

200/0879

厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業

食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 五十君 静信

国立感染症研究所 食品衛生微生物部

食品由来のリストeria菌の健康被害に関する研究班

平成13年度 研究組織

主任研究者

五十君 静信 国立感染症研究所食品衛生微生物部

分担研究者

山本 茂貴 国立感染症研究所食品衛生微生物部長
牧野 壮一 帯広畜産大学畜産学部 助教授
本藤 良 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 教授
神保 勝彦 東京都立衛生研究所乳肉衛生研究科長

協力研究者

丸山 務 麻布大学環境保健学部 教授
寺尾 通徳 新潟大学医学部 講師
仲真 晶子 東京都立衛生研究所乳肉衛生研究科 主任研究員
武士 甲一 北海道立衛生研究所食品科学部 主任研究員
黒木 俊郎 神奈川県衛生研究所細菌病理部 主任研究員
岡田由美子 国立公衆衛生院衛生獣医学部 主任研究員
植田富貴子 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 助教授
山下 和予 国立感染症研究所感染症情報センター 主任研究官
春日 文子 国立感染症研究所食品衛生微生物部 主任研究官
奥谷 晶子 国立感染症研究所食品衛生微生物部 協力研究員
佐々木 直 日本冷凍食品検査協会東京検査所 課長
青山 顕司 雪印乳業食品衛生研究所 主任研究員
桃尾 隆之 横浜市立大学医学部附属市民総合医療センター 医師
天野富美夫 大阪薬科大学薬学部 教授
山崎 学 東京農工大学農学系研究科
浅井 美里 東京家政大学家政学部
近藤 美佳 東京家政大学家政学部

事務および経理担当者

白松 宏子、白井 和美

目 次

I. 総括研究報告書

- 食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究・・・・・・・・・・ 1
五十君 静信

II. 分担研究報告書

1. 市販鮮魚介類及びその加工品における *Listeria* 属の汚染実体調査・・ 11
山本 茂貴、丸山 務
2. 分子疫学的手法の検討及び標準化・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22
牧野 壮一、武士 甲一、岡田由美子
3. *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎的研究・・・・ 29
本藤 良、植田富貴子
4. 市販食肉製品等の *Listeria* 属菌汚染実態調査・・・・・・・・・・ 44
神保 勝彦、仲真 晶子
5. リステリアの食品汚染状況に関する文献調査・・・・・・・・・・ 51
五十君静信、奥谷 晶子

III. その他

- アンケート調査用紙・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59
アンケート発送先医療機関リスト・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 62

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（総括研究報告書）

食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究
主任研究者 五十君 静信 国立感染症研究所室長

研究要旨

リステリア菌 *Listeria monocytogenes* は動物や土壌等の環境中に広く常在している。その結果、乳肉製品を中心に食品から高頻度に分離されてきた。一方、これまで、我国におけるリステリア症の感染源や感染経路については不明で、欧米で報告されているような食品が感染源になった事例は確認されていなかった。それ故、リステリアが食品からしばしば分離される事実と、ヒトにおけるリステリア症発症の因果関係は不明であった。本研究班では、我が国におけるリステリア症の実体を掌握し、本症が食品を介した感染症であるかを検討し、今後どのように対処して行くべきかの方向性を明らかにすると共に、リステリアの検査検出法の標準化を試みることを目的とした。2001年3月に北海道で発生したナチュラルチーズによる集団食中毒事例は、食品を介したリステリアによる感染が強く疑われ、我が国においても食品を介した本症の発生が既に起こっている可能性を示唆し、今後、同様な事例の発生を想定し早急に対策をとる必要性を示した。一方、この事例に関する検討から、リステリアがヒトに感染を起こしたことを臨床的に確認する手法の確立が早急に必要であること、疫学マーカーとして用いた PFGE の信頼性に関する確認が必要であることが示された。前者に対しては、ELISA 法によるヒト血清中リステリア特異的抗体の測定法の開発を試みた。リステリアの主要な抗原であるリステリオリジンOや菌体成分を用いた ELISA の系を作出し、リステリア症の疑われる髄膜炎発症者の血清を用いて、この検査法の検討を行った。後者に対しては、多数の分離株を用いた PFGE による株の同一性の検討を試みた。多数の臨床、食品および環境分離株について検討を行ったところ、リステリアに於ける疫学マーカーとしての PFGE 法は株の同一性を示す方法としては、信頼性が低い事が示された。そこで、PFGE に代わる疫学マーカーの解析方法の開発を試み、*iap* 遺伝子領域内の多型領域のゲノムを解析する手法を示した。我が国に於けるリステリア症の発生状況については、地方衛生研究所、各地の拠点病院および国立感染症研究

所の感染症情報センターと連繋をとりながら、ヒトにおけるリステリア症の情報および臨床株の収集を行った。収集したリステリアの臨床株、環境分離株、食品分離株については、病原関連因子、疫学マーカーなどに着目して解析を行った。リステリア症の発生状況については全国約 2300 ヶ所の病院のリストを作成し、アンケート調査を開始した。国内の食品のリステリアの汚染状況は、これまでに報告されている論文のデータを集計し、検討を加えた。感染が想定され、特に重要と考えられる生食用食品については、市販食品を購入し、実際に汚染実態調査を行った。

分担研究者

山本 茂貴 (国立感染症研究所・部長)
牧野 壮一 (帯広畜産大学・助教授)
本藤 良 (日本獣医畜産大学・教授)
神保 勝彦 (東京都立衛生研究所・科長)

A. 研究目的

リステリア菌 *Listeria monocytogenes* は動物や土壌等の環境中に広く常在している。その結果、乳肉製品を中心に食品から高頻度に分離されてきた。一方、これまで、我国におけるリステリア症の感染源や感染経路については不明で、欧米で報告されているような食品が感染源になった事例は確認されていなかった。それ故、リステリアが食品からしばしば分離される事実と、ヒトにおけるリステリア症発症の因果関係は不明であった。本研究班では、リステリア症の実体を掌握し、本症が食品を介した感染症であるかを検証し、今後どのように対処して行くべきであるかの方向性を明らかにすると

共に、リステリアの検査検出法の標準化を試みることを目的とする。

B. 研究方法

2001 年 3 月に北海道で発生したナチュラルチーズによる集団食中毒事例は、食品を介したリステリアによる感染が強く疑われる事例であった。そこでこの事例を詳しく検討し、リステリアの検査法および解析法の問題点を検討したところ、リステリアがヒトに感染を起こしたことを臨床的に確認する手法の確立が必要であること、疫学マーカーとして用いた PFDE の信頼性に関する確認が必要と思われたので、この 2 点について研究した。リステリアの感染の確認には、リステリア菌体成分への特異的抗体価を ELISA 法により測定する方法を検討した。リステリアの主要な抗原であるリステリオリジン O や菌体成分を用いた ELISA の系を作出し、リステリア症の疑われる髄膜炎発

症者の血清を用いて、この検査法を用いて抗体価の測定を試みた。PFGEについては、多数の分離株について、解析を行い、株の同一性を確認する方法としての妥当性を調べた。さらに他の疫学マーカーの分析法についても検討を加えた。

我が国に於けるリステリア症の発生状況については、地方衛生研究所、各地の拠点病院および国立感染症研究所の感染症情報センターと連携をとりながら、ヒトにおけるリステリア症の情報および臨床株の収集を行った。収集したリステリアの臨床株、環境分離株、食品分離株については、病原関連因子、疫学マーカーなどに着目して解析を行った。過去10年間にわたるリステリア症の発生状況については全国約2300ヶ所の病院のリストを作成し、アンケート調査を開始した。

国内の食品のリステリアの汚染状況は、これまでに報告されている論文のデータを集計し、検討を加えた。この結果からリステリアの感染が想定され、特に重要と考えられる生食用食品については、市販食品を購入し、実際に汚染実態調査を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトの臨床材料を用いた研究に関しては、国立感染症研究所の生体材料等の実験使用に関する倫理委員会での審査を受

け、研究を行うと共に、試料提供者の個人情報等の取扱いは慎重に行った。

C. 研究結果

北海道で発生したナチュラルチーズによる集団食中毒事例の2つの問題点に関してはそれぞれに関して成果が得られた。リステリアがヒトに感染を起こしたことを臨床的に確認する手法としては、ヒトの血清からELISA法によりリステリアの菌体成分特異的な抗体価を測定する方法を確立した。分離株の株の同一性を確認する手法であるPFGEによる解析は、リステリアでは血清型程度の信頼性しかないことを明らかにした。それに代わる方法として*iap* 遺伝子領域内の多型領域のゲノムを解析する手法を示した。

我が国に於けるリステリア症の発生状況については、地方衛生研究所、各地の拠点病院および国立感染症研究所の感染症情報センターと連携をとりながら、ヒトにおけるリステリア症の情報収集を試みた。さらに、全国約2300ヶ所の病院のリストを作成し、アンケート調査を開始した。

リステリアの臨床株、環境分離株、食品分離株の収集は順調に進んでおり、これらの株を用いた病原関連因子、疫学マーカーなどに着目した解析を行った。

リステリアで報告されている12種類

の病原因子に関する検討では、株により病原因子の保持状況が異なっており、この方法により菌株の病原性の強さを推定できる事が示された。

分離菌株の血清型判別法を、カルチャープレートおよびマイクロプレートの併用で改良し、迅速と簡便および抗血清の微量化への利点をもつ改良法を開発した。

ヒトでの病原性と関連性を持つ血清型4b株について、*iap* 遺伝子領域内の多型領域のゲノム構造解析により、汚染鶏肉とヒト感染において疫学的関連性が示唆された。

国内の食品のリステリアの汚染状況は、これまでに報告されている論文のデータを集計し、検討を加えた。この結果から肉製品での汚染が高いことが示された。牛、豚、鶏肉ともほぼ同様にリステリアの汚染が見られるが、ブロック肉に比べ、カットされた肉での汚染率が高かった。特に重要と考えられる生食用食品については、数%の汚染率であったため、市販食品を購入し、実際に汚染実態調査を行った。

市販されている生食用食肉では、4.5%、食肉製品では、8.7%にリステリア属菌汚染が認められた。*L. monocytogenes* は、生食用食肉からは検出されず、食肉製品から218検体中9検体(4.1%)から検出された。

鮮魚類と生食用鮮魚類合計35品目394検体について調査を行ったところ、*Listeria* 属陽性のものは、サンマ刺身が33.3%(1/3)、マグロ刺身が13.2%(7/53)、加工品では、明太子が31.6%(6/19)、マグロのたたきが21.9%(16/73)、スジコが17.4%(4/23)、スモークサーモンが8.8%(5/57)、加熱済みタコが6.3%(1/16)であった。*Listeria* 属陽性のうち *L. monocytogenes* は、マグロ刺身が5.7%(3/53)、加工品からは、明太子が26.3%(5/19)、マグロのたたきが13.7%(10/73)、スジコが8.7%(2/23)、タコ(加熱)が6.3%(1/16)、スモークサーモンが3.5%(2/57)であった。*L. monocytogenes* 陽性検体の汚染菌量は、最も菌量の多かったものでもスモークサーモンの4.3cfu/gであり、ほとんどの検体では0.3cfu/g以下であった。

D. 考察

北海道で発生したナチュラルチーズによる集団食中毒事例を検討したところ、リステリアがチーズという食品を介して患者に摂取されたという事実はほぼ確認された。一方、リステリアにおいては疫学マーカーとして血清型別は以前より用いられているが、菌株の同一性を判定する決め手になると考えられる PFGE 法を用いた実績があまりない。リステリアに

における PFGE 解析が血清型別程度のカテゴリ分けにしかないと指摘する研究者もいる。そこで研究班では、多数の分離株を用いて、リステリア菌株の PFGE によるパターン解析を行ったところ、同一の血清型の分離株同士はほぼ同一の泳動パターンを示した。出血性大腸菌 0157 などで菌株間の同一性の判定に大変有用に用いられている方法ではあるが、これまでの結果では、リステリアへの適用は実用的ではない。今後菌株間の同一判定には新たな手法を含め、検討して行かなければならないと思われる。用いる制限酵素を変えるなど PFGE 法にもまだ条件検討の余地はあるが、今年度分担研究者本藤が検討した *iap* 遺伝子領域内の多型領域のゲノム解析は PFGE に代わる有効な手法と考えられた。

北海道で発生した集団食中毒事例でも必要とされた、リステリアがヒトに感染を起こしたことを臨床的に確認する手法に関しては、本年度、主任研究者五十君がヒトの血清から ELISA 法によりリステリアの菌体成分特異的な抗体価を測定する方法を検討した。リステリアの主要な病原因子であるリステリオリジン O(LL0)を遺伝子組換えにより大量に作成し、LL0 特異的抗体価を ELISA 法にて測定することにより、感染の有無を判定する。リステリア症の疑われる髄膜炎発症

者の血清を用いて、この検査法により特異的抗体価の測定を試みたところ、非特異的なバックグラウンドが高いものの高い抗体価からリステリアの感染を疑う試料が観察され、実用的な検査法になり得ることが示された。バックグラウンドの高い理由は、用いた抗原の精製度が低いこと、ブロッキング剤が適当でなかった事が考えられ、2年目以降はこの方法を引き続き検討し、ヒトにおけるリステリア症の診断に用いることが可能なレベルの検査法として行く予定である。

我が国に於けるリステリア症の発生状況については、地方衛生研究所、各地の拠点病院および国立感染症研究所の感染症情報センターと連携をとりながら、ヒトにおけるリステリア症の情報収集を試みたが、症例数が極端に少ないこともあり、過去10年間さかのぼって発生状況を調べることにした。昨年度から研究をスタートした髄膜炎研究班（主任者山井先生）のご協力をお願いし、全国約2300ヶ所の病院のリストを作成し、流動研究員奥谷が中心となって、アンケート調査を開始した。アンケートの回収、集計は2年目以降の作業になる。

リステリアの臨床株、環境分離株、食品分離株の収集は順調に進んでおり、これらの株を用いた病原関連因子、疫学マーカーなどに着目した解析を行った。分

担研究者牧野により、リステリアで報告されている12種類の病原因子に関する検討では、コントロールとしたEGD株では全てPCRが陽性であった。EGD株は血清型1/2aであり、4bと並んでヒトの感染事例から数多く分離されている血清型である。他の菌株は血清型の標準株として保存されている株で、そのPCRのパターンはまちまちであった。しかし、*L. monocytogenes* 以外の血清型ではほとんど陽性が見られなかった。ドイツ株の方が病原遺伝子を保有している株が多く、特に侵入能に関与する遺伝子である*inlA-C* 遺伝子は国内保存株では検出できなかった。その他の病原因子も同様であった。このように、株により病原因子の保持状況が異なっており、この方法により菌株の病原性の強さを推定できる可能性が示された。

分担研究者本藤は、ヒトでの病原性と関連性を持つ血清型4b株について、分子疫学的解析を試み、*iap* 遺伝子領域内の多型領域のゲノム構造を明らかにした。その特性から、汚染鶏肉とヒト感染において疫学的関連性が示唆された。さらにこの手法を用いることにより、同一菌株による地域常在汚染の実態が明かとなった。

国内における食品のリステリア汚染状況は、これまでに報告されている論文を

集計し、どの食品が汚染されているを明らかにした。食肉からの分離は多数報告されており、動物種を問わず、本菌が主に食肉を汚染していることがわかる。牛、豚、鶏肉ともほぼ同様にリステリアの汚染が見られるが、ブロック肉に比べ、カットされた肉での汚染率が高かった。これはリステリアが低温増殖性であることと関係しており、肉の流通の過程で次第に汚染率を上げているものと思われる。特に重要と考えられる生食用食品については、データは少なく、数%の汚染率が報告されていたため、実際に流通している市販食品を購入し、汚染実態調査を行った。

市販されている食肉製品計240検体の実体調査は分担研究者神保が行った。生食用食肉から*L. monocytogenes*は検出されなかった。調理用食肉の*L. monocytogenes* 検出率が10~40%であるのに比べ、生食用食肉は衛生管理に配慮がなされていると考えられた。食肉製品全体での*L. monocytogenes* 検出率は4.1%であり、非加熱食肉製品のみでは22.2%であった。諸外国での食肉製品からの本菌の検出率は数%~30%程度であり、今回の調査もこれらと同等であった。汚染菌量はすべて1g当たり1個未満であり、ICMSFの提案している一般食品中の*L. monocytogenes*規格である1g当た

り 100 個未満と比較して少ない菌量であった。

魚介類加工品の実態調査は、分担研究者山本が担当し、麻布大学の丸山教授の協力の下行われた。魚介類加工品、特に加熱工程が無く加工されそのまま食される ready to eat 食品を対象に *Listeria* 属の調査を系統的に行ったのは今回が初めてと思われる。ただし調査対象品目が限られ、また品目によっては十分な検体数とはいえないためこの成績が日本における市販食品の全体像を現しているとはいえないが、14 品目中 5 品目が *Listeria* 属および *L. monocytogenes* 陽性であったことは魚介類加工品は鮮魚介類と同様に高い汚染であることが明らかになったことは確かである。今回魚介類製品で *L. monocytogenes* の汚染が最も高かったのは明太子の 26.3% (5/19) で、次いでマグロのたたきの 13.7% (10/73)、スジコの 8.7% (2/23) であった。これらの製品はいずれも加熱工程が無く、又加熱をせずにそのまま喫食する嗜好度の高い食品であるだけにその高い汚染率は問題である。これらの汚染の由来については現在のところ不明であるが、その高い汚染率から原材料とは考えられず、二次汚染の可能性が高い。マグロのたたきでは 73 検体中陽性は 10 検体であったがそのうち 7 検体は同じ販売店からの購入で

あるように製造場所や販売所によって汚染率が著しく異なること、また加熱済みタコからも検出されていること等を考え合わせると製品製造段階での汚染が最も疑われる。スモークサーモンにおける *L. monocytogenes* の汚染は世界各国で知られているが、今回の我々の成績は 57 検体中 2 検体 (3.5%) で諸外国の汚染率よりかなり低い。これも製造場所によって著しく差のあることが指摘されており、また今回用いた検体が輸入品であるか国産品であるか表示の明確でないものもあったため検出率の違いについては不明である。

一方、*L. monocytogenes* の汚染菌量についてはスモークサーモンの 1 検体が 4.3cfu/g であったのが最高値でその他のほとんどは 0.3cfu/g 以下であった。したがって、健康成人がこれらの汚染された食品を喫食したとしても、又これらの食品は大量に摂取するものではないだけにリステリア症を引き起こす可能性は低いと思われる。しかしながら、これらの食品は当然ハイリスクの人達も好んで食べる食品であるため注意が必要である。

E. 結論

1. 2001 年 3 月に北海道で発生したナチュラルチーズによる集団食中毒事例を検

討したところ、リステリアがチーズという食品を介して患者に摂取されたという事実は確認され、我が国においても食品を介した本症の発生を想定した対策が必要であると思われる。

2. リステリアがヒトに感染を起こしたことを確認する方法として、ELISA 法を開発した。

3. リステリア症の発生状況を掌握するため、全国約 2300 の医療機関へのアンケート調査を開始した。

4. リステリアの臨床株、環境分離株、食品分離株を収集した。

5. 収集した株を用いて、病原関連因子、疫学マーカーなどに着目した解析を行った。

6. *iap* 遺伝子領域内の多型領域のゲノム解析により汚染鶏肉とヒト感染において疫学的関連性が示唆された。

7. リステリアにおいて PFGE による解析は血清型別程度の群分けとなるので、菌株の同一性を示す方法としては適さない。

8. リステリアの病原因子の検討から、株により病原因子の保有パターンが異なることが示された。

9. 分離菌株の血清型判別手法を改良した。

10. 我が国に於けるリステリアの食品の汚染状況を文献により集計し、主にどのような食品が汚染されているかをまと

めた。

11. 市販されている生食用食肉の汚染実態調査調査ではリステリア属菌が検出されたが、*L. monocytogenes* は、検出されなかった。

12. 鮮魚類、生食用鮮魚類の汚染実態調査では、一部の食品にリステリアの汚染が認められたが、汚染菌数は低かった。

F. 健康危険情報

2001 年 3 月に北海道で発生したナチュラルチーズによる集団食中毒事例を検討したところ、リステリアがチーズという食品を介して患者に摂取されたという事実は確認された。我が国においても食品を介した本症の発生を想定した対策が必要であると思われる。一方、ヒトが経口的にリステリア感染を受けた事を確認する診断手法が確立しておらず、この手法の確立が必要である。

鮮魚類、生食用鮮魚類のリステリアの汚染実態調査において、一部の市販食品に汚染が認められた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Igimi, S.: Development of the recombinant vaccines with Lactic Acid Bacteria as antigens delivery vehicles for mucosal immunization. Journal of

Intestinal Microbiology (2001)14: 67-73.

2) Mochizuki M, Ueda F, Sano T, Hondo R. 2001. Cadmium contamination in wild bird as an indicator of environmental pollution. Environmental Monitor Assessment in press.

3) Y. Okada, S-I, Makino, T, Tobe, N, Okada, and S, Yamazaki. Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene. Appl. Environ. Microbiol. 68: (2002 in press).

4) Ueda F, Sugawara M, Aota M, Mochizuki M, Yamada F, Hondo R. 2002. Swift and definite serotyping for the isolated *Listeria monocytogenes* strains. Microbiologica. in press.

2. 学会発表

1) 五十君静信、佐藤英一、山崎学、天野富美夫、山本茂貴。Listeriolysin O 関連遺伝子を発現した組換え乳酸菌のマウスへの免疫効果。第74回日本細菌学会総会。2001年4月岡山

2) Igimi S and Satoh E. Development of antigens delivery vehicles for mucosal immunization with *Lactobacillus casei*. International Conference of Intestinal bacteriology. 2001. 7. 5-6. Tokyo.

3) 五十君静信、佐藤英一、村上和雄、山崎学、井上智、山本茂貴。Listeriolysin O 関連遺伝子を組込み発現した *Lactobacillus casei* のマウスへの免疫。日本乳酸菌学会。2001年7月名古屋

4) 仲真晶子、金子誠二、石崎直人、八巻ゆみこ、草野友子、平井昭彦、神保勝彦、宮崎奉之。輸入生ハムの *Listeria monocytogenes* 汚染事例。第22回日本食品微生物学会。2001年10月大阪

5) 五十君静信、佐藤英一、浅井美里、近藤美佳、佐藤美弥子、村上和雄、山崎学、井上智、天野富美夫、山本茂貴。

Listeriolysin O 関連遺伝子を発現した組換え乳酸菌のマウスへの免疫効果。第132回日本獣医学会。2001年10月盛岡

6) 菅又美穂、青田実生、望月真理子、山田文也、植田富貴子、本藤良。市販食肉における *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学。第132回日本獣医学会。2001年10月盛岡

7) 小笠原邦敏、植田富貴子、望月真理子、山田文也、青木英雄、南俊作、本藤良。*L. monocytogenes* 輸入株における疫学的解析。第132回日本獣医学会。2001年10月盛岡

8) 五十君静信、近藤美佳、浅井美里、佐藤英一、山崎学、中野有実子、斎藤典子、村上和雄、山本茂貴、天野富美夫。菌体表面に Listeriolysin O を発現させた乳

酸菌組換え体のマクロファージへの取り込み。日本農芸化学会大会。2002年3月
仙台

9) 青田実生、菅又美穂、望月真理子、小笠原邦敏、山田文也、植田富貴子、本藤良。*L. monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する研究。第132回日本獣医学会。
2002年3月

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特許出願「経口用サイトカイン誘導剤」

2001年8月28日出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
（分担研究報告書）

市販鮮魚介類及びその加工品における *Listeria* 属の汚染実態調査

分担研究者 山本茂貴 国立感染症研究所部長

研究要旨

Listeria monocytogenes の食品汚染実態を明らかにする目的で、これまでにあまり報告例はないが、わが国で多く利用される食品である鮮魚介類とそのまま食される鮮魚介類の“ready to eat”食品についての調査を行った。

合計 35 品目、394 検体のうち *Listeria* 属陽性のものは、サンマ刺身が 33.3% (1/3)、マグロ刺身が 13.2% (7/53)、加工品では、明太子が 31.6% (6/19)、マグロのたたきが 21.9% (16/73)、スジコが 17.4% (4/23)、スモークサーモンが 8.8% (5/57)、加熱済みタコが 6.3% (1/16) であった。*Listeria* 属陽性のうち *L. monocytogenes* は、マグロ刺身が 5.7% (3/53)、加工品からは、明太子が 26.3% (5/19)、マグロのたたきが 13.7% (10/73)、スジコが 8.7% (2/23)、タコ(加熱)が 6.3% (1/16)、スモークサーモンが 3.5% (2/57) であった。*L. monocytogenes* 陽性検体の汚染菌量は、最も菌量の多かったものでもスモークサーモンの 4.3cfu/g であり、ほとんどの検体では 0.3cfu/g 以下であった。

以上の成績から、わが国で市販されている刺身類(寿司ネタも含む)には *L. monocytogenes* の汚染があり、加熱すること無しにそのまま食される鮮魚介類の“ready to eat”食品にも高い汚染が見られることが明らかにされた。マグロのたたきや明太子における高汚染、あるいは加熱食品に見られる汚染は二次汚染によるものと考えられる。*L. monocytogenes* の汚染菌量はすべての検体で 10cfu/g 以下であったため、健康人がこれらをそのまま食してもリステリア症を引き起こす可能性は低いと思われるが、分離株の血清型は患者から多く分離される 1/2a 型(42.3%)、4b 型(34.6%)が大部分であるためハイリスクグループの人では注意が必要である。また、魚介類には、食肉で多く分離される 1/2c 型は少なかった。

協力研究者

丸山 務 (麻布大学環境保健学部)

A. 研究目的

リステリア症が食品媒介性感染症であることが明らかにされて以来、様々な食品が原因となったこともあって食品汚染の現状を把握するための汚染実態調査が世界的に広く行われている¹⁾。

これまでに最もよく調査されてきたのは事故を起こした確率の高い乳製品や食肉製品などの畜産食品である。一方、魚介類およびその製品による事故も発生しているが、その頻度も少ないために特に欧米諸国ではスモークサーモン以外の水産食品を対象にした調査はあまり行われていない²⁾。

わが国の食習慣、食文化が他の国に比較して魚介類の消費に依存している部分が多いことから、鮮魚介類および魚介類製品における *Listeria* の汚染実態を正確に把握しておくことは極めて重要である。これまでもいくつか鮮魚介類における汚染調査があり、食品によってはかなり高い汚染のものもあることが証明されてきている^{3),4)}。今回は魚介類製品の中でもこれまでにほとんど調査が行われていない、市販されているそのまま食される“ready to eat”食品についての *Listeria* 汚染実態調査を行った。*Listeria* が陽性の検体についてはその菌数を測定し、水産食品におけるリスク

評価ための基礎資料を得ることを目的とした。

B. 研究方法

1. 検査材料

1999年3月から2001年11月までに東京、神奈川、千葉のスーパーマーケットの店頭で購入した鮮魚・刺身類(寿司ネタも含む)としてマグロ、イカなど合計17品目129検体、加工品としてスモークサーモン、マグロのたたきなど合計14品目245検体、貝類としてアサリ、ホタテなど合計4品目20検体、総合計35品目、394検体を使用した(表1)。

検体は購入後、表示の保存条件で賞味期限まで保存後、試料に供した。

2. *Listeria* の検出方法 (図1)

(1). 試料の調製： 検体は無菌的操作のもとに、25gを秤量し、ストマッカー袋に入れUVM培地を225ml加えて、30秒～1分間ストマッキングしたものを試料原液とし、必要に応じて10倍希釈列を作った。

(2). 増菌培養： UVM培地を入れストマッキングした検体を、30℃、24時間培養および48時間培養を行った。

(3). 分離培養： 増菌液20 μ lをPALCAM培地で画線塗抹し、37℃で48時間培養した。

(4). *Listeria* 属の同定： PALCAM培地

上に分離されたリステリア属菌に典型的なコロニーを各平板から 10 から 20 個釣菌して性状試験を行い、*Listeria* 属を同定した。

(5). *Listeria monocytogenes* の同定：
Listeria 属と同定された菌株は BCM 培地に塗抹し、青色発色が確認できたものを PCR 法と β - 溶血性試験で *L. monocytogenes* を同定した。PCR 法のプライマーには MonoA・B を用いた。また、 β -溶血性は羊血液寒天培地に穿刺培養し、*L. monocytogenes*、*L. innocua*、*L. ivanovii* の対照菌株を置いて判定した。

(6). 血清型別：*L. monocytogenes* と同定された菌株については、市販の型別用診断血清(デンカ生研)を用いて血清型別を行った。

(7). 直接平板塗抹法による定量試験：
直接平板塗抹法による定量試験は、同一希釈試料液の 1 ml を PALCAM 培地 3 から 4 枚にコンラージし、37°C、48 時間培養した。培地上に発育した *Listeria* 属に典型的なコロニー数をカウントし、*Listeria* 属および *L. monocytogenes* の同定を常法に従って行った。同定された菌株は PCR 法で確認した。

(8). MPN 法による定量試験：MPN は UVM 培地による 3 段階、3 本法によった。UVM 培地は 24 時間と 48 時間後分離培養

を行い *L. monocytogenes* の同定は定性試験と同様に行った。*L. monocytogenes* と同定されたものから MPN 表を用いて最確数を求め、1 g あたりに換算した。

C. 研究結果

合計 35 品目 394 検体のうち *Listeria* 属が陽性であったものは、サンマ刺身が 33.3% (1/3)、マグロ刺身が 13.2% (7/53)、加工品では、明太子が 31.6% (6/19)、マグロのたたきが 21.9% (16/73)、スジコが 17.4% (4/23)、スモークサーモンが 8.8% (5/57)、タコ(加熱)が 6.3% (1/16)であった(表 2)。

次に、*Listeria* 属陽性のうち *L. monocytogenes* は、マグロ刺身が 5.7% (3/53)、加工品からは、明太子が 26.3% (5/19)、マグロのたたきが 13.7% (10/73)、スジコが 8.7% (2/23)、タコ(加熱)が 6.3% (1/16)、スモークサーモンが 3.5% (2/57)であった(表 2)。

また、*L. monocytogenes* 陽性検体の菌数は、最も多かったのはスモークサーモンの 1 検体が 4.3cfu/g、加熱済みタコが 1.5cfu/g であった他はすべて、0.7cfu/g 以下であった(表 3)。

血清型別では、1/2a 型が 42.3% (44/104) と一番多く、次いで 4b 型が 34.6% (36/104)、1/2b 型が 7.7% (8/104)、3a 型が 6.7% (7/104)、1/2c 型

が 2.9% (3/104)、3b 型が 1.0% (1/104) であった(表 4)。

D. 考察

わが国で市販されている鮮魚介類に *L. monocytogenes* の汚染があることはすでに報告されているが⁴⁾、⁸⁾、⁹⁾、今回も刺身類、寿司ネタ類に同様の汚染のあることが確認された。ただ、これらの汚染が原材料が生産される自然環境に由来するものか、刺身などに加工される食品工場や商店などの食品加工される段階での汚染なのかは明らかではない。商品となる以前の段階である食品製造環境あるいは原材料生産の自然環境における調査が今後必要である。

魚介類加工品、特に加熱工程が無く加工されそのまま食される ready to eat 食品を対象に *Listeria* 属の調査を系統的に行ったのは今回が初めてと思われる。調査対象品目が限られ、また品目によっては十分な検体数とはいえないためこの成績が日本における市販食品の全体像を現しているとはいえないが、14 品目中 5 品目が *Listeria* 属 および *L. monocytogenes* 陽性であったことは魚介類加工品は鮮魚介類と同様に高い汚染であることが明らかになったことは確かである。

今回魚介類製品で *L. monocytogenes*

の汚染が最も高かったのは明太子の 26.3% (5/19) で、次いでマグロのたたきの 13.7% (10/73)、スジコの 8.7% (2/23) であった。これらの製品はいずれも加熱工程が無く、又加熱をせずにそのまま喫食する嗜好度の高い食品であるだけにその高い汚染率は問題である。これらの汚染の由来については現在のところ不明であるが、その高い汚染率から原材料とは考えられず、二次汚染の可能性が高い。マグロのたたきでは 73 検体中陽性は 10 検体であったがそのうち 7 検体は同じ販売店からの購入であるように製造場所や販売所によって汚染率が著しく異なること、また加熱済みタコからも検出されていること等を考え合わせると製品製造段階での汚染が最も疑われる。スモークサーモンにおける *L. monocytogenes* の汚染は世界各国で知られている⁵⁾、⁶⁾、⁷⁾、¹⁰⁾ が、今回の我々の成績は 57 検体中 2 検体 (3.5%) で諸外国の汚染率よりかなり低い。これも製造場所によって著しく差のあることが指摘されており、また今回用いた検体が輸入品であるか国産品であるか表示の明確でないものもあったため検出率の違いについては不明である。

一方、*L. monocytogenes* の汚染菌量についてはスモークサーモンの 1 検体が 4.3cfu/g であったのが最高値でその他

のほとんどは0.3cfu/g以下であった。したがって、健康成人がこれらの汚染された食品を喫食したとしても、又これらの食品は大量に摂取するものではないだけにリステリア症を引き起こす可能性は低いと思われる。しかしながら、これらの食品は当然ハイリスクの人達も好んで食べる食品であるため注意が必要である。非加熱 ready to eat 食品における汚染実態のデータをさらに積み重ね、リスク評価を行う必要がある。さらに、*L. monocytogenes* は低温増殖菌であるため低温保蔵の期間中でも菌の増殖が起きることを考慮すべきである。マグロのたたきは長期保存は考えにくい、明太子やスモークサーモンではありうることから汚染頻度の高い食品における保存中の菌の動態については早急に解明する必要がある。

なを、魚介類およびその加工品から分離された *L. monocytogenes* の血清型は 1/2a と 4b が最も多く、ヒト臨床株由来と同じ傾向である。生食肉からは 1/2c が圧倒的に多いのとは大きな違いで汚染の由来が異なることを示唆している。一方、ヒト患者株と同じ血清型であることは魚介類加工品の汚染が肉類より危険性があることを示しているのかもしれない。

E. 結論

わが国で市販されている魚介類およびその加工品を対象に *Listeria* 属および *L. monocytogenes* の検出を行い下記の結論を得た。

1. 35 品目 394 検体から *Listeria* 属は 7 品目、*L. monocytogenes* は 6 品目が陽性であった。
2. *L. monocytogenes* が陽性であった ready to eat 食品は明太子(26.3%)、マグロのたたき(13.7%)、スジコ(8.7%)、加熱済みタコ(6.3%)、スモークサーモン(3.5%)であった。
3. *L. monocytogenes* の汚染菌量は 4.3cfu/g であったのが最高値でその他のほとんどは 0.3cfu/g 以下であった。
4. 分離された *L. monocytogenes* の血清型は 1/2a(42.3%)と 4b (34.6%) が最も多く 1/2c は少なかった(2.9%)。

参考文献

- 1) 小久保彌太郎、丸山務：新訂 食水系感染症と細菌性食中毒。中央法規出版、2000
- 2) Liv Marit Rorvik : *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. International Journal of Food Microbiology , 62(2000)183-

- 3) C-H. Ryu , S. Igimi , S. Inoue and S. Kumagai : The incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. International Journal of Food Microbiology, 16(1992) 157-160
- 4) 増田十茂子、岩谷美枝、三浦平吉、小久保彌太郎、丸山務：海産鮮魚介類における *Listeria* 属菌の汚染実態. 食品衛生学雑誌, Vol. 33, No. 6, (1992)599-602
- 5) Lasse Vigel Jorgensen, Hans Hans Henrik Huss : Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. International Journal of Food Microbiology, 42(1998)127-131
- 6) M. L. Cortesi, T. Sarli, A. Santoro, N. Murru, T. Pepe : Distribution and behavior of *Listeria monocytogenes* in three lots of naturally-contaminated vacuum-packed smoked salmon stored at 2 and 10 °C . International Journal of Food Microbiology, 37(1997)209-214
- 7) Ana Maria Cordano , Joselyne Rocourt : Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in chile. International Journal of Food Microbiology, 70(2001)175-178
- 8) Takashi IIDA , Masako KANZAKI , Akiko NAKAMA , Yataro KOKUBO , Tsutomu MARUYAMA and Choji KANEUCHI : Detection of *Listeria monocytogenes* in Humans, Animals and Foods . The Journal of Veterinary Medical Science . 60(12)1341-1343. 1998
- 9) Satoshi Inoue , Akiko Nakama , Yoshiteru Arai , Yataro Kokubo , Tsutomu Maruyama, Akinobu Saito, Tetsuya Yoshida, Michinori Terao, Shigeki Yamamoto, Susumu Kumagai : Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail food in Japan . International Journal of Food Microbiology, 59(2000)73-77
- 10) Ana Maria Cordano , Joselyne Rocourt : Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in chile. International Journal of Food Microbiology, 70(2001)175-178

表1.検体一覧

検体名	品目	検体数
鮮魚・刺身類(寿司ネタも含む)	17	129
マグロ		53
サーモン		11
トラウト		24
サンマ		3
アジ		4
イカ		23
甘エビ		1
その他※		10
貝類	4	20
アサリ		3
ハマグリ		2
赤貝		2
ホタテ		13
加工品	14	245
スモークサーモン		57
マグロのたたき		73
スジコ		23
明太子		19
タラコ		16
数の子		2
トビノコ		1
イカの塩辛		5
シラス(加熱)		5
エビ(加熱)		14
タコ(加熱)		16
コハダ(酢漬け)		4
もずく		5
ポイルホタテ		5
	35	394

※イシモチ、イトヨリ、コダイ、サバ、ニシン、メバル、カンパチ、アオヤギ、ハマチ、マダイ(各1検体)