

図3. スモークサーモンスライス製造の工程フロー図

表7. ライトスモークサーモンに係るリステリア検査結果

採取日:平成16年12月14日～16日/採取場所:施設B(スモークサーモン製造工場)

試料	No.	選択増菌培地の変色(黒変化)		選択分離培地		理化学的性状		
		一次増菌培地	二次増菌培地	PALCAM	CHROMager L	水分(%)	塩分(%)	pH
① 凍結原魚・背肉	1	-	-	-	-	70.5	0.24	6.21
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
①' 凍結原魚・表皮ふき取り	1	-	-	-	-	70.0	0.24	6.27
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
② 高圧洗浄後の原魚・表皮ふ	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
③ 裁割後のフィレ・背肉	1	-	-	-	-	72.6	0.22	6.33
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
④ 洗浄後のフィレ・背肉	1	-	-	-	-	72.8	0.19	6.15
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
⑤ フィレ・液漬け用調味液	1	-	-	-	-	87.9	6.07	6.91
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
⑥ 調味漬け後フィレ・背肉	1	-	-	-	-	71.8	0.59	6.29
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
⑦ 燻煙・乾燥後のフィレ・背肉	1	-	-	-	-	71.3	1.81	6.20
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
⑧ 骨抜き後のフィレ・背肉	1	-	-	-	-	73.2	1.70	6.13
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
⑩ 剥皮後のフィレ・背肉	1	-	-	-	-	69.8	1.60	6.17
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
⑫ スライス肉	1	-	-	-	-	69.8	1.58	6.28
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
⑬ 計量後のスライス肉	1	-	-	-	-	67.6	1.69	6.22
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-			
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			
⑭ ライトスモーク製品	1	-	-	-	-	66.8	1.59	6.23
	2	-	-	-	-			
	3	-	-	-	-	水分活性 0.972		
	4	-	-	-	-			
	5	-	-	-	-			

- 【結果】
- ①凍結原魚の表皮ふき取り試料5検体のうち、1次増菌培地の1検体、2次増菌培地の2検体で培地色が黒変化した。
 - ①凍結原魚の表皮ふき取り試料の2次増菌培地を、選択分離培地による試験に供した結果、クロモアガーリステリア培地では2検体で水色のコロニーが観察されたが、その周囲にハローの形成は認められなかった。バルカム寒天培地では5検体とも陰性であった。これらの結果から、①凍結原魚表皮には今回の試験では*Listeria monocytogenes*について陰性と判断した。
 - ⑦燻煙・乾燥後のフィレではクロモアガーリステリア培地の1検体で水色コロニーが観察されたものの、ハロー形成は見られなかった。バルカム寒天培地では5検体すべてで陰性となった。これらの結果から、⑦燻煙・乾燥後のフィレには今回の試験では*Listeria monocytogenes*について陰性と判断した。
 - 1～3でコメントした以外の試料については*Listeria monocytogenes*陰性であった。

表8. スモークサーモンスライスに係るリステリア検査結果

採取日時:平成17年1月21日~25日/採取場所:施設B(スモークサーモン製造工場)

工程 No.	コード	試料	No.	選択増菌培地の変色(黒変化)		選択分離培地		理化学的性状		
				一次増菌培地	二次増菌培地	PALCAM	CHROMager L	水分(%)	塩分(%)	pH
①	F・皮	凍結原魚 表皮ふき取り	1	-	-	-	-			
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
①	F・断面	凍結原魚 頭部切断面ふき取り	1	-	-	-	-			
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
①	F・腹須	凍結原魚 腹須内部ふき取り	1	-	-	-	-			
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
①'	Df・皮	解凍原魚 表皮ふき取り	1	-	-	-	-			
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
①'	Df・断面	解凍原魚 頭部切断面ふき取り	1	-	-	-	-			
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
①'	Df・腹須	解凍原魚 腹須内部ふき取り	1	-	-	-	-			
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
②	W・皮	高圧洗浄後の原魚 表皮ふき取り	1	-	-	-	-			
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
②	W・断面	高圧洗浄後の原魚 頭部切断面ふき取り	1	-	-	-	-			
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
②	W・腹須	高圧洗浄後の原魚 腹須内部ふき取り	1	-	-	-	-			
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
③	FM	裁割後のフィレー背肉	1	-	-	-	-	66.7	0.16	6.23
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
③	A1 A2 A3	魚体処理室・引き戸の車輪 魚体処理室・排水溝枠 魚体処理室床面		+	+	+	+			
				+	+	+	+			
				+	+	+	+			
④	S	洗浄後のフィレー背肉	1	-	-	-	-	67.2	0.20	6.29
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
⑤	SEA	粉末調味料	1	-	-	-	-			
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
⑤	B1 B2 B3	台車・車輪 金属網・フィレー積載面(表裏) 台車・網受け部・パイofilm		-	-	-	-	62.2	3.90	6.18
				-	-	-	-			
				-	-	-	-			
⑤	SAL	散塩調味後のフィレー背肉	1	-	-	-	-			
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			
⑥	DES	塩抜き後のフィレー背肉	1	-	-	-	-	63.4	3.00	6.15
			2	-	-	-	-			
			3	-	-	-	-			
			4	-	-	-	-			
			5	-	-	-	-			

⑥	C1	水晒槽・外周部(線上面)	-	-	-	-	-	-	-		
	C2	水晒槽・内面・非水没部	-	-	-	-	-	-	-		
	C3	水晒槽・外周壁面	-	-	-	-	-	-	-		
	D1	台車・車輪	-	-	-	-	-	-	-		
	D2	台車・コンテナ受部・バイオフィルム	-	-	-	-	-	-	-		
	D3	台車・金属網受け部・バイオフィルム	-	-	-	-	-	-	-		
	F1	水晒槽室・壁面と床の境界部	-	-	-	-	-	-	-		
	F2	水晒槽・外周壁面と床の境界部	-	-	-	-	-	-	-		
	F3	水晒槽室・床中央	-	-	-	-	-	-	-		
OF1	オーバーフロー水	-	-	-	-	-	-	-			
OF2	オーバーフロー水	-	-	-	-	-	-	-			
OF3	オーバーフロー水	-	-	-	-	-	-	-			
⑦	DEB	骨抜き後のフィレー背肉	1	-	-	-	-	-	67.7	1.54	6.19
			2	-	-	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-	-	-	-
⑦	G1	骨抜き室・排水溝壁面	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			G2	骨抜き室・壁面と床の境界部	-	-	-	-	-	-	-
			G3	作業台脚部	-	-	-	-	-	-	-
			G4	作業台表面	-	-	-	-	-	-	-
			G5	骨抜き室・床中央	-	-	-	-	-	-	-
⑧	DY	風乾後のフィレー背肉	1	-	-	-	-	-	66.1	3.07	6.21
			2	-	-	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-	-	-	-
⑧	H1	乾燥燻煙室・壁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			H2	乾燥燻煙室・床	-	-	-	-	-	-	-
			H3	乾燥燻煙室・ドア・床設置部	-	-	-	-	-	-	-
			H4	乾燥燻煙室・送風口	-	-	-	-	-	-	-
			H5	乾燥燻煙室・台車フレーム	-	-	-	-	-	-	-
⑩	Ref	燻煙乾燥・冷却後のフィレー背肉	1	-	-	-	-	-	67.6	2.53	6.28
			2	-	-	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-	-	-	-
⑪	SK	剥皮後のフィレー背肉	1	-	-	-	-	-	64.9	2.70	6.19
			2	-	-	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-	-	-	-
⑪	I1	剥皮機・ローラー部	-	-	-	-	-	-	-	-	
			I2	剥皮機・フィレー受金属バー	-	-	-	-	-	-	-
⑪	DTW1	剥皮機室前・通路中央排水溝・廃水	-	-	-	-	-	-	-	-	
			DTW2	-	-	-	-	-	-	-	
			DTW3	-	-	-	-	-	-	-	
⑮	SS	スライス肉	1	-	-	-	-	-	64.5	2.39	6.28
			2	-	-	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-	-	-	-
⑮	J1	ギロチンスライサー刃	-	-	-	-	-	-	-	-	
			J2	ベルトコンベア・ベルト周辺	-	-	-	-	-	-	-
⑮	K1	電子天秤・操作パネル	-	-	-	-	-	-	-	-	
			K2	電子天秤・上皿上部・周囲	-	-	-	-	-	-	-
			K3	作業台裏面・バイオフィルム	-	-	-	-	-	-	-
			K4	作業台表面	-	-	-	-	-	-	-
⑮	L1	真空包装機・上蓋内部・汚れ	-	-	-	-	-	-	-	-	
			L2	真空包装・計量室・排水溝壁面	-	-	-	-	-	-	-
			L3	真空包装機・製品配置部	-	-	-	-	-	-	-
⑳	PRO	スモークサーモンスライス製品	1	-	-	-	-	-	65.5	2.47	6.19
			2	-	-	-	-	-	-	-	-
			3	-	-	-	-	-	-	-	-
			4	-	-	-	-	-	-	-	-
			5	-	-	-	-	-	-	-	-
							水分活性				
							0.953				

解説

1. 二次増菌培地で培地色が黒変化した検体は21検体であった。

- ①凍結原魚頭部切断面(F断面)2検体、①'解凍原魚表皮(Df皮)1検体、①'解凍原魚頭部切断面(Df断面)3検体、①'解凍原魚腹須内部(Df腹須)2検体、
 - ②高圧洗浄後の原魚腹須内部(W腹須)1検体、③魚体処理室関係(A)3検体、④洗浄後のフィレー背肉(S)1検体、⑥塩抜き工程の台車関係(D)1検体、
 - ⑥塩抜き工程作業室(水晒槽室)関係(F)3検体、⑦骨抜き工程作業室関係(G)3検体、⑩計量作業工程作業室関係(K及びL)2検体
2. フィレーマシンにより裁割処理されてから以降の工程において、中間製品及び最終製品においては2次増菌培地の変色や、バルカム寒天培地及びクロモアガーリスティア培地の陽性反応は観察されなかった。したがって、今回の調査においては中間製品及び最終製品に*Listeria monocytogenes*は存在しないものと考えられた。
3. バルカム寒天培地において黒変化和クレーター状のコロニー形成があったか、あるいはクロモアガーリスティア培地に水色のコロニーが形成されたかの何れかを呈した検体は14で、このうちいずれの状態とも呈した検体は8であった。これらについては下記に個別に記載する。
- (1) ①'解凍原魚頭部切断面:Df2断面 - バルカム寒天培地は陰性であった。クロモアガーリスティア培地では水色のコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
 - (2) ②高圧洗浄後の原魚:W4腹須内部 - バルカム寒天培地の変色とクレーター状のコロニー形成が見られる。クロモアガーリスティア培地では水色のコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
 - (3) ③魚体処理室関係:A1引き戸の車輪 - バルカム寒天培地の変色とクレーター状のコロニー形成が見られる。クロモアガーリスティア培地では水色のコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
*L. innocua*が検出された。
 - (4) ③魚体処理室関係:A2排水溝枠 - バルカム寒天培地の変色にわずかな変色は見られるものの、クレーター状のコロニー形成は観察されなかった。クロモアガーリスティア培地では水色のコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。
以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
*L. innocua*が検出された。
 - (5) ③魚体処理室関係:A3床面 - バルカム寒天培地の変色とクレーター状のコロニー形成が見られる。クロモアガーリスティア培地では水色のコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
*L. innocua*が検出された。
 - (6) ④洗浄後のフィレー背肉:S5 - バルカム寒天培地の変色は認められるものの形成されたコロニーはクレーター状ではない。クロモアガーリスティア培地は陰性を示した。以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
 - (7) ⑥塩抜き工程の台車関係:D1台車の車輪 - バルカム寒天培地の変色とクレーター状のコロニー形成が見られる。クロモアガーリスティア培地では水色のコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
 - (8) ⑥水晒槽室関係:F1水晒槽室の壁・床境界部 - バルカム寒天培地は陰性であった。
クロモアガーリスティア培地では水色のコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。
以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
 - (9) ⑥水晒槽室関係:F2水晒槽外周壁面と床境界部 - バルカム寒天培地の変色とクレーター状のコロニー形成が見られる。
クロモアガーリスティア培地では水色のコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。
以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
 - (10) ⑦骨抜き工程作業室関係:G1骨抜き室排水溝壁面 - バルカム寒天培地の変色とクレーター状のコロニー形成が見られる。
クロモアガーリスティア培地では水色から黄色に変色するコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。
以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
 - (11) ⑦骨抜き工程作業室関係:G2骨抜き室壁面と床境界部 - バルカム寒天培地は陰性であった。
クロモアガーリスティア培地ではクレーター状で中央部が水色を呈し、外周が黄色であるコロニーが形成された。コロニー周囲のハローは認められな
コロニー周囲のハローは認められなかった。以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
 - (12) ⑦骨抜き工程作業室関係:G3骨抜き室作業台脚部 - バルカム寒天培地は陰性であった。
クロモアガーリスティア培地では水色や乳白色のコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。
以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
 - (13) ⑦骨抜き工程作業室関係:G5骨抜き室床中央 - バルカム寒天培地の変色とクレーター状のコロニー形成が見られる。
クロモアガーリスティア培地では水色のコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。
以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
 - (14) ⑩計量作業工程作業室関係:K3作業台裏面バイオフィルム - バルカム寒天培地は陰性であった。
クロモアガーリスティア培地では水色のコロニーが見られるが、コロニー周囲のハローは認められなかった。
以上より本検体には*L. monocytogenes*は存在しないと推定される。
4. 1～3でコメントした以外の試料については*Listeria monocytogenes*陰性であった。
5. 今回の調査では中間製品及び最終製品、原料及び製造工程のふき取り検査において*Listeria monocytogenes*は検出されなかった。

本邦における*Listeria monocytogenes* の常在汚染に関する分子疫学

研究協力者 植田富貴子（日本獣医畜産大学獣医公衆衛生学教室・助教授）
落合由 嗣（同上・助手）
本藤 良（同上・教授）
庄司 紘史（久留米大学医学部神経内科・教授）

研究要旨

1. ヒト・リステリア症（髄膜炎患者）および食肉汚染由来 *Listeria monocytogenes* (L.m) 分離菌株のゲノム構造の特性による分子疫学的解析から、地域常在汚染、複合汚染およびヒト・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。

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。これらの成績を基にして、平成16年度は、株間の異同識別とゲノム構造の特性を指標として、当研究室でこれまでに市販食肉から分離したL.m分離菌株についての地域局在性と複合汚染の実態およびヒトへの感染経路に関する分子疫学的解析を試みた。

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2003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402株の中から、経時性と疫学的背景を考慮して19株（血清型、1/2a；3株、1/2b；6株、1/2c；4株、4b；6株）を選択した（表1）。

表1の店舗のカラムでは大文字が購入店舗、小文字が加工場を示している。

2) ヒト・リステリア症由来分離株：髄膜炎患者の血液由来株(2000年9月分離；L2K-11H株、血清型4b)を用いた。（表1）

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、*Bam* HI) 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。

2) 塩基配列の決定は、*iap* 遺伝子内の810bpをPCR法で増幅 (Primer ; SI3A、5'-ACTG GTTTCGTTAACGGTAAA-3' ; SI4B、5'-TTTAGTGTAACCAGAGCAATC-3') して鋳型とし、Dye Primerを用いたサイクルシーケンス法 (Primer ; SI4AD、5'-AATACGGTG TTTCTGTTCAAG*-3' ; SI4BD、5'-TTTAGTGTAACCAG AGCAATC*-3') で塩基配列を決定した後に、多型領域を含む407bpの塩基配列をKohler ら (*Infect. Immun.* 58, 1990 ; GenBank accession number X52268) による SV1/2aEGD株の成績と比較した。

○倫理面での配慮：ヒト・リステリア症由来の各分離菌株については、すでに、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. 成績と考察

20株で得られた制限酵素切断パターンの異同状況と、SV1/2aEGD株の*iap*領域407bpの塩基配列と比較した成績をまとめて表2に示した。

制限酵素による切断パターンは、20株中■●▲★印のそれぞれで同一であった。また、*iap*領域407bp内には、塩基の挿入 (0~2箇所)、挿入 (0~2箇所)、欠損 (0~1箇所) およびEGD株の位置1393と1427の間に局在するACAAATの6塩基を1単位とし、ACAで終わる反復配列構造の反復数 (1~6回) に株間で差が認められた。これらのゲノム構造の特性を分類した結果、I~VIII型に分類された。以上の成績を基にして、L.m分離株による汚染・感染経路について分子疫学的解析を試みることにした。

1. 複合汚染事例-1 (異なる血清型の株による複合汚染の事例 ; 図1)

No.2 のL98-76P2 (血清型1/2a、分類III) とNo.11のL98-76P1 (血清型1/2c、分類I) の2株は、1998年に同一のM店 (同一のm加工場) で購入した同一検体 (豚肉) から分離された株である。制限酵素*Pst* I、*Ban* IIIおよび*Xba* Iによる切断パターンの写真解析の成績を図1に示した。明らかに両者のパターンが異なっていた。図1の右に示したゲノム構造の特性では、複数の塩基を1単位とする塩基の挿入と欠損は両者とも認められなかった。しかし、点変異では分類Iが0に対して分類IIIでは9箇所局在しており、ACAAATを1単位とする反復配列構造も前者ではEGD株より1反復長い5回反復 (AATACAの挿入) であるのに対して、後者は1回反復のみ (AATACAAATACAAATACAの欠損) であった。従ってこれらの成績から、これら2株は全く異なる株であることが示された。

図1の右下に、可能性のある汚染経路を示した。本研究で購入した食肉の全ては、国産表示があるものおよび外国産表示の無い食肉であった。しかし、表示義務が強化されるより以前に購入している食肉もあるため、L.mによる汚染経路として、国内の飼育場のほかに輸入食肉である可能性も否定することはできないものとする。これにより、ここではこの両者を第一次汚染の可能性として示した。それ以後は、同一加工場から同一店舗を経由して購入されているため経路は1本のみである。従って、この2株による汚染は、この

直線上で起こっている可能性が示唆された。

2. 複合汚染事例－2

(同一店舗で購入したが加工場が異なっていた場合の複合汚染事例；図2)

同一店舗で購入した鶏肉から分離されたNo.3のL98-80C1（血清型1/2a、分類Ⅳ）およびNo.5のL98-72C1（血清型1/2b、分類Ⅴ）は、No.2のL98-76P2（分類Ⅲ）およびNo.11のL98-76P1（分類Ⅰ）とそれぞれ異なる分類となっており、前者の加工場はkであり後者はmであった。事例では、No.2とNo.3で同一血清型であるが、他の2株の血清型は異なっていた。

制限酵素による切断パターンでは、4株全てが異なっていた（図2）。ゲノム構造の特性では、3塩基を1単位とする塩基の挿入（AAT）と欠損（GCA）が分類ⅤのNo.5で認められ、他の3株では認められなかった。点変異では、0～22で全ての株で異なっていた。反復配列構造では、分類ⅢとⅤで一致しているが他の特性では異なっていた（図2右上）。以上の成績から、これら4株は全て異なる株であることが示唆された。

図2の右下に示した汚染経路の解析では、第一次汚染経路は、上記1.の複合汚染事例－1（異なる血清型の株による複合汚染の事例）と同様であるが、鶏肉と豚肉で加工場が異なっているため、A店では第二次汚染経路としても2系統の汚染経路の存在が示唆された。

3. 複合汚染と一定地域における常在性汚染事例（図3）

M店から分離されたNo.11のL98-76P1（分類Ⅰ）と同一の2株、No.12のL98-75P1とNo.13のL98-78P1は、異なる加工日に処理された豚肉を購入して分離した血清型1/2c株である。制限酵素切断パターンでの解析では、3株が非常によく類似しており、特にNo.12と13で一致している。また、これらのゲノム構造の特性は全て同一の分類Ⅰであった。

図3の右下に示した汚染経路は、上記1.の複合汚染事例－1（異なる血清型の株による複合汚染の事例）とほぼ同じであるが、この事例では経時的な変異による複数株の複合汚染と常在汚染が示唆された。

4. 一定地域における常在性汚染事例（図4）

本汚染事例は、より複雑である。

No.6（L98-79C1）、No.7（L96-6C1）、No.8（L96-17C1）の3株は分類Ⅵ（血清型1/2b）、No.14（L99-229C1）とNo.18（L2K-295C1）の2株は分類Ⅷ（血清型4b）で全て鶏肉から分離された株、およびNo.16（L97-28C1）とNo.17（L98-82B1）は、分類Ⅴでそれぞれ鶏肉と牛肉由来の血清型4bの2株である。

図4に示したように、分類ⅤとⅥは類似した制限酵素切断パターンを示しており、ゲノム構造の特性でも点変異、挿入、欠損の点では両者は一致していたが、反復配列構造で分類Ⅴは1回反復、分類Ⅵは2回反復でこの2株は異なっていた（No.14とNo.18については制限酵素切断パターンをここでは示していない）。

図4の右下にNo.6、7、8（分類Ⅵ）について、汚染経路の可能性を示した。これらの株を分離した鶏肉は、異なる加工場で異なる日に加工され、異なる店舗（これらは系列店ではない）で購入しており、加工場から店舗の間に疫学的な関連は無いと考えられる。従って、加工場より以前の過程で鶏肉がこのLm株により汚染されたものと考えられ、汚染が長期にわたっていることから、この過程において一定地域における当該株の常在性汚染の経過を経たものと考えられる。また、他の2株（分類ⅢとⅤ）でも同様の推定が可能であ

る。他方、No.6 (分類VI) とNo.16 (分類V) の株はそれぞれ1998年2月と1997年6月に、系列ではあるが別の店舗 (MとW) で購入した鶏肉であり、その加工場は同一のkである。この2株は非常によく類似した株であることから、上記3. 複合汚染と一定地域における常在性汚染事例の3株と同様に、この2箇所の店舗に関する事例では加工場kがL.m株の経時的な変異の要因となっているものと推測される。

5. ヒト感染例と食肉汚染例の関連性 (図5)

東京都内の異なる店舗の鶏肉由来で血清型4b株の事例 (図4) のNo.14 (L99-229C1) とNo.18 (L2K-295C1) の2株、および北九州地区のL.m髄膜炎症例から分離された血清型4b株 (No.20、L2K-11H) では、制限酵素切断パターンおよびゲノム構造の特性が同一である結果が得られた。この2株由来の鶏肉は、異なる系列の店舗から全く異なる年度に購入されたものであるが、両分離株は同一株と考えられる。従って、本事例のヒトリステリア症の感染経路に鶏肉が関与している可能性が強く示唆される。

D. 結論

長期間にわたって当研究室で集積した、市販食肉汚染L.m分離菌株およびヒトリステリア症由来分離菌株を用いて、地域的な複合汚染と常在性汚染およびその汚染・感染様式について、分子疫学的解析の成績を基に考察を試みた。

1. 同一店舗の豚肉と鶏肉の2事例において、L.m血清型1/2aと1/2cおよび1/2aと1/2b菌株の複合汚染を明らかにした。各加工場での汚染に起因することが示唆された。
2. 一定地域の店舗の豚肉と鶏肉の2事例での解析から、L.m血清型1/2cおよび1/2b菌株における各加工場での常在性汚染が局在的に起こり得ることを明らかにした。
3. ヒトリステリア症および鶏肉由来のL.m分離菌株、血清型4b株を用いた解析により、食肉汚染を起因としたヒトへの感染の可能性を示唆する結果が得られた。

以上従来の疫学的解析法に分子生物学的解析法を併用することにより、より詳細な汚染と感染様式の解析が可能となった。

E. 研究発表

1. *Listeria monocytogenes* の非貪食性細胞侵入能に関する基礎的研究。山田文也、植田富貴子、望月眞理子、生嶋昌子、河橋幸恵、小笠原邦敏、本藤良。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)、2002。
2. *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。青田実生、菅又美穂、望月眞理子、小笠原邦敏、山田文也、植田富貴子、本藤良。第133回日本獣医学会。2002.3.28~30。(講演要旨集p.129)
3. 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。小笠原邦敏、植田富貴子、落合由嗣、望月眞理子、山田文也、青木秀夫、南俊作、本藤良。第134回日本獣医学会。2002.9.19~21。(講演要旨集p.199)
4. リステリア脳幹脳炎と分離株のゲノム解析。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。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. Swift and definite serotyping for isolated *Listeria monocytogenes* strains. Fukiko UEDA, Miho SUGAMATA, Miki AOTA, Mariko MOCHIZUKI, Fumiya YAMADA and Ryo HONDO. *Microbiologica* 25, 165-171, 2002.
6. Discrimination of *Listeria monocytogenes* contaminated commercial Japanese meats. Fukiko Ueda, Reiko Anahara, Fumiya Yamada, Mariko Mochizuki, Yoshitsugu Ochiai, Ryo Hondo. *Int. J. Food microbiol.* 2005 accepted.
7. Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. Fumiya Yamada, Yoshitsugu Ochiai, Fukiko Ueda, Mariko Mochizuki, Kunitoshi Ogasawara, Hiroshi Shoji, Kiyoko Ogawa-Goto, Tetsutaro Sata, Akikazu Fujima and Ryo Hondo. *J. Microbiol. Methods* (submitted)
8. Comparison of genomic structures in the serovar 1/2a *Listeria monocytogenes* isolated from meats and listeriosis patients in Japan. *J. Food Protect.* (submitted)
9. *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* 遺伝子の構造解析）。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。2004年4月日本獣医学会
10. リステリア菌のゲノム解析。本藤良、落合由嗣、植田富貴子。*Neuroinfection* Vol.9(1), 51-55, 2004.
11. 食品汚染・リステリアモノサイトジェニスの疫学像。本藤良。第11回食品微生物学検査セミナー。2004年2月（東京・北トピア）、3月（神戸国際会議場）

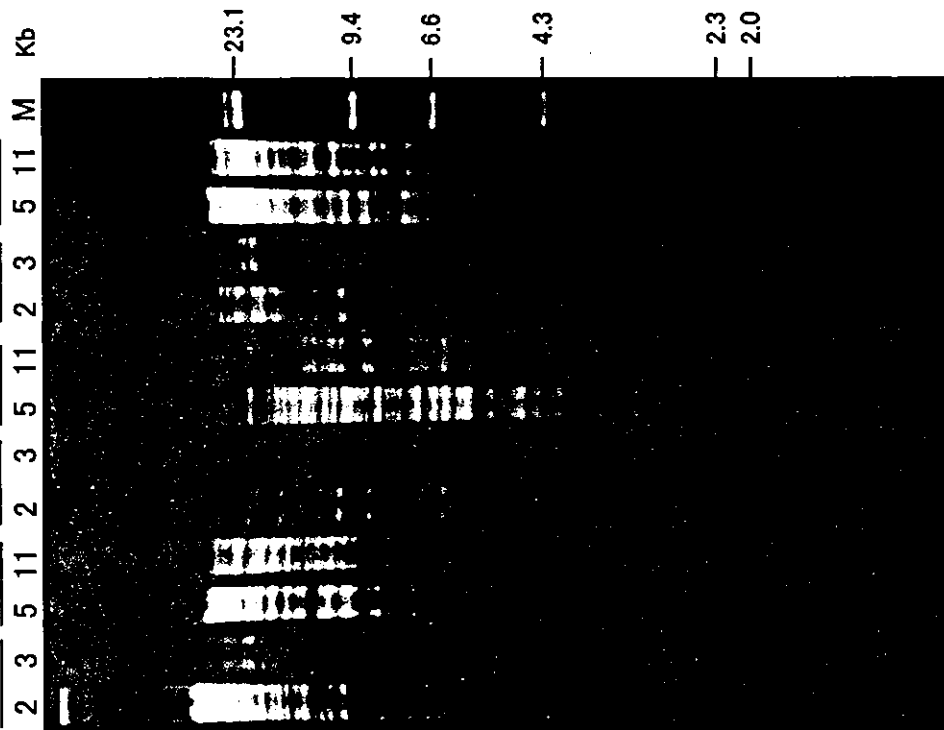
図2. 複合汚染例-2

- 2: L98-76P2(III)
- 3: L98-80C1(IV)
- 5: L98-72C1(V)
- 11: L98-76P1(I)

- 同一の店舗で加工場が異なる血清型1/2aの2株
- 同一の店舗で加工場が異なる血清型も異なる2株

No.2と11は同一店舗同一加工場
No.3と5は同一店舗同一加工場

Pst I	Ban III	Xba I
1/2a	1/2b 1/2c	1/2a 1/2b 1/2c
2 3 5 11	2 3 5 11	2 3 5 11 M



同一店舗より購入したが、加工場が異なり制限酵素切断パターンもゲノム構造の特性も異なる事例

ECD	G T T G T C G G A T T C A T T	G G C A G A T	1174 1184 1194 1219 1249 1273 1279	1307 1308 1315	1462 1471 1477 1480
I
II
III
IV
V
VI
VII
VIII

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAI	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAI	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT
ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT

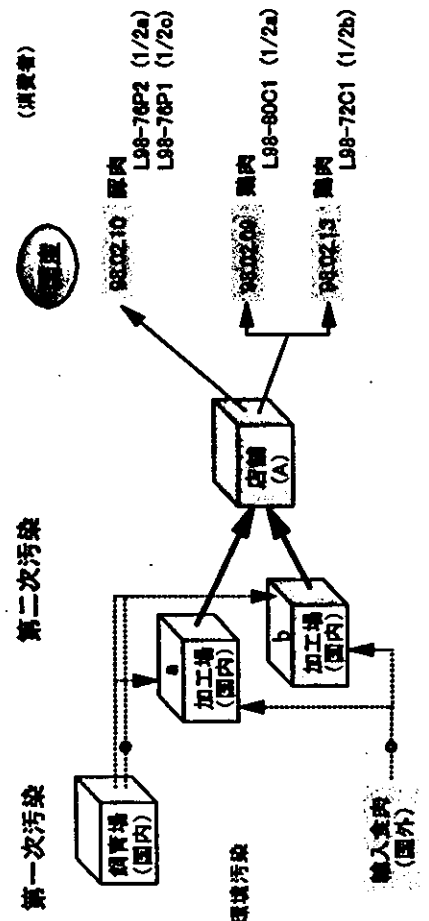
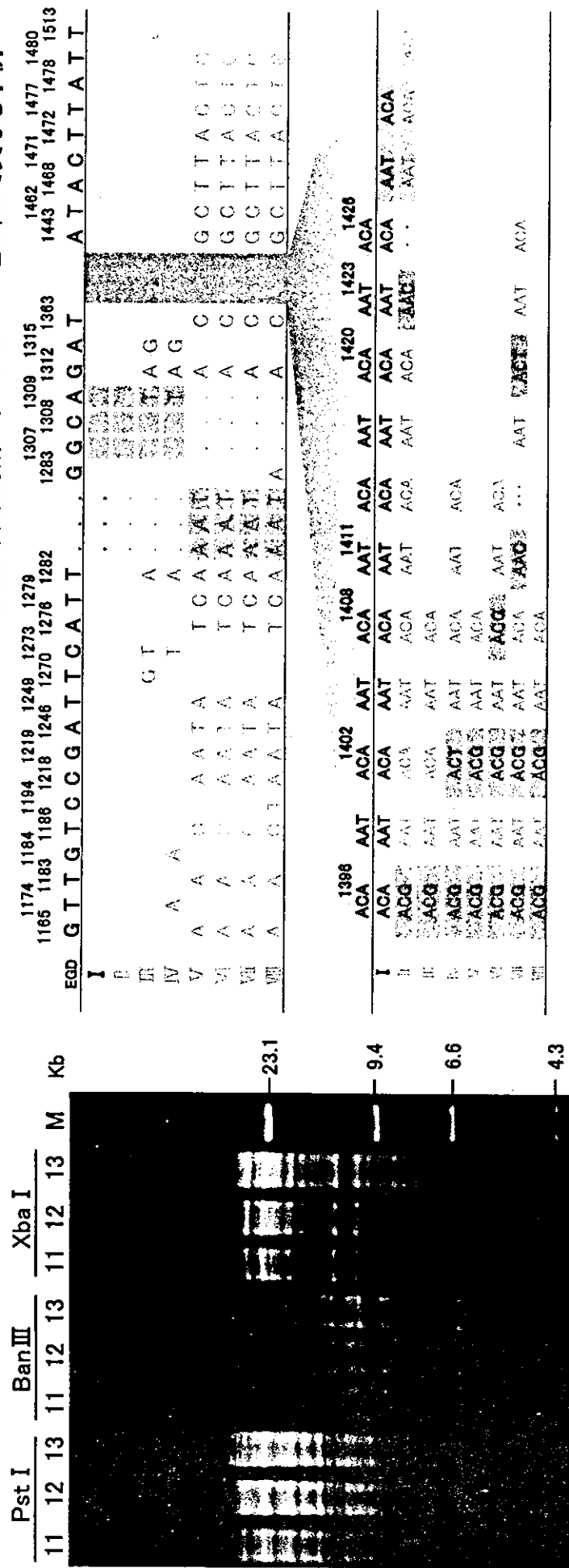


図3. 複合汚染と一定地域における常在性汚染事例

11: L98-76P1
 12: L98-75P1 (I)
 13: L98-78P1



同一店舗で継続して購入した3検体(豚肉)から分離された血清型 1/2c の3分離株
 ゲノム構造の特性は全て同一であるが、制限酵素切断パターンがNo11と12,13で異なる事例

EGD	1174	1184	1194	1218	1248	1273	1279	1307	1308	1315	1462	1471	1477	1480
I	G	T	G	T	G	G	A	T	T	G	A	T	T	A
II	A	A	G	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A
III	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A
IV	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A
V	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A
VI	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A
VII	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A
VIII	A	A	A	A	A	T	A	A	A	A	A	A	A	A

EGD	1386	1402	1408	1411	1420	1423	1426
I	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA
II	ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA
III	ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA
IV	ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA
V	ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA
VI	ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA
VII	ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA
VIII	ACG	AAT	ACA	AAT	ACA	AAT	ACA

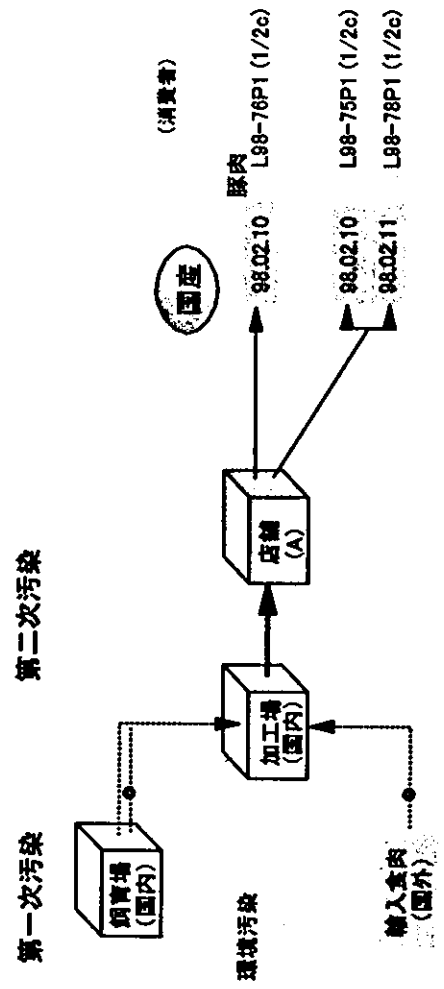


図4. 一定地域における常在性汚染事例

- 6: L98-79C1
- 7: L96-6C1
- 8: L96-17C1
- 14: L99-229C1
- 18: L2K-295C1
- 16: L97-28C1
- 17: L98-82B1

鶏肉由来の血清型1/2b株(VI)

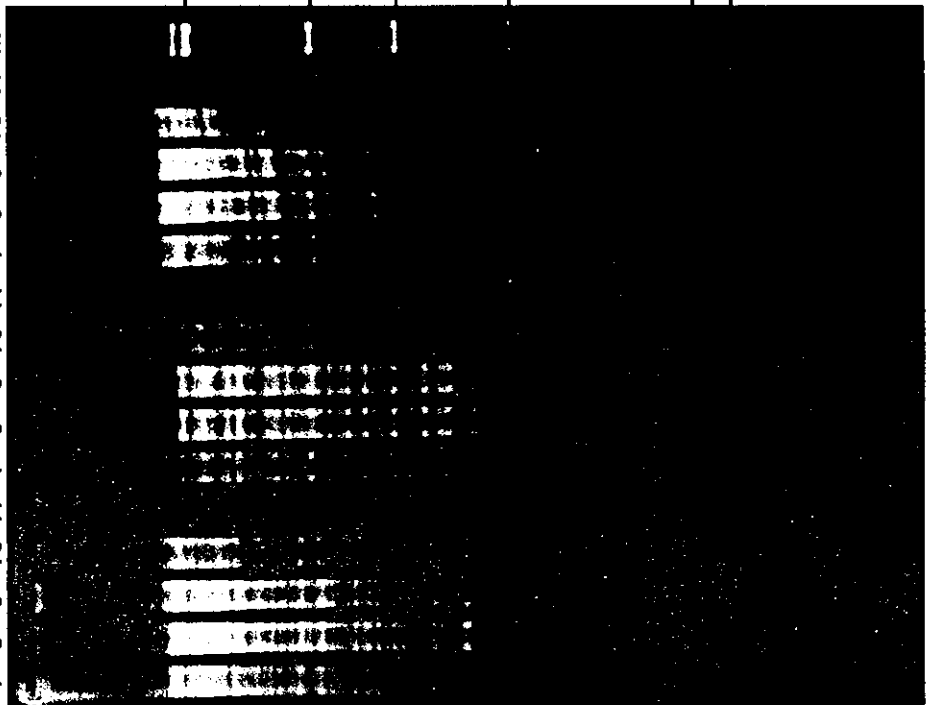
鶏肉由来の血清型4b株(VII)

鶏肉と牛肉由来の血清型4b株(V)

制限酵素切断パターン、ゲノム構造の特性はそれぞれ同一であったが
店舗も加工日も異なる事例

1174 1184 1194 1219 1249 1273 1279 1307 1309 1315 1462 1471 1477 1480
1165 1183 1186 1218 1246 1270 1278 1282 1283 1308 1312 1363 1443 1468 1472 1478 1513
EOD G T T G T C C G A T T C A T T . . . G G C A G A T A T A G T T A T T

Pst I	Ban III			Xba I		
	1/2b	4b	4b	1/2b	4b	4b
7	8	6	16	17	7	8
6	16	17	7	8	6	16
17	8	6	16	17	7	8



V A A C A A T A T C A A A T . . . A C G C T T A C T C
VI A A C A A T A T C A A A T . . . A C G C T T A C T C
VII A A C A A T A T C A A A T . . . A C G C T T A C T C
VIII A A C T A A T A T C A A A T A . . . A C G C T T A C T C

1396 1402 1408 1411 1420 1423 1426
ACA AAT ACA AAT ACA AAT ACA AAT ACA AAT ACA AAT ACA
7 7 7 7 7 7 7
ACG AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
9 9 9 9 9 9 9
ACG AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
6 6 6 6 6 6 6
ACG AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
4 4 4 4 4 4 4
ACG AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT

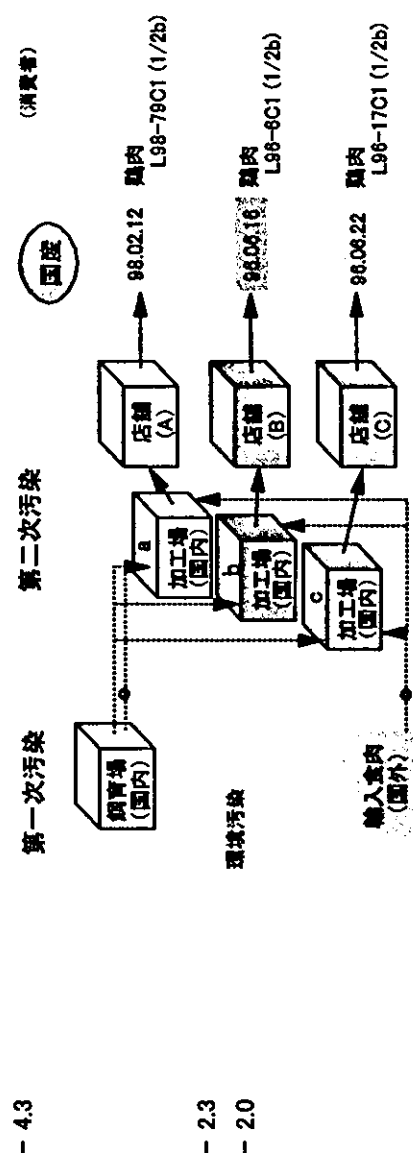


表1. *L. monocytogenes* の由来と血清型

No.	検体採取日	肉の種類	分離菌株名	血清型	店 舗
1	96.06.24	豚肉	L96-11P1	1/2a	Ma
2	98.02.10	豚肉	L98-76P2	1/2a	Mm
3	98.02.13	鶏肉	L98-80C1	1/2a	Mk
4	96.06.17	鶏肉	L96-9C1	1/2b	Ma
5	98.02.09	鶏肉	L98-72C1	1/2b	Mk
6	98.02.12	鶏肉	L98-79C1	1/2b	Mk
7	96.06.16	鶏肉	L96-6C1	1/2b	Oo
8	96.06.22	鶏肉	L96-17C1	1/2b	Kn
9	97.06.15	豚肉	L97-63P1	1/2b	Cc
10	96.06.24	鶏肉	L96-23C1	1/2c	Ya
11	98.02.10	豚肉	L98-76P1	1/2c	Mm
12	98.02.10	豚肉	L98-75P1	1/2c	Mm
13	98.02.11	豚肉	L98-78P1	1/2c	Mm
14	97.10.06	鶏肉	L99-229C1	4b	Mm
15	98.05.21	豚肉	L98-112P3	4b	Mm
16	97.06.20	鶏肉	L97-28C1	4b	Wk
17	98.02.22	牛肉	L98-82B1	4b	Cc
18	00.06.19	鶏肉	L2K-295C1	4b	Cc
19	97.06.16	鶏肉	L97-42C1	4b	Zi
20	00.09.04	血液	L2K-11H	4b	ヒト*

* 髄膜炎患者の血液から分離:久留米大・神経内科

魚卵加工品の保存時における *Listeria monocytogenes* の挙動

協力研究者 仲真晶子 東京都健康安全研究センター 微生物部 主任研究員

研究要旨

たらこおよび辛子明太子に *L. monocytogenes* (ATCC43256) を接種し室温 (25℃) および冷蔵 (4℃、10℃) での挙動を検討した。室温保存では1日目に菌数がやや減少したがその後増加し3日目には当初より2~4 オーダ増加した。冷蔵保存では菌数は2週間目まで徐々に減少した。3週間目には2週間目より増加したのものもあったが、当初の菌数までには至らなかった。

A. 研究目的

わが国独特の ready-to-eat 食品である魚卵加工品は *L. monocytogenes* 汚染率の比較的高いことで知られており、これらの食品に関するリステリア症のリスクを推定する必要がある。そのためには、食品を摂取する時点での菌数を予測することが重要である。本研究は、これらの食品購入後の本菌の挙動を推定する目的で、たらこおよび辛子明太子に本菌を接種し室温 (25℃) および冷蔵 (4℃、10℃) 保存して菌数の推移を検討した。

B. 研究方法

BHI で 30℃、24 時間の条件で 3 代継代した *L. monocytogenes* 4b (ATCC43256) 株をペプトン加リン酸緩衝食塩液 (以下希釈水) で 10 倍段階希釈した。たらこおよび辛子明太子は、それぞれ 10g ずつ滅菌ポリ袋に分取し、10 倍段階希釈した菌液 200 μ l を 10²/g および 10⁴/g となるよう接種した。これらのポリ袋をシールした後 25℃ で 6 日間、4℃ および 10℃ で 3 週間保存した。その間、経日的に各保存条件の試料を 1 個ずつ開封し、希釈水 40ml を加え 5 倍乳剤とした。その後は 10 倍段階希釈し、菌数を測定した。

L. monocytogenes 菌数は PALCAM 寒天培地を用いた平板塗抹法で測定した。すな

わち、5 倍乳剤 1ml を PALCAM 平板 3 枚に塗抹する方法、0.1ml を PALCAM 平板 1 枚に塗抹する方法およびミスラ法を併用した。平板塗抹法で集落を観察されなかった試料については 5 倍乳剤に倍濃の UVM 培地を 40ml 加え、増菌培養法による検出を試みた。なお、これら保存試験に用いたたらこおよび辛子明太子はあらかじめ *Listeria* 属菌陰性であることを確認した。

また、段階希釈した試料乳剤を標準寒天に塗抹し 35℃ で 48 時間培養することにより細菌数を、25℃ で 72 時間培養することにより低温細菌数を測定した。塗抹にはスパイラル・プレーティング法を用いた。さらに、菌接種前に試料の水分活性と塩分濃度、菌接種前および 25℃ と 10℃ での保存期間最終日に pH を測定した。

C. 研究結果

25℃ 保存時の *L. monocytogenes* 菌数の推移を図 1 に示した。菌接種後 18~24 時間では菌数は当初と同等あるいはやや減少した。その後菌数は増加し、3 日後には当初より 2~4 オーダ高い値を示した。

図 2 に 10℃ 保存時の *L. monocytogenes* 菌数の推移を示した。10⁴/g 接種した場合には 2 週間後まで菌数は徐々に減少した。3 週間には増加に転じたが、接種当初の菌数までには回復しなかった。10²/g 接種し

た場合には、たらこでは8日目以降、辛子明太子では2週間目以降、平板塗抹法で検出限界以下(5/g未満)となった。ただし、保存後3週目の試料について増菌法を試みたところ *L. monocytogenes* が検出された。

図3に4℃保存時の *L. monocytogenes* 菌数の推移を示した。10⁴/g接種した場合には菌数は徐々に減少し、2週間目には平板塗抹法で検出限界以下となったが、3週間目には再び検出された(25/g)。10²/g接種した場合には、たらこでは8日目以降、辛子明太子では2週間目以降検出限界以下となり、3週間目の試料では増菌法を用いても *L. monocytogenes* は検出されなかった。

図4~9に細菌数と低温細菌数の挙動を示した。たらこ、辛子明太子ともに当初の菌数は10⁴/gであった。25℃で保存した場合、細菌数、低温細菌数ともに18~24時間後にはやや菌数が減少した試料もあったが、2日後にはたらこで10⁶/g辛子明太子で10⁷/gまで増加した。3日後にはたらこ、辛子明太子ともに10⁸/gに達した。10℃で保存した場合は、たらこでは8日後、辛子明太子では3日後までは菌数に変化はなかったが、その後増加し、3週間後にはたらこで10⁷/g、辛子明太子で10⁸/gに達した。低温細菌数は細菌数と比べ立ち上がり早く、辛子明太子では2週間後には10⁸/gに達していた。4℃で保存した場合は、細菌数はたらこでは徐々に減少し、辛子明太子ではほぼ同じ菌数を維持した。低温細菌数はたらこではほぼ同じ菌数であり、辛子明太子では2週間後から増加傾向があり、3週間後に10⁶/gとなった。

水分活性はたらこが0.93、辛子明太子が0.94であり、塩分濃度はそれぞれ3.0%と1.3%であった。pHはたらこが接種前と25℃6日保存後が6.2、10℃保存3週間後は6.0であった。辛子明太子では接種前の

pHは6.0、25℃6日保存後が6.2、10℃保存3週間後が5.7であった(表1)。

D. 考察

たらこ、辛子明太子とも25℃で保存した場合増殖し、3日後には当初より2~4オーダ高い値を示した。一方、10℃保存では3週間後まで当初より1~2オーダ低い値で推移し、4℃保存の場合はさらに低い値で推移した。これら魚卵加工品は冷蔵保存することにより *L. monocytogenes* の増殖を効果的に抑制すると考えられた。

pHは菌接種前、たらこで6.2、辛子明太子で6.0であり、25℃で6日あるいは10℃で3週間保存後も大きな変化はなかった。*L. monocytogenes* の発育可能最低pHは4.4であることから、増殖抑制の要因としてはあまり大きく働かなかったと考えられる。

たらこの水分活性は0.93、辛子明太子は0.94であり、*L. monocytogenes* の発育可能最小水分活性0.92に近く、増殖抑制の要因と考えられた。

細菌数、低温細菌数の変化と *L. monocytogenes* の挙動との関連は明らかではなかった。

今回は1種類の菌株でのみで挙動を検討したが、菌株により低温増殖性、耐塩性に差異があることが考えられる。今後、低温増殖性、耐塩性に優れた菌株を選択し、保存試験を試みる必要がある

E. 結論

たらこ、辛子明太子とも25℃で保存した場合は増殖したが、10℃保存では3週間後まで当初より1~2オーダ低い値、4℃保存の場合はさらに低い値で推移した。これら魚卵加工品は常温で放置せず適切に冷蔵保存することにより *L. monocytogenes* の増殖を効果的に抑制すると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究発表

(1) A. Nakama, S. Kaneko, A Hirai, N. Isizaki, M. Odagiri, K. Jimbo, A. Kai, K. Yano, S. Morozumi and T. Maruyama. Incidence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in the Tokyo area, 15th International Symposium on Problems of Listeriosis, Uppsala, Sweden (2004).

著書

(1) 仲真晶子, 丸山 務: リステリア, 食品衛生検査指針 微生物編, 日本食品衛生協会, 249-265, (2004).

(2) 仲真晶子: 低温下で増殖できる食品病原微生物—特に *Listeria monocytogenes* について—, 食品のストレス環境と微生物, サイエンスフォーラム, 33-51 (2004).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし