

Listeria属菌24菌種を用いたリステリア増菌培地およびコンパクトドライ™の評価



○近藤 奈央、青柳 ひとみ、中川 湧貴、柴原 裕亮、猪井 俊敏
島津ダイアグノスティクス株式会社

背景

Listeria属菌は近年、急速に細分化が進み、2024年までに28菌種が提唱されている (Orsi *et al.*, 2024)。

通常ヒトに病原性を示すものはListeria monocytogenesのみで食品検査の対象は本菌となるが、L. monocytogenes汚染の指標菌として環境モニタリングの対象とされるなどListeria属菌の検査も食品製造現場の検査として重要となっている。これらリステリア検査法として各国標準法に準拠した培地の他、簡易迅速なキットが多くのメーカーから販売されている。しかし、近年新たに提唱されたListeria属菌の検出能力について言及されているものはほとんどない。

コンパクトドライ™は、調製不要で簡便な操作で使用できる培地で、従来法と比べ消耗品の廃棄量が少ないこと、多種多様なラインナップで様々な検査を簡易に実施できることなどの利点がある。リステリア検査項目としてL. monocytogenes検出用のコンパクトドライ™ LMやListeria属菌検出用のコンパクトドライ™ LSが販売されている。本研究では、Listeria属菌24種について各国標準法の増菌培地とコンパクトドライ™ LM、LSにおける発育性を評価した。

リステリア増菌培地の評価

◆ 方法

羊血液寒天培地上で前培養
(35±1℃, 24h)

▼
滅菌生理食塩水で
McF No.1の菌液を調製

▼
McF No.1菌液から滅菌生理食塩水で
10倍段階希釈液を調製
(10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶希釈液)

▼
培地を96ウェルプレートに
200 μLずつ分注

▼
各希釈菌液を各培地に
10 μLずつ接種 (n=2)

▼
同様に羊血液寒天培地に
ミスマー法で10 μLずつ接種 (n=2)

▼
培養 (30±1℃, 35±1℃の2条件)
・ 0h, 24h, 48hで650 nm吸光度測定
・ 羊血液寒天培地上の集落計数

◆ 結果・考察

- ✓ 各国標準法収載の増菌培地はいずれも、Listeria属菌24種すべての発育を支持することはできなかった。一方、mMSBは非選択培地TSBと同様に24種すべてのListeria属菌を増菌できた。(図2)
- mMSBは複数種の微生物 (大腸菌やSalmonella属菌) を同時に濃縮するために開発された培地であるため、遺伝子検出キットなど特異性の高いスクリーニング法との併用が有効と考えられる。
- ✓ LPTB (USDA FSIS MLG 8.15) はL. grayiの発育を支持できなかったが、広範なListeria属菌を増菌できた。(図2)
- ✓ LPTBの排他性 (Listeria属菌以外の7菌種) について同様の実験系を用いて評価したところ、Enterococcus属などListeria属菌以外のグラム陽性菌やグラム陰性菌の発育が抑えられることがわかった (Data not shown)。

表1 Listeria属菌28種と本研究で利用した菌株の一覧
本研究で利用した菌株には菌株番号を示した。

菌株番号	菌種	由来	Type strain	各種標準法で言及されているかどうか				
				sensu stricto Listeria	ISO 11290 (2017)	FDA BAM Ch.10 (Apr.2022)	USDA MLG 8.15 (Dec.2024)	ISO 11290 (新案検討中)
1	Listeria ivanovii subsp. ivanovii	JCM 7681 (ATCC 19119)	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
2	Listeria ivanovii subsp. londoniensis	ATCC 49954	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
3	Listeria ivanovii	臨床	No	✓	✓	✓	✓	✓
4	Listeria grayi	ATCC 19120	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
5	Listeria innocua	ATCC 33090	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
6	Listeria welshimeri	ATCC 35897	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
7	Listeria welshimeri	臨床	No	✓	✓	✓	✓	✓
8	Listeria seeligeri	ATCC 35967	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
9	Listeria marthii	CCUG 56148T	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
10	Listeria fleischmannii	DSM 24998	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
11	Listeria floridensis	DSM 26687	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
12	Listeria aquatica	DSM 26686	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
13	Listeria newyorkensis	DSM 28961	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
14	Listeria cornelensis	DSM 26689	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
15	Listeria rocourtiae	CCUG 59857T	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
16	Listeria weihenstephanensis	DSM 24698	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
17	Listeria grandensis	DSM 26688	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
18	Listeria riparia	DSM 26685	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
19	Listeria booriae	DSM 28860	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
20	Listeria thailandensis	DSM 107638	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
-	Listeria goeensis	-	-	-	-	-	-	-
-	Listeria costaricensis	-	-	-	-	-	-	-
21	Listeria valentina	DSM 115566	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
22	Listeria cossartiae	CCUG 74667T	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
23	Listeria immobilis	CCUG 74666T	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
24	Listeria portnoyi	CCUG 74671T	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
25	Listeria rustica	CCUG 74665T	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
26	Listeria farberii	CCUG 74668T	Yes	✓	✓	✓	✓	✓
-	Listeria swaminathanii	-	-	-	-	-	-	-
27	Listeria monocytogenes	ATCC 15313	Yes	✓	✓	✓	✓	✓

表2 本評価で利用した培地

培地名	製造者	略語	培養条件	出典
ハーブフラバイオン	Merck	HFB	30℃, 24-26h	ISO 11290:2017
緩衝リステリア増菌バイオン	Oxoid	BLEB	30℃, 24 and 48h	FDA BAM Ch.10
LPTプロス	bioMérieux	LPTB	35℃, 22-26h	USDA MLG 8.15
MSBプロス	島津ダイアグノスティクス	mMSB	30℃, 24 and 48h	MSB(Costa-Ribeiro <i>et al.</i> , 2024)を一部変更
トリプトソーヤバイオン	島津ダイアグノスティクス	TSB	30-35℃	日本薬局方準拠

表3 羊血液寒天培地上での集落数測定結果
例: L. ivanovii (菌株番号1)

希釈段階	集落数	
	10 ⁻ⁿ	CFU/10 μL (n=2)
-4	+	+
-5	64	50
-6	3	9

図1 吸光度の変化の様子
例: L. ivanovii (菌株番号1)

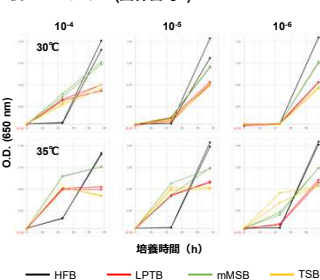
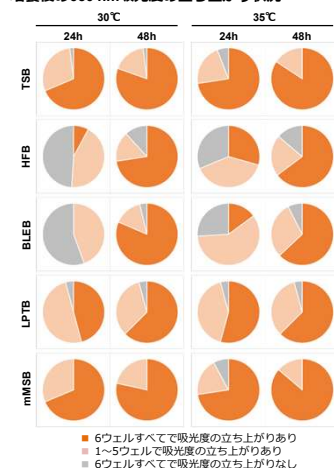


図2 Listeria属菌27菌株の24時間または48時間培養後の650 nm吸光度の立ち上がり状況



コンパクトドライ™ LM/LSの評価

◆ 方法

羊血液寒天培地で前培養
(35±1℃, 24h)

▼
滅菌生理食塩水で
McF No.1の菌液を調製

▼
McF No.1菌液から滅菌生理食塩水で
10倍段階希釈液を調製
(10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸希釈液)

▼
各希釈菌液を各培地に接種

▼
48時間まで培養
(30±1℃, 37±1℃の2条件)

▼
各培地上の定型集落を計数
Listeria属菌数を算出

◆ 結果・考察

- ✓ 37℃培養では発育できない菌株が認められたが、L. monocytogenesに近縁な狭義のListeria属菌はすべていずれの培地でも定型集落として検出可能だった。(表6)
- ✓ 30℃培養においてALOAで8菌種が定型外集落を示した一方で、CD LSではListeria属菌24種すべてを定型集落として検出可能だった。(表5, 6, 図4)
- CD LMやLSでは検体によってEnterococcus属が青色集落として検出されることが報告されているが、LPTBではEnterococcus属の発育が抑えられていることがわかったため、組み合わせることによってListeria属菌を適切に検出できると考えられる。

表4 本評価で利用した培地

培地名	製造者	略語	培養条件	出典
コンパクトドライ™ LS	島津ダイアグノスティクス	CD LS	37℃, 24h and 48h	-
コンパクトドライ™ LM	島津ダイアグノスティクス	CD LM	37℃, 24h and 48h	MicroVal認証取得
Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti	Merck	ALOA	37℃, 24h and 48h	ISO 11290:2017

図3 各培地における定型集落の例 (37℃, 48時間培養)

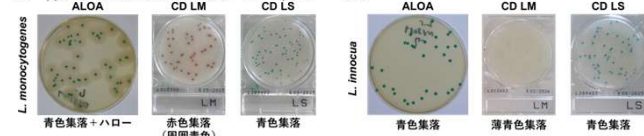


表5 30℃培養におけるALOAとCD LSの比較

菌株番号	菌種	集落性状	ALOA		CD LS		Log difference CD LS - ALOA
			Listeria属菌数 (Log CFU/mL)	集落性状	Listeria属菌数 (Log CFU/mL)	集落性状	
1	Listeria ivanovii	青	8.77	青	8.79	青	0.02
4	Listeria grayi	薄青	8.57	薄青~青	8.35	薄青	-0.23
5	Listeria innocua	青	8.69	青	8.53	薄青	-0.16
6	Listeria welshimeri	青	8.45	青	8.38	薄青	-0.07
8	Listeria seeligeri	青 小さい	8.28	青 小さい	6.37	薄青	-1.91
9	Listeria marthii	青	8.62	青	8.51	薄青	-0.11
10	Listeria fleischmannii	薄青	8.61	薄青	8.58	薄青	-0.03
11	Listeria floridensis	薄青	8.31	薄青~青	8.35	薄青	0.04
12	Listeria aquatica	白	8.68	青	8.94	薄青	0.07
13	Listeria newyorkensis	白	<5.00	青	8.77	薄青	-
14	Listeria cornelensis	白 小さい	<5.00	青 小さい	5.48	薄青	-
15	Listeria rocourtiae	白	<5.00	青	8.29	薄青	-
16	Listeria weihenstephanensis	白	<5.00	薄青	7.46	薄青	-
17	Listeria grandensis	白	<5.00	薄青	8.33	薄青	-
18	Listeria riparia	薄青	8.52	薄青	7.92	薄青	-
19	Listeria booriae	薄青	8.52	薄青	8.54	薄青	0.02
20	Listeria thailandensis	青	8.91	青	9.13	薄青	0.21
21	Listeria liliorensis	青	8.31	青	7.99	薄青	-0.32
22	Listeria cossartiae	青	8.48	青	8.54	薄青	0.07
23	Listeria immobilis	青	8.48	青	8.37	薄青	-0.11
24	Listeria portnoyi	白	<5.00	薄青~青	7.38	薄青	-
25	Listeria rustica	白	<5.00	薄青	7.38	薄青	-
26	Listeria farberii	白	8.61	青	8.53	薄青	-0.09
27	Listeria monocytogenes	NT	NT	青	8.80	薄青	NT

*NT: not tested

図4 30℃, 48時間培養でのListeria属菌の発育例
L. innocua L. newyorkensis

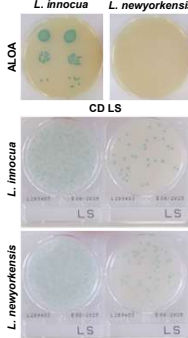


表6 48時間培養で検出可能だったListeria属菌

菌株番号	菌種	sensu stricto Listeria	USDA MLG 8.15	ALOA 37℃	CD LM 37℃	CD LS 37℃	CD LS 30℃
1	Listeria ivanovii	✓	✓	✓	✓	✓	✓
4	Listeria grayi	✓	✓	✓	✓	✓	✓
5	Listeria innocua	✓	✓	✓	✓	✓	✓
6	Listeria welshimeri	✓	✓	✓	✓	✓	✓
8	Listeria seeligeri	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	Listeria marthii	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	Listeria fleischmannii	✓	✓	✓	✓	✓	✓
11	Listeria floridensis	✓	✓	✓	✓	✓	✓
12	Listeria aquatica	✓	✓	✓	✓	✓	✓
13	Listeria newyorkensis	✓	✓	✓	✓	✓	✓
14	Listeria cornelensis	✓	✓	✓	✓	✓	✓
15	Listeria rocourtiae	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16	Listeria weihenstephanensis	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17	Listeria grandensis	✓	✓	✓	✓	✓	✓
18	Listeria riparia	✓	✓	✓	✓	✓	✓
19	Listeria booriae	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20	Listeria thailandensis	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21	Listeria liliorensis	✓	✓	✓	✓	✓	✓
22	Listeria cossartiae	✓	✓	✓	✓	✓	✓
23	Listeria immobilis	✓	✓	✓	✓	✓	✓
24	Listeria portnoyi	✓	✓	✓	✓	✓	✓
25	Listeria rustica	✓	✓	✓	✓	✓	✓
26	Listeria farberii	✓	✓	✓	✓	✓	✓
27	Listeria monocytogenes	✓	✓	✓	✓	✓	✓

*コロニー一つのみ検出

結論

- ✓ 本研究で公定法を含むリステリア検査用培地における様々なListeria属菌の発育性能が明らかになった。本研究で評価した培地のうち、最も幅広くListeria属菌を検出するためには、LPTBでの35℃24時間増菌培養とCD LSでの30℃48時間培養との組み合わせが適切だと考えられる。L. monocytogenes検査用のALOAやCD LMでは、L. monocytogenesに近縁な狭義のListeria属菌を含む一部のListeria属菌の検査も同時に実施できることが明確になった。検査の目的に応じてListeria属菌の検出範囲を決定し、適切な培地やキットを選択することが重要である。