

表9 主なカテゴリー別に見た Southern Dot hybridization 法における各遺伝子の陽性検体数

血清型	由来	陽性検体数 / 総検体数									
		<i>prfA</i>	<i>plcA</i>	<i>hly</i>	<i>actA</i>	<i>mpl</i>	<i>plcB</i>	<i>inlA</i>	<i>iap</i>	<i>clpC</i>	<i>opuCB</i>
1 / 2 b	鶏肉	10/13	13/13	13/13	7/13**	13/13	10/13	11/13	13/13	13/13	11/13
	豚肉	2/3	3/3	2/3**	2/3	3/3	1/3*	3/3	3/3	2/3	2/3
	豚肉加工品	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	魚介類・加工品	4/6*	6/6	6/6	5/6	6/6	4/6	4/6	6/6	4/6*	6/6
	患者	20/21	21/21	21/21	20/21	21/21	19/21	19/21	21/21	20/21	19/21
4 b	鶏肉	8/8	8/8	8/8	4/8**	8/8	5/8*	7/8	8/8	8/8	7/8
	豚肉	7/14**	13/14*	11/14**	6/14**	13/14*	6/14**	9/14**	13/14	10/14**	14/14
	豚肉加工品	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	牛肉	2/7**	5/7**	5/7**	1/7**	4/7**	1/7**	3/7**	4/7**	4/7**	4/7*
	患者	60/65	65/65	65/65	61/65	65/65	60/65	61/65	64/65	63/65	59/65

*、**：各血清型の患者由来株に比べ、有意に保有率が低い遺伝子（*：危険率5%以下、**：危険率1%以下）

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

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・原虫病研究センター・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。本研究では、初年度に、遺伝学的にリステリアの病原性を調べる指標について検討し、北海道で起きたチーズを喫食したことによる胃腸炎症状患者における例も今後日本研究を進めるうえで重要な事例になるので、その概要を報告した。次年度は、実際の病原性の差を検証可能な動物モデル系としてモルヒネ投与マウスの検討を行なった。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。最終年度は、モルヒネ投与マウスよりも勘弁である系として乳飲みマウスを用いた病原性の比較実験を行った。さらに、北海道内の下痢便患者由来糞便からリステリアの検出を試みた。

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、遺伝子を用いた病原性の差異に関する研究、モルヒネや乳飲みマウスを用いた病原性の評価システムを開発した。これらにより、食品由来株が本当にヒトに感染を起こすのかを推定できると期待できる。

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。

また、リステリア症は脳炎というよりも近年は胃腸炎が主症状であるとされている。そこで、下痢便からリステリアの分離を試み、その頻度を調べた。これは、

海外では食中毒と同じ概念で考えられているリステリア症が我が国でどの程度検出か農家の科を調べる目的で行なった。本調査は、酪農や水産物の生産地である北海道で行なった。

B. 研究方法

1. 菌株および培地

使用したリステリア菌株は表1に示した血清型の同定されている標準株33株と、健康家畜から分離された3株である。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。ドイツの血清標準株はドイツで精製した全DNAをDr. A. Bubertより分与を受け、本研究に使用した。

2. DNAの精製

リステリアEGD株より常法に従い全DNAを分離し、PCRのコントロールに使用した。

3. PCR法とプライマー

サンプル処理は、各菌株をBHI寒天平板に塗布して37°C一夜培養し、その約2白金耳を滅菌蒸留水100 μ lに懸濁し、ボルテックス後10分間ボイルした。その後15000rpm、5分間遠心し、その上清4 μ lをPCRに用いた。PCR用の試薬はTAKARA Ex Taq及び付属バッファを用い、反応液量を15 μ lとし、サーマルサイクラーを用いて次の条件で行った。

step1:94°C 2分

step2: (94°C 1分、50°C* 1分、72°C 1分)を30サイクル

step3:72°C 7分

*但し、inlB及びinlCではアニーリングを47°Cで行った。

電気泳動は2%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。プライマーは、表2に示した病原性と関わりがあると報告された遺伝子を使用し、プライマーを設計した。

4. 試験品

試験品は、北海道内で生産されたナチュラルチーズ123件で、その内訳を表3に示す。

5. チーズからのリステリアの分離

国際酪農連盟の方法に基づき、試験品から25gをスオマフィルターに秤量し、225mlのEBブロスを加えてストマッキングした。これを37°Cで24~48時間増菌後、パルカム・リステリア選択寒天培地に培養し、リステリアの分離を試みた。

6. リステリアの病原性の評価システムの構築 (モルヒネ投与マウスの系)

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。

7. 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 (ア) 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

(イ) 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。

(ウ) 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、フレーザ培地で二次増菌し、その培養液を CHROMagar Listeria に培養した。

(エ) 判定方法

食品衛生を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。

8. 乳飲みマウスを使った病原性評価系の確立

乳飲みマウスの実験で使用したリステリア菌株と由来を表5に示す。それぞれの株は24穴マイクロタイタープレート内で培養したHeLa細胞を用い、細胞感染実験で差が出るかを確認した。MOI=10で*L. monocytogenes*をHeLa細胞培養液に加え37℃、5%CO₂下で1時間培養した。その後、滅菌PBS 0.5 μlで2回洗浄後、加温したgentamycin加(30 μg/ml) MEM 1mlを加え20時間培養を行った。培養開始から1時間後、12時間後、20時間後にPBSで3回洗浄し、滅菌水500 μlを加え

てHeLa細胞を溶解し、リステリア菌数を数えた。

次に乳のみマウス(Jc1:ICR3日齢)にEvans blue(終濃度)0.04%およびBHIで培養したリステリア(約10⁷~8)を含むPBS 100 μlを胃内に投与した。胃内投与には、インスリン用注射器の注射針に約1cmの長さのポリエチレンチューブを接続したものをを用いた。乳のみマウスは母マウスと同ゲージで飼育した。アダルトマウスはJc1:ICRの5週齢を用い、カテーテルで胃内投与を行った。菌投与後14日間にわたって、24時間ごとにマウスの生存数を確認した。投与2週間後における乳のみマウスの生存率は100%であり、Evans blue 0.04%加PBSは乳のみマウスに対して致命的な作用を及ぼさなかった。また、EGD5×10⁸ CFUを同Evans blue 0.04%加PBS溶液500 μlに加え、TSA培地にて培養した。コントロールとして、PBSを用いて同様の操作を行った。10時間後および24時間後において、両者の増殖菌数に顕著な差は認められず、この結果から以下のマウス感染実験の際の色素液として、Evans blueを用いた。

9. 下痢便からのリステリアの分離

下痢便は札幌近郊の病院から別紙のような同意書を取り、下痢便から直接約20 μlとり、パルカム選択培地およびクロモアガーリステリアを用いた。

C. 研究結果

1. PCRによる各種リステリアの増幅パターンの比較

リステリアの病原因子として報告されている12種類の遺伝子を用いてPCRを行ったが、EGD株を用いての同定であり、この株では全て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。また、全体

的に、ドイツ株の方が病原遺伝子を保有している株が多く、特に侵入能に關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。さらに肉用に飼育されていた羊から分離されたリステリアでは、これらは血清型は 1/2a と 1/2b であったが、全ての遺伝子の増幅が確認できた。

2. チーズからのリステリアの分離

2000年3月に実施したモニタリング試験において、試験品123件のうち Wash type の1件から *L. monocytogenes* serovar 1/2b が検出された。このとき同一の工場で生産され保存されていた製品および有症者から提供された未開封製品19件を検査し、そのうち15件からリステリアが検出され、うち14件から同一の血清型が分離された。これらの試験において、汚染菌量は最大 10^9 MPN/100g であった。

Elliotらによると殺菌乳に500 cfu/ml にリステリアを接種して Camembert を製造した場合、製造後24時間では菌数が5~10倍に増加し、熟成後18日には一旦菌数が減少するが、熟成18日以降は再び菌数が増え、熟成65日には最大 10^7 cfu/g に達したと報告した。このときチーズ表面の菌数は内部よりも10~100倍多く、Camembert における菌の増殖要因は、その最終 pH(7.4) が菌の発育に好適であることによると考察し、Camembert の汚染調査を行う場合には熟成後25~30日の製品を対象とすることを推奨した。

3. リステリアの病原性の評価システムの構築 (モルヒネ投与マウスの系)

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)。

4. 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4)。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 -ガラクトシデース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 -グルクロニデース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~白色集落を形成し(図5)、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。

5. 乳飲みマウスによる病原性の実験

- (1) 各株の血清型別：健康羊由来 5 株を除いた *L. monocytogenes* 16 株は既に血清型が同定されている株である。羊由来 5 株について血清型の同定を行ったところ、No. 51、52 株が 1/2a、No. 53、54、55 株が 1/2a であった(表 5)。
- (2) PCR 法による各リステリア菌株の増幅パターンの比較：EGD 株は表 5 に示す 11 種類の遺伝子を全て有しており、EGD 株をコントロールに用いて各分離株の増幅パターンを確認した。その結果を表 5 に示す。脳炎症状を呈した牛由来株である No. 61 は *opuCA* を、No. 62 は *inlC* および *cIpc* を欠いていた。他の 18 菌株は、分析に用いた 11 種類の全遺伝子を有していることを確認した。
- (3) EGD 株とチーズ分離株およびヒト糞便分離株を用いた細胞感染実験：EGD 株、チーズ分離株である No. 7、9、11 株およびヒト糞便分離株である No. 20、30、40 株を用いて、HeLa 細胞感染実験を行った。図 8 に示すように、感染 1 時間後、12 時間後および 20 時間後における EGD 株およびその他の株の細胞内菌数に有意差は認められなかった。
- (4) 乳のみおよび 5 週齢マウスの経口感染実験：EGD 株、病原性欠損 EGD 変異株、患者症例由来株(Okutani-6)の 3 株を用いてマウスへの経口感染実験を行った。各株につき供試したマウスの数は、同腹の乳のみマウスでは 11~16 匹、5 週齢マウスでは 5 匹で、菌投与量は、 5×10^9 CFU/マウスである。14 日間にわたり、24 時間ごとに生存数を確認した(図 9)。

EGD 株は病原性の低い株であり、患者由来株である Okutani-6 は EGD よりも高病原性であることが推測される。病原性欠損 EGD 株を投与したグループでは、乳のみマウスおよび 5 週齢マウスともに、生存率は 100% であった。EGD 株を投与した乳のみマウスグループの生存率は 12.5%、平均死亡日は 4.0 日であるのに

対して、Okutani-6 を投与した乳のみマウスは菌投与 5 日目までに全て死亡し、平均死亡日は 2.1 日であった。5 週齢マウスの生存率は、EGD 株および Okutani-6 とともに、80% (1/5) であり、*L. monocytogenes* に対する感受性は乳のみマウスに比べて低かった。

EGD、食品、環境、家畜および症例由来の計 8 株についてマウスへの感染実験を行った。各菌株につき投与マウスの数は、同腹の乳のみマウスで 11~17 匹、5 週齢マウスでは 5 匹であった。全ての菌株について、菌投与量は 5×10^7 CFU/マウスである。感染後 14 日間にわたり、24 時間ごとに生存数を確認した(図 10)。各菌株に対する生存率を比較すると、0% (No. 51 株)~77.0% (No. 41 株)と幅広い値をとるが、平均死亡日は菌投与後 2~4 日目に集中していた。平均死亡日が 4 日目以降であった No. 62、No. 00065 の 2 株は、3 日以内の死亡率が高い反面、8、9 日目と遅れて死亡するマウスがあり、死亡日の平均値を増大させている。5 週齢マウスの感染実験では、8 株のうち 4 菌株で生存率が 100% を示し、全体的に乳のみマウスと比較して高い生存率を示し、EGD 株および Okutani-6 株の感染実験と一致した傾向を示した。

L. monocytogenes、*L. seeligeri*、*L. ivanovii*、*L. innocua*、*L. welshimeri*、*L. grayi*、*L. murrayi* の 6 菌種で乳飲みマウス感染実験を行った。病原性を有する菌種は *L. monocytogenes* および *L. ivanovii* であったが、後者は *L. monocytogenes* に比較して病原性が低く、主に羊の流産の原因となり、AIDS 患者を除きヒトへの感染はない。各菌株につき投与マウスの数は、同腹乳のみマウスは 13~17 匹であり、投与量は、 5×10^7 CFU/マウスである。14 日間にわたり、24 時間ごとに生存数を確認した(図 11)。EGD 株を投与したグループの生存率が 23.1%、平均死亡日 1.3 日であるのに対して、*L. ivanovii* は生存率が 50.0%、平均死亡日が 8.6 日であった。他の 4 株に関しては 93.8~100.0% とい

う高い生存率を示し、EGD 株に対する生存率との間に顕著な差が認められた。

D. 考察

1. PCRにより病原遺伝子を探索し、病原性の指標となるかどうかを調べた。しかし、標準株ではドイツ由来 4e 株以外完全に EGD 株と同じパターンになる株はなかった。このことは病原因子はリステリア内で共通のものではないのか、それとも保存株が病原株に成りえないのか現時点では不明であった。
2. しかし、ヒツジ由来株は EGD 株と同じであった。これらのデータからは EGD 同様の病原性を有している可能性が強く示唆される。すなわち、これらの遺伝子の存在が病原株に共通のものである可能性もある。
3. *L. monocytogenes* 以外の血清型ではこれらの病原因子の検出は非常に低頻度であった。種々の報告からこれらの血清型では病気を起こさないであろうとされているので、それらの結果とあうデータであった。
4. わが国ではまだ食品媒介リステリア症は確認されていないが、最近の食生活の欧米化や冷蔵保存された Ready-to-eat の食品の普及に伴い、近い将来その発生が憂慮される。それに対してわが国でも早急にリスクアセスメントに基づいて国産食品については HACCP を導入した汚染防止対策を、また、輸入食品に対しては原材料を含めこれまで以上に検疫体制を強化する必要があると考える。今後はナチュラルチーズのみならず、食肉製品、水産加工品、野菜類なども検査し、北海道での本症の発生を未然に防止したいと考える。
5. 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。

6. 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。
7. 本研究においては、*L. monocytogenes* の病原性を評価する実験系として乳のみマウス感染モデルの有用性が示された。乳のみマウス感染モデルは、*L. monocytogenes* の病原性の有無や強弱の違いを推定できる感度の高い評価法であり、従来の方法と比較して短い日数で判定できるという利点を持っている。乳のみマウス感染モデルを利用して食品、環境および症例由来の *L. monocytogenes* 8 株について病原性の判定を試みたが、8 株とも乳のみマウスに対して病原性を示すという結果が得られ、食品由来の *L. monocytogenes* によってヒトがリステリア症を惹起する可能性が強く示唆された。日本におけるリステリア症発生率は諸外国と比較して低く、

発症の原因が食品と断定されたケースは未だ報告されていない。我が国における食品の *L. monocytogenes* 汚染率は諸外国と同様に高いものであり、リステリア症の発生を防止するためには、汚染食品による感染・発病を視野に入れた予防対策が重要であると思われる。

8. 下痢便からの分離は検体が集まったばかりで、初年度から実施していればと後悔するが、結果は来年度以降になる。

E. 結論

1. 今回は標準株で行ったが、既に報告済みの病原遺伝子ではリステリアの指標となることは確認出来なかった。しかし、病原菌を多く調べることによりこれらのことが明らかになり、PCRによる指標が可能になるかもしれない。次年度はもう少し多くの菌株を調べマーカーとして使用価値を調べる必要がある。
2. 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。
3. *L. monocytogenes* の基準株である EGD 株ならびに病原性欠損 EGD 株および病原性既知のリステリア属の 6 菌種を乳のみマウスおよび 5 週齢マウスに経口投与し、14 日間にわたり生存数を観察した。乳のみマウスでは 5 週齢マウスと異なり、各菌株の病原性の強弱と相関した生存率や平均生存日数を示した。このことは、乳のみマウスが *L. monocytogenes* に対して高

い感受性を有することを示しており、乳のみマウスモデルがリステリア属の病原性を評価する方法として活用できる可能性が示唆された。さらに、乳のみマウスの本菌感染モデルを用いて食品、環境および症例由来の *L. monocytogenes* 8 株について病原性の判定を試みた。その結果、8 株全てが乳のみマウスに対して病原性を示す結果が得られ、食品由来の *L. monocytogenes* が人にリステリア症を惹起する可能性があることが示唆された。

F. 健康危険情報

特に無い。

G. 研究発表

1. 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、牧野壮一ら：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
 8. Sou-ichi Makino and Hyeng-il Cheun. 2003. Application of the real-time PCR for the detection of airborne microbial pathogens in reference to the anthrax spores. *J. Microbiol. Meth.* 53: 141- 147.
 9. Makino, S-I., Tobe, T., Asakura, H., Watarai, M., Ikeda, T., Takeshi, K., Sasakawa, C. 2003. Distribution of the secondary type III secretion system locus found in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 among Shiga toxin-producing *E. coli*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2341-2347
 10. Kim, S., Watarai, M., Kondo, Y., Erdenebaatar, J., Makino, S-I., Shirahata, T. 2003. Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of *Brucella abortus* deficient in internalization and intracellular growth in HeLa cells. *Infect. Immun.* 71: 3020-3027.
 11. Masahisa Watarai, Suk Kim, Janchivdorj Erdenebaatar, Sou-ichi Makino, Motohiro Horiuchi, Toshikazu Shirahata, Suehiro Sakaguchi and Shigeru Katamine. 2003 Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages. *J. Exp. Med.* 198: 5-17.
 12. Cheun, H-I., Makino, S-I., Watarai, M., Erdenebaatar, J., Kawamoto, K., and Uchida, I. 2003. Rapid and effective detection of anthrax spores in soil by PCR. *J. Appl. Microbiol.* 95:728-733.
 13. Erdenebaatar, J., Bayarsaikhan, B., Watarai, M., Makino, S-I., and Shirahata, T. 2003. Enzyme-linked immunosorbent assay to differentiate the antibody responses of animals infected with *Brucella* species from those of animals infected with *Yersinia enterocolitica* O9. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:710-714.
 14. Hisao Kurazono, Masayuki Nakano, Shingo Yamamoto, Osamu Ogawa, Kazuyo Yuri, Katsuhisa Nakata, Miyuki Kimura, Sou-ichi Makino, and G. Balakrish Nair. Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variations of the pathogenicity island. *Microbiol. Immunol.* 47 (10): 797-802, 2003.
 15. 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). P99-100, 文永堂出版 東京 2003年9月.

表 1. 使用菌株と PCR の結果

	prfA	plcA	hly	actA	mpl	plcB	inlA	iap	clpC	opuC	inlB	inlC
血清標準株 1a	-	*	+	+	+	-	-	-	-	-	-	*
血清標準株 1b	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
血清標準株 1c	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	Sm	Sm
血清標準株 3a	+	-	+	+	+	*	+	+	-	-	-	-
血清標準株 3b	+	*	+	+	-	+	-	-	-	-	Sm	Sm
血清標準株 3c	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
血清標準株 4a	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	*
血清標準株 4b	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Sm
血清標準株 4c	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	Sm	Sm
血清標準株 4d	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Sm
血清標準株 6a	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Sm
血清標準株 5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Sm
血清標準株 6	-	-	-	-	+	-	-	S	-	-	Sm	Sm
血清標準株 7	L	-	-	+	S	-	-	-	-	-	-	-
L. innocua	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	S	S
L. ivanovii	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L. welshmeri	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-
L. murray	-	-	-	*	-	-	-	S	-	-	-	Sm
L. gray	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	*
ドイツ 1a	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
ドイツ 1b	-	+	+	+	Sm	Sm	Sm	+	Sm	Sm	Sm	Sm
ドイツ 1c	*	+	+	+	+	+	-	Sm	Sm	+	+	+
ドイツ 3a	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
ドイツ 3b	+	+	L	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ドイツ 3c	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
ドイツ 4a	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	LS	S
ドイツ 4ab	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ドイツ 4b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+
ドイツ 4c	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Sm
ドイツ 4d	+	L	L	L	+	+	+	+	+	+	+	+
ドイツ 4e	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ドイツ 7	+	L	-	-	+	+	+	+	+	+	*	+
EGD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ヒツツ ^o 由来株-1(1/2a)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ヒツツ ^o 由来株-2(1/2b)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ヒツツ ^o 由来株-3(1/2a)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*=+/-

L=larger band

S=smaller band

Sm=smear

表 2. プライマーとその配列

Name	sequence (5' -3')	fragment size (bp)	gene
prfA1/prfA2	CAGCTGAGCTATGTGCGAT ACCAATGGGATCCACAAG	467	<i>prfA</i>
C01/C02	TTCGGGAATTCCATGATTAG CACTACTCCCGGACTGAG	392	<i>plcA</i>
C03/C04	CGCGGATGAATTCGATAG GTCATACCCGGGAAATCAATG	316	<i>hly</i>
actA1/actA2	ACGGGACCAAGATACGAA GCATGCTAGAATCTAAGTCAC	411	<i>actA</i>
mpl1/MSZ2	TTGCCAGATTCCTGCGAA GCGCCGGTTTCTACGTCCACTTG	428	<i>mpl</i>
C05/C06	CCAGTAGGATCCACTGTATC CTTATTTCCCGGTTTTGCTAATG	419	<i>plcB</i>
SC1/C08	GTGATATAACTCCACTTGGG GGTTAAGTTCGCAAGTGAGC	425	<i>inlA</i>
BKPN2/BBAM	AATAAGGTACCGTCTACCAAGG CAAGCGAGATAACAAGCACTTGG	301	<i>inlB</i>
InlC3/BBAM	AATTGGTTACAAAATGCAG CAAGCGAGATAACAAGCACTTGG	420	<i>inlC</i>
MonoA/Lis1B	CAAAGTCTAACACAGCTACT TTATACGCGACCGAAGCCAAC	660	<i>iap</i>
clpCA1/clpCB1	TAGGGCTTGTAAGAGAAG CCACGATATTTGTACTG	645	<i>clpC</i>
opuCA1/opuCB1	AACGAAGACTTATAAAGGGG ATAATTACGATACGGTCTGC	608	<i>opuCA</i>

表 3 試験品の内訳と試験結果

Type	Cheese	2000 年 3 月 (n=84)	2001 年 3 月 (n=123)
Fresh	Cream	0/7	0/7
	Mozzarella	0/7	0/14
	Cottage	0/2	0/2
Washed	Wash		1/3
White mold ripened	Camembert	0/17	0/27
Blue mold ripened	Blue	0/4	0/4
Semi-hard/hard	Gouda	0/16	0/13
	Smoked	0/1	0/3
	Cheddar	0/3	0/4
	Gruyere		0/2
Others		0/27	0/44

表4 . 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 E. coli	3.6×10^3	3.4×10^3	94.4
<i>S. aureus</i>	CHROM S. aureus	8.9×10^3	8.7×10^3	97.7
<i>Salmonella</i>	CHROMagar Salmonella	4.5×10^3	4.4×10^3	97.5
<i>L. monocytogenes</i>	CHROMagar Listeria	1.4×10^3	1.4×10^3	100.0

表 5. 乳飲みマウスの実験に使用した菌株

Strain	Source	Biotype	Virulence gene										
			<i>prfA</i>	<i>hly</i>	<i>actA</i>	<i>mpl</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>inlA</i>	<i>inlC</i>	<i>iap</i>	<i>clpC</i>	<i>opuC</i> A
wTEGD	This Laboratory	1/2a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.7	Food/ Cheese	1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.9		1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.11		1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.20	Fece /human	1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.30		1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.40		1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.41	Food /salmon	1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.42		1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.43		1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.44		1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.51	Domestic animal /sheep	1/2a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.52		1/2a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.53		1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.54		1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.55		1/2b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.61	Clinical	1/2a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
No.62	/Cow	4b	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Okutani-6	Clinical /human	4b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.00110	Enviro- ment	1/2c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No.00065		1/2c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Strain	Source	Virulence gene											
		<i>prfA</i>	<i>hly</i>	<i>actA</i>	<i>mpl</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>inlA</i>	<i>inlC</i>	<i>iap</i>	<i>clpC</i>	<i>opuC</i>	
<i>L. ivanovii</i>	This Laboratory	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. innocua</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. welshmeri</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. murrayi</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gray</i>		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

図1. リステリア感染実験

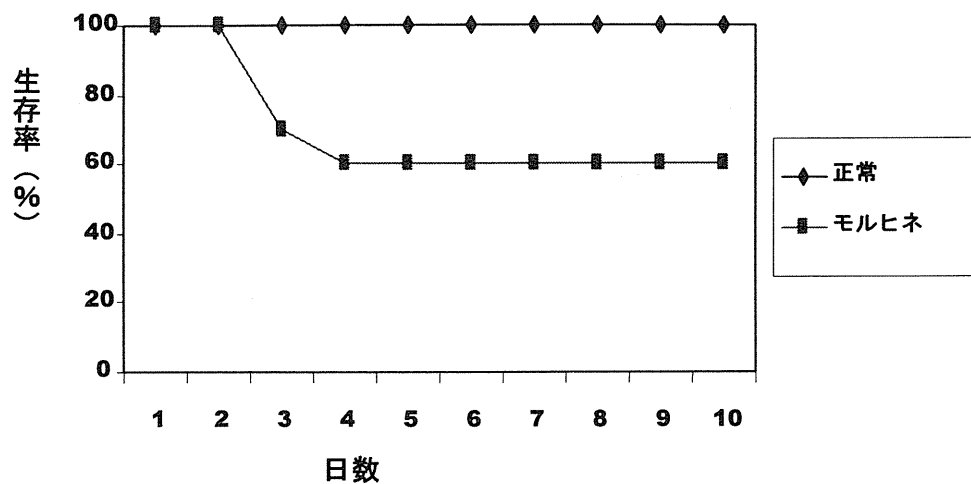
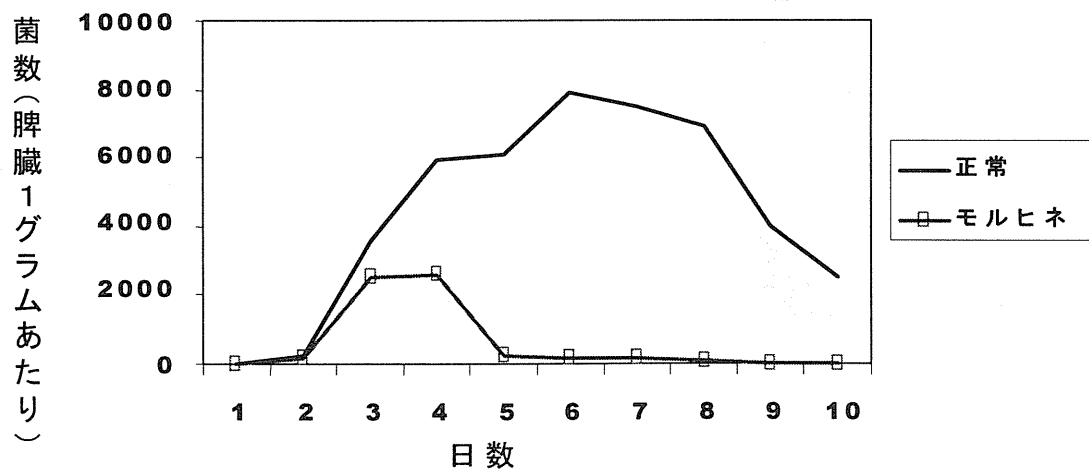


図2. 脾臓内菌数の推移



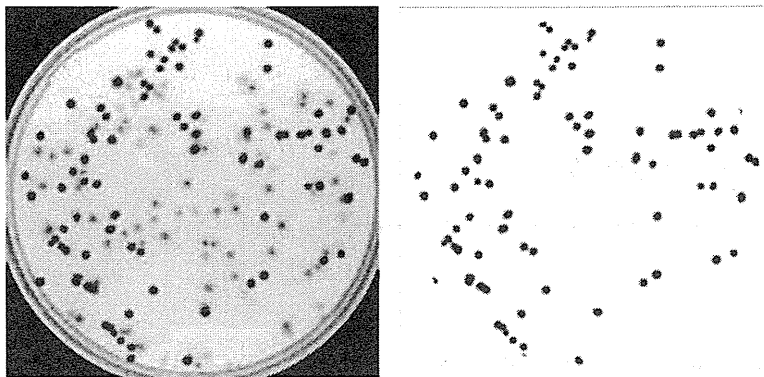


図 3. CHROMagar Coliform TAK1 における大腸菌群の発育
大腸菌群(*C. freundii*)の集落は青色を呈し(左側)、その集落を画像解析により抽出した(右側)。

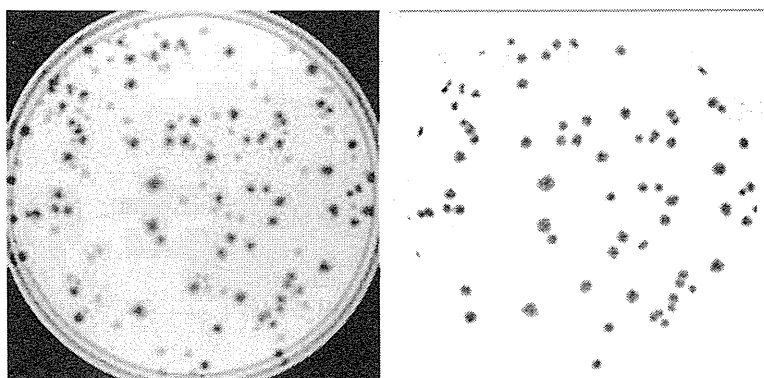


図 4. CHROMagar E. coli における大腸菌の発育
大腸菌の集落は青色を呈し(左側)、その集落を画像解析により抽出した(右側)。

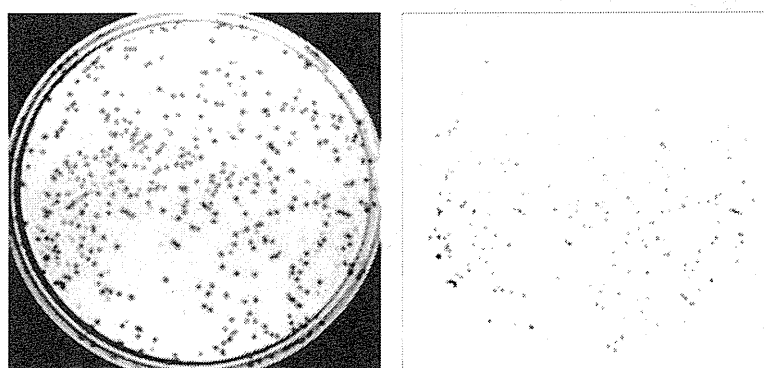


図 5. CHROMagar *S. aureus* における黄色ブドウ球菌の発育
*S. aureus*は本培地上で藤色集落を呈し、*S. saprophyticus*は青色集落を呈する(左側)。このうち、*S. aureus*のみを画像解析により注したのが左側である。

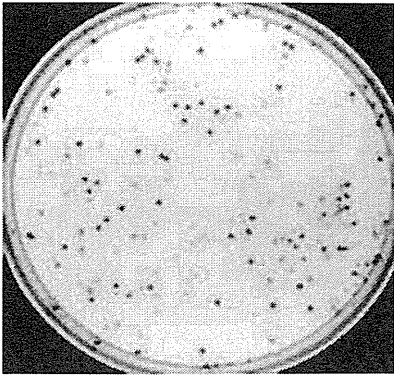


図 6. CHROMagar Salmonella における *S. Enteritidis* の発育状況
S. Enteritidis は本培地上で藤色集落を呈し、亜種 2 の *S. Arizonae* は青色集落を呈する（左側）。
右側は *S. Enteritidis* を画像解析により抽出した写真。

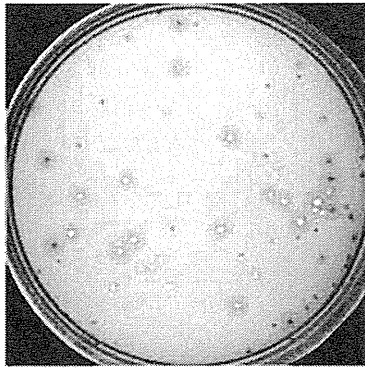
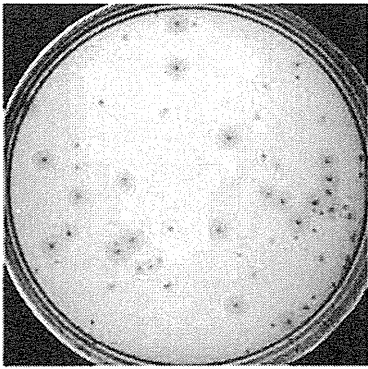


図 7. CHROMagar Listeria における *L. monocytogenes* の発育
L. monocytogenes は本培地上で青色集落を呈し、かつハロー形成を見る。

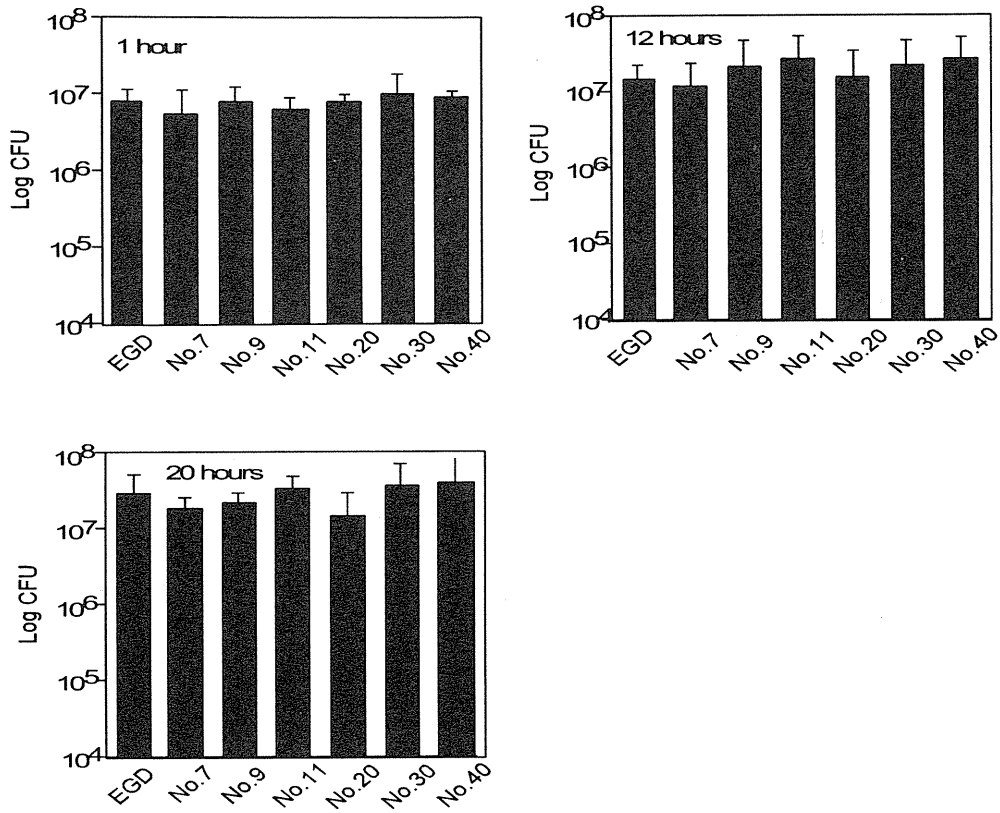


図8 リステリアのHeLa細胞内増殖
HeLa細胞はNo. 7, No. 9, No. 11, No. 20, No. 30, No. 40, EGDで感染させた。

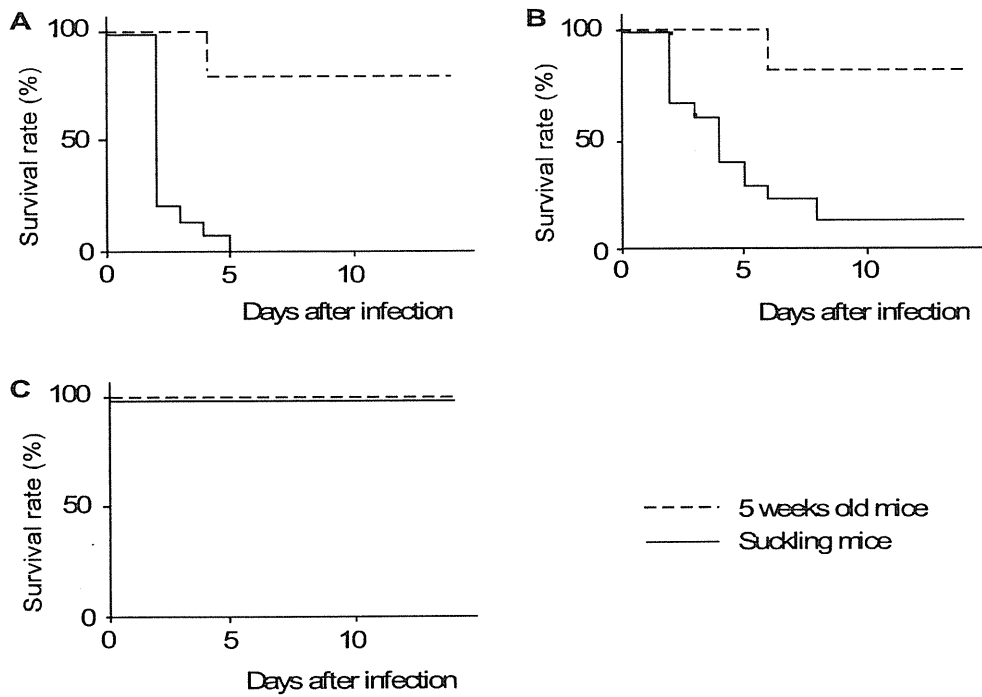


図9 乳飲みマウスと5週令マウスへの感染実験
(A) Okutani-6, (B) EGD, (C) EGD耐菌性喪失変異株

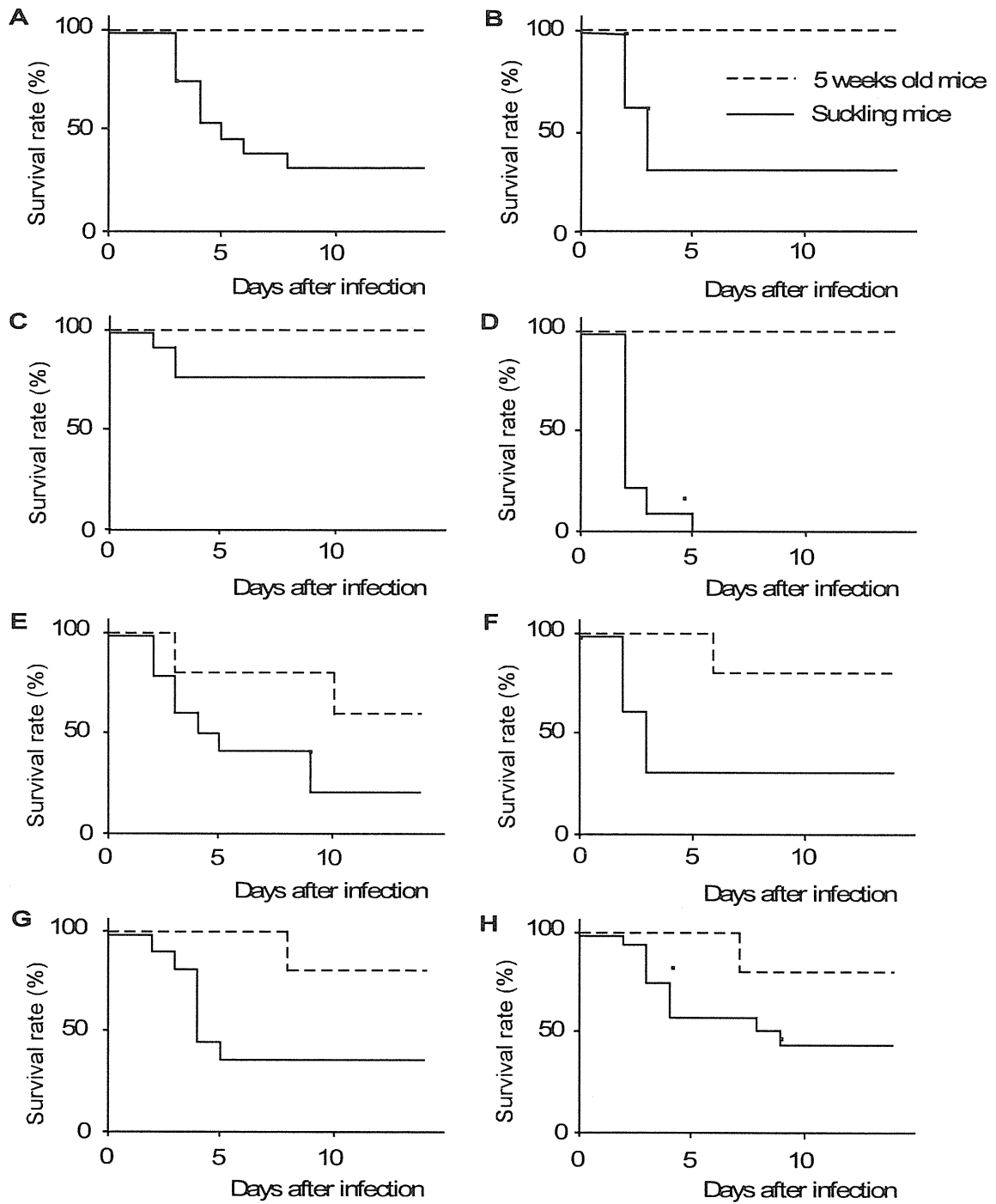


図10. 乳飲みマウスと5週令マウスへの感染実験

(A)No. 7、(B)No. 20、(C)No. 41、(D)No. 51、(E)No. 62、(F)Okutani-6、(G)No. 00110、(H)No. 00065.

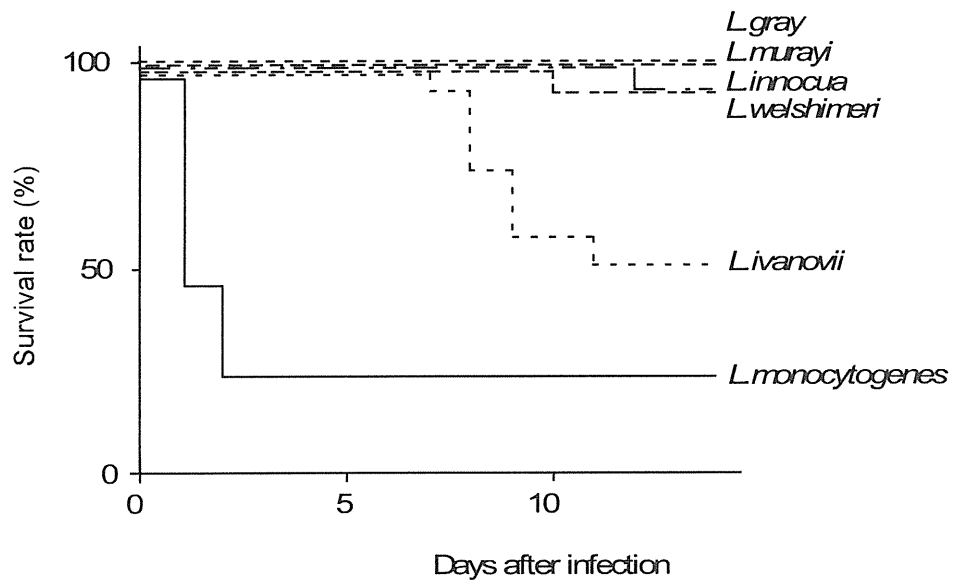


図11. 乳飲みマウスと5週令マウスへの感染実験
各種リステリア属菌の病原性