

表1. 試料の水分活性、塩分濃度、pH

	水分活性	塩分濃度	pH		
			菌接種前	25°C6日	10°C3週間
たらこ	0.93	3.0%	6.2	6.2	6.0
辛子明太子	0.94	1.3%	6.0	6.2	5.7

図1. 25°C保存時の*L. monocytogenes*菌数

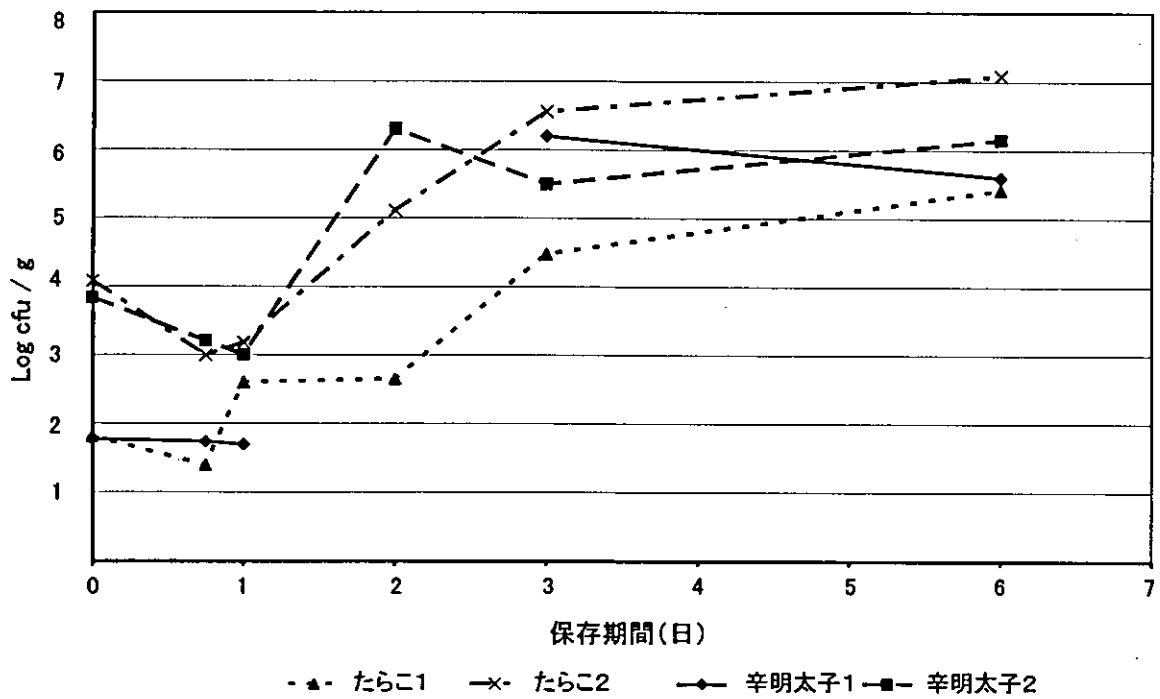


図2. 10°C保存時の*L. monocytogenes*菌数

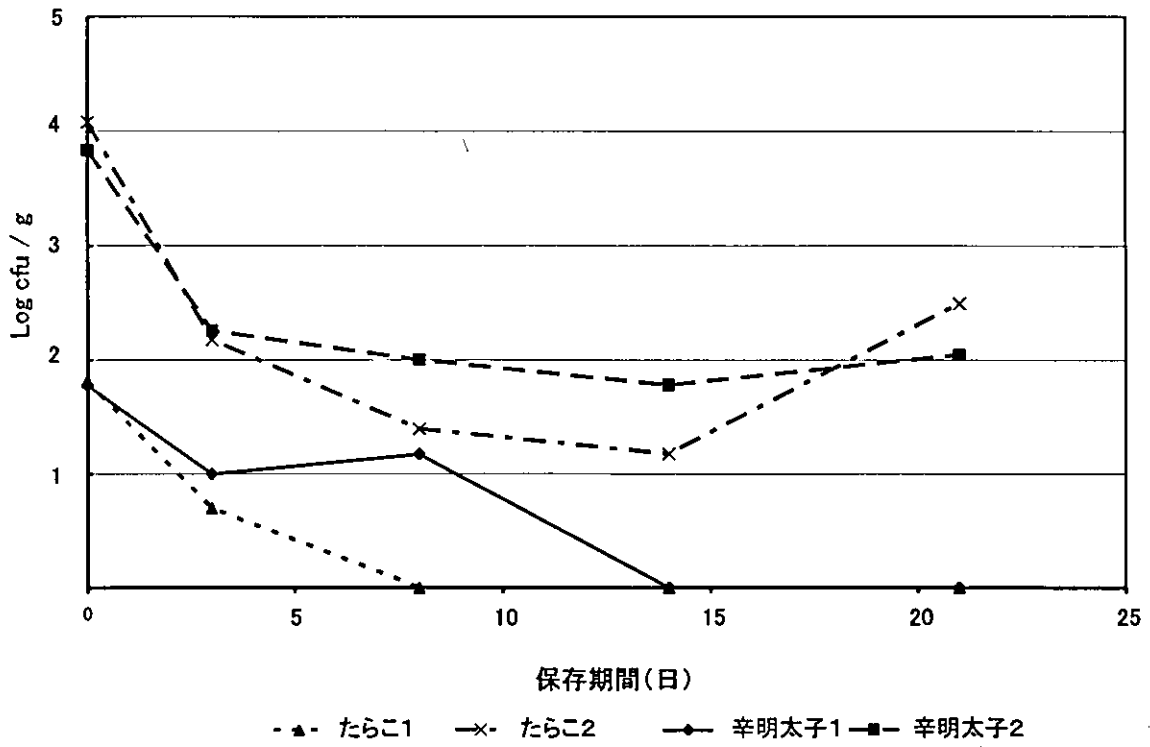


図3. 4°C保存時の*L. monocytogenes*菌数

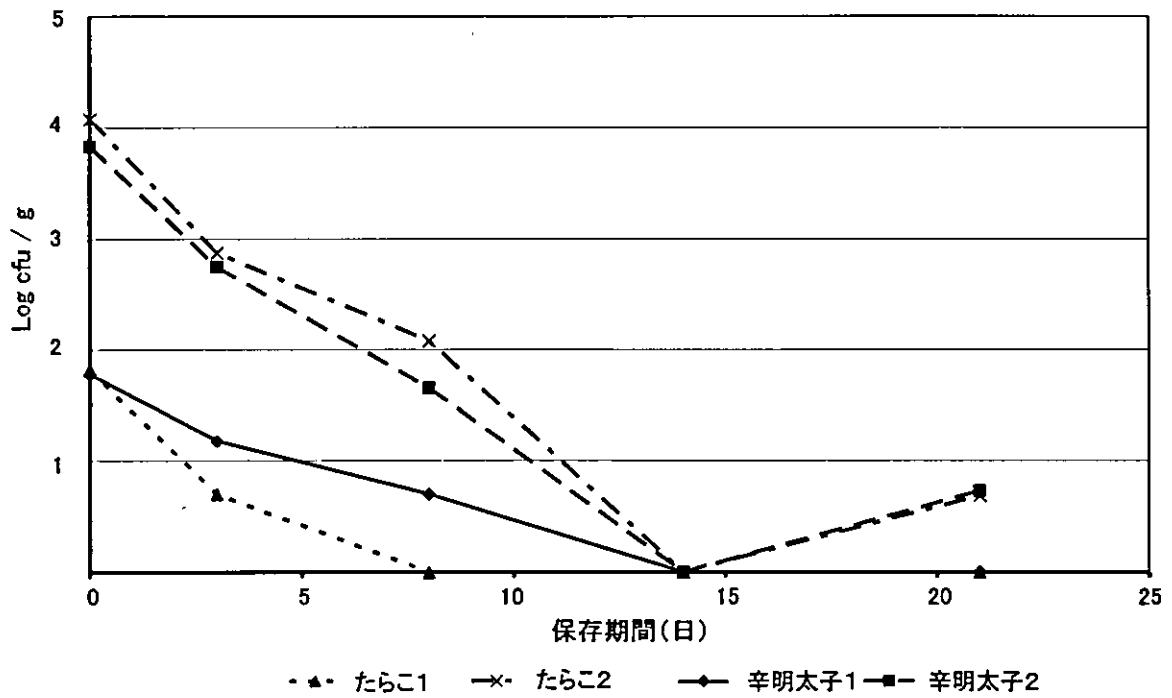


図4. 25°C保存時の細菌数

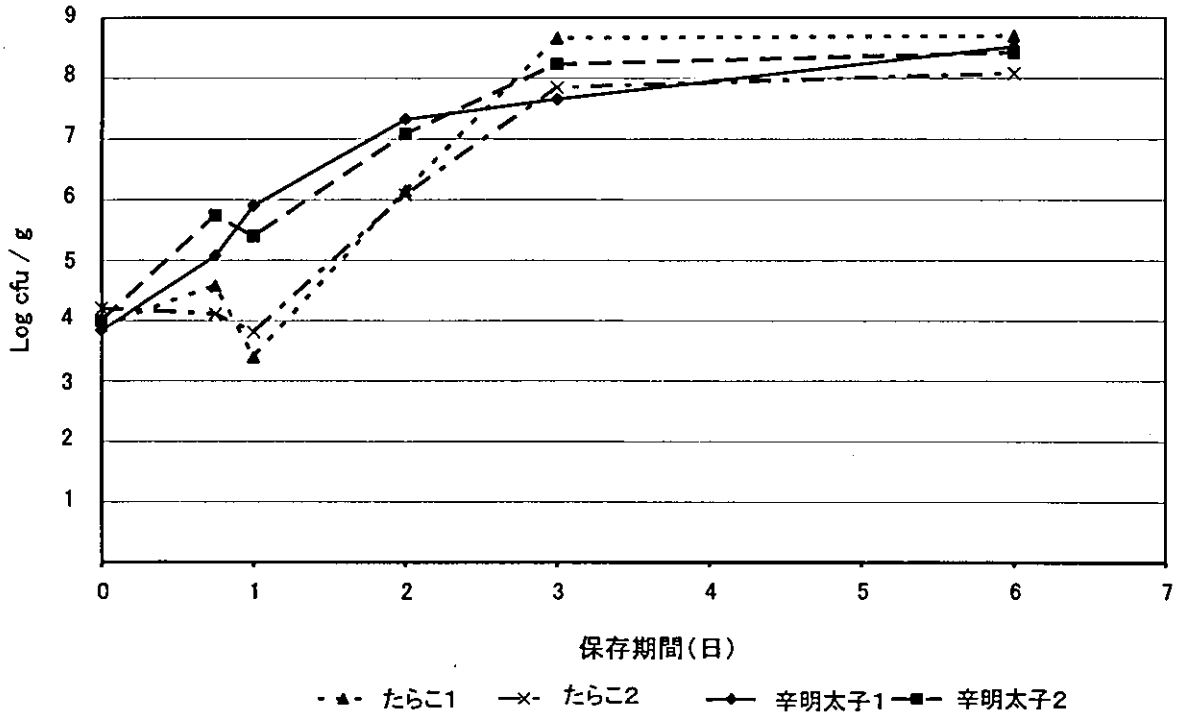


図5. 25°C保存時の低温細菌数

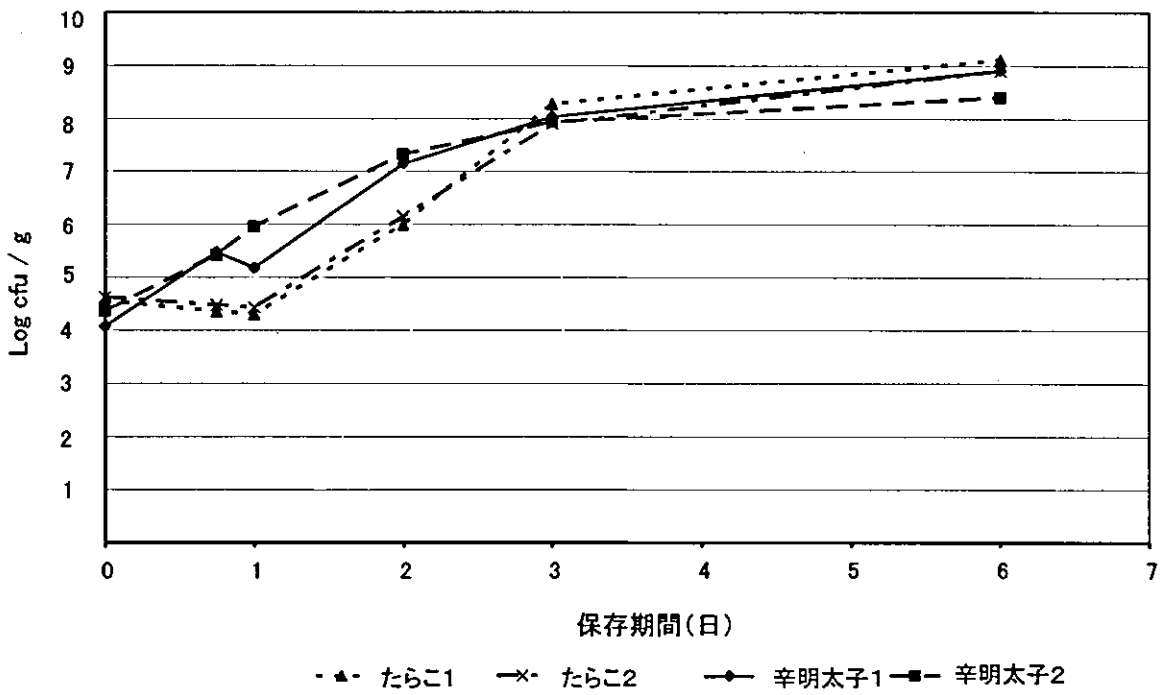


図6. 10°C保存時の細菌数

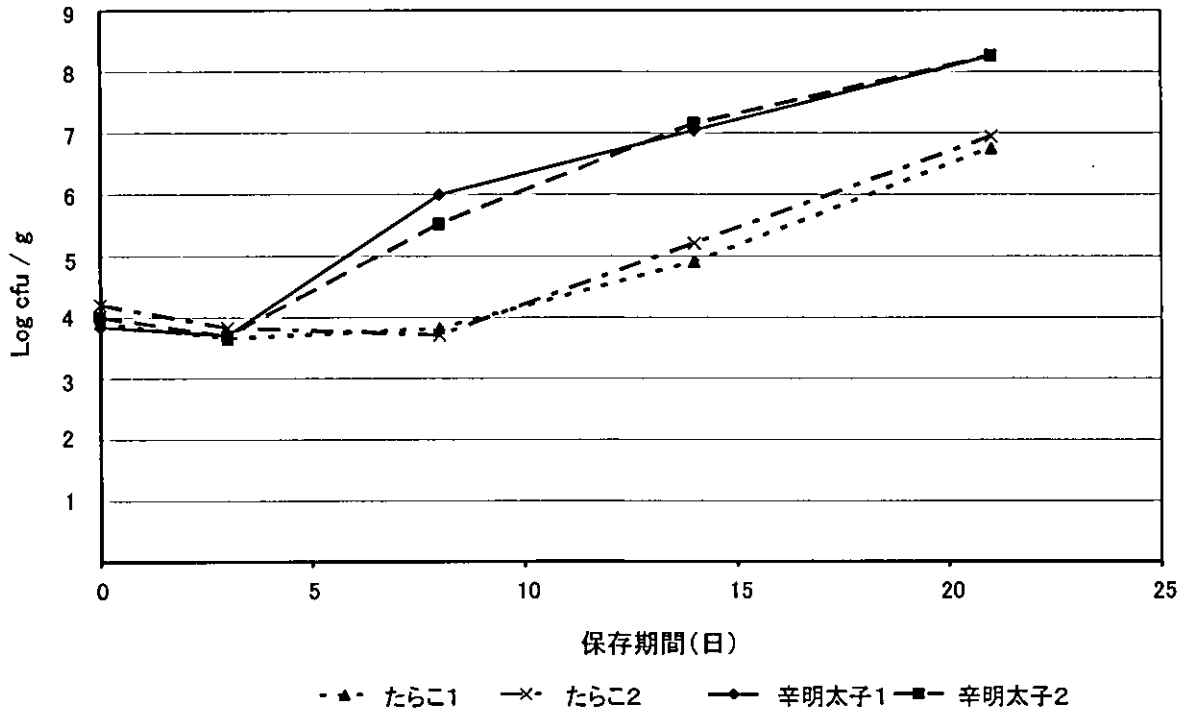


図7. 10°C保存時の低温細菌数

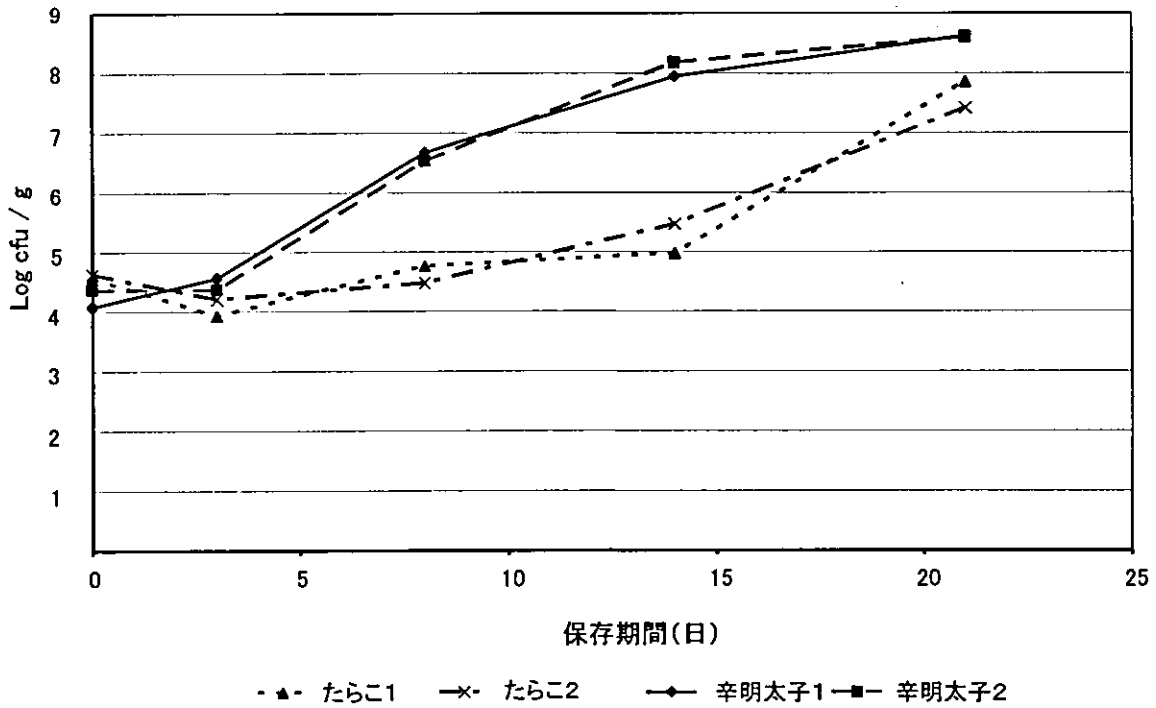


図8. 4°C保存時の細菌数

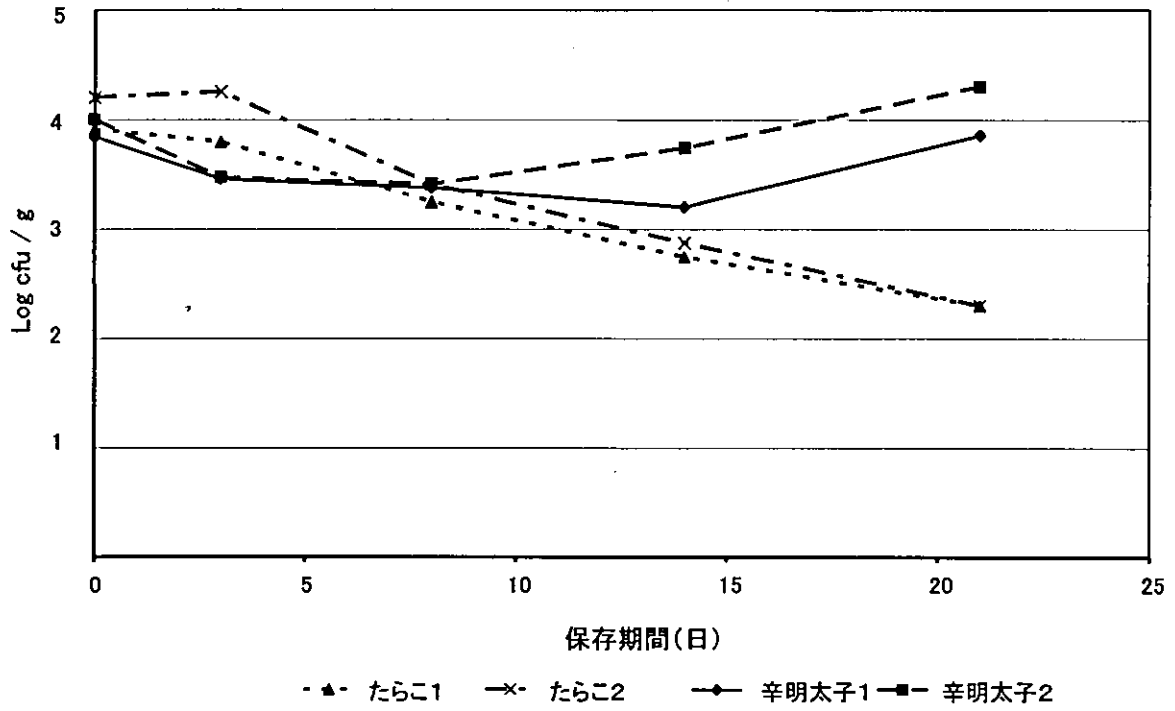
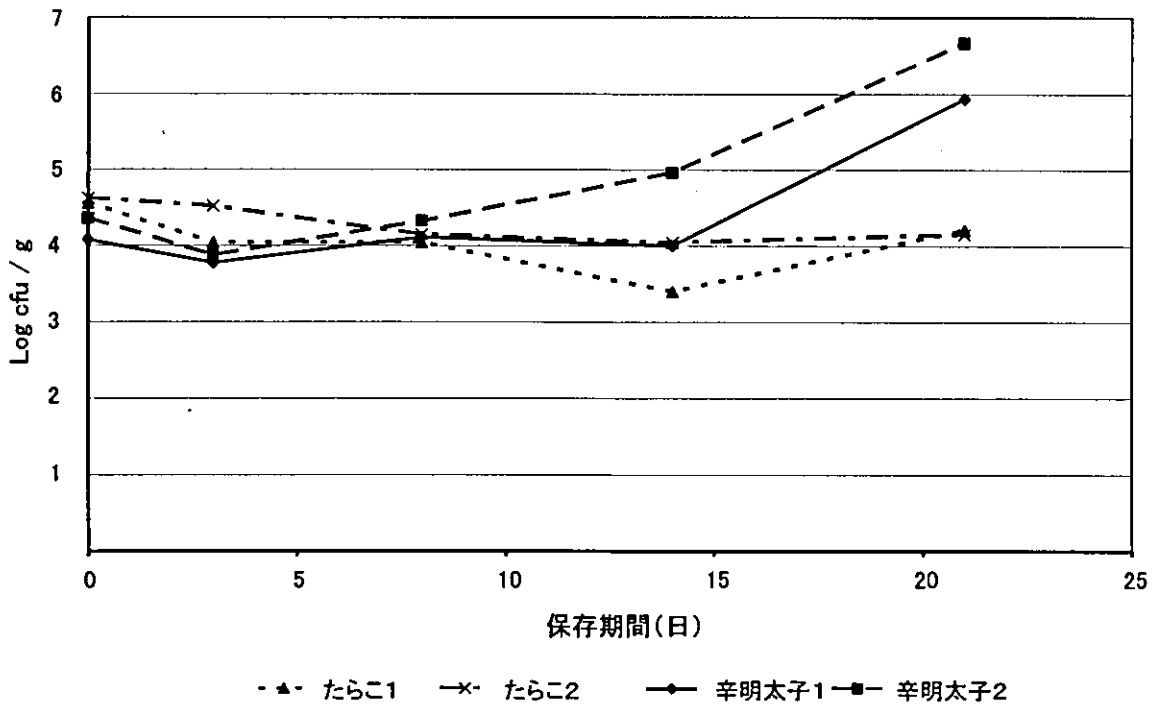


図9. 4°C保存の低温細菌数



分担・協力研究報告書

食品由来リステリア菌株における病原株マーカー遺伝子と病原性の相関に関する研究

研究協力者 岡田 由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部
分担研究者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨

リステリアは様々な動物の腸管内から分離されることが知られており、人へは主に汚染食品を通じて媒介される。本菌は13血清型に分類されるが、動物の腸管内や食品から主に分離される菌と、患者由来の菌株の血清型が異なる傾向にあることが従来知られている。また、過去の研究においては感染実験でそれらの血清型間に病原性の差はみられていないが、人への感染リスクが環境分離株と患者由来株である程度異なる可能性がある。昨年度までの厚生労働科学研究において我々は、リステリアの人へのリスクを正しく評価するための手法を開発するための基礎的研究として、強毒株の指標となりうるマーカーの検索をPCR法及びSouthern Dot Hybridization法により行ってきた。患者由来株及び食品、動物等環境由来株をそれぞれ約100株用いた病原マーカー検索を行った。その結果、特に临床上重要となる血清型4bにおいて豚肉及び牛肉由来株で有意に保有率の低い病原因子関連遺伝子が複数示され、本菌の集団の中に人への感染リスクの低い菌株群が存在している可能性が示唆された。今回の研究ではこれらの株の病原性について培養細胞を用いた感染実験を行うことで評価し、実際に低病原性群が存在しているかどうかを検証した。

A. 研究目的

リステリア症の原因菌 *Listeria monocytogenes* は人には主に汚染食品の摂取を通じて感染する。一方本菌は動物の腸管内や河川水等自然界に広く分布しており、また、4℃以下でも増殖可能な低温増殖能や20%もの高食塩濃度下でも生残できる高塩濃度耐性能を持つことから食品原料の一次汚染とともに製造工程及び保存期間での二次汚染・食品内増殖を防ぐことも困難である。本菌の血清型は13種類に分類さ

れるが、環境由来株の血清型は1/2cが7割を占め、食品由来株では1/2a, 1/2b及び1/2cがそれぞれ2割ずつ程度の割合で分離されている。このように環境及び食品由来株ではその血清型は1/2cを中心に多岐にわたっているにもかかわらず、患者から分離される臨床由来株の血清型の9割以上が1/2a, 1/2b 或いは4bの3血清型に属していることが知られている。特に我が国では臨床由来株のほぼ6割を血清型4bが占めている。過去の研究では血清型間の病原性の違いは

明らかになっておらず、また、同一血清型間でも病原性の異なる株の存在が知られている。従って本菌の人への感染リスクを正しく評価するには、単に食品からの分離率や汚染菌量を調査するのみならず、各菌株の病原性の有無或いは強弱を判定する必要があると思われる。しかし現在のところ、分離菌株毎の病原性の評価はほとんどなされていない。今回我々は、人への汚染食品を通じたリステリア症のリスクをより明確にするための研究の一端として、豚及び牛由来株の中に見られた病原因子関連遺伝子の保有率が低い群の実際の病原性を調査し、低リスク菌群の存在について検討した。

B. 研究方法

1. 菌株及び培地

使用菌株の一覧を表1に示す。コントロールとして用いた *Listeria monocytogenes* EGD 株を除いたすべての菌株は日本国内で分離されたものである。豚肉由来株は12株、豚肉加工品由来株は3株、牛肉由来株は7株を用いた。各菌株はブレインハートインフュージョン(BHI)寒天培地及び液体培地を使って培養した。溶血性の確認は羊血液寒天培地(日水)を使用し、37℃で一夜培養を行った。

2. 培養細胞

培養細胞は人の小腸上皮由来であるCaco-2細胞を用いた。細胞は牛胎児血清を10%添加したDulbeccoのmodified Eagle's medium (DMEM) 中で5%炭酸ガス存在下において培養し、継代には0.25%トリプシン溶液を用いた。

3. 感染実験

各菌株は3mlのBHI液体培地に接種し、

37℃一夜浸透培養した後遠心分離して上清を取り除いて滅菌生理食塩水で洗浄後、100 μ lを用いて分光高度計で各菌株が同一になるよう濃度を調整した。Caco-2細胞は1mlあたり 3×10^5 個になるよう調整し、24wellの組織培養用プレート上で単層培養した。各wellに1mlあたり約 2×10^8 個の菌液を10 μ l接種し、1時間感染後gentamycin添加DMEMを加えて細胞外のリステリア菌体を殺菌した。更に3時間培養して細胞内の菌を増殖した後、各wellを洗浄し、1mlの冷却水で細胞を破壊してから生理食塩水で希釈し、LB寒天平板に塗布した。それらを37℃で培養し、コロニー数を計測することにより、各菌株の細胞内での増殖数を確認した。

4. 統計処理

今回の研究で得られた実験データは集計後、StatView 4.0を用いて有意差検定の解析を行った。コントロール株として用いたEGD株の1wellあたりの菌数の平均を1として、各株の相対的な菌数を算出し、t検定を行ってコントロール株に比した病原性の強弱を調べた。危険率1%或いは5%でコントロール株と比した細胞内菌数により、各株の病原性を高い方より評価レベルAからEとして分類した。また、昨年度の厚生労働科学研究の結果である各株における病原因子関連遺伝子の保有状況と、本研究の結果である細胞内増殖性を指標とした病原性の相関は χ^2 検定を用いて調べた。

C. 研究結果

Caco-2細胞感染3時間後の各菌株の細胞内菌数を表2に、その相対値を図1に示した。危険率1%でコントロール株である

EGD よりも有意に低い菌数を示した株（病原性評価レベルE）は3株（13.6%）見られ、うち1株は豚由来、2株は牛由来であった。危険率5%ではEGD よりも有意に低い菌数を示した株（病原性評価レベルD）は8株（36.4%）見られた。その内豚由来株は4株、牛由来株は4株であった。豚肉加工品である生ハム由来株にはコントロールに比べ有意に低い菌数を示した株はみられなかった。また、危険率1%でコントロールに比べ有意に高い細胞内菌数を示した菌株（病原性評価レベルA）は9株（40.9%）みられ、その内牛由来株は1株、豚由来株は6株、生ハム由来株は2株であった。危険率5%では有意に高い菌数を示した株（病原性評価レベルB）は12株（54.5%）みられ、その内牛由来株は3株、豚由来株は7株、生ハム由来株が2株であった。

コントロールに比べ有意に低い細胞内菌数を示した株について、昨年度までの厚生労働科学研究で行った病原因子関連遺伝子保有状況を調べたところ、表3の結果が得られた。コントロール株よりも1%の危険率で有意に低い細胞内菌数を示した3株のうち2株は牛肉由来であり、これらの菌株は昨年度調査を行った10種類の病原因子関連遺伝子（*prfA*, *plcA*, *hly*, *actA*, *plcB*, *mpl*, *inlA*, *iap*, *clpC* 及び *opuCA*）の Southern hybridization において全て陰性を示していた。また、データは示していないが、溶血毒素リステリオリジンOをコードする遺伝子 *hly* について Southern hybridization で陰性を示した全ての株の溶血性を羊血液寒天平板を用いて調べたところ、全株が溶血性を保持していた。一方、

豚由来でコントロールよりも低い病原性を示した1株は、Southern hybridization において *prfA*, *actA*, *plcB*, *inlA* の4遺伝子で陰性を示していた。

これらの株の病原性評価レベルの高さと昨年度行った Southern hybridization による病原因子保有状況の相関を χ^2 検定により調べたところ、牛由来株では危険率1%でコントロール群より低い病原性を示した菌株群とその他の菌株群の *plcA* 遺伝子と *hly* 遺伝子の保有率に著しい有意差が見られた（表4）。危険率5%では *mpl*, *iap*, *clpC*, *opuCA* の各遺伝子の保有率にある程度の有意差が見られた。豚由来株ではどちらの危険率においても病原性評価レベルと病原遺伝子保有状況の相関は見られなかった。

D. 考察

本研究において、病原株の指標となるマーカー遺伝子の保有率が有意に低い群が存在している可能性が示された豚及び牛由来の *L. monocytogenes* 23株を対象としてその病原性について培養細胞を用いて評価したところ、牛由来株では危険率1%で28.5%、危険率5%では57.1%の菌株がコントロールよりも有意に低い結果を、豚由来株では危険率1%で8.3%、危険率5%で33.3%の株が有意に低い結果を示したことから、主に牛由来株に病原性の低い菌株群が存在していると思われた。特に顕著な病原性の低下を示していた牛由来株は Southern hybridization において10種類全ての遺伝子で陰性を示していたが、病原性がコントロール株と同等以上の他の菌株と比べて有意に低い保有状況を示したのは *plcA* 及び *hly* の両遺伝子であった。この結果より、これらの遺伝子が本菌の強毒

株検出マーカーとして最も有用である可能性が示された。また、これらの株の溶血性を羊血液寒天平板を用いて調べたところ、全株が溶血性を保持していたため、溶血素であるリステリオリジン O(LLO)のコード遺伝子である *hly* 遺伝子を欠失してはいないものの、その塩基配列が Southern hybridization で検出されない程度にコントロール株と大きく異なっているという可能性が示唆された。今後は病原性評価レベルが低かった菌群の *plcA* 及び *hly* 周辺の塩基配列を解析することにより、病原性の低下につながる塩基配列の多型性を明らかにし、人への高リスク菌群と低リスク群の鑑別の有用なマーカーとして実用できるよう研究を進める予定である。また、高病原性レベルを示した菌株群の環境ストレス抵抗性を解析することにより、食品の製造、保存過程での増菌能力の違いをも明らかにしていく予定である。

F. 健康危機情報

特になし。

G. 研究発表

1. 学会発表

1) 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主要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。大阪市

2) 岡田由美子、牧野壮一、廣田雅光、奥谷晶子、山本茂貴、五十君静信。リステリアの病原性に関する検討。衛生微生物技術評議会第25回研究会。2004年7月。さいたま市

3) Y. Okada, S-I. Makino, N. Okada, S.

Yamamoto, S. Igimi, Role of *Listeria monocytogenes* sigma factors in survival of high osmotic conditions. XV International Symposium on Problems of Listeriosis, September, 2004, Uppsala, Sweden

4) 岡田由美子、牧野壮一、岡田信彦、朝倉宏、山本茂貴、五十君静信。 *Listeria monocytogenes* の σ 因子の各種ストレス耐性における役割。第27回分子生物学会年会。2004年12月。神戸市

表1. 使用菌株

菌株名・番号	血清型	由来
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	1/2a	コントロール株
1	4b	牛
2	4b	牛
3	4b	牛
4	4b	牛
5	4b	牛
6	4b	牛
7	4b	牛
8	4b	豚
9	4b	豚
10	4b	豚
11	4b	豚
12	4b	豚
13	4b	豚
14	4b	豚
15	4b	豚
16	4b	豚
17	4b	豚
18	4b	豚
19	4b	豚
20	4b	豚
21	4b	生ハム
22	4b	生ハム
23	4b	生ハム

表2. 各菌株の細胞内菌数と病原性評価レベル

菌株番号	由来	1wellあたりの細胞内菌数(平均)±SD	相対的細胞内菌数	病原性評価レベル
1	牛	261250±23571	0.72	D
2	牛	16375±5558	0.04	E
3	牛	588375±103517	1.61	B
4	牛	13250±4368	0.04	E
5	牛	1008250±141798	2.75	A
6	牛	576000±121234	2.31	B
7	牛	138333±18910	0.55	D
8	豚	350000±264575	2.09	C
9	豚	609000±156150	2.44	B
10	豚	870333±167374	3.49	A
11	豚	6333±4041	0.03	E
12	豚	1009833±225036	4.05	A
13	豚	728667±128808	2.92	A
14	豚	796000±69844	3.19	A
15	豚	53250±1061	0.21	D
16	豚	962500±12728	3.86	A
17	豚	332000±123744	1.33	C
18	豚	64500±5657	0.33	D
19	豚	626500±59397	2.51	A
20	豚	105500±17678	0.42	D
21	生ハム	367333±197439	1.47	C
22	生ハム	650667±62692	2.61	A
23	生ハム	487667±40188	1.96	A

相対的細胞内菌数:コントロール株(EGD)の細胞内菌数の平均値を1とした際の試験株の相対値
 病原性評価レベル A: 危険率1%で有意にコントロール株より高い細胞内菌数を示した株
 B: 危険率5%で有意にコントロール株より高い細胞内菌数を示した株
 C: コントロール株と同等の細胞内菌数を示した株
 D: 危険率5%で有意にコントロール株より低い細胞内菌数を示した株
 E: 危険率1%で有意にコントロール株より低い細胞内菌数を示した株

表3. 各菌株の病原性評価レベルと病原因子保有状況

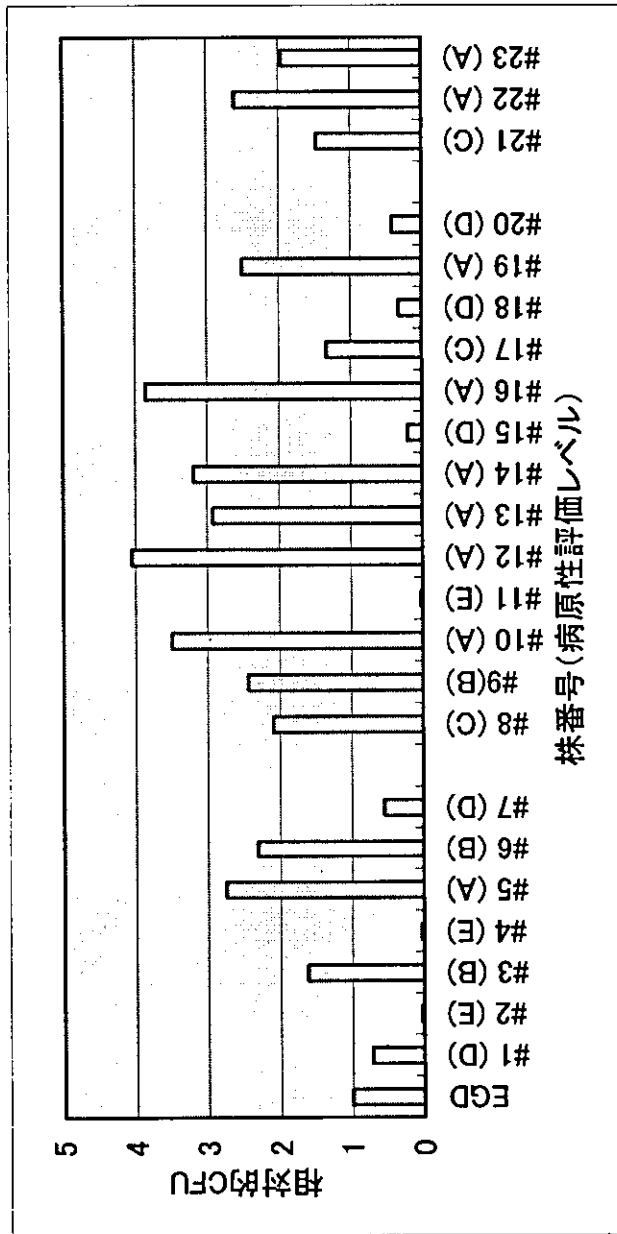
菌株番号	由来	評価	病原遺伝子保有状況													
			<i>prfA</i>	<i>plcA</i>	<i>hly</i>	<i>actA</i>	<i>mpl</i>	<i>plcB</i>	<i>inlA</i>	<i>iap</i>	<i>clpC</i>	<i>opuCA</i>				
1	牛	D	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	牛	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	牛	B	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
4	牛	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	牛	A	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	牛	B	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	牛	D	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	牛	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	豚	B	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	豚	A	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	豚	E	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	豚	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	豚	A	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	豚	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	豚	D	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	豚	A	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	豚	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18	豚	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	豚	A	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	豚	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	生ハム	C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	生ハム	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	生ハム	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表4. 各由来菌株群の病原性評価レベルと病原因子保有状況の相関

由来	病原性評価レベル	菌株数									
		<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>opuCA</i>
牛	(-)	3	0	0	4	1	4	2	1	1	1
	(+)	2	5	5	1	4	1	3	4	4	4
	(-)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	P-value	0.2899	0.0082	0.0082	0.4945	0.0533	0.4945	0.1473	0.0533	0.0533	0.0533
豚	(-)	6	1	3	7	1	7	4	1	1	4
	(+)	6	11	9	5	11	5	8	11	11	8
	(-)	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0
	(+)	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1
	P-value	0.3352	0.7638	0.5686	0.4106	0.7638	0.4106	0.188	0.7638	0.188	-
牛	(-)	2	0	0	2	0	2	1	0	0	0
	(+)	1	3	3	1	3	1	2	3	3	3
	(-)	3	2	2	4	3	4	3	3	3	3
	(+)	1	2	2	0	1	0	1	1	1	1
	P-value	0.8091	0.1473	0.1473	0.2123	0.0472	0.2123	0.2703	0.0472	0.0472	0.0472
豚	(-)	6	1	3	6	1	6	3	1	1	3
	(+)	3	8	6	3	8	3	6	8	8	6
	(-)	1	0	0	2	0	2	2	0	0	1
	(+)	3	4	4	2	4	2	2	4	4	3
	P-value	0.1643	0.4878	0.188	0.5686	0.4878	0.5686	0.5686	0.4878	0.7638	-

** : 危険率1%で有意差あり
* : 危険率5%で有意差あり

図1. 各菌株の相対的細胞内菌数



平成16年度厚生労働科学研究費補助金
(食品の安全性高度化推進研究事業)
分担研究報告書

分担研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者 大塚佳代子 埼玉県衛生研究所

非加熱摂取食品におけるリステリア食中毒の
予防に関する研究

市販食肉における *Listeria* 属菌の汚染

研究要旨

欧米をはじめ世界的に注目される食中毒細菌であるリステリアは、動物や土壌など環境中に広く存在し、食肉や生乳を汚染していることが多い。このため、食肉製品や乳製品の非加熱摂取食品が主要な原因食品と考えられている。そこで、危害度の高い非加熱摂取食肉製品とリステリア症との関連を検証する基礎情報を得るため、これらの原材料である食肉について、*Listeria* 属菌の汚染状況を肉種別に調査した。*Listeria* 属菌は牛、豚、鶏のすべての食肉で20~60%の高い汚染率を示した。なかでも病原性のある *L. monocytogenes* は国産および輸入鶏肉を高率に汚染していた。*Listeria* 属菌の汚染菌数は、いずれの国産食肉も100g当たり10,000未満であったのに対し、輸入食肉は10,000を超える菌数の多いものがあった。食肉から検出された *L. m* の血清型は、リステリア症患者から高率に検出される血清型1/2a、1/2b および4bが67.4%を占めた。

A. 研究目的

欧米等ではリステリア食中毒による健康被害の報告はあるが、日本ではその発生状況がほとんど把握されていない現状にある。この理由としては、日本の食習慣や嗜好性が欧米等と異なり、リスクの高い食品が摂取されず、またはリスクの高い食品は加熱調理後摂取されることが多く、食品を介したリステリア症の発生が少ないことによるものかもしれない。他の理由としては、リステリア症の病型が妊婦を介した周産期リステリア症や基礎疾患を有する人が感染す

る日和見感染症で髄膜炎や敗血症を引き起こし、胃腸炎症状を主徴としないため、食品を介したリステリア食中毒と断定されるに至っていないことが考えられる。

このような状況を踏まえ、日本におけるリステリア症の実態を掌握する目的で、平成15年度厚生労働省科学研究において、リステリア症発生状況調査システムが確立された。

欧米をはじめ世界的に注目される食中毒細菌であるリステリアは、動物や土壌など環境中に広く存在し、動物由来の食肉や生乳を汚染して

いることが多い。このため、非加熱摂取食品、特に食肉製品や乳製品が主要な原因食品と考えられている。そこで、リステリア症発生状況調査システムを活用し、本症と危害度の高い非加熱摂取食肉製品との関連を検証する基礎情報を得るため、これらの原材料である食肉について、*Listeria* 属菌の汚染状況を肉種別に調査した。さらに、病原性のある *Listeria monocytogenes* (以下 *L.m*) については、血清型別試験および食肉の汚染菌量を測定した。

B. 研究方法

1. 食肉の *Listeria* 属菌汚染状況

1999年から2001年に、埼玉県内で市販された牛肉51検体、豚肉35検体、鶏肉80検体、合計166検体を対象にリステリア属菌の検査を行った。

Listeria 属菌の検査方法は、食品衛生検査指針の方法に準じて行った。すなわち、各食肉10gにUVM培地(MERCK)90mlを加え、30℃で48時間増菌培養した後、PALCAM培地に塗抹し、35℃で48時間培養した。平板上に発育した *Listeria* 属菌が疑われるコロニーを釣菌し、0.6%酵母エキス(BBL)加 Trypticase Soy Agar (MERCK) で純培養した。発育したコロニーをHenryの斜光法により観察し、真珠様青緑色を呈するコロニーについて、グラム染色試験、カタラーゼ試験、VP試験および運動性試験を行い、*Listeria* 属菌と同定した。菌種同定は、糖分解試験およびβ溶血性試験で行った。

L.m と同定された菌株は、さらにリステリア診断用血清(デンカ生研)を用いて血清型別試験を行った。

L.m が検出された検体は、検査後-20℃に保管していた食肉材料を室温で解凍した後、UVM培地を用いたMPN法(3管法)により定量試験を行い、汚染菌量を算出した。

2. 鶏肉の *Listeria* 属菌汚染状況

前項の調査の結果、鶏肉の *L.m* 汚染率が高いことが判明したので、2002年7月から10月に、埼玉県内の小売店で販売されていた国産鶏肉92検体、輸入鶏肉41検体および卸売市場で販売されていた輸入鶏肉62検体を対象にリステリア属菌の検査を行った。

検査方法は前項に準じた。

C. 研究結果および考察

1. 食肉の *Listeria* 属菌汚染状況

市販食肉の *Listeria* 属菌および *L.m* の汚染状況を産地別および食肉の種類別に表1に示した。*Listeria* 属菌および *L.m* の検出率は、国産牛肉それぞれ22.7%(5検体/22検体)、13.6%(3検体/22検体)、国産豚肉で40.0%(6検体/15検体)、13.3%(2検体/15検体)、国産鶏肉42.9%(9検体/21検体)、38.1%(8検体/21検体)であった。輸入牛肉の *Listeria* 属菌および *L.m* の検出率は、それぞれ34.5%(10検体/29検体)、20.7%(6検体/29検体)、輸入豚肉30.0%(6検体/20検体)、10.0%(2検体/20検体)、輸入鶏肉64.4%(38検体/59検体)、30.5%(18

検体/59 検体)であった。市販食肉は獣種の別なく、いずれの食肉でも *L. m* 汚染率が高かった。このため、これらの食肉を原料とした食肉製品や加工食品等は、製造工程中に汚染される機会が多く、最終製品へ持ち込まれ、リスクも高くなる。また、食肉は家庭で食されることの多い食品で、調理する際、取扱が適切でなければ、家庭内食中毒を引き起こす可能性も高い。従って、食肉のリステリア汚染状況を継続的に調査し、食品製造者および消費者へ得られた情報を提供して、食肉を介した健康危害の発生リスクを低くする必要がある。

各種食肉から検出した *L. m* の血清型を表 2 に示した。国産牛肉から検出した *L. m* の血清型は 1/2c および 4b で、国産豚肉が 1/2c、国産鶏肉が 1/2a、1/2b、3a、輸入牛肉が 1/2a および 1/2c、輸入豚肉が 1/2a および 4b、輸入鶏肉が 1/2a、1/2b、1/2c、3a、4ab、4b および型別不能であった。国産の食肉では 1/2a、1/2b および 1/2c の I 型菌が 70.4% で、4b が 22.2% と両血清型菌で 90% 以上を占めた。輸入食肉では I 型菌が 64.5%、3b が 19.4%、4b が 9.7% の順に多く検出された。平成 15 年度に実施された厚生労働省科学研究において、リステリア症患者由来の血清型は国内患者で 4b が最も多く、近年 I 型菌が増加傾向にあり、またカナダ、オーストラリアなどでは I 型菌が 9 割を占めているとの報告があった。日本の食料自給率は 6 年連続 40% で、残り 60% は輸入食品で賄われている。とりわけ、I 型菌による患者発生が多いカナダ、オースト

ラリアからの食肉の輸入が増加傾向にあり、日本での I 型菌による患者の増加との関連性を検証するためにも、食肉特に輸入食肉の *L. m* 汚染状況を継続して監視する必要がある。

食肉から検出した *Listeria* 属菌の汚染菌数を表 3 に示した。汚染菌数が 30 未満/100g であった食肉は、国産牛肉 5 検体中 3 検体 (60.0%)、国産豚肉 6 検体中 2 検体 (33.3%)、国産鶏肉 9 検体中 1 検体 (11.1%) であった。30 以上 100 未満/100g の食肉は、国産牛肉 1 検体 (20.0%)、豚肉 1 検体 (16.7%)、鶏肉 3 検体 (33.3%)、100 以上/100g の食肉は、国産牛肉 1 検体 (20.0%)、国産豚肉 3 検体 (50.0%)、国産鶏肉 5 検体 (55.6%) であった。一方、輸入食肉は 100g 当たり 1,000 を超える高い汚染のあった検体が牛肉 1 検体、豚肉 1 検体および鶏肉 6 検体に見られたが、その他は国産食肉と同様の汚染菌数であった。

2. 鶏肉の *Listeria* 属菌汚染状況

鶏肉の *Listeria* 属菌および *L. m* の汚染状況を産地および販売施設別に表 4 に示した。*Listeria* 属菌および *L. m* の汚染率は、小売店で販売されていた国産鶏肉がそれぞれ 48.9%、43.5%、アメリカ産が 43.8%、12.5%、ブラジル産が 48.0%、16.0% であった。卸売市場のブラジル産の汚染率はそれぞれ 74.2%、51.6% で、他の産地および小売店販売品に比べ高かった。

L. m の汚染菌数を産地および販売施設別に表 5 に示した。30 未満/100g の菌量であった鶏肉は、*L. m* が検出された国産鶏肉 40 検体中 16 検

体(40.0%)、アメリカ産2検体中2検体(100%)、ブラジル産小売店4検体中3検体(75.0%)、ブラジル産卸売市場32検体中10検体(31.3%)であった。100g当たり1,000を超える高い菌数汚染があった鶏肉は、小売店販売の国産8検体(20.0%)と卸売市場のブラジル産7検体(21.9%)に見られた。

L. m の平均汚染菌数は、産地および販売施設における差がなく、100g当たり100前後であった。

鶏肉から検出された *L. m* の血清型を表6に示した。国産鶏肉を汚染していた *L. m* の血清型は、1/2bが35検体(87.5%)と最も多く、次いで1/2a、4b、1/2c、4ab、型別不能と続いた。アメリカ産2検体はすべて1/2aであった。ブラジル産のうち小売店で販売されていた鶏肉は、3検体が4b(75.0%)、1検体が1/2b(25.0%)であったのに対し、卸売市場で販売されていた鶏肉は、1/2aおよび4bがそれぞれ30%台と最も多い血清型であった。卸売市場の鶏肉はさらに1/2b、4ab、4e、1/2c、3b型の *L. m* も検出された。

D. 結論

リステリア症の主要な原因食品の一つとして考えられている非加熱摂取食肉製品の原材料である食肉について、*Listeria*属菌の汚染状況を調査した。

*Listeria*属菌は牛、豚、鶏のすべての食肉で20~60%の高い汚染率を示した。なかでも病原性のある *L. m* は国産および輸入鶏肉を高率に汚

染していた。*Listeria*属菌の汚染菌数は、国産食肉すべて100g当たり10,000未満であったのに対し、輸入食肉は10,000を超える菌数の多いものがあった。食肉から検出された *L. m* の血清型は、リステリア症患者から高率に検出される血清型1/2a、1/2bおよび4bが67.4%を占めた。

以上の結果をもとに、汚染頻度の高い鶏肉について、産地別の *L. m* 汚染調査を行ったところ、国産および卸売市場で販売されていたブラジル産鶏肉が、前述の調査同様 *L. m* 汚染率40~50%と高かった。平均汚染菌数はいずれの産地および販売施設の鶏肉も100g当たり100前後で、*L. m* の血清型は人から検出されることの多い1/2a、1/2bおよび4bであった。

各種の食肉由来 *L. m* 株と人由来株を比較すると、検出頻度の高い血清型が類似した。今後、食肉をはじめ汚染リスクの高い食品を中心に、*L. m* 汚染サーベイランスを継続して行い、分離菌株についてはリステリアの病原因子として報告されている12種類の遺伝子保有状況を検査し、人への健康被害に関与する因子のランク付けを行う必要がある。

E. 研究発表

1. 論文発表

日本獣医師会雑誌 56 巻第3号・167-170・
2003年

2. 学会発表

日本獣医師会関東地区大会・三学会・2004
年

表 1 市販食肉における *Listeria* 属菌および
Listeria monocytogenes の汚染状況

産地	種類	検体	陽性検体数 (%)	
			<i>Listeria</i> 属菌	<i>L. monocytogenes</i>
国産	牛肉	22	5 (22.7)	3 (13.6)
	豚肉	15	6 (40.0)	2 (13.3)
	鶏肉	21	9 (42.9)	8 (38.1)
輸入	牛肉	29	10 (34.5)	6 (20.7)
	豚肉	20	6 (30.0)	2 (10.0)
	鶏肉	59	38 (64.4)	18 (30.5)

表2 市販食肉から検出された *L. monocytogenes* の血清型

検体の種類	<i>L.m</i> 陽性 検体数	<i>L.m</i> 株数	血清型別陽性検体数 (%)									
			1/2a	1/2b	1/2c	3b	4ab	4b	UT			
国産												
牛肉	3	7	-	-	1(14.3)	-	-	-	6(85.7)	-	-	
豚肉	2	5	-	-	5(100.0)	-	-	-	-	-	-	
鶏肉	8	15	6(40.0)	7(46.7)	-	2(13.3)	-	-	-	-	-	
計	13	27	6(22.2)	7(25.9)	6(22.2)	2(7.4)	-	-	6(22.2)	-	-	
輸入												
牛肉	6	8	5(62.5)	-	3(37.5)	-	-	-	-	-	-	
豚肉	2	6	5(83.3)	-	-	-	-	-	1(16.7)	-	-	
鶏肉	18	48	18(37.5)	7(14.6)	2(4.2)	12(25.0)	1(2.1)	5(10.4)	3(6.3)	-	-	
計	26	62	28(45.2)	7(11.3)	5(8.1)	12(19.4)	1(1.6)	6(9.7)	3(4.8)	-	-	