

であるか否かについての情報を、我々は得ることができなかったが、Rasmussenら(1995)が報告した第3群が我々のC群に相当していたことは、上記の示唆を支持している。

我が国では、これまで*L.monocytogenes*による大規模な食中毒は幸いながら発生していないが、多くの食品を諸外国からの輸入に頼っており、今回検討した血清型4b株のように一般に病原性が高いと言われている血清型で、異なる遺伝子型を持つ*L.monocytogenes*株が新たに我が国に定着してゆくことは、食品衛生上極めて注意を要する点であろうと考える。

#### D. 結論

1988-2003年の16年間にわたって、当研究室で集積した*L.monocytogenes*の市販食肉汚染分離菌株、環境汚染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、本邦の*L.monocytogenes*分離株の分子進化学的解析を行った。

1. 検討した88分離菌株とEGD株の89株は、血清型とある程度関連性を持つ19型に分類された。
2. 19型は、分子進化学的にA群(28株;32%)、B群(58株;66%)およびC群(2株;2%)の3系統に大別可能で、これまでに報告されている諸外国の系統と一致することを示した。
3. 輸入鶏肉から分離された*L.monocytogenes*、血清型4b株のiap領域のゲノム特性を検討し、この分離株が我が国の系統では稀なC群に属する株であることを明らかにした。

以上、本研究では本邦の*L.monocytogenes*分離株の分子進化学的系統を明らかにし、今後、本菌による食品汚染およびヒト・リステリア症が発生した場合の疫学的解析を可能にした。また、分子進化学的に見て、C群が外国からの輸入株によって構成されている可能性を示した。

#### E. 研究発表

##### 1. 原著論文

- 1) Fukiko UEDA, Kunitoshi OGASAWARA and Ryo HONDO. Analysis of molecular evolution of *Listeria monocytogenes* isolated from Japanese meats and environment. Japanese Journal of Infectious Disease 58(5), 320-322, 2005.
- 2) Fukiko UEDA, Kyoko YUGAMI, Mariko MOCHIZUKI, Fumiya YAMADA, Kunitoshi OGASAWARA, Akikazu FUJIMA, Hiroshi SHOJI and Ryo HONDO. Comparison of genomic structures in the serovar 1/2a *Listeria monocytogenes* isolated from meats and listeriosis patients in Japan. Japanese Journal of Infectious Disease 58(5), 289-293, 2005.
- 3) Kazue Uchida, Michiyo Shinohara, Shin-ichi Shimoda, Uykari Segawa, Rei Doi, Atushi Gotoh and Ryo Hondo. Rapid and sensitive detection of Mumps virus RNA Directly from Clinical Samples by Real-Time PCR. Journal of Medical Virology 75: 470-474, 2005.
- 4) Mariko MOCHIZUKI, Makoto MORI, Mayumi AKINAGA, Kyoko YUGAMI, Chika OYA, Ryo HONDO and Fukiko UEDA. Thallium contamination in wild ducks in Japan. Journal of Wild Disease 41(3), 664-668, 2005.
- 5) Fukiko UEDA, Reiko ANAHARA, Fumiya YAMADA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu Ochiai and Ryo HONDO. Discrimination of *Listeria monocytogenes* contaminated commercial Japanese meats. International Journal of Food Microbiology 105(3), 455-462, 2005.
- 6) Kaneda T., Takeuchi M., Shimizu K., Urakawa N., Nakajyo S., Mochizuki-Kobayashi M., Ueda F. and R. Hondo.

Inhibitory mechanism of monensin on high K<sup>+</sup>-induced contraction in guinea-pig urinary bladder. J. Pharmacol. Sci. 100, 133-141, 2006.

- 7) Fukiko UEDA, Kunitoshi OGASAWARA and Ryo HONDO. Characteristic of *Listeria monocytogenes* isolated from Imported meat in Japan. Japanese Journal of Infectious Disease 59(1), 54-56, 2006.
- 8) Fumiya Yamada, Fukiko Ueda, Yoshitsugu Ochiai, Mariko Mochizuki, Hiroshi Shoji, Kiyoko Ogawa-Goto, Tetsutaro Sata, Kunitoshi Ogasawara, Akikazu Fujima and Ryo Hondo. Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. Journal of Microbiological Methods (in press).
- 9) 本藤 良、斎藤彩、植田富貴子。特集:動物由来ウイルス感染症、Bウイルス感染症。日本臨床63(12)、2189-2195、2005。

## 2. 学会発表

- 1) 関本容子、清家一生、植田富貴子、山田文也、小笠原邦敏、望月眞理子、本藤 良。*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎的研究5、*Listeria monocytogenes*分離株の分子進化学的解析。第139回日本獣医学会学術集会、2005。
- 2) 高橋知子、松館宏樹、長谷川和弘、高橋雅輝、大窪富士子、瀬川俊夫、落合由嗣、植田富貴子、本藤 良。と場に搬入された牛におけるリステリア菌の保有状況とL.m分離株のゲノム構造の特性。第140回日本獣医学会学術集会、2005。
- 3) 植田富貴子、望月眞理子、岩堀満月、川崎麻衣子、古賀敦子、小守忍、伊藤健護、須田詩織、早川一生、本藤 良。愛玩動物飼育用缶詰の安全性についての研究(2.市販ネコ用缶詰中の必須元素含量)。第140回日本

獣医学会学術集会、2005。

- 4) 小笠原邦敏、植田富貴子、望月眞理子、山田文也、青木英雄、木田中、中野恵、本藤 良。*Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎的研究6、*Listeria monocytogenes* 輸入株における分子進化学的解析。第140回日本獣医学会学術集会、2005。

表1. *L. monocytogenes* 分離株の由来と血清型

origin	serovar	No	year	**p	strain
*human	1/2a	1	1989	S1	H1
		2	1988	S2	H3
		3	1996	T1	HM1
		4	1996	T1	HM2
	5	2002	F1	12H	
	6	1989	S3	H2	
	7	2000	F2	11H	
beef	1/2a	8	2000	T2	312B1
	4b	9	1999	C1	173B3
		10	1998	T3	82B1
		11	1998	S4	133B1
		12	2001	T4	392B1
		13	2003	T4	468B1
chicken	1/2a	14	1998	T4	80C1
		15	1989	S5	SC23
		16	1998	T4	89C5
		17	2000	T5	265C1
		18	2000	T6	268C1
		19	1999	S4	213C1
	1/2b	20	1999	C1	221C1
		21	2000	T7	307C1
		22	1999	T5	186C1
		23	1999	T8	188C3
		24	1999	T6	223C3
		25	1998	T4	72C1
pork	1/2a	26	1996	T4	9C1
		27	1998	T4	79C1
	1/2b	28	1996	S6	6C1
		29	1996	G	17C1
		30	1997	T4	66C3

origin	serovar	No	year	**p	strain
chicken	1/2b	31	1997	T4	69C3
		32	1998	T4	74C1
		33	1998	T4	77C1
		34	1998	T4	87C1
		35	1998	T4	89C4
		36	1998	T4	91C3
		37	1998	T4	93C1
		38	1998	T4	95C1
		39	1998	T4	97C1
		40	1998	T4	99C4
chicken	1/2c	41	1998	T4	103C1
		42	1998	T4	105C2
		43	1998	T4	106C3
		44	1998	T4	109C1
		45	1998	T4	116C1
pork	1/2c	46	1996	C2	23C1
		47	1997	S4	28C1
	4b	48	1999	S5	SC32
		49	1997	T9	42C1
		50	1998	T9	125C1
		51	1997	T4	229C1
		52	2000	T3	295C1
		53	2001	T4	355C4
		54	2003	T4	490C1
		55	1996	T4	11P1
56	1998	T4	76P2		
pork	1/2a	57	1998	T4	78P5
		58	1999	S4	183P1
		59	1997	T3	63P1
		60	1998	T4	81P1

origin	serovar	No	year	**p	strain
pork	1/2b	61	1998	T4	100P3
		62	1998	T4	102P1
		63	1998	T4	104P6
		64	1998	T4	112P4
		65	1998	T4	114P3
		66	1998	T4	75P1
		67	1998	T4	76P1
		68	1998	T4	78P1
		69	1998	T4	112P3
		70	2003	T4	489P1
sheep	1/2a	71		T*	IJD566
	4b	72		T*	IJD571
pro- cessed meat	1/2a	73	1989	S7	Hu53
	4b	74	1989	S7	Hu120
		75	1989	S7	Hu80
milk	1/2a	76	1989	S8	LM51
		77	1989	S8	LM41
		78	1989	S8	LM61
		79	1989	S8	LM71
		80	1989	S8	LM87
cheese	4b	81	1989	S8	LM103
		82	1989	S9	CH191
		83	1989	S9	CH115
		84	1989	S9	CH188
		85	1989	S9	CH190
environ- ment	4b	86	1989	S9	CHF201
		87	1989	S9	CHF208
88	1989	S9	CHF231		

\* human; isolates from listeriosis patients who caused meningitis and/or septicemia.

\*\*p (place): S; Saitama, T; Tokyo, F; Fukuoka, C; Chiba, G; gunma.

T\*: supplied from the University of Tokyo.

表2. 88株の*L.monocytogenes* から抽出した染色体DNAの*iap* 領域407bpにおける  
ゲノム構造の特性による分類と血清型の関係

type	1/2a	1/2b	1/2c	4b
0	EGD-e			
1	H3			
2	Hu53 173B3		75P1 76P1 78P1	
3			23C1	
4	76P2 78P5 89C5 183P1 312B1			490C1
5	11P1 80C1 H1 HM1 HM2			
6	265C1			
7	268C1			
8	213C1 221C1 307C1			
9	223C3			
10	12H 186C1 188C3			
11				IID571
12	LM51 LM41 LM61 LM71 LM87 LM103	72C1 74C1		28C1 Hu120 CH191 CH115 CH188 CH190 CHF201 CHF208 CHF231 42C1 82B1 355C4 392B1 468B1 489P1
13	SC23	9C1 79C1 6C1 17C1 66C3 69C3 77C1 81P1 87C1 89C4 91C3 93C1 95C1 97C1 99C4 100P3 102P1 103C1 104P6 105C2 106C3 109C1 112P4 114P3 116C1		Hu80 112P3
14	IID566	63P1		
15				SC32 H2
16				229C1 295C1 11H
17				125C1
18				133B1

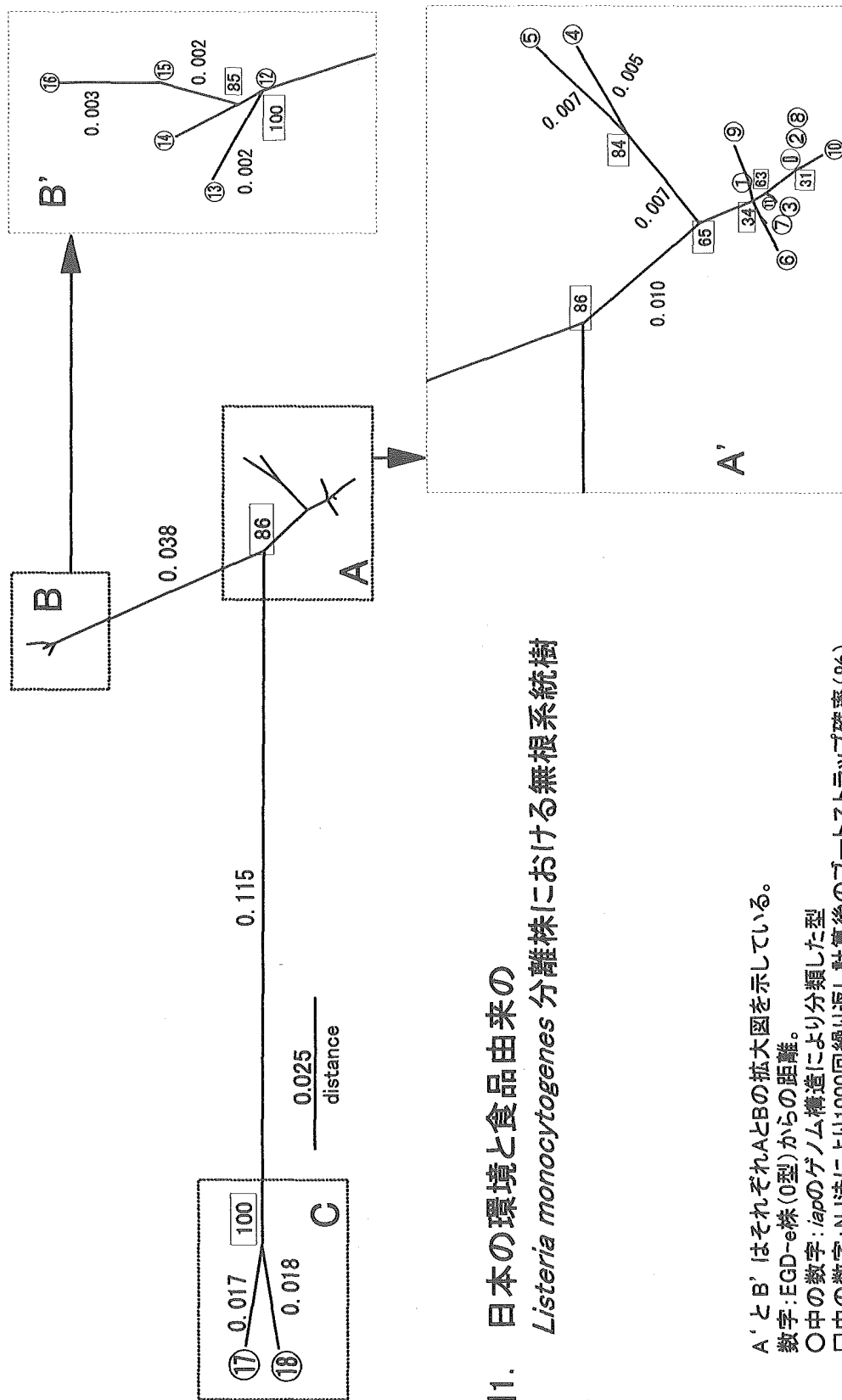
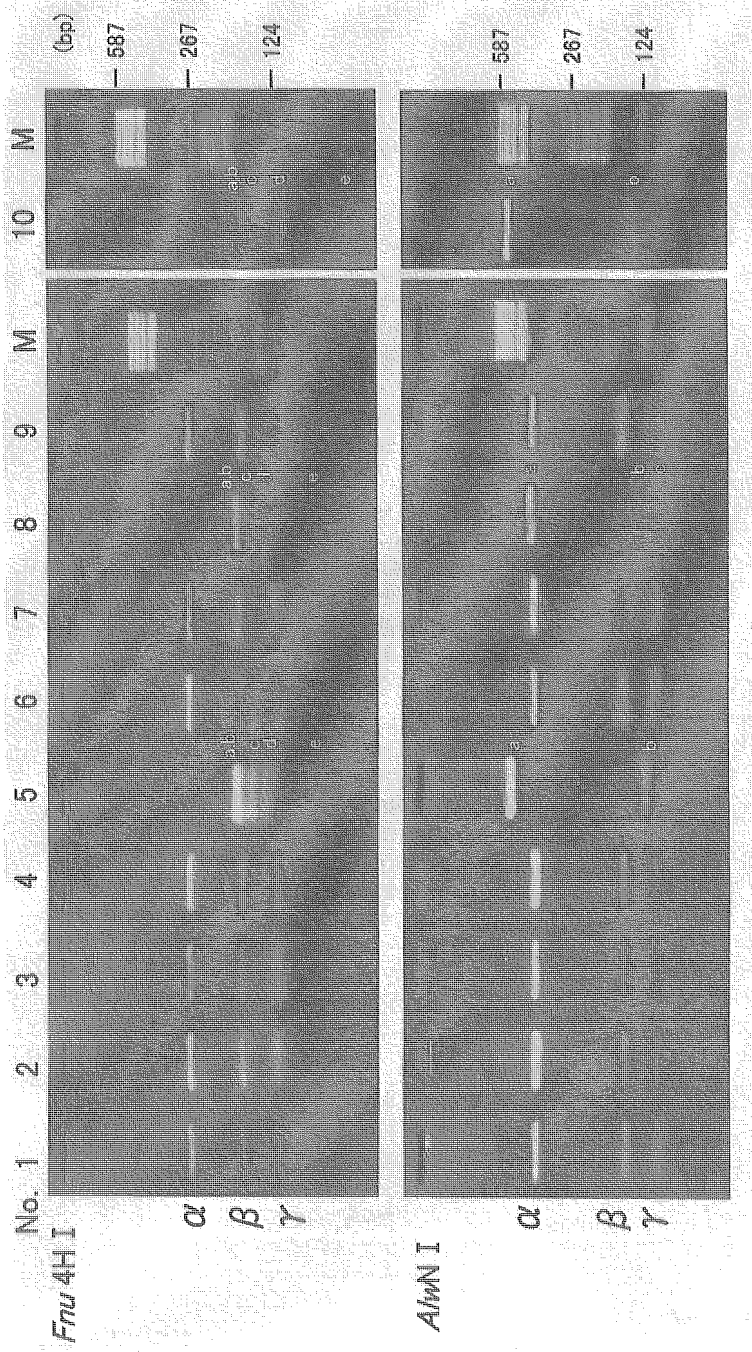


図1. 日本の環境と食品由来の *Listeria monocytogenes* 分離株における無根系統樹

A' と B' はそれぞれAとBの拡大図を示している。  
 数字: EGD-e株(0型)からの距離。  
 ○中の数字: *iap*のゲノム構造により分類した型  
 □中の数字: NJ法により1000回繰り返し計算後のブートストラップ確率(%)。

図.2



レーンNo.と分離株: 4(L97-28C), 2(L98-82B), 3(L2K-295C), 4(L97-42C), 5 (L98-125C), 6(L99-229C),  
7(L98-112P), 8(L98-133B), 9 (L2K-11H), 10(YC16C-10), M(size marker)







## リステリアの食品内での生残性・増殖性の考察とヒトへの感染リスク

協力研究者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所・主任研究官  
分担研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所・室長

### 研究要旨

食品および臨床由来のリステリア菌株がヒトへの感染リスクに差を示すか否かを明らかにするため、食品および環境由来株、臨床由来株各約100株を用いて、それらの環境ストレス抵抗性について調査を行った。高食塩濃度耐性能に関しては食品環境由来株と臨床由来株の間に差は見られなかったが、低温増殖能に関しては食品環境由来株が抵抗性を示した。血清型別には特に差は見られなかった。食肉由来の血清型4b株の中で、ヒト上皮細胞由来の培養細胞CaCo2内での増殖性の強い株（強毒株）は細胞内増殖性の弱い株と比較して、食塩抵抗性が高い菌株が多く見られた。以上の結果から、臨床由来株よりも食品由来株の方が強い環境抵抗性を示す菌株が多い傾向がみられた。また、食品由来株の中に病原性と環境抵抗性が強く、ヒトへの感染リスクの高い菌株群が存在している可能性が示された。

### A. 研究目的

*Listeria monocytogenes*（以下リステリア）は0℃以上での低温増殖性及び20%食塩濃度下でも生残できる高食塩濃度耐性能を持つ食品媒介感染症原因菌である。本菌は自然界に広く分布しており、様々な食品からも分離されている。しかしながら、食品及び環境由来株と臨床由来株において分類される血清型の比率が大きく異なっていることから、食品由来株の中で病原性が高い、或いは食品内での増殖性が高い等、ヒトへの感染リスクが高い菌株群が存在している可

能性が考えられている。我々は、平成13年から17年にかけて厚生労働科学研究において、食品および環境由来株、臨床由来株各約100株に関して、本菌の持つ既知の病原遺伝子10種の保有状況の違いや、臨床由来に多い血清型4bに分類される食品由来菌株の中での強病原性菌株群の存在について明らかにしてきた。今回は本研究においてこれらの菌株の環境抵抗性を比較検討することにより、食品の製造行程及び保存中の増殖性についてその違いを明らかにすることで、食品内での増殖性が高くヒ

トへの感染リスクの高い群が存在するか否かを調べることを目的とした。

## B. 研究方法

今回の研究には、日本国内で分離された臨床由来リステリア菌株98株と食品及び環境由来の99株を使用した。培養には Brain Heart Infusion agar (Difco) を用い、高食塩濃度耐性能試験には10または12%の食塩を添加した培地を用いた。通常の培養は37℃で行い、低温増殖性試験では4℃で培養を行った。すべての菌株は寒天平板上に画線培養し、24時間ないし48時間後に判定を行った。判定基準は画線部位に全面的に発育したものを陽性(+)、部分的にコロニーを形成したものを擬陽性(+/-)、発育が見られなかったものを陰性(-)とした。さらに、24時間と48時間における判定結果の組み合わせによって24時間・48時間ともに陰性の場合をレベル0、24時間陰性・48時間擬陽性の場合をレベル1、24時間・48時間ともに擬陽性の場合をレベル2、24時間陰性・48時間陽性の場合をレベル3、24時間擬陽性・48時間陽性の場合をレベル4、24時間・48時間ともに陽性の場合をレベル5と分類した。

## C. 研究結果

図1に食品・環境由来株と臨床由来株の10%及び12%食塩添加培地上での増殖性と低温増殖性試験の結果を示した。高食塩濃度耐性については菌株の由来による差は見られなかったが、低温耐性株は食品由来株において臨床由来

株よりも多い傾向が見られた。まとまった菌株数をもつ血清型別に見ると、血清型1/2aでは高食塩濃度耐性株は臨床由来株で、低温耐性株は食品・環境由来株で多い傾向にあった(図2)。血清型1/2b(図3)及び血清型4b(図4)でも同様の傾向が見られた。主要な食品カテゴリー別にみると、牛肉で高食塩濃度耐性株が、鶏肉で低温耐性株が多い傾向が見られた(図5)。また、今回の試験菌株のうち平成16年度厚生労働科学研究(食品の安全性高度化推進研究事業、主任研究者 高鳥浩介、細菌性食中毒の予防に関する研究)において、その病原性をヒト上皮細胞由来培養細胞 CaCo2内での増殖性によって調査した食肉由来血清型4b菌株23株の環境抵抗性と病原性の相関を調べたところ、病原性の高い菌株群のなかに12%食塩添加培地での増殖性が強い菌株が存在している結果がみられた(図6)。低温耐性能には病原性との相関は見られなかった。

## D. 考察

今回の研究結果より、食品・環境由来株は臨床由来株よりも低温での増殖性が強い株が多い傾向が示された。また、高食塩濃度下での増殖性は、臨床由来株で多い傾向が見られた。また、今回の試験菌株のうちまとまった検体数の血清型であり、ヒトの感染事例由来の菌株の大半が分類される血清型でもある血清型1/2a、1/2b及び4bに属する菌株のいずれにおいても、同様の結

果が得られ、血清型による環境抵抗性の差はあまりないと思われた。また、食品カテゴリー別に見た結果では牛肉で高食塩濃度耐性株がやや多く、鶏肉で低温耐性株が多い傾向が見られ、それぞれの食品特性により生残しやすい菌株のタイプがある可能性が考えられた。更に、昨年度の本研究で病原性を確認した食肉由来の血清型 4b に属する 23 株においても、低温増殖性と病原性の関連は見られなかったが、病原性の強い菌株の中に高食塩濃度下での増殖性が強い株があった。以上より、食肉由来の血清型 4 株の内、病原性と食塩耐性が共に強く、食品内での増殖が比較的容易であり、ヒトへの感染リスクが高い群がある可能性が示された。一方で、食品・環境由来株には低温増殖性の高い菌が比較的多く存在しており、チーズ、食肉加工品のように製造工程で低温熟成を行うものや、販売店・家庭での保存期間に微量の汚染菌がヒトへの健康危害をもたらす菌数へ増殖する可能性が示された。

F. 研究発表

論文発表

1. Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S, Igimi

S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. Int J Food Microbiol. 104:189-196. (2005)

口頭発表

1. 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  $\sigma$  因子の食塩耐性における役割。日本細菌学会総会 (2005)
2. Okada Y, Okada N, Makino SI, Asakura H, Yamamoto S, Igimi S. SigmaL contributes the osmotolerance of *Listeria monocytogenes*. The XI International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. (2005)
3. 岡田由美子、朝倉宏、岡田信彦、牧野壮一、山本茂貴、五十君静信: *Listeria monocytogenes* rpoN 欠失変異株の高食塩濃度下でのプロテオーム解析。第79回日本細菌学会総会 (2006)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

その他

なし

表 1 使用菌株

由来	血清型	菌株数
臨床	1/2a	7
	1/2b	21
	1/2c	2
	3a	1
	3b	2
	4b	65
食品・環境	1/2a	7
	1/2b	35
	1/2c	19
	3b	1
	4b	36
	型別不能	1

图1 食品・環境由来株及び臨床由来株の高食塩濃度耐性及び低温増殖能

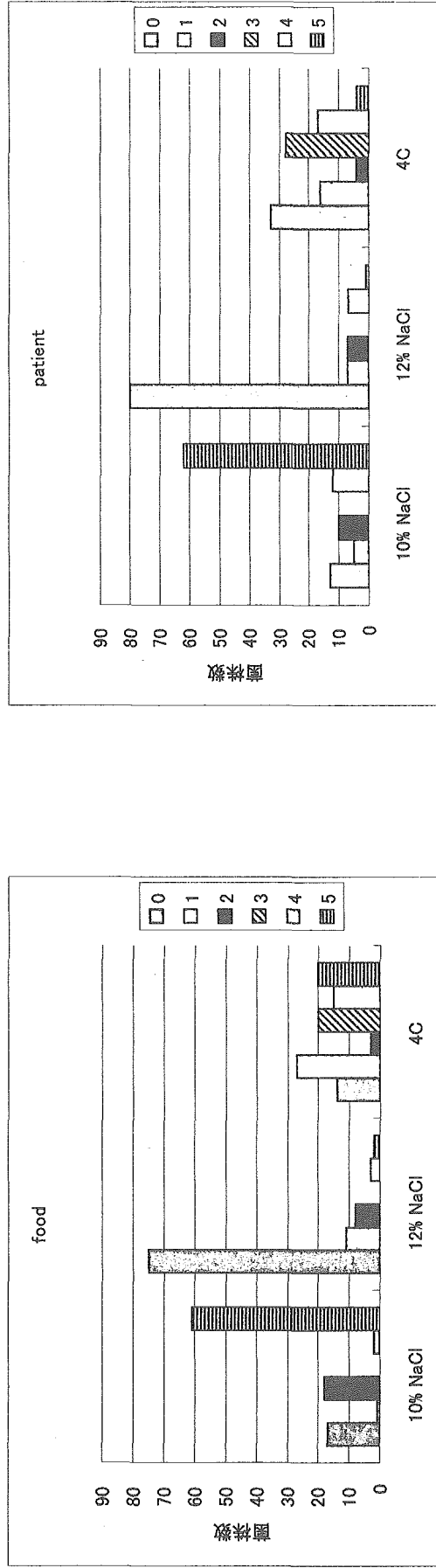


図2 血清型別に見た環境抵抗性血清型1/2a

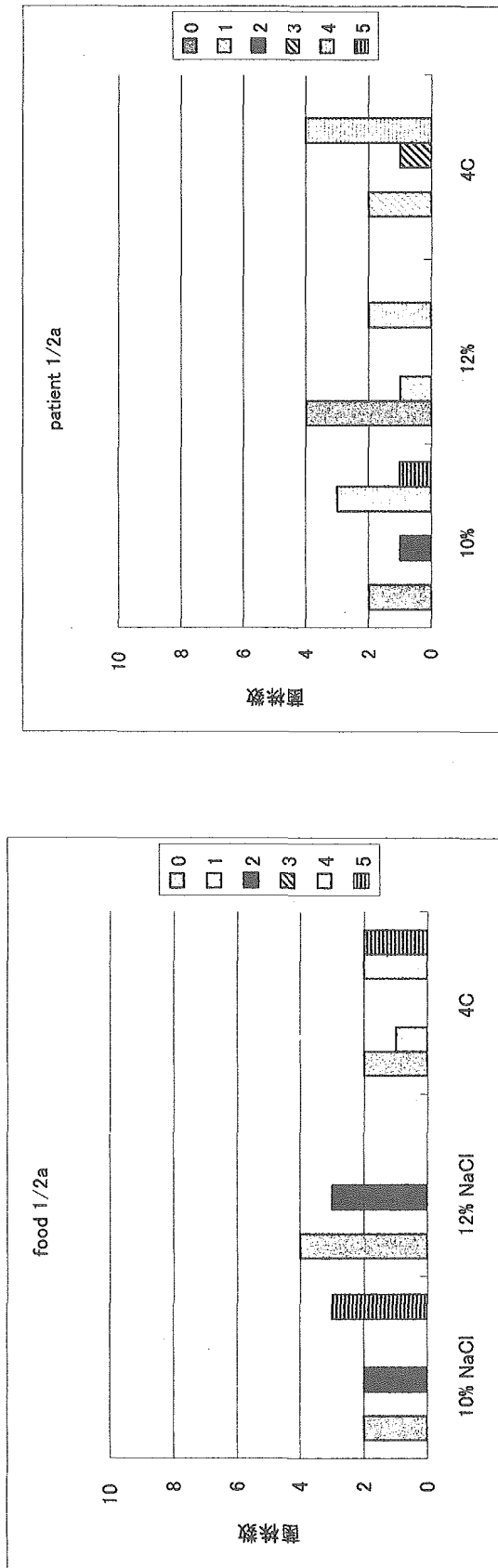


図3 血清型別に見た環境抵抗性 血清型1/2b

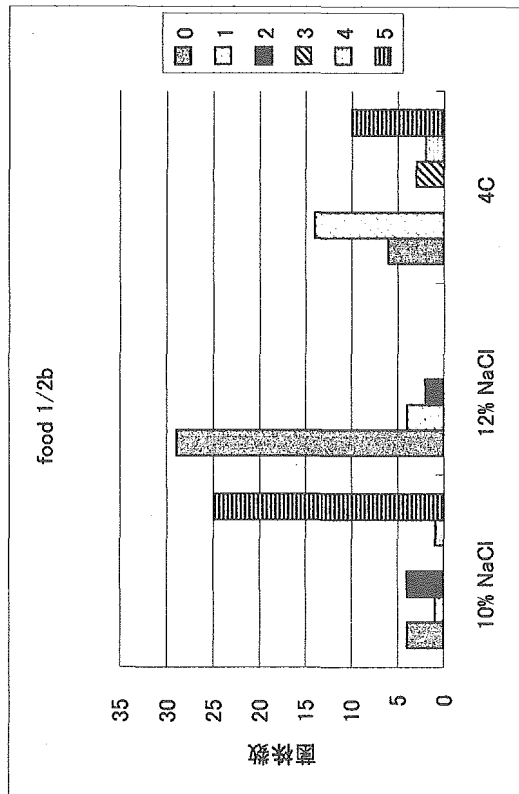
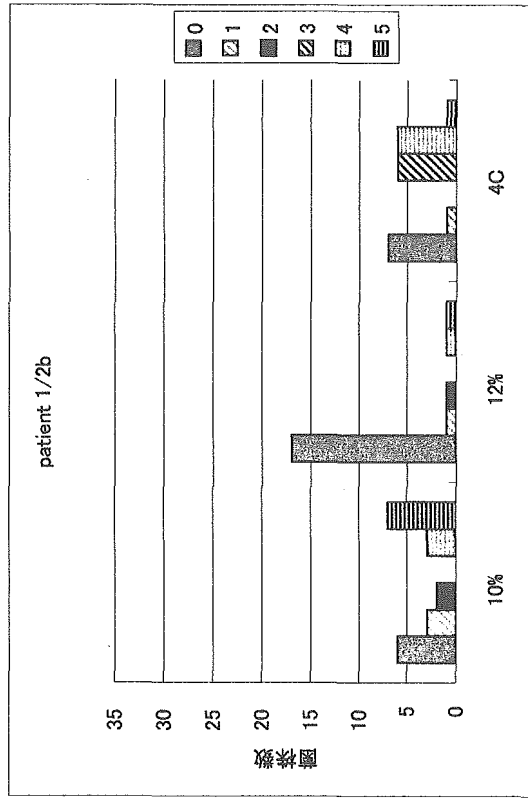


図4 血清型別に見た環境抵抗性 血清型4b

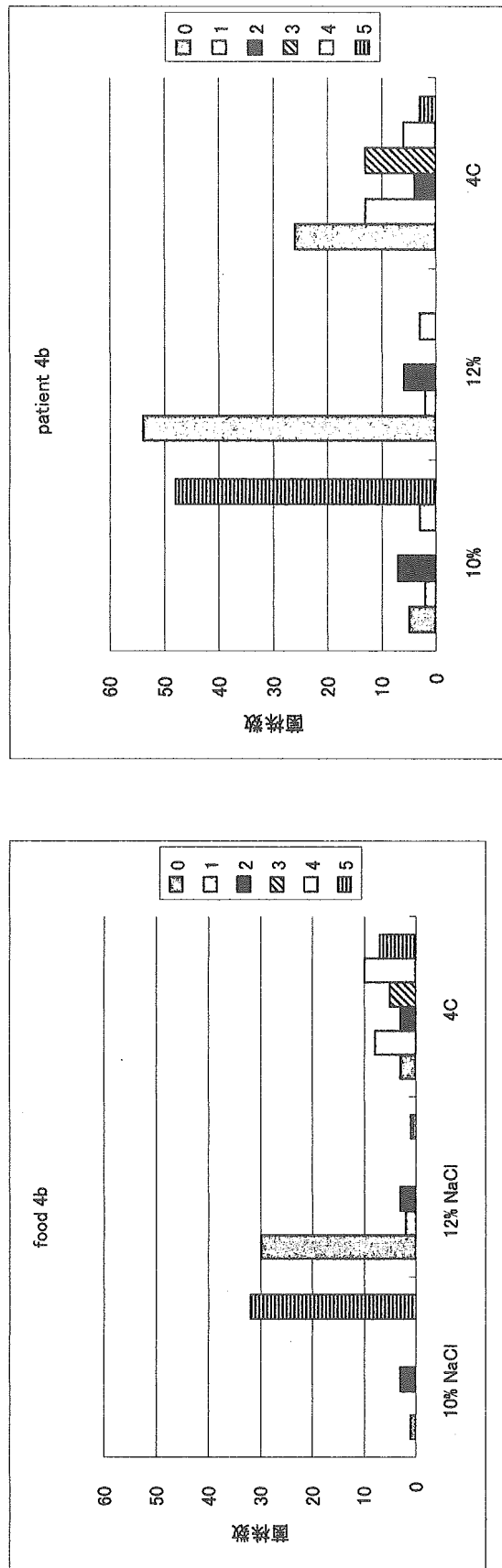




図5 食品カテゴリー別に見た環境抵抗性

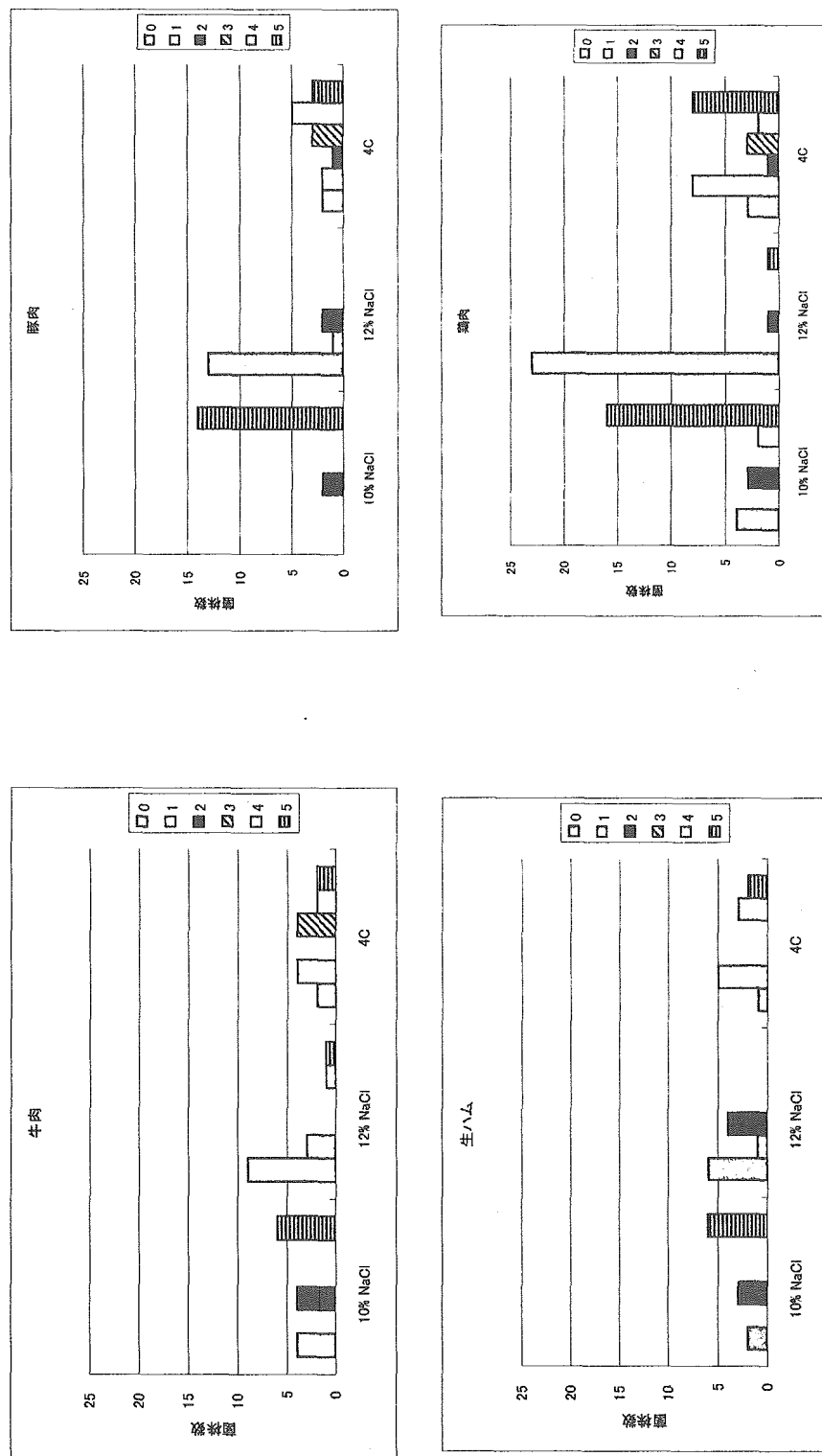
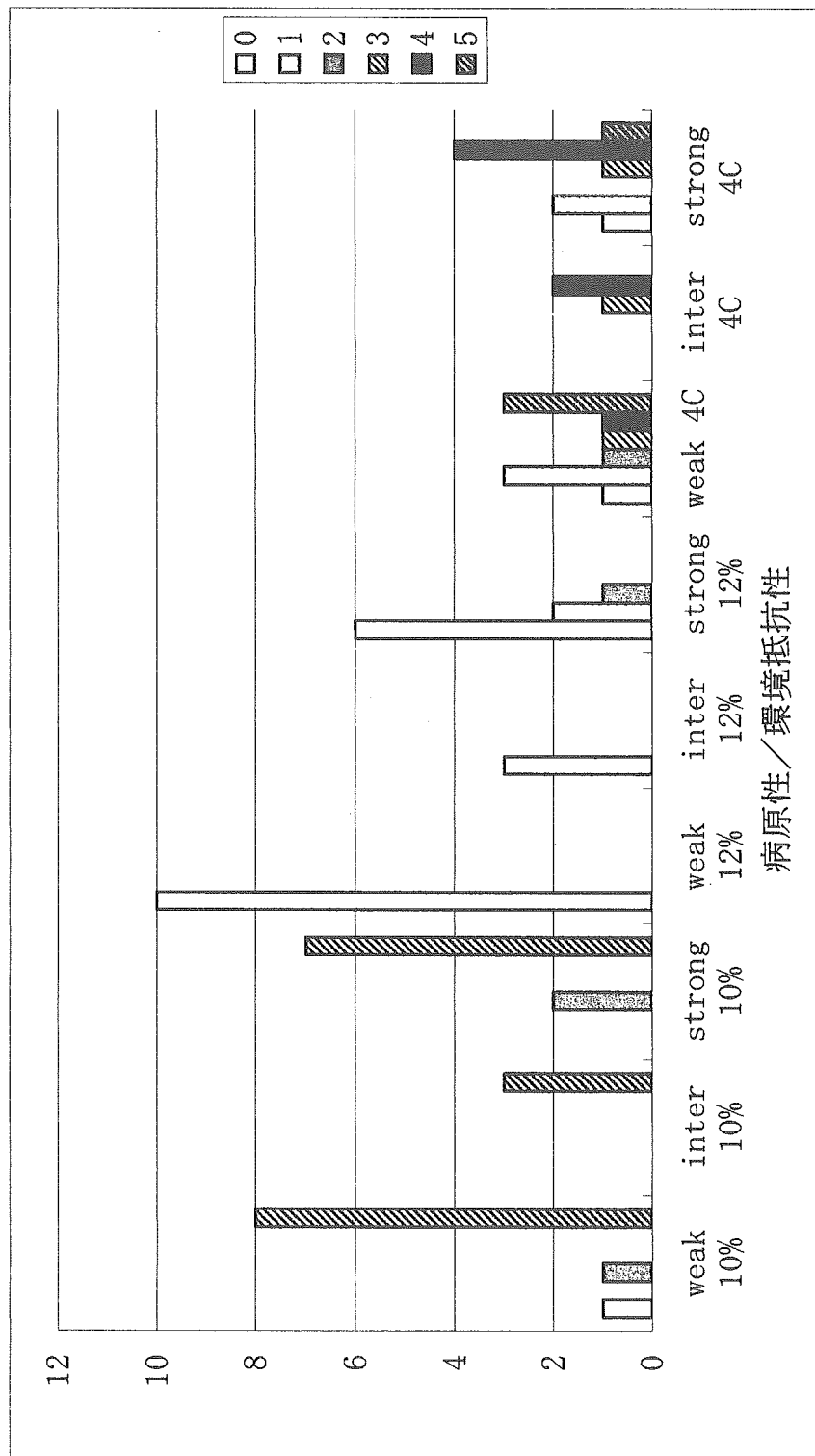


図6 食肉由来の血清型4b株における病原性と環境抵抗性の関連



Weak: 弱病原性、inter: コントロールと同程度の病原性、strong: 強病原性