

リステリア・モノサイトゲネス検査



Kanto Reagents

リステリア属菌は家畜・魚類・河川・野生動物など自然界に広く分布する細菌で、特にリステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)は、ナチュラルチーズや食肉、食肉加工品、野菜サラダなどを汚染して食中毒を引き起こすと考えられます。本菌は発育温度域が広く(0°C~45°C)低温でも発育し、また他の細菌と比べて強い耐塩性(食塩濃度10%でも発育する。)を示します。

また潜伏期間は24時間~数週間と幅が広く、初期症状は倦怠感・発熱を伴うインフルエンザ様症状を示します。妊婦・乳幼児・高齢者などは特に感染しやすいと言われ、感染すると髄膜炎や敗血症、流産などを引き起こし、死にいたる場合もあります。

我が国においては、本菌を原因とする食中毒事例の報告はありませんが、厚生労働科学研究班により非侵襲性リステリア感染症の集団発生事例が報告されています。

また、欧米では集団感染事例が多く報告されている重要な食中毒細菌とされています。



関東化学では、国際標準に適合したオクソイド社製の歴史と実績のある検査試薬やクロモアガー社製の酵素基質培地という新しい原理を利用した培地・検査試薬など、リステリア検査の増菌から鑑別までの様々な製品をご用意しております。

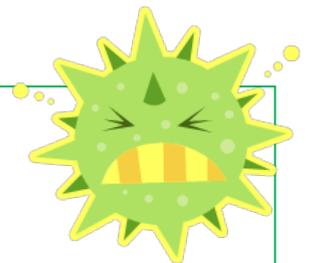
● 海外での主な集団事例

発症年	発症国	患者数	死者数(%)	原因食品
1990	オーストラリア	11	6(54.5)	パテ・ミートスプレッド
1992	フランス	279	85(30.5)	豚タンのゼリー寄せ
1993	フランス	39	12(30.8)	リエット(豚肉調理品)
1995	フランス	37	11(29.7)	ソフトチーズ
1997	イタリア	1566	0(0.0)	コーンサラダ
1998-99	アメリカ	108	14(13.0)	ホットドック等
1998-99	フィンランド	25	6(24.0)	バター
1998-99	オーストラリア	6	5(83.0)	フルーツサラダ
2002	アメリカ	54	8(14.8)	調理済七面鳥の冷肉
2005	スイス	10	3(30.0)	チーズ
2008	カナダ	57	23(40.4)	RTE デリミート
2009-10	オーストリア・ドイツ・チェコ	34	8(23.5)	酸ミルクチーズ
2011	アメリカ	147	33(22.0)	カンタローブメロン
2012	オーストリア・ドイツ・チェコ	22	4(18.0)	リコッタチーズ・サラダ

食品中リステリア・モノサイトゲネス評価書 (食品安全委員会資料:2013年5月)より抜粋

● リステリア汚染率の高い食品

- ①非加熱食品……生ハム・ソーセージなど
- ②乳製品……ナチュラルチーズ・未殺菌乳など
- ③魚介類……スモークサーモン・いくら・明太子など
- ④惣菜……ポテトサラダ・ホットドッグなど



● 非加熱食肉製品及びナチュラルチーズの成分規格

非加熱食肉製品(食品、添加物等の規格基準(昭和34年厚生省告示第370号)、食肉製品のうち、非加熱食肉製品について、これまでの規格に、リステリア・モノサイトゲネスが、検体1gにつき100cfu以下でなければならないことを追加する。

ナチュラルチーズ

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令(昭和26年厚生省令第52号)の(三)乳製品の成分規格並びに製造及び保存の方法の基準に、ナチュラルチーズ(ソフト及びセミハードのものに限る。)の成分規格としてリステリア・モノサイトゲネス(1g当たり)100cfu以下(ただし、容器包装に入れた後加熱殺菌したもの又は飲食に供する際に加熱するものは、この限りでない。)を追加する。

● 規格基準設定の経緯

リステリア・モノサイトゲネス(以下LM)については、平成19年7月にコーデックスにおいて「食品中のリステリア・モノサイトゲネスの管理における食品衛生の一般原則の適用に関するガイドライン」(以下「コーデックスガイドライン」という。)が採択され、平成21年7月にコーデックスガイドラインの別添に微生物規格(以下「コーデックス基準」という。)が採択された。

我が国においては、コーデックス基準が策定されたこと、日・EU規制改革対話において、日本の規制をコーデックス基準に従ったものとするための要望を受けたこと等から、平成23年2月に開催した薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会において、我が国のLMIに係る規制について検討を行った。

平成25年5月に食品安全委員会から食品健康影響評価結果が通知されたことを受け、これに基づくLMの規格基準設定について検討する。

今般、LMの規格基準設定について、厚生労働大臣から薬事・食品衛生審議会長あてに平成26年4月7日付けで諮問され、平成26年10月、同分科会は本規格基準を承認した。これを受け、乳及び乳製品の規格などに関する省令及び食品添加物規格基準の一部を改正してリステリアの規格を付加する。パブリックコメントなどを経て速やかに施行の手続きとなる。

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会資料より(要約)

● リステリアに係るこれまでの我が国の規制状況等

輸入される非加熱食肉製品及びナチュラルチーズ(ソフト及びセミソフトタイプに限る。)については、国、製造者、品目等を指定して、食品衛生法第26条第3項に基づく検査命令の対象としている。検査の結果、LMが検出された場合には、輸入等が禁止される。

海外でのLMIに汚染されたナチュラルチーズを原因とするリステリア症の発生等を受け、自治体に対し、国内の事業者には製造工場内の環境対策の管理強化や製品の自主検査、原料乳の殺菌などを指導すること、自治体においても必要に応じ製品の検査を実施する等の監視・指導を強化することを求めている。

妊娠中に注意が必要な食中毒菌としてLMを挙げ、食べる前の食品の加熱の啓発及び注意喚起を行っている。

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会資料(要約)

● 国内に流通している食品の LM 汚染実態

平成 21 年度に実施した Ready-to-eat 食品1(以下、「RTE 食品」という。)に係る汚染実態調査において、野菜類、チーズ、食肉製品、魚介類、豆類及び牛乳の調査が行われ、LM の分離率は 1.4%(21 検体/1,500 検体)であった。検出されたもののうち、LM の菌数は、1 検体(フランス産チーズ、490 cfu/g)を除き、10 cfu/g未満であった。

○ 国内流通食品の汚染実態調査結果のまとめ

食品名	検体数	陽性数	分離率%
乳製品合計	2, 863	35	1. 22
非加熱喫食食肉製品合計	360	14	3. 89
魚介類加工品合計	2, 349	169	7. 19
野菜合計	844	6	0. 71

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会資料(要約)

● コーデックスガイドライン及び基準

①コーデックスガイドラインでは、LMに対する衛生管理として、RTE食品の製造・輸送等にあたり6℃(できれば2~4℃)を超えないよう温度管理が重要であり、食品の保存期限はLMの増殖等を踏まえた設定が重要としている。

②食品のpHが4.4未満、水分活性が0.92未満又は冷凍保存の条件、LMの増殖を抑えることができるとしている。

コーデックス基準	n	C	m
増殖がおきるRTE食品	5	0	不検出/25g
増殖がおきないRTE食品	5	0	100cfu/g

上記以外に、代替措置(alternative approach)として行政当局が消費者を保護できる他の有効な基準を採用することができるとしている。

* 規格の適用は、製造終了(輸入)時から販売点

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会乳肉水産食品部会資料(要約)

検査法

● リステリア・モノサイトゲネスの検査についての監視指導等に関する通知(食安発1128第3号:生食発0330第6号改正)要約

基準適合性

対象となる食品検体 1g中にリステリア・モノサイトゲネス生菌数が100 を超えない事を定量試験法により n=5 で評価する。

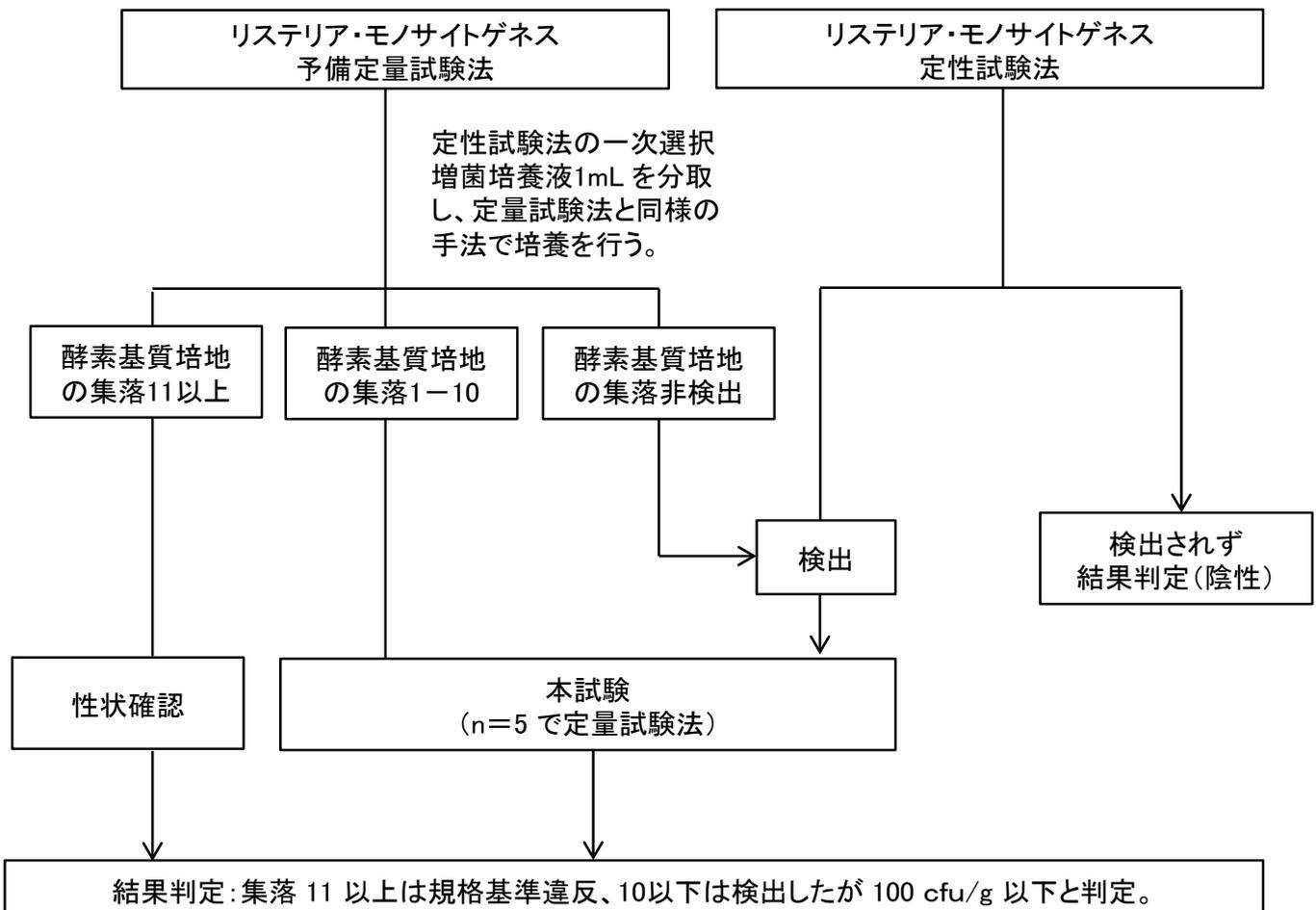
予備試験

- ①予備試験を行う場合は、検体25gを対象とした予備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を行う。
- ②検体: 同一ロット200gの検体より3か所以上から25g採取し、**定性試験法**(下図: 予備試験を行う場合のフロー)により生菌の有無を確認し本試験を行う必要性を決定する。
- ③基準適合性を迅速に評価する為に、**予備定量試験**を実施し、本試験の必要性を評価する。

本試験

4℃以下に保存してあった検体から10gずつを対象にn=5で**定量試験**を実施し何れかの1試料で3枚の酵素基質培地上に**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違反とする(詳細は次項以降参照ください)

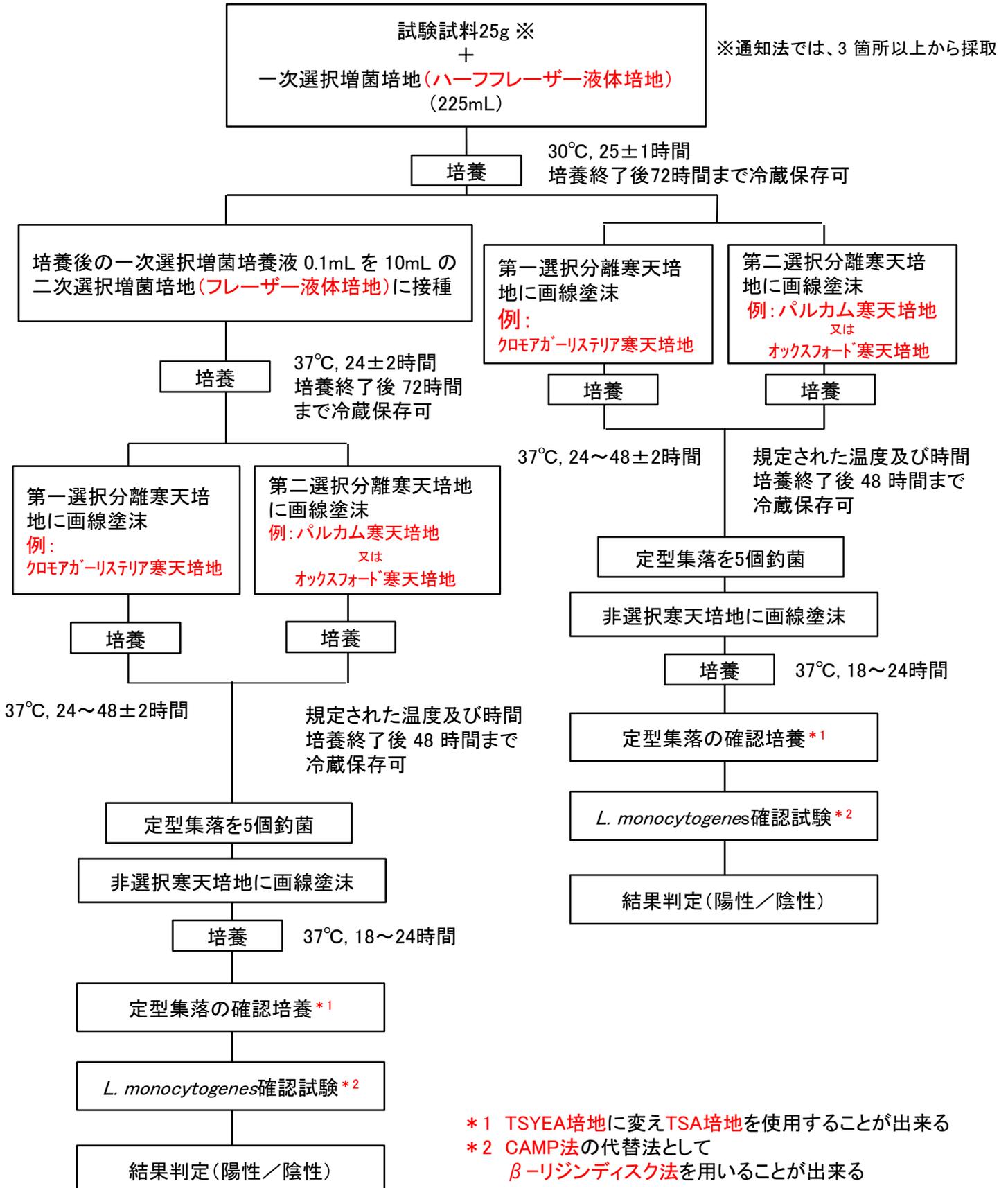
予備試験を行う場合のフロー図



検査法

定性試験法 (NIHSJ-08:2020 定性法)

フローチャート

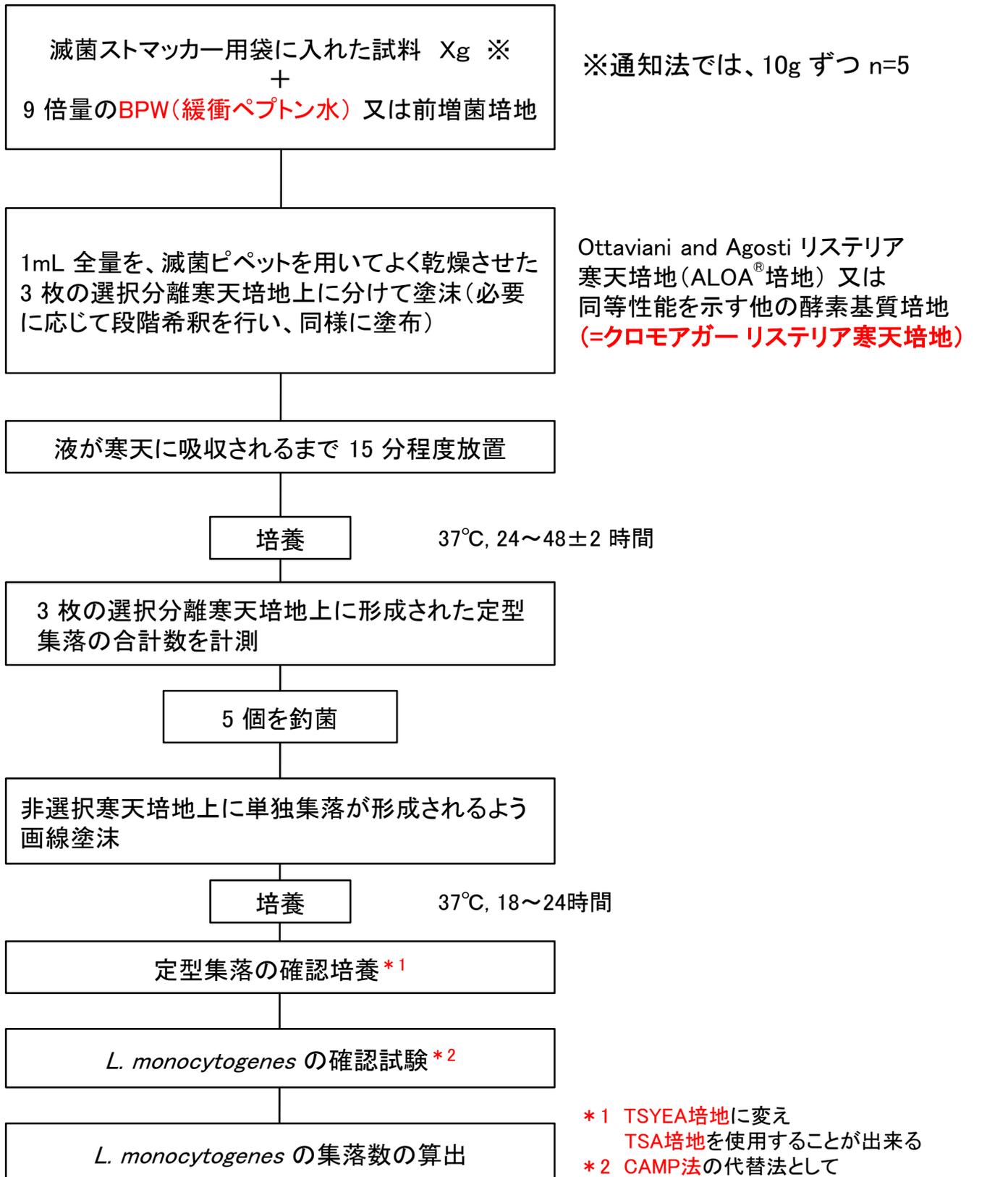


検査法

定量試験法

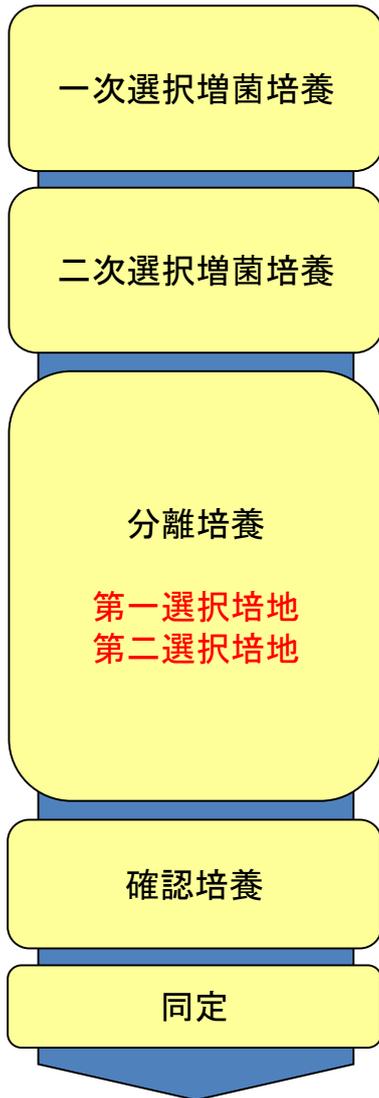
(NIHSJ-09:2020 集落計数法)

フローチャート



リステリア検査に使用する培地

定性試験法



製品コード	製品名 (一次選択増菌培地)	包装
711895-5	フレーザー基礎バイオン	500g
713166-1	ハーフフレーザーサプリメント	225mL用 × 10

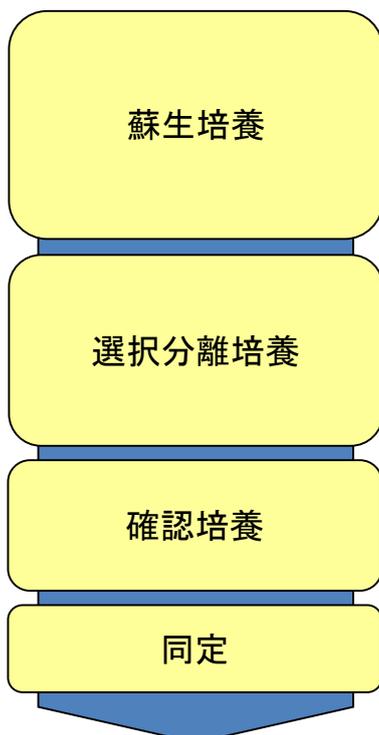
製品コード	製品名 (二次選択増菌培地)	包装
711895-5	フレーザー基礎バイオン	500g
713156-1	フレーザーサプリメント	500mL用 × 10

製品コード	製品名 (第一選択分離培地)	包装
08403-67	クロモアガー リステリア (1L用)	1L用
49958-19	クロモアガー リステリア 基礎培地	5L用
49958-20	クロモアガー リステリア サプリメント	5L用
72144 72145	クロモアガー リステリア生培地	10枚 × 10 10枚

製品コード	製品名 (第二選択分離培地)	包装
711877-5	パルカム寒天基礎培地	500g
713150-1	パルカム選択サプリメント	500mL用 × 10
711856-5	リステリア選択寒天基礎培地 (Oxford)	500g
713140-1	リステリア選択サプリメント (Oxford)	500mL用 × 10

製品コード	製品名 (確認培養用培地等)	包装
711131-5	トリプトンソーヤ寒天培地	500g
非在庫品	β-リジンディスク (メーカーコード: R21120)	25discs

定量試験法



製品コード	製品名 (蘇生培養)	包装
711895-5	フレーザー基礎バイオン	500g
713166-1	ハーフフレーザーサプリメント	225mL用 × 10
710001-3	緩衝ペプトン水 (ISO処方)	500g
717724-0	緩衝ペプトン水 (ISO処方) リパックシステム	300g
717724-1	緩衝ペプトン水 (ISO処方) 1L用分包	1L用 × 40
717724-4	緩衝ペプトン水 (ISO処方) 450mL用分包	450mL用 × 40
49957-00	BPW緩衝液 ISO処方 (225mL)	225mL × 30

製品コード	製品名 (選択分離培養培地)	包装
08403-67	クロモアガー リステリア (1L用)	1L用
49958-19	クロモアガー リステリア 基礎培地	5L用
49958-20	クロモアガー リステリア サプリメント	5L用
72144 72145	クロモアガー リステリア生培地	10枚 × 10 10枚

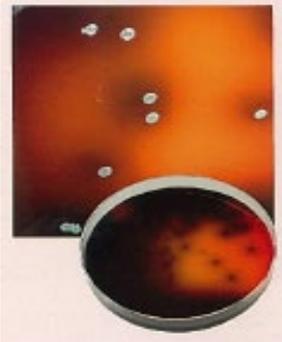
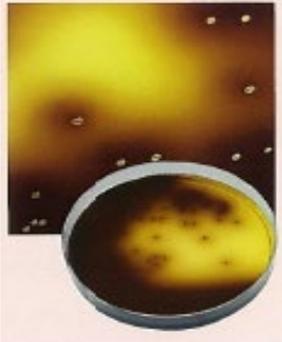
製品コード	製品名 (確認培養用培地等)	包装
711131-5	トリプトンソーヤ寒天培地	500g
非在庫品	β-リジンディスク (メーカーコード: R21120)	25discs

リステリア検査に使用する培地

● 選択増菌培地

培地名	ハーフフレーザーブイオン	フレーザーブイオン
組成	フレーザー基礎ブイオン (711895-5) ハーフフレーザーサプリメント (713166-1) ・クエン酸アンモニウム鉄 : 500 mg/L ・ナリジクス酸 : 10 mg/L ・アクリフラビン塩酸塩 : 12.5 mg/L	フレーザー基礎ブイオン (711895-5) フレーザーサプリメント (713156-1) ・クエン酸アンモニウム鉄 : 500 mg/L ・ナリジクス酸 : 20 mg/L ・アクリフラビン塩酸塩 : 25 mg/L
特徴	・エスクリンを加水分解してエスクレチンにする。エスクレチンは鉄イオンに反応し黒色を呈する。このような原理からブイオンの黒色化によりリステリアの存在が推定できます。しかし、ブイオンが黒色化しないことで、リステリア属の存在を否定することはできません。 ・フレーザーブイオンは食品および環境検体中のリステリア属の検出において非常に高い正確性が証明されISOで推奨されている方法です。 ・肉製品の検査には、UVMブイオンの2段階増菌が推奨される。	

● 選択培地

培地名	パルカム寒天培地	オックスフォード寒天培地
		
特徴	・リステリア・モノサイトゲネスはエスクリンを加水分解し、その結果コロニー周囲に黒色ハローを形成します。 ・リステリア・モノサイトゲネスはマンニト非発酵性であるため、マンニトを発酵する腸球菌やブドウ球菌などの汚染菌は培地が黄変するので識別可能です。	・リステリア・モノサイトゲネスはエスクリンを加水分解し、その結果コロニー周囲に黒色ハローを形成します。 ・一部の腸球菌・ブドウ球菌がリステリア・モノサイトゲネスと同様のコロニーで発育する。

● 各種 選択増菌培地

リステリア増菌ブイオン(UVM)



増菌前 増菌後

この処方には選択剤量を変化させたUVM IとUVM IIがあり二段選択増菌法に用いられる。これにより培養時間を大幅に短縮することが可能となった。また、熱損傷を受けた菌を回復させる増菌培地としても推奨される。食肉製品のような夾雑菌の多いものに使用されることが多い。多くの国の公定法、国際機関でも認められている培地である。

緩衝リステリア増菌ブイオン



増菌前 増菌後

Lovettらによる処方に増菌効果を上げるためリン酸緩衝剤が添加された処方である。リン酸緩衝剤を除いてはリステリア選択増菌培地FDA法と同組成となる。幅広い食品のリステリア検出に用いることが出来る。本培地は特にリステリア迅速テストキットの2次増菌培地に用いられる。

リステリア増菌ブイオン(FDA)



増菌前 増菌後

Lovettらによる処方にに基づき、食品中のリステリアの選択増菌に用いられる。乳や乳製品などを含め幅広い食品の検査に使用されることが多い。増菌培養開始後定期的に選択分離培地に継代して行くことが推奨されている。また培養時間を延ばすことで損傷菌が良好に回復される。日本の乳及びに乳製品に対する厚生労働省通知(平成5年)や食品衛生検査指針を初め多くの国の公定法、国際機関でも認められている培地である。

フレーザーブイオン



増菌前 増菌後

FraserとSperberの処方に基づいており、食品及び環境材料からリステリア検出に推奨される。本培地は選択剤の量を変化させたハーフフレーザーブイオンとフレーザーブイオンが有り、二段選択増菌法に用いられる。共雑菌の多い検査材料や食肉製品はこの二段選択増菌法が適している。またリステリアが存在すると培地中のエスクリンにより培養液が黒色化する特徴がある。ISOなど国際機関でも認められている。

● クロモアガーリステリア

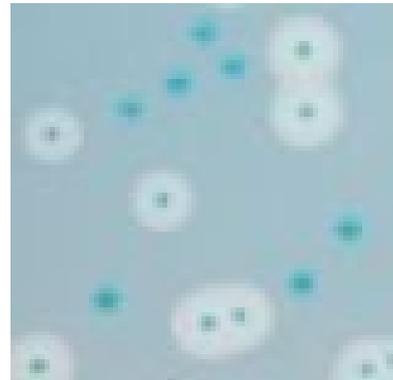
特長

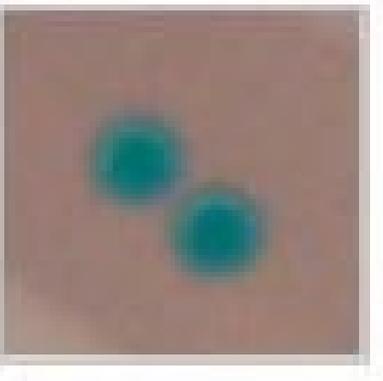
- ・特殊酵素基質によりリステリア・モノサイトゲネスのスクリーニングが容易です。
- ・24時間で判定が可能です。(発育が弱い場合は48時間培養してください。)
- ・ISO法とのバリデーションをとっております。



酵素基質培地

微生物の酵素活性を利用した培地です。特異性が高く、発色酵素基質の分解でコロニー自体が着色するためスクリーニングが容易です。



	リステリア・モノサイトゲネス	その他の微生物
コロニー色調	青色コロニー	青色のコロニー 無色のコロニー 抑制される
ハローの形成	形成する	形成しない
培養所見		

● 確認試験

グラム染色: グラム陽性, 短桿菌

カタラーゼ試験: 陽性

VP試験: 陽性

運動性試験: 陽性

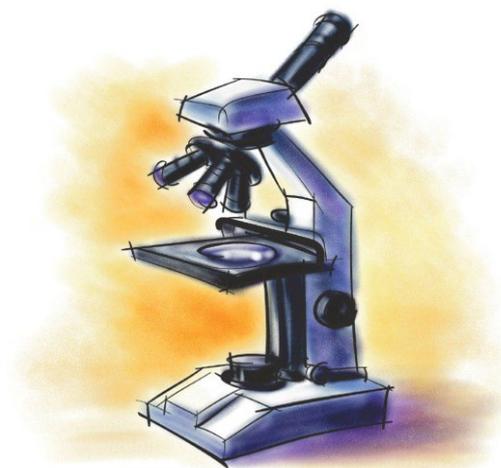
糖分解性試験 : ラムノース 陽性

キシロース 陰性

マンニット 陰性

CAMP試験*: 黄色ブドウ球菌の近くで溶血が増強される。

*: 確認試験のCAMP試験では簡易法であるβ-リジンディスク法で代替可能である。



● 主なリステリア属菌の鑑別性状

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

V: + or - , +: 90%以上陽性, -: 陰性

● クロモアガー アイデンティフィケーション リステリア

簡易鑑別

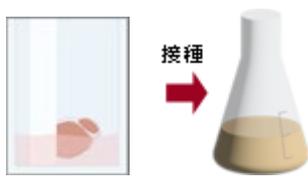
特徴

クロモアガーリステリア上に発育した疑わしいコロニーから、リステリア・モノサイトゲネスを確認するための培地です。酵素基質により明瞭なコロニー色調を示し、簡便にリステリア・モノサイトゲネスを確認できます。

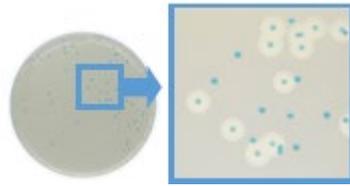
クロモアガー リステリアメソッド

食品・環境検体中の*L. monocytogenes*を簡便に検出できます。

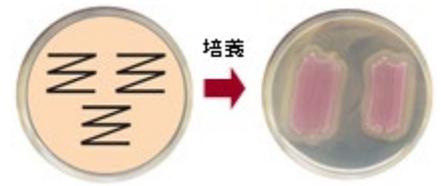
- ① 選択増菌培養(24 h) ② 分離培養(24 h) ③ 確認試験(18~24 h)



検体をハーフプレーザーバイオンに接種し培養。



培養液をクロモアガー™リステリアに接種・培養。白色ハローを伴う青色のコロニーに対して確認試験を実施。



分離したコロニーをクロモアガー™アイデンティフィケーションリステリアに塗抹・培養。コロニーの性状から結果を確認する。

典型的なコロニー性状



L. monocytogenes



L. ivanovii



L. innocua



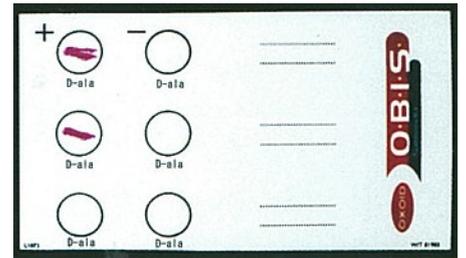
B. cereus

菌種名	コロニー色調
<i>L. monocytogenes</i>	→ 白色ハローを伴うピンク色
<i>L. monocytogenes</i>	→ 白色ハローを伴う無色
<i>L. innocua</i>	→ ハローを伴わないピンク色
<i>L. seeligeri</i>	→ ハローを伴わない無色
<i>B. cereus</i>	→ 無色、不規則なハロー

● O.B.I.S. MONO

簡易鑑別

テストカード上の反応サークルに選択分離されたリステリア疑いのコロニーを塗抹・反応させることで、リステリア・モノサイトゲネスの鑑別が容易にできます。



特徴

- ・本試薬はD-アラニルアミノペプチダーゼ (DALAase)を検出する試薬です。
- ・リステリア属はDALAaseを産生しているが、リステリア・モノサイトゲネスはDALAaseを産生しないためDALAaseの有無により目的の微生物がリステリア・モノサイトゲネスかどうかを判定する事ができます。

O.B.I.S MONOの判定結果

	リステリア・モノサイトゲネス	その他のリステリア属
DALAase	非産生	産生
O.B.I.S.MONOの結果	陰性 	陽性 
判定	陽性	陰性

● SureTectリアルタイムPCRシステム

遺伝子検査

食品中の微生物検査を迅速に行うリアルタイムPCRシステムです。増菌培養液中の細菌の遺伝子を検出することにより、分離培養前に細菌を検出することができ、結果判定までの時間を短縮することができます。

リステリア検査用のキットもご用意しております。

詳細は弊社までお問い合わせください。



リステリア関連製品一覧

用途	コード	製品名	包装
前増菌培地	緩衝ペプトン水		
	71001-3	緩衝ペプトン水(ISO処方)	500g
	717724-0	緩衝ペプトン水(ISO処方)リパックシステム	300g
	717724-1	緩衝ペプトン水(ISO処方)1L用分包	1L用×40
	717724-4	緩衝ペプトン水(ISO処方)450mL用分包	450mL用×40
	49957-00	BPW緩衝ペプトン水(225mL)ISO処方	225mL×30
	フレーザー／ハーフフレーザー処方		
	711895-5	フレーザー基礎ブイオン	500g
	713156-1	フレーザーサプリメント	10バイアル
	713166-1	ハーフフレーザーサプリメント	10バイアル
	UVM処方		
	711863-5	リステリア選択増菌培地(UVM)	500g
	713142-1	リステリア選択増菌培地サプリメント(UVM-I)	10バイアル
	713143-1	リステリア選択増菌培地サプリメント(UVM-II)	10バイアル
	FDA処方		
	711862-5	リステリア選択増菌培地(FDA)	500g
	713141-1	リステリア選択増菌培地サプリメント(FDA)	10バイアル
緩衝リステリア			
711897-5	緩衝リステリア増菌培地	500g	
713141-1	リステリア選択増菌培地サプリメント(FDA)	10バイアル	
分離培地	パルカム寒天培地		
	711877-5	パルカム寒天基礎培地	500g
	713150-1	パルカム選択サプリメント	10バイアル
	オックスフォード寒天培地		
	711856-5	リステリア選択寒天基礎培地(Oxford)	500g
	713140-1	リステリア選択サプリメント(Oxford)	10バイアル
	酵素基質培地		
	08403-67	クロモアガー リステリア (1L用)	1L用
	49958-19 49958-20	クロモアガー リステリア 基礎培地 クロモアガー リステリア サプリメント	5L用
	72144 72145	クロモアガー リステリア生培地	10枚×10 10枚
確認用培地	711131-5	トリプトンソーヤ寒天培地	500g
	非在庫品	β-リジンディスク (メーカーコード:R21120)	25discs
迅速確認キット	718600-6	O.B.I.S. MONO	60回
補助培地	49958-50	クロモアガー アイデンティフィケーション リステリア 基礎培地	250mL用
	49958-51	クロモアガー アイデンティフィケーション リステリア サプリメント	250mL用
器材・消耗品	55000-08	滅菌ストマック袋(フィルター付)	50枚×10
	55000-09	滅菌ストマック袋	50枚×20
	71532	自立式ストマック袋	50枚
	96930-01	滅菌シャーレ・浅型	10枚×50
	96930-02	滅菌シャーレ・深型	10枚×50
	96930-21	滅菌スプレッダー	10本×100
	96930-22	滅菌ディスポニードル	20本×50
	96930-23 96930-24	滅菌ディスポループ1μL 滅菌ディスポループ10μL	20本×50 20本×50

-
- 本記載の製品は、試薬（試験、研究用として用いる化学薬品）としての用途にご利用ください。
 - 本記載の製品情報は予告なく変更する場合があります。最新情報は、弊社ホームページ「Cica-Web」をご確認ください。



〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
TEL : 03-6214-1093
HP : <https://www.kanto.co.jp>