

無調理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
辛子明太子およびその製造過程における *Listeria monocytogenes* の消長

協力研究者 樋脇 弘 福岡市保健環境研究所・主任研究員
宮本敬久 九州大学大学院農学研究院・教授
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・室長

研究要旨

辛子明太子の製造過程における *L. monocytogenes* の消長を調べた。自作調味液 3 種 (pH 5.9, 6.5 および 7.0, Aw はいずれも 0.95) とメーカー 4 社の調味液 (pH 5.7~6.1, Aw は 0.89~0.93) を用いて *L. monocytogenes* FCI-Lis10 株 (血清型 1/2a) を接種し、増殖実験を行った。6°C では、いずれの調味液中でも FCI-Lis10 株の菌数は保存期間に減少した。パラコ試料 3 種 (pH 6.0, 6.5 および 7.0, Aw はいずれも 0.97) を用いて、調味液と同様の増殖実験を行った。6°C で保存した pH 6.0 の試料では、菌数の大幅な増加はなく 14 日目の菌数は接種菌数とほぼ同数であった。自作調味液 3 種と 2 社の調味液 (pH 5.7 および 6.3, Aw はいずれも 0.93) を用いて辛子明太子の製造実験を行い、FCI-Lis10 株の消長を調べた。いずれの調味液を使用しても、FCI-Lis10 株の菌数は製造実験中に減少した。さらに、pH 5.9 の自作調味液と上記 2 社の調味液を用いた辛子明太子の製造実験において FCI-Lis12 (血清型 1/2b), FCI-Lis29 (血清型 3a) および LM17 (血清型 4b) 株の消長を調べたが、いずれの調味液を使った製造実験でも 3 株とも菌数は減少した。

以上の結果から、少なくとも pH 5.9 かつ Aw 0.95 以下の調味液を使用して 6°C の温度で辛子明太子を製造すれば、*L. monocytogenes* の生菌数は減少していくことがわかった。これは、温度、pH、Aw あるいは浸透圧など複数の要因によって菌の増殖が抑制され、一部は分裂能が消失したため、培養法で検出される生菌数が減少したと思われる。したがって、辛子明太子製造業者のリステリア対策としては、調味液の pH と Aw をできるだけ低く調整し、6°C 以下で製造することが重要と考えられる。

A. 研究目的

Listeria monocytogenes は、4°C の冷蔵状態でも増殖可能な低温細菌であり、その発育可能な pH 域は 4.4~9.4 と広く、また 10% の高食塩濃度でも発育する耐塩性の特性を持つ。本菌は、環境中のきわめて広い範囲に分布しているため、食品を汚染する機会は多く、特に製造後、長期間にわたり低温流通する食品や、加熱せずにそのまま食べる (以下 ready-to-eat) 食品については、リステリア汚染防止対策が必要である。国内で流通する水産食品では、刺身や寿司ネタなどの ready-to-eat 鮮魚介類のほかにもスモークサーモン、スジコ、辛子明太子などの ready-to-eat 魚介類加工品から、本菌が検出されることが報告されているが、その汚染菌量は大半が 1 CFU 未満/g と非常に低い。

辛子明太子は、唐辛子調味液 (以下調味液) に塩たらこを 2~7 日間冷蔵室内で漬け込むことで製造される日本独特の ready-to-eat 魚介類加工品である。辛子明太子の製造には加熱工程がなく、しかも消費期限が冷蔵下で 7~14 日間と長いいため、本食品の製造過程における *L. monocytogenes* の制御は重要と考えられる。水産食品中での本菌の消長については、スモークサーモンあるいは塩辛、いずしについての報告はあるが、辛子明太子についての知見はない。そこで、調味液や塩たらこに *L. monocytogenes* を接種し、調味液中や塩たらこ中および辛子明太子製造時の菌の消長を調べたので報告する。

B. 研究方法

1. 調味液および塩たらこ

調味液は、自作調味液およびメーカー製調味液(A, B, C および D の 4 社)を使用した。

自作調味液は、加熱してアルコール分を飛ばした日本酒に昆布を加えて 30 分放置後、カツオ節を加え約 1 分加熱し、ろ過した液に醤油、砂糖、リンおよび唐辛子粉を加えて作製した。調味液中の唐辛子粉の含有割合は 10%とした。

塩たらこは、亜硝酸ナトリウムを使用していない無着色塩たらこをメーカーから購入した。塩たらこは粒状にばらして“バラコ”とし、重量比で“バラコ”2 に対して生理食塩水 1 の割合で混合したもの(以下バラコ試料)を試験に供した。

自作調味液およびバラコ試料は、実験の内容に応じて、ポリペプトン(以下ペプトン)を添加したり、2N NaOH を加えて pH を修正して用いた。

2. 供試菌株

当研究所で分離した辛子明太子由来の *L. monocytogenes* FCI-Lis10(血清型 1/2a)のほか、FCI-Lis12(血清型 1/2b), FCI-Lis29(血清型 3a) および九州大学で分離した鶏肉由来の LM17(血清型 4b)の菌株を使用した。供試菌株は、トリプトソイブイオン(BD)で 35°C, 18 時間培養後、滅菌生理食塩水で希釈して実験に使用した。

3. *L. monocytogenes* の増殖実験

調味液およびバラコ試料にそれぞれ 10^4 CFU/g レベルとなるよう、*L. monocytogenes* 菌液を接種し、増殖実験を行った。また、“バラコ”を調味液に漬け込んで菌液を接種し、辛子明太子の製造実験を行った。製造実験では、バラコ試料の作製と同様に、重量比で“バラコ”2 に対して調味液 1 を混合した。

実験温度は、辛子明太子が 4~6°C の冷蔵室内で製造されることから 6°C とした。なお、調味液およびバラコ試料での増殖実験は、温度の影響を調べるため、6°C のほか 15°C で行った。

4. 細菌数および理化学成分の測定

L. monocytogenes の菌数は PALCAM 寒天培地(MERCK)に、一般細菌数は標準寒天培地(日水)に、スパイラルプレーティング法で塗抹し測定した。乳酸菌数の測定は BCP プレートカウント培地(栄研化学)を用いて混釈培養法で行った。

pH は pH メーター(HORIBA, F-21)で、塩分量はデジタル塩分計(積水化学工業, SS-31A)で、水分活性(以下 Aw)は水分活性測定システムロトニック DT 型(ロトニック社)を用いて測定し

た。

調味液の有機酸(酢酸, 乳酸, プロピオン酸, 酪酸)とエタノールについては、それぞれキャピラリー電気泳動法, ガスクロマトグラフ法で測定した。

C. 研究結果

1. 調味液中の *L. monocytogenes* の消長

1) 調味液の細菌数および理化学的性質

調味液の細菌数および理化学成分の測定結果を Table 1 に示した。

自作調味液は、pH 5.9, 6.5 および 7.0 に調整し、それぞれペプトンを 1% 添加したものと未添加のものを計 6 種類作製した。これらの自作調味液の一般細菌数は 7.2×10^3 CFU/g, 乳酸菌数は 3.0×10^3 未満 CFU/g, Aw は 0.95, 塩分濃度は 1.3% であり、有機酸として酢酸が 0.02%, 乳酸が 0.21%, エタノールは 4.6% 含まれていた。

4 社の調味液の一般細菌数は 2.0×10^2 未満 CFU/g, 乳酸菌数は 3.0×10^3 未満 CFU/g であり、pH は 5.7~6.1, Aw は 0.89~0.93, 塩分濃度は 0.9~1.0% の範囲であり、有機酸として酢酸が 0.01 未満~0.56%, 乳酸が 0.01 未満~0.03%, エタノールは 2.1~4.5% 含まれていた。

プロピオン酸と酪酸はいずれの調味液からも検出されなかった。

2) 自作調味液での実験結果

自作調味液に FCI-Lis10 株(血清型 1/2a)を 10^4 CFU/g レベル接種し、6°C と 15°C 保存時における *L. monocytogenes* の消長を Fig.1 に示した。6°C の場合、pH およびペプトン添加の有無にかかわらず、FCI-Lis10 株の菌数は日数の経過に伴い減少し、特に pH 5.9 では 10~14 日目に検出限界値 (2.0×10^2 CFU/g) 未満となった (Fig.1-A,B)。

15°C の場合、ペプトン添加の有無にかかわらず、pH 5.9 では菌数は減少し 4~14 日目にかけて検出限界値未満となったが、pH 6.5 では菌数の減少は少なく、pH 7.0 では 10 日目以降 10^5 CFU/g レベルに菌数が増加した (Fig.1-C,D)。

3) メーカー製調味液での実験結果

A および B 社の調味液については 6°C と 15°C で増殖実験を行ったが、C および D 社の調味液は入手量が少なかったため 6°C だけの試験を行った。自作調味液と同様に、FCI-Lis10 株を接種して行った実験結果を Fig.2 に示した。6°C では、

A社の調味液の菌数は緩やかに減少したが、B、CおよびD社の調味液では菌数が2~4日目に急減し検出限界値未満となった。15℃でのAおよびB社の調味液中の菌数は2~4日目以降急減し、検出限界値未満となった。

2. 塩たらこ中の *L. monocytogenes* の消長

塩たらこの一般細菌数は 2.0×10^2 未満~ 3.6×10^3 CFU/g の範囲であり、乳酸菌数は 3.0×10^3 未満 CFU/g、塩分濃度は 3.8%であった。

塩たらこから作製したバラコ試料の pH は 6.0 であり、さらに pH を 6.5 と 7.0 に修正し、それぞれにペプトンを 1% 添加した試料(以下ペプトン加試料)も実験に使用した。これらのバラコ試料およびペプトン加試料の A_w はいずれも 0.97 であった。FCI-Lis10 株を接種して行った実験結果を Fig.3 に示した。

6℃保存では、バラコ試料もペプトン加試料も、 10^4 CFU/g レベル接種した FCI-Lis10 株の菌数は 4~6 日目以降、pH 7.0>6.5>6.0 の順に増加した。ただし、pH 6.0 のバラコ試料では 14 日目の菌数は接種菌数とほぼ同数であった(Fig.3-A)。ペプトン加試料の場合、pH 6.5 では pH 7.0 と同程度に菌数が増加したが、pH 6.0 では 14 日目の菌数は接種菌数よりわずかに増加しただけであった(Fig.3-B)。

15℃保存では、バラコ試料もペプトン加試料も、6℃保存よりも増殖は良好となった(Fig.3-C,D)。ペプトン加試料の場合、pH 6.5 では pH 7.0 と同程度に菌数が増加した(Fig.3-D)。

3. 製造過程での *L. monocytogenes* の消長

FCI-Lis10 株を接種して、各 pH の自作調味液 3 種と、A および B 社の調味液 2 種を使って辛子明太子の製造実験を行った。できあがった辛子明太子の pH は、自作調味液と B 社の調味液を用いた場合が 6.0、A 社の調味液を用いた場合が 5.8 であり、 A_w はいずれの調味液を使用した場合も 0.95 であった。

自作調味液を使用した場合、調味液の pH にかかわらず、 10^4 CFU/g レベル接種した FCI-Lis10 株の菌数は日数の経過に伴い緩やかに減少した(Fig.4-A)。A および B 社の調味液を使用した場合、菌数は 2 日目に 10^3 CFU/g レベルとなり、4 日目以降は 10^2 CFU/g レベルまたは検出限界値未満となった(Fig.4-B)。

さらに、FCI-Lis12(血清型 1/2b)、FCI-Lis29(血清型 3a) および LM17(血清型 4b) の 3 株を接種

して、pH 5.9 の自作調味液と A および B 社の調味液による辛子明太子の製造実験を行い、*L. monocytogenes* の菌数とともに一般細菌数と乳酸菌数を測定した。

3 株の菌数は、pH 5.9 の自作調味液でも A 社の調味液でも 10^2 CFU/g レベル以下に減少した(Fig.5-A,B)。B 社の調味液では、FCI-Lis12 株の菌数は 10^3 CFU/g レベルまでしか減少しなかったが、ほかの 2 株の菌数は 10^2 CFU/g レベル以下に減少した(Fig.5-C)。

一般細菌数は、FCI-Lis12 株を接種した B 社の調味液では 14 日目には 10^5 CFU/g レベルに増加したが、それ以外の試料では日数の経過に伴い $10^2 \sim 10^3$ CFU/g レベルに減少した(Fig.6-A,B,C)。なお、乳酸菌数はすべて 3.0×10^3 未満 CFU/g であった。

D. 考察

辛子明太子の製造に使用する調味液には、鰹だしや昆布だしなどの旨味成分、糖類、ミリン、甘味料、食塩、着色料、唐辛子粉が含まれるが、食品メーカーでは、粘度安定剤としてのデンプン、酸化防止剤としてのビタミン C、色調調整剤としてのナイアシン、さらに品質の安定化と保存性向上のための pH 調整剤や日持ち向上剤を添加していることが多い。このため、メーカー製調味液を用いて実験を行った場合、食品添加物の影響が考えられたため、本実験では調味液を自作した。

実験に際し、自作調味液や塩たらこ中に菌が利用する栄養分が十分含まれているか不明であったため、ペプトンを 1% 添加した自作調味液やバラコ試料も実験に用いた。なお、筆者らは、予備実験として 1% ペプトン水や唐辛子粉を 10% 添加したトリプトソイブイオンに FCI-Lis10 株を接種し 6℃ で増殖試験を行い、FCI-Lis10 株は 1% ペプトン水で十分に増殖し、唐辛子粉による菌の発育抑制効果はないことを確認した。

自作調味液に FCI-Lis10 株を接種し 6℃ で増殖実験を行うと、pH およびペプトン添加の有無にかかわらず菌数は緩やかに減少し、pH 5.9 の調味液では 10~14 日目に検出されなくなった。15℃ で増殖実験を行った場合、ペプトン添加の有無にかかわらず、pH 5.9 および pH 6.5 では接種菌数よりも菌数が増加することはなく、pH 7.0 では 10 日目以降に菌数がわずかに 1 オーダ増加しただけであった。

pH 5.7~6.1 の 4 社の調味液に FCI-Lis10 株を接種し 6℃ で増殖実験を行うと、いずれのメーカ

一製調味液でも菌数は減少した。さらに、A および B 社の調味液については 15°C でも増殖試験を行ったが、菌数は両社とも減少した。

Pathogen Modeling Program 7.0 (USDA)による *L. monocytogenes* の増殖モデルのデータを Table 2 に示した。その結果、調味液の pH および Aw と同じ条件で 6°C の Broth culture (Aw) から得られた菌の誘導期は、自作調味液で平均 11.69 日、B 社の調味液で平均 22.85 日であり、残りの 3 社の調味液では予測増殖データが得られなかった。したがって、FCI-Lis10 株が 6°C の調味液中で 14 日間増殖しなかったことは、温度、pH および Aw の相互作用により誘導期が延長されたことによるものと考えられた。なお、本菌が増殖可能な Aw の下限値は 0.90~0.93 または 0.92 であり、今回用いたメーカー製調味液の Aw はその下限値またはそれ以下であり、メーカー製調味液を使った実験結果には Aw が大きく関与したものと考えられる。

L. monocytogenes に対して発育抑制効果の高い有機酸には酢酸と乳酸があるが、それらの D 値は pH の影響を強く受ける。0.6% の酢酸と 0.9% の乳酸は pH 6.0 では本菌に対して高い抑制効果を示さず、また、乳酸を使った食品中の本菌の制御には 2~3% 以上の高濃度が使用される。調味液に含まれた酢酸は、C 社が 0.56% とやや高い濃度であったが、それ以外の調味液では 0.01 未満~0.12% と低い濃度であった。乳酸については、自作調味液が 0.21%、4 社が 0.01 未満~0.03% と低い濃度であった。したがって、C 社の調味液中の菌の消長には有機酸の微妙な影響があったかもしれないが、それ以外の調味液については有機酸の影響は少なかったものと思われる。

6°C に保存したバラコ試料中の FCI-Lis10 株の菌数は、pH 6.5 および pH 7.0 の試料では増加したが、pH 6.0 では 14 日目においても接種菌数とほぼ同数であった。また、6°C のペプトン加試料の場合も、pH 6.0 では 14 日目の菌数は接種菌数よりも微増した程度であった。バラコ試料およびペプトン加試料の Aw は 0.97 であり、実験に使用した各調味液の Aw 0.89~0.95 と比べてやや高めであった。Table 2 の増殖モデルから算出された pH 6.0 のバラコ試料中の菌の誘導期は、平均 5.06 日と各調味液と比べると短かく、同じ 6°C でも pH 6.0 のバラコ試料と調味液では異なる菌の消長を示したものと考えられた。

自作調味液を使って 6°C で辛子明太子を作製

した場合、調味液の pH に関係なく FCI-Lis10 株の菌数は減少した。また、A および B 社の調味液を用いて辛子明太子を作製した場合も FCI-Lis10 株の菌数は減少した。さらに、FCI-Lis12、FCI-Lis29 および LM17 の 3 株を接種して、同様の製造実験を行った。pH 5.9 の自作調味液を使用した場合も、A および B 社の調味液を使用した場合も、各 3 株の菌数は日数の経過に伴い減少した。ただし、B 社の調味液では、FCI-Lis12 株の菌数は減少は 10^3 CFU/g レベルまでであった。

各調味液を用いて作製された辛子明太子の pH は 5.8 または 6.0 であり、Aw はバラコ試料よりも低く、自作調味液と同じ 0.95 であった。Table 2 の増殖モデルから算出された辛子明太子中の誘導期は、平均 13.52 または 10.20 日と自作調味液中の誘導期の長さにはほぼ匹敵した。したがって、6°C で行った辛子明太子の製造実験において接種した *L. monocytogenes* 4 株がいずれも増殖しなかったことは、調味液での実験結果と同様、温度、pH および Aw の相互作用により菌の誘導期が延長されたためと考えられた。

L. monocytogenes の増殖性に関与する要因の 1 つとしてとして、共存菌の影響を検討した。一般細菌数は、自作調味液が 7.2×10^3 CFU/g、4 社の調味液がいずれも 2.0×10^2 未満 CFU/g、塩たらが 2.0×10^2 未満~ 3.6×10^3 CFU/g といずれも少なかった。また、乳酸菌数はどの調味液も塩たらこも 3.0×10^3 未満 CFU/g であった。FCI-Lis12、FCI-Lis29 および LM17 の 3 株を接種した製造実験においては、一般細菌数は FCI-Lis12 株を接種した B 社調味液での試料を除くと 10^2 ~ 10^3 CFU/g レベルに減少し、乳酸菌数もすべて 3.0×10^3 CFU 未満/g であった。したがって、今回の実験では *L. monocytogenes* の消長に対する共存菌の影響はなかったものと思われた。

調味液に FCI-Lis10 株を接種して 15°C で増殖試験を行うと、pH 5.9 の自作調味液ではペプトン添加の有無にかかわらず菌数が減少し、A および B 社の調味液でも菌数は減少した。Table 2 の増殖モデルから算出された 15°C での調味液中の菌の誘導期は、A 社が平均 11.79 日、B 社が平均 7.18 日と長かったが、自作調味液では平均 3.43 日と短く、少なくとも自作調味液中では菌が増殖することが可能な状態にあると思われた。一方、調味液中のエタノールは、自作調味液で 4.6%、メーカー製調味液で 2.1~4.5% 含まれていた。また、調味液の塩分は、自作調味液では 1.3%、メーカー製調味液では 0.9~1.0% であった。エタノ

ールや食塩は、酢酸やグリシン、ソルビトールと同様に浸透圧の上昇効果にすぐれ、細菌の発育を抑制する。今回の実験で、調味液中の浸透圧の測定は行っていないが、15℃の自作調味液中でも FCI-Lis10 株の菌数が減少したことから、調味液中や辛子明太子製造過程における *L. monocytogenes* の増殖性には浸透圧の影響があったのではないかと推察された。

以上、今回の実験結果から、少なくとも pH 5.9 以下かつ Aw 0.95 以下の調味液を使用して 6℃ 以下の温度で辛子明太子を製造すれば、*L. monocytogenes* の菌数は減少していくことがわかった。これは、温度、pH、Aw あるいは浸透圧など複数の要因によって菌の増殖が抑制され、培養法で検出される生菌数が減少したものと思われた。したがって、辛子明太子製造業者のリステリア対策としては、調味液の pH と Aw をできるだけ

低く調整し、6℃以下で製造することが重要と考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 学会発表

1) 馬場愛, 樋脇弘, 宮本敬久, 瓜生佳世, 江渕寿美, 武田昭: 辛子明太子製造過程における *Listeria monocytogenes* の消長。第 26 回日本食品微生物学会学術総会。2005 年 11 月。金沢

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1. Biological, physical and chemical property of seasoning liquids

Seasoning liquid	Standard plate count	Count of LAB ^a	pH	Aw	Salinity	Acetic acid	Lactic acid	Ethyl alcohol
Self-made	7.2×10^3 CFU/g	$<3.0 \times 10^3$ CFU/g	5.9/6.5/7.0	0.95	1.3%	0.02%	0.21%	4.6%
A company	$<2.0 \times 10^2$ CFU/g	$<3.0 \times 10^3$ CFU/g	5.7	0.93	1.0%	0.10%	0.02%	2.1%
B company	$<2.0 \times 10^2$ CFU/g	$<3.0 \times 10^3$ CFU/g	6.0	0.93	1.0%	0.12%	0.03%	2.5%
C company	$<2.0 \times 10^2$ CFU/g	$<3.0 \times 10^3$ CFU/g	6.1	0.89	0.9%	0.56%	<0.01%	3.2%
D company	$<2.0 \times 10^2$ CFU/g	$<3.0 \times 10^3$ CFU/g	5.7	0.91	1.0%	<0.01%	0.03%	4.5%

^a Lactic acid bacteria.

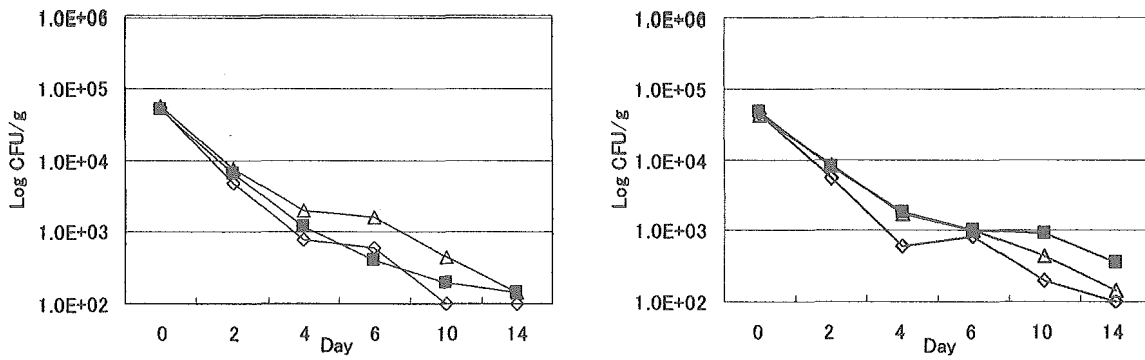
Table 2. Modeled growth parameters of *Listeria monocytogenes* in broth culture (Aw) by Pathogen Modeling Program 7.0

Temp.	pH	Aw	Sample which corresponds to the same condition (pH, Aw)	Growth parameter of lag phase duration (day)	Growth parameter of Generation time (day)
6°C	5.9	0.95	Self-made seasoning liquid	11.69 [9.27 ^a -14.73 ^b]	1.28 [1.08 ^a -1.52 ^b]
15°C	5.9	0.95	Self-made seasoning liquid	3.43 [2.88 ^a -4.07 ^b]	0.28 [0.25 ^a -0.32 ^b]
6°C	5.7	0.93	A company's seasoning liquid	No growth data	No growth data
15°C	5.7	0.93	A company's seasoning liquid	11.79 [8.11 ^a -17.14 ^b]	0.69 [0.52 ^a -0.91 ^b]
6°C	6.0	0.93	B company's seasoning liquid	22.85 [15.12 ^a -34.52 ^b]	2.34 [1.72 ^a -3.17 ^b]
15°C	6.0	0.93	B company's seasoning liquid	7.18 [5.02 ^a -10.27 ^b]	0.52 [0.40 ^a -0.68 ^b]
6°C	6.1	0.89	C company's seasoning liquid	No growth data	No growth data
6°C	5.7	0.91	D company's seasoning liquid	No growth data	No growth data
6°C	6.0	0.97	Salted cod roe sample	5.06 [4.45 ^a -5.77 ^b]	0.68 [0.62 ^a -0.75 ^b]
6°C	5.8	0.95	Karashi-Mentaiko ^c	13.52 [10.64 ^a -17.19 ^b]	1.48 [1.18 ^a -1.68 ^b]
6°C	6.0	0.95	Karashi-Mentaiko ^d	10.20 [8.16 ^a -12.76 ^b]	1.18 [1.00 ^a -1.39 ^b]

^a Lower confidence limit, ^b Upper confidence limit, ^c A company's seasoning liquid was used,

^d Self-made seasoning liquid or B company's seasoning liquid was used.

(A) Self-made seasoning liquid at 6°C (B) Self-made seasoning liquid with 1% peptone at 6°C



(C) Self-made seasoning liquid at 15°C (D) Self-made seasoning liquid with 1% peptone at 15°C

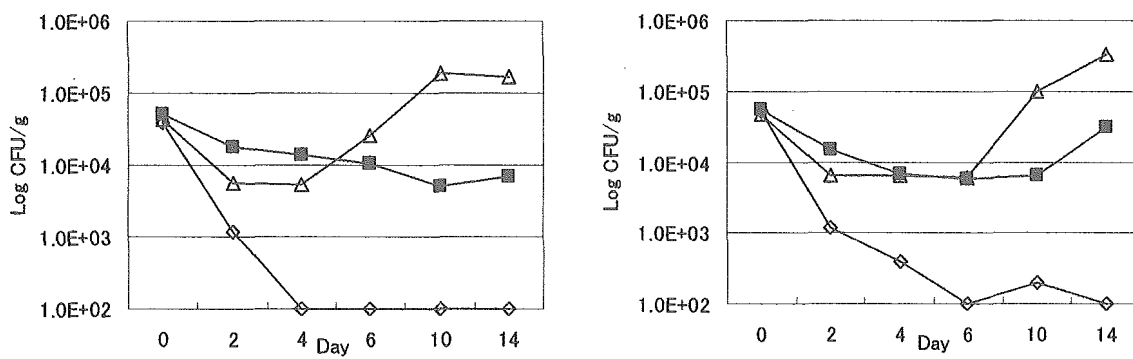


Fig. 1. Changes of viability of *L. monocytogenes* FCI-Lis10 strain in self-made seasoning liquid.

◇, pH 5.9, Aw 0.95; ■, pH 6.5, Aw 0.95; △, pH 7.0, Aw 0.95.

(A) Food company's seasoning liquid at 6°C

(B) Food company's seasoning liquid at 15°C

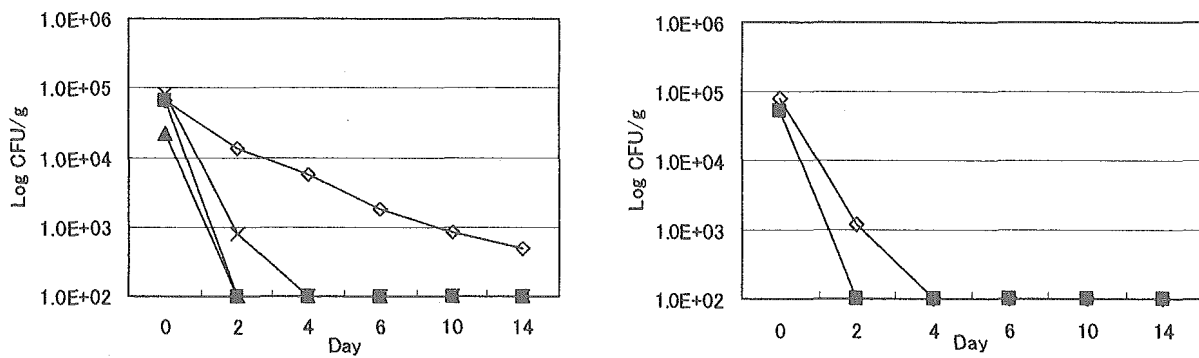
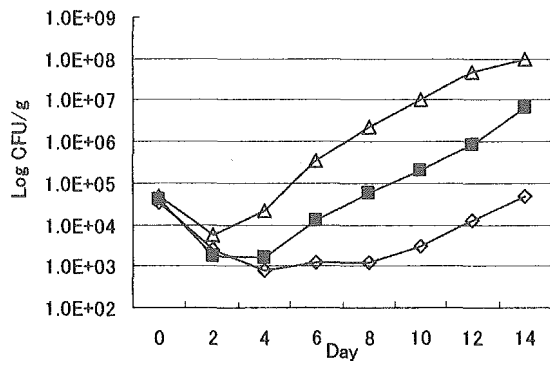


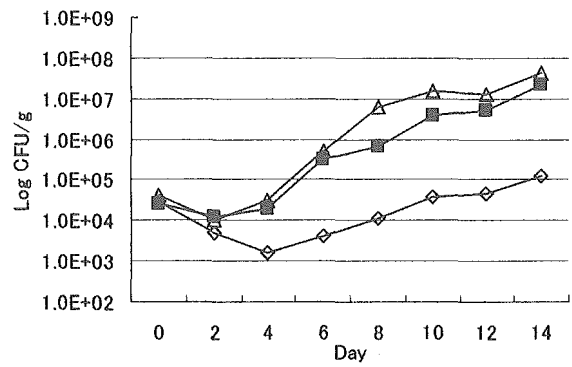
Fig. 2. Changes of viability of *L. monocytogenes* FCI-Lis10 strain in food company's seasoning liquid.

◇, A company (pH 5.7, Aw 0.93); ■, B company (pH 6.0, Aw 0.93);
 ▲, C company (pH 6.1, Aw 0.89); ×, D company (pH 5.7, Aw 0.91).

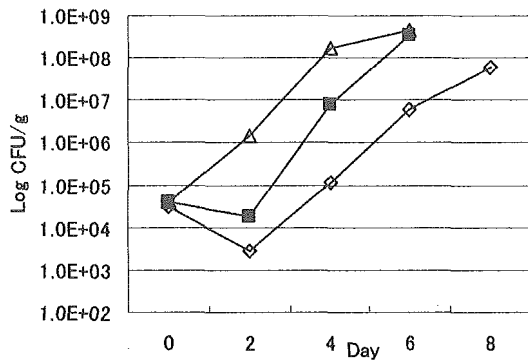
(A) Salted cod roe sample at 6°C



(B) Salted cod roe sample with 1% peptone at 6°C



(C) Salted cod roe sample at 15°C



(D) Salted cod roe sample with 1% peptone at 15°C

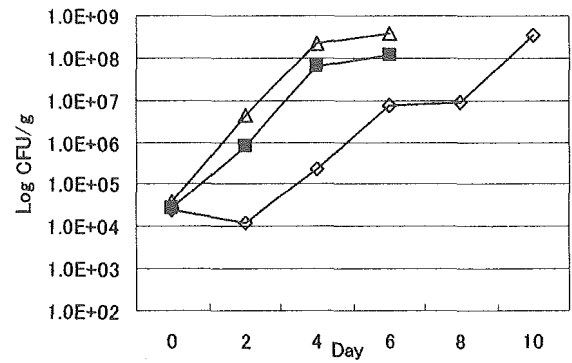
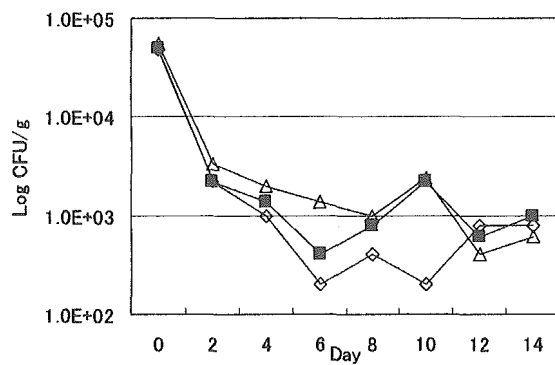


Fig. 3. Changes of viability of *L. monocytogenes* FCI-Lis10 strain in salted cod roe sample.

◇, pH 6.0; ■, pH 6.5; △, pH 7.0; Aw 0.97 (salted cod roe sample, salted cod roe sample with 1% peptone).

(A) Manufacturing with self-made seasoning liquid



(B) Manufacturing with food company's seasoning liquid

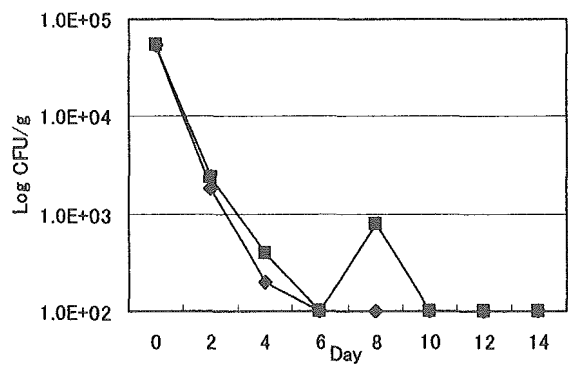


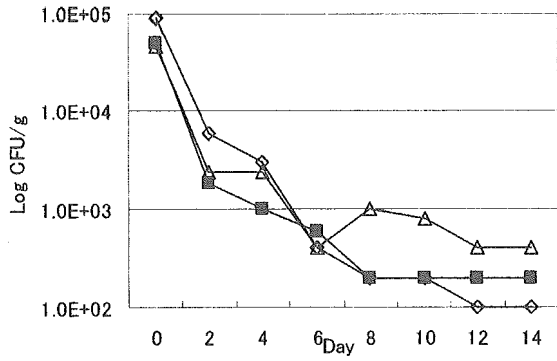
Fig. 4. Changes of viability of *L. monocytogenes* FCI-Lis10 strain in the manufacturing process of Karashi-Mentaiko at 6°C.

(A): ◇, pH 5.9 (self-made seasoning liquid); ■, pH 6.5 (self-made seasoning liquid); △, pH 7.0 (self-made seasoning liquid).

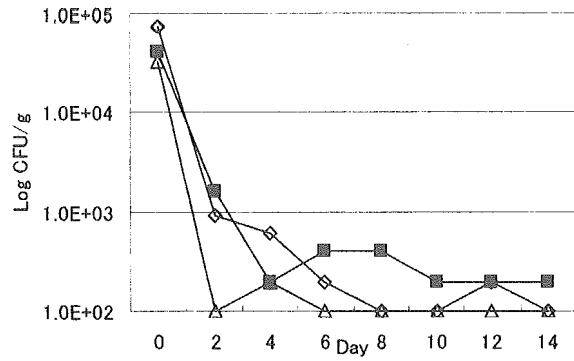
(B): ◇, pH 5.7 (A company's seasoning liquid); ■, pH 6.0 (B company's seasoning liquid).

Aw of manufactured Karashi-Mentaiko (A and B) was 0.95 respectively.

(A) Manufacturing with self-made seasoning liquid (pH 5.9)



(B) Manufacturing with A company's seasoning liquid (pH 5.7)



(C) Manufacturing with B company's seasoning liquid (pH 6.0)

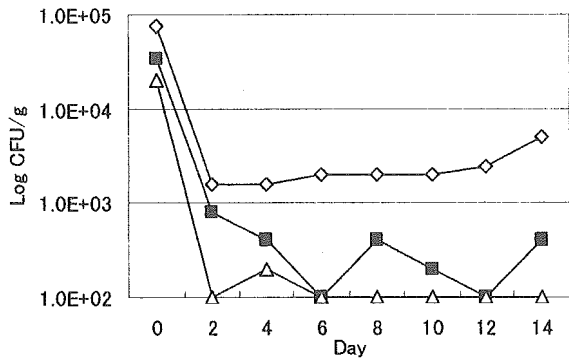
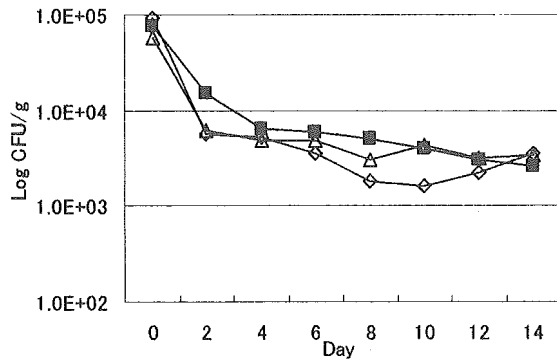


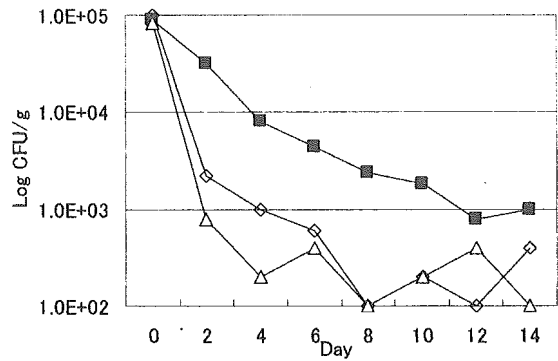
Fig. 5. Changes of viability of *L. monocytogenes* FCI-Lis12 strain, FCI-Lis29 strain and LM17 strain in the manufacturing process of Karashi-Mentaiko at 6°C.

◇, FCI-Lis12 strain; ■, FCI-Lis29 strain;
△, LM17 strain.

(A) Manufacturing with self-made seasoning liquid (pH 5.9)



(B) Manufacturing with A company's seasoning liquid (pH 5.7)



(C) Manufacturing with B company's seasoning liquid (pH 6.0)

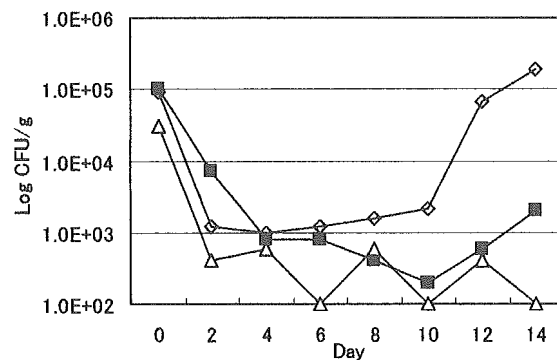


Fig. 6. Standard plate count in the manufacturing process of Karashi-Mentaiko at 6°C.

◇, Inoculation of FCI-Lis12 strain;
■, Inoculation of FCI-Lis29 strain;
△, Inoculation of LM17 strain.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）
（協力研究報告書）

無調理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
魚卵加工品の低温保存時における *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

L. monocytogenes 保存株（標準株を含む）30株を食塩濃度3%、pH6.0に調整した Trypticase soy broth に接種後4℃で34日間あるいは10℃で8日間保持し、増殖性の優れた2株を選択した。これら2株を用いて魚卵加工品の低温保存時における本菌の挙動を調べた。辛子明太子に接種した場合は、保存温度が4℃、10℃にかかわらず菌数が減少し、3週間で2~3オーダー減少した。たらこに接種した場合は4℃保存では菌数が減少した。一方、10℃保存では2週間目までは接種当初レベル以下であったが、3週間目には菌数が増加し、菌株によっては接種時より2オーダー以上高くなった。

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。昨年度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および冷蔵保存して菌数の推移を検討した。しかし、昨年度は標準菌株1株のみを用いて検討したにすぎない。リスクを評価するためには、低温増殖性、耐塩性の優れた株を用いて、さらに検討する必要がある。今年度はまず、保存株（標準株を含む）30株を魚卵と同等の食塩濃度3%、pH6.0に調整した Trypticase soy broth に接種し、10℃で8日間および4℃で34日間保存して増殖性の優れた2株を選択した。次に、これら2株を用いて魚卵加工品の低温保存時

における本菌の挙動を再度調べた。

B. 研究方法

B-1 液体培地接種菌株の挙動

Brain heart infusion(Difco)で30℃、18時間の条件で3代継代した *L. monocytogenes* 保存株30株（表1）を Trypticase soy broth（以下 TSB：BBL 食塩濃度0.5%、pH7.3）と食塩濃度3%、pH6.0に調整した TSB10ml にそれぞれ 10^3 CFU / ml となるように接種した。これらを4℃で34日、10℃で8日間保持し、経時的に *L. monocytogenes* 菌数を測定した。菌数測定は Tryptose Agar (Difco) 平板を用いたスパイラル・プレーティング法により実施した。

B-2 魚卵加工品の低温保存時における挙動

BHI で30℃、18時間の条件で3代継代した *L. monocytogenes* ATCC 43256（California）株および *L. monocytogenes*

ATCC 49594 (Scott A) 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。辛子明太子およびたらこは外膜を除去してバラコ状態にした後それぞれ 10g ずつ滅菌ポリ袋に分取し、希釈菌液 200 μ l を 10^3 CFU / g となるよう接種した。これらのポリ袋をシールした後、4°C および 10°C で 3 週間保存した。その間、経時的に各保存条件の試料を 2 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。平板塗抹法で集落が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辛子明太子およびたらこはあらかじめ *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°C で 48 時間培養することにより細菌数を、25°C 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、保存期間中および最終日に pH を測定した。

C. 研究結果

C-1 液体培地接種菌株の挙動

液体培地に接種して 10°C で保存した場合の各菌株の挙動を図 1~2 に示した。TSB では 3 日目には 3~4 オーダー増加し、6 日目には $10^8 \sim 10^9$ CFU / ml に達した。一方、食塩濃度 3%、pH6.0 に調整した TSB では菌株間の増殖速度にやや差異が生じ、3 日目で 3 オーダーまで増加せず、

$10^8 \sim 10^9$ CFU / ml に達するまで 8 日かかる菌株もみられた。

4°C に保存した場合の各菌株の挙動を図 3~4 に示した。TSB では 1 週間後には菌数の変化がみられない株から 2 オーダー増加した株まで差異が認められた。3 週間後には当初菌数から 3~5 オーダー増加し、34 日後にはどの株も $10^8 \sim 10^9$ CFU / ml に達した。塩分濃度 3%、pH6.0 に調整した TSB では調整しない TSB と比較して菌数の増加速度がやや遅く、34 日後でも 10^8 CFU / ml に達しない株が数株認められた。

これら菌株の低温保存時の挙動は血清型あるいは由来による差異は特に認められなかった。ただし、株番号 6 の菌株は他 29 株に比べ増殖速度が遅く、その差は塩分濃度 3%、pH6.0 に調整した TSB で顕著であった。一方、株番号 1 と株番号 2 の ATCC 株は上記のどの条件においても増殖性に優れていた。

C-2 魚卵加工品の低温保存時における挙動

図 5~6 に *L. monocytogenes* を辛子明太子に接種して冷蔵保存した場合の *L. monocytogenes* 菌数、細菌数および低温細菌数の推移を示した。*L. monocytogenes* 菌数は保存温度に関係なく減少し、3 週間後には平板塗抹法で検出限界 (5CFU / g) 以下となった。しかし、これらを増菌培養すると大部分の試料で *L. monocytogenes* が検出された。細菌数、低温細菌数については 10°C 保存の場合には急激に増加し、2 週間後には 10^8 CFU / g レベルに達した。4°C 保存では増加速度は遅く、2 週間後に $10^4 \sim 10^5$ CFU / g、3 週間後に $10^4 \sim 10^6$ CFU / g であった。

図 7~8 に *L. monocytogenes* をたらこに接種して冷蔵保存した場合の *L. monocytogenes* 菌数、細菌数および低温細菌数の推移を示した。*L. monocytogenes*

菌数は 10°C に保存した場合 2 週間目までは当初の菌数レベル内で推移したが、3 週間目には Scott A 株では当初より 1 オーダー、California 株では 2 オーダー増加した。4°C に保存した場合は徐々に減少し、3 週間後にはほとんどの試料で検出限界 (5CFU / g) 以下となった。しかし、これらの試料についても増菌法では *L. monocytogenes* が検出された。細菌数は 10°C で保存した場合は 10⁶ CFU / g、4°C で保存した場合は 10⁵ CFU / g に留まったが、低温細菌数は 1 ~ 2 週間目に 10⁷ ~ 10⁸ CFU / g に達した。

水分活性は辛子明太子が 0.93、たらこが 0.94 であり、塩分濃度はそれぞれ 3.1% と 3.5% であった。pH は辛子明太子では菌接種前に 5.9 であったが、10°C 保存 1 週間後に 5.7、3 週間後には 5.2 とやや下がった。4°C 保存の場合は 3 週間目で 5.6 ~ 5.7 とあまり変化がなかった。たらこの pH は菌接種前には 6.2 であり、10°C 保存の場合は 6.0 ~ 6.4、4°C 保存では 5.9 ~ 6.1 とあまり変化がなかった (表 2)。

D. 考察

L. monocytogenes 30 株を魚卵を模して食塩濃度と pH を調整した液体培地に接種後冷蔵保存した場合の挙動を比較検討したところ、ATCC 43256 (California) 株および ATCC 49594 (Scott A) 株が増殖性に優れていた。そこで、これら 2 株を用いて魚卵加工品の低温保存時における挙動を調べた。辛子明太子に接種した場合 *L. monocytogenes* 菌数は保存温度に関係なく減少し、3 週間後には検出限界 (5CFU / g) 以下となった。一方、たらこでは、4°C に保存した場合は徐々に減少し、3 週間後にはほとんどの試料で検出限界以下となった。しかし、10°C に保存した場合は 2 週間目までは当初の菌数レベル内で推移したが、3 週間目には Scott A 株では当初より 1 オ

ーダー、California 株では 2 オーダー増加した。

辛子明太子の水分活性は 0.93、たらこは 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。pH は、たらこで菌接種前 6.2 であり、保存期間を通じ 5.9 ~ 6.4 とあまり変化がなく、*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。一方、辛子明太子は接種前の 5.9 から 10°C 保存 1 週間後に 5.7、3 週間後には 5.2 とやや下がったことから pH の低下が増殖抑制の要因となった可能性がある。また、辛子明太子では漬け込み液に *L. monocytogenes* の増殖を抑制する成分を加えることがある。今回 10°C で 3 週間保存した場合に、たらこでは当初菌数より 1 ~ 2 オーダー増加したが、辛子明太子では *L. monocytogenes* 菌数が増加しなかったことから、辛子明太子には本菌の増殖を抑制する成分が含まれていたことも考えられる。

E. 結論

魚卵加工品の低温保存時における *L. monocytogenes* の挙動を検討した。辛子明太子では、保存温度にかかわらず菌数が減少した。たらこの場合は 4°C 保存では菌数が減少したが 10°C 保存では 3 週間目に菌数が増加し、菌株によっては接種時より 2 オーダー以上高くなった。耐塩性、低温増殖性に優れた菌株では 10°C 保存で増殖する場合がある。4°C 保存では魚卵の種類、菌株にかかわらず減少したことから保存温度は 4°C が望ましいと考えられた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

研究発表

1. 論文発表

仲真晶子 食品媒介リステリア症. 防菌防
黴 34 : 149-154 (2006)

2. 学会発表

仲真晶子. 食品媒介リステリア症. 日本防
菌防黴学会第 32 回年次大会. 平成 17 年
5 月. 大阪.

仲真晶子. 食品の *Listeria* 汚染実態. 第 26
回日本食品微生物学会学術総会. 平成 17
年 11 月. 金沢.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 使用菌株

菌株No.	菌株名	血清型	由来
1	MMS-93001	4b	標準菌株 ATCC49594 (ScottA)
2	MMS-93002	4b	標準菌株 ATCC43256 (California)
3	MMS-98022	4b	臨床 新生児髄膜炎
4	MMS-98023	4b	臨床 髄膜炎
5	MMS-99402	4b	臨床 髄膜炎
6	MMS-02040	4b	臨床 髄膜炎・敗血症
7	MMS-03001	4b	臨床 髄膜炎・敗血症
8	MMS-03174	4b	臨床 敗血症
9	MMS-03072	4b	ヒト糞便
10	MMS-02003	4b	食品 生ハム
11	MMS-02097	4b	食品 松前漬
12	MMS-03094	1/2a	臨床 髄膜炎・敗血症
13	MMS-03117	1/2a	ヒト糞便
14	MMS-03140	1/2a	ヒト糞便
15	MMS-00272	1/2a	食品 生ハム
16	MMS-01304	1/2a	食品 サラミンソーセージ
17	MMS-02045	1/2a	食品 生ハム
18	MMS-01091	1/2a	食品 辛子明太子
19	MMS-01217	1/2a	食品 辛子明太子
20	MMS-02288	1/2a	食品 筋子醤油漬
21	MMS-02148	1/2a	食品 松前漬
22	MMS-01067	1/2a	食品 チーズ(ブリードモー)
23	MMS-02307	1/2a	食品 むか漬けきゅうり
24	MMS-01219	1/2b	食品 辛子明太子
25	MMS-02297	1/2b	食品 生珍味(海藻帆立)
26	MMS-01046	1/2b	食品 スモークサーモン
27	MMS-02304	1/2b	食品 鮭ジャーキー
28	MMS-01115	1/2b	食品 チーズ(ゴーダ)
29	MMS-04042	1/2b	食品 チーズ(プティリパロ)
30	MMS-02273	1/2b	食品 むか漬けきゅうり

表2. 試料の塩分濃度、水分活性、pH

		塩分濃度	水分活性	pH				
				菌接種前	10°C1W	10°C3W	4°C1W	4°C3W
辛子明太子	未接種	3.1%	0.93	5.9	5.7	5.2	5.8	5.7
	接種(S)				5.7	5.2	5.8	5.6
	接種(C)				5.7	5.2	5.8	5.7
たらこ	未接種	3.5%	0.94	6.2	6.1	6.3	5.9	6.1
	接種(S)				6.0	6.2	5.9	6.1
	接種(C)				6.1	6.4	5.9	6.1

備考 接種(S): ScottA株を接種した試料

接種(C): California株を接種した試料

図1. TSB (食塩濃度0.5%, pH 7.4)に接種後 10°C保存時の挙動

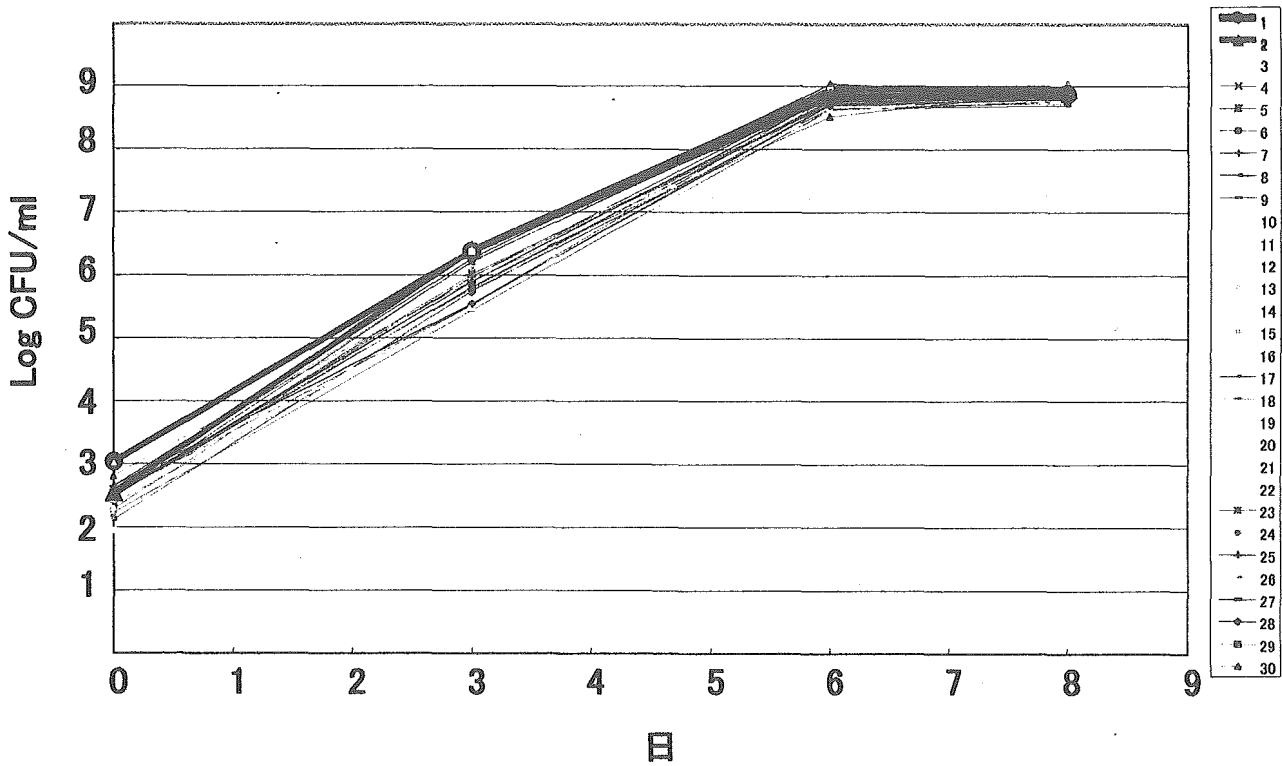


図2. TSB (食塩濃度3.0%, pH 6.0)に接種後 10°C保存時の挙動

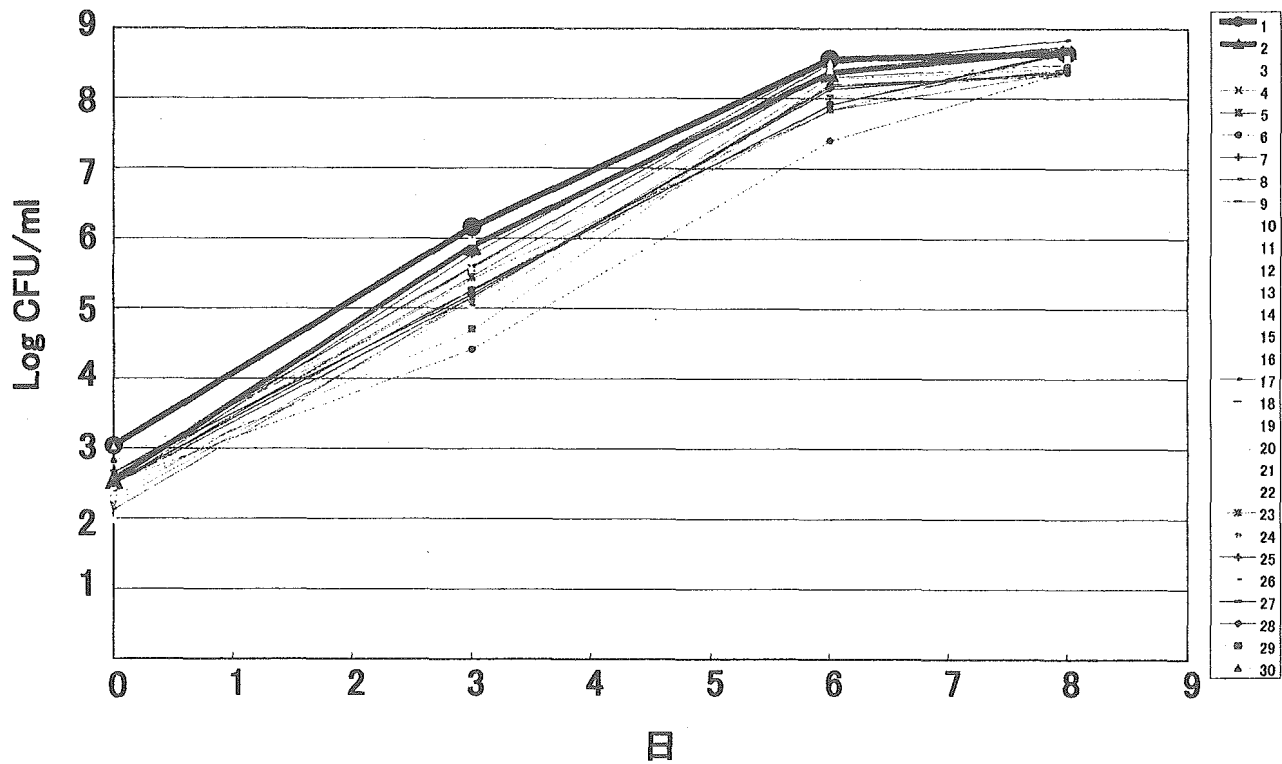


図3. TSB (食塩濃度0.5%, pH 7.4)に接種後 4°C保存時の挙動

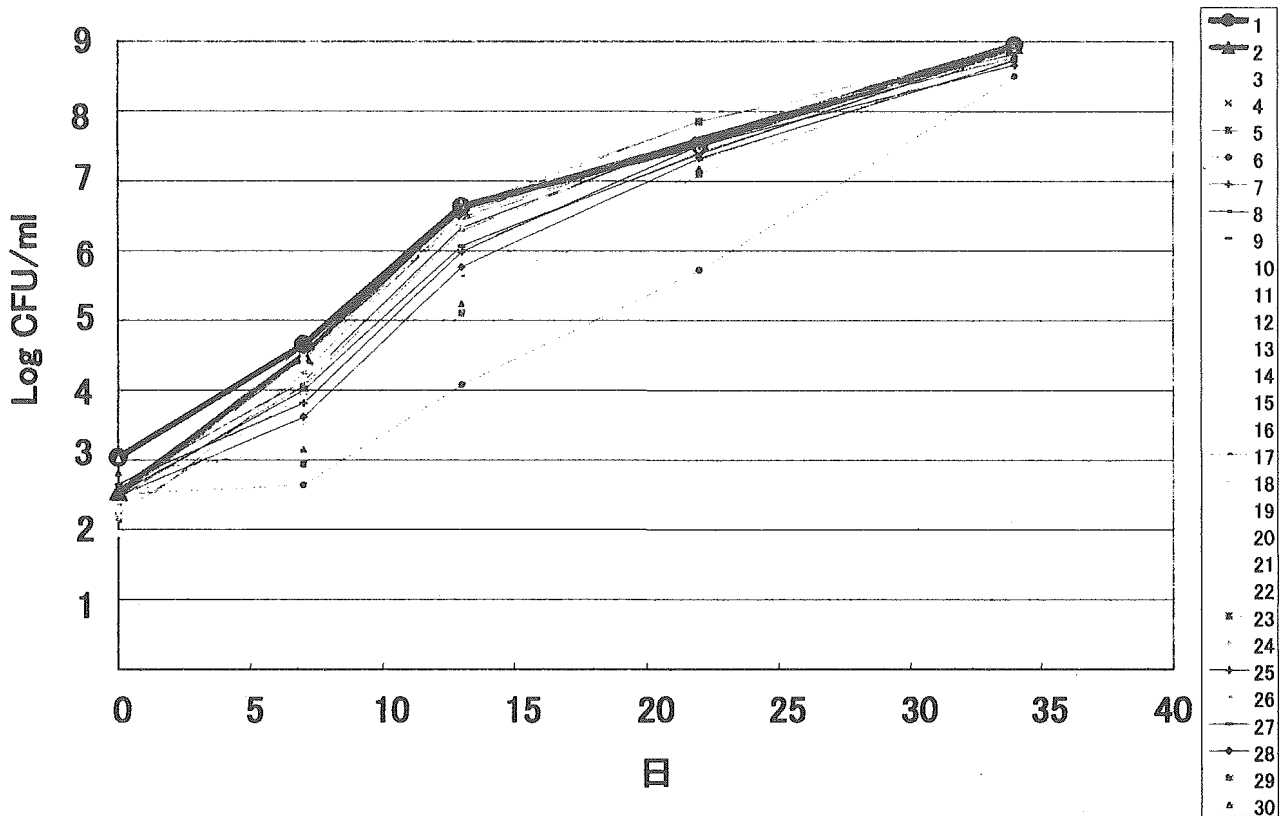


図4. TSB (食塩濃度3.0%, pH 6.0)に接種後 4°C保存時の挙動

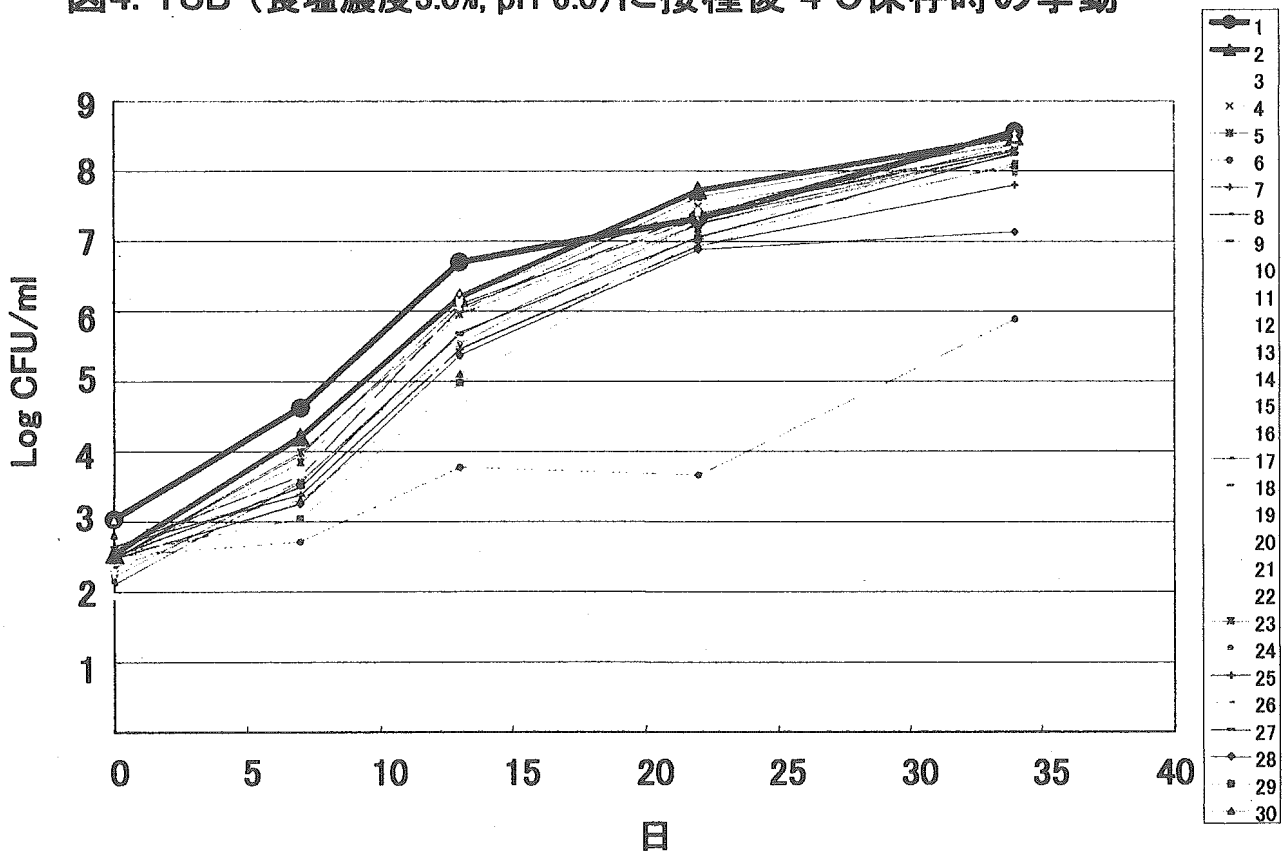
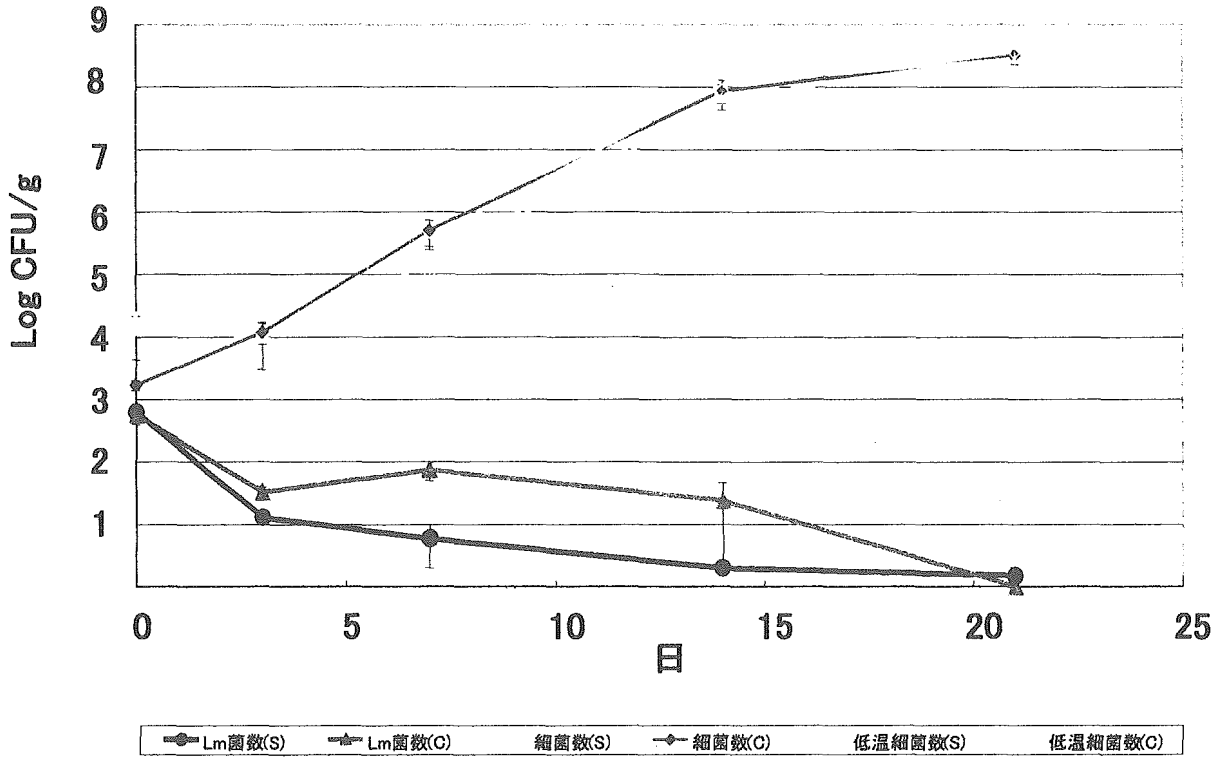
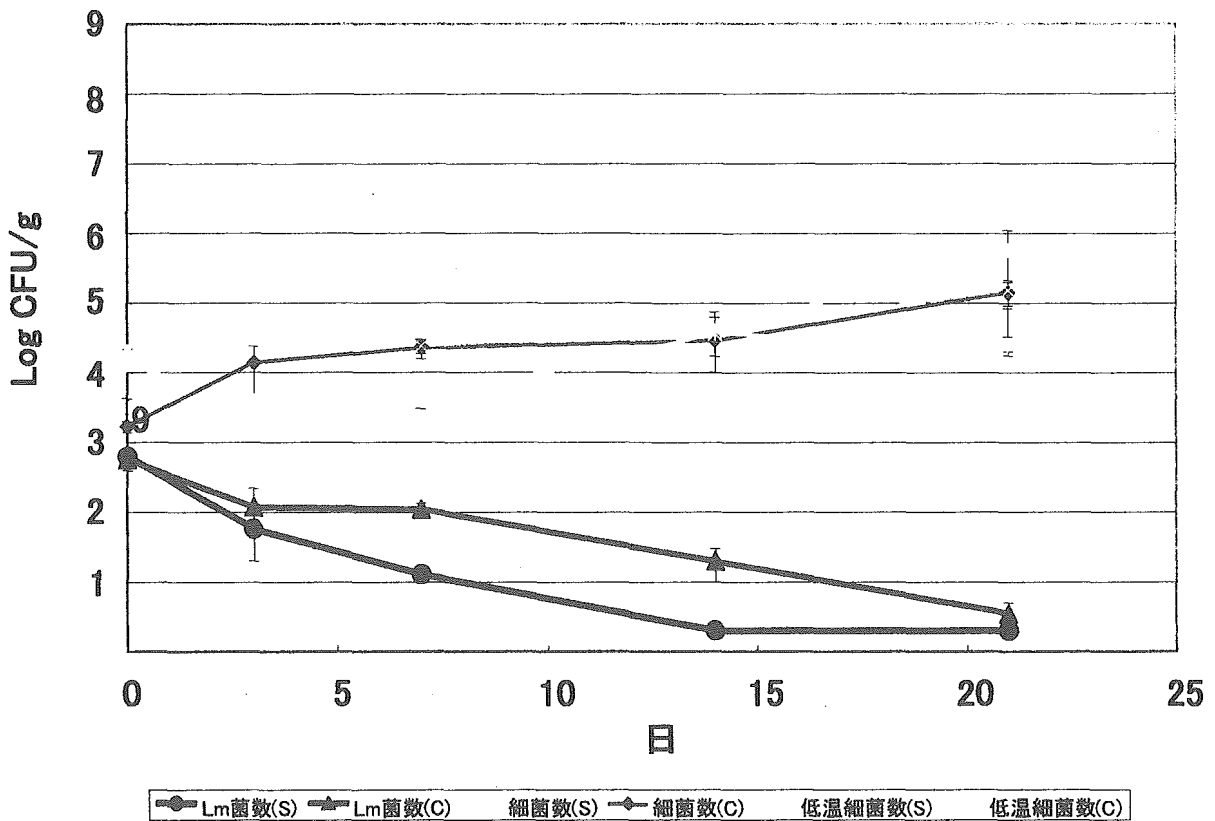


図5. 辛子明太子に接種後10℃保存時の挙動



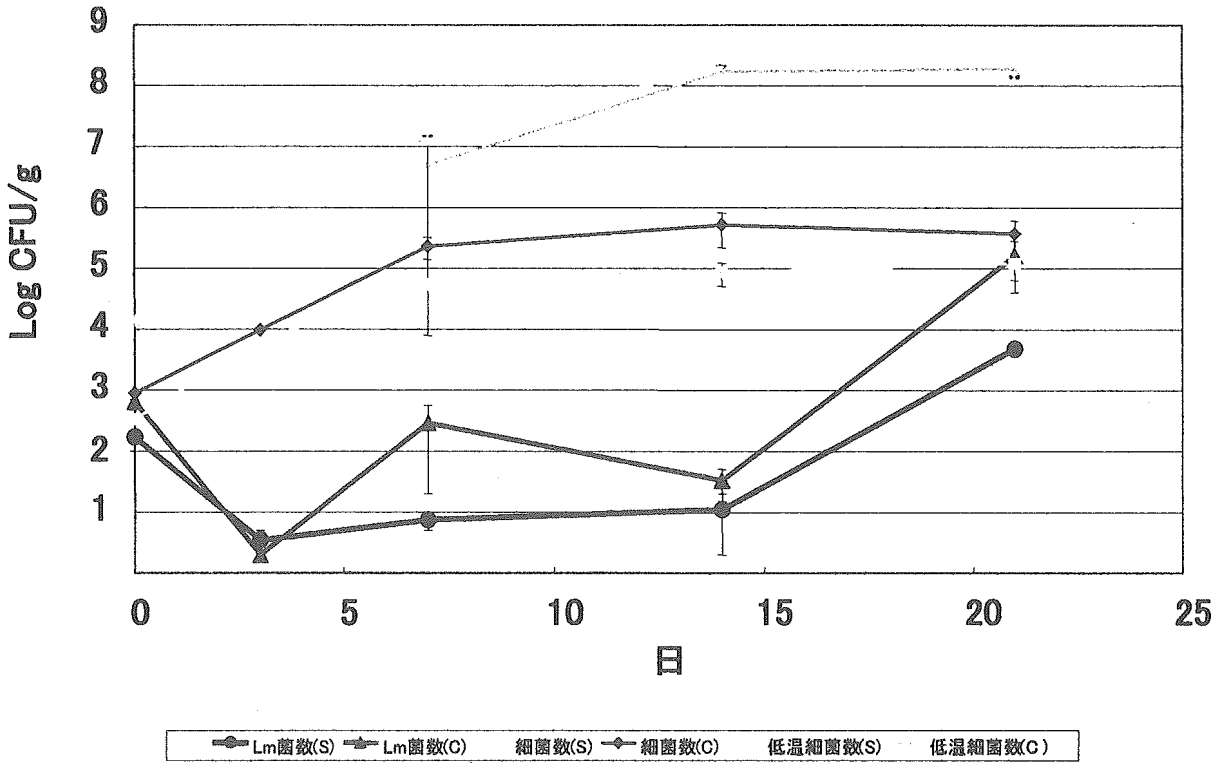
備考 (s): Scott A株を接種した試料 (c): California 株を接種した試料

図6. 辛子明太子に接種後4℃保存時の挙動



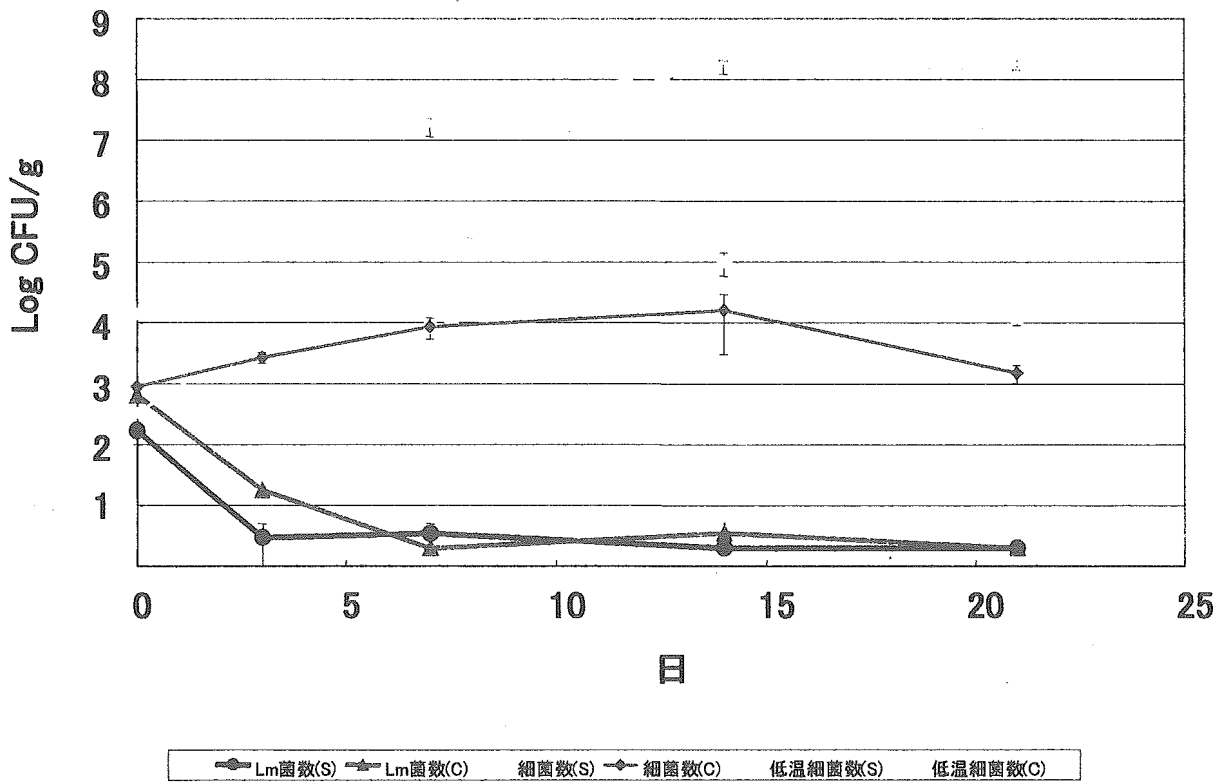
備考 (s): Scott A株を接種した試料 (c): California 株を接種した試料

図7. たらこに接種後10℃保存時の挙動



備考 (s): Scott A株を接種した試料 (c): California 株を接種した試料

図8. たらこに接種後4℃保存時の挙動



備考 (s): Scott A株を接種した試料 (c): California 株を接種した試料

日本の食肉と環境から分離された *Listeria monocytogenes* の分子進化学的解析

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)

本藤 良 (同上・教授)

小笠原邦敏 (横浜検疫検査センター; 現在 新潟検疫)

庄司 紘史(久留米大学医学部神経内科・教授)

研究要旨

本邦の*L.monocytogenes* 分離株の分子進化学的系統を明らかにするために、リステリア症患者、食肉、環境等由来の88分離株の*iap*領域(407bp)を解析して、血清型とほぼ一致する18型に分類して、これらがA、B、Cの3群に大別されることを明らかにし、本邦における分離株が3つの分子進化学的系統からなることを明らかにした。また、諸外国から輸入して保税中の食肉から分離した*L.monocytogenes* 株のうちの1株(血清型4b株)がC群に属することを明らかにし、この群を構成する分離菌株が、最近、我が国に輸入された輸入株である可能性を示した。

A. 研究目的

前年度は、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.monocytogenes* 分離菌株について、地域常在性と複合汚染の実態およびヒトへの感染経路に関して分子疫学的考察を試みた。この感染経路をさらに詳細に解析し、疫学的考察を正確に行うために、本年度はこれまでに集積した本邦分離株の*iap*領域の塩基配列に基づいて系統樹解析を行った。

B. 研究方法

1) 分離株: 1988-2003年に食品、環境およびリステリア症患者から分離した408株中の88株の*L.monocytogenes* を使用した(表1)。これらのうちの81株が食品あるいは環境由来分離株、および7株が患者由来分離株である。*L.monocytogenes* の分離方法、血清型の決定方法等については、既報の報告書(厚労省科研費平成13年度~15年度総合研究報告書、厚労省科研費平成16年度総括・分担研究報告書)と論文(Saito et al., Microbiologica 21, 87-92, 1998; Ueda et al. Int. J. Food Microbiol. 105(3), 455-462, 2005; Ueda et al., Microbiologica 25, 165-171, 2002)に記載してある。使用した88株の血清型は、1/2a; 32株、1/2b; 26株、1/2c; 4株および4b; 26株であった。

他方、11ヶ国(米国、カナダ、デンマーク、オース

トラリア、メキシコ、フランス、タイ、アイルランド、中国、ニュージーランドおよびブラジル)から2001-2003年に輸入して、保税中の無加工生肉(豚肉、牛肉、鶏肉)より無作為に51サンプルを採取して*L.monocytogenes* の分離を試みた。検体の採取は通常の検疫検査手技で行い、無菌パックに入れて横浜検疫検査センターを通じて当研究室に搬入した。*L.monocytogenes* の分離方法、血清型の決定方法は常法に従って行った。分離された92株の*L.monocytogenes* のうちの1株が血清型4b株であった(ブラジル、Rio Grande do Sul, Correaより2001年3月1日輸入鶏肉)。

2) 染色体DNAの抽出と制限酵素切断解析方法: 染色体DNAを常法に従って抽出し、*iap*領域687bp(位置836-1522)をプライマーSI3AとSI3Bを用いてPCR法で増幅した。増幅産物を制限酵素*Fnu4HI*と*AlwNI*で消化した後にAgarose電気泳動し、その切断パターンを比較解析した。

3) 塩基配列の決定: 塩基配列が未決定であった27分離株については、それぞれの分離株から抽出した染色体DNAの*iap*領域の位置1116-1522(407bp)について、常法に従って(Saito et al., Microbiologica 21, 1998; Ueda et al., Int. J. Food Microbiol. 105(3), 2005) サイクルシーケンス法により、新たに塩基配列を決定した。決定した塩基配列は、*L.monocytogenes* EGD-e株(EGD株; GenBank accession No. AL591824)を標準として、相当する

位置の塩基配列と比較した。塩基配列の比較と系統樹解析には、配列情報解析コンピュータ・ソフトウェア DNAsis pro (Ver.2.00.000.002, Hitachi Software Japan, Tokyo, Japan)を用いた。

C. 成績と考察

1) 本邦分離株の分子進化学的解析

本邦の環境と食品から分離した88株の全ては、EGD株(0型)とは異なる18型に分類された(表2)。これらのうち1型と5-10型は合計15株の血清型1/2aのみ(17.0%)、3型は1株の1/2c株のみ(1.1%)、そして11型と15-18型は8株の血清型4b株のみ(9.1%)で構成されていた。これに対して、その他の型には複数の血清型が混在しており、2型(5株;5.7%)、4型(6株;6.8%)および14型(2株;2.3%)には血清型1/2a・1/2c、血清型1/2a・4bおよび1/2a・1/2bのそれぞれ2種の血清型の株、12型(23株;26.1%)と13型(28株;31.8%)には血清型1/2a・1/2b・4bの3種の血清型の株がそれぞれ含まれていた。リステリア症のヒト由来分離株は、7株が全て血清型と対応した1型、5型、11型、16型および17型に分類された。本研究で分類した18型中の13型が単一の血清型株で構成されていたことは、この分類(*L.monocytogenes*の分子進化学的系統)と本邦の環境と食品から分離された分離株の血清型とが関連性を持っていることを示唆しており、これまでの報告(Ward et al., J. Bacteriol., 186. 4994-5002, 2004)とも矛盾しない。

*L.monocytogenes*の分子進化学的系統については、3つの系統があることが報告されている(Ward et al., J. Bacteriol., 186. 2004; Rasmussen et al., Microbiol., 141, 2053-2061, 1995)が、本邦の分離株についての詳細はまだ明らかにされていない。このため、本研究では系統樹解析を行った。この結果、今回、分類されたEGD株(0型)を含む19型は、0型から11型までの12型を含むA群(28株;32%)、12型から16型までの5型を含むB群(58株;66%)、血清型4b株のみを含む17型と18型の2型からなるC群(2株;2%)の大きな3枝に分岐する無根系統樹を形成した(図1)。A群とB群については進化学的距離0.038で比較的近距离にあったが、A・B群とC群との間の距離は0.115であった。これらA、BおよびC

の3群は、解析領域は異なっているが、相当する領域の一部が文献上比較可能であったため比較解析したところ、Wardら(2004)とRasmussenら(1995)が報告した2、1および3群にそれぞれ相当していると考えられた。従って、本邦の*L.monocytogenes*分離株にも、海外の分離株と一致する分子進化学的に3つの異なる系統があることが示唆された。

2) 輸入4b株の特性と分子疫学的解析

図2は、血清型4b株から抽出した染色体DNAの*iap*領域607bpを制限酵素*Fnu4H I*と*AlwN I*で消化して比較解析した典型的な成績を示している。図中、No.10の輸入鶏肉由来株を除く全ての分離株は、本邦の食肉およびリステリア症ヒト由来の分離株である。本邦分離株のうちのNo.5と8および輸入分離株No.10を除く7株では、両方の制限酵素で消化後に、それぞれほぼ同じサイズの α 、 β および γ の3断片が得られた。No.5とNo.8は、それぞれ1998年に関東地域の店舗から購入した鶏肉と牛肉からの分離株であり、前項の系統樹解析でC群に分類された分離株である。これら3分離株では*Fnu4H I*での消化後、それぞれの分離株で断片の大きさは異なっていたが、他の7株とは全く異なる、aからeより小さな5断片に切断された。*AlwN I*での消化後では、No.5とNo.10では他の7株とは全く異なる2断片に切断された。No.8では、 α と γ 断片はほぼ他の7株と同サイズであるが β 断片のサイズが異なる3断片に切断された。これらの成績から、輸入鶏肉由来株No.10が本邦分離株のNo.5およびNo.8と同型ではないが非常に近縁であることが示唆された。

我々のこれまでの解析では、No.5とNo.8を除く通常の本邦分離株では、この領域に局在する変異数は30以下であったが、No.5とNo.8およびNo.10株の*iap*領域407bpにおける塩基配列は非常に特徴的であり、この領域内には50カ所の点変異と特徴的な挿入・欠損が局在していた(図3)。図4は、この輸入株No.10をEGD株と本邦の88株を用いて作成した無根系統樹に挿入したものである。この無根系統樹でも、No.10株はNo.5とNo.8と同じC群に分類され、No.5株よりもNo.8株に近縁であった。これらの成績は、このC群に属する株が近年、我が国に輸入された新しい輸入株であることを示唆している。このNo.10株が分離されたブラジルおよび諸外国において、この株の様な遺伝子型を示す株が一般的