

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4001553号
(P4001553)

(45) 発行日 平成19年10月31日(2007.10.31)

(24) 登録日 平成19年8月24日(2007.8.24)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q 1/04
GO 1 N	21/77	(2006.01)	GO 1 N 21/77 D
GO 1 N	21/78	(2006.01)	GO 1 N 21/78 C
			GO 1 N 21/78 Z

請求項の数 9 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2002-555216 (P2002-555216)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月4日(2002.1.4)
 (65) 公表番号 特表2004-524017 (P2004-524017A)
 (43) 公表日 平成16年8月12日(2004.8.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2002/000024
 (87) 国際公開番号 W02002/053705
 (87) 国際公開日 平成14年7月11日(2002.7.11)
 審査請求日 平成16年3月5日(2004.3.5)
 (31) 優先権主張番号 01/00121
 (32) 優先日 平成13年1月5日(2001.1.5)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 503243748
 ランバッチ アライン
 フランス共和国 パリ ブルーバード デ
 ユ モントパーナッセ 7 3
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (72) 発明者 ランバッチ アライン
 フランス共和国 パリ ブルーバード デ
 ユ モントパーナッセ 7 3
 審査官 田村 明照

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リステリア属の細菌を検出するための培地

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リステリア・モノサイトゲネスを他のリステリアの種から区別するための固形培地であって、リステリア培地中に、___-マンノシダーゼを同定するための ___-マンノシダーゼ基質として、少なくとも発色性物質または蛍光発生物質を含有するが、エステラーゼ活性の検出を可能にする基質を含有せず、さらに、前記発色性物質が、加水分解によって、インドキシル、ハロインドキシル(プロモインドキシル、クロロインドキシル、フルオロインドキシル、ヨードインドキシル、ジクロロインドキシル、クロロプロモインドキシル、トリクロロインドキシル)、メチルインドキシル、またはヒドロキシキノリンの誘導体、から選択される沈殿可能な発色団を放出することを特徴とする固形培地。

【請求項 2】

発色性物質が、6-クロロインドキシル、5-プロモインドキシル、3-プロモインドキシル、6-フルオロインドキシル、5-ヨードインドキシル、4, 6-ジクロロインドキシル、6, 7-ジクロロインドキシル、5-プロモ-4-クロロインドキシル、5-プロモ-6-クロロインドキシル、4, 6, 7-トリクロロインドキシル、N-メチルインドキシル、または8-ヒドロキシキノリンの誘導体から選択される沈殿可能な発色団を放出することを特徴とする、請求項 1 に記載の固形培地。

【請求項 3】

___-マンノシダーゼの基質と連結した蛍光発生物質が4-メチルウンベリフェリルであることを特徴とする、請求項 1 に記載の固形培地。

10

20

【請求項 4】

発色反応アクチベーターをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか1項に記載の固形培地。

【請求項 5】

アクチベーターがメチル- -マンノシドであることを特徴とする、請求項 4 に記載の固形培地。

【請求項 6】

-マンノシダーゼの基質がインドキシル- -マンノシドであることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか1項に記載の固形培地。

【請求項 7】

1リットルあたり以下の成分を含有することを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか1項に記載の固形培地：

寒天 10g
 仔ウシ脳インフュージョン 12.5g
 プロテオースペプトン 10g
 ウシ心臓インフュージョン 5g
 塩化ナトリウム 5g
 Na_2HPO_4 4g
 KH_2PO_4 2g
 グルコース 2g
 塩化リチウム 7.5g
 レシチン 3g
 オフロキサシン 0.0004g
 コリスチン 0.015g
 セフトジジム 0.0134g
 メチル- -マンノシド 0.25g
 インドキシル- -マンノシド 0.05g。

【請求項 8】

リステリア・モノサイトゲネスを他のリステリアの種から区別するための、請求項 1 ~ 7 のいずれか1項に規定される培地の使用。

【請求項 9】

以下の工程を含むことを特徴とする、試料中のリステリア・モノサイトゲネスを他のリステリアの種から区別するための方法：

- (a) 請求項 1 ~ 7 のいずれか1項に規定されるような培地に、試料または該試料由来の接種材料を接種する工程、
 (b) 該培地上でリステリア属の細菌の存在を検出する工程、
 (c) 選択的に、該培地上に存在する、リステリア・モノサイトゲネスを、リステリア・イヴァノビおよび他のリステリアから区別する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リステリア属の細菌、特にリステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*) の細菌を実証することを意図する発色性培地に関する。

【背景技術】

【0002】

臨床分野および農業食品分野の両方において、リステリア、および特にリステリア・モノサイトゲネスを分析することは、ますます重要になっている。なぜなら、これらの細菌は、しばしば農業食品製品中に広がり、感受性の高い患者（妊婦、高齢者など）において重篤な感染をもたらすからである。

【0003】

10

20

30

40

50

実際、数年間、特に農業食品産業の製品について、政府は厳しいサーベイランスネットワークの設置を増加させてきた。このように、一般化された、リステリア・モノサイトゲネスの疫学的なサーベイランスが監視されている。

【0004】

従って、これらの細菌による汚染を検出するための、信頼性が高くかつ迅速な試験方法（この試験方法は高感度かつ特異的の両方でなければならない）を確保することが重要である。

【0005】

今日、ある程度選択性であり、試料中のリステリアの存在を検出することが可能な、リステリアを検出するための特定の培地（例えば、PALCAM培地またはOXFORD培地）が存在している。これらの培地を使用して得られる結果は、ある程度の不正確さを示し得る。このことは、リステリア・モノサイトゲネスの存在を確認するために他の試験を実施することの必要性を示す。

10

【0006】

これらの培地は、実際、選択性を提供する抗微生物物質、および特異性を提供する酵素の検出の組み合わせに基づいている。しかし、これらの培地は、特に多くの偽陽性または偽陰性の存在を引き起こすため、これらの培地の選択性および特異性の両方は、改善され得る余地がある。これらの培地の不利な点は、これらの培地がリステリア・モノサイトゲネス種を区別することができないという点である。

【0007】

20

コロニーの特異的な着色またはコロニーを取り囲む特異的なハロー（halo）によってリステリア・モノサイトゲネスを直接検出するために、ホスホリパーゼの検出に基づく試験を含む培地もまた存在する。しかし、これらの試験は、天然でホスホリパーゼ+であるリステリア・イヴァノビ（*L. ivanovii*）についても陽性である。

【0008】

単離工程の後の同定工程で、特に「アミノペプチダーゼ」表現型における差異に基づく試験を用いて、リステリア・イヴァノビからリステリア・モノサイトゲネスを区別することも示唆された。

【発明の開示】

【0009】

30

リステリア・イヴァノビからリステリア・モノサイトゲネスを区別する目的のために、本発明は、リステリア・モノサイトゲネスについては陽性であり、リステリア・イヴァノビについては陰性であることを特徴とする、 α -マンノシダーゼの検出に基づいている。本発明の特徴としては、例えば、酵素基質であるニトロフェニル- α -マンノシドを使用して、純粋な培養物であることを示すことができる。この基質は無色であるが、試験が陽性である場合に、黄色に着色したニトロフェニルを放出する。

【0010】

本発明は、固形培地中で発色性基質または蛍光発生基質を用いて α -マンノシダーゼを検出することによって、固形培地上のコロニー中の α -マンノシダーゼを示すことが可能であることを実証する。固形培地中での α -マンノシダーゼについての基質の使用は、本願において初めて導き出され、特に固形培地を調製する利点を有する。ここでは、単離が実行されるとすぐに、さらなる試験を実施する必要なしに、リステリア・イヴァノビからリステリア・モノサイトゲネスを区別することが可能である。

40

【0011】

従って、本発明は、リステリア属の細菌を検出および/または識別するための新規な培地に関し、上記培地は、リステリア培地中に、固形培地中で使用され得る α -マンノシダーゼを同定するための少なくとも1種の特異的な物質を含有することを特徴とする。固形培地中で使用され得る α -マンノシダーゼを同定するための特異的な物質は、好ましくは、 α -マンノシダーゼの基質から選択される発色性物質または蛍光発生物質である。

【0012】

50

-マンノシダーゼの基質である発色性物質は、好ましくは、この酵素による基質の加水分解によって放出される沈殿可能な発色団を含有する。従って、細菌のコロニーは、放出される発色団の関数として着色し、放出された発色団は培地中で固体状態である。それゆえ、発色団が放出されたコロニーに局在したまま残っている。

【0013】

好ましくは、上記発色団は、インドキシル、ハロインドキシル（プロモインドキシル、クロロインドキシル、フルオロインドキシル、ヨードインドキシル、ジクロロインドキシル、クロロプロモインドキシル、トリクロロインドキシル）、メチルインドキシル、またはヒドロキシキノリンの誘導体から選択される。好ましい誘導体は、特に、以下の誘導体：6-クロロインドキシル、5-プロモインドキシル、3-プロモインドキシル、6-フルオロインドキシル、5-ヨードインドキシル、4, 6-ジクロロインドキシル、6, 7-ジクロロインドキシル、5-プロモ-4-クロロインドキシル、5-プロモ-6-クロロインドキシル、4, 6, 7-トリクロロインドキシル、N-メチルインドキシル、および8-ヒドロキシキノリンから選択される。

10

【0014】

-マンノシダーゼの基質が蛍光発生物質と連結される場合、4-メチルウンベリフェリルが好ましく使用される。

【0015】

好ましくは、-マンノシダーゼの基質は、インドキシル--マンノシドである。培地中の発色性物質の濃度は、約0.01~0.5g/lの間である。好ましい濃度は0.05g/lである。

20

【0016】

観察される反応の質を改善するために、発色反応アクチベーターを上記培地に添加することもまた、利点であり得る。このような用途のための適切なアクチベーターは、メチル--マンノシドであり、約0.01~0.5g/lの間、好ましくは0.25g/lの濃度で培地に取り込まれる。

【0017】

従って、本発明に従う培地は、いかなるさらなる試験をも実行することなく、リステリア・モノサイトゲネスを検出することを可能にし、そしてリステリア・モノサイトゲネスを、リステリア・イヴァノビから識別することを可能にする。本発明に従う培地によって得られた結果を最適化するために、先行技術の培地中で使用されているように、リステリア属に対して選択的な因子を追加することが有利であり得る。その結果、リステリア・モノサイトゲネスに特異的な培地が得られる。

30

【0018】

本発明の目的はまた、リステリア属、特にリステリア・モノサイトゲネスの細菌を検出および/または識別するための、本発明に従う培地の使用に関する。

【0019】

本発明の目的はまた、試料中のリステリア属の細菌を検出および/または識別するための方法に関し、上記方法は、

- (a) 本発明に従う培地に、試料または試料由来の接種材料を接種する工程、
 - (b) 培地上でリステリア属の細菌の存在を検出する工程、および
 - (c) 選択的に、培地上に存在する、リステリア・モノサイトゲネスを、リステリア・イヴァノビおよび他のリステリアから区別する工程、
- を含むことを特徴とする。

40

【0020】

実施例

実施例1

本発明を実施するための好ましい培地は以下の成分を含有する（1リットルあたり）：

寒天 10g

仔ウシ脳インフュージョン 12.5g

50

プロテオースペプトン 10g
 ウシ心臓インフュージョン 5g
 塩化ナトリウム 5g
 Na_2HPO_4 4g
 KH_2PO_4 2g
 グルコース 2g
 塩化リチウム 7.5g
 レシチン 3g
 オフロキサシン 0.0004g
 コリスチン 0.015g
 セフトジジム 0.0134g
 メチル- α -マンノシド 0.25g
 インドキシル- α -マンノシド 0.05g。

【0021】

実施例2

本発明に従う培地上に細菌を播種して、以下の結果を得た（37℃で24時間インキュベーション）：

【0022】

【表1】

	ハロー	コロニーの中心
リステリア・モノサイトゲネス	白色	青色
リステリア・イヴァノビ	白色	無色
他のリステリア	ハローなし	—————

【0023】

従って、本発明に従う培地の使用は、リステリア・モノサイトゲネス、リステリア・イヴァノビ、および他のリステリアの種を検出および識別することを可能にする。

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平05 - 030995 (JP, A)
特表平09 - 500791 (JP, A)
特表2004 - 513649 (JP, A)
J Med Microbiol, 1991年, 35, 193-6
Journal of Clinical Microbiology, 1986年, 24 (1), 99-103
Zentralblatt fur Bakteriologie, 1991年, 275 (4), 423-35

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/04