

DNAプローブ法キットによる食品からのListeria属菌検査

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	仲真, 晶子 小久保, 彌太郎 飯田, 孝 梅木, 富士郎 丸山, 務
巻/号	44巻8号
掲載ページ	p. 851-855
発行年月	1991年8月

DNAプローブ法キットによる食品からの *Listeria* 属菌検査

仲真晶子 小久保彌太郎 飯田 孝

梅木富士郎 丸山 務

東京都立衛生研究所 (東京都新宿区百人町3-24-1, 〒169)

(平成3年1月31日受付・平成3年3月22日受理)

Detection of *Listeria* in Foods by Using a DNA-probe Hybridization Assay Kit
AKIKO NAKAMA, YATARO KOKUBO, TAKASHI IDA, FUJIO UMEKI and TSUTOMU MARUYAMA
(Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku,
Tokyo 169)

SUMMARY

A non-isotopic DNA-probe hybridization assay has been developed for the rapid and definitive identification of *Listeria* spp. in food, which is now commercially available as a kit. We have evaluated the hybridization assay kit by comparing it with a conventional culture procedure regarding 56 cheese samples (including positive samples which had been tested previously and frozen) and 50 meat samples.

For the cheese samples, 22 (39%) were positive by hybridization, while 24 (43%) were positive by the culture procedure. In the case of the meat samples, 36 (72%) were positive using UVM-2 broth and 34 (68%) positive using EB broth by the hybridization assay, while 39 (78%) were positive by the culture. With the cheese samples, 13 were positive for *L. monocytogenes* and for the meat samples, 19 were positive for this species. Most of the *L. monocytogenes* positive samples were detected by the hybridization assay.

The above data show that the positive rate by the hybridization assay was slightly lower than by the culture procedure. However, this difference is not very important from a practical standpoint. The hybridization assay results can be obtained within approximately 3 hr following two day's of enrichment. The hybridization assay is therefore useful for rapid detection of *Listeria* in foods.

—Key Words : *Listeria* spp., *Listeria monocytogenes*, DNA-probe hybridization assay, cheese, meat.

.....J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 44, 851~855 (1991)

要 約

食品中の *Listeria* 属菌の有無を簡易迅速に検査する目的で、市販ナチュラルチーズと食肉を対象に市販キットによる DNA プローブ法の応用を試み、その成績を従来の培養法と比較した。この結果、ナチュラルチーズ 56 例中 DNA プローブ法では 22 例 (39.3%)、培養法では 24 例 (42.9%) が陽性であった。また、食肉 50 例中 DNA プローブ法で増菌培地に UVM-2 培地を用いた場合は 36 例 (72.0%)、EB 培地を用いた場合は 34 例 (68.0%)、培養法では 39 例 (78.0%) が陽性であった。さらに、培養法で *L. monocytogenes* が検出された検体の約 85% が DNA プローブ法でも陽性を示した。このように、DNA プローブ法の成績は培養法と比較して有意差はなく、検査開始後 3 日間で判定が可能であり、手技も熟練を要しないことから *Listeria* 属菌の日常検査法として有用であると考えられた。

—キーワード : *Listeria* 属菌, *Listeria monocytogenes*, DNA プローブ法, ナチュラルチーズ, 食肉.

最近、欧米諸国で主として乳、乳製品を原因食品とする *Listeria monocytogenes* の集団感染例が相次いで報告され注目されている^{7,11,12}。また、その後の調査で、乳、乳製品に限らず食肉等広範囲の食品が本菌によって汚染されていることが明らかにされ、それらによる食品媒介リステリア症の発生も示唆された^{2,17}。WHO の報告書「Foodborne Listeriosis」(1988)¹⁹でも本菌による事故を未然に防止するために、予め食品の汚染実態を

把握しておく必要性が指摘されており、本菌の迅速で正確な検査法の確立が食品衛生上重要な課題となっている。

食品を対象とした *Listeria* 属菌および *L. monocytogenes* の検査法については、これまでに多くの報告^{4,13,16}がなされているが、これらのほとんどが増菌→分離→確認のステップを必要とする培養法のため、結果を得るまでかなりの時間と経験を必要とする。そのため、簡易迅速検査法が検討され^{3,5,6,15}、これらのうちで、

DNA プローブを用いた方法 (DNA probe hybridization assay) は適確性および迅速性の点で優れているといわれている¹⁾。しかし、従来から DNA プローブの標識には主として放射性同位元素が用いられており、日常検査で手軽に使用できない難点があった。最近、KING ら^{8,9)}は比色により *L. monocytogenes* を含む *Listeria* 属菌を検出する方法を開発し、これがキットとして市販されるようになった。そこで、著者らはこのキットの有用性について市販のチーズおよび食肉を対象に従来の培養法と比較検討し同時に、キットのより確実な使用方法について検討を加えた。

材料および方法

供試食品

市販ナチュラルチーズ 56 例、市販食肉 50 例を供試した。なお、ナチュラルチーズ 56 例中には著者らが過去に培養法で *L. monocytogenes* を検出した凍結保存検体も含めた。

DNA プローブ法の手順

Listeria 属菌検出のために開発された GENE-TRAK *Listeria* assay (GENE-TRAK 社) を用い、原則としてマニュアルに従って実施した。その検査法は、試料中の菌の増菌培養と、これを用いた DNA-RNA ハイブリ

ダイゼーションからなっている (図 1)。

すなわち、増菌培地としてナチュラルチーズではマニュアルどおり EB 培地 (Difco) に MOPS buffer (MOPS-free acid, MOPS-Na Salt; Sigma) を加えた MEB 培地を用いた。食肉ではマニュアルどおり UVM 培地 (Difco) にアクリフラビン (Sigma) を 2 倍量となるように加えた UVM-2 培地を用いるとともに EB 培地も併用した。平板培地はマニュアルに規定された LPM 培地のかわりに Oxford 培地 (Oxoid) を使用した。検体量および培地量はマニュアルではそれぞれ 25 g および 225 ml となっているが、検査の容易さや経済性を考慮して、それぞれ 10 g および 50 ml とした。

検査手順は、検体を上記増菌培地に接種し、35°C で 24 時間増菌培養した後、その 50 μ l を上記平板培地上に滴下し均一に塗抹した。これを 35°C で 24 時間培養して平板上に発育した全ての集落をかき取り、リン酸緩衝生理食塩水に懸濁させてハイブリダイゼーション用の試料溶液とした。この試料溶液に溶菌溶液を加えて菌体から RNA を放出させ、*Listeria* 属菌に特異的な RNA 部分と DNA プローブとのハイブリッドを形成させた。そして、これを酵素抗体法により発色させ、吸光度を測定して *Listeria* 属菌の有無を判定した。

培養法の手順

ナチュラルチーズ、食肉ともに同じ方法を採用した。すなわち、検体を EB 培地で 7 日間増菌培養し、その間 2 および 7 日に Oxford 培地平板で分離培養し、エスクリン分解陽性の褐色集落を Trypticase soy agar (BBL) で再分離した。平板上に発育した集落を 45 度の反射光を用いて実体顕微鏡で観察し、*Listeria* 属菌と疑われた青緑色の集落を釣菌して、このうちグラム陽性の短桿菌で、カタラーゼ反応陽性、25°C での運動性陽性、VP 反応陽性の確認ができたものを *Listeria* 属菌と同定した。さらに、 β -溶血陽性で、この溶血が CAMP 試験において *Staphylococcus aureus* の溶血素により増強され、ラムノース分離能陽性、キシロースおよびマンニト分解能陰性のものを *L. monocytogenes* と同定した。なお、DNA プローブ法で *Listeria* 属菌陽性を示したものについてもハイブリダイゼーション用試料溶液から Oxford 培地を用いて分離培養し、培養法と同様の手順により *Listeria* 属菌の確認および *L. monocytogenes* の同定を行った。

成 績

ナチュラルチーズを対象とした *Listeria* 属菌の検査成績

市販ナチュラルチーズ 56 例について *Listeria* 属菌および *L. monocytogenes* の DNA プローブ法と培養法による検出成績を表 1 に示した。

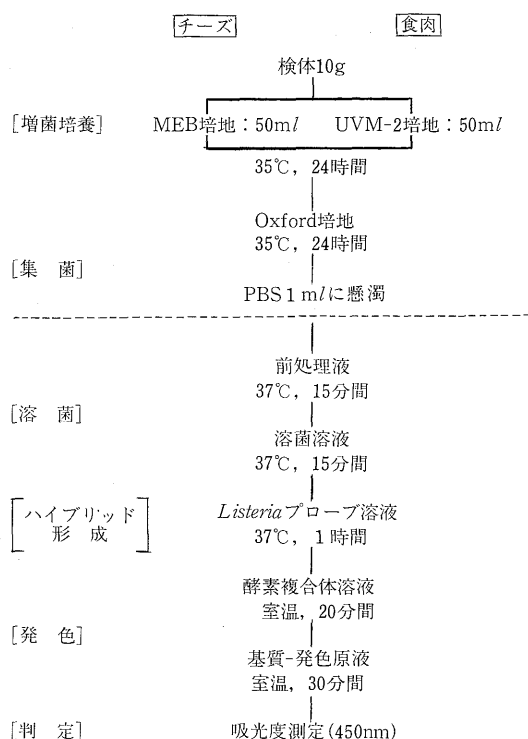


図 1 DNA プローブ法による *Listeria* 属菌の検査手順

表1 DNAプローブ法および培養法によるナチュラルチーズからの *Listeria* 属菌検出成績の比較

方 法	検体数	陽 性 数 (%)	
		<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
DNA プローブ法	56	22(39.3)	11(19.6)
培 養 法	56	24(42.9)	13(23.2)
DNA プローブ法, 培養法ともに陽性	56	19	11
DNA プローブ法のみ陽性	56	3	0
培養法のみ陽性	56	5	2

表2 DNAプローブ法および培養法による食肉からの *Listeria* 属菌検出成績の比較

方 法	検体数	陽 性 数 (%)		
		<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	
DNA プローブ法 培 養 法	UVM-2	50	36(72.0)	16(32.0)
	EB	50	34(68.0)	17(34.0)
		50	39(78.0)	19(38.0)
DNA プローブ法 (UVM-2), 培養法ともに陽性	50	32	16	
DNA プローブ法 (UVM-2) のみ陽性	50	4	0	
培養法のみ陽性	50	7	3	
DNA プローブ法 (EB), 培養法ともに陽性	50	34	17	
DNA プローブ法 (EB) のみ陽性	50	0	0	
培養法のみ陽性	50	5	2	

DNA プローブ法では 56 例中 22 例 (39.3%) が陽性で、陽性を示した全ての試料から *Listeria* 属菌が確認された。培養法では 56 例中 24 例 (42.9%) から *Listeria* 属菌が検出された。

Listeria 属菌陽性検体の内訳は、DNA プローブ法、培養法ともに陽性を示したものは 19 例、DNA プローブ法のみ陽性であったものは 3 例、培養法のみ陽性であったものは 5 例であった。両方法とも陰性のものは 29 例であり、DNA プローブ法と培養法の成績は 85.7% の検体が一致した。

これら *Listeria* 属菌陽性例のうち *L. monocytogenes* の認められたものは DNA プローブ法では 22 例中 11 例であり、培養法では 24 例中 13 例であった。

なお、DNA プローブ法での *Listeria* 属菌および *L. monocytogenes* の検出成績と従来の培養法での検出成績について χ^2 検定を行ったところ、両方法に有意差は認められなかった。

食肉を対象とした *Listeria* 属菌の検査成績

表 2 に市販食肉 50 例について *Listeria* 属菌および *L. monocytogenes* の検出成績を検査法別に比較して示した。

DNA プローブ法では増菌培地に UVM-2 培地を用いた場合、陽性を示したものは 50 例中 36 例 (72.0%) であり、EB 培地を用いた場合は 50 例中 34 例 (68.0%) が陽性であった。これら陽性例すべてから *Listeria* 属菌が確認された。

いっぽう、培養法では *Listeria* 属菌が検出されたものは 50 例中 39 例 (78.0%) であった。*Listeria* 属菌陽

性検体の内訳は、DNA プローブ法で増菌培地に UVM-2 培地を用いた場合には、DNA プローブ法と培養法ともに陽性を示したものは 32 例、DNA プローブ法のみ陽性であったものは 4 例、培養法のみ陽性であったものは 7 例であった。また、両方法とも陰性のものは 7 例であり、DNA プローブ法と培養法の成績は 78.0% の検体が一致した。

DNA プローブ法で増菌培地に EB 培地を用いた場合には、DNA プローブ法と培養法ともに陽性を示したものは 34 例、培養法のみ陽性であったものが 5 例であった。両方法ともに陰性のものは 11 例であり、DNA プローブ法と培養法の成績は 90.0% の検体が一致した。

これら *Listeria* 属菌陽性例のうち *L. monocytogenes* が検出されたものは DNA プローブ法で増菌培地に UVM-2 培地を用いた場合には 16 例、EB 培地を用いた場合には 17 例であり、培養法では 19 例であった。

DNA プローブ法による *Listeria* 属菌および *L. monocytogenes* の検出成績を従来の培養法の検出成績と比較するために χ^2 検定を行ったところ、使用した増菌培地に関係なく、両方法に有意差は認められなかった。なお、DNA プローブ法で増菌培地に UVM-2 培地を用いた場合と EB 培地を用いた場合との間にも差は認められなかった。

考 察

DNA プローブ法は、主に感染症の迅速診断法として臨床材料を対象に開発され、広く採用されてきており¹⁸⁾、

最近、食品衛生の分野でもサルモネラ等のキット類が市販され始めた。*Listeria* 属菌の DNA プローブキットは当初から食品用に開発されたものであるが、その実用性について調べた例は極めて少なく、開発者自身の報告^{8,9)}の中で若干検討されているにすぎない。そこで、著者らは市販ナチュラルチーズおよび市販食肉の *Listeria* 属菌の検査に当キットを用い、従来の培養法との比較検討を試みた。

当キットによる *Listeria* 属菌の検出成績を従来の培養法の検出成績と比較すると、ナチュラルチーズ、食肉ともに有意差は認められなかった。しかも、DNA プローブ法による検査では、最終成績を得るまでに2日間の培養とその後のキットを用いた3時間の操作で終了するのに対し、培養法では約10日間を要する。さらに、DNA プローブ法では操作が容易で熟練を必要としなかったが、培養法では集落の鑑別、各種性状試験の実施等手技に熟練を要する部分が多かった。これらのことから、DNA プローブ法は培養法に比較して、迅速性、簡便性の点で優れ、日常検査で十分応用可能であり、有用であると考えられた。

著者らが DNA プローブ法での検出限界を確認したところ、 $10^6 \sim 10^7$ /ml であった。同方法で陽性の結果を得るためには、増菌培養によってこの菌量にまで増殖させる必要がある。ナチュラルチーズについて培養法で *Listeria* 属菌が検出されたにもかかわらず DNA プローブ法では陰性を示した検体が5例あったが、このうち4例は培養法でも2日間の増菌培養では検出されず、7日間で初めて検出されたものであった。また、食肉では培養法で *Listeria* 属菌が検出されたにもかかわらず、EB 培地を使用した DNA プローブ法で陰性であった5例のうち、2例は培養法でも7日間の増菌培養で初めて検出できたものであった。これらのことから、培養法で検出されたにもかかわらず DNA プローブ法で陰性を示した検体は菌量が少なく、マニュアルで示された24時間の増菌培養では検出可能な菌量にまで増殖されなかったことが考えられる。したがって、増菌時間を延長すれば DNA プローブ法での検出率をさらに高めることが可能であると推測される。

DNA プローブ法のマニュアルで指定された増菌培地は食肉では UVM-2 培地であるが、今回は食肉の *Listeria* 属菌の検査に広く使用されている EB 培地⁴⁾も併用した。その結果、UVM-2 培地と EB 培地との間で *Listeria* 属菌および *L. monocytogenes* の検出成績に有意な差は認められなかった。

マニュアルで規定された平板培地は LPM 培地であるが、今回の検査では Oxford 培地を用いた。この理由は、LPM 培地と Oxford 培地との間で *Listeria* 属菌の検出率に差がないというわれわれの調査結果に基づいてい

る¹⁰⁾。しかも、Oxford 培地では *Listeria* 属菌はエスクリン分解により集落周囲が褐色化するため、褐色化の観察されない平板についてはその後のキットによる検出を行う必要がないという利点がある。そのため、キットの経費削減の観点からも Oxford 培地等の肉眼的に平板上で *Listeria* 属菌の存在が推測できる培地の使用が良いと思われる。

市販キットの採用にあたって考慮すべき点は、検出対象が *L. monocytogenes* のみでなく全ての *Listeria* 属菌であるという点である。現在のところ、*Listeria* 属菌中で人に病原性の認められている菌種は *L. monocytogenes* のみであることを考えると、*Listeria* 属菌の汚染率の比較的低い食品については属の段階でのスクリーニングは十分有用である。しかし、食肉ではわが国の市販食肉の70~80%から *Listeria* 属菌が検出され、このうち約半数が *L. monocytogenes* であるという事実¹⁰⁾から、*L. monocytogenes* のみを検査の対象とする必要がある。最近、*L. monocytogenes* を検査する DNA プローブもいくつか開発され、研究レベルで使用されつつあるが^{3,6)}、日常検査で使用可能なキット類の開発が早急に望まれる。

引用文献

- 1) BECKERS H. J.: *Foodborne Listeriosis. Proc. of a Symposium on September 7, 1988 in Wiesbaden, FRG*, 123~143 B. Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg (1989).
- 2) BRACKETT R. E.: *Food Tech.*, 42, 162~164 and 178 (1988).
- 3) DATTA A. R., WENTZ B. A., SHOOK D., et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2933~2937 (1988).
- 4) DONNELLY C. W.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 644~646 (1988).
- 5) DONNELLY C. W. and BAIGENT G. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 689~695 (1986).
- 6) FLAMM R. K., HINRICHS D. J. and THOMASHOW M. F.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 2251~2256 (1989).
- 7) FLEMING D. W., COCHI S. L., MACDONALD K. L., et al.: *New Engl. J. Med.*, 312, 404~407 (1985).
- 8) KING W., RAPOSA S., WARSHAW J., et al.: *Int. J. Food Microbiol.*, 8, 225~232 (1989).
- 9) KING W., RAPOSA S. M., WARSHAW J. E., et al.: *Foodborn Listeriosis*, Miller, A. J. et al. eds., 117~124, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam (1990).
- 10) 小久保彌太郎, 飯田 孝, 金子誠二, ほか: 食衛誌, 31, 51~56 (1990).
- 11) KVENBERG J. E.: *Microbiol. Sci.*, 5, 355~358 (1988).
- 12) LINNAN M. J., MASCOLA L., LOU X. D., et al.: *New Engl. J. Med.*, 319, 823~828 (1988).

- 13) LOVETT J.: *Food Tech.*, 42, 172~175 (1988).
14) LOVETT J., FRANCIS D. W. and HUNT J. M.: *J. Food Protect.*, 50, 188~192 (1987).
15) McLAUHLIN J. and PINI P. N.: *Lett. Appl. Microbiol.*, 8, 25~27 (1989).
16) RALOVICH B.: *Int. J. Food Microbiol.*, 8, 205~217 (1989).
17) SKOVGAARD N.: *Acta Microbiologica Hungarica*, 36, 239~243 (1989).
18) TENOVER F. C.: *Clin. Microbiol. Rev.*, 1, 82~101 (1988).
19) WHO Working Group: *Bull. WHO*, 66, 421~428 (1988).

《海外文献要録》

鉛の毒性：明らかな中毒症から不顕性鉛中毒，さらに微妙な生体影響へ

Lead Toxicity: From Over to Subclinical to Subtle Health Effect

R. A. GOYER: *Environ. Health Perspect.*, 86, 177~181 (1990).

この論文は、1988年アメリカ国立環境衛生研究所が主催した21世紀の環境衛生と題するカンファランスでの講演内容の要旨である。その目的は、鉛暴露指標である血中鉛濃度の段階的軽減に照らして人に与える鉛の影響を概観することにある。鉛の毒性は、その関与が明らかな症状、すなわち、疝痛、脳症、貧血、腎疾患に限られていた。しかし、ここ15~20年間に環境中の鉛による不顕性鉛中毒が証明された。これは、神経心理学的行動評価や生化学的手法によってのみ検出可能な病態を示す。新知見によって職業性鉛暴露許容限度ばかりでなく、幼児の許容限度も引き下げられた。また、大気中鉛の主な汚染源であるガソリンの鉛含有量は規制された。

さらに最近では、微妙な神経学的障害、高血圧、先天性奇形、免疫毒性、発育障害のような、一般的な疾患の病因のひとつとして、環境中の鉛が関連づけられ、生体に微妙な影響を及ぼすものと解されている。21世紀に向けて公衆衛生上重要な課題は、人の最適な健康状態に合致するレベルに鉛暴露量を軽減することである。これまで大気中への鉛の排出を減少する努力がなされ、その努力目標はかなり達成された。しかし、酸性雨のような他の環境変化によって、土壤中に蓄積された鉛の溶出や可動化が増加する中で、われわれは食物や飲料水中の鉛濃度の減少に努めなければならない。

(学会誌編集委員会)