

## 別紙

検査検体依頼病院担当者殿

この手紙は以下の趣旨により貴病院に検査の同意を得るために送付いたしました。

私共は平成13年度より厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)で、「国内で発生しているリステリア症の実態を掌握し、市販食品からリステリアの分離される事実との因果関係につき研究し、食品衛生の立場から本菌の制御に関する行政的な方向性を示す。」ために、「食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究」を実施しております。本研究の目的等は別紙を参照下さい。一昨年北海道においてリステリア汚染チーズを喫食した数名からリステリアが分離され、胃腸炎や軽い風邪様症状を呈する事例が発生しました。その際リステリアと胃腸炎の因果関係は明らかにされませんが、下痢患者便からリステリアがどの程度分離されるのか、未だに科学的に調査されたケースは少ないのが現状です。私どもは、下痢便からどの程度リステリアが分離されるのか明らかにすることで、リステリアと胃腸炎との関係がある程度類推できると考えております。つきましては、貴病院からの同意が得られれば、下痢便の検査項目にリステリアの検査を導入したいと考えております。以下、実施項目等について記載しますが、この検査を株式会社エスアールエス北海道に依頼する予定です。もしも、株式会社エスアールエス北海道とお取引があり、検査を依頼される場合、よろしくご協力のほどお願いいたします。なお、ご協力いただける場合は、同封の同意書に捺印の上返信用封筒にて返送頂ければ幸いです。どうぞご協力のほど宜しくお願いいたします。

### 記

1. 下痢便の検査項目にリステリアの検査項目を追加する。
2. 必要な追加検査費用は当研究班が負担する。
3. 検査結果は他の検査項目とともに、貴病院に知らせる。
4. 同じく、検査結果は当班研究の報告書にて利用し、公表する。
5. 患者の氏名は原則として求めないが、必要が生じた場合は改めて同意を得る。
6. 本研究は、国立医薬品食品衛生研究所の研究倫理審査会の了承を得ている。

以上、お忙しいところお手数をおかけ致しますが、ご協力お願い申し上げます。

問い合わせ先: 〒080-8555 北海道帯広市稲田町西2線11

帯広畜産大学

大動物特殊疾病研究センター

食品有害微生物研究分野

教授 牧野壮一

TEL & FAX : 0155-49-5386

E-mail : smakino@obihiro.ac.jp

## 臨床検体の医学研究への使用に関する同意書

帯広畜産大学 大動物特殊疾病研究センター  
有害食品微生物分野 教授 牧野壮一 殿

私は、臨床検体（下痢便）の医学研究への使用について、下記の点について同意いたします。

記

1. 下痢便の検査項目にリステリアの検査項目を追加する。
2. 必要な追加検査費用は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」研究班（主任研究者名：五十君静信（国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・室長））が負担する。
3. 検査結果は他の検査項目とともに、貴病院に知らせる。
4. 同じく、検査結果は当班研究の報告書にて利用し、公表する。
5. 患者の氏名は原則として求めないが、必要が生じた場合は改めて同意を得る。

担当医の氏名及び住所

---

印

---

## 研究課題に関する情報

1. 課題名：食品由来のリストeria菌の健康被害に関する研究
2. 主任研究者名：五十君 静信（国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・室長）
3. 分担研究者名：  
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）
4. 研究の目的と概要：

国内で発生しているリストeria症の実態を掌握し、市販食品からリストeriaの分離される事実との因果関係につき研究し、食品衛生の立場から本菌の制御に関する行政的な方向性を示す。
5. 研究の対象、実施場所及び実施期間  
リストeria症患者に対して、その発症と食品の関連につき調査研究を行う。分離菌株、血液等の提供を受け、疫学的検討を行う。食中毒事例につき、臨床検体からのリストeria分離を試み、検出された場合は、臨床的な検討を行う。検体からの分離は分担研究者が行い、血液等の診断は主任者が国衛研で行う。実施期間は、平成16年3月31日までとする。
6. 研究計画について

### (1) 研究の目的と科学的意義を明確にし、研究によって生ずる倫理的危険性と研究上の成果の総合判断

近年、海外ではリストeriaを原因とする食品を介した集団食中毒事件が多発している。しかし、わが国においては、食品を介したリストeria症の集団発生はまだ確認されていない。一方、国内の市販食品のリストeria汚染実態調査によれば、その汚染状況は海外とほぼ同様なレベルにあり、これらの食品を介したリストeria症の集団発生はいつ起こっても不思議ではない。2001年には、疑わしい事例が北海道で記録されたが、諸般の事情からリストeria症の確定には至らなかった。本研究では、国内において、食品を介したリストeria症が発生している事を確認すると共に、その制御法を探ることを目的とする。研究班の調査により、わが国の重症化したリストeria症の発生は年間約80例と推定され、敗血症、髄膜炎を発症し、致命率も高い。しかるに、その感染ルートは明らかにされておらず、感染防御の方法はない。海外で示されたような食品を介した感染ルートが明らかになれば、食品汚染を制御することにより、その発症は未然に防止可能となる。

- (2) 研究対象となる「人体より採取した材料」提供者の人権の擁護  
試料の提供依頼および説明は、担当医師を通じて行い、研究の趣旨の理解を受けた上で賛同を得られた場合提供していただく。提供を受けた臨床材料等は、提供者名を数値に変換し管理する。臨床データは別に保管し、個人名の特定がされないよう管理する。検体のDNA解析は、病原体DNAに対してのみ行い、ヒトゲノムに関する検討は行わない。得られた研究成果を発表する場合は、その発表形態に注意し、個人が特定されることがないように配慮する。
- (3) 「人体より採取した材料」提供者から同意を得る方法  
研究は「疫学研究に関する倫理指針」に従い実施し、事前に対象者からインフォームド・コンセントを受ける。本研究では、リストeria症患者、食中毒事例、および対照として健康人からの材料について検討を行う。それぞれの具体的取扱については、別紙参照。①リストeria症患者からの材料提供は、あらかじめ説明を行ったうえで賛同を得られた主治医に、本研究の内容を患者に説明をしていただき、同意が得られた場合、血液、体液、糞便および生活環境からのふき取り等の検体をお願いする。②食中毒事例の場合は、他の食中毒菌検査と同時にリストeria分離培地による分離を試みる。リストeriaの分離された検体については、上述①と同様な手順で主治医を通じ検体の提供をお願いする。③対照としての健康人の血液検体については、香川大医学部で行い、本研究の内容をボランティア（提供者）に説明し、同意が得られた場合、血液の採取を行う。
- (4) その他

本症は、その殆どが重症化しはじめてリステリア症であることが判明する。感染初期は症状による特定が困難で、このため感染ルートを特定することは難しい。食品を介した発症であるかを明らかにするには、感染初期にリステリア症と判断することが可能と思われる、血液を用いた診断手法の確立が必要である。研究班の開発した血液を用いた検査法の評価には実際の患者と健康人の試料を用いた検討が必須である。

## *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎的研究(Ⅲ) *L. monocytogenes* 分離菌株の培養細胞における侵入性に関する研究

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 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 助教授  
落合由嗣 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 助手  
山田文也 埼玉県衛生研究所感染症疫学情報担当 専門研究員  
小笠原邦敏 横浜検疫所輸入食品検疫検査センター 副統括検査  
官

研究要旨: リステリア症および汚染食肉由来で最も多く分離された、血清型、1/2a、1/2b、4bの菌株における、Caco-2およびVero培養細胞を用いた細胞侵入能の比較解析から病原性との関連性を解析した。

- 1) 培養細胞における*L. monocytogenes* (*L.m*) 分離菌株の侵入能は、感染菌の感染中心(MOI)に依存することが示唆された。Caco-2培養細胞ではMOI・1-50で回収率5%およびVero培養細胞ではMOI・10で回収率14%で、MOIが上がると侵入率は低下の傾向を示した。
- 2) *L.m*分離菌株間での侵入能は、血清型、1/2a、4b株で高い傾向を示し、同一血清型の菌株間においてもその侵入能は異なることが判明した。また、ヒト・リストeria症(敗血症患者、髄膜炎患者)由来分離菌株は全て高い侵入性を示した。
- 3) 培養細胞における*L.m*分離菌株の侵入性に関する病理形態学的所見では、侵入能に差異を示した各分離菌株間において、散在性の局在で、同一の侵入形態をとることが判明した。

### A. 研究目的

現在までに、市販および輸入食肉における*Listeria monocytogenes*(*L.m*)の汚染状況に関する分子疫学的解析から、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。

1) 汚染食肉とヒト・リストeria症との関連性に関する研究では、ヒト・リストeria症(敗血症患者、髄膜炎患者)および食肉汚染由来*L.m*・血清型1/2aおよび4b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・リストeria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(平成13年度、平成14年度の研究報告書)。

2) 輸入食肉の汚染状況に関する分子疫学的研究では、2001年に輸入した食肉から各血清型の*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(平成14年度

の研究報告書)。

以上の成績を基にして、汚染食肉およびヒト・リストeria症由来の各分離菌株における培養細胞での侵入性に関する比較解析を試み、各分離菌株間における細胞侵入能の形態学的特性を解明し、病原性との関連性を考察することを目的とした。

### B. 研究方法

1) 使用菌株: 実験に使用した菌株を表1に示した。菌の前培養は、4℃で普通寒天上に保存した菌を実験毎にBHI agar (Difco)で37℃ 18時間培養した。侵入性試験には、前培養した菌の1コロニーをBHI broth (Difco)で37℃ 13時間振とう培養したものを使用した。

2) 培養細胞と培養液: Caco-2細胞(human colonic enterocyte-like cell Line)とVero細胞(monkey kidney cell Line)は、いずれも5% fetal bovine serum加Minimum Essential Medium(MEM, Gibco)で、5% CO<sub>2</sub> 37℃の条件で継代培養した。細胞数はNeubauer血球計算版(hemocytometer)を用いて算出し、24wellのculture plate(FALCON)に接種し、5% CO<sub>2</sub> 37℃

で72時間培養した。侵入性試験には、Caco-2細胞で $1.0 \times 10^5 \sim 5.3 \times 10^5$ /wellの細胞を、Vero細胞で $1.6 \times 10^5 \sim 8.9 \times 10^5$ /wellの細胞を用いた。

3) 細胞侵入試験：菌株は、PBSで2回洗浄(3000rpm/10min)後、MEMで希釈し、各wellに0.2mlずつ接種した。接種菌数は、菌の希釈液を0.6% yeast-extract加Trypticase soya agar(BBL)に接種(plating)し48時間培養後、菌数(colony forming unit)を数えた。感染中心(MOI)は実験毎に24wellのプレート上の2 wellの細胞数を数え、接種菌数を細胞数で除して求めた。24wellのculture plateに培養した各細胞は、PBSで洗浄後、MEMで希釈した菌液を各wellに0.2mlずつ接種し、5% CO<sub>2</sub> 37°Cで2時間静置した。さらに、接種2時間後上清を吸引除去、PBSで2回洗浄し、40 µg/ml gentamicin加MEMを各wellに1mlずつ加え、5% CO<sub>2</sub> 37°Cでさらに2時間静置した。回収菌数は、菌を接種した細胞を、PBSで2回洗浄後、氷冷した0.5% TritonX-100加D.W. 1mlを加えて細胞を溶解し、PBSで段階希釈後、0.6% yeast-extract加TSAに接種し、37°C、48時間培養後に平板上のコロニーを数えた。

4) 菌体の蛍光とE-アクチンの2重染色：菌の侵入形態の観察には、カバースリップ上に培養したCaco-2細胞とVero細胞を用い、細胞侵入試験と同じ処理を行った。標本は、感染細胞を4% パラフォルムアルデヒドで20分固定後、50mM NH<sub>4</sub>Cl 2で洗浄した。2重染色は、200倍希釈した抗L. monocytogenes抗体(栄研化学)で1時間静置し、PBSで3回洗浄後FITC標識抗ウサギIgGヤギ抗体と Rhodamine-coupled phalloidinで1時間染色した。標本の観察は、共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss)を用いて行った。

○倫理面での配慮：ヒト・リステリア症由来の各分離菌株は、すでに、東京大学医科学研究所・移植外科(銘形和彦博士、現職・メデカルクリニック中目黒・院長)および久留米大学・医学部・第一内科(庄司紘史教授)で症例報告された菌株である。

## C. 研究結果

### 1. Caco-2および Vero培養細胞におけるL.mの侵入能

ヒト由来血清型4b(H2)株を用いて、Caco-2細胞とVero細胞におけるL.mの侵入性の特徴を定量的に検討した(本実験では感染中心(MOI)の条件として1~200を用いた)。L.mを各MOIの条件下で接種し、感染2時間後の細胞からの回収菌数と接種菌数の比率から出された侵入能を図1に示した。

1) MOIの上昇に従って細胞当たりの接種菌数は増加してしているが、Caco-2ではMOI・1から200の条件下で、菌の回収率は3~6%前後であり差は認められなかった。

2) Vero細胞ではMOIの増加に伴って菌の回収率は増加し、MOI・10で15.4%を示した。その後、MOIを上げるにしたがって回収率は低下し、MOI・50以上で最低率を示した。

以上の結果から、Vero細胞およびCaco-2細胞における本菌の侵入能はMOIに依存することが判明した。また、この現象はVero細胞において特に顕著であった。

### 2. Vero培養細胞におけるL.m分離菌株の侵入能

最も高い回収率が得られたMOI・10の条件下で、ヒト由来L.m株(5株)および汚染食肉由来株(15株)について、菌株間の細胞侵入能の比較を行った(この実験ではヒト由来血清型4b、H2株を実験毎に対照として使用した)。その結果を図2に示した。

1) ヒト由来のH2株の回収率は12.5から21%で、平均値は15.4%であった。H2株と同様10%以上の高い回収率を示した株は、20株中9株であった。血清型別では、1/2aおよび4b株に10%以上の高い回収率の株が偏る傾向が認められた。また、血清型1/2aと4b株間では、L96-11P1株とL97-28P1株がそれぞれ著しく低い回収率を示した。一方、血清型1/2bと1/2c株間では、L96-6C1株とL98-76P1株がそれぞれ著しく高い回収率を示した。以上から、同一血清型の株において、異なる侵入能を保有する菌株の存在が示唆された。

2) ヒトおよび汚染食肉由来株間における回収率の比較解析では、ヒト由来・血清型1/2a株の3株および4b株の2株はいずれも10%以上の高い回収率を示した。これに対して、汚染食肉由来株の15株では、ヒト由来株と異なり株間での回収率に大きな差が認められ、15株中10株での回収率は5%以下であったが、血清型1/2a株のL98-76P2とL98-80C1、血清型1/2b株のL96-6C1、血清型1/2c株のL98-76P1、および血清型4b株のL98-82B1の5株はヒト由来のH2株と同様の高い回収率を示した。以上の結果により、細胞侵入能とヒトへの病原性との関連性が強く示唆された。

### 3. Vero培養細胞におけるL.mの侵入性に関する病理形態学的解析

回収率の解析と同条件下でVero培養細胞にL.m菌株を感染させ、FITCとphalloidinを用いた2重染色により、その侵入状態について病理形態学的解析を試みた。侵入能の低い株(L96-23C1株)および高い株(H2株)を用い、Phalloidin染色による成績(写真1:A,D,G)およびFITC染色での成績(写真1:B,E,H)との重合した成績(写真1:G,F,I)を基に解析した。その結果を写真1に示した。

1) 各L.m菌株を取り囲む様なE-アクチンとの重合像が観察され、各菌株が細胞質内への侵入状態にあることが確認された。また、細胞質内に侵入した菌株の分裂像は観察されなかった。

2) 侵入能の低い株(L96-23C1株)および高い株(H2株)間の比較観察では、E-アクチンとの重合性に関する形態像は同一で、両者株間における侵入形態には差異のないことが示唆された。

## D. 考察

ヒトのリステリア症は、主に免疫機能の低下を伴う基礎疾患をもつ患者、高齢者、妊産婦や新生児に、髄膜炎や敗血症等を引き起こす日和見感染症で、頻度は低いが発症すると致死率は極めて高いのが特徴である。欧米では食中毒事例の報告も多く、公衆衛生上の問題としても重要視されているが、本邦における食中毒事例の報告は皆無である。また、リステリア症の起病病原体であるL.mは、通性細胞内寄生菌で、病原性は感染初期における菌の細胞侵入性とその後後の組織内拡散性で決定されると考えられてい

る。従って、L.mの細胞侵入と拡散過程に関する特性を詳細に検討することは、感染の成立を理解するうえで重要と考えられる。

L.mの病原因子の解析のために、感染モデルとして培養細胞が一般的に用いられている。使用される培養細胞としてはCaco-2細胞が多いが、この細胞に対するL.mの侵入率に関しては、問題点も指摘されている。従って、本研究ではCaco-2細胞とは異なる侵入性をもつと考えられるVero細胞をとりあげ、両者に対するL.mの侵入性を定量的および形態的に解析し、汚染食肉由来株とリステリア症由来株との侵入能について検討した。その結果、Caco-2およびVero培養細胞系で感染菌のMOIに依存性があること、ヒト・リステリア症に由来する全ての菌株で侵入能が高いこと、食肉由来で同一血清型の菌株間においてもその侵入能は異なっていることから考察すると、病原性と感染・発病との関連性に感染菌株の侵入能が大きく関与しているものと考えられる。

また、侵入能の低い株および高い株間における侵入形態の比較観察では、そのアクチンの重合性に関する形態像は同一で、両者株間における侵入形態には差異のないことが示唆される。以上の結果を視点において、病原性と感染・発病に至る過程での種々要因を加味して考察すると、L.mは細胞内寄生菌であることから、病原性の強さは感染初期段階における菌体の細胞侵入能により決定付けられ、そのエンドサイトーシスの誘発、ファゴソーム膜の破壊および細胞質内での増殖、フィラメント状のアクチンの凝集による運動性の獲得および細胞間の移動等の菌体の特性と宿主細胞側との複雑な相互作用に強く依存するものと考えられる。グラム陰性菌のShigellaとよく類似するところである。

## E. 結論

Listeria monocytogenesの細胞侵入性に関する病理学的解析を、培養細胞を用いて、各分離・血清型の菌株間で検討した。培養細胞系で感染菌のMOIに依存性があること、ヒト・リステリア症に由来する菌株では全ての株で侵入能が高いこと、食肉由来で同一血清型の菌株間においてもその侵入能は異なっていることから考察すると、病原性と感染・発病との関連性に感染菌株の侵入能が大きく関与しているものと考えられる。

## F. 健康危険情報

本邦において、常在性汚染による食品汚染の蔓延とリステリア症の散発的な発生が増加している傾向が伺われる。汚染食肉等の食品を媒介したヒトへの感染防止対策に十分な配慮が必要かと考える。

## G. 研究発表

1. 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*の非貪食性細胞侵入能に関する基礎的研究。感染症学雑誌76臨時増刊号p.137(第76回日本感染症学会総会学術講演抄録)。

2. 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。

*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎的研究(4)食肉とヒト由来血清型4b株におけるiap遺伝子の比較解析。第133回日本獣医学会。2002.3.28~30。(講演要旨集p.129)

3. 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。2002.9.19~21。(講演要旨集p.199)

4. 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。2002.10.4~5(学術集会・抄録集p.47)

5. 勇上恭子、小笠原邦敏、山田文也、庄司紘史、落合由嗣、植田富貴子、本藤良。

*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎的研究4.食肉とヒト由来血清型1/2a株におけるiap遺伝子の比較解析。第135回日本獣医学会。2002.3.30~4.1。(講演要旨集p.153)

6. Fukiko UEDA, Miho SUGAMATA, Miki AOTA, Mariko MOCHIZUKI, Fumiya YAMADA and Ryo HONDO. Swift and definite serotyping

for isolated *Listeria monocytogenes* strains. Microbiologica 25, 165-171, 2002.

7. Fukiko UEDA, Reiko ANAHARA, Fumiya YAMADA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu OCHIAI and Ryo HONDO. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* contamination in marketed Japanese meat. International Journal of Food Microbiology (submitted).
8. Fumiya YAMADA, Yoshitsugu OCHIAI, Fukiko UEDA, Mariko MOCHIZUKI, Kunitoshi OGASAWARA, Hiroshi Shoji, Kiyoko Ogawa-Goto, Tetsutaro SATA and Ryo HONDO. Comparison of the invasion ability into Vero cells among *Listeria monocytogenes* from meats and listeriosis patients. Applied and Environmental Microbiology (submitted).
9. Fukiko UEDA, Miho SUGAMATA, Miki AOTA, Fumiya YAMADA, Kunitoshi OGASAWARA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu OCHIAI and Ryo HONDO. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes*, serovar 4b: Relation among the strains isolated from a patient and marketed Japanese meat. Journal of Food Protection (submitted).
10. Fukiko UEDA, Kyoko YUGAMI, Fumiya YAMADA, Kunitoshi OGASAWARA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu OCHIAI and Ryo HONDO. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes*, serovar 1/2a: Relation among the strains isolated from a patient and marketed Japanese meat. Journal of Food Protection (submitted).



表1. 検体：リステリア・モノサイトジェネス分離株

Strain	Serotype	Source	Strain	Serotype	Source
H2	4b	Human	L98-76P2	1/2c	Pork
L96-HM1	1/2a	Human	L98-76P2	1/2a	Pork
L96-HM2	1/2a	Human	L98-78P1	1/2a	Pork
L2K1-11H	4b	Human	L96-6C1	1/2b	Chicken
L2K1-12H	1/2a	Human	L96-9C1	1/2b	Chicken
L98-82B1	4b	Beef	L96-17C1	1/2b	Chicken
L97-28P1	4b	Pork	L96-23C1	1/2b	Chicken
L96-11P1	1/2a	Pork	L97-63C1	1/2b	Chicken
L98-75P1	1/2c	Pork	L98-79C1	1/2b	Chicken
L98-76P1	1/2a	Pork	L98-80C1	1/2a	Chicken

図1. Caco2およびVero培養細胞におけるL.mの侵入能

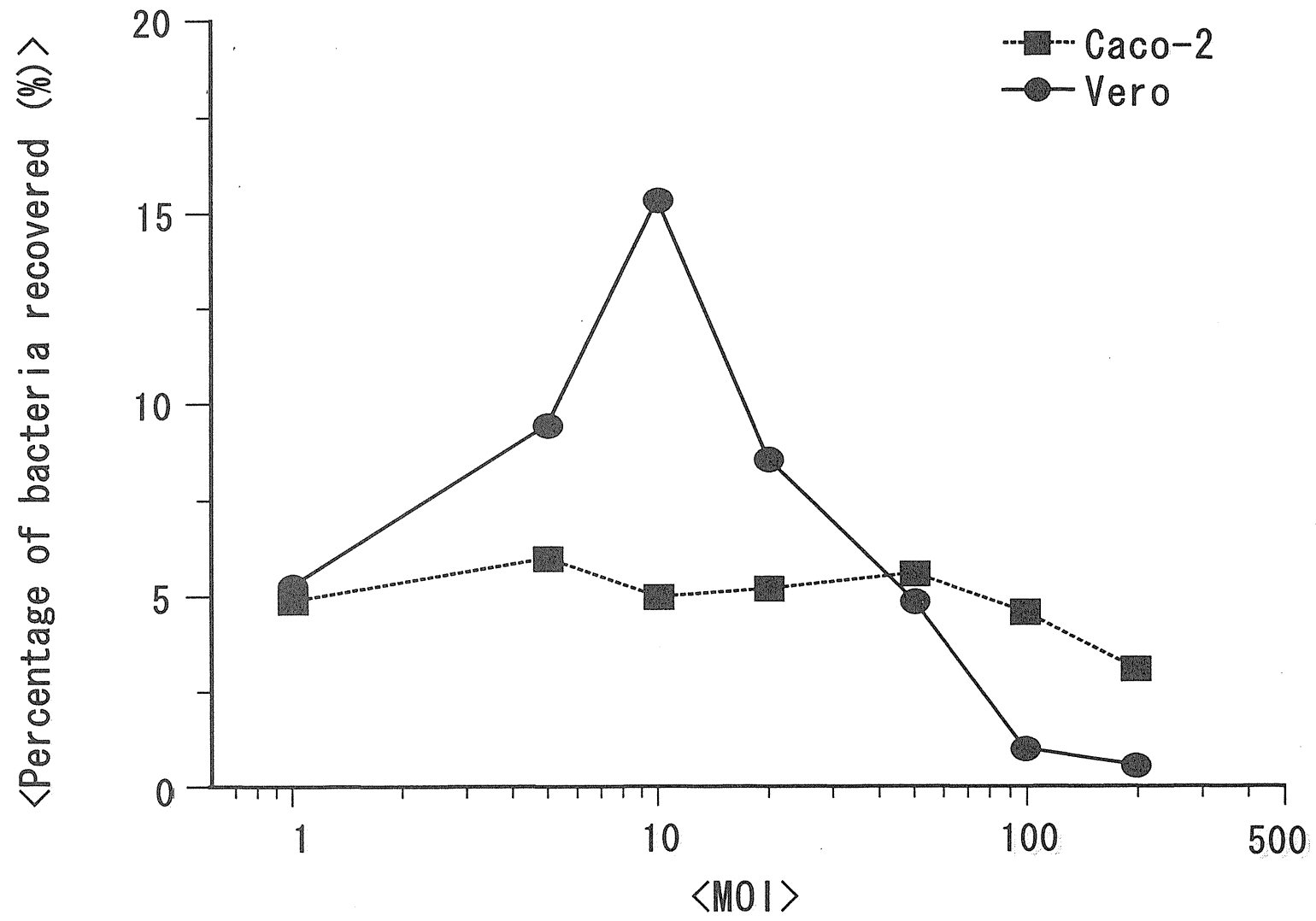


図2. Vero培養細胞におけるL.m分離菌株の侵入能

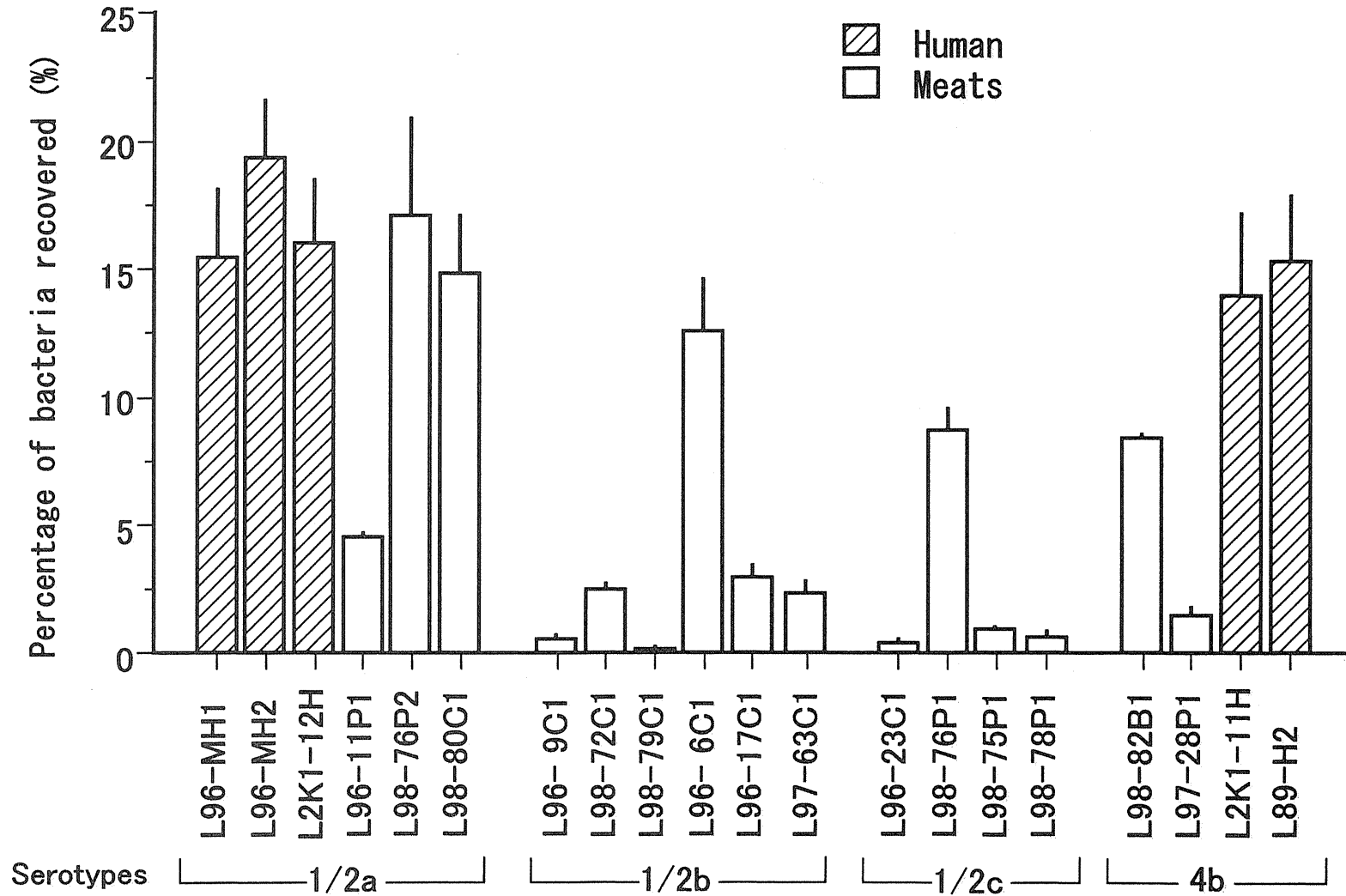
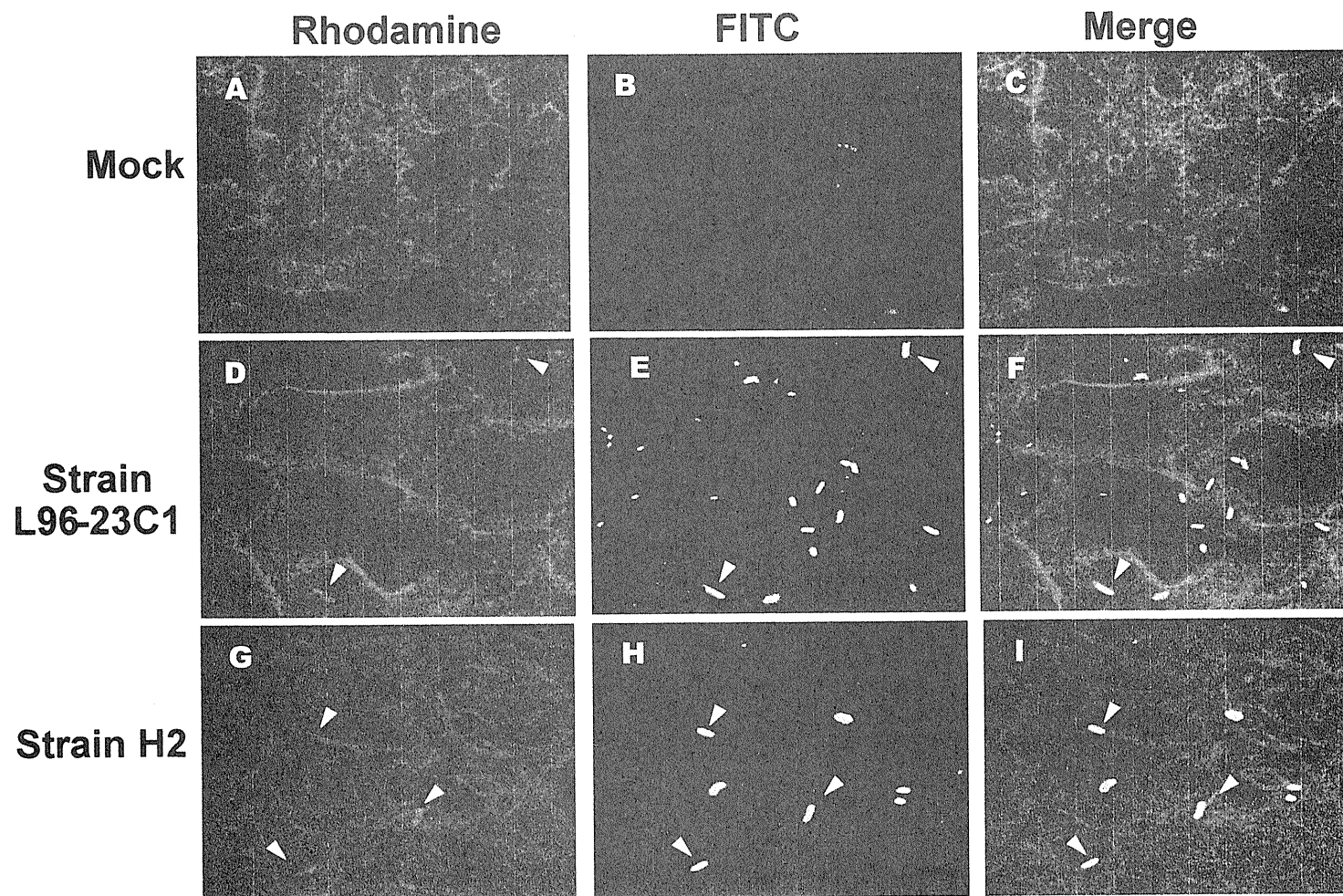


写真1.

Vero培養細胞におけるL.mの侵入性に関する病理形態学的解析



厚生労働科学研究補助金（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（主任研究者 五十君静信）  
（分担研究報告書）

わが国におけるヒト・リステリア症の発生状況 — 1958年～2001年 —

分担研究者 寺尾 通徳

新潟大学医学部保健学科検査技術科学 助教授

## 研究要旨

ヒトのリステリア症（Listeriosis; L症）は、起因菌をリステリア菌（*Listeria monocytogenes*; L菌）とする早期の診断と治療が求められる感染症である。わが国のL症は散発的発生事例のみであり、その実態の詳細は不明であった。そこで、本研究では、わが国の初発症例から2001年12月末までの分担研究者が知り得た症例の年次推移、月別発生状況、発生地、患者の性別、年齢分布、病型、転帰、分離菌株の血清型、治療抗生剤及び基礎疾患の有無等のデータを収集して検討し、今後の防疫体制の強化のための施策資料を提供することを目的にした。

わが国のヒトの初発L症は、1958年の8月に山形県の髄膜炎患者からの症例として報告されている。それ以後散発的ではあるが毎年全国各地で発生しており、2001年12月末までに累計796症例が認められた。患者の性別は男性440例、女性353例、不詳3例であり、年齢別では5歳以下の新生児及び乳幼児371例（46.6%）、満20歳以上の成人からの症例は387例である（不明1例）。特に、2歳～5歳の症例数が131例（16.5%）と多く、わが国のL症を特徴づけている。また、6歳から19歳までの症例数は37例と極めて少なかった。人口100万人あたりの発症率は、0.53と見積もられた。患者の病型別では、髄膜炎が64%を占め、次いで（胎児）敗血症で全体の96.6%を占めていた。患者の転帰は、治癒563例、死亡226例で致命率28.4%であるが、成人では白血病、肝硬変及、SLE及び糖尿病等の基礎疾患をもち免疫機能の低下している患者からの致命率（40.3%）が高かった。しかし、近年の適切な化学療法により致命率の低下が認められた。血清型別では1/2b型が26.4%、4b型が59.9%と両菌型で86.3%とL症の二大菌型であった。近年の傾向として、1/2a、1/2cを含めた1型菌による症例の増加が注目された。患者の発生地は本州各地、四国、九州及び沖縄と全国都道府県に分布している。患者の治療に用いられた化学療法剤は、AB-PCが第一選択剤として使用され、AMK、GM、IPM/CS等を併用しながら治療効果を挙げていた。

これらの結果から、今後早期にL症とL菌の完全なサーベイランスシステムの構築と導入を行って致命率の高いヒトのL症の長期的な防疫体制の強化を目指すべきものと考えられた。

## A. 研究目的

ヒトのL症は、致命率が高く早期の診断と治療が求められる感染症である。原因菌であるL菌は、ヒトの臨床材料のみならず食品、食肉及び環境からも分離されることが多く、重要な食品媒介性病原菌の1菌種として位置づけられている。

わが国におけるヒトのL症は、1958年に山形県で発生した髄膜炎患者からの症例報告が最初である。それ以後散発的ではあるが毎年症例の発生が認められており、今後諸外国の例にあるように食品を介して大規模な集団発生が危惧されている。L症の集団発生を未然に防止するためにも過去の散発事例の実態を詳細に分析し把握する必要がある。しかし、わが国では、L症及びL菌を対象にしたサーベイランスシステムが確立されていないことから、正確なデータを得るには限界がある。以前のL症の発生件数は、研究者の自発的な報告に基づいており、実際の発生数より低く見積もられていると考えられるので、その分析と解釈には慎重にならざるを得ない。しかし、継続的に症例と菌株を収集してきた分担研究者は、日本のL症の概要を不完全ながら把握してきていると考えている。

そこで、本研究では、ヒトのL症由来菌株の同定・血清型別を行った症例についての疫学データの収集を行って、わが国におけるL症の実態とその背景について把握検討し、諸外国の例と比較検討を行って、ヒトL症の感染実態の特性を明らかにすることを目的にした。

## B. 研究方法

### 1. L症患者由来分離株の同定

全国の医療機関及び検査機関等からL症起因菌として同定・血清型別を依頼された菌株について同定した(表1)。同定・血清型別結果は依頼者宛に報告を行った。

### 2. 疫学諸データの収集

L菌と同定された症例について、菌株の背景を知るために疫学的諸データを収集した。収集内容は、1.依頼菌株番号 2.発生年月 3.発生都道府県名 4.性別 5.年齢 6.病型 7.検査材料 8.転帰 9.血清型 10.基礎疾患 11.化学療法剤 12.医療機関名 13.備考である。

### 3. 血清型別法

血清型別は、リステリア標準菌株に対する自家製家兔免疫血清(表2)を用いて、分離L菌の抗O血清によるO抗原定量凝集反応及びO因子血清によるスライド凝集(表3)並びにH因子血清による試験管凝集反応によった(表4)。一部の菌株はリステリア型別用免疫血清「生研」を用いた。

### 4. データの解析

わが国の初発症例から2001年12月末までの分担研究者が知り得た症例の年次推移、月別発生状況、発生地、患者の性別、年齢分布、病型、転帰、分離菌株の血清型、治療抗生剤、薬剤感受性及び基礎疾患の有無等のデータを収集して検討した。併せて、WHOの1992年の統計「HUMAN LISTERIOSIS-1990」や最近の諸外国のデータと比較検討し、その異同とこれからの問題点について検討した。

## C. 研究結果と考察

### 1. リステリア症の発生状況

わが国で発生したヒトのL症は、1958年の8月に山形県で髄膜炎患者及び11月に北

海道で胎児敗血症性肉芽腫症患者から独立に症例が報告された。それ以後散発的ではあるが毎年全国各地で発生しており、2001年12月末までに累計796症例が認められた(図1)。初発症例が報告された翌年の症例発生は無かったが、1972年頃から漸増し1979年には40症例を数えた。その後1982年には期間を通じ最大の62症例が報告されたが、以後減少した。人口100万人あたりの発生率は0.53であった。1996年以降、症例が減少しているのは、私共が協力して作製された『リステリア型別用免疫血清「生研」』が市販され、研究者が望めば使用できる環境が整ったことも原因の一つと考えられる。初発から1995年までの発生率は0.2であった。

日本のリステリア症の年間発生率(散発事例)は、人口100万人あたり0.53と低発生率であるが、スペインでは10.9、フランスでは14.7と高率である。ヨーロッパ、米国では2~8であるが、3~10倍の事例が隠れていると考えられている。同様に、わが国の発生率0.53は低率であり、その数倍が潜在化していると考えられる。食生活及び食品の低温流過程が欧米化している状況において、国内では、まだチーズやソーセージ等を家庭で作る習慣が普及していないものの自家製の乳製品等の健康食品を嗜好する傾向があるため、今後もL症は増加すると考えられる。

L症の月別発生状況を図2に示した。発生頻度が高い月は、初夏から夏季の5月~7月であった。以前は12月~1月と夏季の二峰性を示しており、L菌が低温でも十分に増殖できる性質を持つことを考えると食品の低温流過程の発達と食生活の多様化が影響しているものと推定される。

## 2. 発生都道府県

患者の発生地は本州各地、四国、九州及び沖縄と全国都道府県に分布している(表5、図3)。県別の発生状況では、東京の120症例を筆頭に北海道、神奈川及び福岡の都市化の進んでいる都道府県からの症例報告が多いが、人口比別では、青森、秋田、鳥取及び新潟からの症例発生数が多かった。このことは、L症発生に地域差があるのかどうかの詳細は検討していないが、少なくともL症に関心を抱いている医療関係者の存在の有無が無視できないことは明らかである。

## 3. 患者の性別と年齢分布

患者の性別は表6に示すように、男性440例、女性353例、不詳3例であった。

年齢別では5歳以下の新生児及び乳幼児371例(46.6%)、満20歳以上の成人からの症例は387例である(不明1例)(図4)。特に、1歳以上~5歳の症例数が131例(16.5%)と多く、わが国のL症を特徴づけている(図14)。これは、特に1歳から2歳までの症例が多いためである(図5)。また、6歳から19歳までの症例数が37例と極めて少なく、L菌が免疫抵抗力の減弱した者に感染し重篤な症状を起こす日和見感染菌的な様相を示している。

## 4. 患者の病型

患者の病型別では、図6に示すように、髄膜炎が圧倒的に多く、次いで敗血症及び胎児敗血症で全体の96.6%を占めている。また、外国と比較すると髄膜炎が占める割合が高い点も特徴の一つといえる(図15)。胎児敗血症は妊産婦関連の疾病として重要である。このように、L症の主要な病型は髄膜炎と敗血症であるが、L菌感染による髄膜炎患者の臨

床症状及び髄液の検査所見は一般的な細菌感染による化膿性髄膜炎と臨床的には大差なく、高齢者では髄膜炎時も典型的な髄膜刺激症状を呈さず、診断には注意を要する場合がある。L症の確定診断には髄液、血液等の検査材料から菌の分離同定が必須であるのは、治療する抗生剤の選択に関わる重要な留意点であるからである。

#### 5. 検査材料

検査材料の内訳は、図7に示すように、髄液と血液で95%を占めており、L菌を分離するための二大検体といえる。胎児敗血症の場合は、胎脂をはじめあらゆる部位が検査材料となっている。

#### 6. 患者の転帰

患者の転帰は、治癒563例、死亡226例で致命率28.4%であるが(表6, 図8, 図9)、成人では白血病、肝硬変及び糖尿病等の基礎疾患をもち免疫機能の低下している患者からの死亡率が高く、その致命率は40.3%である。全症例のおよそ30%にあたる241例に基礎疾患が認められた。主な疾患は、慢性骨髄性白血病や悪性リンパ腫等の血液疾患が計72例、肝硬変が34例、SLE28例、糖尿病が21例、気管支喘息を含む肺炎が17例、癌が15例及び腎炎、腎移植等基礎疾患を有する例は14症例であった。

#### 7. 薬剤感受性と治療抗生剤

L症は、特に基礎疾患を有する患者からの発生率が高く、その治癒率は早期診断による適切な化学療法に依存しているため、分離当初から現在までのL菌の473株について薬剤感受性の推移を比較検討した。

その結果、ABPC、TOB、TC、EM、GM及びRFPに高い感受性を示したが、第三世代

の $\beta$ -Lactamase 安定性セフェム系類に対しては菌種特異的に耐性を示した(表7)。従って、L症を疑いセファロsporin類を使用する場合、特に薬剤の選択に留意する必要があるものと思われる。また分離年度及び菌型の相違によるMIC値にも有意の差はなかった。しかし、近年の症例では、CP、ABPC、EM及びTC耐性菌が分離される症例があり、今後の動向に注意したい。実際に患者の治療に用いられている化学療法剤は、起因菌がL菌と同定されると投与薬剤の変更が行われ、ABPCが第一選択剤でAMK、GM、PIPC、TOB及びMINO等を併用して優れた治療効果を挙げている。

近年の適切な化学療法により致命率が低下傾向にあることは、図10で示した。図10は、致命率について年次を4区分して示してあるが、1980年を境に致命率に差があり、有意に低下傾向が認められた。それとは逆に、50歳以上の年齢層からの治癒率の低下が認められ(図10)、高齢化時代に向かい今後の対応が必要であることが示された。なお、特に注目されることは、食肉由来菌株は患者由来菌株に比べて、ABPCに感受性傾向を示すものの、TCに対しては12%程度が耐性菌であり、EM耐性菌も散見されることから、今後も食肉由来菌株と患者由来菌株についての薬剤感受性パターンの動向を監視する必要がある。

#### 8. 血清型別分布

血清型別では1/2b型が26.4%、4b型が59.9%と両菌型で86.3%を占めており、L症の二大菌型と言える。近年は、1/2a、1/2cを含めた1型菌による症例が増加傾向にあり、36.7%に達している(表8, 図12)。各国の状況を図13に示した。日本では、4b型がおよ



そ 6 割を占めるが、同様な国は、スウェーデン、デンマーク、ブラジル、ベルギー、英国及びスイス等の国々であった。オランダ、ニュージーランド、フランスは 5 割前後、イタリア、ユーゴスラビア、ドイツは 9 割以上が 4b 型が占めた。一方、カナダ、オーストラリア及びハンガリーは 1 型菌が優勢であり、オーストラリア及びハンガリーはおおよそ 9 割が 1 型菌が占めていた。日本での 1 型菌による症例の増加は、一つにはこのような国々からの輸入食品の増加との関連性があるものと考えられる。

#### E. 結論と今後の展望

1. わが国のヒトの L 症は、1958 年～2001 年 12 月末迄に累計 796 症例の散発事例が認められた。その背景となるデータを分析した。
2. 年齢別発症数では、2 歳～5 歳の症例数が 16.5%を占め特徴的であった。
3. 人口 100 万人あたりの発症率は、0.2 ～ 0.53 と見積もられた。
4. 患者の二大型別は、髄膜炎と（胎児）敗血症であった。
5. 患者の転帰は、致命率 28.4%であるが、基礎疾患有する患者からの致命率は 40.3%と高率であった。しかし、適切な化学療法により致命率の低下が認められた。
6. 4b 型と 1/2b 型が L 症の二大菌型であり、国による相違がみられた。また、近年の傾向として、特に、1/2a 型菌による症例の増加が

注目された。

7. 患者の治療に用いられた化学療法剤は、AB-PC が第一選択剤として使用され治療効果を挙げていた。

8. 致命率の高いヒトの L 症の長期的な防疫体制の強化を目指すために、今後も国内の L 症患者症例報告に基づいて L 症の実態把握を継続しながら患者症例収集を行う必要がある。そのために、早期に L 症と L 菌の完全なサーベイランスシステムの構築と導入を図る必要があるものと考えられる。

#### F. 健康危険情報

同一施設の同時期で胎児敗血症、新生児敗血症が発症しており、乳幼児の発症例では、院内感染を疑われた症例が複数認められた。

#### G. 研究発表

学会発表 2003 年

・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 回日本食品学会総会，岡山。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表1 *Listeria monocytogenes* の同定基準

リステリア菌属 6 菌種 簡易鑑別同定表

菌種	酸産生：			硝酸塩還元	CAMP Test：	
	Mannitol	D-Xylose	L-Rhamnose		<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	-	-	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	-	D	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	-	+	-	-	+	-
<i>L. welshimeri</i>	-	+	D	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+	-	-	-	+
<i>L. grayi</i>	+	-	-	-	-	-

D : Variable

CAMP test : Christie et al の溶血試験

*S. aureus* 及び *R. equi* の産生する  $\beta$ -toxin により溶血活性が増強するかどうかの試験

• *L. monocytogenes* 同定の最少定義

- Morphology 短桿菌
- $\beta$  - Hemolysis 陽性
- Catalase 陽性
- Voges-Proskauer 陽性
- Growth in/at: 6.5%NaCl, 4 °C
- Aescilin 陽性

表2 *Listeria monocytogenes* 診断用免疫血清の作製に使用した菌株リストと抗原構造

血清型	標準菌株 No.	O抗原	H抗原
1/2a (1a)	2459	I, II, (III)	A, B
1/2b (1b)	1684	I, II, (III)	A, B, C
1/2c (2)	5348	I, II, (III)	B, D
3a	5105	II, (III), IV	A, B
3b	L461	II, (III), IV	A, B, C
3c	1916	II, (III), IV	B, D
4a	5214	(III), (V), VII, IX	A, B, (C)
4b	F4	(III), V, VI	A, B, (C)
4c	10	(III), V, VII	A, B, C
4d	21	(III), V, VI, VIII	A, B, C
4f	93/65	III, V, XV	A, B, C
5	Iwanoff	(III), (V), VI, VIII, X	A, B, C
6	1384	(III), VII, IX	A, B, C
7	1627	(III), XII, XIII	A, B, C

表3 抗O抗原因子血清の作製と凝集反応試験

O-因子	<i>Listeria monocytogenes</i> 血清型：O抗血清	吸収 血清型：O抗原	スライド凝集反応試験 陽性反応
I	1/2a：I, II, (III)	3b：II, (III), IV	1/2a, 1/2a, 1/2c
IV	3a：II, (III), IV	1/2a：I, II, (III)	3a, 3b, 3c
V	4c：(III), V, VII	6：(III), VII, XI	4a, 4b, 4c
VI	4b：(III), V, VI	4c：(III), V, VII	4b, 4d
VII	4c：(III), V, VII	4b：(III), V, VI	4a, 4c
VIII	4d：(III), V, VI, VIII	4b：(III), V, VI	4d, 5
IX	4a：(III), (V), VII, IX	4c：(III), V, VII	4a
X	5：(III), (V), VI, VIII, X	4d：(III), V, VI, VIII	5
XI	6：(III), VII, XI	4c：(III), V, VII	6
XII・XIII	7：(III), XII, XIII	1/2a：I, II, (III)	7
XV	4f：III, V, XV	4c：(III), V, VII	4f

表4 H抗原の作製

H-因子	A-因子	C-因子	D-因子
<i>Listeria monocytogenes</i> 家兎 OH-抗血清	1/2a I, II, (III) A, B	4f III, V, XV A, B, C	1/2c I, II, (III) B, D
吸収 O-抗原	1/2a I, II, (III)	4f III, V, XV	1/2c I, II, (III)
吸収 OH-抗原	1/2c I, II, (III) B, D	1/2a I, II, (III) A, B	1/2a I, II, (III) A, B
OH-抗原 血清型：	1/2a (A, B) 1/2c (B, D) 4f (A, B, C)	+++ - +++	- - +++ -

表5 リステリア症の県別発生状況

県名	症例数	県名	症例数	県名	症例数	県名	症例数
北海道	58	東京	120	滋賀	9	香川	5
青森	28	神奈川	44	京都	13	愛媛	10
岩手	7	新潟	37	大阪	38	高知	7
宮城	6	富山	6	兵庫	21	福岡	41
秋田	20	石川	14	奈良	13	佐賀	4
山形	12	福井	5	和歌山	14	長崎	6
福島	10	山梨	3	鳥取	9	熊本	17
茨城	12	長野	9	島根	7	大分	5
栃木	14	岐阜	15	岡山	10	宮崎	3
群馬	6	静岡	24	広島	9	鹿児島	3
埼玉	13	愛知	38	山口	9	沖縄	13
千葉	25	三重	3	徳島	1	総計	796

表6 発生症例数と転帰

性別	治癒	死亡	不明	致命率 (%)	症例数
男性	304	132	4	30	440
女性	257	93	3	26.3	353
不明	2	1	0	33.3	3
合計	563	226	7	28.4	796

表8 ヒト由来 *Listeria monocytogenes* の血清型 (1958~2001)

性別	症例数	1	1/2a	1/2b	1/2c	3	4a	4b	4c	4d	Un
男性	440	13	21	119	8	1	0	267	0	2	9
女性	353	12	24	90	3	4	1	209	1	0	9
不明	3	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
合計	796	25	46	210	11	5	1	477	1	2	18
%	100	3.1	5.8	26.4	1.4	0.6	0.1	59.9	0.1	0.3	2.3
死亡数	226	6	9	70	2	1	0	133	1	0	4
致命率 (%)	28.4	24	19.6	33.3	18.2	20	0	27.9	100	0	22.2