

Listeria monocytogenes による ready-to-eat 食品の汚染実態

Isolation of *Listeria monocytogenes* from the ready-to-eat Foods

菅原 直子*¹ 佐々木ひとえ 加藤 浩之
小林 妙子 渡邊 節 山田 わか*²
谷津 壽郎 斎藤 紀行

Naoko SUGAWARA, Hitoe SASAKI, Hiroyuki KATOH
Taeko KOBAYASHI, Setsu WATANABE, Waka YAMADA
Juro YATSU, Noriyuki SAITO

近年、*Listeria monocytogenes* が魚介類加工品や生食用野菜などの ready-to-eat 食品から検出され、本菌による食中毒集団感染事例のリスクが懸念されている。平成 18 年度宮城県内の流通品について汚染実態調査を行った結果、辛子明太子および鶏肉から汚染菌量は少ないものの病原遺伝子を保有した菌が検出された。また、LM の迅速検査法を検討し、発色酵素基質培地、LAMP 法の応用が有効であると思われた。

キーワード：*Listeria monocytogenes*；ready-to-eat 食品；魚介類加工品；LAMP 法

Key words：*Listeria monocytogenes*；ready-to-eat foods；seafood products；LAMP method

1 はじめに

リステリア属菌は自然界に広く生息する細菌であり、このうちヒトに病原性を示すものは *Listeria monocytogenes* (以下 LM) のみである。リステリア症は人獣共通感染症の一つで、周産期の流産死や胎児敗血症、成人の髄膜炎、敗血症などの症状を示す。一方、1980 年代に欧米諸国で乳製品や食肉製品などを原因とする集団感染事例が相次いで報告されるようになり、現在も多くの事例が報告されている¹⁾。

日本でも平成 5 年に乳および乳製品のリステリア菌の汚染防止について、当時の厚生省から通知が出され²⁾、食中毒原因菌の一つとして検査法が示された。2001 年には国内産ナチュラルチーズによる国内初の集団感染事例が発生し、国内でも本菌の食品汚染の実態調査や制御についての議論が進められている。

近年、これまでの乳製品等に加え、生食用鮮魚介類や魚介類加工品、生食用野菜・果物など生でそのまま食べる食品“ready-to-eat 食品”の LM 汚染の報告がみられるようになった³⁾。しかし、LM の食品中での挙動や菌数などの詳細については明確にされていない。

このことから、汚染実態の把握を目的に、宮城県内に流通する ready-to-eat 食品を中心とした LM 検索を行った。また、菌検出時における発色酵素基質培地の有効性の検討および分離菌の保有病原因子検索も併せて行った。さらに、LAMP (Loop-Mediated isothermal Amplification) 法による検出感度を標準株を用い検討した。

2 材料

市場に流通している ready-to-eat 食品および食材計 102 検体を検査対象とした。

2.1 ready-to-eat 食品

魚介類加工品 22 検体 (辛子明太子 9 検体、たらこ 9 検体、すじこ 1 検体、数の子 1 検体、スモークサーモン 2 検体)、生鮮魚介類 11 検体、乳製品 16 検体 (ナチュラルチーズ 8 検体、アイスクリーム類 8 検体)、生食用芽物野菜 38 検体の計 87 食品

2.2 食材等

生乳 5 検体、食肉 10 検体 (鶏肉 7 検体、合鴨肉 3 検体) 計 15 食材

3 方法

3.1 食品、食材からの菌分離

生乳・乳製品からのリステリア菌の分離は厚生省通知の方法に従って行った。すなわち検体 25g に EB 培地 (Merck) 225ml を加え 10 倍乳剤とし、30℃で 48 時間培養後、Oxford 寒天培地 (Merck：以下 OX)、PALCAM 寒天培地 (Merck：以下 PAL) 及びクロモアガー・リステリア培地 (CHROMagar：以下 C-Lis) の 3 種の分離培地に 1 白金耳ずつ塗抹し、35℃で 48 時間培養した。各培地に発育したリステリア菌の疑わしい集落を釣菌し、0.6%酵母エキス加トリプチン寒天培地 (自家製：以下 TSYEA) に接種培養後、3.2 に示す生化学性状の確認を行って同定した。なお、リステリア属菌同定キット「アピリステリア」(日本ビオメリュー) も併用した。

その他の食品、食材は、ISO⁴⁾の方法に準じて行った。検体 10g に半濃度フレーザー培地 (Merck) 90ml を加え 10 倍乳剤とし、30℃で 24 時間培養後、100 μ l を 10ml フ

* 1 現 中南部下水道事務所

* 2 現 (財) 宮城県公衆衛生協会

フレーザー培地に接種した。さらに35℃で48時間培養後、OX, PAL, C-Lisの各培地に1白金耳ずつ塗抹し培養した。以下、生乳・乳製品の方法と同様にして菌の同定を行った。

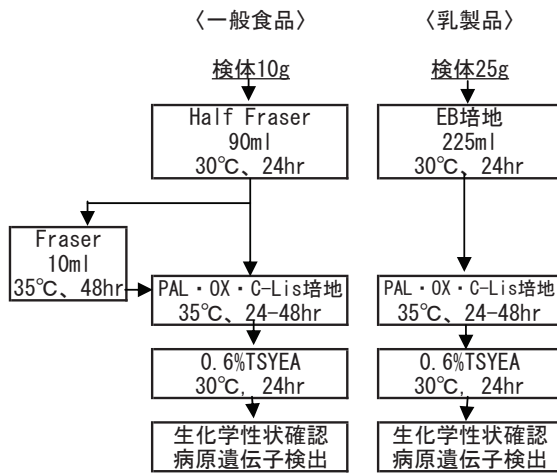


図1 各食品からのLM分離フロー

3.2 分離菌株の確認試験および血清型別

分離菌株について、グラム染色、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験(日本製薬)、CAMP試験、VP試験(栄研化学)および糖分解試験を実施した。グラム陽性短桿菌、カタラーゼ試験陽性、オキシダーゼ試験陰性、SIM確認培地(栄研化学)での運動性(傘状発育)の確認、VP反応陽性、糖分解性(ラムノース分解陽性、キシロース分解陰性、マンニト分解陰性)、CAMPテスト陽性となったものをリステリア属菌とし、同定キットにより菌種を決定した。

血清型別はリステリア型別用免疫血清(デンカ生研)を用いて行った。なお、標準菌株 *L.monocytogenes* ATCC 19112についても各試験を実施した。

3.3 特異遺伝子の検出

リステリアの病原遺伝子の確認を *hly*⁵⁾ および *prfA*⁶⁾ のプライマーを用い、各々276bpおよび467bpを検出することで行った。

3.4 LM菌数の測定

LMの菌数測定はMPN法で行った。すなわち、検体に添加剤を含まない半濃度フレーザー培地を加え10倍希釈液を調製した。滅菌した空試験管3本に10倍希釈液を10mlずつ入れた。さらに半濃度フレーザー培地10mlの入った試験管に10倍希釈液を1mlずつ3本に、0.1mlずつを3本に分注した。これらを35℃で24時間および48時間培養し、それぞれからPAL, C-Lisに1白金耳ずつ塗抹しLMを検出、性状確認した。LMを検出した試験管数と希釈倍率からMPN値を求めた。

3.5 LAMP法によるLM検出

LMの標準株をフレーザー培地で24時間培養後、培養液を原液から10⁹希釈まで10段階希釈した。希釈液をそれぞれ50μl採り、2000×g、5分間遠心後上清を除去し、

EXF80μlを加え95℃で5分間アルカリ熱処理した。これに1MのTris-HCl 10μlを添加し2000×gで30秒間遠心した上清を検体とした。それぞれについてLoopamp *L.monocytogenes* 検出キット(栄研化学)を用いて遺伝子を増幅し、Loopampリアルタイム濁度測定装置(RT-160C)で測定を行った。同時に、用いたLM菌数を平板培地を用いた生菌測定法で測定した。

4 結果

4.1 各食品・食材からのLM検出状況

調査した食品・食材を品目別にし、それぞれからのリステリア属菌の分離状況を表1に示した。リステリア属菌は魚介類加工品では辛子明太子9検体中6検体(検出率66.7%)すじこ1検体中1検体(100%)から、肉類では鶏肉7検体中3検体(42.9%)から合計10菌株分離された。生鮮魚介類、乳類・乳製品および芽物野菜からはリステリア属菌は検出されなかった。

4.2 分離リステリア属菌の同定

分離したリステリア属菌10株と標準菌株について、生化学性状の確認試験、血清型別試験および病原遺伝子検査を実施し、その結果を表2に示した。また、LMが検出された検体は菌数をMPN法で求め、これも表2に示した。

辛子明太子から検出された6株のリステリア属菌のうち2株が、鶏肉から検出された3株のリステリア属菌のうち1株がLMであった。血清型は3株とも別々で1/2b, 3bおよび4bであった。LMの病原遺伝子 *hly* および *prfA* を3株とも保有していた。

4.3 発色酵素基質培地での発育性

LMの分離に用いられるOX, PAL培地上でリステリア属菌は灰色~茶褐色の集落を形成するので、種の区別は困難であり、発育集落をLMと特定できない。発色

表1 各食品・食材からのLM検出状況

検体種類	検体数	検出(検出率)
魚介類加工品		
辛子明太子	9	6 (66.7)
たらこ	9	0
すじこ	1	1 (100)
数の子	1	0
スモークサーモン	2	0
生鮮魚介類	11	0
乳類・乳製品		
生乳	5	0
ナチュラルチーズ	8	0
アイスクリーム類	8	0
芽物野菜	38	0
肉類		
鶏肉	7	3 (42.9)
合鴨肉	3	0
計	102	10 (9.8)

酵素基質培地 C-lis を菌分離に用い、その結果を表2に示したように、リステリア属菌は C-lis 培地に発育し青い集落となる。しかも LM には特徴的に白色ハローが認められた。一方、C-lis 培地での発育性を黄色ブドウ球

菌と大腸菌について調べた結果、大腸菌は発育しないが、黄色ブドウ球菌は発育した。しかし黄色ブドウ球菌は培地上でやや淡色の青色集落を形成し、リステリア属菌とは鑑別ができた。

表2 検出菌の性状

検体 No (検体名)	C-Lis		カタラーゼ	溶血性	V P	運動性	糖分解性			病原遺伝子保有状況		菌種・血清型	菌数 (MPN/100g)
	集落の色	ハロー形成					ラムノース	キシロース	マンニット	<i>hly</i>	<i>prfA</i>		
K-2 (辛子明太子)	青	+	+	+	+	傘状	+	-	-	+	+	LM 1/2b	60
K-19 (辛子明太子)	青	+	+	+	+	傘状	+	-	-	+	+	LM 3b	<30
K-8 (辛子明太子)	青	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	<i>L.welshimeri</i>	NT
K-10 (辛子明太子)	青	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	<i>L.welshimeri</i>	NT
K-12 (辛子明太子)	青	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	<i>L.welshimeri</i>	NT
K-18 (すじこ)	青	-	+	-	+	傘状	-	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>	NT
K-20 (辛子明太子)	青	-	+	-	+	傘状	+	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>	NT
M-2 (鶏肉)	青	+	+	+	+	傘状	+	-	-	+	+	LM 4b	<30
M-1 (鶏肉)	青	-	+	-	+	傘状	+	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>	NT
M-7 (鶏肉)	青	-	+	-	+	傘状	+	-	-	-	-	<i>L.innocua</i>	NT
<i>L.monocytogenes</i> (ATCC19112 株)	青	+	+	+	+	傘状	+	-	-	+	+		

+ : 陽性 - : 陰性 NT : 実施せず

4.4 LAMP 法による検出感度

LM の ATCC19112 株を 1 日培養した 1.6×10^8 cfu/ml の菌液を $10^{-1} \sim 10^{-6}$ に希釈し、そのそれぞれを LAMP 法用検体として LM の遺伝子検査を行った結果を表3に示した。 1.6×10^5 cfu/ml 以上の菌量で陽性を示した。

表3 LAMP 法の感度

希釈倍率	原液	$\times 10$	$\times 10^2$	$\times 10^3$	$\times 10^4$	$\times 10^5$	$\times 10^6$
LAMP 法	+	+	+	+	-	-	-
菌数 (cfu/ml)	$\times 10^8$	$\times 10^7$	$\times 10^6$	$\times 10^5$	$\times 10^4$	1600	160

+ : 陽性 - : 陰性

5 考察

宮城県内に流通する ready-to-eat 食品を購入し、リステリア属菌の汚染状況を調べた。その結果、辛子明太子 2 検体および鶏肉 1 検体から LM が、魚介類加工品 5 検体、鶏肉 2 検体から LM 以外のリステリア属菌が検出され、本県の流通品も他の報告⁷⁾と同様の汚染であることが分かった。リステリア菌の血清型別は O 抗原因子と H 抗原因子の組み合わせで 13 種類に分類されるが、今回検出された LM の血清型は辛子明太子が 1/2a および 3a、鶏肉が 4b であった。4b は最も病原性に関する血

清型といわれ、臨床株の 6 割がこの型である³⁾。市販品の鶏肉から 4b が検出され、検出された菌株は全て病原遺伝子 *hly* および *prfA* の病原遺伝子を保有していたが、汚染菌量は、辛子明太子で 30 未満 ~ 60/100g、鶏肉で 30 未満 /100g と少量であったことからリステリア症感染のリスクは低いと考えられた。

今回示したように、食品は *L.innocua* のような LM 以外のリステリア属菌に汚染されていることが多い⁸⁾ことから、LM との鑑別は重要である。LM は OX 及び PAL の分離培地上でエスクリンを分解し灰色から茶褐色で中央部のやや凹んだ集落を形成する。しかし LM 以外のリステリア属菌も OX, PAL 培地上で同じ性状を示すため、これら分離培地での菌の鑑別は困難である。発色酵素基質培地 C-Lis では、リステリア属菌は青い集落を形成し鑑別が容易であった。なお、同じく C-lis 培地上に発育する *Staphylococcus* 属菌は集落の発色がやや異なり区別ができる。さらに LM と *Livanovii* は青い集落周囲に白色ハローを形成するが、それ以外のリステリア属菌はハローを形成せず、種の決定にも発色酵素基質培地が有効であることが確認された。

われわれの今回の結果も含め、一般に食品中の LM 菌数は少量であることから、通常の LM 検出法には 2 段階増菌法が用いられ LM の検出には 4-5 日を要する。そこで、迅速かつ高感度な LM 検出方法の検討の一つと

して LAMP 法について検討した。標準株検体を 1 日増菌培養すると約 1 時間で判定が可能であったことから、LAMP 法は迅速性に優れていると思われた。しかし陽性判断には 10^5 cfu/ml 以上の菌量が必要であることから、食品直接からの検出は困難で、増菌した検体についての応用は有効と考えられる。それでも通常の検査手法より早く判定されることから、LAMP 法による迅速検査法は実用性が高いと思われた。今後多くの食品について LAMP 法による LM の検討法を検討したい。

LM によるリステリア症はヒトに感染すると髄膜炎や敗血症、流産等の重篤な症状を示し、致死率も高いことから、欧米では食品衛生上特にリスク評価を行うべき細菌と位置付けられている。わが国では食品からのリステリア感染事例は不明なことが多く、さらに欧米型の畜産食品中心の食生活ではなかったことから関心が低かった。しかし日本人の食文化に密接に関係する魚介類加工品を中心とした ready-to-eat 食品に病原遺伝子を保有するリステリア汚染が確認されたことから、今後も継続した調査を行い、LM 汚染実態を把握していく必要があると思われる。

参考文献

- 1) 五十君静信：食品衛生研究 Vol.53, No.9 (2003)
- 2) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知 “乳及び乳製品のリステリアの汚染防止等について” 平成 5 年 8 月 2 日, 衛乳第 169 号 (1993)
- 3) 仲真晶子: Jpn. J. Food Microbiol., 23(4), 183-189, (2006)
- 4) (社) 日本食品衛生協会: “食品衛生検査指針微生物編” 256, (2004)
- 5) KARVEN J COORAY, TANAKA NISHIBORI, HUABAO XIONG, TOHEY MATSUYAMA, MASASHI FUJITA and MASAO MITSUYAMA: APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol.60, No.8 3023 (1994)
- 6) 宮原美知子, 後藤公吉, 正木宏幸, 齊藤章暢, 金子誠二, 増田高志, 小沼隆博: 日本食品微生物学会雑誌 19 (2) 47 (2002)
- 7) 中村寛海: 生活衛生 Vol.50 No.4 175-184 (2006)
- 8) 真仲晶子: 防菌防黴 Vol.31, No.3 159-168 (2003)