食肉を対象とした *Listeria monocytogenes* の検査法の検討

(平成元年 9 月 12 日受理)

小久保彌太郎* 飯田 孝*
金子誠二* 丸山 務*

Evaluation of Enrichment and Plating Media for Isolating *Listeria monocytogenes* from Raw Meat

Yataro KOKUBO, Takashi IIDA, Seiji KANEKO and Tsutomu MARUYAMA

(Department of Food Hygiene & Nutrition, Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health: 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, Japan)

In order to establish a method for accurately detecting small amounts of *Listeria monocytogenes* from raw meat, combinations of two kinds of enrichment media, EB medium as defined by the FDA method and Listeria Enrichment Broth (Merck), with four kinds of selective plating media, Oxford Formulation (Oxoid), LPM medium, McBride medium (Oxoid) and Listeria Selective Agar (Merck), were studied. In the recovery test of *L. monocytogenes* inoculated at less than 10 cells per one gram of minced pork meat, the combination of EB medium for the enrichment medium and Oxford Formulation or LPM medium for the selective medium demonstrated superior detection performances. In the test on 116 samples of commercial minced meat, *L. monocytogenes* was detected in 44 samples (37.9%) with all the combinations with the highest detection rate of 29.3% (34 positive samples) being obtained by the method of 7-day enrichment culture with EB medium followed by isolation with Oxford Formulation. Isolation with LPM medium was also successful in 33 samples. Of these, however, 6 samples were positive only when isolated on day 2 of enrichment culture, suggesting a need for carrying out isolation culture twice on days 2 and 7 of enrichment culture. Of the selective media, Oxford Formulation was particularly superior in that *Listeria* colonies could be macroscopically observed by aesculin hydrolysis. The detection rate obtained by the cold-enrichment method was considerably lower than that for 30°C enrichment culture with EB medium.

(Received September 12, 1989)

Key words: 食肉 meat; *Listeria monocytogenes*; 増菌培地 enrichment media; 分離培地 selective media; 日常検査 routine examination

最近、*Listeria monocytogenes* によるヒトのリステリア症の集団発生が欧米諸国で相ついで報告された^{1)~4)}。これらの事例は家畜の糞便に汚染された野菜、あるいは牛乳やチーズなどの畜産物の摂食によることが明らかにされた。その後の調査研究により、乳、食肉、魚介類などを主原料とする広範囲の食品が *L. monocytogenes* を媒介する可能性が示唆され、リステリア症が食物媒介感染症として大きくクローズアップされている^{5)~7)}。1988年に公表された WHO のワーキンググループによる「食

物媒介リステリア症」と題する報告書⁸⁾の中でも、あらゆる食品が家畜や環境を通じて *L. monocytogenes* により汚染される危険性が指摘され、これを監視するための簡便で迅速な検査法を早急に確立する必要性が強調されている。

これまでに、食品中から *L. monocytogenes* を検出するための各種の増菌並びに分離培養法が報告され^{9)~13)}、既にいくつかの培養基も市販されている。著者らは、食肉を汚染している *L. monocytogenes* を日常検査で的確に検出することを目的として、今までに報告あるいは市販されているいくつかの増菌並びに分離培地について、

* 東京都立衛生研究所: 東京都新宿区百人町 3-24-1

Table 1. Comparison of the Recovery of *Listeria monocytogenes* from Artificially-inoculated Ground Pork by Combination of Two Selective Enrichment and Four Isolation Media

Inoculated strain	Enrichment time (day)	Selective-enrichment ¹⁾ /Plating media ²⁾							
		EB				LE			
		OX	LPM	LS	MC	OX	LPM	LS	MC
1/2a (88-28)	1	4/5 ³⁾	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	2	5/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	3	5/5	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	4	4/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	5	3/5	1/5	0/5	0/5	5/5	5/5	4/5	0/5
	7	3/5	0/5	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	4/5
4b (88-3)	1	2/5	1/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5
	2	5/5	4/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	0/5
	3	5/5	5/5	0/5	0/5	5/5	5/5	0/5	0/5
	4	5/5	5/5	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	2/5
	5	5/5	5/5	0/5	0/5	5/5	5/5	5/5	3/5
	7	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

¹⁾ EB: EB medium by FDA, LE: *Listeria* Enrichment broth (Merck)

²⁾ OX: Oxford Formulation (Oxoid), LPM: LPM medium by Lee & McLain

LS: *Listeria* Selective medium (Merck), MC: McBride medium (Oxoid)

³⁾ Number of plates recovered /total plates tested

地 1,000 ml 当たりモクサラクタム (塩野義製薬(株); ラタモキセフナトリウム) 20 mg を加えることにより自製した寒天平板である。また, McBride 培地 (Oxoid; 以下 MC 培地) 及び *Listeria* Selective 寒天 (Merck; 以下 LS 培地) はいずれも市販の粉末培地で, 処方に従って平板を作成した。

4. 菌添加回収試験の手順

前記豚挽肉に供試菌を 1 g 当たり 10 個以下の菌数になるように接種したものを試料として, Fig. 1 に示した手順で接種菌の回収試験を行った。

菌接種豚挽肉 10 g ずつを 2 個のストマッカー 80 用ポリ袋にひょう量し, このうちの 1 個には増菌培地の EB 培地, 他方には LE 培地をそれぞれ 50 ml ずつ入れてストマッカー処理後, 規定の培養温度の 30° 及び 25° でそれぞれ培養した。各増菌培養液は, 1 日から 7 日まで経日的に 4 種類の分離培地平板各 5 枚に 1 枚当たり 0.01 ml ずつ塗抹して, OX, MC 及び LS 培地の 3 種類は 35° で 2 日間, LPM 培地は 30° で 2 日間の規定条件で培養した。各分離培地平板上に発育した *L. monocytogenes* を疑われた集落は, 0.6% 酵母エキス加 Trypticase soy agar 平板に再分離して, 実体顕微鏡を使用して 45 度の反射光による真珠様青緑色の特有の集落所見 (Henry の斜光手法) を示したものについて, 自家製の型別用抗血清を使用して接種菌と同一であることを確認した。

5. 市販豚挽肉からの検出試験の手順

各 10 g の挽肉を EB 培地 50 ml ずつに接種してスト

マッカー処理後 30° で増菌培養し, 培養後 2 及び 7 日目の 2 回にわたって 4 種類の培地で分離培養を行った。なお, 増菌培養には M/15 リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.6) 中において 4° で 30 日間低温培養する方法を併用した。各分離培地上に発生した定型的集落は, 前記菌添加回収試験の手順と同様に 0.6% 酵母エキス加 Trypticase soy agar 平板に再分離し, Seeliger らの記載¹⁸⁾に従って生物化学的性状を調べて *Listeria* 属菌を同定し, ついで *L. monocytogenes* を鑑別した。

結 果

1. 菌添加回収試験の成績

各供試菌株について増菌培地別, 増菌日数別に, 4 種類の分離培地平板各 5 枚中の菌回収平板枚数の変化を示したのが Table 1 である。

1/2a 株は EB 培地を用いて増菌培養した場合, 2 日目には OX 及び LPM 培地のほとんどから 1 平板当たり 5 個以下と少ない菌数であったが回収された。これに対して, LE 培地では 4 日目までいずれの分離培地でも全く回収できなかった。一方, 4b 株は両増菌培地とも培養 2 日目には OX 及び LPM 培地のほとんどの平板から回収された。また, EB 培地で増菌培養したときは, OX 及び LPM 培地平板上には供試菌以外の雑菌はあまり発育せず, 特に 4b 株では 4 日目以降は両培地各 5 枚の平板すべてに多量の接種菌集落がほぼ純培養状に認められた。これに対して, LE 培地では全増菌培養期間を通じて, いずれの分離培地平板上にも雑菌が多数出現した。

4 種類の分離培地の選択分離能は, 1/2a 及び 4b 株の

Table 2. Comparison of the Recovery of *Listeria* spp. from 116 Samples of Retail Ground Meats Using Several Different Procedures

Enrichment procedures	Number (%) of positive samples on							
	OX ¹⁾		LPM		LS		MC	
	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>
EB ²⁾								
30°C-2 days	67 (57.8)*	23 (19.8)	64 (55.2)	24 (20.7)	6 (5.2)	0	0	0
30°C-7 days	86 (74.1)	34 (29.3)	85 (73.3)	33 (28.4)	37 (31.9)	7 (6.0)	13 (11.2)	1 (0.9)
PBS ³⁾								
4°C-30 days	22 (19.0)	13 (11.2)	22 (19.0)	13 (11.2)	0	0	0	0

¹⁾ OX: Oxford Formulation (Oxoid), LPM: LPM medium by Lee & McLain, LS: Listeria Selective medium (Merck), MC: McBride medium (Oxoid)

²⁾ EB: EB medium by FDA

³⁾ M/15 phosphate buffer saline (pH 7.6)

いずれに対しても OX 培地が最も優れており、LPM 培地もこれに近似した成績を示した。これに対して、LS または MC 培地は増菌培地の種類やその培養時間に関係なく、*Listeria* 属菌以外の雑菌の集落が多数出現し、これらの中から接種菌を鑑別して分離するにはかなりの熟練を必要とした。

以上の成績から、接種菌の回収率は EB と OX 培地の組み合わせが最も優れており、ついで EB と LPM 培地の組み合わせであった。

2. 市販挽肉を対象とした *L. monocytogenes* の検出試験の成績

市販挽肉 116 検体について、増菌培養条件別、分離培地別に *Listeria* 属菌及び *L. monocytogenes* の検出率を比較した成績を Table 2 に示した。

いずれかの検査法で *Listeria* 属菌が認められた検体は合計 88 例 (75.9%) で、そのうち 44 例 (37.9%) が *L. monocytogenes* であった。本菌種の検出率が最も高かった検査法は、EB 培地で 7 日間増菌培養後に OX 培地で分離培養する方法で、34 例 (29.3%) が陽性であった。同じ増菌培養条件で LPM 培地で分離したときがこれにつき、ほぼ同一挽肉の 33 例 (28.4%) から検出できたが、LS 培地では 7 例 (6.0%)、MC 培地では 1 例 (0.9%) しか分離されなかった。また、EB 培地による 2 日間増菌培養では、OX または LPM 培地でいずれも約 20% の挽肉から *L. monocytogenes* が検出されたが、これらのうち 6 例は 7 日間増菌培養では両分離培地とも陰性であった。

一方、低温増菌培養では *L. monocytogenes* が検出されたものは 13 例 (11.2%) で、これらはいずれも OX と LPM 培地から分離されたものであり、LS と MC 培地では全く検出できなかった。

なお、検査法によるブタ、ウシ及びニワトリの肉から

の検出率の差はほとんど認められなかった。

考 察

食肉を対象とした *L. monocytogenes* の検査法については既にいくつかの報告があり^{17), 19), 20)}、特に 1985 年以降に主として乳・乳製品を対象に開発された各種の増菌並びに分離培地も食肉やその他の食品に応用されている^{9)~13)}。しかし、これらの中のいずれを使用すれば、最も確に食肉中の本菌を検出できるのかは明確ではない。国際的にはアメリカの FDA で示された方法²¹⁾、我が国では厚生省により 1988 年に示された方法¹⁵⁾が広く使用されているようである。今回、著者らが調査対象とした EB や LPM 培地も FDA あるいはアメリカ農商務省 (USDA)²²⁾ で採用されており、LE や LS 培地は厚生省法に示されたものである。また、MC 培地は以前から *L. monocytogenes* の分離培地として一般的に良く知られていたものである^{9), 13)}。

EB 培地は、本来チーズから *L. monocytogenes* を検出するために開発されたものであるが¹⁴⁾、その後に食肉にも十分に適応できることが報告されている^{23), 24)}。今回の菌添加回収試験の成績でも、この培地は LE 培地よりも *L. monocytogenes* の選択増菌能が明らかに優れていると認められた。本培地の培養条件は、当初 30° で 7 日間であり、その間 1 及び 7 日目の 2 回にわたって分離培養を行うことが規定されていた¹⁴⁾。それが現在では検査の迅速化のために 2 日間培養後の 1 回だけに改められている²¹⁾。食肉の *L. monocytogenes* の汚染菌量は、通常 1 g 当たり 10 個以下と報告されているが^{20), 23)}、著者らも食肉中に添加した 10 個以下の *L. monocytogenes* を 2 日間の増菌培養時間で、OX または LPM 培地との組み合わせによりほぼ 100% 回収できた。しかも、1/2a 株を添加した場合に増菌培養時間が長くなると回収率が低下し、7 日目には LPM 培地で検出できなくなったことが

ら、菌株によっては一度は増菌されてもその後に、菌数が減少して検出できなくなることがあると考えられる。このことは、市販挽肉を対象にした検出試験において、増菌 2 日目には陽性で 7 日目には陰性の検体があったことから確認された。反面、市販挽肉では増菌培養時間が 2 日より 7 日目の方が分離培地上に多量の *Listeria* 属菌が純培養上に出現する傾向が多く認められ検出率も高かった。また、Knight ら²⁵⁾は損傷菌の存在を考慮すれば、7 日間培養の必要性があると述べている。以上のことから、食肉では汚染フローラも複雑であり、このような中から損傷菌をも含めた少量の *L. monocytogenes* を的確に検出するには、増菌培養後 2 及び 7 日目の 2 回にわたって分離培養を実施する必要があると考えられる。

L. monocytogenes の増菌培養法として、本菌の低温増殖性を利用して 4° で 3~4 週間培養する方法が、従来から最も一般的に使用されてきた^{9), 10)}。しかし、この手法は結果を得るまでに長期間を要するために日常検査法として実用的でない。その上、今回の市販挽肉の検査成績でも示されたように、30° で増菌培養を行う FDA 法に比較して著しく低い検出率であった。このことは、Pini ら²⁴⁾が鶏肉について行った汚染調査でも示されており、低温増菌法を食肉に適用することは好ましくないと思われる。

今回、検討対象とした分離培地中、LPM 培地は食肉からの *L. monocytogenes* の分離培地として優れた選択分離能を有することが認められている^{22), 26), 27)}。著者らの調査成績でもこのことが証明されたが、最近 Curtis ら¹⁶⁾が開発した OX 培地は、これと同等ないし若干上まわる傾向の見られる選択分離能を示した。その上、本培地平板上に発生した *L. monocytogenes* は、その特異性状であるエスクリン分解による集落周囲の褐色化により他の集落との識別が肉眼的に容易であった。このことは、LPM 培地では 45 度の反射光により真珠様青緑色の集落を指標とし、これの観察には実体顕微鏡を必要とするのに比較して、日常検査法として極めて優れた点であると思われる。一方、これら 2 種類の分離培地に比較して LS 及び MC 培地は選択力が弱く、*Listeria* 属菌以外の集落が多数出現した。特に、食肉のように汚染フローラが多様な菌種から構成されている場合は、これらの中から *Listeria* 属菌を識別して分離することは、その菌量の割合が高くない限り容易でないと思われる。

以上のことから、著者らは食肉を対象にした *L. monocytogenes* の日常検査法として、次のような手順を考えた。すなわち、通常増菌培養は検体量 25 g を増菌培地 225 ml 中に接種して行うようであるが⁹⁾、今回の実験成績及び検査の容易さや経済性を考慮すると、10 g を 50 ml の EB 培地中に接種すれば十分である。これを 30° で増菌培養後、2 及び 7 日目の 2 回にわたり OX 培地で

分離培養を行う。エスクリン分解の定型的集落が発生したならば、これを 0.6% 酵母エキス加 Trypticase soy agar などの非選択培地に再分離し、45 度の反射光による特有の集落所見を実体顕微鏡で確認する。更に、綿羊血液寒天平板上において CAMP テストで黄色ブドウ球菌の溶血素により増強される弱い β 溶血を示せば、かなり高い確率で *L. monocytogenes* と推定される¹⁸⁾。日常の食品衛生検査としては、ここまでの段階で十分と考えられ、このような手順により、食肉中の *L. monocytogenes* の存在の有無をほぼ 7~10 日間で容易に明らかにすることができる。

現在も、食品中の *L. monocytogenes* の検査法については勢力的に調査研究が実施されており、検出用の簡易キットも開発されている²⁸⁾。今後、定量的概念をも考慮に入れた一層の確な日常検査法を確立し、我が国における食肉の *L. monocytogenes* 汚染の実態を明らかにしていきたいと考える。

ま と め

食肉を汚染する少量の *L. monocytogenes* を的確に検出する目的で、EB 並びに LE 培地の 2 種類の増菌培地、及び OX, LPM, MC 並びに LS 培地の 4 種類の分離培地の組み合わせについて検討した。豚挽肉を用いた菌添加回収試験では、増菌培地は EB 培地、分離培地は OX 又は LPM 培地が他よりも優れた選択能を示した。市販挽肉を対象にした検出成績でも、EB 培地で 7 日間増菌培養後に OX 又は LPM 培地で分離培養する手順が最も高い検出率を示した。特に、OX 培地はエスクリン分解により *Listeria* 属菌集落を肉眼的に識別できる点で優れていた。なお、併せて検討したリン酸緩衝生理食塩水を使用した低温増菌法は、EB 培地による 30° 増菌よりかなり低い検出率であった。これらの成績から、日常検査で食肉から *L. monocytogenes* を検出するには、増菌培養は EB 培地で 30° で 7 日間行い、その間 2 及び 7 日目の 2 回 OX 培地で分離培養する手順が良いことが分かった。

文 献

- 1) Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S., Broome, C. V.: New Eng. J. Med. **308**, 203~206 (1983).
- 2) Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V., Reingold, A.: *ibid.* **312**, 404~407 (1985).
- 3) Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminer, C., Hird, D. W., Yonekura, L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L., Kleks, A., Broome, C. V.: *ibid.* **319**, 823~828 (1988).
- 4) Kvenberg, J. E.: Microbiol. Sci. **5**, 355~358 (1988).

- 5) McLauchlin, J.: J. Appl. Bact. **63**, 1~11 (1987).
- 6) Hird, D. W.: J. Food Protect. **50**, 429~433 (1987).
- 7) Brackett, R. E.: Food Tech. **42**, 162~164, 178 (1988).
- 8) WHO Working Group: Bull. WHO **66**, 421~428 (1988).
- 9) Lovett, J.: Food Tech. **42**, 172~175 (1988).
- 10) Klinger, J. D.: Infect. **16S**, 98~105 (1988).
- 11) Donnelly, C. W.: J. A.O.A.C. **71**, 644~646 (1988).
- 12) Golden, D. A., Beuchet, L. R., Brackett, R. E.: *ibid.* **71**, 647~650 (1988).
- 13) Cassiday, P. K., Brackett, R. E.: J. Food Protect. **52**, 207~214 (1989).
- 14) Lovett, J., Francis, D. W., Hunt, J. M.: *ibid.* **50**, 188~192 (1987).
- 15) 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.
- 16) Curtis, G. D. W., Mitchell, R. G., King, A. F., Emma, J.: Lett. Appl. Microbiol. **8**, 95~98 (1989).
- 17) Lee, W. H., McClain, D.: Appl. Environ. Microbiol. **52**, 1,215~1,217 (1986).
- 18) Seeliger, H. P. R., Jones, D.: “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” Vol. 2, p. 1,235~1,245 (1986), Williams & Wilkins, Baltimore.
- 19) Truscott, R. B., McNab, W. B.: J. Food Protect. **51**, 626~628 (1988).
- 20) Buchanan, R. L., Stahl, H. G., Becivengo, M. M., Carral, F. D.: Appl. Environ. Microbiol. **55**, 599~603 (1989).
- 21) FDA: Federal Register 53~211 (1988).
- 22) McClain, D., Lee, W. H.: J. A.O.A.C. **71**, 660~664 (1988).
- 23) Schmidt, U., Seeliger, H. P. R., Glenn, E., Langer, B., Leistner, L.: Fleischwirtsch. **68**, 1,313~1,316 (1988).
- 24) Pini, P. N., Gilbert, R. J.: Int. J. Food Microbiol. **7**, 331~337 (1988).
- 25) Knight, M. T., Black, J. F., Wood, D. W.: Appl. Environ. Microbiol. **51**, 438~440 (1986).
- 26) Loessner, M. J., Bell, R. H., Jay, J. M., Shelef, L. A.: *ibid.* **54**, 3,003~3,007 (1988).
- 27) Bailey, J. S., Fletcher, D. L., Cox, N. A.: J. Food Protect. **52**, 148~150 (1989).
- 28) Kligner, J. D., Johnson, A. R.: Food Tech. **42**, 66~70 (1988).