

生乳からのListeria monocytogenesの検査法の比較と生乳におけるListeria汚染状況

| | |
|-------|--|
| 誌名 | 日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association |
| ISSN | 04466454 |
| 著者 | 斎藤, 章暢 徳丸, 雅一 正木, 宏幸 板屋, 民子 青木, 敦子 |
| 巻/号 | 44巻4号 |
| 掲載ページ | p. 378-383 |
| 発行年月 | 1991年4月 |

生乳からの *Listeria monocytogenes* の検査法の比較と 生乳における *Listeria* 汚染状況

齋藤章暢 徳丸雅一 正木宏幸

板屋民子 青木敦子

埼玉県衛生研究所（浦和市上大久保 639-1, 〒338）

（平成 2 年 5 月 1 日受付・平成 2 年 12 月 21 日受理）

Evaluation of Enrichment and Plating Media for the Isolation of *Listeria monocytogenes*
from Raw Milk and the State of Contamination of Raw Milk by *Listeria*
AKINOBU SAITO, YOSHIKAZU TOKUMARU, HIROYUKI MASAKI, TAMIKO ITAYA and ATUSKO AOKI
(Institute of Public Health, Saitama Prefecture, Kamiokubo, Urawa, Saitama 338)

SUMMARY

Methods of isolation of *Listeria monocytogenes* (L.m.) from raw milk were investigated. Three enrichment media, enrichment broth (EB) of the FDA method, L-PALCAMY (L-PAL) of Van Netten et al., and Merck's *Listeria* enrichment broth (LEB); enrichment by the two-stage method (2-st) of Slade et al.; and 4 plating media, modified McBride *Listeria* agar (MMA), LiCl phenylethanol moxalactam agar (LPM), Oxford formulation (OX), and PALCAM *Listeria* selective agar (PAL) were combined, and recovery tests of L.m. were performed to evaluate each combination. The best enrichment of L.m. was achieved by L-PAL; when L.m. was present in raw milk at less than 10^2 /ml, the number of L.m. increased to 10^7 - 10^8 /ml after 24 hours of culture. Although there was no clear difference between the 4 plating media in terms of the number of L.m. grown in the media, OX and PAL were superior to MMA and LPM in terms of the number of bacteria other than L.m. grown in the media and the ease of observation of L.m. colonies. Raw milk produced in Saitama Prefecture and brought to milk processing factories in Saitama Prefecture was positive for *Listeria* in 5.3% (8/150) of the raw milk samples, and L.m. was identified in 4.0% (6/150), while *L. innocua* was identified in 1.3% (2/150) of the samples. The serotype of the isolated L.m. was 1a for all isolates.

—Key Words: *Listeria monocytogenes*, *Listeria*, raw milk, enrichment medium, plating medium.

-----J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 44, 378~383 (1991)

要 約

生乳からの *Listeria monocytogenes* (L.m.) の検査法を比較検討するため、FDA 法の enrichment broth (EB), VAN NETTEN らの L-PALCAMY (L-PAL), Merck の *Listeria* enrichment broth (LEB) の 3 増菌培地および SLADE らの two-stage 法 (2-st) による増菌と modified McBride *Listeria* agar (MMA), LiCl phenylethanol Moxalactam agar (LPM), Oxford formulation (OX), PALCAM *Listeria* selective agar (PAL) の 4 分離培地を組み合わせて添加回収試験を行った。L.m. の増菌効果は L-PAL が最も優れ、接種時生乳中において 10^2 /ml 以下の L.m. 菌数が 24 時間培養で 10^7 ~ 10^8 /ml に増加した。分離培地は、出現する L.m. 菌数には差がなかったが、L.m. 以外の細菌数、集落のみやすさの点で MMA, LPM に比べ OX, PAL が優れていた。埼玉県内の牛乳処理工場へ搬入された県内産生乳は 5.3% (8/150) が *Listeria* 陽性であり、4.0% (6/150) が L.m., 1.3% (2/150) が *L. innocua* と同定された。L.m. の血清型はすべて 1a であった。

—キーワード: *Listeria monocytogenes*, *Listeria*, 生乳, 増菌培地, 分離培地。

Listeria monocytogenes (L.m.) は人畜共通感染症であるリステリア症の原因菌として古くから知られている。リステリア症は、人において敗血症や髄膜炎等を起こし

死亡率も高い。しかし近年まではその感染経路は不明な点が多く、特に食品がリステリア症の原因とされた事例はなかった。ところが 1980 年代に欧米で相次いだリス

テリア症の集団発生いづれも L.m. に汚染された食品が原因であったことが確認された^{3,5,11)}。これを契機に欧米を中心に食品衛生の分野における *Listeria* の研究が盛んとなり、食品を対象とした検査法も数多く報告されている^{1,14)}。しかし、これらの検査法も現時点においては確立されるまでには到っておらず、またわが国においては *Listeria* の疫学的な調査、特に食品を対象とした汚染状況調査はあまりなされていない。

そこで今回われわれは、生乳を対象に現在報告されている検査法の比較検討を行い、さらに生乳における *Listeria* の汚染状況調査を行った。

材料および方法

生乳からの検査法の比較検討

供試菌株：菌の添加回収試験に供試した菌株は医学研究所より分与を受けた L.m. IID 566 (血清型 1 a), IID 571 (血清型 4 b) および当所で生乳から分離した LM 41 (血清型 1 a) の 3 菌株である。

供試生乳：埼玉県内の牛乳工場において、工場搬入時にタンクローリーから約 500 ml を滅菌ポリ容器に無菌的に採取した生乳を供試した。L.m. の添加回収試験に使用した生乳は搾乳した当日のもので、直接および増菌培養によって *Listeria* に汚染されていないことを確認した。

使用培地：増菌培地は FDA 法⁹⁾ の enrichment broth (EB), VAN NETTEN ら¹³⁾ の L-PALCAMY (L-PAL), Merck 社製の *Listeria* enrichment broth (LEB) および Tryptose broth (TB) で低温増菌後 Thiocyanate nalidixic acid Nutrient broth No. 2 (TNA-NB 2) で選択増菌を行う two-stage 法 (2-st)¹²⁾ の 4 種類である。分離培地は modified McBride *Listeria* agar (MMA)⁸⁾, LiCl phenylethanol moxalactam agar (LPM)⁷⁾, Oxford formulation (OX)²⁾ および PALCAM *Listeria* selective agar (PAL)¹³⁾ の 4 種類で、これらの培地を組み合わせて比較検討を行った。

L.m. 添加回収試験：7 本の滅菌コルベンに生乳 10

ml を入れ、1 ml 当たり 10^3 個になるように調整した IID 566, IID 571, LM 41 の 3 菌株の L.m. 菌液 1 ml を各菌株につき 2 本ずつのコルベンに加えて合計 6 本の L.m. 添加生乳を作った。この 6 本の L.m. 添加生乳中の L.m. 菌数は 10^2 /ml 以下となり、残りの 1 本は L.m. 未接種の対照として 7 本のコルベンそれぞれに EB 90 ml を加えた。L-PAL, LEB, 2-st についても EB と同様の操作を行った。そして EB と L-PAL は 30°C で、LEB は 25°C で、24 時間、48 時間さらに 1 週間培養した。TB は、4°C で 1 週間から 4 週間まで培養後、その 1 ml を 9 ml の TNA-NB 2 に加え 35°C 24 時間の選択増菌を行った。そして各増菌培地から Spiral plating system (グンゼ産業) を使って、MMA, LPM, OX, PAL に塗抹し、35°C 48 時間微好気培養後 L.m. 菌数および L.m. 以外の菌数を測定した。測定方法は、MMA と LPM においては実体顕微鏡を使用して 45 度の反射光による青緑色の集落を L.m. 菌数とし、OX と PAL においてはエスクリン分解陽性の定型的集落を L.m. 菌数とした。そして各分離培地上の L.m. として計測した集落については、FDA 法⁹⁾ に準じて L.m. であることを同定確認した。また、EB については 0.5% KOH によるアルカリ処理もあわせて行った (図 1)。

生乳における *Listeria* 汚染状況調査

生乳は、埼玉県内の牛乳工場へ搬入された県内産のものを 10 地区 16 ルートに限定してタンクローリーから約 200 ml ずつを毎月 1 回の割合で 12 回採取した、のべ 150 検体を使用した。

調査期間は、平成元年 4 月から平成 2 年 3 月までとした。

検査方法は図 2 の要領で行った。増菌培地は L.m. 添加回収試験において成績が良好であった L-PAL と、同試験における結果は良好ではなかったが *Listeria* 検査法の基本的な方法とされる低温増菌を基にしており、損傷菌等に対しては有効ではないかと考え 2-st を併用した。分離培地は L.m. 添加回収試験において成績が良好であった OX と PAL を用いた。分離株の同定および生化学

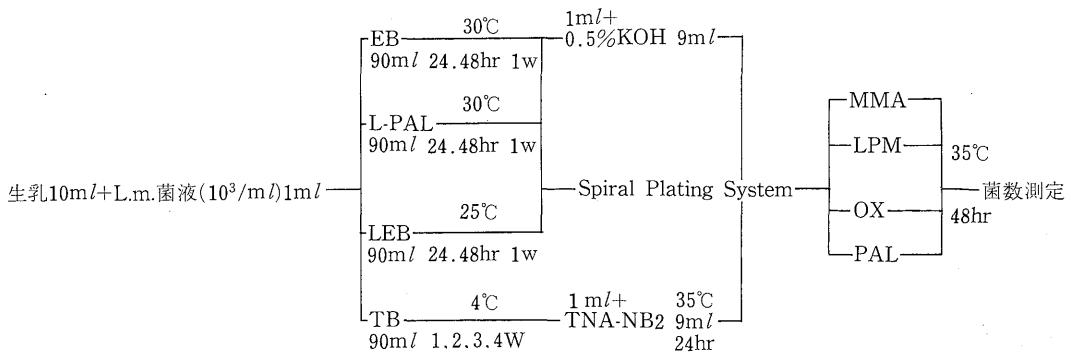


図 1 生乳からの L.m. の検査法の比較検討

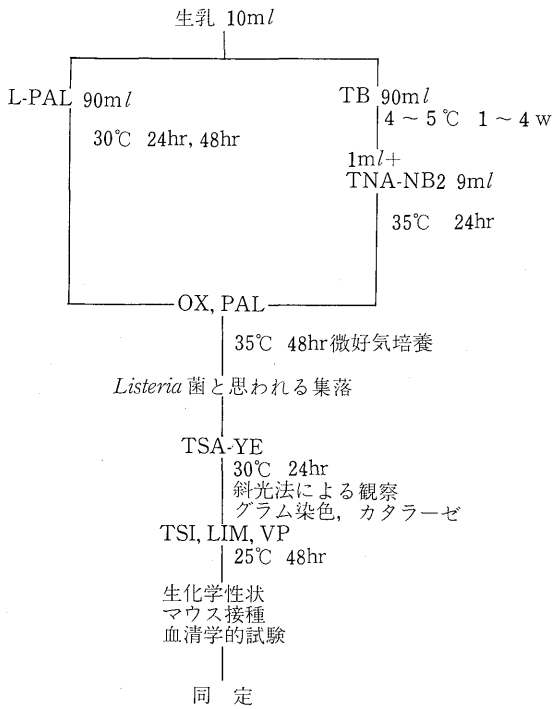


図2 *Listeria* 検査法

性状は FDA 法に準じて行った。

CAMP-test : *Staphylococcus aureus* (S.a.) は、当所で食中毒患者から分離された β 毒素産生株 (H2-1 株) を供試した。 *Rhodococcus equi* (R.e.) は、東京大学応用微生物研究所より分与された NCTC 1621 株を使用した。

マウス毒性試験 : 40 ml の BHI ブイヨンで 35°C 1 夜培養した被検菌液を 3800 rpm で遠沈後上澄液を捨て、滅菌生理食塩水 1 ml で沈殿物を攪拌して均一な菌液を作った。この菌液の 0.1 ml を 16 ~ 18 g の ddY 系マウス 5 匹に腹腔内接種すると同時に菌数を測定し各々のマウスが 10^9 /ml の菌液を注入されるようにした。菌液接種後 7 日目まで観察して死亡したマウスについては、心、肝、脾を無菌的に取り出し直接および増菌培養後接種菌と同一性状の *Listeria* を確認した。

血清型 : 分離された L.m. の血清型別は新潟県衛生公署研究所に依頼した。

成 績

生乳からの検査法の比較検討

各分離培地における L.m. および L.m. 以外の菌の増菌法別増殖経過を図 3 に示した。

EB, L-PAL, LEB においては実験に使用した L.m. 3 菌株間にその菌数の差がみられなかったため、成績は各菌株の平均値とした。

各増菌培地における増菌効果はいずれの分離培地にお

いてもほとんど差がみられず、同様の増殖経過であった。4 分離培地の平均 L.m. 菌数 (log 細菌数/ml) は、24 時間培養では L-PAL の 7.76, EB の 6.85, EB (KOH 処理) の 6.10, LEB の 2.06 の順であり、48 時間では EB が 8.29, L-PAL が 7.86, EB (KOH 処理) が 7.52, LEB が 5.18 であった。さらに 1 週間培養では LEB が 6.87, L-PAL が 6.69, EB が 6.45, EB (KOH 処理) が 4.57 であった。EB と L-PAL の増菌効果には有意な差はみられなかったが、EB の L.m. 菌数が 48 時間で最高値となったのに対し、L-PAL では 24 時間でほぼ最高値となった。EB の KOH 処理では KOH によって 10 倍希釈されているため、EB に比べ L.m. 菌数は約 1 オーダー低かった。LEB はゆるやかな増殖経過を示し、24 時間、48 時間培養では EB, L-PAL に比べてその増菌効果が劣っていた。

各分離培地における選択分離能は、MMA と LPM において L.m. 以外の菌の出現が多くみられた。MMA における各増菌培地ごとの L.m. 以外の菌数 (log 細菌数/ml) は、24 時間培養では EB の 5.64, L-PAL の 4.94, EB (KOH 処理) と LEB の 4.15 の順であり、48 時間では EB が 7.95, L-PAL が 6.98, EB (KOH 処理) が 6.90, LEB が 5.00 であった。さらに 1 週間培養では EB が 8.11, L-PAL が 6.94, LEB が 6.40, EB (KOH 処理) が 6.32 であった。各培養時間とも EB における L.m. 以外の菌数が最も多く、KOH によるアルカリ処理を行っても希釈による物理的效果程度しかみられなかった。LPM における各増菌培地ごとの L.m. 以外の菌数もほぼ同様であった。しかし OX と PAL においては、LEB の 24 時間培養で OX が 3.43, PAL が 2.74, 48 時間で OX が 4.23, PAL が 3.60 の L.m. 以外の菌が認められたが、他の増菌培地ではほとんど認められなかった (図 3)。

また、MMA と LPM は斜光法によって *Listeria* を鑑別するのに対し、OX と PAL ではエスクリン加水分解による黒色集落の形成を指標とするため、後者を用いた場合の方が L.m. 集落の鑑別が容易であった。

いっぽう、図には示さなかったが、同様に接種した 2-st においては使用した L.m. 3 菌株間で菌数に差がみられた。

1 週間培養での各分離平板の平均 L.m. 菌数 (log 細菌数/ml) は、IID 566 株が 6.47, IID 571 株が 3.38, LM 41 が 5.40 であり、その後 4 週間培養まで L.m. 菌数はほとんど変わらずに推移した。L.m. 以外の菌数では、MMA において平均 2.41 (log 細菌数/ml) 認められたが、他の分離培地ではほとんど認められなかった。

以上の結果から、生乳からの L.m. の検出には、L-PAL で 24 時間増菌後、分離培地として OX または PAL を使用する方法が迅速性、選択性および簡便性の

点から優れていた。

生乳における *Listeria* 汚染状況調査

Listeria 検出状況：生乳における月別・搬入ルート別 *Listeria* 検出状況を表1に示した。

150 検体中 8 検体 (5.3%) から *Listeria* が検出された。このうち 6 検体は R1 の同一地区のものであり、平成元年 8 月から平成 2 年 1 月にかけて検出された。このほかは R3 から 1 月に、R9 から 5 月に検出された。したがって生乳の搬入ルートごとにみると、R1 からは 50%、R3 と R9 からは 8.3% の陽性率で *Listeria* が検出され、その他の 13 ルートからは全く検出されなかつた。

た。

分離した *Listeria* の生化学性状と血清型：今回生乳から分離した *Listeria* の主な生化学性状と血清型を表 2 に示した。

7% 羊血液寒天平板上における β 溶血性は No. 1 と No. 8 が陰性であった。ラムノースはすべて陽性、キシロースはすべて陰性であった。CAMP-test は、No. 1 と No. 8 の 2 株は S.a., R.e. ともに陰性で、他の 6 株はすべて S.a. 陽性であった。マウス毒性試験も No. 1 と No. 8 では 7 日以内に死亡したものはなく、他の 6 株はすべて 5 日以内に 3 匹以上が死亡した。これらの性状か

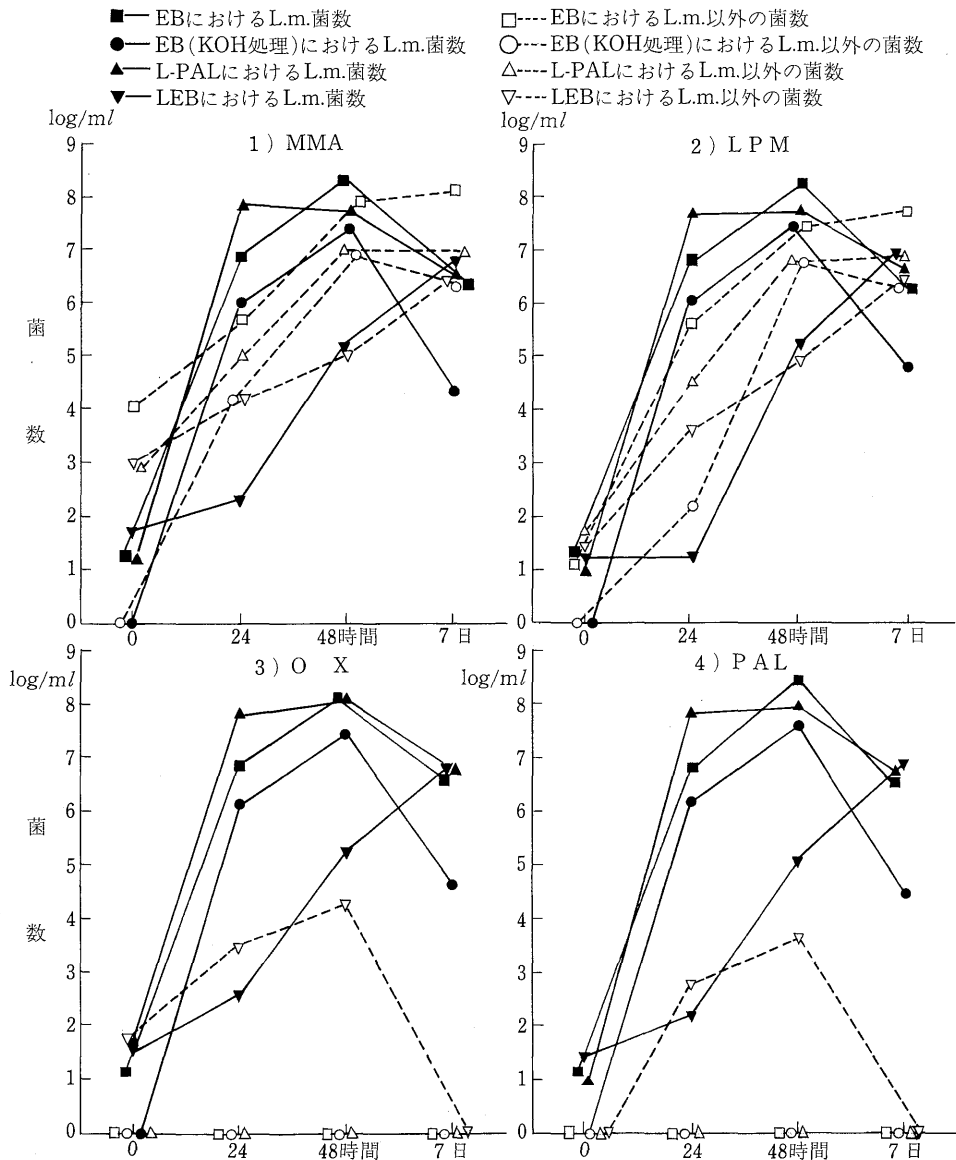


図3 各分離培地における L.m. および L.m. 以外の菌の増菌法別増殖経過

生乳からの *Listeria monocytogenes* の検査法の比較と生乳における *Listeria* 汚染状況

ら No. 2～No. 7 の菌株は L.m., No. 1 と No. 8 の 2 株は *L. innocua* と同定された. L.m. 6 株の血清型はすべて 1a であった.

考 察

考 察 1

1988 年 2 月, 厚生省は「食品 (チーズ) 中のリステ

リア菌の検査法⁹⁾を提示した. われわれは厚生省法に基づきナチュラルチーズ, 鶏肉等からの *Listeria* の分離を試みたが *Listeria* を分離することができなかった. そこで, 現在報告されている食品からの *Listeria* 検査法の中から, FDA 法の EB, 厚生省法の LEB, また最近報告された L-PAL の 3 増菌培地に斜光法により *Listeria* を鑑別する MMA と LPM, エスクリン反応に

表 1 生乳における月別・搬入ルート別 *Listeria* 検出状況

| 生乳の搬入ルート | 平成元年 | | | | | | | | | | 平成2年 | | | 合計* (%) |
|----------|------|-----------|------|------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|-------------|------|------|-------------|---------|
| | 4月 | 5月 | 6月 | 7月 | 8月 | 9月 | 10月 | 11月 | 12月 | 1月 | 2月 | 3月 | | |
| R1 | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | - | 6/12 (50) | |
| R2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0/12 | |
| R3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | 1/12 (8.3) | |
| R4～8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0/60 | |
| R9 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1/12 (8.3) | |
| R10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0/12 | |
| R11～16 | • | • | • | • | • | • | • | - | - | - | - | - | 0/30 | |
| 合計* (%) | 0/10 | 1/10 (10) | 0/10 | 0/10 | 1/10 (10) | 1/10 (10) | 1/10 (10) | 1/16 (6.3) | 1/16 (6.3) | 2/16 (12.5) | 0/16 | 0/16 | 8/150 (5.3) | |

注) *合計は陽性数/検体数, •は未検査

表 2 生乳から分離された *Listeria* の主要生化学性状と血清型

| No. | 搬入ルート | β溶血性 | ラムノース | キシロース | CAMP-test* | | マウス毒性** | 菌種*** | 血清型 |
|-----|-------|------|-------|-------|------------|------|---------|-------|-----|
| | | | | | S.a. | R.e. | | | |
| 1 | R9 | - | + | - | - | - | 0/5 | L.i. | |
| 2 | R1 | + | + | - | + | - | 4/5 | L.m. | 1a |
| 3 | R1 | + | + | - | + | - | 4/5 | L.m. | 1a |
| 4 | R1 | + | + | - | + | - | 5/5 | L.m. | 1a |
| 5 | R1 | + | + | - | + | - | 3/5 | L.m. | 1a |
| 6 | R1 | + | + | - | + | - | 5/5 | L.m. | 1a |
| 7 | R1 | + | + | - | + | - | 5/5 | L.m. | 1a |
| 8 | R3 | - | + | - | - | - | 0/5 | L.i. | |

注) *S.a.: *Staphylococcus aureus*. R.e.: *Rhodococcus equi*

**死亡マウス数/供試マウス数

***L.m.: *Listeria monocytogenes*, L.i.: *Listeria innocua*

表 3 *Listeria* が分離された生乳の増菌培地別・増菌時間別・分離培地別検査結果

| No. | L-PAL | | | | | | 2-st | | | | | | | | | |
|-----|-------|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 24時間 | | 48時間 | | 結果 | | 1週 | | 2週 | | 3週 | | 4週 | | 結果 | |
| | OX | PAL | OX | PAL | OX | PAL | OX | PAL | OX | PAL | OX | PAL | OX | PAL | OX | PAL |
| 1 | • | • | • | • | • | • | + | • | - | • | - | • | - | • | + | • |
| 2 | + | • | + | • | + | • | + | • | + | • | - | • | - | • | + | • |
| 3 | + | • | + | • | + | • | + | • | + | • | + | • | • | • | + | • |
| 4 | + | • | + | • | + | • | + | • | + | • | + | • | + | • | + | • |
| 5 | + | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | + | + | + | + | + | + | • | • | • | • | • | • | • | • | • | • |
| 7 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 計* | 7/7 | 3/4 | 7/7 | 3/4 | 7/7 | 3/4 | 4/7 | 0/3 | 3/7 | 0/3 | 2/7 | 0/3 | 1/6 | 0/3 | 4/7 | 0/3 |

注) *は検出数/検査実施数, •は検査未実施

より同菌を鑑別する OX と PAL を組み合わせて、生乳を対象にそれらの増菌効果および分離効果を比較検討することとした。また、古くから *Listeria* の増菌法として知られる低温増菌を基にしている 2-st もあわせて行った。

その結果、EB と L-PAL の増菌効果はともに良好でほとんど差がなかったが、L-PAL の方が迅速性の点でやや優っていると判定した。EB の KOH 処理については余り効果的でなく、OX, PAL 等選択力に優れた分離培地を使用することにより不必要な操作となってしまうと思われる。LEB と 2-st においては、その増菌効果は EB, L-PAL に比べ低く、さらに 2-st においては 3 菌株での増菌効果に差がみられた。

いっぽう、分離培地では、OX と PAL は MMA と LPM に比べて、L.m. 以外の菌の発育を抑制する点で優れていた。また斜光法による鑑別は器材の使用や技術的な面でやや煩雑である。したがって、分離培地はエスクリン反応によって *Listeria* を鑑別する OX, PAL の使用が選択性、鑑別性の面から適当であると判断した。これらの事実は実際に生乳の検体を用いた比較試験でも確認された。ただし、今回 *Listeria* が検出された生乳はわずか 8 検体であり十分な比較検討がなされたとはいえないが、少なくとも表 3 に示すとおり L-PAL では 24 時間培養と 48 時間培養の結果に差がみられなかったことから本培地による増菌は短時間で *Listeria* を十分に検出できる有用な方法であると考えられる。

考 察 2

生乳における *Listeria* の汚染状況調査は欧米を中心に多くの報告がある。各国の生乳からのリステリア菌検出率は 0～45.3%¹⁰⁾ と大きな差がみられるが、今回のわれわれの成績は、米国やハンガリーの成績^{8,10,14)} と比べてほぼ同様の汚染状況であった。また、今回 *Listeria* の分離された 6 検体は同一地区のものであり、さらに血清型も同一であることから汚染源は同じであることが推測された。

Listeria は広く環境に分布しているといわれるため、それが病原株であるか否かということは重要である。今回、生乳から分離された L.m. は人のリステリア症から

分離されている血清型 1a と同型であり、かつマウスにも毒性を示した。ゆえに、人に対しても病原性を有することが疑われた。また、米国におけるリステリア症集団発生の中の 1 例は、殺菌牛乳が原因とされている³⁾。これらのことから、牛乳処理工場における殺菌工程の管理および製品管理は厳格に行われなければならないと考える。

稿を終わるにあたり、血清型別を実施していただいた新潟県衛生公害研究所の寺尾通徳先生に深謝いたします。

引 用 文 献

- 1) CASSIDAY P. K. and BRACKETT R. E.: *J. Food Protect.*, 52, 207～214 (1989).
- 2) CURTIS G. D. W., MITCHELL R. G., KING A. F. and EMAHA J.: *J. Appl. Bacteriol.* In press (1988).
- 3) FLEMING D. W., COCHI S. L., McDONALD K. L., et al.: *N. Engl. J. Med.*, 312, 404～407 (1985).
- 4) GROVES R. D. and WELSHIMER H. J.: *J. Clin. Microbiol.*, 5, 559～563 (1977).
- 5) JAMES S. M., FANNIN S. L., AGEE B. A., et al.: *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, 34, 357～359 (1985).
- 6) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長事務連絡：ソフト及びセミソフト・タイプのナチュラル・チーズのリステリア菌汚染防止について、昭和 63 年 2 月 2 日、衛乳第 3 号。
- 7) LEE W. H. and McCLAIN D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 1215～1217 (1986).
- 8) LOVETT J., FRANCIS D. W. and HUNT J. M.: *J. Food Protect.*, 50, 188～192 (1987).
- 9) LOVETT J.: *Method for isolating Listeria monocytogenes from Foods* Chapter 29 (1987).
- 10) 丸山 務：食品と微生物，6，3～15 (1989).
- 11) SCHLECH W. F., LAVIGNE P. M., BORTOLUSSI R. A., et al.: *N. Engl. J. Med.*, 308, 203～206 (1983).
- 12) SLADE P. J. and COLLINS-THOMPSON D. L.: *J. Food Protect.*, 50, 904～908 (1987).
- 13) VAN NETTEN P., PERAIAS I., VAN DE MOOSDIJK A., et al.: *Proceedings of the Tenth International Congress on Listeriosis*, Pesc, Hungary, 20～25 (1988).
- 14) WEHR H. M.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 643～683 (1988).