

200301205A

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

## 食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究

平成15年度 総括・分担研究報告書

平成13年度～15年度 総合研究報告書

(H13-生活-026)

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16(2004)年

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究

平成15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16（2004）年

## 食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究班

平成15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

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

仲真 晶子 東京都立衛生研究所乳肉衛生研究科

寺尾 通徳 新潟大学医学部

協力研究者

山本 茂貴 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

丸山 務 麻布大学環境保健学部

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

阪本 晴彦 香川大学医学部

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

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

天野富美夫 大阪薬科大学薬学部

山崎 学 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

梶川 揚申 岐阜大学連合大学院

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	
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	
総括研究報告書概要版	8
II. 分担研究報告書	
1. リステリアの食品汚染状況に関する文献調査／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／リステリア症診断のための ELISA 法の検討	12
奥谷晶子、五十君静信	
2. <i>Listeria monocytogenes</i> 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	38
青山顕司、岡田由美子、丸山務、山本茂貴	
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	63
岡田由美子、山本茂貴、廣田雅光、牧野壮一、五十君静信	
4. 分子疫学的手法の検討及び標準化	78
牧野壮一、武士甲一	
5. <i>Listeria monocytogenes</i> 汚染の分子疫学に関する基礎的研究 (Ⅲ) <i>L. monocytogenes</i> 分離菌株の培養細胞における侵入性に関する研究	101
本藤良、植田富貴子、落合由嗣、山田文也、小笠原邦敏	
6. わが国におけるヒト・リステリア症の発生状況－1958 年～ 2001 年－	109
寺尾通徳	
7. Ready-to-eat 食品の <i>Listeria</i> 属菌汚染実態調査 およびヒト糞便からの <i>Listeria</i> 属菌の検出	133
仲真晶子、神保勝彦、	
III. その他アンケート調査用紙	149
アンケート発送先医療機関リスト	152
追加アンケート調査用紙および発送先医療機関リスト	163
倫理関係資料	168
IV. 平成 13 年度～ 15 年度 総合研究報告書	173
食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究	174
総合研究報告書概要版	185
論文別刷	189

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

（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 牧野 壮一 帯広畜産大学・教授

本藤 良 日本獣医畜産大学・教授

寺尾 通徳 新潟大学・助教授

仲真 晶子 東京都健康安全研究センター・主任研究員

研究要旨

リステリア *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にし、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。研究班では、この事例の全ての関連菌株と疫学データの提供を受け、詳細に検討した結果、本事例が食品を介したリステリアの事例である可能性が非常に高いという結論に達した。一方、この事例の検討から、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と思われ、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開発した。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。この結果、血清型 1/2c は広く環境や食品を汚染しているが、臨床的にはほとんど感染のおそれのない集団であると思われた。一方、リステリアの病原因子のほとんどを保持する血清型 4b の一部の集団については、臨床的に特に重要であることが示された。今後このような菌種より下のレベルの集団における疫学的検討がリステリアの制御に必要となると思われる。

#### A. 研究目的

リステリア *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。感染源や感染経路については不明で、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。2001 年に食品を介したリステリアによる感染が強く疑われる集団事例が発生し、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が示された。そこで、本研究班では、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た。リステリアの集団感染が疑われた事例については、研究班として疫学的検討を加えた。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示すために、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した。

#### B. 研究方法

これまで、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検討してきた。本年度は、これまでに収集した臨床分離菌株、環境分離株および食品由来株に詳細な疫学および遺伝学的な検討を加え、食品媒介感染症としての国内のリステリア症についてその制御法をふまえた研究を行った。初年度から、主任研究者が中心となり、地方衛生研究所、拠点となる病院および国立感染症研究所の感染症情報センターとの連携をとりながら、リステリア症の疑いがある症例の発生情報の提供をお願いしてきたが、複数の医療機関で研究に理解をいただき、研究への協力並びに臨床材料の提供を受けた。引き続き臨床的な情報収集を行い、食品との関連が疑われる症例については重点的に検討を加えた。特に 2001 年に北海道で発生した事例については、関連する全ての菌株および疫学データの提供を受け、研究班としてこの事例について検討を行った。リステリア症の診断法の検討では、健康成人のボランティア

ィアから血液の提供を受け、研究班で開発した ELISA 法および PCR 法を試み、リステリア症患者血清との比較において、検査法を評価し、更なる改良を行った。リステリア症が疑われるが、生菌の検出されない事例についてもこれらの方法を適用し、評価した。食品を介したリステリア症の集団発生を想定し、初期のリステリア症診断の可能性（ELISA 法と PCR 法による感染の確認と原因食品の特定方法のプロトコール作成）を検討した。一方、国内における食品のリステリア汚染状況に関しては、昨年度までの研究により多くの市販食品種における汚染実態がほぼ掌握されたが、本年度は特に重要と思われる ready-to-eat 食品について、汚染菌数に定量的な検討を加えた。リステリアの疫学マーカー、分離法の検討とその標準化に関しては、これまで、PFGE の手法の標準化、リポタイピング、簡易迅速キットの評価、簡便な血清型別法について検討を行って来たが、本年度は引き続き検討を行うと共にこれらの方法を系統的にまとめ、標準的な方法の確立を試みた。これらの手法を用いて、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から分離されたリステリア菌株につき疫学的検討を加えた。リステリアの疫学マーカーの検索では、各種由来の異なる菌株の遺伝解析および生化学性状を比較するための疫学マーカーや、10 の病原因子の遺伝子の分布について検討した。ヒト以外の由来のリステリア菌株が実際にヒトに病原性を保有するののかについて明らかにするために、リステリア菌の病原性を判定する試験法について検討した。

（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ってきたが、主任者の所属が国立医薬品食品衛生研究所に移ったことに伴い、同研究所の医学研究倫理規定に基づき再度倫理委員会の審査を受け、その規定に従い研究を行った。

### C. 研究結果

これまで研究班で検討してきたリステリアの細菌学的検出法、疫学的検討方法は、系統的にまとめ、今後用いる標準的な方法として整理した。検討を行ってきたリステリア症の診断法も実用レベルに達した。そこで、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関連する菌株および疫学データを収集し、検討を行った。菌株は、PFGEによる検討で、個々の株間に小さな差異は認められるものの近縁な株の集団であることが確認できた。リポプリンターの解析では、検討した全ての株でパターンが一致した。この事例による問題点を明らかにすると共に、今後実際に類似する事例が発生した場合、どの様に対処すべきかのプロトコール作りを試みた。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。

国内における市販食品のリステリア汚染状況は、ほぼ明かに出来た。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ことは、食肉の処理過程において汚染が広が

っていることになる。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。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2乗を越える菌数を示した。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。由来の異なる菌株に対して10種の病原因子の保持状況を検討したところ、ある特定の血清型で大変興味深い結果が得られた。血清型1/2cでは、環境からの分離頻度が60%を越えているのに、食品からの分離頻度は30%で、臨床からは2%とまず分離されてこない。一方、血清型4bは、環境から5%、食品から15%、そして臨床由来株では65%分離されてくる。さらに血清型4bでは、食品分離株と臨床分離株において10種の病原因子の保持状況に有意差が認められた。すなわち、環境や食品由来株の4bは、均一な集団ではなく、その一部が有意に病原因子を持っていることになる。

#### D. 考察

これまで研究班で検討してきたリステリア

の細菌学的検出法、疫学的検討方法、リステリア症の診断法は実用レベルに達し、今後もし食品を原因としてリステリア症が疑われる集団事例が起こったとしてもすぐ対応可能な検査体制が整ったといえる。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関連する菌株および疫学データを収集し、検討を行った結果から、チーズ由来株、患者由来株共にPFGEによる検討で、個々の株間に小さな差異は認められるものの近縁性は高く、リボプリンターの解析では、検討した全ての株でパターンが一致した。この結果は、これらの菌株が近縁な株の集団であることを示しており、チーズと患者由来の菌株は同一由来と見なせる。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。この事例では他の食中毒細菌および同様な症状を起こすと思われる他の感染症に関する検査が行われていなかったこと、リステリアの初期症状に対する診断基準がないため、リステリアの感染を特定できないなどの指摘がされているが、この点については患者血清が採取されておらず、今となっては検討も不可能である。この事例で報告された臨床症状は、海外で発生した同様な集団事例の臨床症状と比べ、個々の臨床症状の割合も含め、類似性が非常に高く、予想されたリステリアの高い摂取菌数から考えても、観察された症状がリステリア感染の初期症状と考えることは自然である。研究班としては、リステリアの確定診断の問題は残るとしても、本事例が食品を介したりステリア事例と考えることが妥当と結論した。もちろん、今後同様な事例が発生した場合は、患者血液の採取が望まれる。そして研究班の開発した臨床



的な診断法を適用すれば、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。研究班の開発したリステリア特異的抗体価を測定するELISA法と、血液からリステリア遺伝子を検出するPCR法は、一般のリステリア症の診断においてしばしば発生する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も確実となる。さらに、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といったリステリア感染初期の診断にも応用が期待される。

環境、食品、臨床といった由来の異なる菌株間の血清型の比較と病原因子の保持状況の検討では、大変興味深い結果が得られた。血清型1/2cでは、環境からの分離頻度が60%を越えているのに、食品からの分離頻度は30%で、臨床からは2%とまず分離されてこない。これは、おそらく病原性がほとんどない群と思われる。一方、血清型4bは、環境から5%、食品から15%、そして臨床由来株では65%分離されてくる。おそらく病原性の強い群である。さらに血清型4bでは、食品分離株と臨床分離株において10種の病原因子の保持状況に有意差が認められた。すなわち、環境や食品由来株の4bは、均一な集団ではなく、その一部が有意に病原因子を持っていることになる。食品を汚染する大部分の4b株は臨床的に分離されることはないが、ほんの一部の4bが臨床と関わる集団であると考えられる。今後、動物等を用いた病原性の検討によりこの結果が確認されるならば、リステリアの制御は、菌種よりも下のレベルである一部の病原性のある集団を対象とするべきであるとい

うことになるのかもしれない。

## E. 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。2001年の北海道でチーズを原因とするリステリアの集団事例と見なすことのできる事例がすでに起こっており、研究班としては、今後同様な事例が発生した場合の検査体制を整備した。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。汚染率は低いが、生食用食品(ready-to-eat)の一部にも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。リステリアの病原因子のほとんどを保持する血清型4bの一部の集団については、臨床的に特に重要であることが示された。今後このような菌種より下のレベルの集団における疫学的検討がリステリアの制御に必要となると思われる。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, and Igimi S. Nationwide survey of human *Listeria monocytogenes* infection in Japan. *Epidemiology and Infection*. 132: 769-772. (2004)
2. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, Igimi S.

- Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *International Journal of Food Microbiology*. 93:131-140. (2004)
3. 仲真晶子. 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. (2003)
  4. 五十君静信. 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:No.4:19-23. (2003)
  5. 五十君静信、奥谷晶子. 日本国内におけるリステリア症発生状況の調査. *獣医学雑誌*. 7:51. (2003)
  6. 五十君静信. リステリア —注目されるようになった食品媒介感染症菌—. *食品衛生研究* 53:No.9:11-16. (2003)
  4. 仲真晶子, 金子誠二, 平井昭彦, 石崎直人, 小田桐恵, 神保勝彦, 甲斐明美, 諸角聖. 畜水産食品の*Listeria*汚染状況. 第24回日本食品微生物学会. 2003年10月岡山
  5. 村上裕之、藤田康弘、五十君静信、丸山務、園部廣美. *Listeria monocytogenes* のLAMP法による検出法の検討. 第24回日本食品衛生微生物学会総会. 2003年10月2-3日. 岡山
  6. 酒井史彦、青山顕司、篠澤映子、山縣尚、丸山 務、五十君静信、柳平修一. 各種ナチュラルチーズからのリステリア菌検出方法の検討. 第24回日本食品衛生微生物学会総会. 2003年10月2-3日. 岡山
  7. 青山顕司、高橋千登勢、奥谷晶子、山本茂貴、五十君静信、丸山 務. 食品および臨床由来*Listeria monocytogenes* のパルスフィールド電気泳動解析第24回日本食品衛生微生物学会総会. 2003年10月2-3日. 岡山

#### 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回日本細菌学会総会. 2003年4月2日
2. 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
3. 石村勝之、井上智、仲真晶子、寺尾通徳、萱島隆之、河本秀一、平崎和孝、荻野武雄. *Listeria monocytogenes actA* 遺伝子PRR配列と血清型の関連性および mismatch PCR法による系統別遺伝子型別. 第24回日本食品微生物学会. 2003年10月岡山
4. 奥谷晶子、岡田由美子、山本茂貴、五十君静信. 国内における食品等のリステリア汚染状況の報告. 第24回日本食品衛生微生物学会総会. 2003年10月2-3日. 岡山
5. 岡田由美子、廣田雅光、奥谷晶子、山本茂貴、五十君静信. 環境及び臨床由来リステリア菌株における病原因子関連遺伝子の保有状況について. 第24回日本食品衛生微生物学会総会. 2003年10月2-3日. 岡山
6. 酒井史彦、青山顕司、篠澤映子、山縣尚、丸山務、五十君静信、柳平修一. 自動免疫蛍光測定装置を用いたリステリア菌検

- 査法の評価。日本食品衛生学会第86回学術講演会。2003年10月30-31日。盛岡
11. Kenji Aoyama, Chitose Takahashi, Akiko Okutani, Tsutomu Maruyama, Shigeki Yamamoto and Shizunobu Igimi. Pulsed-field gel electrophoresis pattern analysis of food and clinical isolates of *Listeria monocytogenes* in Japan. 第38回天然資源の開発利用に関する日米会議 有毒微生物専門部会。2003年11月11日。東京
  12. 奥谷晶子、五十君静信、山本茂貴。リステリア症診断のためのELISA法の検討。第77回日本細菌学会総会。2004年4月1日。大阪
  13. 岡田由美子、牧野壮一、奥谷晶子、山本茂貴、五十君静信。 *Listeria monocytogenes* の患者及び食品・環境由来株における病原因子関連遺伝子の保有状況。第77回日本細菌学会総会。2004年4月2日。大阪
- (2003)
  4. 五十君静信。リステリア症。動物由来感染症—その診断と対策。神山恒夫、山田章雄編。真興交易(株)医学出版部 東京。P219-222。(2003)
  5. 牧野壮一。リステリア属と感染症 獣医微生物学 第二版(見上毅 編)。P 99-100, 文永堂出版 東京 (2003)

#### 書籍等

1. 五十君静信。リステリア症。共通感染症ハンドブック。日本獣医師会。(2004)  
in press
2. 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)
3. 仲真晶子：HACCP：衛生管理計画の作成と実践 改訂データ編。熊谷進，小久保彌太郎，小沼博隆，豊田正武（編）I 細菌 10 リステリア，149-156，中央法規，

## 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=食品安全研究事業

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（総括研究報告書）

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=牧野壮一（帯広畜産大学），本藤良（日本獣医畜産大学），仲真晶子（東京都健康安全研究センター），寺尾通徳（新潟大学）

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。感染源や感染経路については不明で、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。一方、2001年に食品を介したリステリアによる感染が強く疑われる集団事例が発生し、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、本研究班では、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た。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示すために、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した。

研究方法=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検討してきた。本年度は、これまでに収集した臨床分離菌株、環境分離株および食品由来株に詳細な疫学および遺伝学的な検討を加え、食品媒介感染症としての国内のリステリア症

についてその制御法をふまえた研究を行った。初年度から、主任研究者が中心となり、地方衛生研究所、拠点となる病院および国立感染症研究所の感染症情報センターとの連携をとりながら、リステリア症の疑いがある症例の発生情報の提供をお願いしてきたが、複数の医療機関で研究に理解をいただき、研究への協力並びに臨床材料の提供を受けた。引き続き臨床的な情報収集を行い、食品との関連が疑われる症例については重点的に検討を加えた。リステリア症の診断法の検討では、健康成人のボランティアから血液の提供を受け、研究班で開発したELISA法およびPCR法を試み、リステリア症患者血清との比較において、検査法を評価し、更なる改良を行った。リステリア症が疑われるが、生菌の検出されない事例についてもこれらの方法を適用し、評価した。食品を介したリステリア症の集団発生を想定し、迅速診断の可能性（ELISA法とPCR法による感染の確認と原因食品の特定方法のプロトコール作成）を検討した。一方、国内における食品のリステリア汚染状況に関しては、昨年度までの研究により多くの市販食品種における汚染実態がほぼ掌握されたが、本年度は特に重要と思われる ready-to-eat 食品について、汚染菌数に定量的な検討を加えた。リステリアの疫学マーカー、分離法の検討とその標準化に関しては、これまで、PFGEの手法の標準化、リポタイピング、簡易迅速キットの評価、簡便な血清型別法について検討を行って来たが、本年度は引き続き検討を行うと共にこれらの方法を系統的にまとめ、標準的な方法の確立を試みた。これらの手法を用いて、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から分離されたリステリア菌株につき疫学的検討を加えた。リステリアの疫学マーカーの検索では、各種由来の異なる菌株の遺伝解析および生化学性状を比較するための疫学マーカーや、10の病原因子の遺伝子の分布について検討した。ヒト以外の由来のリステリア菌株が実際にヒトに病原性を保有するのかについて明らかにするために、リステリア菌の病原性を判定する試験法について検討した。

結果と考察=これまで研究班で検討してきたリステリアの細菌学的検出法、疫学的検討方法は、系統的にまとめ、今後用いる標準的な方法として整理した。検討を行ってきたリステリア症の診断法も実用レベルに達し、今後もし食品を原因としてリステリア症が疑われる集団事例が起こったとしてもすぐ対応可能な検査体制が整ったといえる。そこで、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検討することにより、この事例による問題点を明らかにすると共に、今後実際に類似する事例が発生した場合、どの様に対処するべきかのプロトコール作りを試みた。北海道で発生したナチュラル

ルチーズによる集団食中毒事例について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、この事例では他の食中毒細菌および同様な症状を起こすと思われる他の感染症に関する検査が行われていなかったこと、症状がリステリアが感染を起こした事によるものであるかを特定できなかったことなどの理由からリステリア症の確定には至らなかった。血清は採取されておらず、この検討も不可能であった。一方、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比べ、個々の臨床症状の割合も含め、ほぼ一致しており、想定されたりステリアの摂取菌数から考えても、観察された症状がリステリア感染の初期症状と考えることは自然である。今後同様な事例が発生した場合は、患者血液の採取が望まれる。そして研究班が開発した臨床的な診断法を適用すれば、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、一般のリステリア症の診断においてしばしば発生する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も確実となる。さらに、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といったリステリア感染初期の診断にも期待される。国内における市販食品のリステリア汚染状況は、ほぼ明かに出来た。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ことは、食肉の処理過程において汚染が広がっていることになる。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。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 2 乗を越える菌数を示した。非加熱喫食食品にこのような汚染が見られたことは、注目に値する。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。由来の異なる菌株に対して 10 種の病原因子の保持状況を検討したところ、ある特定の血清型で大変興味深い結果が得られた。血清型 1/2c では、環境からの分離頻度が 60%を越えているのに、食品からの分離頻度は 30%で、臨床からは 2%とまず分離されてこない。これは、おそらく病原性がほとんどない群と思われる。一方、血清型 4b は、環境から 5%、食品から 15%、そして臨床由来株では 65%分離されてくる。おそらく病原性の強い群である。さらに興味深いことに、血清型 4b では、食品分離株と臨床分離株において 10 種の病原因子の保持状況に有意差が認められた。すなわち、環境や食品由来株の 4b は、均一な集団ではなく、その一部が有意に病原因子を持っていることになる。食品を汚染するほんの一部の 4b が臨床と関わる集団であると考えられる。今後、動物等を用いた病原性の検討によりこの結果が確認されるならば、リステリアの制御は、菌種で行うよりも一部の病原性のある集団を対象とするべきであるということになるのかもしれない。

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。汚染率は低いが、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）

（分担研究報告書）

## リステリアの食品汚染状況に関する文献調査

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

リステリア症診断のための ELISA 法の検討

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

主任研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所 室長

### 研究要旨

重篤な髄膜炎等を症状とするリステリア症を引き起こす *Listeria monocytogenes* (以下 *L. monocytogenes*) は欧米では食品を介した感染症として認識されている。一方、日本では発生数が少なく食品を介した集団発生を未だ経験していないためリステリア症および *L. monocytogenes* による食品の汚染状況に関する報告および資料は散発的である。

そこで日本国内における食品の *L. monocytogenes* による汚染状況を詳細に検討するため、始めに国内の汚染状況を食品のカテゴリー別に集計し、汚染実態をまとめた。その結果、国内の食品汚染状況は欧米と同程度であることが明らかとなった。

続いて、国内におけるリステリア症の発生状況を検証するため、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、*L. monocytogenes* 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。サーベイランスの結果を基に、1995 年以降の単年度あたり患者数から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。

最後に、リステリア症の迅速診断方法としての ELISA 法による特異的抗体価の測定の評価と検討を行った。その結果、主要な病原因子である Listeriolysin O (LLO) のコレステロール結合ドメインを欠損した蛋白質を HPLC 精製したものを固相化抗原とした場合に、患者血清において高い特異性と感受性が得られることが明らかとなった。

#### A. 研究目的

*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。日本国内に流通する食品等の *L. monocytogenes* による汚染状況を把握するために、国内で報告された汚染状況についての論文を収集し、カテゴリーによる分類を行った。

また、日本ではこれまでリステリア症の集団発生への報告はないことや、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、国内の病院（病床数100床以上）を対象にアンケート形式のアクティブ・サーベイランスを行い、国内のリステリア症発生数および発生率を推定した。またリステリア症と原因と思われる食品との連関を調査するためには迅速な診断方法の開発が不可欠である。そこで血清を材料としたELISA法を開発し評価・検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 日本国内の汚染状況

本邦におけるリステリア菌 (*Listeria monocytogenes* 以下 *L. monocytogenes*) による食品の汚染状況の報告した文献を検索した。まず、リステリア菌が分離された品目を食品別に食肉と ready-to-eat 食品別に大きくカテゴリー分けした。そして、各カテゴリー内を食品別に分類し、検体数、*L. monocytogenes* 陽性率を一覧表にまとめた。さらに、食品ごとの傾

向を検討するために、総数の多いブロック肉、薄切り肉、腸内容物、魚介類、野菜およびチーズは総計の一覧表を作成し、考察を行った。

### 2. アクティブ・サーベイランス

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。

(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。

### 3. ELISA法の評価および検討

*L. monocytogenes* の主要な病原因子である溶血素 listeriolysin O (LLO) を抗原としたELISA法を評価するため、LLO全長およびコレステロール結合領域欠失 LLO 蛋白質を大腸菌を用いて作出した。各蛋白質はN末側のHisタグによりNi-NTAで精製後、イオン交換液体クロマトグラフィ(HPLC)により精製を行った。陽性の血清として3例の *L. monocytogenes* 感染患者のペア血清を陰性として104例の健康人血清を用いて血中抗体価の測定を試みた。ELISA用プレートに抗原は0.2μg/wellとなるように貼り付けた。二次抗体にはAPラベル抗ヒトIg抗体を用いた。各wellの波長405nm

における吸光度を測定しブランクとの差が0.100以上となったwellを陽性とした。

## C. 研究結果

### 1. 日本国内の汚染状況

食肉では、塊肉に比較して、薄切り肉および挽肉で *L. monocytogenes* 汚染率(以下、汚染率)が高かった。この傾向は牛、豚、鶏で同様であった (Table 1-1)。動物由来の検体では食肉由来の検体と比較して、汚染率は低かったが、豚体表面およびと畜場の周辺河川に生息する魚の腸内容物の汚染率が高めであった (Table 1-2)。ナチュラルチーズは加工過程を経るシュレッドタイプ・チーズの汚染率が高かった。国産のナチュラルチーズは汚染が報告されたものは無かったが、輸入チーズでは割合は低いものの汚染されているものもあった (Table 1-3)。日本国内で消費量の多い魚介類は、とりわけ汚染率の高い製品はなかったが、一部の ready-to-eat 食品で汚染がみられた。他の ready-to-eat 食品では、ハンバーグなどの肉製品で汚染がみられた (Table 1-4)。動物由来の検体では、豚体表面やとちく場周囲河川に生息する川魚からやや高い検出率であった (Table 1-5)。ヒトからの検体では、と畜場従業員と健常人の汚染率は差が認められなかった (Table 1-6)。環境由来(主にとちく場)の検体では広範囲で汚染が認められた (Table 1-7)。血清型のデータをまとめたところ、食品由来の検体では 1/2c が最優勢であった。続いて、1/2a、1/2b、4b が報告された。環境からの検体も含めると 1/2c が半数以上を占め、1/2a、1/2b、4b で90%以上となり、他の血清型の報告は稀であった (Table 1-8)。

### 2. アクティブ・サーベイランス

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 2-1)。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 2-2)。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 2-3)。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 2-4)。

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 2-5 および Table 2-6)。

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 2-1)。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。

### 3. ELISA 法の評価および検討

HPLC 精製後の LL0 全長を抗原とした ELISA では感染患者血清の抗体価は患者 B 感染確認 9 日後で 8192 倍を示した。患者 C 感染確認 4 週後では 4096 倍を示した。これはペア血清の 2 倍から 4 倍、また健常人血清の抗体価の 4 倍から 32 倍の値であった (Table 3-1)。この値は Ni-NTA 単独精製の LL0 全長を抗原とした場合に比べ特異性および感受性ともに高かった。また、コレステロール結合ドメインを欠失した Ni-NTA 単独精製 LL0 を抗原とした ELISA では感染患者血清の抗体価は 1024 倍 (患者 B、9 日後) および 256 倍 (患者 C、4 週後) を示し、ペア血清の 4 倍から 16 倍、また健常人血清に比べ 2 倍から 16 倍の値を示した (Table 3-2)。HPLC 精製後の欠失 LL0 を抗原とした場合は、抗体価は 2048 倍 (患者 B、9 日後) および 1024 倍 (患者 C、4 週後) を示し、ペア血清の 16 倍、また健常人血清に比べ 16 倍から 32 倍の値を示した (Table 3-3)。患者血清 A はいずれの抗原に対しても特異的な反応を示さなかった。

#### D. 考察

##### 1. 日本国内の汚染状況

日本国内におけるリステリア菌汚染率は欧

米諸国と比較して同レベルのものであった。薄切り肉や挽肉など食肉の汚染率が高かったが、これらの食品では摂食前に加熱調理することから、感染する危険性は低くなると思われる。動物個体由来の汚染率は低いレベルであったことおよびと畜場の環境由来の汚染率が高かったことから、加工過程で食肉がリステリア菌に汚染されている可能性が示唆された。

ready-to-eat 食品の汚染率は、加工過程の多いシュレッドタイプチーズやハンバーグ、ハムサラダなどの肉製品で高かった。これらの食品は加熱をせずに摂食するものであるため、汚染を予防することが第一であると考えられる。

食品および環境由来のリステリア菌で最も多く報告された血清型は臨床株では検出されない 1/2c であった。一方、臨床で多く分離される 1/2a、1/2b、4b 株は 1/2c に次いで検出はされるものの、最優勢ではなかった。このことから、食品を汚染しているリステリア菌の大多数は非病原性であり、一部の株が病原性を持つことなどの可能性が考えられるが、更なる検証が必須である。

汚染率は同レベルであるものの日本のリステリア症発生数および発症率は欧米諸国と比較すると低いレベルであることから、今後はこれらの相関に関する考察が必要であると思われる。

##### 2. アクティブ・サーベイランス

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。

### 3. ELISA法の評価および検討

ELISAに用いるLL0は、HPLC精製を行うことで非特異反応を減少させ、また、コレステロール結合領域を欠失させることにより特異性をさらに高めることができた。ただし、検体からの菌の培養が確認された患者血清Aでは特異的な抗体価の上昇がみられず、ELISA法だけでは陽性血清を全て網羅する事は難しいと思われた。そのためには、例えば血液や髄液サンプルからのdirect PCRによる病原体DNAの検出をELISAと併用して行うなど相補的な方法を採用する必要があると思われ、今後の検討課題である。

### 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や、日本国内の食品等の汚染率は欧米と同程度であることを考慮すると、発生を予防することが重要であると思われる。

また、培養に頼らない迅速な診断方法として血清を用いたELISA法は適切な抗原を選択することで利用が可能になると思われた。