

## リステリア・モノサイトゲネス検査法に関する検討

### 1. 目的

リステリア・モノサイトゲネス (LM) は、おもに汚染食品を通じて人に感染し、リステリア症を発症すると脳脊髄膜炎、流死産を引き起こし致命率が 20-30%に及ぶ。ナチュラルチーズ等の乳製品、水産加工品、食肉加工品等によるリステリア症の集団感染は欧米諸国では頻発しているが、国内での発生の大半は散発事例である。2008年にCodex委員会が非加熱喫食食品中のLM菌数の国際規格(100CFU/g以下)を定めたのを受け、国内においても2014年12月にナチュラルチーズ(ソフトおよびセミハードに限る)と非加熱食肉製品について同様の規格基準が定められた<sup>1)</sup>。同時に検査法(通知法)についても2014年11月28日付け食安発1128第2号に改正された<sup>2)</sup>。通知法では、微生物規格への適合性を調べるためには、定量的試験法を行う必要があり、1ロットにつき5検体すべてで検体1g当たり100CFU以下でなくてはならない。ただし検査負担の軽減のため、1ロットにつき1検体を用いた予備定量試験ならびに定性試験を行うことが可能となっている。本試験および予備試験の組み合わせは任意であるが、最終判定には最短5日から14日間を要する<sup>1)</sup>。

今回、通知法が改正されたのを契機に、通知法による検査手順の確認と、PCR法などの簡便法を取り入れた自主検査法について検討を行ったので報告する。

### 2. 方法

#### (1) 通知法検査手順の確認

*Listeria monocytogenes*( ATCC 19111、以下LMという)および、*Listeria ivanovi*( ATCC 19119、以下LIという)標準菌株の純粋培養株を、LL牛乳を用い段階希釈液を調製し試験に供した。食安発1128第2号で定められた通知法に従い、予備定量試験および定性試験を実施した。

#### (2) 簡便法の検討

##### 1) PCR試験

クロモアガーリステリア培地上に生育したコロニーならびに、ハーフフレーザーブイヨン増菌培養液からのPCR法による検出試験を行った。プライマーは、文献<sup>3)</sup>に記載されたLM1: CCTAAGACGCCAATCGAA および、LM2: AAGCGCTTGCAACTGCTCを用いた。PCR産物の塩基サイズは702bpである。ターゲット遺伝子は、マクロファージのファゴソーム膜を傷害・脱出してLMが寄生細胞内に侵入するための病原分子である溶血素リステリオシンO(LLO)をコードするhlyA遺伝子である。そのため致死的病原性を持たないリステリア・モノサイトゲネスは偽陰性となる可能性がある。

コロニーからのDNA抽出法は、0.2ml滅菌蒸留水にコロニーを懸濁後、95℃10分間加熱処理し細胞壁を破壊した。その後12,000rpmで10分間遠心分離を行い、上澄み液をテンプレートとした。ハーフフレーザー培地からのDNA抽出は、シカジーニクスDNA抽出

試薬（関東化学）を用いマニュアルに従い実施した。

PCR 反应用試薬は Amp Direct（島津）を用い、下記条件により PCR 反応を行った後、電気泳動によるバンド形成の有無をもって LM 菌の推定を行った。

Final Volume : 20  $\mu$ l

Amp Direct : 10  $\mu$ l

Primer mixture : 5  $\mu$ l (終末濃度 0.5  $\mu$ mol/L)

Sample volume : 5  $\mu$ l

Reaction : 95 for 10 min  $\times$  1 cycles、94 for 30sec, 50 for 45sec, 72 for 1 min  $\times$  35 cycles

## 2) O.B.I.S MONO 試験

SCD 寒天培地（ニッスイ）に純粋培養した LM および LI 菌株について、簡易鑑別キット O.B.I.S MONO（OXOID）を用いて試験を行った。同キットは、DALAase（D-アラミノペプチダーゼ）活性を 10 分で検出し、LM（DALAase 活性無し）とその他のリステリア属菌（DALAase 活性有り）を鑑別することができる。

試験手順は、以下のとおりである。

リステリア属の確認培養において SCD 寒天培地上に形成された 5 個以上の定型集落をプラスチックループで釣菌し、テストカードの反応エリアに塗抹する。この際、十分な菌量を狭い範囲に集中して塗りつけることが重要である。菌量が不十分であると色調変化の識別が困難になり誤判定の原因となる。陽性対象として LI についても同一のテストカード上で試験を行う。

菌を塗抹した反応エリアに OBIS MONO バッファー液を一滴滴下する。

反応スリーブ（袋）にテストカードを入れ、37  $^{\circ}$ C、10 分間培養する。

反応スリーブからテストカードを取り出し、OBIS MONO Developing Solution を反応エリアに一滴滴下する。

LM 以外の菌は、20 秒以内に紫色に変色する。LM は 20 秒経過しても発色しない。

## 3 . 結果および考察

### (1) 通知法による試験

2014 年に定められた LM の微生物規格への適合性を調べるためには、定量的試験法を行う必要がある。また、本試験である定量試験の前には予備試験（予備定量試験および定性試験）を行うこともでき、定性試験において陰性が確認された場合は、本試験を行う必要はない。試験の組み合わせ方法は次の 3 パターンがある。予備定量試験と定性試験を併行して行い、それらの結果に応じて本試験の定量試験を行う。定性試験を行い、陽性の場合に本試験の定量試験を行う。本試験の定量試験のみ行う。

LM 確認試験の方法は、予備試験および本試験ともに共通であるため、今回の調査試験で

は定性試験においてのみ実施した。

本報告では、各検査手順の詳細については省略し、留意点のみに留める。

#### 1) 定性試験法

一次選択増菌培地 (half-Fraser 液体培地)

当培地にはエスクリンが添加されており、LM 等のエスクリン分解菌が増殖すると黄色から濃褐色に変色するが、リステリア属菌を含んでいても黒変しないこともあるため培地の色に関らず必ず選択分離培養を行う。当培地に試験試料を接種し 30 ,24 時間培養した。

二次選択増菌培地 (Fraser 液体培地)

培養した half-Fraser 液体培地の 0.1ml を 10ml の Fraser 液体培地に接種し、37 ,48 時間培養した。当培地にもエスクリンが含まれている。half-Fraser 液体培地による以降の手順において LM の分離が確認された場合、LM 陽性の判定となるためその時点からは当培地からの選択培養の続きは実施しなくてもよい。反対に、half-Fraser 液体培地からの選択分離培養以降の結果が陰性であれば、当培地からの続きを最後まで行う必要がある。

第一選択分離寒天培地 (クロモアガーリステリア寒天培地)

培養後の half-Fraser 液体培地を、白金耳でクロモアガーリステリア寒天培地に単独集落が形成されるよう画線塗抹した。接種した培地を 37 ,24 時間培養した。

培地上に形成された LM のコロニー所見は、直径 1~2mm で青色を呈し、コロニー周囲に 2~3mm の幅広の白色ハローを形成した。一方、LI は、直径 0.5mm 程度の微小な青色コロニーであり、コロニー周辺に 1mm 程の白色ハローを形成した。LM と LI の判別は、コロニーおよびハローの大きさにより可能であった。

参考として、LM および LI の 5%羊血液寒天培地における培養所見は、LM は連鎖球菌様で幅の狭い溶血環を形成し、コロニー形態は *Streptococcus agalactiae* (SAG) に類似していた。SAG との判別はカタラーゼ試験 (LM : 陽性、SAG : 陰性) およびグラム染色 (LM : グラム陽性短桿菌、SAG : グラム陽性球菌) により可能であった。LI の培養所見は連鎖球菌様で幅広の溶血環を形成し、*Streptococcus canis* (SC) と類似していた。SC との判別は SAG と同じ方法で可能であった。

第二選択分離寒天培地 (オックスフォード寒天培地)

30 ,24 時間培養した half-Fraser 液体培地を、白金耳でオックスフォード寒天培地に画線塗抹し 35 ,48 時間培養した。LM は灰色から濃オリーブグリーンのコロニーで黒色ハローを形成した。LI は当培地では増殖しなかった。

リステリア属菌の確認培養 (TSYEA もしくは SCD 寒天培地)

クロモアガーリステリア寒天培地およびオックスフォード寒天培地上に形成された定型集落を 5 個釣菌し、SCD 寒天培地に画線塗抹し 37 ,18-24 時間培養した。リステリア属菌のコロニー所見は、直径 1~2mm で凸状を呈する無色不透明であった。

リステリア属菌の確認試験

SCD 寒天培地上に形成された定型集落について、グラム染色（LM、LI：グラム陽性短桿菌）、カタラーゼ試験（LM、LI：陽性）を行った。

#### LM の確認試験

SCD 寒天培地上に形成された定型集落について CAMP 試験と炭水化物分解試験を行った。LM の CAMP 反応は、*Staphylococcus aureus* (SA) との交差部において半透明で不鮮明な矢じり型の反応であったため、判定の際には十分注意が必要であった。*Rhodococcus equi* (RE) との交差部では CAMP 反応は示さなかった。

LI では、SA との交差部で幅広の溶血が増強されマッチ棒型を呈したが CAMP 反応としては陰性と判定した。RE との交差部では鮮明で典型的な矢じり型の反応を示した。

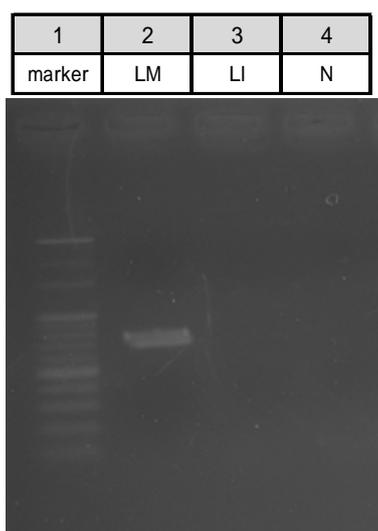
## (2) 簡便法の試験結果

### 1) PCR 試験

予備試験において、37℃、24 時間培養した一次選択増菌培地（half-Fraser 液体培地）をクロモアガーステリア寒天培地に画線塗抹し培養した後、形成された定型集落の一つを PCR 試験に供した。図 1 に示したとおり、電気泳動において 700bp 位置に鮮明なバンドを確認することができた。自主検査において PCR 法を併用することで、SCD 培地によるリステリア属菌の確認培養以降の手順を省略することができ、試験開始から最短 3 日間で LM 菌の検出が可能になった。

一方、half-Fraser 液体培地を用いた PCR 試験では、電気泳動において特異的なバンドを観察することはできなかった。培養液菌数の不足か、培地成分の影響による PCR 阻害が考えられた。

図 1 PCR 試験結果の電気泳動像



LM : *Listeria monocytogenes* ( ATCC 19111 )

LI : *Listeria.ivanovii* ( ATCC 19119 )

N : ネガティブ・コントロール

## 2) O.B.I.S MONO 試験

キット付属マニュアルに従い試験を行った結果、LMを確認することができた。初回の試験において、純粋培養した定型集落をキット付属のテストカード反応エリアに塗抹する際、菌量が不足していたため、陽性コントロールとして実施したLIの発色反応を確認できなかった。塗抹する菌量が不十分であると発色を確認できず偽陰性の判定になる可能性があるため、試験の際には特に注意が必要である。自主検査法においてO.B.I.S MONO 試験を併用することで、SCD培地によるリステリア属菌の確認試験以降の手順を省略することができるため、試験開始から最短4日間でLM菌の検出が可能となった。

今回調査試験を行ったことで、通知法の一連の手順について確認することができた。通知法では、予備試験から着手し最終的な本試験（定量試験）まで実施した場合、最長で14日間を要する。また、使用する培地の種類も他菌種の検出法よりも多く、併行して実施しなければならない手順も少なくなく作業的には非常に煩雑である。

通知法の実施と同時に、自主検査法による簡便法について検討したが、PCR法を採用した場合、試験開始から3日間でLMの確認が可能となり、結果を得るまでの時間の短縮と省力化が可能であった。

## 4 . 参考文献

- 1) 岡田由美子, リステリア・モノサイトゲネス試験法の改正, 食品衛生研究 Vol.65, No.7 (2015)
- 2) リステリア・モノサイトゲネスの検査について, 食安発 1128 第2号, 厚生労働省, 平成26年11月28日
- 3) R. Aznar and B. Alarcón, PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity, *Journal of Applied Microbiology* 2003, 95, 958–966, 2003

(小坂英次郎、仁藤百合子)