

食安発 1 1 2 8 第 3 号
平成 2 6 年 1 1 月 2 8 日

各 検疫所長 殿

厚生労働省医薬食品局食品安全部長
(公 印 省 略)

リステリア・モノサイトゲネスの検査について

リステリア・モノサイトゲネス（以下「リステリア」という。）の試験法については、平成 5 年 8 月 2 日付け衛乳第 169 号「乳及び乳製品のリステリアの汚染防止等について」により通知しているところである。

本年 10 月 21 日に開催された薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会において、食品衛生法に基づく非加熱食肉製品及びナチュラルチーズ（ソフト及びセミハードに限る。）の成分規格にリステリアの基準値（100cfu/g）を設定することが了承されたところである。

については、リステリアの試験法を別添のとおり定めることとしたので、基準値設定後の円滑な検査業務に資するよう、事前の準備及び関係者への周知方よろしく願います。

リステリア定量試験法（別紙 1）については、基準値の施行日より、リステリア定性試験法（別紙 2）については、本日より適用することとする。

ただし、基準値が設定されるまでの間、リステリア定性試験法は、なお従前の例によることができる旨申し添える。

食品中のリステリア・モノサイトゲネスの検査について

1. 検査の概要

基準適合性は、対象となる食品検体 1 g 当たり、リステリア・モノサイトゲネス生菌数が 100 を超えないことを別紙 1 に示す定量試験法により $n=5$ で評価する。予備試験を行う場合は、検体 25 g を対象とした定量試験法と定性試験法の併用により評価し、必要な場合は本試験 ($n=5$ で評価する定量試験法) を行い、その結果から当該食品の基準適合性を判断する。

予備試験を行う場合は、3 箇所以上から検体を採取し、計 25 g とし、別紙 2 に示す定性試験法により生菌の検出の有無を確認し、本試験を行う必要性を決定する。検体は、200 g 以上を確保し、定性試験の結果が出るまで 4℃以下(冷凍食品の場合は冷凍状態)で保存する。また、予備試験では対象となる食品の基準適合性を迅速に評価する為に、定性試験用に作成したストマッカー等処理後の 10%乳剤 (half-Fraser 液体培地) から、一部を分取し、蘇生培養後、直接酵素基質培地に接種、培養し、平板培地上に形成したリステリア・モノサイトゲネスの定型集落を計数することで、本試験の必要性を評価する。具体的には、ストマッカー等処理後の 10%乳剤 (half-Fraser 液体培地) から、2ml をピペットにより滅菌試験管等に無菌的に分取し、 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ で 1 時間 \pm 5 分の蘇生培養を行う。蘇生培養後、均一化し、その 1ml の乳剤をピペットにより無菌的に採取し、3 枚の酵素基質培地に全量を塗抹し、定量試験法と同様の手法で培養を行う (予備定量試験)。蘇生培養用に 2ml を分取した残りの 10%乳剤は、定性試験法により、生菌の有無を評価する。

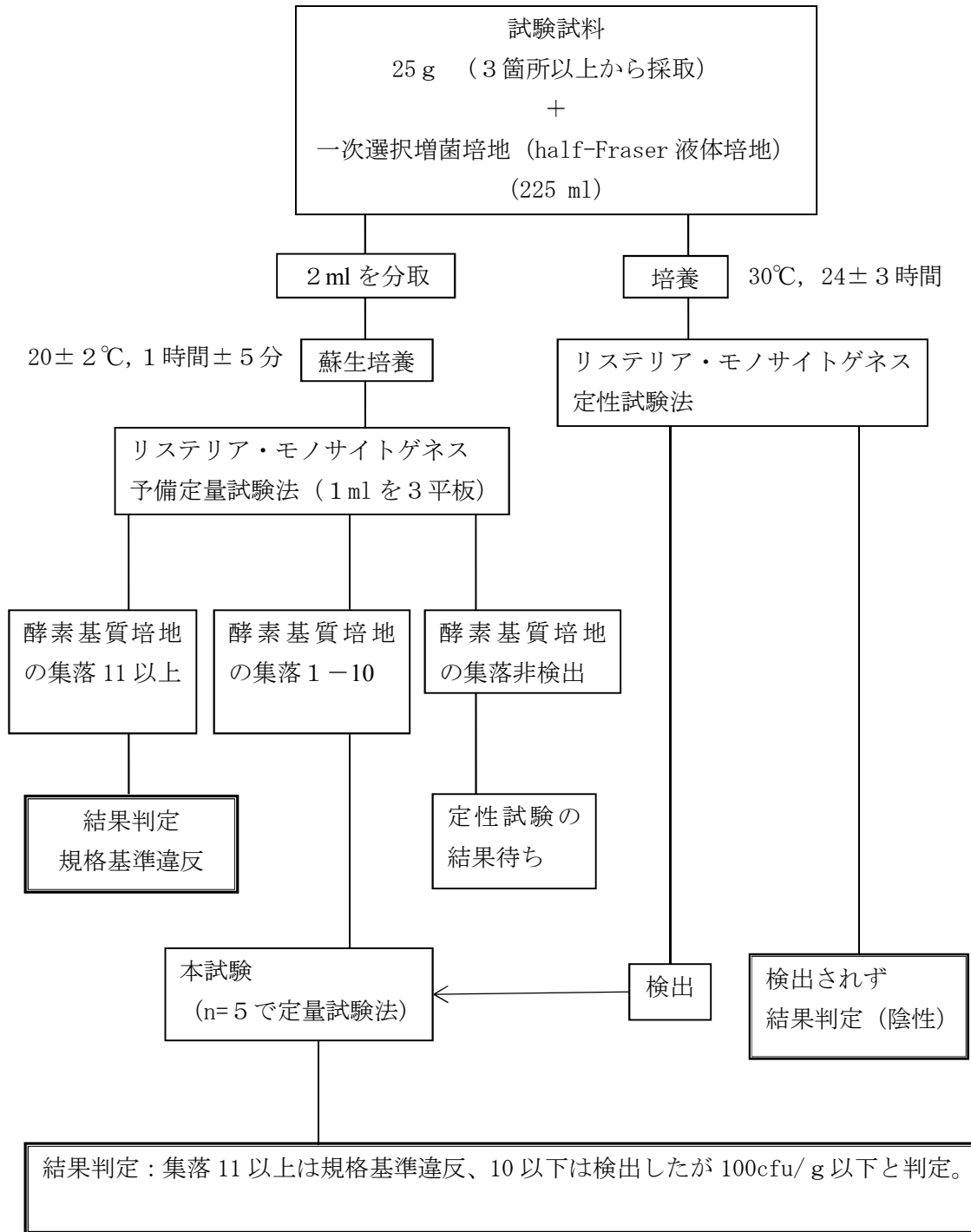
予備定量試験により、典型的なリステリア・モノサイトゲネスの集落が 3 枚の酵素基質培地上に合計 11 集落以上観察された場合は、5 集落について本試験と同様の手順で性状確認を行い、いずれもリステリア・モノサイトゲネスであることが確認された場合、又は合計 11 集落以上のリステリア・モノサイトゲネスが検出された場合は、規格基準違反とする。3 つの酵素基質培地上の典型的なリステリア・モノサイトゲネスの集落数が合計 1 から 10 個の場合、又は定性試験により、リステリア・モノサイトゲネスが検出された場合には、速やかに以下の本試験を行う。本試験は、4℃以下に保存してあった検体につき、検体量 10 g ずつを対象とし、 $n=5$ で、定量試験を実施する。試験法は別紙 1 に示す定量試験法により行う。 $n=5$ で、評価した結果、少なくともいずれかの 1 試料について 3 枚の酵素基質培地上に合計 11 集落以上のリステリア・モノサイトゲネスが検出された場合は、規格基準違反とする。

なお、別紙 1 の定量試験法は ISO 11290-2 に示される試験法で実施しても差し支えない。

2. 検体の調製

同一ロットの食品検体 200 g 以上を準備する。ハサミ、ピンセット等を用いて 3 箇所以上から検体を無菌的に切り出し、合計 25 g とし、ストマッカー用袋 (ストマフィルター使用可) に採る。それに 225 ml の half-Fraser 液体培地を加え、ストマッカー等で均質化し、ストマッカーを用いる場合は、1 分間ストマッカー処理する (ストマッカーが準備できない施設は、揉み洗いを 20 回程度行う)。

予備試験を行う場合のフロー図



リステリア・モノサイトゲネス定量試験法

はじめに

本試験法で述べるリステリア・モノサイトゲネスとは、ISO 11290-2:2004 で定義する *Listeria monocytogenes* とする。

1. 試験法の概要

試験試料 Xg をストマッキング袋等に無菌的にとりわけ、 $9 \times X$ ml の Buffered peptone water を加え、ストマッカー等で均質化し、損傷菌の蘇生培養を行う。その培養液 1 ml を 1 種類の酵素基質培地 3 枚に分けて塗布し、形成集落数を測定する。*L. monocytogenes* と思われる 5 集落を純培養し、確認試験（カタラーゼ試験、CAMP 試験、糖分解試験）を行い、*L. monocytogenes* と確定する。合計集落数、確認試験に用いた集落数及び *L. monocytogenes* と確定された集落数から、1 検体当たりの *L. monocytogenes* 菌数を算出する。

2. 使用器具、装置及び抗血清

- (1) 滅菌ハサミ
- (2) 滅菌ピンセット
- (3) ストマッカー
- (4) ストマッカー袋
- (5) 三角フラスコ
- (6) 秤量器
- (7) pH 計
- (8) 滅菌ピペット、マイクロピペット及び滅菌チップ
- (9) メスシリンダー
- (10) ビーカー
- (11) 小試験管
- (12) 中試験管
- (13) 試験管立て
- (14) 白金耳、白金線
- (15) 高圧蒸気滅菌器（オートクレーブ）
- (16) 乾熱滅菌器
- (17) 恒温槽・ふ卵器（ 20 ± 1 °C、 25 ± 1 °C、 37 ± 1 °C）、恒温水槽
- (18) 滅菌シャーレ（直径 90 -100 mm）
- (19) 顕微鏡、スライドグラス、カバーグラス（必要に応じて）
- (20) スターラー及びスターラーバー
- (21) ろ過滅菌用器具（シリンジフィルター及び注射筒）
- (22) 透過光線試験用機器（必要に応じて）

3. 培地、試薬及び抗血清

- (1) 希釈溶液

Buffered peptone water (BPW:ISO 処方)

(組成)

カゼイン酵素分解産物	10 g
塩化ナトリウム	5 g
リン酸水素二ナトリウム (十二水和物)	9 g
リン酸二水素カリウム	1.5 g
精製水	1,000 ml

粉末培地を精製水に溶解 (必要ならば加温する。) 後、滅菌後の pH が 25°C で 7.0 ± 0.2 となるよう調整する。121°C 15 分滅菌する。

(2) 分離寒天培地

選択分離寒天培地 : Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地、又はそれと同等性の確認された酵素基質培地 (注参照) を 1 種類用いる。使用説明書に従って作成する。

(Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地)

基礎培地 (組成)

動物組織の酵素分解産物	18 g
カゼイン酵素分解産物	6 g
酵母エキス	10 g
ピルビン酸ナトリウム	2 g
ブドウ糖	2 g
グリセロリン酸マグネシウム	1 g
硫酸マグネシウム (無水)	0.5 g
塩化ナトリウム	5 g
塩化リチウム	10 g
リン酸水素二ナトリウム (無水)	2.5 g
5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-グルコピラノシド	0.05 g
寒天	12~18 g ¹⁾
精製水	930 ml ²⁾

¹⁾寒天強度による

²⁾アンホテリシン B 溶液を用いる場合には、925 ml

注 : Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地と同等性の確認された酵素基質培地

国立医薬品食品衛生研究所法 (NIHSJ-09) に示されている酵素基質培地については、同等性が確認されている。その他の酵素基質培地については、メーカーの品質証明によるデータ又は第三者認証機関による評価を確認する。なお、酵素基質培地は、メーカーの品質証明を取るとともに、既知の菌株を用いて性能評価を行うこと。

① 基礎培地を精製水に煮沸溶解後、121°C 15 分滅菌する。必要に応じて 25°C における pH を 7.2 ± 0.2 に調整する。

② ナリジクス酸ナトリウムを 5ml の水酸化ナトリウム溶液に溶かし、フィルターでろ過滅菌す

る。

ナリジクス酸溶液 5ml 当たり

ナリジクス酸ナトリウム	0.02 g
水酸化ナトリウム (0.05 mol/L)	5 ml

③ セフトジジムを 5ml の精製水に溶かし、フィルターでろ過滅菌する。

セフトジジム溶液 5ml 当たり

セフトジジム	0.02 g
精製水	5 ml

④ 硫酸ポリミキシン B を 5ml の精製水に溶かし、フィルターでろ過滅菌する。

ポリミキシン B 溶液 5ml 当たり

硫酸ポリミキシン B	76,700 IU
精製水	5 ml

⑤ シクロヘキシミドを 2.5 ml のエタノールに溶かし、その後 2.5 ml の精製水を加える。フィルターでろ過滅菌する。

抗生剤サプリメント

シクロヘキシミド溶液 5ml 当たり

シクロヘキシミド	0.05 g
エタノール	2.5 mL
精製水	2.5 mL

⑥ アンホテリシン B を塩酸/ジメチルホルムアミド (DMF) 液に溶かし、フィルターでろ過滅菌する。

アンホテリシン B 溶液 (シクロヘキシミド溶液の代替として) 10 ml 当たり

アンホテリシン B	0.01 g
塩酸 (1 mol/L)	2.5 ml
DMF	7.5 ml

注：塩酸/DMF 液は有毒なので、取り扱いに注意する。

⑦ 2g の L- α -ホスファチジルイノシトールを 50 ml の冷水に溶かし、約 30 分スターラーで均一になるまで攪拌する。121°C 15 分オートクレーブで滅菌し、48~50°C に冷却する。

添加剤 50 ml 当たり

L- α -ホスファチジルイノシトール	2 g
冷水	50 ml

⑧ 約 50°C に保温した溶解済み基礎培地にナリジクス酸溶液、セフトジジム溶液、ポリミキシン B 溶液、シクロヘキシミド溶液 (又はアンホテリシン B 溶液) 及び L- α -ホスファチジルイノシトール溶液を加え、その度によく混和する。最終的に pH が 25°C で 7.2 ± 0.2 となるよ

うにする。培地は均一に白濁する。各シャーレに 15～20 ml ずつの調製直後の培地を分注し、固まるまで放置する。

完全培地（組成）

基礎培地	930 ml ¹⁾
ナリジクス酸溶液	5 ml
セフトジジム溶液	5 ml
ポリミキシシン B 溶液	5 ml
シクロヘキシミド溶液	5 ml
（若しくはアンホテリシン B 溶液）	10 ml
添加剤	50 ml

¹⁾ アンホテリシン B 溶液を用いる場合は、925 ml

注：酵素基質培地を自家調製する場合は、培地の性能確認を行う。培地メーカーから粉末培地を購入した場合は、培地及びサプリメントともにメーカーの指示書に従い調製し、メーカーの品質証明を取るとともに、既知の菌株を用いて性能評価を行う。

（3） 確認用培地

① トリプトソイ酵母エキス寒天培地（TSYEA）：選択分離寒天培地上の定型集落の純培養に用いる。

（組成）

トリプトソイ液体培地 ¹⁾	30 g
酵母エキス	6 g
寒天	9～18 g ²⁾
精製水	1,000 ml

¹⁾ 組成

カゼインペプトン	17 g
ソーヤペプトン	3 g
塩化ナトリウム	5 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
ブドウ糖	2.5 g

²⁾ 寒天強度による

上記の組成又は粉末培地を加温水中で溶解する。必要に応じて滅菌後の pH が 25℃で 7.3±0.2 となるよう調整する。試験に適した容量の試験管に分注し、121℃15 分オートクレーブで滅菌する。寒天平板を作る場合には、試験に適した容量をシャーレに分注し、固める。

TSYEA は、トリプトソイ寒天培地（TSA）で代替可能である。

② トリプトソイ酵母エキス液体培地（TSYEB）：炭水化物分解試験の前培養に用いる。

（組成）

トリプトソイ液体培地 ¹⁾	30 g
酵母エキス	6 g
精製水	1,000 ml

1) 組成

カゼインペプトン	17 g
ソーヤペプトン	3 g
塩化ナトリウム	5 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
ブドウ糖	2.5 g

上記の組成又は粉末培地を、必要に応じて加温しながら精製水に溶解する。必要に応じて滅菌後の pH が 25°C で 7.3 ± 0.2 となるよう調整する。試験に適した容量の試験管やフラスコに分注し、121°C 15 分オートクレーブで滅菌する。

(4) CAMP 試験用培地：この試験には通常、羊血液寒天を使用するが、羊血液寒天を非常に薄い層とした重層寒天平板を使うとさらに判定しやすい。

① 羊血液寒天培地

基礎培地（組成）

肉ペプトン	15 g
肝臓の酵素分解産物	2.5 g
酵母エキス	5 g
塩化ナトリウム	5 g
寒天	9~18 g ¹⁾
精製水	1,000 ml

¹⁾寒天強度による

上記の組成又は粉末培地（Blood Agar Base No. 2 等）を精製水に溶解する（必要に応じて加温する。）。必要に応じ、滅菌後の pH が 25°C で 7.2 ± 0.2 となるよう調整する。試験に適した容量のフラスコにいれ、121°C 15 分オートクレーブで滅菌する。

完全培地（組成）

基礎培地	100 ml
羊脱繊維血	5~7 ml

47°C に維持した恒温水槽中で保温し、温度を安定させた基礎培地に血液を加え、よく混和する。滅菌シャーレに試験に適した容量を分注し、固める。

② 重層血液寒天培地

（組成）上記羊血液寒天培地と同じ

シャーレに約 8 ml の基礎培地を分注し、固化させる。6 ml を超えない量の羊血液寒天の非常に薄い層を重層し、固化させる。

(5) 生化学性状確認培地及び試薬

① 炭水化物分解試験培地

基礎培地（組成）

プロテオースペプトン	10 g
------------	------

肉エキス	1 g
塩化ナトリウム	5 g
ブロモクレゾールパープル	0.02 g
精製水	1,000 ml

上記の組成又は粉末培地を精製水に溶解する（必要に応じて加温する。）。必要に応じ、滅菌後の pH が 25℃で 6.8 ± 0.2 となるよう調整する。試験に適した容量のフラスコにいれ、121℃ 15 分オートクレーブで滅菌する。

炭水化物溶液 100 mL 当たり

L-ラムノース又はD-キシロース	5 g
精製水	100 ml

上記組成を精製水に溶かし、フィルターでろ過滅菌する。

完全培地

オートクレーブにかけた基礎培地とろ過滅菌した炭水化物溶解液を 9 : 1 の割合で混合する。

- ② グラム染色液：市販のグラム染色液キットを用いる。
- ③ カタラーゼ試薬：3% (最終濃度) 過酸化水素水を用いる。

(6) 運動性試験用培地

運動性試験は、必要に応じて行う。

- ① トリプトソイ酵母エキス液体培地 (TSYEB)：顕微鏡による旋回運動の確認に用いる。
(組成) (3) 確認試験用培地の項を参照。
- ② 半流動寒天培地：傘状発育の確認に用いる。

(組成)

カゼインペプトン	20 g
肉ペプトン	6.1 g
寒天	3.5 g
精製水	1,000 ml

上記の組成を沸騰水中で溶解する。必要に応じて滅菌後の pH が 25℃で 7.3 ± 0.2 となるよう調整する。試験管に約 5 ml ずつ分注し、121℃ 15 分オートクレーブで滅菌する。

(7) 血清型別用抗血清

血清型別は必要に応じて行う。リステリア診断用血清を用いる。

4. 試験手順

(1) 蘇生培養

- ① 滅菌ストマッカー袋に入れた試料 X g に BPW 9 × X ml を加え、ストマッカー処理する。
- ② 20 ± 2 °C で 1 時間 ± 5 分 静置培養する。

(2) 平板培養

- ① 培養後の培養液 1 mL 全量を滅菌ピペットを用いてよく乾燥させた 3 枚の選択分離培地上に分けて塗抹する。必要に応じて、10 倍階段希釈を繰り返して同様に塗布する。蓋をし、液が寒天に吸収されるまで約 15 分間放置する。
- ② 接種した培地を 37 °C で 24 ± 3 時間培養する。
- ③ 乳白色のハローに囲まれた青緑の集落は *L. monocytogenes* とみなす (定型集落)。集落形成が認められない場合は更に 24 ± 3 時間の培養を追加する。

注：選択分離寒天培地として用いる酵素基質培地上では、既定の培養時間において

L. monocytogenes は乳白色のハローを伴った青緑色の定型集落を示すが、ハローが弱い株も存在する。

(3) 定型集落の確認培養

- ① 培養後、3 枚の選択分離寒天培地上に形成された定型集落の合計数を計測する。その中から 5 個を釣菌し、TSYEA 平板上に単独集落が形成されるよう画線塗抹する。3 平板上の合計推定集落数が 5 個未満の場合は、全てを確認試験用に釣菌する。
- ② 37 °C 18 ~ 24 時間又は十分増殖するまで培養する。
- ③ TSYEA 平板上のリステリア属菌定型集落は、直径 1 ~ 2 mm で凸状を呈する無色不透明で、辺縁がはっきりしている。純培養ができない場合は、定型的なリステリア属菌の集落を別の TSYEA 平板で再び分離する。以下の試験は、TSYEA 平板上で純培養された集落を用いて行う。

注：必要な場合はヘンリー斜光試験 (実体顕微鏡を用いた、45 度の角度の反射光による透過光線での観察) を行う (図 1 参照)。リステリア属菌は、真珠様の青緑色 ~ 青白色の特有の形態が観察される。この試験を実施する場合には、寒天平板の厚さが薄いこと (1 枚当たり 12 mL 程度で作成) が重要である。

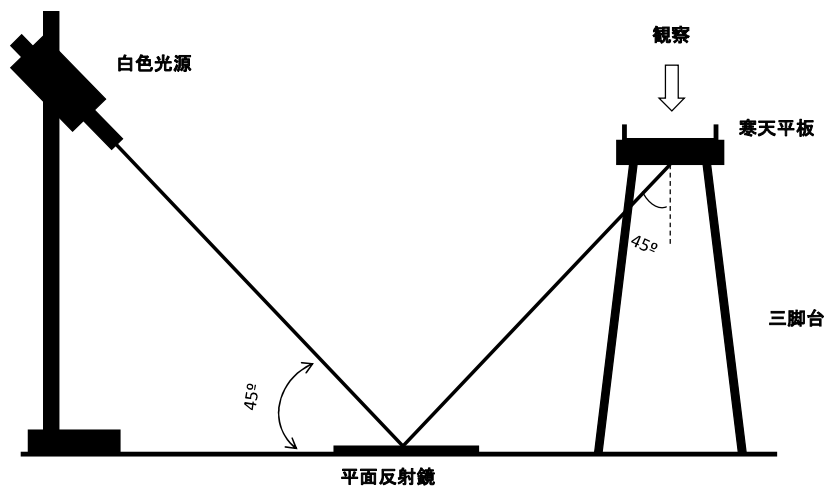


図1 ヘンリー斜光試験

④ カタラーゼ反応

単離した集落を、スライドグラス上に滴下した3%過酸化水素水中で懸濁させる。リステリア属菌はカタラーゼ陽性で、気泡が発生する。

⑤ グラム染色

単離した集落でグラム染色を実施する。グラム陽性の細く短い桿菌である。

⑥ 運動性試験（必要に応じて）

単離した集落を TSYEB 培地の入った試験管内に接種する。25℃に設定した恒温器内で8～24時間、培地が濁ってくるまで培養する。白金耳を用いて上記の培養液1滴をスライドグラス上に移す。カバーグラスをのせ、顕微鏡で観察する。細い短桿菌で、旋回運動を示す。

半流動寒天培地を用いた傘状発育の確認は、試験菌を培地に穿刺して、25～30℃で48時間～5日間培養する。リステリア属菌はこの温度帯で鞭毛が発育して運動性が認められ、特有の傘状発育(表層から3～5mm下で最もよく発育し、傘のように見える。)を示す。

(4) *L. monocytogenes* の確認試験

① CAMP 試験

形態学的、生理的特性及びカタラーゼ反応の結果からリステリア属菌であることが示された場合、羊血液寒天平板を用いて CAMP 試験を行う。羊血液寒天平板に *Staphylococcus aureus* と *Rhodococcus equi* を培地の反対側に平行線を描くように画線培養する(図2参照)。ごく薄くむらのない画線でなければならない。白金耳か白金線を寒天に対し直角に持つとよい。

注：CAMP 反応に用いる菌株

CAMP 試験の実施には、β-haemolysin 産生性の *S. aureus* (例:NCTC1803 株又は ATCC25923 株)、*R. equi* (例:NCTC1621 株又は ATCC6939 株) 及び *L. monocytogenes* (例:NCTC11994 株)

が必要である。全ての *S. aureus* や *L. monocytogenes* が CAMP 試験に適しているわけではない。

次に、単離した試験菌株を、*S. aureus* と *R. equi* に直角に、かつ、接触しないように 1～2 mm 離れた位置から画線する。1 枚の平板に数株接種できる。同時に、コントロール株として *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* を画線する。血液寒天を用いた場合、平板を 37℃ 18～24 時間培養する。重層寒天平板を用いた場合、37℃ 12～18 時間培養する。

試験菌株が *S. aureus* あるいは *R. equi* に交差する部分で β 溶血が増強されているのが陽性反応とみなされる。

R. equi との陽性反応は幅の広い (5～10 mm) の矢頭状溶血を示す。*R. equi* 菌株の周囲の拡散している領域と試験菌株の交差部分で 1 mm 程度の弱い溶血帯しか見られない場合には、陰性とみなされる。*L. monocytogenes* は、基本的に *R. equi* とは陰性反応を示すが、一部の株では、*R. equi* の塗抹線近くでも溶血が増強されるものがある。

S. aureus との陽性反応は、*S. aureus* の周囲の弱い溶血帯と試験菌株が交差する領域で、試験菌株を中心に 3～4 mm 幅での増強された溶血として観察される。*S. aureus* と *L. monocytogenes* の交差する領域には、幅の広い β 溶血は認められず、幅の狭い溶血帯が観察される。

CAMP 法の代替法として β リジンディスク法を用いることも可能である。

この場合は、上記寒天培地の中央にディスクを置き、ディスクを中心として 2～3 mm 離して放射状に被検菌を塗抹して培養する。*L. monocytogenes* ではディスク周辺で溶血の増強が認められる。この試験でも、被検菌と同時に対象株として既知の *L. monocytogenes*, *L. innocua* 及び *L. ivanovii* を画線する。

L. monocytogenes には、溶血の弱い株が存在する。

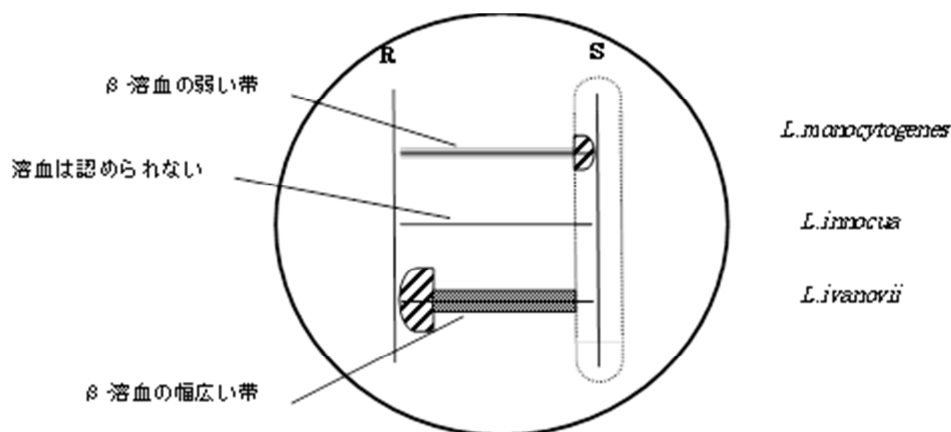


図 2. CAMP 試験平板への接種と解説

注 1 : 図に示すように薄い血液寒天に接種する。垂直の線は *S. aureus* (S) と *R. equi* (R) を示す。水平の線は、試験菌株を示す。斜線の領域は、溶血が増強されている領域を示す。

注 2 : 点線で囲まれた領域は、*S. aureus* の増殖の影響を受けた領域を示す。

② 炭水化物分解能

TSYEB の培養液を、白金耳を用いて炭水化物分解試験用培地にそれぞれ接種する。37℃で5日まで培養する。陽性反応（酸の産生）は多くの場合 24～48 時間以内に黄色に変化することで示される。*L. monocytogenes* はラムノース陽性、キシロース陰性である。

(5) 計数法

3 枚の選択分離培地上に形成された定型集落の合計数と、確認培養を実施した 5 集落のうち *L. monocytogenes* と確認された集落数を用いて、検体中の菌数を以下のように算出する。

$$a=b/A\times C$$

a : *L. monocytogenes* 集落数

b : 確認培養で *L. monocytogenes* と確認された集落数

A : 確認培養に用いた集落数

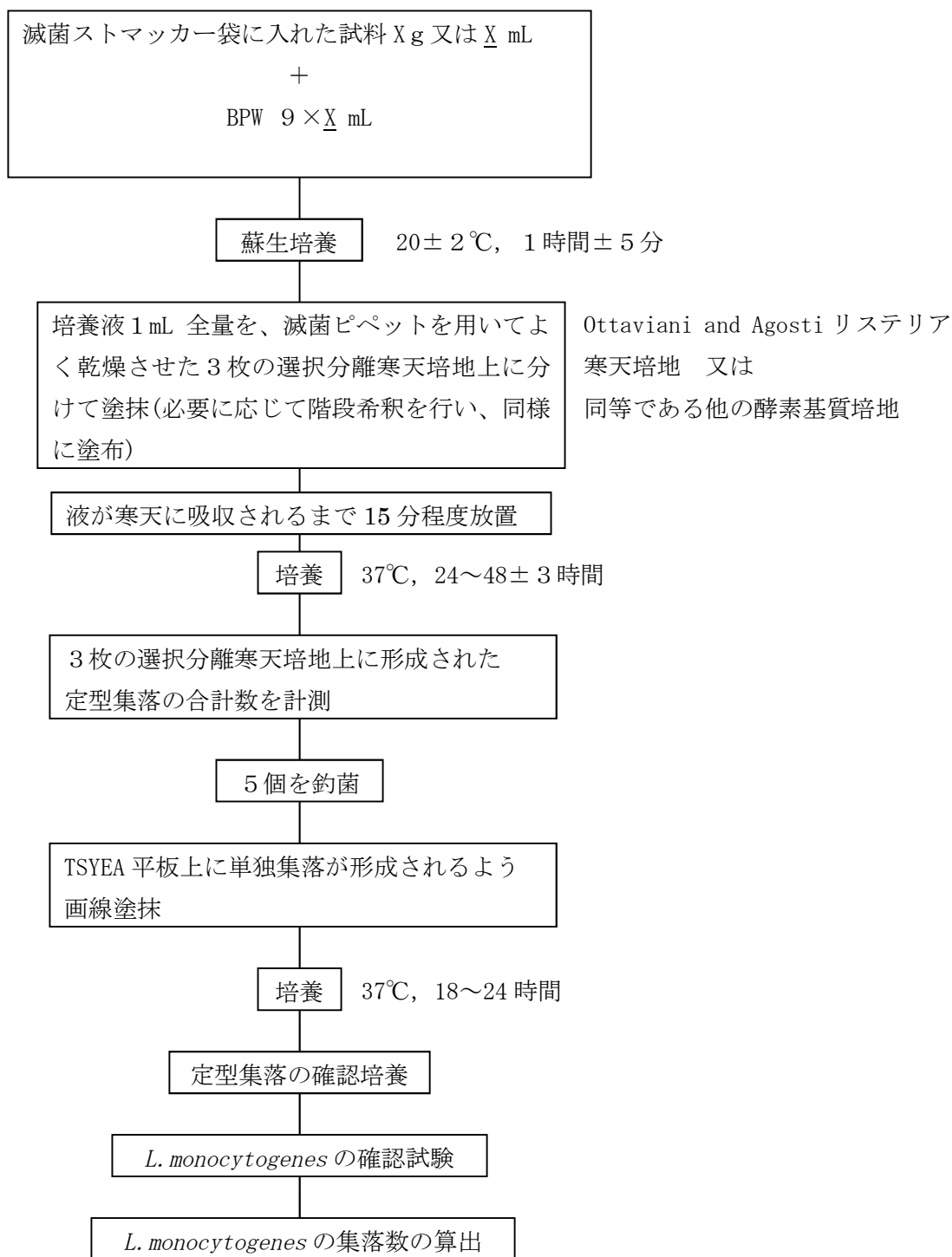
C : 3 枚の選択分離培地上に形成された定型集落の合計数

試験試料を階段希釈したものを塗布した平板の集落数を用いる場合には、集落数に希釈倍率をかけて検体 1 g (又は ml) 当たりの菌数を算出する。

(6) 結果の解釈

検体から作成した 10 倍乳剤液 1 ml 当たりの *L. monocytogenes* の集落数が 11 以上（検体当たり 100cfu/g を超える）の検体は、規格基準違反となる。

図3. フロー図



リステリア・モノサイトゲネス定性試験法

はじめに

本試験法で述べるリステリア・モノサイトゲネスとは、ISO 11290-1:2004 で定義する *Listeria monocytogenes* とする。

1. 試験法の概要

検体を3箇所以上から採取し、合計25gの試験検体としてストマッキング袋等に無菌的に取り分ける。225mlのhalf-Fraser液体培地を加え、ストマッカー等で均質化し、前増菌培養する。その培養液1白金耳を2種の分離寒天培地(酵素基質培地1種とその他の選択培地1種)に塗抹培養し、集落の形成を確認する。また、前増菌培養液0.1mlをFraser液体培地10mlに加え、培養後にその培養液1白金耳を2種の分離寒天培地(酵素基質培地1種とその他の選択培地1種)に塗抹培養し、集落の形成を確認する。*L. monocytogenes*と思われる集落を純培養し、カタラーゼ試験、CAMP試験、糖分解試験を行い、*L. monocytogenes*と確定する。

2. 使用器具、装置及び抗血清

- (1) 滅菌ハサミ
- (2) 滅菌ピンセット
- (3) ストマッカー
- (4) ストマッカー袋
- (5) 三角フラスコ
- (6) 秤量器
- (7) pH計
- (8) 滅菌ピペット、マイクロピペット及び滅菌チップ
- (9) メスシリンダー
- (10) ビーカー
- (11) 小試験管
- (12) 中試験管
- (13) 試験管立て
- (14) 白金耳、白金線
- (15) 高圧蒸気滅菌器(オートクレーブ)
- (16) 乾熱滅菌器
- (17) 恒温槽・ふ卵器(25±1℃、30±1℃、37±1℃)、恒温水槽
- (18) 滅菌シャーレ(直径90-100mm)
- (19) 顕微鏡、スライドガラス、カバーガラス(必要に応じて)
- (20) スターラー及びスターラーバー
- (21) ろ過滅菌用器具(シリンジフィルター及び注射筒)
- (22) 透過光線試験用機器(必要に応じて)

3. 培地、試薬及び抗血清

(1) 一次選択増菌培地：half-Fraser 液体培地

基礎培地（組成）

肉ペプトン	5 g
カゼインペプトン	5 g
肉エキス	5 g
酵母エキス	5 g
塩化ナトリウム	20 g
リン酸水素二ナトリウム（二水和物）	12 g
リン酸二水素カリウム	1.35 g
エスクリン	1 g
精製水	1,000 ml

① 基礎培地の組成又は粉末の市販品を、必要に応じて加温しながら水に溶かす。必要に応じ、滅菌後の pH が 25°C で 7.2 ± 0.2 になるように調整する。試験に適した大きさのフラスコに分注して 121°C 15 分オートクレーブで滅菌する。なお、後述の塩化リチウム溶液とナリジクス酸溶液は、オートクレーブ前に基礎培地に加えてもよい。

② 塩化リチウムを水に溶解し、フィルターでろ過滅菌する。塩化リチウムを水に溶解するときには、その反応が強い発熱を引き起こすため、必要な予防策を講じること。この溶液は、粘膜にも刺激を引き起こす。

塩化リチウム溶液 10 ml 当たり

塩化リチウム	3 g
精製水	10 ml

③ ナリジクス酸ナトリウムを水酸化ナトリウム水溶液に溶かし、フィルターでろ過滅菌する。

ナリジクス酸ナトリウム塩溶液 10 ml 当たり

ナリジクス酸ナトリウム塩	0.1 g
水酸化ナトリウム水溶液 (0.05 mol/L)	10 ml

④ 塩酸アクリフラビンを水に溶解し、フィルターでろ過滅菌する。

塩酸アクリフラビン溶液 100 ml 当たり

塩酸アクリフラビン	0.25 g
精製水	100 ml

⑤ クエン酸鉄アンモニウム(Ⅲ)を水に溶かし、フィルターでろ過滅菌する。

クエン酸鉄アンモニウム(Ⅲ)溶液 100 ml 当たり

クエン酸鉄アンモニウム(Ⅲ)	5 g
精製水	100 ml

⑥ 基礎培地を精製水に溶解（必要に応じて加温する。）後、121°C 15 分滅菌する。使用前に滅菌済みの塩化リチウム溶液、ナリジクス酸ナトリウム溶液、塩酸アクリフラビン溶液及びクエ

ン酸鉄アンモニウム(Ⅲ)溶液を加える。

完全培地(組成)

基礎培地	100 ml
塩化リチウム溶液	1 ml
ナリジクス酸ナトリウム塩	0.1 ml
塩酸アクリフラビン	0.5 ml
クエン酸鉄アンモニウム(Ⅲ)	1 ml

(2) 二次選択増菌培地: Fraser 液体培地

基礎培地(組成)

肉ペプトン	5 g
カゼインペプトン	5 g
肉エキス	5 g
酵母エキス	5 g
塩化ナトリウム	20 g
リン酸水素二ナトリウム(二水和物)	12 g
リン酸二水素カリウム	1.35 g
エスクリン	1 g
塩化リチウム	3 g
ナリジクス酸ナトリウム塩	0.02 g
精製水	1,000 ml

① 基礎培地を精製水に溶解(必要に応じて加温する。)後、25℃におけるpHを 7.2 ± 0.2 に調整し、適切な容量の試験管に試験に適した分量となるよう121℃15分滅菌する。

② 塩酸アクリフラビンを水に溶解し、フィルターでろ過滅菌する。

塩酸アクリフラビン溶液 100 ml 当たり

塩酸アクリフラビン	0.25 g
精製水	100 ml

③ クエン酸鉄アンモニウム(Ⅲ)を水に溶かし、フィルターでろ過滅菌する。

クエン酸鉄アンモニウム(Ⅲ)溶液 100 ml 当たり

クエン酸鉄アンモニウム(Ⅲ)	5 g
精製水	100 ml

完全培地

使用前に、基礎培地10mlの入った各試験管に滅菌済みの塩酸アクリフラビン溶液とクエン酸鉄アンモニウム(Ⅲ)溶液を0.1mlずつ加え、静かに混和する。

(3) 選択分離寒天培地: 第一[A]と第二[B]からそれぞれ1種類用いる。

[A] 第一選択分離寒天培地(酵素基質培地): Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地、ま

たはそれと同等性の確認された酵素基質培地(注参照)を1種類用いる。使用説明書に従って作成する。

(Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地)

基礎培地 (組成)

動物組織の酵素分解産物	18 g
カゼイン酵素分解産物	6 g
酵母エキス	10 g
ピルビン酸ナトリウム	2 g
ブドウ糖	2 g
グリセロリン酸マグネシウム	1 g
硫酸マグネシウム (無水)	0.5 g
塩化ナトリウム	5 g
塩化リチウム	10 g
リン酸水素二ナトリウム (無水)	2.5 g
5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルコピラノシド	0.05 g
寒天	12~18 g ¹⁾
精製水	930 ml ²⁾

¹⁾寒天強度による

²⁾アンホテリシン B 溶液を用いる場合には、925 ml

注：Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地と同等性が確認された酵素基質培地

国立医薬品食品衛生研究所法 (NIHSJ-09) に示されている酵素基質培地については、同等性が確認されている。その他の酵素基質培地については、メーカーの品質証明によるデータ又は第三者認証機関による評価を確認する。なお、酵素基質培地は、メーカーの品質証明を取るとともに、既知の菌株を用いて性能評価を行う。

- ① 基礎培地を精製水に煮沸溶解後、121°C 15 分滅菌する。必要に応じて 25°C における pH を 7.2 ± 0.2 に調整する。
- ② ナリジクス酸ナトリウムを 5ml の水酸化ナトリウム水溶液に溶かし、フィルターでろ過滅菌する。
ナリジクス酸溶液 5ml 当たり
ナリジクス酸ナトリウム 0.02 g
水酸化ナトリウム水溶液 (0.05 mol/L) 5 ml
- ③ セフトジジムを 5ml の水に溶かし、フィルターでろ過滅菌する。
セフトジジム溶液 5ml 当たり
セフトジジム 0.02 g
精製水 5 ml
- ④ 硫酸ポリミキシン B を 5ml の水に溶かし、フィルターでろ過滅菌する。

ポリミキシシン B 溶液 5 ml 当たり

硫酸ポリミキシシン B	76,700 IU
精製水	5 ml

- ⑤ シクロヘキシミドを 2.5 ml のエタノールに溶かし、そのあと 2.5 ml の精製水を加える。フィルターでろ過滅菌する。

抗生剤サプリメント

シクロヘキシミド溶液 5 ml 当たり

シクロヘキシミド	0.05 g
エタノール	2.5 ml
精製水	2.5 ml

- ⑥ アンホテリシン B を塩酸/ジメチルホルムアミド (DMF) 液に溶かし、フィルターでろ過滅菌する。

アンホテリシン B 溶液 (シクロヘキシミド溶液の代替として) 10 ml 当たり

アンホテリシン B	0.01 g
塩酸 (1 mol/L)	2.5 ml
DMF	7.5 ml

注：塩酸/DMF 液は有毒なので、取り扱いに注意する。

- ⑦ 2 g の L- α -ホスファチジルイノシトールを 50 ml の冷水に溶かし、約 30 分スターラーで均一になるまで攪拌する。121°C 15 分オートクレーブで滅菌し、48~50°C に冷却する。

添加剤 50 ml 当たり

L- α -ホスファチジルイノシトール	2 g
冷水	50 ml

- ⑧ 約 50°C に保温した溶解済み基礎培地にナリジクス酸溶液、セフトジジム溶液、ポリミキシシン B 溶液、シクロヘキシミド溶液 (又はアンホテリシン B 溶液) 及び L- α -ホスファチジルイノシトール溶液を加え、その度によく混和する。最終的に pH が 25°C で 7.2 ± 0.2 となるようにする。培地は均一に白濁する。各シャーレに 15~20 ml ずつの調製直後の培地を分注し、固まるまで放置する。

完全培地 (組成)

基礎培地	930 ml ¹⁾
ナリジクス酸溶液	5 ml
セフトジジム溶液	5 ml
ポリミキシシン B 溶液	5 ml
シクロヘキシミド溶液	5 ml
(若しくはアンホテリシン B 溶液)	10 ml)
添加剤	50 ml

¹⁾ アンホテリシン B 溶液を用いる場合は、925 ml

注：酵素基質培地を自家調製する場合は、培地の性能確認を行う。培地メーカーから粉末培地

を購入した場合は、培地及びサプリメントともにメーカーの指示書に従い調製し、メーカーの品質証明を取るとともに、既知の菌株を用いて性能評価を行う。

[B] 第二選択分離寒天培地：PALCAM 寒天培地または Oxford 寒天培地より 1 種類を用いる。使用説明書に従って作成する。

(PALCAM 寒天培地)

規定された量の市販培地を 500 ml の精製水に懸濁し、沸騰するまで加熱して溶解する。121°C 15 分オートクレーブで滅菌し、ウォーターバスで約 50°C に冷却する。2 ml の滅菌精製水で溶解後に、フィルターでろ過滅菌したサプリメント 1 バイアルを無菌的に添加し、攪拌後シャーレに分注する。

(組成)

コロンビア寒天基礎培地	39 g
酵母エキス	3 g
ブドウ糖	0.5 g
マンニット	10 g
クエン酸鉄アンモニウム (III)	0.5 g
エスクリン	0.8 g
塩化リチウム	15 g
フェノールレッド	0.08 g
pH 7.2±0.2	

サプリメント 1 バイアル (培地 500 ml 用) 当たり

ポリミキシン B	5 mg
塩酸アクリフラビン	2.5 mg
セフトジジム	11.6 mg
滅菌精製水	2 ml

(Oxford 寒天培地)

規定された量の市販培地を 500 ml の精製水に懸濁し、沸騰するまで加熱して溶解する。121°C 15 分オートクレーブで滅菌し、ウォーターバスで約 50°C に冷却する。5 ml のエタノール/滅菌精製水 (1 : 1) で溶解後に、フィルターで濾過滅菌したサプリメント 1 バイアルを無菌的に添加し、攪拌後シャーレに分注する。

(組成)

コロンビア寒天基礎培地	39 g
クエン酸アンモニウム鉄 (III)	0.5 g
エスクリン	1.0 g
塩化リチウム	15 g
精製水	1,000 ml
pH7.0±0.2	

サプリメント 1 バイアル (培地 500 ml 用) 当たり

シクロヘキシミド	200 mg
----------	--------

硫酸コリスチン	10 mg
塩酸アクリフラビン	2.5 mg
セフトetan	1.0 mg
ホスホマイシン	5.0 mg
エタノールと滅菌精製水の 1 : 1 混合液	5 ml

(4) 確認用培地

- ① トリプトソイ酵母エキス寒天培地 (TSYEA) : 選択分離寒天培地上の定型集落の純培養に用いる。

(組成)

トリプトソイ液体培地 ¹⁾	30 g
酵母エキス	6 g
寒天	9~18 g ²⁾
精製水	1,000 ml

¹⁾ カゼインペプトン	17 g
ソーマペプトン	3 g
塩化ナトリウム	5 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
ブドウ糖	2.5 g

²⁾寒天強度による

上記の組成又は粉末培地を加温水中で溶解する。必要に応じて滅菌後の pH が 25℃で 7.3±0.2 となるよう調整する。試験に適した容量の試験管に分注し、121℃15分オートクレーブで滅菌する。寒天平板を作る場合には、試験に適した容量をシャーレに分注し、固める。

TSYEA は、トリプトソイ寒天培地 (TSA) で代替可能である。

- ② トリプトソイ酵母エキス液体培地 (TSYEB) : 炭水化物分解試験の前培養に用いる。

(組成)

トリプトソイ液体培地 ¹⁾	30 g
酵母エキス	6 g
精製水	1,000 ml

¹⁾ カゼインペプトン	17 g
ソーマペプトン	3 g
塩化ナトリウム	5 g
リン酸水素二カリウム	2.5 g
ブドウ糖	2.5 g

上記の組成又は粉末培地を、必要に応じて加温しながら精製水に溶解する。必要に応じて滅菌後の pH が 25℃で 7.3±0.2 となるよう調整する。試験に適した容量の試験管やフラスコに分注し、121℃15分オートクレーブで滅菌する。

- (5) CAMP 試験用培地 : この試験には通常、羊血液寒天を使用するが、羊血液寒天を非常に薄い層と

した重層寒天平板を使うとさらに判定しやすい。

① 羊血液寒天培地

基礎培地（組成）

肉ペプトン	15 g
肝臓の酵素分解産物	2.5 g
酵母エキス	5 g
塩化ナトリウム	5 g
寒天	9～18 g ¹⁾
精製水	1,000 ml

¹⁾寒天強度による

上記の組成又は粉末培地（Blood Agar Base No. 2等）を精製水に溶解する（必要に応じて加温する。）。必要に応じ、滅菌後の pH が 25℃で 7.2±0.2 となるよう調整する。試験に適した容量のフラスコにいれ、121℃15分オートクレーブで滅菌する。

完全培地（組成）

基礎培地	100 ml
羊脱繊維血	5～7 ml

47℃に維持した恒温水槽中で保温し、温度を安定させた基礎培地に血液を加え、よく混和する。滅菌シャーレに試験に適した容量を分注し、固める。

② 重層血液寒天培地

（組成）羊血液寒天培地と同じ

シャーレに約 8ml の基礎培地を分注し、固化させる。6ml を超えない量の羊血液寒天の非常に薄い層を重層し、固化させる。

（6）生化学性状確認培地及び試薬

① 炭水化物分解試験培地

基礎培地（組成）

プロテオースペプトン	10 g
肉エキス	1 g
塩化ナトリウム	5 g
ブロモクレゾールパープル	0.02 g
精製水	1,000 ml

上記の組成又は粉末培地を精製水に溶解する（必要に応じて加温する。）。必要に応じて滅菌後の pH が 25℃で 6.8±0.2 となるよう調整する。試験に適した容量のフラスコにいれ、121℃15分オートクレーブで滅菌する。

炭水化物溶液 100 ml 当たり

L-ラムノース又は D-キシロース	5 g
精製水	100 ml

上記組成を精製水に溶かし、フィルターで濾過滅菌する。

完全培地

オートクレーブにかけた基礎培地とろ過滅菌した炭水化物溶解液を 9 : 1 の割合で混合する。

- ② グラム染色液：市販のグラム染色液キットを用いる。
- ③ カタラーゼ試薬：3% (最終濃度) の過酸化水素水を用いる。

(7) 運動性試験用培地

運動性試験は、必要に応じて行う。

- ① トリプトソイ酵母エキス液体培地 (TSYEB)：顕微鏡による旋回運動の確認に用いる。
(組成) (4) 確認試験用培地の項を参照

- ② 半流動寒天培地：傘状発育の確認に用いる。

(組成)

カゼインペプトン	20 g
肉ペプトン	6.1 g
寒天	3.5 g
精製水	1,000 ml

上記の組成を加温溶解する。必要に応じて滅菌後の pH が 25°C で 7.3 ± 0.2 となるよう調整する。試験管に約 5 mL ずつ分注し、121°C 15 分オートクレーブで滅菌する。

(8) 血清型別用抗血清

血清型別は必要に応じて行う。リステリア診断用血清を用いる。

4. 試験手順

(1) 一次選択増菌培養

- ① 検体を 3 箇所以上から採取し、合計 25 g の試験検体としてストマッキング袋等に無菌的に取り分け、half-Fraser 液体培地 225 ml を加えてストマッカー処理する。
- ② 30°C で 24 ± 3 時間培養する。

(2) 二次選択増菌培養

- ① 培養後の一次選択増菌培養液 0.1 ml を 10 ml の Fraser 液体培地が入った試験管に移す。
- ② 37°C で 48 ± 3 時間培養する。

(3) 平板培養及び同定

- ① 培養後の一次増菌培養液を白金耳に取り、第一選択分離寒天培地上に単独集落が形成される

よう画線塗抹する。第二選択分離寒天培地についても同様に接種する。

- ② 接種した培地を第一選択分離寒天培地は 37℃で 24±3 時間、第二選択分離寒天培地は規定された温度及び時間で培養する。
- ③ 培養後の二次増菌培養液について、①及び②と同様の手順を実施する。
- ④ 第一選択分離寒天培地においては、24±3 時間の培養後に増殖の程度が弱く、集落形成が認められない場合は更に 24±3 時間の培養の培養を追加する。

注：第一選択分離寒天培地においては、既定の培養時間で *L. monocytogenes* は乳白色のハローを伴った青緑色の定型集落を示すが、ハローが弱い株も存在する。第二選択分離寒天培地上では、リステリア属菌はエスクリン分解による褐色から黒色のハローを呈する灰色から濃オリーブグリーン色の定型集落を示す。

(4) リステリア属菌の確認培養

注：規定された培養温度及び時間において、第一選択分離寒天培地(酵素基質培地)上に形成される定型集落のほとんどは *L. monocytogenes* であるが、*L. ivanovii* が発育する可能性もある。第二選択分離寒天培地上の定型集落はリステリア属菌である。

- ① 各選択分離寒天培地から形成された定型集落を 5 個釣菌し、TSYEA 平板上に単独集落が形成されるよう画線塗抹する。1 平板上の推定集落数が 5 個未満の場合は、全てを確認試験用に釣菌する。
- ② 37℃で 18~24 時間又は十分増殖するまで培養する。

③ TSYEA 平板上のリステリア属菌定型集落は、直径 1~2 mm で凸状を呈する無色不透明で、辺縁がはっきりしている。純培養がうまくいかない場合は、定型的なリステリア属菌の集落を別の TSYEA 平板で再び分離する。以下の試験は、TSYEA 平板上で純培養された集落を用いて行う。

注：必要な場合はヘンリー斜光試験(実体顕微鏡を用いた、45 度の角度の反射光による透過光線での観察)を行う(図 1 参照)。リステリア属菌は、真珠様の青緑色~青白色の特有の形態が観察される。この試験を実施する場合には、寒天平板の厚さが薄いこと(1 枚当たり 12 ml 程度で作成)が重要である。

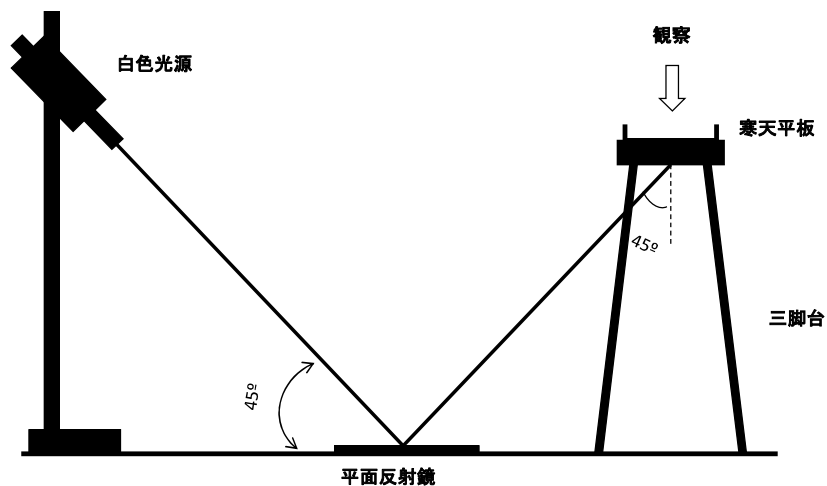


図1 ヘンリー斜光試験

④ カタラーゼ反応

単離した集落を、スライドグラス上に滴下した3%過酸化水素水中で懸濁させる。リステリア属菌はカタラーゼ陽性で、気泡が発生する。

⑤ グラム染色

単離した集落でグラム染色を実施する。グラム陽性の細く短い桿菌である。

⑥ 運動性試験（必要に応じて）

単離した集落をTSYEB培地に接種する。25℃に設定した恒温器内で8～24時間、培地が濁ってくるまで培養する。白金耳を用いて上記の培養液1滴をスライドグラス上に移す。カバーグラスをのせ、顕微鏡で観察する。細い短桿菌で、旋回運動を示す。

半流動寒天培地を用いた傘状発育の確認は、試験菌を培地に穿刺して、25～30℃で48時間～5日間培養する。リステリア属菌はこの温度帯で鞭毛が発育して運動性が認められ、特有の傘状発育(表層から3～5mm下で最もよく発育し、傘のように見える。)を示す。

(5) *L. monocytogenes* の確認試験

① CAMP試験

羊血液寒天平板に *Staphylococcus aureus* と *Rhodococcus equi* を培地上に平行線を描くように画線培養する(図2参照)。ごく薄くむらのない画線でなければならない。白金耳か白金線を寒天に対し直角に持つとよい。

注：CAMP反応に用いる菌株

CAMP試験の実施には、β haemolysin産生性の *S. aureus* (例:NCTC1803株又はATCC25923

株)、*R. equi* (例:NCTC1621 株又は ATCC6939 株) 及び *L. monocytogenes* (例 :NCTC11994 株) が必要である。全ての *S. aureus* や *L. monocytogenes* が CAMP 試験に適しているわけではない。

次に、単離した試験菌株を、*S. aureus* と *R. equi* に直角に、かつ、接触しないように 1～2 mm 離れた位置から画線する。1 枚の平板に数株接種できる。同時に、コントロール株として *L. monocytogenes*, *L. innocua* 及び *L. ivanovii* を画線する。血液寒天を用いた場合、平板を 37°C で 18～24 時間培養する。重層寒天平板を用いた場合、37°C で 12～18 時間培養する。

試験菌株が *S. aureus* 又は *R. equi* に交差する部分で β 溶血が増強されているのが陽性反応とみなされる。

R. equi との陽性反応は幅の広い (5～10 mm) の矢頭状溶血を示す。*R. equi* 菌株の周囲の拡散している領域と試験菌株の交差部分で 1 mm 程度の弱い溶血帯しか見られない場合には、陰性とみなされる。*L. monocytogenes* は基本的に *R. equi* とは陰性反応を示すが、一部の株では、*R. equi* の塗抹線近くでも溶血が増強されるものがある。

S. aureus との陽性反応は、*S. aureus* の周囲の弱い溶血帯と試験菌株が交差する領域で、試験菌株から片側約 2 mm 幅での増強された溶血として観察される。*S. aureus* と *L. monocytogenes* の交差する領域には、幅の広い β 溶血は認められず、幅の狭い溶血帯が観察される。

CAMP 法の代替法として β リジンディスク法を用いることも可能である。

この場合は、上記寒天培地の中央にディスクを置き、ディスクを中心として 2～3 mm 離して放射状に被検菌を塗抹して培養する。*L. monocytogenes* ではディスク周辺で溶血の増強が認められる。この試験でも、被検菌と同時に対象株として既知の *L. monocytogenes*, *L. innocua* 及び *L. ivanovii* を画線する。

L. monocytogenes には、溶血の弱い株が存在する。

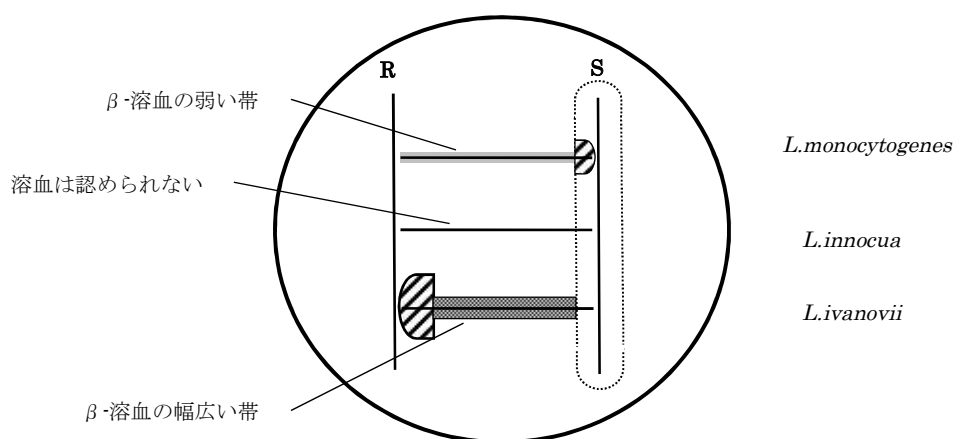


図 2. CAMP 試験平板への接種と解説

注1：図に示すように薄い血液寒天に接種する。垂直の線は *S. aureus* (S) と *R. equi* (R) を示す。水平の線は、試験菌株を示す。斜線の領域は、溶血が増強されている領域を示す。

注2：点線で囲まれた領域は、*S. aureus* の増殖の影響を受けた領域を示す。

② 炭水化物分解能

TSYEB の培養液を、白金耳を用いて炭水化物分解試験用培地にそれぞれ接種する。37℃で5日まで培養する。陽性反応（酸の産生）は多くの場合 24～48 時間以内に黄色に変化することで示される。*L. monocytogenes* はラムノース陽性、キシロース陰性である。

表. 主要なリステリア属菌の鑑別性状

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>
CAMP テスト							
<i>S. aureus</i>	+	-	-	-	(+)	-	-
<i>R. equi</i>	-	+	-	-	-	-	-
糖発酵性							
ラムノース	+	-	v	v	-	-	v
キシロース	-	+	-	+	+	-	-

v: + or -, (+): 弱い陽性反応, +: 90%以上陽性, -: 陰性

図 3. フロー図

