

20020974

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 五十君 静信

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

平成15（2003）年3月

## 食品由来のリストeria菌の健康被害に関する研究班

平成14年度 研究組織

主任研究者

五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

分担研究者

山本 茂貴 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

牧野 壮一 帯広畜産大学畜産学部

本藤 良 日本獣医畜産大学獣医畜産学部

神保 勝彦 東京都立衛生研究所乳肉衛生研究科

協力研究者

丸山 務 麻布大学環境保健学部

仲真 晶子 東京都立衛生研究所乳肉衛生研究科

武士 甲一 北海道立衛生研究所食品科学部

岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

奥谷 晶子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

青山 顕司 雪印乳業食品衛生研究所

廣田 雅光 日本冷凍食品検査協会東京検査所

植田富貴子 日本獣医畜産大学獣医畜産学部

落合 由嗣 日本獣医畜産大学獣医畜産学部

小笠原邦敏 厚生労働省横浜検疫所輸入食品検査センター

山田 文也 埼玉県衛生研究所

黒木 俊郎 神奈川県衛生研究所細菌病理部

寺尾 通徳 新潟大学医学部

山下 和予 国立感染症研究所感染症情報センター

春日 文子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

佐藤和貴郎 神戸市立中央市民病院

天野富美夫 大阪薬科大学薬学部

山崎 学 東京農工大学大学院農学系研究科

浅井 美里 法政大学工学部大学院

事務および経理担当者

小野俊一 国立医薬品食品衛生研究所総務部

## 目 次

### I. 総括研究報告書

- 総括研究書概要版・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1  
食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究・・・・・・・・ 5  
五十君 静信

### II. 分担研究報告書

1. 日本国内におけるリステリア症発生状況のアクティブ・サーベランス・・ 11  
五十君静信、奥谷晶子
2. 日本国内の食品のリステリア菌汚染について・・・・・・・・ 25  
五十君静信、奥谷晶子
3. リステリアにおける病原株の指標となるマーカー遺伝子の検索・・・・・・・・ 45  
五十君静信、岡田由美子、廣田雅光
4. *Listeria monocytogenes* のパルスフィールド電気泳動による  
疫学的解析について・・・・・・・・ 53  
山本茂貴、青山顕司、丸山務
5. 分子疫学的手法の検討及び標準化・・・・・・・・ 93  
牧野壮一、武士甲一
6. *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎的研究(II)・・・・ 101  
本藤良、植田富貴子、落合由嗣、小笠原邦敏、山田文也
7. 魚介類加工品及び漬物の *Listeria* 属菌汚染実態調査・・・・・・・・ 127  
神保勝彦、仲真晶子

## 総括研究報告書概要版

研究費の名称=厚生労働科学研究費補助金

研究事業名=食品・化学物質安全総合研究事業

研究課題名=食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究

主任研究者名=五十君静信（国立医薬品食品衛生研究所）

分担研究者名=山本茂貴（国立医薬品食品衛生研究所）， 牧野壮一（帯広畜産大学）， 本藤良（日本獣医畜産大学）， 神保勝彦（東京都立衛生研究所）

**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、わが国におけるリステリア症の発生状況は十分に掌握されておらず、漠然と発生が少ないと考えられてきた。従って、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おらず、食品を介した感染症であるといった認識は希薄であった。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。一方、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り、わが国においても食品を介したリステリア症が発生している可能性を示唆した。そこで、本研究班は、わが国におけるリステリア症の実体を掌握するために、まず、アクティブサーベイランスを行い、国内でどの程度の患者が発生しているかを明らかにし、リステリアに関する情報収集と研究を行ったうえで、本症が食品を介した感染症であるかの検証を試みる。そして、今後リステリア症に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、本症の診断に関する問題点、本菌の検査検出法に関する問題点を示し、その解決法を探り、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。

**研究方法**=わ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。発生数の推定は、全国の病院へのアンケートによるアクティブサーベランスにより行った。すなわち、全国の100床以上の病床数をもつ基幹病院2258ヶ所の病院のリストを作成し、アンケート用紙を配布し、リステリア症をどの程度経験しているか、診療科と検査科にそれぞれ回答をお願いした。回答が得られた773病院のうち過去にリステリアを経験している病院については、菌株の分与を依頼すると共に、更なる臨床的な情報の提供をお願いした。これらの情報から、リステリアの発生数を集計し、回答の得られた標本空間の規模をその病床数を基に算出し、その逆数値を乗ずることにより、わが国における単年度あたりのリステリア症の発生件数を推定し、100万人あたりの発生頻度を算出した。食品のリステリア汚染状況は、国内の食品を対象とする本菌の汚染実態に関する論文を収集し整理したうえで、分離手法が明記されており、我々の設定した基準を満たし、科学的に信頼できると判定した34編の結果を基に、食品別に集計し検討を加えた。この結果から、既報の論文のデータでは不足と思われかつ、リステリアの感染が想定され、食品衛生上特に重要と考えたいくつかの生食用食品(ready-to-eat)については、研究班で市販食品を実際に購入し、汚染実態調査を行った。研究を通じて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。疫学マーカーの解析方法としては、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)、多型領域における点変異解析などの遺伝子レベルでの解析方法について検討した。リステリア症の診断法は、PCR法によるリステリア遺伝子の検出、および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。

**結果と考察**=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

毒事例の資料を研究班で検討したところ、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。しかし、この事例はリステリアが体内に入り感染を起こした事による症状であったかが議論となり、当時患者血清が採取されていなかったことから、リステリア症の確定には至らなかった。この事例で報告された臨床症状は、海外で発生した集団事例の臨床症状とほぼ一致しており、リステリア感染の初期症状と考えることは自然であると思われた。今後同様な事例が発生した場合に備え、臨床的な診断法の確立を行った。いずれにせよ、リステリア症の診断法を確立しておくことは重要で、今後国内で食品を介したリステリア症の集団事例が発生した場合、リステリア症であるか否かに関する判断は確信を持ってなされると思われる。研究班では、リステリア症の診断法として、リステリアの菌体成分特異的な抗体価を測定するELISA法と、血液から直接リステリア菌遺伝子を検出するPCR法を開発した。これらの方法を用いることにより、抗生物質治療が行われているため菌の分離が困難であるような本菌による重篤な脳髄膜炎や敗血症の診断に加え、集団発生事例で報告されている発熱などのいわゆる風邪の初期に類似する症状や急性胃腸炎を主徴とするリステリア感染初期の確定診断も期待される。アクティブサーベイランスにより、わが国の単年度あたりのリステリア症の発生件数は83件、100万人あたりの発生頻度は、0.65と推定された。一方、抗生物質投与のためリステリア菌の分離が困難であった事例において、我々の開発した新しい診断法の適用によりリステリア症とすべき事例が示されたことから、国内で発生しているリステリア症の実数は、今回の数字よりもさらに高いものと思われる。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のデータを集計し、検討を加えた。これにより、わが国において市販されているほとんどの食品について、その汚染状況の概要を知ることが出来た。この結果から肉製品での汚染率が高いことが確認された。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、カットされた肉や挽肉など手を加えられた肉での汚染率が高かった。市販生肉は、いずれの動物種の食

肉も汚染頻度は高いが、汚染菌数は低く、通常は加熱後喫食する事を考えると、感染のリスクはそれほど高くないと思われる。一方、汚染頻度は低いものの、生食用食品の一部でリステリアの汚染が報告されていたため、研究班は市販の生食用食品を購入し、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。生食用食肉から、*L. monocytogenes*は検出されなかった。鮮魚類と生食用鮮魚類合計35品目394検体についての汚染実態調査の結果では、一部の生食用食品で*L. monocytogenes*が分離された。おおむね菌数は低かったが、1検体はグラムあたり10の4乗とかなり高い菌数を示した。リステリアの検査法としては、PFGEによる疫学マーカーの解析方法、*iap*遺伝子領域内の多型領域のゲノムを解析する手法、菌株の血清型判別を、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、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。臨床分離株、食品分離株について、10種類の病原因子の保有状況を調べることにより、菌株の病原性の強さを推定可能である事を示した。最終年度には、動物を用いた感染モデルにより、これまで得られた病原性に関する知見を個体レベルで検証する予定である。

**結論**=アクティブサーベイランスにより、わが国の単年度あたりのリステリア症の発生件数は83件、100万人あたりの発生頻度は、0.65と推定された。文献調査と研究班の汚染実態調査により、国内で市販されているほとんどの食品について、リステリア菌の汚染状況の概要を知ることが出来た。肉製品を中心に高い汚染率が確認されたが、その汚染菌数は低かった。汚染率は低い、生食用食品(ready-to-eat)の一部にやや高い菌数の汚染が見られたことは注目される。リステリア症の診断法、検査法、病原性に関して検討を行い、標準的な方法や具体的な試験法の検討を行った。

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
（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 国立医薬品食品衛生研究所・室長  
分担研究者 山本 茂貴 国立医薬品食品衛生研究所・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

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、わが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、アクティブサーベランスにより、我が国におけるリステリア症の発生頻度を明かとし、わが国の市販食品におけるリステリアの汚染状況を整理し、本症が食品を介した感染症であるかの検討を行い、今後どのように対処して行くべきかの方向性を示すことを目指した。加えて、リステリア症の診断法の開発、病原性の検討とその試験法の確立およびリステリアの検査検出法の標準化を試みた。

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が求められ、研究班ではリステリア症の診断法として、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、およびPCR法によるリステリア遺伝子の検出法を検討した。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。



## 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、わが国におけるリステリア症の発生状況は十分に掌握されておらず、漠然と発生が少ないと考えられてきた。従って、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おらず、食品を介した感染症であるといった認識は希薄であった。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。一方、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り、わが国においても既に食品を介したリステリア症が発生している可能性を示唆した。そこで、本研究班は、わが国におけるリステリア症の実体を掌握するために、まず、アクティブサーベランスを行い、国内でどの程度の患者が発生しているかを明らかにし、リステリアに関する情報収集と研究を行ったうえで、本症が食品を介した感染症であるかの検証を試みる。今後リステリア症に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、本症の診断に関する問題点、本菌の検査検出法に関する問題点を示し、その解決法を探り、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

わ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。発生数の推定は、全国の病院へのアンケートによるアクティブサーベランスにより、行った。全国の100床以上の病床数をもつ基幹病院2258ヶ所の病院のリストを作成し、アンケート用紙を配布し、リステリア症をどの程度経験しているか、診療科と検査科にそれぞれ回答をお願いした。回答が得られた773病院のうち過去にリステリアを経験している病院については、菌株の分与を依頼すると共に、更なる臨床的な情報の提供をお願いした。これらの情報から、リステリアの発生数を集計し、回答の得られた標本空間の規模をその病床数を基に算出し、その逆数値を乗ずることにより、わが国における単年度あたりのリステリア症の発生件数を推定し、100万人あたりの発生頻度を推定した。

食品のリステリア汚染状況は、分離手法が明記されており、一定の基準を満たし、科学的に信頼できると判定した、国内の食品を対象とする本菌の汚染実態に関する34編の論文の結果を基に、食品別に集計し検討を加えた。この結果から、既報の論文のデータでは不足と思われるか、リステリアの感染が想定され、特に重要と考えたいくつかの生食用食品 (ready-to-eat) については、研究班で市販食品を実際に購入し、汚染実態調査を行った。鮮魚類と生食用鮮魚類合計35品目394検体、魚介類加工品121検体、漬物103検体について検討した。研究を通じて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。疫学マーカーの解析としては、臨床分

分離株、食品および環境分離株合計 147 株を用いて、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) について検討を行った。iap 遺伝子の多型領域における点突然変異解析など遺伝子レベルでの解析手法を用いて汚染食肉について疫学的な検討を行った。食品細菌自動検査装置「バクテクター」の開発とリステリア検査への応用を試みた。リステリア症の診断法としては、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、および PCR 法によるリステリア遺伝子の検出法を検討し、リステリア症患者およびコントロール血清、髄液等を用いその有効性を検討した。患者由来 98 株、食品環境由来株 101 株を用い、PCR 法で、病原性に関する 10 種の遺伝子の保有状況を調べ、株ごとの病原性の強さを検討した。

(倫理面への配慮)

個々の患者情報の取り扱いに関しては、国立感染症研究所の医学研究倫理委員会の審査を受けたうえで慎重に行い、同研究所および国立医薬品食品衛生研究所において医学研究倫理規定に基づき管理を行った。

### C. 研究結果

アクティブサーベランスにより、わが国の単年度あたりのリステリア症の発生件数は 83 件、100 万人あたりの発生頻度は、0.65 と推定された。文献調査と研究班の汚染実態調査により、国内で市販されているほとんどの食品について、リステリア菌の汚染状況の概要を知ることが出来た。研究班は市販の生食用食品を購入し、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。生

食用食肉から、*L. monocytogenes* は検出されなかった。鮮魚類と生食用鮮魚類合計 35 品目 394 検体についての汚染実態調査の結果では、一部の生食用食品で *L. monocytogenes* が分離された。おおむね菌数は低かったが、1 検体はグラムあたり 10 の 4 乗とかなり高い菌数を示した。リステリアの検査法としては、PFGE による疫学マーカーの解析方法、iap 遺伝子領域内の多型領域のゲノムを解析する手法、菌株の血清型判別を、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、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。臨床分離株、食品分離株について、10 種類の病原因子の保有状況を調べることにより、菌株の病原性の強さを推定可能である事を示した。なお、詳しいデータについては、分担報告書を参照。

### D. 考察

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の資料を研究班で検討したところ、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。しかし、この事例はリステリアが体内に入り感染を起こした事による症状であったかが議論となり、当時患者血清が採取されていなかったことから、リステリア症の確定には至らなかった。この事例で報告された臨床症状は、海外で集団発生した事例の臨床症状に類似していることを考えると、リステリア感染の初期症状に間違いないと考えられる。今後同

様な事例が発生した場合に備え、臨床的な診断法の確立を行った。いずれにせよ、リステリアの診断法が確立されるなら、今後国内で食品を介したリステリア症の集団事例が発生した場合、リステリア症であるか否かに関する判断は確信を持ってなされると思われる。研究班では、リステリア症の診断法として、リステリアの菌体成分特異的な抗体を測定する ELISA 法と、血液から直接リステリア菌遺伝子を検出する PCR 法を検討した。これらの方法を用いることにより、抗生物質治療が行われているため菌の分離が困難であるような本菌による重篤な脳髄膜炎や敗血症の診断に加え、発熱と急性胃腸炎を主徴とするリステリア初期の集団発生事例の確定診断も確実にこなることが期待される。

アクティブサーベイランスにより、わが国の単年度あたりのリステリア症の発生件数は 83 件、100 万人あたりの発生頻度は、0.65 と推定された。一方、抗生物質投与のためリステリア菌の分離が困難であった事例において、我々の開発した新しい診断法の適用によりリステリア症とすべき事例が示されたことから、国内で発生しているリステリア症の実数は、さらに高いものと考えられる。

国内における市販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のデータを集計し、検討を加えた。さらに、データの少なかった生鮮魚介類と漬物について汚染実態調査を行い、その実態を明らかにした。これにより、わが国において市販されているほとんどの食品について、その汚染状況の概要を知ることが出来た。これらの結果から肉製品での汚染率が高いことが確認された。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、カットされた肉や挽肉など手を加えられた肉での汚染率が高かった。市販生肉は、いずれの動物種の食肉も汚染頻度は高いが、汚染菌数は低く、通常加熱後喫食する事を考えると、感染のリスクはそれほど高くないと思われる。一方、汚染頻度は低いものの、生食用食品の一部でリステリアの汚染率が数%であったため、研究班は市販食品を購入し、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。生食用食肉から、*L. monocytogenes* は検出されなかった。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、一部の食品で *L. monocytogenes* が分離された。おおむね菌数は低かったが、1 検体ではあるが、グラムあたり 10 の 4 乗とかなり高い菌数を示した。

リステリアの検査法としては、まず PFGE による疫学マーカーの解析を行った。血清型によりその傾向が異なることを明らかにした。また、*iap* 遺伝子領域内の多型領域のゲノムを解析する手法を用いてヒト・リステリア症の感染に地域常在性の汚染食肉の関与が示唆された。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、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。

臨床分離株、食品分離株について、10 種類の病原因子の保有状況を調べたところ、菌株により異なった遺伝子の組み合わせを保有していた。この方法を用いれば、それぞれの菌株の病原性の強さをある程度推定できる可能性が示された。この点については、リステリア菌の

病原性を判定する動物モデルの開発を含め、最終年度に検討の予定である。

#### E. 結論

アクティブサーベランスにより、わが国の単年度あたりのリステリア症の発生件数は83件、100万人あたりの発生頻度は、0.65と推定された。文献調査と研究班の汚染実態調査により、国内で市販されているほとんどの食品について、リステリア菌の汚染状況の概要を知ることが出来た。肉製品を中心に高い汚染率が確認されたが、その汚染菌数は低かった。汚染率は低い、生食用食品(ready-to-eat)の一部にや高い菌数の汚染が見られたことは注目される。リステリア症の診断法、検査法、病原性に関して検討を行い、標準的な方法や具体的な試験法の検討を行った。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Y. Okada, S-I. Makino, T. Tobe, N. Okada and S. Yamazaki. (2002) Cloning of rel from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene. Appl. Environ. Microbiol. vol. 68, 1541-1547.
2. Ueda F, Sugamata M, Aota M, Mochizuki M, Tamada F and Hondo R. (2002) Swift and definite serotyping for isolated *Listeria monocytogenes* strains. Microbiologica 25:165-171.
3. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S and Igimi S. Active surveillance of *Listeria monocytogenes* infection in Japan. Submitted.
4. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S and Igimi S. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. Submitted.
5. Ueda F, Anahara R, Yamada F, Mochizuki M, Ochiai Y and Hondo R. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* contamination in marketed Japanese meat. Submitted.
6. Yamada F, Ogasawara K, Mochizuki M, Ochiai Y, Ueda F, Sata T and Hondo R. Evaluation of the assay for cell invasion of *Listeria monocytogenes* using the cell lines of Caco-2 and vero cells. Submitted.
7. Ueda F, Sugamata M, Aota M, Yamada F, Ogasawara K, Mochizuki M, Ochiai Y and Hondo R. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes*, serovar 4b: Relation among the strains isolated from a patient and marketed Japanese meat. Submitted.
8. Ueda F, Yugami K, Yamada F, Ogasawara K, Mochizuki M, Ochiai Y and Hondo R. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes*, serovar 1/2a: Relation among the strains isolated from a patient and marketed Japanese meat.
9. 笹川伸之、梅津淳一、武士甲一、牧野壮一。(2002) 食品細菌の自動検査装置「バクテクター」の開発、食品工業誌. 45
10. 仲真晶子。(2003) 食品の食中毒検査法リステリアモノサイトゲネス、日本防菌防黴学会誌. 31:159-168
11. 五十君静信。(2003) 食品由来のリステリ

ア菌による健康被害. 食品衛生研究. 53:19-23

#### 学会発表

1. 浅井美里、佐藤英一、山崎学、山本茂貴、五十君静信. Listeriolysin O 関連遺伝子を発現させた組換え乳酸菌によるマウスへの免疫. 第75回日本細菌学会総会. 2002年4月5日
2. 五十君静信、近藤美佳、浅井美里、村上和雄、佐藤英一、山崎学、天野富美夫、山本茂貴. 乳酸菌の菌体表層に発現したリステリオリジンOのJA-4細胞の食作用に与える影響. 第6回腸内細菌学会. 2002年5月31日
3. 大石金成、渡辺正明、斉藤美佳子、松岡英明、五十君静信. 蛍光グルコース・蛍光アミノ酸による食中毒菌の検出. 防菌防黴学会. 2002年5月
4. 五十君静信、近藤美佳、浅井美里、村上和雄、佐藤英一、山崎学、天野富美夫、山本茂貴. 乳酸菌の菌体表層に発現したリステリオリジンOのJA-4細胞の食作用に与える影響. 第6回腸内細菌学会. 2002年5月31日
5. 山田文也、植田富貴子、望月真理子、生嶋昌子、河橋幸恵、小笠原邦敏、本藤良. *Listeria monocytogenes* の非食食性細胞侵入能に関する基礎研究. 第76回日本感染症学会総会.
6. 小笠原邦敏、植田富貴子、落合由嗣、望月真理子、山田文也、青木秀夫、南俊作、本藤良. 輸入食肉由来 *Listeria monocytogenes* 株における iap 遺伝子のゲノム構造の解析. 第134回日本獣医学会. 2002. 9. 19
7. 中尾栄男、今泉登史宏、藤本浩、三浦夕美子、綾部光芳、庄司紘史、本藤良、植田富貴子. リステリア脳幹脳炎と分離株のゲノム解析. 第7回日本神経感染症学会. 2002. 10. 4
8. Igimi S, Okutani A, Okada Y, Yamasaki M, Nakama A, and Yamamoto S. Results of nationwide survey on listeriosis and the incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. UJNR meeting. 2002. 11. 12. Emeryville, CA, USA
9. 五十君静信. 食品由来のリステリア菌による健康被害. シンポジウム-食品の安全性確保を考える-. 2003年1月31日. 広島. 2003年2月19日. 東京
10. 奥谷晶子、岡田由美子、山本茂貴、五十君静信. 日本国内におけるリステリア症発生状況のアクティブ・サーベイランス. 第76回日本細菌学会総会. 2003年4月2日
11. 岡田由美子、牧野壮一、五十君静信、山本茂貴. 高食塩濃度下における *Listeria* の遺伝子発現について. ワークショップ遺伝子の構造と発現. 第76回日本細菌学会総会. 2003年4月2日

#### 書籍等

1. 仲真晶子: 図説食品汚染病原微生物, 図説食品汚染病原微生物, 丸山 務・熊谷進(監訳), 16. リステリアモノサイトゲネス, 327-354, 廣川書店, 2003 (1).

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）  
（分担研究報告書）

食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究

日本国内におけるリステリア症発生状況のアクティブ・サーベイランス

主任研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 室長

協力研究者 奥谷晶子 国立医薬品食品衛生研究所 協力研究員

研究要旨

重篤な髄膜炎等の感染症を引き起こす *Listeria monocytogenes* (リステリア)は欧米では食品を介した感染症として認識されている。日本国内においてもこれまでに広範囲の食品でリステリアによる汚染が報告されているが、国内のリステリア症年間発症患者数についての詳細は不明である。今回、全国の病床数 100 床以上、救急告示病院 2258 病院の診療科および検査科に対して、リステリア検出・分離あるいは診断経験に関するアンケート調査によるサーベイランスを行った。アンケート返答施設数は 773、回収率は 34%であった。うちリステリア検出・分離あるいは診断経験ありと答えた施設数は検査科・診療科あわせてのべ 194 施設であった。診療科のデータによると、1980 年代の単年度あたり患者数は 6 件、1990 年代前半では同 8 件、1995 年以降は同 13 件であった。検査科では診療科よりも分離報告数は多かったが、傾向は同様であった。症例としては髄膜炎と敗血症が多数を占めた。過去の症例ほどカルテの照合が困難なことや選択培地の改良に伴い確定診断される患者数が増加することが考えられる。そのため、より信頼性の高いと思われる 1995 年以降の単年度あたり患者数から病床数を基に年間発症患者数を推定したところ、年間発症数は 83 件、人口 100 万人あたりの発症率は 0.65 となった。また、個々の症例からの検討によると、乳幼児と高齢者での発生が多かった。今回の結果から日本国内におけるリステリア症推定年間患者数は、欧米における発症患者数（フランス 242 件(1997 年発生数)、アメリカ 2518 件(1996-1997 の平均発生数)）と比較すると少ないが、国内でも発症がみられ、本症の発症と広範囲な食品汚染との相関に関する考察が必要と思われた。

A. 研究目的

*Listeria monocytogenes*(*L. monocytogenes*)を起因菌とするリステリア症の発生数は少ないものの、症状の重篤さ、およびその致死率の高さ(20-25%)から公衆衛生上重要な疾患であ

る。欧米各国では、*L. monocytogenes* に汚染された市販食品の摂取によるリステリア症集団発生例が数多く報告されている。そのため欧米ではリステリア症は食品媒介性疾患とされ、HACCP などの行政措置もその認識が前提とな

っている。日本においても、発生したリステリア症と *L. monocytogenes* により汚染された食品との関連を調査する必要がある。しかしながら、日本ではこれまでリステリア症の集団発生の報告はなく、リステリア症は感染症法の 4 類定点報告疾患である細菌性髄膜炎に含まれていて全数把握感染症ではないために国内のリステリア症患者数についての詳細は不明である。そこで、今回我々は、アクティブ・サーベイランスを行い、国内のリステリア症発生数を調査した。

## B. 研究方法

日本国内の病床数 100 床以上かつ救急告示病院である 2258 病院を対象にアンケート用紙を送付し、診療科および検査科においてリステリア症の診断経験あるいは検体等からのリステリア菌分離経験の有無を尋ねた。さらに、回答のあった病院中、1995 年以降にリステリア症の診断経験をもつ診療科を対象に追加アンケートを行い、日本国内で発生したリステリア症例についての詳細な解析を行った。

なお、昨年 の 病院リストには 2257 病院が掲載されているが、

北海道社会保険病院

〒062-8618

北海道札幌市豊平区中の島 1 条 8-3-18

に追加送付したため、送付数合計は 2258 病院となった。

(倫理面への配慮)

個々の患者情報の取り扱いに関しては、国立感染症研究所および国立医薬品食品衛生研究所において医学研究倫理規定に基づき管理した。

## C. 研究結果

アンケートでは、診療科における細菌性髄膜炎の患者数は、1980 年以前では約 100 件であったが、1981 年-1990 年、1991 年-1995 年で約 400 件、1995 年以降は約 900 件の報告があった (Table 1)。リステリア菌感染患者報告数は、1980 年以前 4 件であったが、1981 年-1990 年 62 件 (単年度あたり 6 件)、1991 年-1995 年 42 件 (同 8 件)、1995 年以降では 95 件 (同 13 件) の報告があった (Table 2)。検査科から報告された分離件数は診療科の患者数よりも高めであったが、件数の増加傾向は診療科と同様であった (Table 3)。症例としては髄膜炎と敗血症が多数を占め、流産や乳幼児感染の報告数は少なかった。

最も現状の値を反映していると思われる 1995 年以降の数値をもとに日本におけるリステリア症の推定発生数と発症率を全国の全病床数をもとに計算したところ、一年間の推定発生数は 83 件、人口 100 万人あたりの発症率は 0.65 となった (Table 4)。

今回のアンケートで指摘された問題点として、診療科からは、届け出基準に関するもの、起因菌の検出同定に関するもの、および臨床診断の決定に関するものが挙げられた。一方、検査科からは、他菌との鑑別が困難、同定まで時間がかかる、検体の状態 (保存状態や検体量など)、発生が稀で同定に熟練を要すなどといった点が挙げられた。髄膜炎をすでに発症している患者には抗生剤が投与されていることも多いため、菌が培養できず病原体の特定が困難であったという報告が診療科と検査科双方から寄せられた (Table 5 および Table 6)。

1995年以降に発生がみられたと報告のあった診療科を対象に行った個々の症例のアンケート結果によると、患者は乳幼児および小児と60才以上の高齢者に多く見られた(Graph 1)。臨床症状は髄膜炎(42例中25例)および敗血症(同中14例)が多数を占めた。また、死亡例9例は全て60才以上の高齢者であった(16例中)。死亡例のうち7例は既往症があった。

#### D. 考察

細菌性髄膜炎患者の発生数は概算値での記入も含まれており、大まかな数値で捉えたものであるため、数値についての詳細な分析は困難であるが、近年やや増加しているように思われる。

一方、リステリア菌感染患者報告数は、1980年以前4件であったが、1981年-1990年62件(単年度あたり6件)、1991年-1995年42件(同8件)、1995年以降では93件(2002年まで同13件)の報告があった。今回のアンケートでは1990年以降に開設した施設が含まれていること、過去の症例のカルテ照合が難しいといった報告があること、また、選択培地の改良により病原体の検出・同定技術が向上すると確定診断される患者数が増加することなどの要因を考慮すると、数値をそのまま評価することは難しいが、リステリア症は近年増加傾向にあるように思われる。1995年以降の報告数はそれ以前のものと比較して実際のリステリア菌感染患者数により近づいているものと考えられる。検査科から報告された分離件数は診療科の患者数よりも高めであったが、件数の増加傾向は診療科と同様であった。

国内のリステリア症発生報告数は年間83件、

人口100万人あたりの発症率は0.65と算出されたが、この値は欧米での発生患者数[アメリカ2518件(推定)、4.8件/100万人(1997年: Mead *et al.*, 1999他より)、フランス242件(実数)、5.4件/100万人(1997年: Goulet *et al.*, 2001より)]を下回る数値であった。発生数は低頻度ではあるものの、今後の課題として、国内における本症の発症と広範囲な食品汚染との相関に関する考察を可能とする情報網の整備等が必要と思われる。

個々の症例に関する追加アンケートの結果、リステリア症のハイリスク群である乳幼児、高齢者および免疫不全状態の患者(既往症を持つ患者)での発生が多く認められた。死亡例は既往症を持つ60才以上の高齢者に高頻度でみられたことから、これらハイリスク群のリステリア症発生を予防することは重要な課題と思われる。

検査科、診療科双方から挙げられた問題点や疑問点から、検査科、診療科共にリステリア症を迅速・正確に特定可能な手法が求められていると思われた。そのためには、迅速な診断が可能な検査法として血液や髄液サンプルからのdirect PCRによる病原体DNAの検出やELISAを用いた病原体特異的抗体価の測定法といった方法を臨床の現場において利用可能にすることが重要であると思われる。

#### E. 結論

日本国内におけるリステリア症発生報告数、推定患者数および人口100万人あたりの発症率は欧米と比較して少なかったものの、症状が重篤化しやすい乳幼児や高齢者の発生が多いことから、発生を予防することが重要であると



思われる。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

1. Akiko Okutani, Yumiko Okada, Shigeki Yamamoto, and Shizunobu Igimi. Active surveillance of *Listeria monocytogenes* infection in Japan. Submitted.
2. Akiko Okutani, Yumiko Okada, Shigeki Yamamoto, Shizunobu Igimi. Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. Submitted.
3. Takahashi T, Yoshida Y, Hatano S, Sugita-Konishi Y, Igimi S, Yajima M, Kojima T, Kanno T, Yonekubo A, Yajima T, and Kuwata T. (2002) Reactivity of secretory IgA antibodies in breast milk from 107 Japanese mothers to 20 environmental antigens. *Biology of the Neonate*. 82:238-242.
4. 五十君静信. (2003) 食品由来のリステリア菌による健康被害. 食品衛生研究 in press.

##### 学会発表

1. 奥谷晶子、岡田由美子、山本茂貴、五十君静信. 日本国内におけるリステリア症発生状況のアクティブ・サーベイランス. 第76回日本細菌学会 2003年4月 熊本
2. 大石金成、渡辺正明、斉藤美佳子、松岡英明、五十君静信. 蛍光グルコース・蛍光アミノ酸による食中毒菌の検出. 防菌防黴学会. 2002年5月.
3. 五十君静信、近藤美佳、浅井美里、村上和雄、佐藤英一、山崎学、天野富美夫、山本

茂貴. 乳酸菌の菌体表層に発現したリステリオリジンOの JA-4 細胞の食作用に与える影響. 第6回腸内細菌学会. 2002年5月31日東京.

Table 1 細菌性髄膜炎患者数（他の細菌を含む）累計  
診療科 回答数：89施設

1980年代以前	1981-1990年	1991-1995年	1995年以降
100	402	415	899

Table 2. リステリア菌感染患者報告件数累計 診療科 回答数：89施設

	1980年代以前	1981-1990年	1991-1995年	1995年以降
脳炎・髄膜炎	3	36	19	46
敗血症	1	23	19	37
流産・乳幼児感染	0	3	3	3
その他	0	0	2	9
	単年度あたり の件数	6	8	13

その他の病型：

中耳炎、妊婦感染、膿胸、腹膜炎

Table 3 リステリア菌検出、分離経験を持つ検査科 回答数：177 施設  
 リステリア菌検出あるいは分離件数累計

	1980 年代以前	1981-1990 年	1991-1995 年	1995 年以降
髄液	31	63	47	71
血液	20	55	74	116
その他	3	23	30	42
	単年度あたり の件数	14	30	32

その他の検体：

胆汁、腎移植関連検体、便、膣分布物、膿、胸水、咽頭粘液、胃液、羊水、動脈瘤血栓、  
 喀痰、腹水、尿、耳漏、臍帯、卵膜、胎盤、創部ガーゼ、気管チューブ先

Table 4 日本のリステリア症年間および推定発生数および発症率

1995 年以降の発症報告数	95
単年度あたり発症数	13
年間推定発症数（病床数より推定）	83
リステリア症発症率（100 万人あたり）	0.65

Table 5 検査科における髄膜炎での病原体鑑別における問題点

他菌との鑑別：

検体採取時のコンタミとの鑑別が困難なときがある（採取状態、保存、搬送の経過が把握できないので）（8件）

同定キットを使用した場合、得られた同定菌名の信頼性（7件）

細菌性かウイルス性かの鑑別（6件）

グラム染色が困難（4件）

B群連鎖球菌と集落性状がよく似ているため鑑別が必要（3件）

分離培養における培地の選択と培養条件と同定精度（2件）

同定までの時間：

起因菌の同定および感受性検査の結果報告まで時間がかかりすぎる（13件）

迅速、容易、安価なグラム陽性桿菌用鑑別同定キットの開発が望まれる（4件）

細菌検査室の週休2日制などの休日検査体制（2件）

検体：

検体採取後の保存方法(病棟などで室温に長く置かれる)（7件）

髄液の検体量が少ない（5件）

髄膜炎疑いの髄液検体は既に抗生剤が投与されていることが多く、起炎菌の分離が難しい（5件）

発生が稀：

症例数が少なく、日常目にすることの少ない菌の同定に熟練を要する（10件）

増菌するほど検体を採取できないため塗抹や免疫学的検出が重要と思われるが、検体数が少ないのでPCRや免疫学的検出のキットを購入する余裕がない（7件）