=原 著=

ナチュラルチーズ工場における *Listeria* 属菌の 環境モニタリングへの自動免疫蛍光測定装置の利用

宮本真理[†]・菊次 智・須藤朋子・西原正晴・
石井 哲・藤田 孝*・鷺尾信幸

(雪印メグミルク株式会社品質保証部食品衛生研究所)

(受付: 平成27年5月5日)

(受理: 平成27年8月28日)

Environmental Monitoring of *Listeria* Genus Using Enzyme-Linked Fluorescence Assay in the Natural Cheese Factory

Mari MIYAMOTO, Satoshi KIKUTSUGI, Tomoko SUDO, Masaharu NISHIHARA,
Satoshi ISHII, Takashi FUJITA and Nobuyuki WASHIO

(Institute of Food Hygiene, Quality Assurance Department, Megmilk Snow Brand Co., Ltd.,
1-1-2 Minamidai, Kawagoe, Saitama 350-1165, Japan)

Listeria infection is caused by consuming food containing *L. monocytogenes* which is contaminated from environment. Therefore, the cleanliness and hygiene maintained in the factory are the utmost importance in controlling *L. monocytogenes*. VIDAS UP *Listeria* is an automated rapid detection kit of *Listeria* genus in food and environmental samples. In this study, VIDAS UP *Listeria* and a selective medium, LPT Broth, were evaluated. The maximum growth rate and OD of *L. monocytogenes* in LPT Broth were compared with those in half Fraser Broth with no added ammonium iron(III) citrate or Fraser Broth with no added ammonium iron(III) citrate. The maximum growth rate of LPT Broth was 3.0 to 6.3 times faster than other medium. The maximum OD of LPT Broth was 2.4 to 2.9 times higher than other medium. In addition, the growth of Gram-negative bacteria such as *Acinetobacter* and *Pseudomonas* was inhibited in LPT Broth. The growth of *L. monocytogenes* was delayed in co-culture with *Microbacterium arborescens* and *P. putida* group. Negative correlation was detected between initial counts of these bacteria and the count of *L. monocytogenes* after co-culture. A long incubation time (26 to 30 hr) was suitable for detection of *L. monocytogenes* in environment samples. In conclusion, VIDAS UP *Listeria* was a powerful tool for the rapid detection of *Listeria* genus in environmental samples.

Key words: *Listeria monocytogenes*, natural cheese, co-culture, VIDAS

緒 言

Listeria 属菌は環境中に広く分布することが知られている。このうち、リステリア症の原因菌である *Listeria monocytogenes* は、髄膜炎や敗血症といった症状を示し、

重篤化した場合には致死率が高いことで知られる食中毒菌である。本菌は生乳にも存在し4℃以下での増殖も可能であることから、低温で長期熟成させるナチュラルチーズを原因とする集団感染事例が海外では多く報告されている^{17, 21)}。国内では食品衛生法において、病原微生物により汚染されたものの製造、販売などが規制されており、非加熱食肉製品およびソフト、セミハード系のナチュラルチーズから *L. monocytogenes* が検出された場合には、輸入などが禁止されてきたが、平成21年に

[†]連絡先 mari-miya@meg-snow.com
〒350-1165 埼玉県川越市南台1-1-2
電話: 049-242-8155

*現所属: 雪印メグミルク株式会社ミルクサイエンス研究所

コーデックスで微生物規格の国際基準が採択されたことを受け、国内においてもナチュラルチーズ（ソフト、セミハードのものに限る）および非加熱食肉製品の成分規格に100 cfu/g以下という基準値が設けられ平成26年12月25日に施行された。しかし、チーズでは5℃、21日間で*L. monocytogenes*が増殖することが確認されており¹⁷⁾、これよりも長期の賞味期限が設定されている商品も多い。また、*L. monocytogenes*は生乳に存在していることが知られており²⁶⁾、乳製品工場から施設定着株が検出された報告もある¹⁸⁾。そのため、われわれ食品製造メーカーは環境モニタリングによる衛生管理の徹底など、商品の安心、安全の向上に向けた取り組みを継続して実施する必要がある。

前述のとおり、本菌は自然界に広く存在することから、原材料を起源として食品中で増殖する以外にも、環境からの二次汚染が感染経路として考えられている^{9, 17)}。そのため、*L. monocytogenes*を制御するためには製造環境の徹底した衛生管理が求められており、*L. monocytogenes*が生息可能な条件が整っていることを示す指標として*Listeria*属菌を用いることが環境モニタリングでは特に有効であると考えられている^{4, 6)}。*L. monocytogenes*検出のための公定法¹³⁾はISO法に準拠しており、*Listeria*属菌の定性的な検出に通常4日を要する。*Listeria*属菌の検出法としては、これまでに各種の迅速測定法が開発されており、ELISA法、イムノクロマト法、PCR法などが報告されている^{5, 14, 25)}。自動免疫蛍光測定装置(VIDAS)もその一つであり、他の方法と比較しても操作性、迅速性に優れる利点がある。そこで、*Listeria*属菌を迅速に検出可能なVIDAS UP *Listeria* (SYSMEX bioMérieux)を用いた検査法について、その有効性を検証した。

材料および方法

1. 供試菌株

*L. monocytogenes*は当社ナチュラルチーズ製造工場の未殺菌乳から分離したIFH 2570, 2729および、臨床株としてScott A (ATCC 49594)を供試した。環境や食品に一般的に共存する細菌（以下、「一般細菌」と示す）には、当社製造ラインの排水口から分離した*Acinetobacter johnsonii* IFH 2581, *A. beijerinckii* IFH 2577, *A. lwoffii* IFH 2578, *Bacillus cereus* group IFH 2586, *B. nealsonii* IFH 2589, *Brevundimonas faecalis/terrae* IFH 2579, *Cellulosimicrobium funkei* IFH 2588, *Microbacterium arborescens* IFH 2587, *M. paraoxydans* IFH 2516, *Pseudomonas cuatrocienegasensis* IFH 2576, *P. anguilliseptica/peli* IFH 2580, および未殺菌乳から分離した*P. putida* group IFH 2572を供試した。*L. monocytogenes*はBHI Broth (Becton, Dickinson and Company)、一般細菌はTS Broth (Merck)にて30℃、一晚培養した。

2. *Listeria*増菌培地における増殖能

*L. monocytogenes*のBHI Broth培養液 10 mlを遠心分

離 (2,900×g, 10 min, 4℃) によって上清を除去し、0.85%生理食塩水10 mlで2回洗浄した。洗浄して遠心分離により集めた菌体は、0.85%生理食塩水10 mlに再懸濁して10⁹ cfu/mlの洗浄菌体を調製した。クエン酸鉄アンモニウム(III)を除いたhalf Fraser Broth (Merck) およびFraser Broth (Merck)、迅速測定法の増菌培地であるLPT Broth (SYSMEX bioMérieux)それぞれ15 mlに、この洗浄菌体を150 μl接種し、専用のL字管 (ADVANTEC)へ移し、バイオフィトメーター TVS-126MA (ADVANTEC)を用いて30℃で培養し、1 hrごとにOD (660 nm)を測定した。最大増殖速度(V_{max}/hr)は測定データから1 hr当たりのOD増加を算出した増殖速度 ($v = (OD_{t2} - OD_{t1}) / (t2 - t1)$) の最大値を、ODの最大値は測定データからその最大値を求めた。なお、half Fraser, Fraser Brothの構成成分であるクエン酸鉄アンモニウム(III)は、*Listeria*属菌の増殖とともに培地を黒変させ、OD値に影響するため添加しなかった。*L. monocytogenes*の増殖能は、クエン酸鉄アンモニウム(III)を無添加とすることによって影響を受けないことを事前に確認した。

3. 一般細菌との共存下における*L. monocytogenes*の検出

LPT Broth 15 mlに*L. monocytogenes*はBHI Broth培養液を0.85%生理食塩水で段階希釈して調製した10⁻⁷希釈液を150 μl接種、一般細菌はTS Broth培養液をそのまま1.5 ml接種した。これにより初期菌数が*L. monocytogenes* 1~3 cfu/ml, *M. paraoxydans* 10⁹ cfu/ml, *B. cereus* group 10⁸ cfu/ml, *M. arborescens* 10⁸ cfu/ml, *B. nealsonii* 10⁷ cfu/mlとなったLPT Brothを、30℃で22~30 hr培養した。本キットのプロトコールに従い、このLPT Broth培養液2~3 mlを試験管に移し、95~100℃で5±1 min処理して冷却、混合後、500 μlをVIDAS UP *Listeria* (SYSMEX bioMérieux)のストリップ上のサンプル用ウェルに移し、mini VIDAS (bioMérieux)によって*L. monocytogenes*を検出した。

*L. monocytogenes*の菌数はPALCAM寒天培地(Merck)で35℃、1日培養して得られる灰色~濃オリーブグリーン~黒色のハローを形成するコロニーを計数して算出した。一般細菌数はTSA培地(Merck)で30℃、2日間培養して得られるコロニーを計数して算出した。なお、TSA培地には*L. monocytogenes*も生育し白色スムーズコロニーとして検出される¹⁶⁾ことから、*Bacillus*属の2菌株はその典型的な形態であるラフコロニー¹⁵⁾を、*Microbacterium*属の2菌株は黄白色スムーズコロニー²⁴⁾を計数した。

4. *L. monocytogenes*の増殖抑制因子の探索

M. arborescens IFH 2587のTS Broth培養液 20 mlを10 ml×2本に分注し、1本は遠心分離によって上清を得るとともに、前述（第2項）と同様にして洗浄菌体を調製した。この洗浄菌体を5 ml×2本に分注し、1本は65℃、

30 min 処理して加熱処理菌体を調製した。TS Broth 培養液の上清については0.22 μ m 滅菌フィルターでろ過し、菌体を完全に除去した。

LPT Broth 10 ml に初期菌数が、*L. monocytogenes* Scott A は1.3 cfu/ml、*M. arborescens* IFH 2587 のTS Broth 培養液と洗浄菌体は 10^8 cfu/ml (添加量としてはそれぞれ1 ml)、加熱処理菌体と上清は1 ml 添加し、30℃で22 hr 培養した。培養後の*L. monocytogenes* 菌数はPALCAM 寒天培地を用いて、第3項と同様に測定した。*L. monocytogenes* を単独培養した菌数を1とし、*M. arborescens* IFH 2587 のTS Broth 培養液、洗浄菌体、加熱処理菌体、上清を添加したときの*L. monocytogenes* 菌数の比率を算出した。

5. 一般細菌の初期菌数が*L. monocytogenes* に及ぼす影響

前述(第2項)と同様にして調製した洗浄菌体を用いて、LPT Broth に初期菌数が、*L. monocytogenes* Scott A は2.1 cfu/ml、*M. arborescens* IFH 2587 は $10^8 \sim 10^4$ cfu/ml、*P. putida* group IFH 2572 は $10^7 \sim 10^3$ cfu/ml となるよう、1/10 ずつ段階的に低減させて接種し、30℃で22 hr 培養後の*L. monocytogenes* の菌数を測定した。*L. monocytogenes* の菌数はPALCAM 寒天培地を用いて、第3項と同様に測定した。

6. ナチュラルチーズ製造工場における*Listeria* 属菌の環境モニタリング

ナチュラルチーズを製造している4工場を対象に、拭取り検査を実施した。拭き取る場所はヘイマンの報告⁸⁾にあるゾーン2(生産区域内で製品接触表面に隣接する、または近い範囲内の製品接触面以外)を中心に、装置の外側、底部、床、排水口等とし、製造中に拭き取りを行った。検査にはLethen Broth (Merck) 10 ml によって復元した滅菌ドライスポンジ(エルメックス)を用い、対象場所を拭き取った後に付属のサンプリングバックへ戻し、LPT Broth 100 ml を添加して30℃、26 hr 増菌培養した。このLPT Broth 培養液は、本キットのプロトコールに従って第3項と同様の処理を行い、mini VIDAS によって*L. monocytogenes* を検出した。

結 果

1. *Listeria* 増菌培地における*L. monocytogenes* の増殖能

クエン酸鉄アンモニウム(III)を除いたhalf Fraser Broth およびFraser Broth、迅速測定法の増菌培地であるLPT Broth において30℃で培養した*L. monocytogenes* の、最大増殖速度およびODの最大値をFig. 1に示す。いずれの供試菌もLPT Broth において最大増殖速度が顕著に速く(0.181~0.247/hr)、クエン酸鉄アンモニウム(III)を除いたhalf FraserやFraser Broth の3.0~6.3倍、ODの最大値も顕著に高く(0.887~1.078)、クエン酸鉄アンモニウム(III)を除いたhalf FraserやFraser Broth の2.4~2.9倍となった。ISO法の二次増菌に使用するFraser Broth は本来35℃あるいは37℃培養であるが^{10, 11)}、今回は培地種による*L. monocytogenes* の増殖能を比較するため、30℃培養とした。クエン酸鉄アンモニウム(III)を除いたFraser Broth における*L. monocytogenes* Scott A、IFH 2570、IFH 2729の35℃培養での最大増殖速度はそれぞれ、0.051、0.053、0.044/hr、ODの最大値は0.248、0.393、0.337となった。30℃培養に対する35℃の最大増殖速度は1.0~1.1倍、ODの最大値は0.9~1.1倍の範囲となり、大きな差は認められなかった。

2. LPT Broth における一般細菌の増殖能

一般細菌をLPT Broth を用いて30℃でODをモニタリングした結果、供試したグラム陰性菌6菌種のうち5菌種(*A. beijerinckii* IFH 2577、*A. johnsonii* IFH 2581、*A. lwoffii* IFH 2578、*P. anguilliseptica/peli* IFH 2580、*P. cuatrecasensis* IFH 2576)のODは増加せず、増殖が認められなかった。増殖が認められた菌種について、*L. monocytogenes* Scott A と比較した結果をFig. 2に示す。これらのグラム陽性菌においても、*L. monocytogenes* は10 hr 以内にODが0.6に達したのに対し、これに次いで速かった*M. arborescens* は17 hr を要しており、LPT Broth では*L. monocytogenes* の増殖が速かった。

Fig. 1. Maximum growth rate and maximum optical density of *Listeria monocytogenes* incubated at 30℃ in selection medium. ■, Scott A; ■, IFH 2570; ■, IFH 2729; AIC free, medium with no added for ammonium iron(III) citrate.

Fig. 2. Monitoring the optical density of bacteria in LPT Broth at 30 °C. —●—, *Listeria monocytogenes* Scott A; —■—, *Cellulosimicrobium funkei* IFH 2588; —△—, *Microbacterium arborescens* IFH 2587; —◇—, *Bacillus cereus* group IFH 2586; —○—, *Bacillus nealsonii* IFH 2589; —□—, *Brevundimonas faecalis/terrae* IFH 2579; —▲—, *Microbacterium paraoxydans* IFH 2516; —◆—, *Pseudomonas putida* group IFH 2572.

3. 一般細菌の共存下における *L. monocytogenes* の検出

LPT Brothにおいて一般細菌と共培養した *L. monocytogenes* Scott A の菌数を Fig. 3 に示す。共培養ではいずれも単独培養に比べ、*L. monocytogenes* Scott A の菌数は低かった。特に、*M. arborescens* IFH 2587 と共培養した *L. monocytogenes* Scott A の菌数は顕著に低く、 10^4 cfu/ml を下回る結果となった。また、この検体については、VIDAS UP *Listeria* の検査結果が陰性となった。そこで、培養を延長したところ、徐々に *L. monocytogenes* Scott A の菌数は増加し (Fig. 4), 26 hr 培養では VIDAS UP *Listeria* で陽性となることが確認された。結果は示さなかったが、*L. monocytogenes* IFH 2570, 2729 それぞれと *M. arborescens* IFH 2587 を共培養した場合には、30°C, 22 hr 培養において VIDAS UP *Listeria* で陽性となり、増殖抑制の程度は菌株によって差が認められた。

4. *L. monocytogenes* の増殖抑制因子の探索

M. arborescens IFH 2587 の培養物、洗浄菌体、加熱処理菌体、培養上清をそれぞれ LPT Broth へ添加し、*L. monocytogenes* Scott A を 30°C, 22 hr 培養した結果を Fig. 5 に示す。*M. arborescens* の培養上清や加熱処理菌体の添加では *L. monocytogenes* の菌数は低減されず、培養上清の添加では *L. monocytogenes* を単独培養したコントロールの菌数よりも 2.5 倍高かった。一方、培養液や洗浄菌体の添加ではコントロールに比べて菌数が 1/10 以下となり、*M. arborescens* の生菌が添加されることで *L. monocytogenes* の増殖は抑制された。

5. 一般細菌の初期菌数が *L. monocytogenes* に及ぼす影響

前項で実施した一般細菌と *L. monocytogenes* の共培

Fig. 3. *Listeria monocytogenes* counts of co-culture with *Listeria monocytogenes* and other bacteria in LPT Broth at 30°C for 22 hr. Pure culture, *Listeria monocytogenes* Scott A; A, co-culture of *Listeria monocytogenes* Scott A and *Microbacterium paraoxydans* IFH 2516; B, co-culture of *Listeria monocytogenes* Scott A and *Bacillus cereus* group IFH 2586; C, co-culture of *Listeria monocytogenes* Scott A and *Microbacterium arborescens* IFH 2587; D, co-culture of *Listeria monocytogenes* Scott A and *Bacillus nealsonii* IFH 2589; C, negative using VIDAS UP *Listeria*.

Fig. 4. *Listeria monocytogenes* counts of co-culture with *Listeria monocytogenes* Scott A and *Microbacterium arborescens* IFH 2587 in LPT Broth at 30 °C. —●—, pure culture; —▲—, co-culture; co-culture at 22 and 24 hr, negative using VIDAS UP *Listeria*.

養試験は、一般細菌数が多い場所の拭き取りを想定し、一般細菌の初発菌数を $10^7 \sim 10^9$ cfu/ml という高い菌数とした。そこで、*M. arborescens* IFH 2587 の接種量を段階的に減少させ、*L. monocytogenes* Scott A の増殖能を評価した。その結果、LPT Broth で増菌培養後の *L. monocytogenes* 菌数は、*M. arborescens* の初期菌数と負の相関 ($R^2=0.951$) が認められた (Fig. 6)。また、未殺菌乳から分離した *P. putida* group IFH 2572 を用いて同様の試験を行ったところ、LPT Broth で増菌培養後の *L.*

Fig. 5. Growth ratio of *Listeria monocytogenes* Scott A cultivated with *Microbacterium arborescens* IFH 2587 in LPT Broth at 30 °C for 22 hr. Control, added fresh TS Broth; culture, added TS Broth culture of *Microbacterium arborescens*; wash cell, added wash cell of *Microbacterium arborescens*; heat treatment cell, added heated treatment cell of *Microbacterium arborescens*; supernatant, added supernatant of *Microbacterium arborescens* cultivated in TS Broth.

Fig. 6. Correlation of *Listeria monocytogenes* counts and bacteria counts in LPT Broth at 30°C. —◆—, *Listeria monocytogenes* Scott A + wash cell of *Microbacterium arborescens* IFH 2587; —□—, *Listeria monocytogenes* Scott A + wash cell of *Pseudomonas putida* group IFH 2572.

monocytogenes 菌数は、*P. putida* groupの初期菌数とも負の相関($R^2=0.957$)が認められた。得られた近似式から算出すると、培養後の*L. monocytogenes*の菌数を 10^5 cfu/mlとするのに要する一般細菌の初期菌数は、*M. arborescens*が 7.4×10^6 cfu/ml、*P. putida* groupが 2.6×10^7 cfu/mlであり、共培養による*L. monocytogenes*の増殖抑制作用は、*M. arborescens*よりも*P. putida* groupで弱い傾向にあった。

6. VIDAS UP *Listeria*によるナチュラルチーズ工場の環境モニタリング

当社のナチュラルチーズを製造している4工場において拭き取り検査を行い、合計191検体をVIDAS UP *Listeria*を用いて検査した。その結果、すべての検体において*Listeria*属菌は陰性であった。

考 察

クエン酸鉄アンモニウム(III)を除いたhalf Fraser BrothおよびFraser Broth、迅速測定法の増菌培地であるLPT Brothの3種について、30°Cで*L. monocytogenes*を培養した際の最大増殖速度およびODの最大値を比較し、LPT Brothが他の2種に比べそれぞれ3.0~6.3倍、2.4~2.9倍と高い値を示した。なお、half Fraser BrothおよびFraser Brothに含まれるクエン酸鉄アンモニウム(III)は、添加・無添加にかかわらず*L. monocytogenes*の増殖能には影響を与えなかった(data not shown)。最大増殖速度が速かった原因として、Fraser Brothの基礎培地には炭素源としてエスクリンが、LPT Brothにはグルコースが配合されており、エスクリンでは加水分解によって得られたグルコースを利用するのに対し、加水分解工程なくグルコースを利用できるLPT Brothは代謝効率の点から有利であることが考えられた。また、炭素源の含有量はFraser Broth中のエスクリン(分子量: 340.282)が1 g/L、LPT Broth中のグルコース(分子量: 180.16)が2 g/Lであり、モル濃度に換算するとそれぞれ2.9、11.1 mMとなり、LPT Brothはクエン酸鉄アンモニウム(III)を除いたFraser Brothの3倍以上の炭素源を含有する。一般的に、窒素源やミネラルなどの栄養成分が十分量存在する条件において、菌体濃度は消費された炭素源の量によって菌株固有の値を示し、「増殖収率=菌体濃度/消費された炭素源濃度」の式が成り立つ²⁾。また、炭素源のモル濃度がLPT Brothと等しくなるようFraser Brothにグルコースを加え、その効果を確認したところ、*L. monocytogenes*の菌数(菌体濃度)はLPT Brothと同レベルの 10^9 cfu/mlに達することを確認した(data not shown)。これらから、LPT Brothに含まれるグルコースのモル濃度が高いことが、*L. monocytogenes*のODの最大値を高めた原因と考えられた。

LPT Brothはグルコースを炭素源としたことで、*Listeria*属菌以外の細菌も増殖可能な培地である。しかし、VIDAS UP *Listeria*は*Listeria*属菌に感染するファージ由来の蛋白質を抗原とした酵素免疫蛍光測定法によって検出するためその特異性は高く、今回の調査では、増菌培養後のLPT Brothに $3.2 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^5$ cfu/ml以上の*Listeria*属菌が存在することにより、他の菌種が混在しても特異的な検出が可能であった。また、*L. monocytogenes*と同様に未殺菌乳から検出事例のある*L. innocua*²²⁾について当社保有株の最大増殖速度を調査したと

ころ, half Fraser, Fraser, LPT Brothはそれぞれ0.073~0.091, 0.067~0.075, 0.277~0.338/hrとなり, *L. monocytogenes*だけではなく*L. innocua*においてもLPT Brothの増殖能が優れることが確認できた。

VIDAS UP *Listeria*のメーカープロトコルでは, LPT Brothにおける増菌時間が製品サンプルは26~30 hr, 環境サンプルは22~30 hrと設定されている。本報では, 他の菌種が $10^7 \sim 10^9$ cfu/mlで存在するサンプルでは, LPT Brothにおける*L. monocytogenes*の増殖が遅延することを確認した。この検証は一般細菌の初期菌数が $10^7 \sim 10^9$ cfu/ml, *L. monocytogenes*が1~3 cfu/mlという条件であり, 非常に汚染度が高い場所を想定した試験系である。このような条件下では*Listeria*属菌の検出が困難となるため日頃から衛生管理に注意し, 環境中の一般細菌数を低減させ*Listeria*属菌の検知が容易な状態にしておくことも必要である。また, 欧米では未殺菌乳からナチュラルチーズが製造されることもあり, チーズ中の一般細菌数が高い製品も存在する。このような場合には*Listeria*属菌の増殖が遅延し, 偽陰性となる可能性が考えられる。実際に, 筆者らが未殺菌乳で製造されたフランス産のカマンベールチーズを用いて行った添加回収試験では, *L. monocytogenes*の添加サンプルが陰性と判定されてしまった。検査キットは異なるが, *L. monocytogenes*を検出するVIDAS LMO2 (SYSMEX bioMérieux)を用いて実施した酒井らの添加回収試験では, *L. monocytogenes*の陽性率が89%であったと報告されている²³⁾。この原因として, 増菌培養において*L. monocytogenes*が十分に増殖しなかったことを挙げており, 本報と同様, 一般細菌との競合作用があった可能性が高い。未殺菌乳から製造されたナチュラルチーズあるいは不衛生な状態における環境の*Listeria*検査については, 本キットのプロトコルで規定された増菌時間の最大値である30 hrまで, できる限り長く培養すべきであると考えられる。

*L. monocytogenes*の増殖抑制にはバクテリオシンが関与しているとの報告が多くだされている^{3,7,12)}。しかし, *M. arborescens*の培養上清の添加では, *L. monocytogenes*の増殖は抑制されなかったことから, *L. monocytogenes*の増殖抑制作用はバクテリオシンの産生によるものではないと考えられた。同様の結果は*Carnobacterium piscicola*のバクテリオシン非産生株を用いたNilssonらの報告^{19, 20)}にもあり, *L. monocytogenes*の増殖抑制因子は*C. piscicola*の産生する酢酸であったと結論づけている。*Microbacterium*属は酸を生成するが, その生成量は遅いか弱いと報告されている²⁴⁾。今回の実験では*M. arborescens*と*L. monocytogenes*を共培養した培養液について, 酸の定量やpH測定を行わなかったため, 酸による影響であったかは不明である。また, 本報ではLPT Brothにおいて増殖能が低い*P. putida* groupの添加によっても, *L. monocytogenes*の増殖が抑

制される結果が得られた。このことから, *P. putida* groupによる*L. monocytogenes*の増殖抑制作用は, 栄養の奪い合いや代謝産物による影響である可能性は低いと考えられた。*M. arborescens*, *P. putida* groupによる*L. monocytogenes*の増殖抑制メカニズムについては, 今後さらなる検討を必要とする。

今回の調査ではサンプル数が少なく正確性は低いものの, 一般細菌と*L. monocytogenes*との共培養試験におけるVIDAS UP *Listeria*の検出限界が, $3.2 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^5$ cfu/mlの範囲にあった。また, VIDAS UP *Listeria*は属レベルで*Listeria*を広く検出可能であり¹⁾, 検査2日目に判定結果が得られることから, 迅速な対応を必要とする環境モニタリングには適した検査キットであった。今回, 本キットを用いてナチュラルチーズ工場の製造環境について拭き取り検査を行った結果, すべての検体で*Listeria*属菌が検出されず, 製造環境が適切に管理されていることが確認できた。

要 約

*L. monocytogenes*は自然界に広く存在することから, 感染経路としては原材料を起源として食品中で増殖するだけではなく, 環境からの二次汚染も原因と考えられている。そのため, *L. monocytogenes*の制御には, 製造環境の徹底した衛生管理が求められている。

そこで, 環境モニタリングの検査キットとしてVIDAS UP *Listeria*を活用するに当たり, その専用増菌培地であるLPT Brothの増殖能を評価した。*L. monocytogenes*の増殖能はクエン酸鉄アンモニウム(III)を除いたhalf FraserやFraser Brothに比べて最大増殖速度で3.0~6.3倍, ODの最大値で2.4~2.9倍にあり, LPT Brothの方が優れていた。また, LPT Brothではグラム陰性菌である*Acinetobacter*, *Pseudomonas*の多くが増殖しないことも確認できた。増菌培養後の*L. monocytogenes*の菌数は一般細菌の共存下では低下し, *M. arborescens*と*P. putida* groupの初期菌数と増菌後の*Listeria*菌数には負の相関が認められた。そのため, 一般細菌数が多い検体では, 規定範囲内(22~30 hr)で26 hr以上に設定する必要があった。VIDAS UP *Listeria*は*L. monocytogenes*だけでなく*Listeria*属菌を広く検知可能であり, 定性的な検出に通常4日を要する公定法に対し検査2日目に判定が可能な点から, 迅速な対応を必要とする工場の環境モニタリングには有効な手法であった。

文 献

- 1) Association Française de Normalisation, Validation certificate No.: BIO 12/33-05/12. VIDAS UP *Listeria* (LPT) (as compare to ISO 11290-1 including amendment A1:2004 method) (2012).
- 2) 合葉修一, 永井史郎: 2.2 増殖収率. 生物化学工学—反応速度論—. 西 十郎編, p. 65-68, 科学技術社, 金沢 (1978).

- 3) Annamalai, N., Manivasagan, P., Balasubramanian, T. and Vijayalakshmi, S.: Enterocin from *Enterococcus faecium* isolated from mangrove environment. *Afr. J. Biotechnol.*, **8**, 6311–6316 (2009).
- 4) Codex Alimentarius Commission, CAC/GL 61-2007. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. Codex Alimentarius Commission, Rome, Italy (2007).
- 5) Farber, J. M. and Speirs, J. I.: Monoclonal antibodies directed against the flagellar antigens of *Listeria* species and their potential in EIA-based methods. *J. Food Prot.*, **50**, 479–484 (1987).
- 6) 畑中義博, 高橋久美子, 薩埵真二, 金子誠二, 平井昭彦, 井田美樹: 食肉製品製造施設における *Listeria monocytogenes* 汚染低減化のための効果的衛生管理法及び監視指導方法の検討. *東京都福祉保健医療学会誌*, **2008**, 73–74 (2008).
- 7) Héchar, Y., Dériard, B., Letellier, F. and Cenatiempo, Y.: Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 2725–2731 (1992).
- 8) ヘイマン, M.: HACCP導入効果の検証の一環としての「環境モニタリングプログラム(EMP)」について. *月刊HACCP*, 9月号, 42–50 (2014).
- 9) 五十君静信, 岡田由美子: 食品を介したリステリア症に関する現状と考察. *Infectious Agents Surveillance Report*, **29**, 222–223 (2008).
- 10) International Organization for Standardization, ISO11290-1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*—Part 1: Detection method. ISO, Geneva, Switzerland (1996).
- 11) International Organization for Standardization, ISO 11290-1/Amendment1. Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. ISO, Geneva, Switzerland (2004).
- 12) Kawai, Y., Saito, T., Uemura, J. and Itoh, T.: Rapid detection method for bacteriocin and distribution of bacteriocin-producing strains in *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria isolated from human feces. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 179–182 (1997).
- 13) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長: リステリア・モノサイトゲネスの検査について. 平成26年11月22日, 食安発1128第2号 (2014).
- 14) Lawrence, L. M. and Gilmour, A.: Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4600–4604 (1994).
- 15) Longan, N. A. and Vos, P. D.: Genus I. *Bacillus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn. Vol. 3, The *Firmicutes*, Vos, P. D., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H. and Whitman, W. B. (eds.), p. 21–128, Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York (2009).
- 16) McLauchlin, J. and Rees, C. E. D.: Genus I. *Listeria*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn. Vol.3, The *Firmicutes*. Vos, P. D., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H. and Whitman, W. B. (eds.), p. 244–257, Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York (2009).
- 17) 仲真晶子: 食品の *Listeria monocytogenes* 汚染実態. *日食微誌*, **23**, 183–189 (2006).
- 18) 中村寛海: 食品媒介リステリア症と食品製造施設のリステリア汚染—リステリアの施設定着株を取り巻く話題—. *日食微誌*, **32**, 1–11 (2015).
- 19) Nilsson, L., Hansen, T. B., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knöchel, S., Gram, L. and Gravesen, A.: Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a non-bacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *J. Appl. Microbiol.*, **98**, 172–183 (2005).
- 20) Nilsson, L., Ng, Y. Y., Christiansen, J. N., Jørgensen, B. L., Grøtnum, D. and Gram, L.: The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in cold-smoked salmon systems. *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 133–143 (2004).
- 21) Pightling, A. W., Lin, M., Pagotto, F.: Draft genome sequence of *Listeria monocytogenes* strain LI0521 (syn. HPB7171), isolated in 1983 during an outbreak in Massachusetts caused by contaminated cheese. *Genome Announc.*, Jul. 24; 2: e00729–14 (2014).
- 22) 斎藤章暢, 徳丸雅一, 正木宏幸, 板屋民子, 青木敦子: 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. *日獣会誌*, **44**, 378–383 (1991).
- 23) 酒井史彦, 青山顕司, 篠澤映子, 山縣 尚, 丸山 務, 五十君静信, 柳平修一: ナチュラルチーズからの *Listeria monocytogenes* 検出における自動免疫蛍光測定装置の利用. *日食微誌*, **22**, 17–23 (2005).
- 24) Suzuki, K. and Hamada, M.: Genus I. *Microbacterium*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn. Vol. 5, The *Actinobacteria*, Part A. Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M. E., Suzuki, K., Ludwig, W. and Whitman, W. B. (eds.), p. 814–852, Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London (2012).
- 25) 米北太郎, 寺尾義孝: 食中毒菌迅速検出キットの開発—NHイムノクロマトシリーズ (大腸菌O157, O26, O111, リステリア, サルモネラ)—. *月刊フードケミカル*, **24**, 115–118 (2008).
- 26) Yoshida, T., Kato, Y., Sato, M., Hirai, K.: Sources and routes of contamination of raw milk with *Listeria monocytogenes* and its control. *J. Vet. Med. Sci.*, **60**, 1165–1168 (1998).