌種は近年増加しており、その中には従来の生化学性状試験では分類が不可能で、分子遺伝学的手法が必要とされる菌種も存在する。また、リステリア属菌用の選択分離培地上で定型集落と鑑別困難な類似集落について、食品製造事業者が純培養と各種の確認試験を行うのは困難であると思われる。今年度の本研究では、国際的な標準試験法である ISO 法に準拠したリステリア属菌の試験法を検討しつつ、その確認試験の範囲と手法につ

いて細胞バンクからの購入菌株及び作業部会メンバーの研究室保有菌株を用いて検討を行った。その結果、細胞バンクから購入した標準菌株等はリステリア属菌に定型的な性状を示した。一方、研究室保有のリステリア属菌の中には選択分離培地上での集落形成性が劣る株も見られた。更に、食品から分離されたリステリア属菌類似集落の鑑別に有用と思われる性状を見出し、リステリア属菌の確認試験として、TSA 平板上の集落性状、半流動寒天培地を用いた傘状発育の確認及び VP 試験が有用である可能性が示された。来年度は更に多くの菌株についてデータを集積し、確認試験として必要とされる範囲を確定することで、NIHSJ-40 TS 及び NIHSJ-41TS の最終案を作成する。

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、細胞バンクから購入した標準菌株等、作業部会保有株及びリステリア属菌類似集落を形成する菌株を用いて検討し、確認試験として有用と思われる項目を抽出した。

F. 研究発表

学会発表

岡田由美子、下島優香子、井田美樹、西野由香里、三橋華子、都丸亜希子、西野智子、食品及び製造環境から分離されたリステリア属菌の性状. 第 45 回日本食品微生物学会（2024 年 9 月、青森）

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. リステリア属菌の性状

菌種	古典的な種	運動性	カタラーゼ	VP 反応	溶血性	ラムノース	キシロース	マンニット	タガトース	4℃での発育
<i>Listeria monocytogenes</i>	○	+	+	+	+	+	—	—	—	+
<i>Listeria innocua</i>	○	+	+	+	—	v	—	—	—	+
<i>Listeria ivanovii</i>	○	+	+	+	++	—	+	—	—	+
<i>Listeria seeligeri</i>	○	+	+	+	弱い+	—	+	—	—	+
<i>Listeria welshimeri</i>	○	+	+	+	—	v	+	—	+	+
<i>Listeria grayi</i> *	○	+	+	+	—	v	—	+	—	+
<i>Listeria marthii</i>		+	+	+	—	—	—	—	—	+
<i>Listeria farberii</i>		+	+	+	—	+	—	—	—	+
<i>Listeria immobilis</i>		—	+	+	—	—	+	—	—	+
<i>Listeria cossartiae</i>		+	+	+	—	—	—	—	—	+
<i>L. swaminathanii</i>		+	+	+	—	—	—	—	—	+
他 17 菌種 *		ほぼ—	ほぼ+	ほぼ—	—	v	ほぼ+	v	v	v

*：網掛部分は広義のリステリア属菌、それ以外は狭義のリステリア属菌

v：菌種あるいは菌株によって異なる性状を示す

表 2. 作業部会保有菌株の選択分離培地等における集落形成性

菌種（赤字は広義の リステリア属菌）	総菌 株数	ALOA 培地		CHROMagar Listeria 培地		PALCAM 培地		血液寒天 培地	CHROMagar Identification Listeria 培地	
		集落	ハロー	集落	ハロー	集落	ハロー	溶血	集落	ハロー
<i>L. monocytogenes</i>	18	青	小～あり	青	小～あり	オリーブ 13/灰色 5	黒	±～+	紫	なし/あり
<i>L. innocua</i>	9	青	なし	青	なし	オリーブ	黒	－	紫	なし
<i>L. seeligeri</i>	15	青 5/発育なし 3/ ほぼ発育なし 7	なし	青 9/ほぼ 発育なし 6	なし	オリーブ/灰色/発育 弱い 1	黒	－～+	白	なし
<i>L. welshimeri</i>	11	青 10/ほぼ 発育なし 1	なし	青	なし	オリーブ 8/灰色 3	黒	－	紫	なし
<i>L. grayi</i>	7	青 4/水色 2/発育 弱い 1	なし	青	なし	黄色 3/発育なし 2/ 黄・発育弱い 2	黄色 4/ 弱い黒 1	－	白/紫	なし
<i>L. ivanovii</i>	4	青	あり	青	あり	灰色	黒	++	白	あり
<i>L. newyorkensis</i>	2	青	なし	青	なし	オリーブ/発育なし	黒	－	紫	なし
<i>B. cereus</i>	2	ほぼ発育なし	あり	ほぼ発育 なし	あり	白	なし	－～+	白	あり

表 3. 標準菌株等の性状

	ID	菌種	TSA 上 集落	運動性試験		傘状発育			ALOA 培地		CHROMagar Listeria 培地		PALCAM 培地		血液寒天 培地	CHROMagar Identification Listeria 培地	
				37°C	25°C	37°C	30°C	25°C	集落	ハロ ー	集落	ハロー	集落	ハロー	溶血	集落	ハロー
1	JCM 7681	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	白	++	++ +	-	+	+	青	白 大	青	白 大	灰	黒	++	白	白 大
2	JCM 32813	<i>L. grayi</i>	やや黄 色	—	—	+	+	+	水色	なし	青	なし	黄 増 殖弱い	黄	—	紫	なし
3	JCM 32814	<i>L. innocua</i>	白	±	+	+	+	+	青	なし	青	なし	灰	黒	—	紫	なし
4	JCM 32815	<i>L. seeligeri</i>	白	±	+	-	+	±	青	なし	青	なし	灰 増 殖弱い	黒	+	白	なし
5	JCM 32816	<i>L. welshimeri</i>	白	±	+	-	+	+	青	なし	青	なし	オリ ーブ	黒	—	紫	なし
6	JCM 32891	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>londoniensis</i>	白	±	±	-	+	+	青	白	青	白	灰	黒	++	白	白
7	ATCC BAA-139	<i>L. ivanovii</i> subsp. <i>ivanovii</i>	白	±	+	-	±	±	青	白	青	白	灰	黒	++	白	白
8	ATCC 25401	<i>L. grayi</i>	やや黄 色	+	++	+	+	+	水色	なし	青	なし	黄	黄	—	紫	なし

表 4. リステリア属菌類似菌株の性状と同定菌種

	ALOA 培地		CHROMagar Listeria 培地		PALCAM 培地		CHROMagar Identification Listeria		TSA 培地	カタラ ーゼ試 験	溶血性 試験	VP 反応	傘状発育		prs	16S rDNA 塩基配列解析による 同定菌種
	集落	ハロー	集落	ハロー	集落	ハロー	集落	ハロー	集落色				37℃	30℃		
1	青緑	なし	黄緑	なし	白 ラフ	なし	オレンジ	なし	オレンジ	+	—	—	—	—	—	<i>Microbacterium</i> sp.
2	黄緑	なし	黄緑	なし	灰 弱い	黒	オレンジ	なし	黄	+	—	—	—	—	—	<i>Curtobacterium</i> sp.
3	黄緑	なし	黄緑	なし	発育なし		オレンジ	なし	オレンジ	+	—	—	—	—	—	<i>Curtobacterium</i> sp.
4	青	なし	青緑	なし	オリーブ	黒	オレンジ	なし	オレンジ	+	—	—	—	—	—	<i>Microbacterium arborescens</i> / <i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
5	青	なし	青	なし	オリーブ	黒	紫	なし	白	+	—	+	+	+	+	<i>Listeria innocua</i>
6	白	なし	青 弱い	なし	発育なし		白	なし	白	+	—	—	—	—	—	<i>Leuconostoc</i> sp.
7	白	なし	青 弱い	なし	発育なし		白	なし	白	+	—	—	—	—	—	<i>Brachybacterium</i> sp.
8	白 弱い	なし	青 弱い	なし	発育なし		白	なし	白	+	—	+	+	+	—	<i>Kocuria</i> sp.