

Apa I グループ4

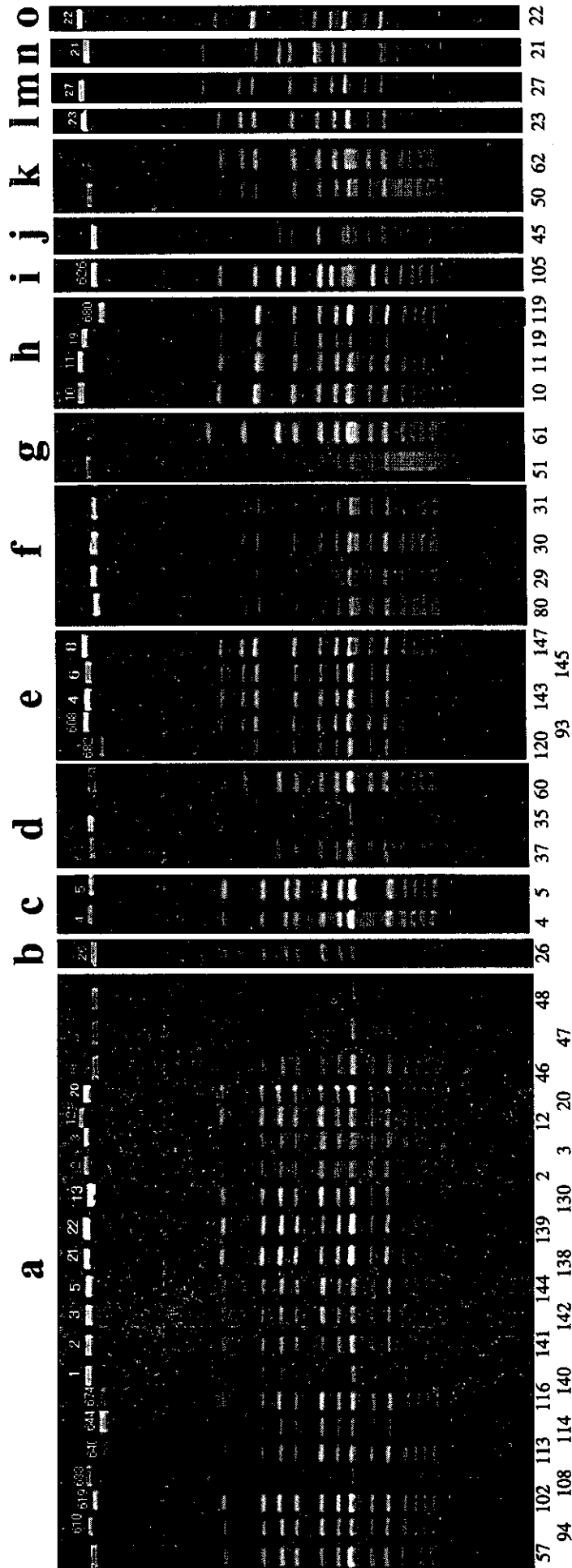


図4-3 Apa I切断によるPFGEパターンของกลุ่ม分け

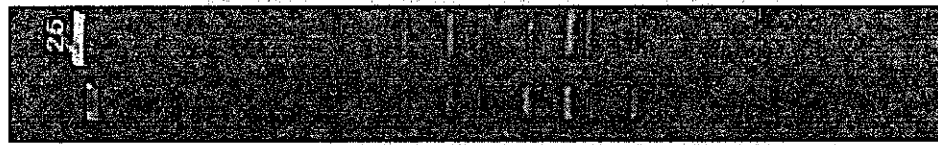
- ・ 画像下の数値は表1の菌株No.と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

Apa I グループ5

Apa I グループ6

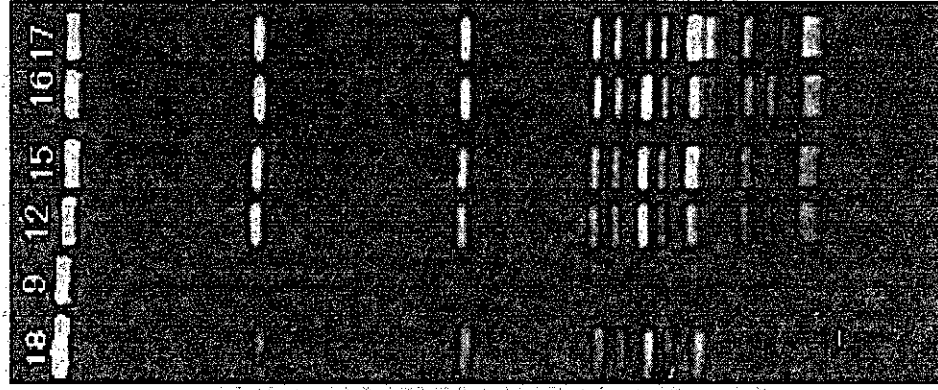
Apa I グループ7

a



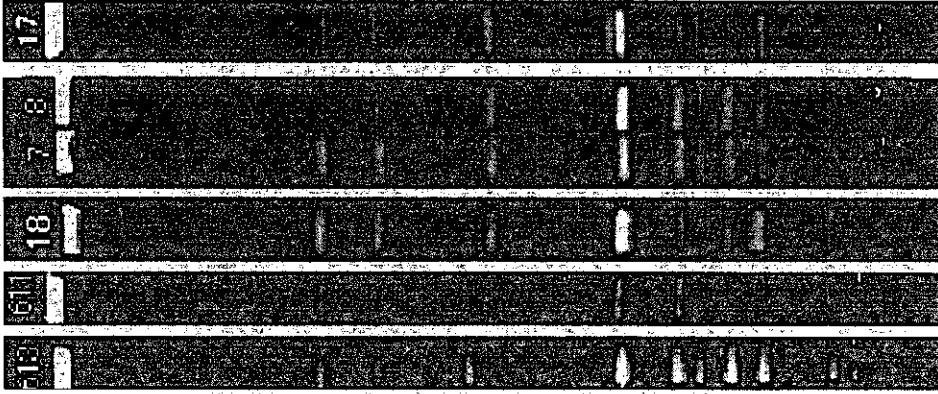
41 25

a



18 126 129 132 133 134

a



97 95 135 7 8 17

図4-4 Apa I切断によるPFGEパターン分け

- ・ 画像下の数値は表1の菌株No. と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

Apa I グループ8

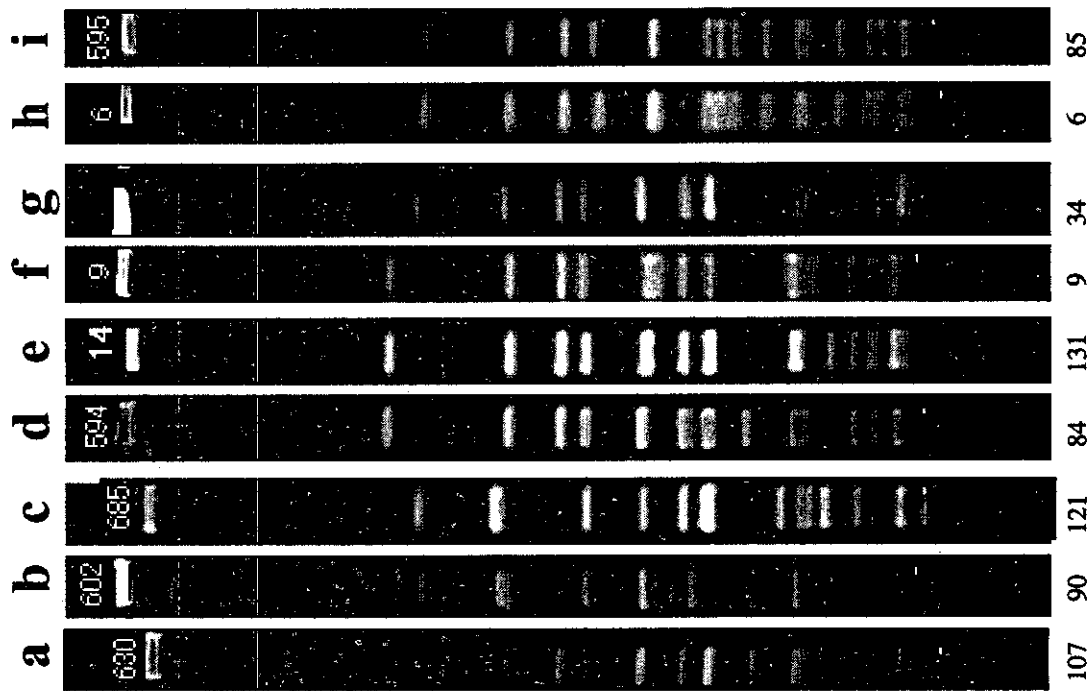


図4-5 Apa I切断によるPFGEパターンによるグループ分け

- ・ 画像下の数値は表1の菌株No.と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

Apa I グループ9

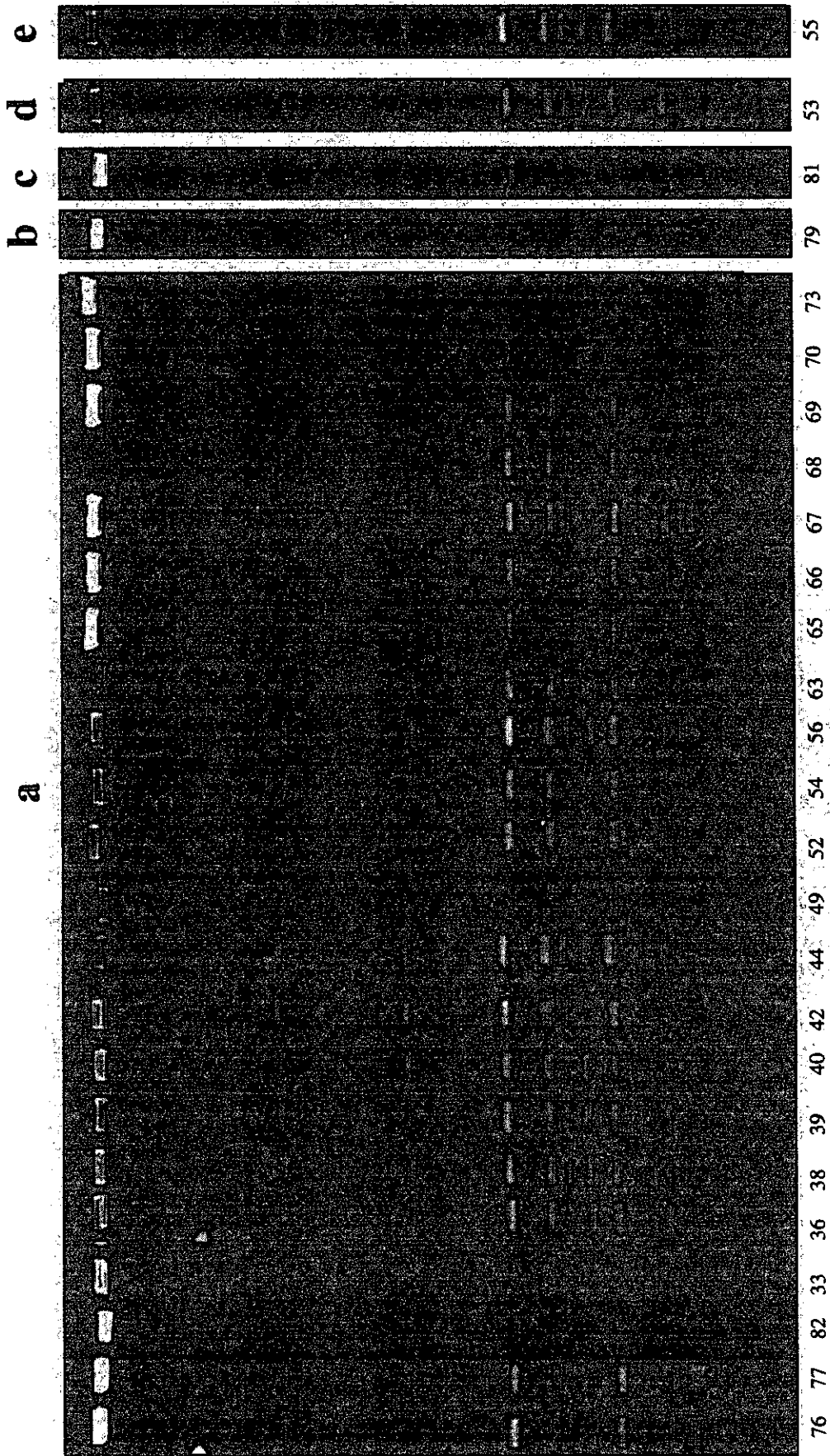
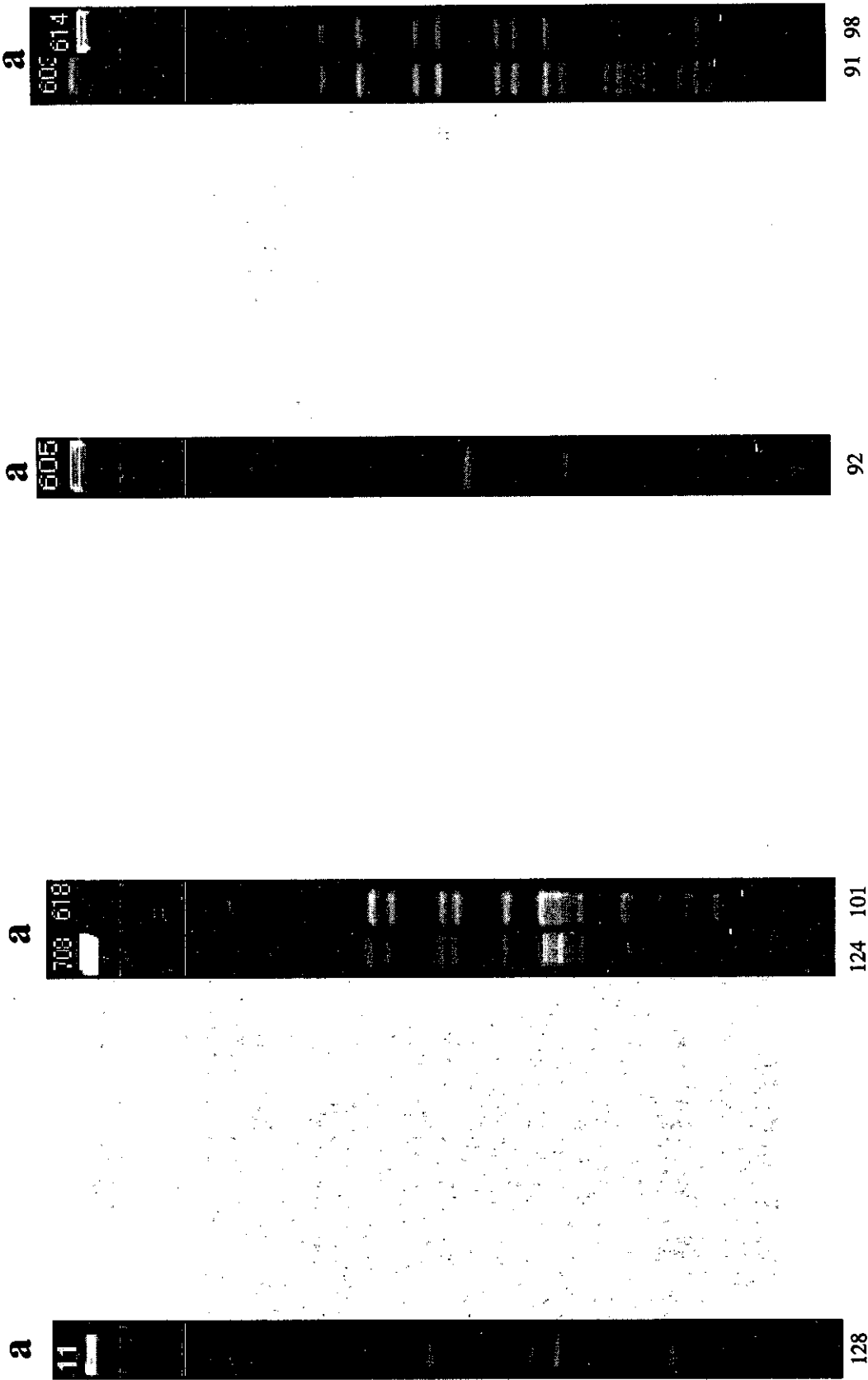


図4-6 Apa I切断によるPFGEパターンによるグループ分け

- ・ 画像下の数値は表1の菌株No.と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

Apal グループ10 Apal グループ11 Apal グループ12 Apal グループ13



128

124 101

92

91 98

図4-7 Apal I切断によるPFGEパターンの中のグループ分け

- ・ 画像下の数値は表1の菌株No.と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

Asc I グループ1

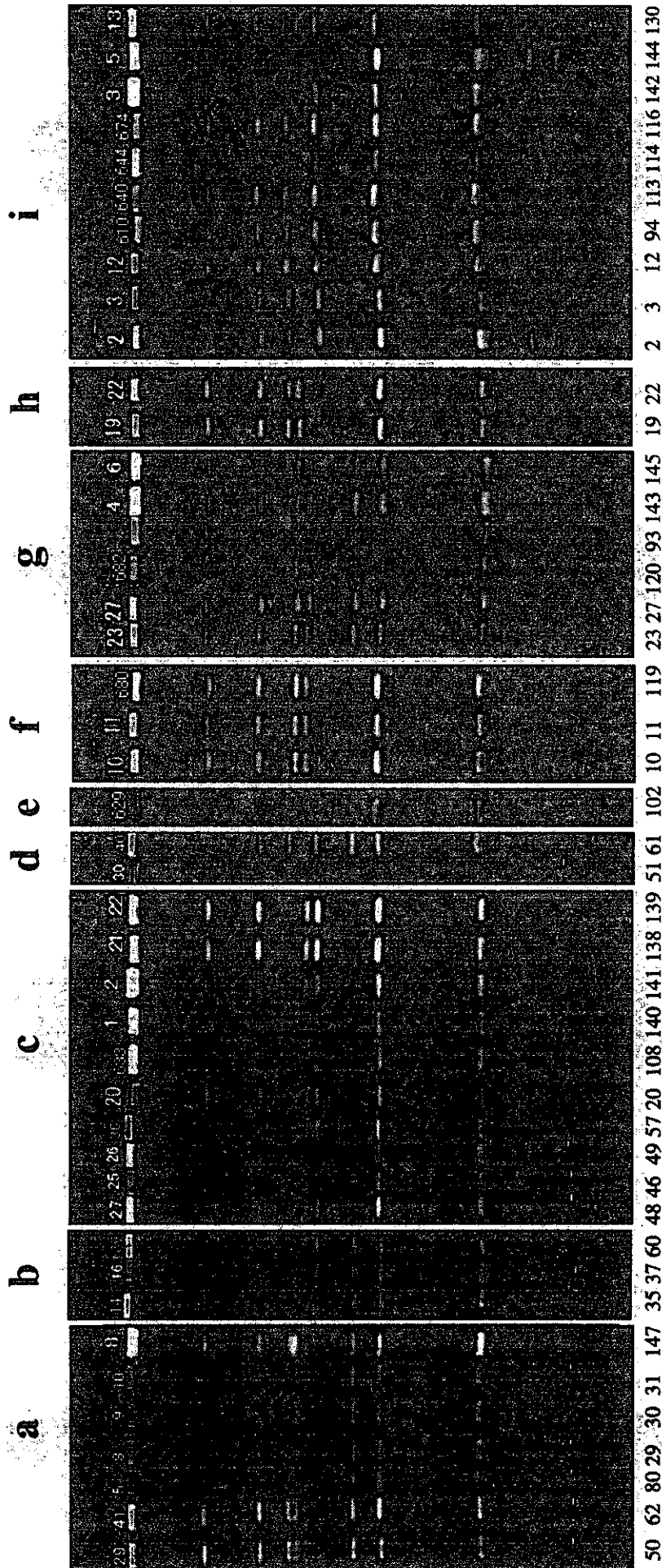
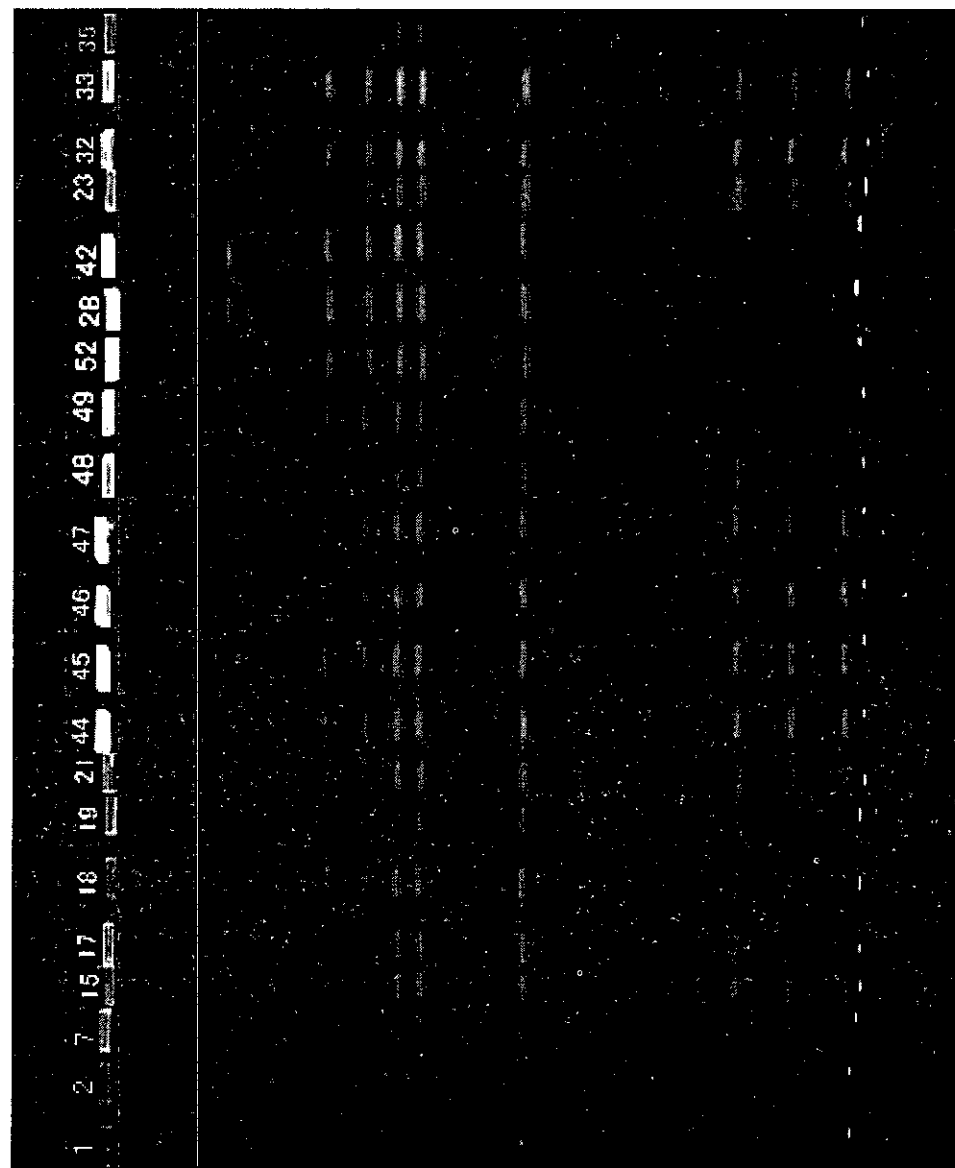


図5-1 Asc I切断によるPFGEパターンของกลุ่ม分け

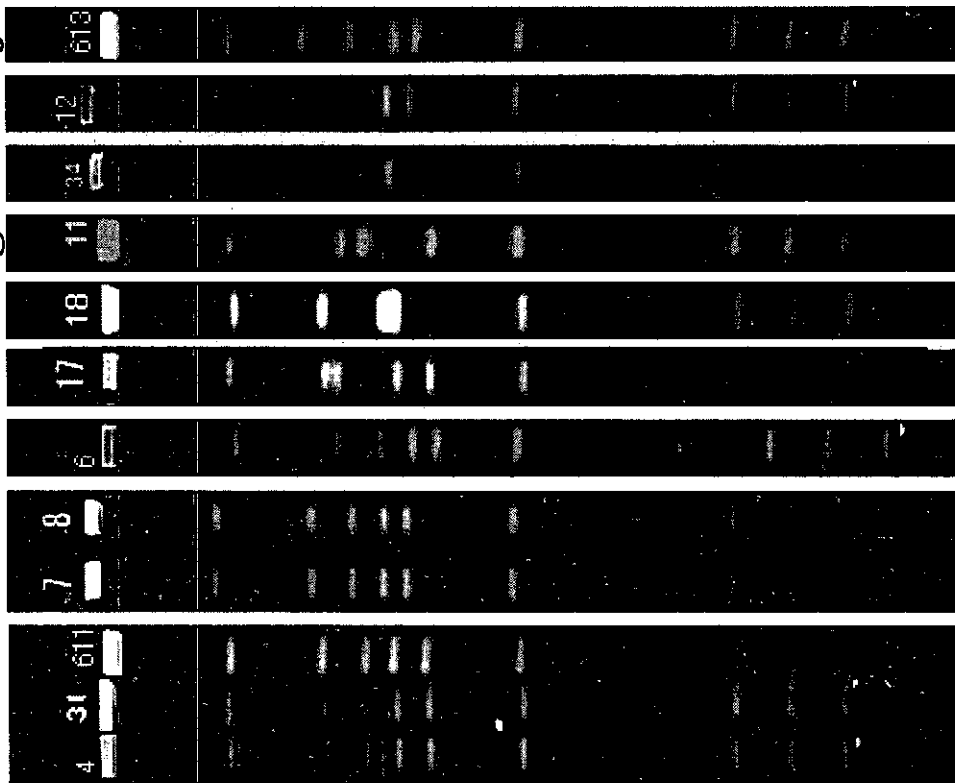
- ・ 画像下の数値は表1の菌株No. と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

Asc I グループ2

a



b c d e f g h i j



76 77 82 36 38 39 40 42 65 66 67 68 69 70 73 49 63 44 53 54 56 79 52 95 7 8 81 17 135 128 55 33 97

図5-2 Asc I切断によるPFGEパターンของกลุ่ม分け

- ・ 画像下の数値は表1の菌株No.と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

Asc I グループ3

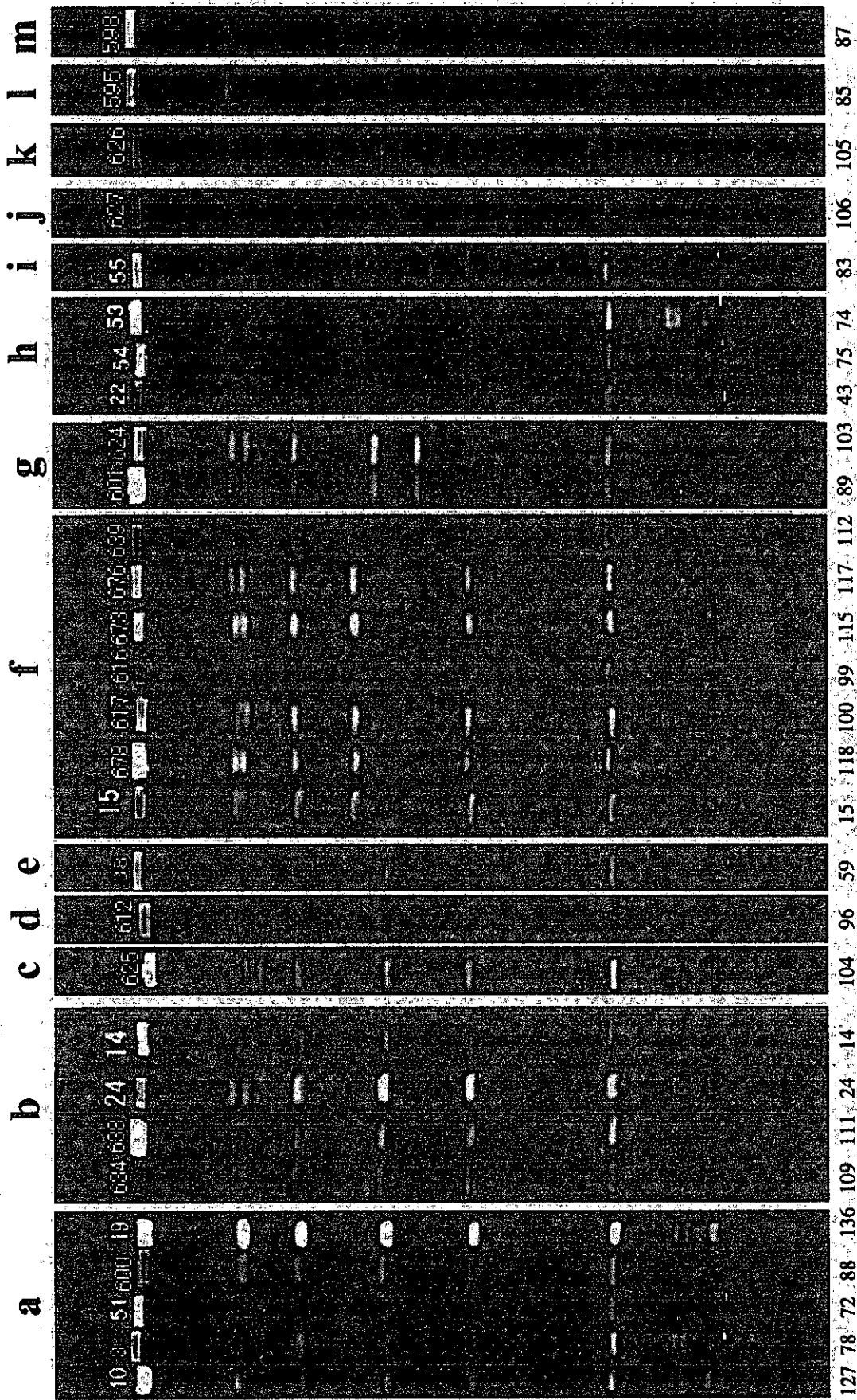


図5-3 Asc I切断によるPFGEパターンによるグループ分け

- ・ 画像下の数値は表1の菌株No.と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

Asc I グループ4

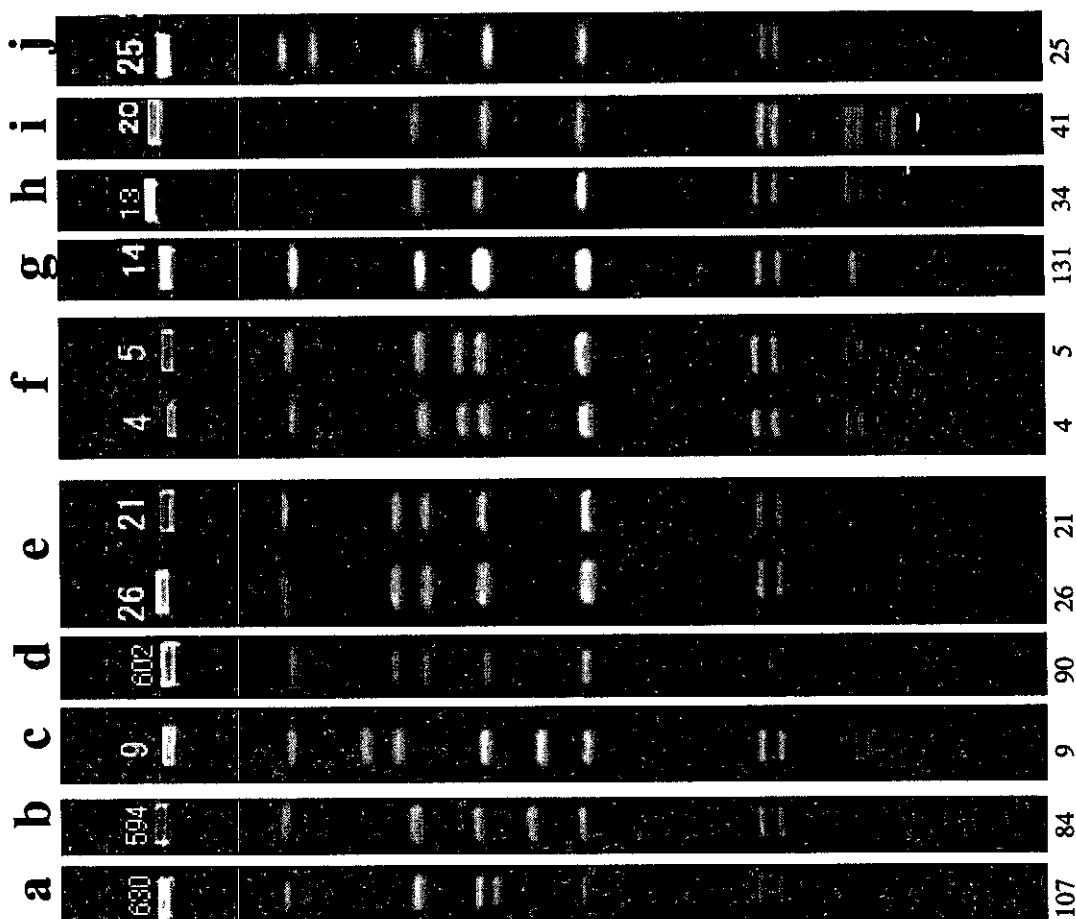


図5-4 Asc I切断によるPFGEパターンによるグループ分け

- ・ 画像下の数値は表1の菌株No.と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

Asc I グループ5

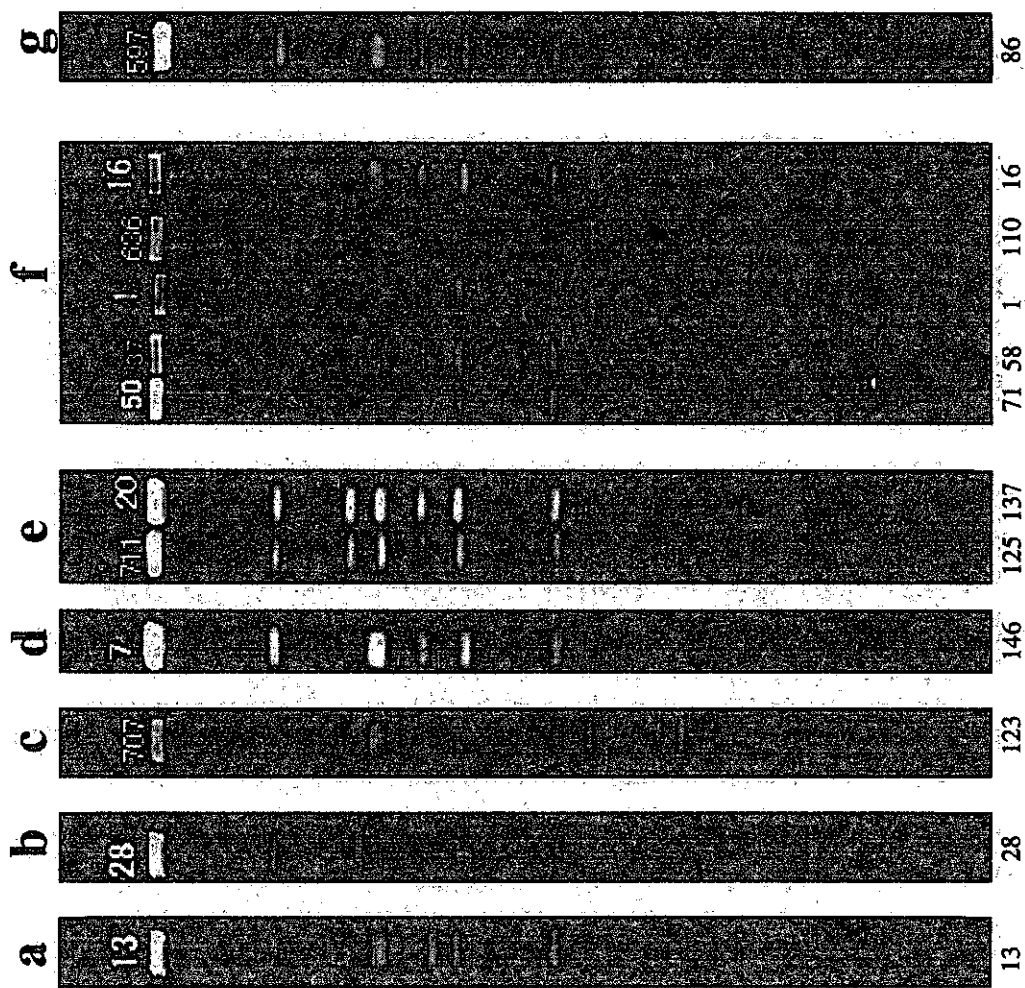


図5-5 Asc I切断によるPFGEパターンの中のグループ分け

- ・ 画像下の数値は表1の菌株No.と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

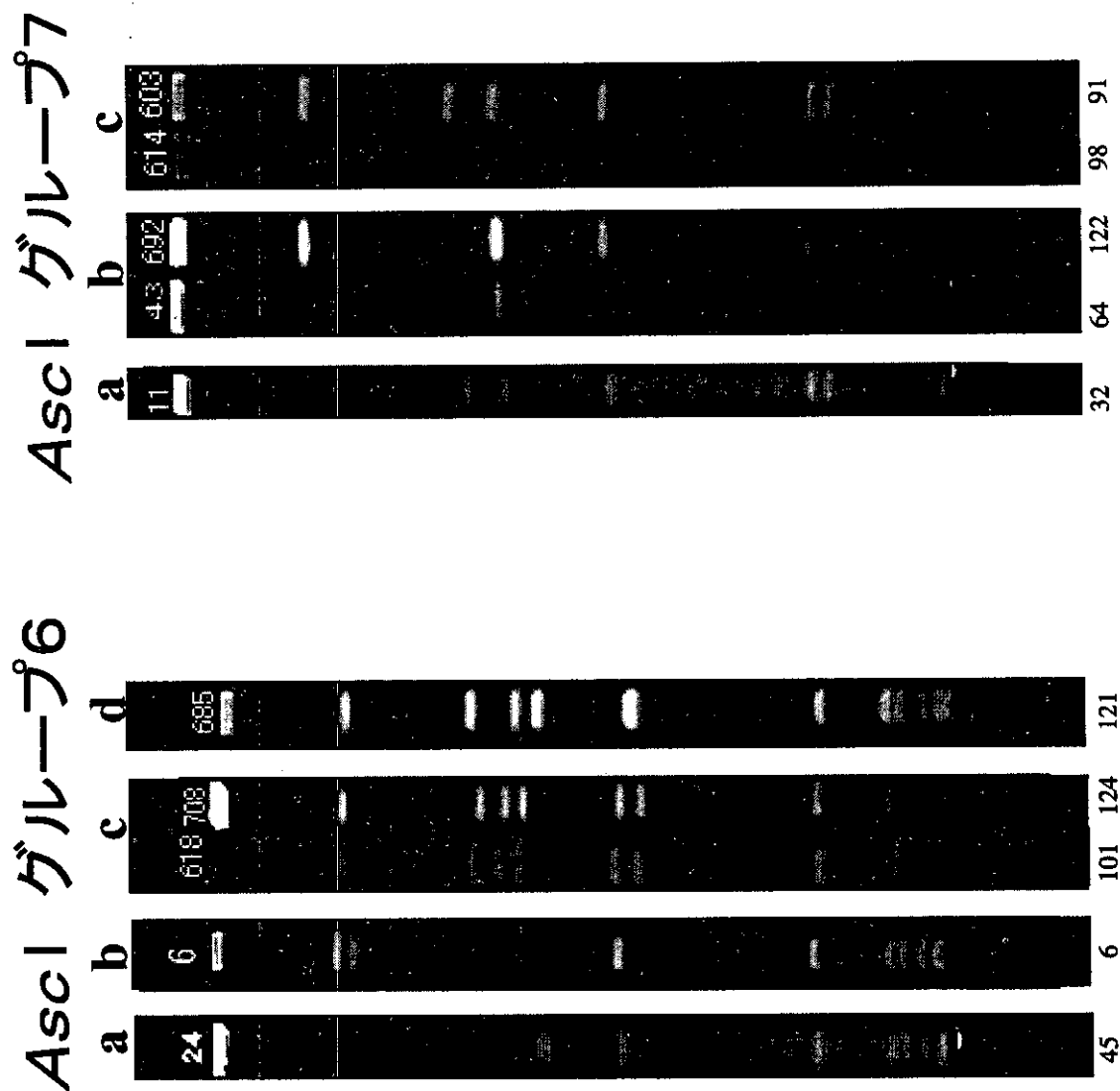


図5-6 AscI切断によるPFGEパターンによるPFGEパターンのグループ分け

- ・ 画像下の数値は表1の菌株No.と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

Ascl グループ9



Ascl グループ8

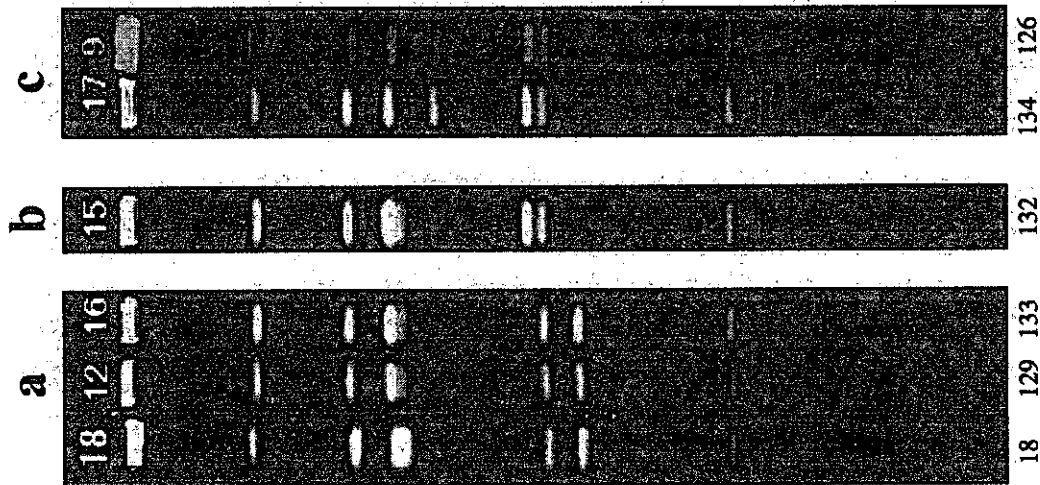


図5-7 AscI切断によるPFGEパターンによるPFGEパターンのグループ分け

- ・ 画像下の数値は表1の菌株No. と対応
- ・ 画像上の英字はPFGEパターンを示す

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

分子疫学的手法の検討及び標準化

分担研究者 牧野壮一

帯広畜産大学畜産学部家畜微生物学教室助教授

研究協力者 武士甲一

北海道立衛生研究所食品科学部主任研究員

研究要旨 人畜共通感染症の一つであるリステリア症は本来動物の感染症であり、その原因菌である *Listeria monocytogenes*（リステリア）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、我国におけるヒトのリステリア症は 1958 年に始めて小児の髄膜炎として報告されてから、現在では、毎年 40-50 例の発生が認められている。しかし、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ほとんど報告されていない。胎児および新生児のリステリア症は母親からの垂直感染であろうと推定されているが、母親への感染源については不明である。食品が世界的に流通し、リステリアの低温増殖性といった特性から、本症が食品を介して国内でいつ集団発生しても不思議ではない。2001 年 3 月北海道でチーズからヒトへの感染事例が初めて報告されたことから、食品を汚染源とする散発事例は国内で既に発生している可能性は高い。そこで、我々の研究班では、日本で発生しているリステリア症の実態をアクティブサーベイランスにより掌握した上で、臨床分離菌株、環境分離株および食品由来株の詳細な検討により、感染源がどこにあるのかを明らかにすることを目的とする。これにより、我国におけるリステリア症が、欧米と同様に食品媒介感染症として位置付けられるのかを明らかにでき、重篤な症状と高い致死率を示すリステリア症の予防に重要な知見が得られることと思われる。加えて、食品を介した感染が明らかとされた場合は、行政上、リステリアを食品衛生上重要な汚染菌として取り扱う必要性を示すことが出来、これにより多くのリステリア症の発生を未然に防ぐことが出来る。同時に本研究で疫学的手法を標準化することにより、画一的な疫学データの解析が可能となり、ネットワークで情報交換が可能となり、衛生行政への貢献は計り知れないものと期待される。実際にリステリアはヒトよりも家畜を含めた環境中に常在しており、それが経口感染でヒトに伝播すると考えられている。しかし、リステリアの病原性の指標となる簡便な方法がないことから、環境中のリステリアのどの程度がヒトに危険なのか把握する手段がない。我々は昨年度の報告書で遺伝学的に病原性を調べる指標について検討した。そこで、実際の病原性の差を検証可能な動物モデル系の作出を試みた。また、食品の安全性を常にモニタリング可能なように、リステリア等の病原細菌の自動検出機器を開発し、リステリア等への応用について検証した。

A. 研究目的

人畜共通感染症の一つであるリステリア症は本来動物の感染症であり、その原因菌である *Listeria monocytogenes*（リステリア）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、我国におけるヒトのリステリア症は 1958 年に始めて小児の髄膜炎として報告されてから、現在では、毎年 40-50 例の発生が認められている。しかし、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

た事例はほとんど報告されていない。胎児および新生児のリステリア症は母親からの垂直感染であろうと推定されているが、母親への感染源については不明である。食品が世界的に流通し、リステリアの低温増殖性といった特性から、本症が食品を介して国内でいつ集団発生しても不思議ではない。2001年3月北海道でチーズからヒトへの感染事例が初めて報告されたことから、食品を汚染源とする散发事例は国内で既に発生している可能性は高い。そこで、我々の研究班では、日本で発生しているリステリア症の実態をアクティブサーベイランスにより掌握した上で、臨床分離菌株、環境分離株および食品由来株の詳細な検討により、感染源がどこにあるのかを明らかにすることを目的とする。これにより、我国におけるリステリア症が、欧米と同様に食品媒介感染症として位置付けられるのかを明らかにでき、重篤な症状と高い致死率を示すリステリア症の予防に重要な知見が得られることと思われる。加えて、食品を介した感染が明らかとされた場合は、行政上、リステリアを食品衛生上重要な汚染菌として取り扱う必要性を示すことが出来、これにより多くのリステリア症の発生を未然に防ぐことが出来る。同時に本研究で疫学的手法を標準化することにより、画一的な疫学データの解析が可能となり、ネットワークで情報交換が可能となり、衛生行政への貢献は計り知れないものと期待される。

そこで本分担研究では、食品および環境由来リステリアがヒトにリステリア症を起こすのかという点に着目して、リステリアの動物や食品からリステリアを分離同定し、また各分担研究者が分離した菌株を用い、病原性のアッセイを行う。しかし、そのための統一的方法が確立されていないので、まずその方法を確立することからはじめた。今までリステリアの病原性の評価はマウスを用いた感染実験や細胞への侵入能などの系で行われてきた。しかし、マウスに対してほとん

ど病原性を示さず、指標としての利用価値は低いと考えられている。そこで、モルヒネを用いた実験系を開発した。

一方、現在、食品中のリステリアの検査については煩雑で熟練を要するため、検査を実施している食品工場は少なく、また、ナチュラルチーズや生ハムにはその規格基準が定められていないことから、必要なときには外部の検査機関に委託しているのが実情である。さらに商品製造者のリステリア症と食品衛生に関する知識は乏しく、欧米における食品媒介性リステリア症の発生状況を考えると、わが国においても汚染が報告されている輸入ナチュラルチーズや輸入生ハム、国産シュレッドチーズ及び国産ナチュラルチーズ等を介した本症の発生が危惧される。今回、我々は、リステリア検査の自動化を試みを、生ハムをモデルとして行った。本システムを食品工場に導入し、食品製造所の段階でリステリアを排除することにより、食品媒介性の本症を未然に防止することを目的とした。

B. 研究方法

1. リステリアの病原性の評価システムの構築

使用したリステリア菌株はEGD株(標準株)と患者およびチーズ由来株(12/a)である。マウスは生後6週令雌のBALB/Cマウスで、日本クレアより購入した。モルヒネは和光純薬の塩酸モルヒネを購入し、1kgあたり100mg量を12時間ごとに一週間腹腔内投与した。投与後リステリア菌の約 10^7 個を経口投与して経過観察を行った。同時にマウスの脾臓内菌数を測定した。培地は選択培地としてパルカム培地を用い、リステリアの増殖にはBHIブロスもしくは寒天平板を使用した。培養は、37°Cで行った。モルヒネは麻薬取り扱い主任者の許可および管理のもと、適正な使用を行った。

2. 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

(1) 供試菌株

Coliform

Citrobacter freundii ATCC 19119

Faecal coliform

Escherichia coli ATCC

Salmonella

Salmonella sp. Serovar

Enteritidis ATCC

Staphylococcus

Staphylococcus aureus ATCC

Staphylococcus saprophyticus

ATCC

Listeria

Listeria monocytogenes ATCC

Listeria innocua ATCC

(2) 食品及び試験項目

食品はS社製の生ハムとし、試験項目は食品衛生法における非加熱食肉製品の規格基準どおり大腸菌、サルモネラ、黄色ぶどう球菌としたが、これに大腸菌群とリステリアを加えた。

(3) 試料の調製と供試培地

試料の調製と使用培地については、食肉製品の規格試験に準拠して行った。大腸菌、黄色ぶどう球菌、大腸菌群については試料 10 g に滅菌生理食塩水を加えて 10 倍乳剤とし、その 0.1 ml ずつを各々、CHROMagar E. coli、CHROMagar S. aureus、CHROMagar Coliform TAK1 に培養した。サルモネラについては、25 g を SPLINT Salmonella で増菌後、培養液を CHROMagar Salmonella に、また、リステリアについては、USDA 法にしたがって 25 g を UVM 培地で一増菌した後、プレーザー培地で二次増菌し、その培養液を CHROMagar Listeria に培養した。

(4) 判定方法

食品衛生法の規格基準にしたがって判定を行う一方、CCD 画像解析を原理とする食品細菌自動検査装置である「バクテクター」を用いて試験を行い、その結果を目視判定による結果と比較し検討した。

C. 研究結果

1. リステリアの病原性の評価システムの構築

リステリアを培養後正常マウスおよびモルヒネ投与マウスに経口投与を行った。その結果、死亡率も脾臓内菌数も有意に正常マウスに比べ高くなっていた(図1および2)。また、野外分離株も同様の結果を得た(結果示さず)。

2. 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

供試3検体の生ハム(ロット別による)からは、いずれの細菌も検出されなかった。このうちの1検体に種々の細菌を添加し、各培地でその回収を行った。いずれの培地においても回収率は良好であった(表1)。これら選択寒天培地における集落を目視とバクテクターによる画像解析の両方で、定量的にあるいは定性的に行った。

大腸菌群については、 α -ガラクトシダーズの産生により大腸菌群の集落は青色に発色する(図3)。左側に目視判定、右側に画像解析による結果を示す。いずれの方法においても青色を示す大腸菌群の集落については、その数が一致した。

糞便性大腸菌群については、 β -グルクロニダーズの産生により大腸菌を含む糞便性大腸菌群(乳糖非分解性大腸菌を含む)、赤痢菌の集落は青色に発色する(図4)。左側に目視判定、右側に画像解析に用結果を示した、いずれの方法においても集落数は一致した。

黄色ぶどう球菌は、本培地上で藤色集落を形成し、その他の *Staphylococcus* sp. は青色あるいは白色集落を形成し(図5)、また、サルモネラについては亜種1のみが藤色集落を形成し、亜種2、3については青色集落を形成した(図6)。各々の培地において黄色ぶどう球菌及びサルモネラは、目視判定と画像解析における集落数に相違はほとんど認められなかった。

CHROMagar Listeria 上においてリステリア属菌は青色集落を呈する一方、*L. monocytogenes*、*L. ivanovii*についてはレシチンを分解して集落周辺にハローを形成する(図7)。食品衛生上問題となる*L. monocytogenes*については、青色集落のほかにハローを解析することによってその存在の有無を確認することができる。これまでリステリアの分離寒天培地にはパルカム・リステリア選択寒天やOX寒天培地が用いられてきたが、これらの培地では菌種の推定を行うことは困難であった。

D. 考察

1. リステリアの病原性の評価は免疫不全マウスを用いた系などが考えられていたが、維持や値段が高く、実用的ではないといわれている。我々はサルモネラの病原性のアッセイにモルヒネマウスを利用し効果をあげ、麻薬患者の易疫感染が多いことを実証したが、リステリアも同様であるといえた。同じような細胞内寄生菌であることを考えると他にも応用可能であると考えられた。今後は遺伝子解析の結果とあわせて、由来の異なるリステリアについて病原性のアッセイに応用し、食品や環境由来リステリアの人への危険性の評価も出るとしたい。
2. 1998年からは、欧州連合で採用されているリステリアの検査に発色酵素基質培地の使用が推奨され、分離用寒天培地での*L. monocytogenes*の存在の有無が容易となった。本研究では、分離培地上でのリステリアの存在の有無を自動化した。今後は、本リステリア検査システムをナチュラルチーズ、生ハム及びスモークサーモン製造施設に導入し、システムの実用試験を行うと同時に本システムの普及を図り、食品媒介性リステリア症の発生を未然に防止する計画を立てたいと考える。

E. 結論

食品や環境から自動的にリステリアを分離同定し、そのシステムを衛生環境の向上や教育、そして究極的にはHACCPへの導入をできるものと考えている。また、この際にリステリアの病原性を評価して、本当に危害となるリステリアなのかを知ることが、正当なリスク評価になるはずである。その際に我々の利用したモルヒネ投与マウスの系は利用可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

特に無い。

G. 研究発表

1. Okada Y, Makino S-I, Tobe T, Okada N, Yamazaki S. 2002. Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene. *Appl Environ Microbiol.* 68:1541-1547.
2. Watarai, M., Makino, S-I. and Shirahata, T. 2002. An essential virulence protein of *Brucella abortus*, VirB4, requires an intact nucleoside triphosphate-binding domain. *Microbiology.* 148: 1439-1446.
3. Asakura H, Makino S-I, Takagi T, Kuri A, Kurazono T, Watarai M, and Shirahata T. 2002. Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. *FMS Microbiol. Lett.* 212(1):87-93.
4. J. Erdenebaatar, S. Sugar, A. Yondondorj, T. Nagabayashi, B. Shuto, M. Watarai, S-I Makino and T. Shirahata. 2002. Serological Differentiation of *Brucella*-Vaccinated and -Infected Domesticated Animals by the Agar Gel Immunodiffusion Test using *Brucella* Polysaccharide in Mongolia. *J. Vet. Med. Sci.* 64: 839-841.
5. K. Suk, H, Asakura, A, Kuri, M, Watarai, T, Shirahata, K, Tekeshi, T, Tsukamoto and S-I, Makino. 2002. Long-Term Excretion of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) and Experimental Infection of O157 in a

Sheep. J. Vet. Med. Sci. 64: 927-931.
 6. Hiroshi Asakura, Masahisa Watarai, Toshikazu Shirahata, and Sou-ichi Makino. 2002. Viable but non-culturable *Salmonella* recovery and its systemic infection in morphine-treated mice. J.

Infect. Dis. 186:1526-9.
 7. 笹川伸之、梅津淳一、武士甲一、牧野壯一ら：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、Vol.45, No.22, 2002

図2. 脾臓内菌数の推移

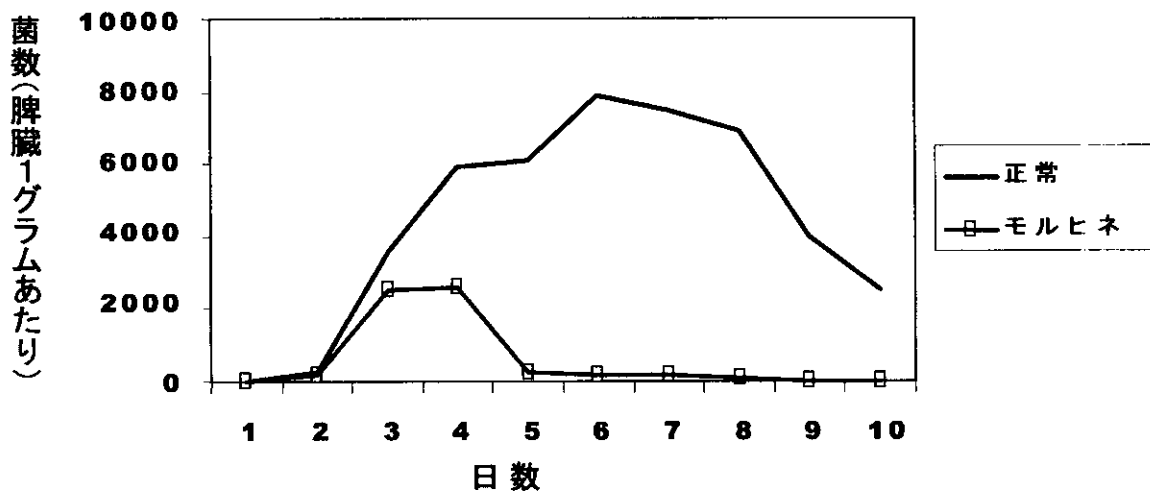


表1. 生ハムへの細菌の添加・回収試験

細菌	選択分離培地	添加菌数 (cfu/g), 回収菌数 (cfu/g), 回収率 (%)		
		標準寒天培地	選択分離培地	回収率
<i>C. freundii</i>	CHROM coliform	2.4×10^3	2.1×10^3	87.5
<i>E. coli</i>	CHROM <i>E. coli</i>	3.6×10^3	3.4×10^3	94.4
<i>S. aureus</i>	CHROM <i>S. aureus</i>	8.9×10^3	8.7×10^3	97.7
<i>Salmonella</i>	CHROMagar <i>Salmonella</i>	4.5×10^3	4.4×10^3	97.5
<i>L. monocytogenes</i>	CHROMagar <i>Listeria</i>	1.4×10^3	1.4×10^3	100.0

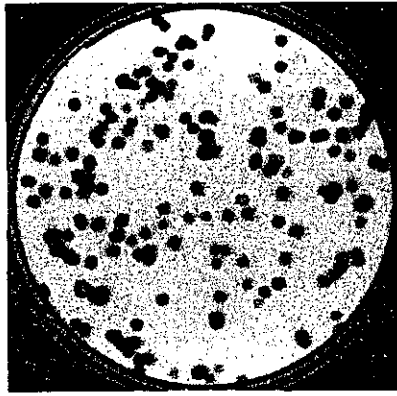


図3. CHROMagar Coliform TAK1における大腸菌群の発育
大腸菌群(*C. freundii*)の集落は青色を呈し(左側)、その集落を画像解析により抽出した(右側)。

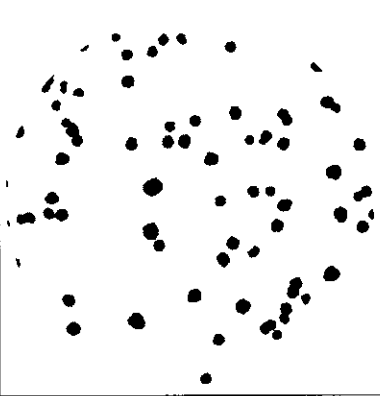
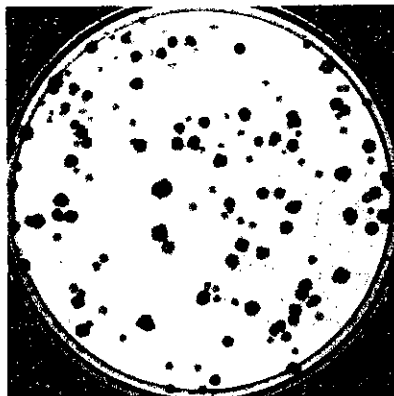


図4. CHROMagar E. coliにおける大腸菌の発育
大腸菌の集落は青色を呈し(左側)、その集落を画像解析により抽出した(右側)。

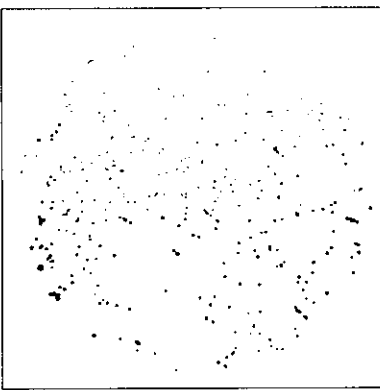


図5. CHROMagar S. aureusにおける黄色ブドウ球菌の発育
*S. aureus*は本培地上で黄色集落を呈し、*S. saprophyticus*は青色集落を呈する(左側)。
このうち、*S. aureus*のみを画像解析により注したのが左側である。

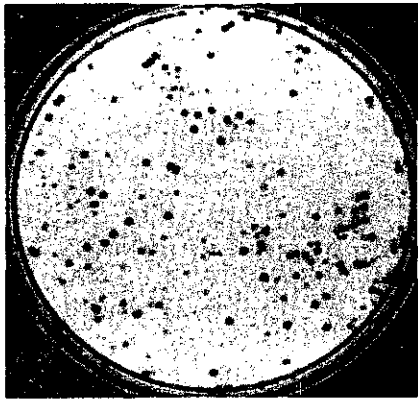


図6. CHROMagar Salmonella における *S. Enteritidis* の発育状況

S. Enteritidis は本培地上で藤色集落を呈し、亜種2の *S. Arizonae* は青色集落を呈する（左側）。

右側は *S. Enteritidis* を画像解析により抽出した写真。

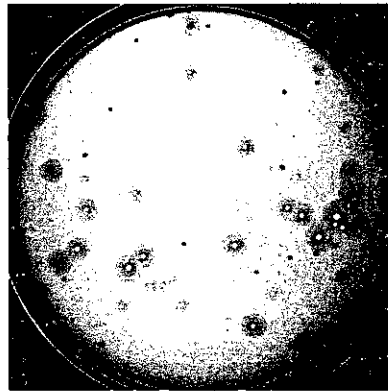
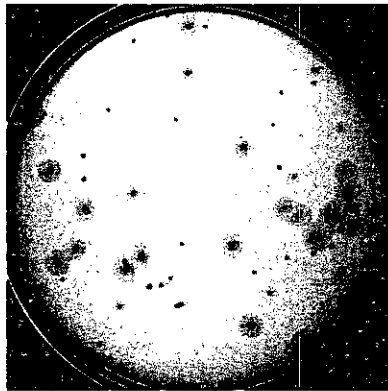


図7. CHROMagar Listeria における *L. monocytogenes* の発育

L. monocytogenes は本培地上で青色集落を呈し、かつハロー形成を見る。

Listeria monocytogenes 汚染の分子疫学に関する基礎的研究(Ⅱ)

分担研究者 本藤 良 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 教授
協力研究者 植田富貴子、落合由嗣 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 助教授、助手
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

研究要旨：

1. ヒト・リステリア症(敗血症患者、髄膜炎患者)および食肉汚染由来 *Listeria monocytogenes* (L.m) 分離菌株・血清型 1/2a 株について、*iap* 遺伝子内・多型領域のゲノム構造の特性を解明し、その分子疫学的解析から、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る結果を得た。

2. 2001年に輸入した食肉(保税段階)から各血清型の L.m を分離した。カナダ(4株)、米国(2株)、デンマーク(1株)、アイルランド(1株)、中国(6株)、ブラジル(1株)由来菌株について分子疫学的比較解析を試み、各国での常在汚染および複合汚染の実態とその菌株のゲノム構造の特性を明らかにした。

A. 研究目的

Listeria monocytogenes (L.m)の分子疫学的解析の基盤となるのは、起因菌の分離と同定およびその血清型別である。それらの疫学情報を基にして分子生物学的手法を併用することにより、さらに詳細な疫学的解析が可能となるものと考えている。

現在までに、市販食肉におけるL.mの汚染状況の調査と本邦での地域常在性に関する分子疫学的解析を継続し、その解析法と有用性、本邦での地域常在汚染と複合汚染の実態およびその菌株のゲノム構造の特性を明らかにしてきた(文献1、2、3、4、5)。以上の成績を基にして、平成14年度は以下の2題をテーマに解析を試みた。

1) 汚染食肉とヒト・リステリア症との関連性：ヒト・リステリア症由来菌株(1/2a)と汚染食肉由来菌株(1/2a)についての分子疫学的比較解析を試み、汚染食肉を介したヒトへの感染の可能性を解析する。

2) 輸入食肉の汚染状況：各国の輸入食肉(保税段階)からL.mの分離を試み、その汚染状況を明らかにする。また、外来分離菌株の分子疫学的比較解析により、各輸入国における汚染菌株のゲノム構造の特性を解明する。

B. 研究方法

1. 検体

1) 市販食肉由来分離株：本研究室で、1996年から2000年までに市販の豚肉、鶏肉、牛肉、および合挽肉から常法で分離した206株の中から、経時性と疫学的背景を考慮し、血清型1/2aの17株を選択した。(表1)

2) ヒト・リステリア症由来分離株：基礎疾患が白血病で敗血症を併発した患者の動脈血由来株(HM1)と糞便由来(HM2)および髄膜炎患者の髄液由来株(12H)の3株を用いた。(表1)

3) 輸入食肉由来分離株：2001年に輸入した牛肉、豚肉、鶏肉(保税段階)から分離したL.mの15株を用いた。(表2)

以上の各菌株をBHI(Difco)培養液で37℃・18時間培養後に一定条件に調整し、常法により抽出した染色体DNAを用いた。

2. 分子疫学的解析

1) 分離菌株の異同識別には、制限酵素切断解析法を用いた。各菌株から抽出した染色体DNAを6塩基を認識する6種の制限酵素(Pst I、Xba I、Ban III、Sal I、Bgl II、BamHI)で消化した後、電気泳動を行い、写真撮影後にフィンガープリントを作成して切断パターンの比較解析を行った。