

資料2 食品中の赤痢菌の検査法について

事務連絡
平成14年1月9日

各都道府県
政令市
特別区
衛生主管部（局）
食品衛生担当課 御中

厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課
送信枚数17枚（本紙を含む）

赤痢菌の試験法について

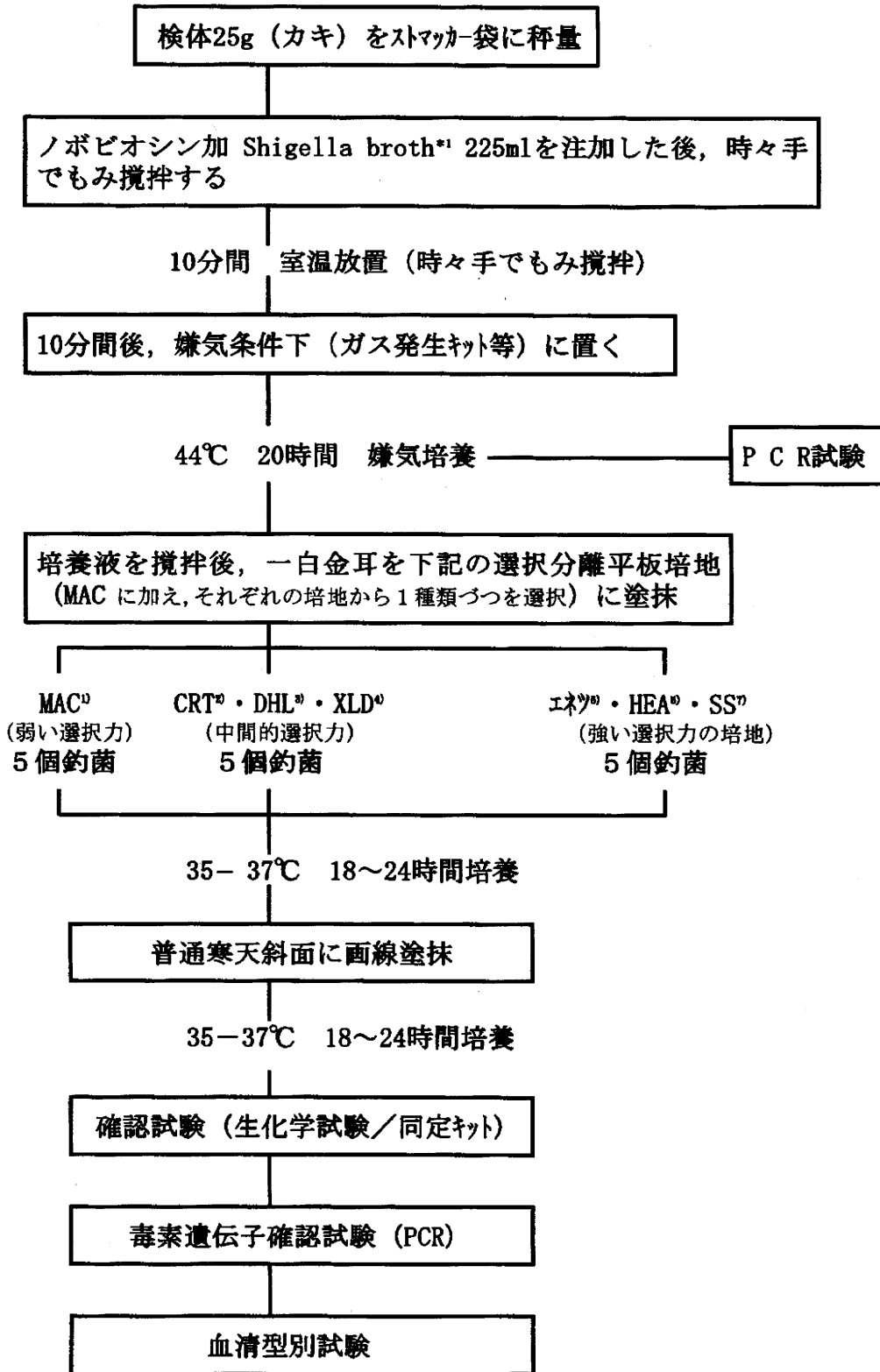
平成13年11月下旬から西日本を中心に、30都道府県、159名（同年12月27日午後6時現在）の赤痢菌患者の発生が報告され、当課から同月28日に患者が喫食したと考えられる韓国産かき及び患者から分離された赤痢菌と同一のPFGEパターンを有する赤痢菌が検出されたこととお知らせしたところです。

食品からの赤痢菌の検出については、従来から困難とされているところですが、本事件において国立医薬品食品衛生研究所が実施した検査方法を参考までに送付しますので、同様の事件が発生した際には活用されるようお願いいたします。

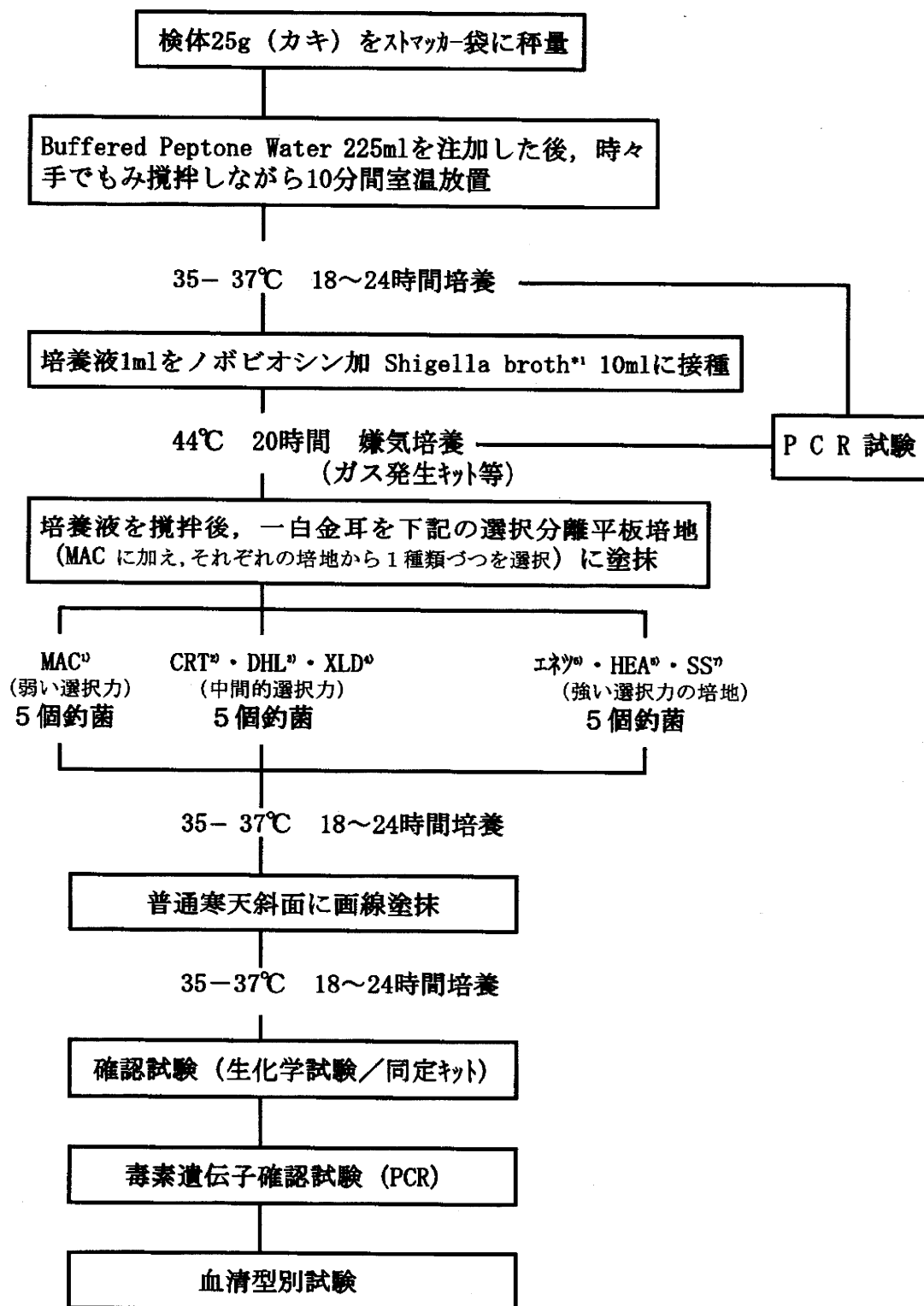
なお、食品中の赤痢菌の検出方法については、今年度の厚生科学研究でさらなる検討を行っているところであり、最終的な結論が提出された段階で、改めて各都道府県等に対して通知する予定です。

監視安全課食品安全係
TEL:03-5253-1111(内2478)
直通 TEL:03-3595-2337
FAX:03-3503-7964

Shigella sonneiの試験法 (1)



冷凍カキの *Shigella sonnei* 試験法 (2)



資料3 畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法（改定）

1. 定義

人と同様に牛、豚、鶏などの畜産動物や養殖魚などに対して、病気の予防や治療を目的として、抗生物質が使われるようになりました。このような目的で使用され、最終的な食品に残留した抗生物質のことを呼ぶ。

2. 臨床的意義

食品に残留した抗生物質が人に与えるもっとも大きな影響は、人の体内に生息している微生物に重大な影響を与える点です。人の体内、特に腸内には大量の微生物が生息し、それぞれに勢力を争いながらも、バランスを保っています。抗生物質は、微生物の生育を阻止する働きをしますので、一部の腸内細菌を一掃してしまうことがあります。すると、腸内細菌のバランスが崩れ、それまでおとなしくしていたある種の腸内細菌が突然暴れだしてしまうことがある。

3. 測定（検査）方法

ディスク拡散法

畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改定)に準ずる。

4. 測定（検査）原理

培地上に菌液を塗布し、抗菌薬を染み込ませたディスクを置き、培養後阻止円を計測する。

5. 検査室の温度及び湿度条件

温度： 25 ± 5℃

湿度： 20～80%

6. 検査室において検体を受領するときの取り扱いに関する事項

検体受付部門からの検体受領に関する手順は別 SOP（SOP/TES/011/011）に記載されている。

7. 測定（検査）の実施方法

7.1 検査材料

7.1.1 材料名

食肉、養殖魚類、卵、はちみつ

7.1.2 採取条件

- ①検体を開封して検体を採取する場合、異物の混入及び微生物の汚染がないように採取すること。
- ②検体を採取する際には必ず滅菌した器具・容器包装を用い、できるだけ無菌的に採取すること。
- ③検体をいれる容器は、検体の種類、形状、検査項目等に適したものであって、運搬洗浄、滅菌に便利なものを用いる。

7.1.3 保存条件

腐敗・変敗しやすいものは、5℃以下に保持し運搬すること。腐敗・変敗し難いものは通常の保存温度で運搬すること。

7. 4 測定手順

7.4.1 試験菌添加培地の作成

- ① *M.luteus*・・・普通寒天斜面培地に 30℃18 時間培養し、発育した菌株 1 コロニーを感受性測定用ブイヨンに接種する。30℃18 時間の培養を 3 継代まで行い、3 代目の菌株を使用する。(継代を行なうときは 100 μ L ずつ接種する) この菌液を AM5 培地 50mL に 1mL 添加し、8mL ずつペトリ皿に流して試験用培地とする。アンピシリン 0.025 μ g/mL 含有ペーパーディスクをおいて 30℃18 時間培養し、現れる阻止円直径が 14 \pm 1mm であることを確認する。
- ② *B.subtilis*・・・普通寒天斜面培地に 30℃1 週間培養し、芽胞を形成させ所定の濃度に合わせた芽胞菌液を作製する。この菌液を AM5 培地 50mL に 500 μ L 添加し、8mL ずつペトリ皿に流して試験用培地とする。カナマイシン 0.5 μ g/mL 含有ペーパーディスクをおいて 30℃18 時間培養し、現れる阻止円直径が 14 \pm 1mm であることを確認する。
- ③ *Mycoides*・・・普通寒天斜面培地に 30℃1 週間培養し、芽胞を形成させ所定の濃度に合わせた芽胞菌液を作製する。この菌液を AM5 (または AM8) 培地 50mL に 500 μ L 添加し、8mL ずつペトリ皿に流して試験用培地とする。オキシテトラサイクリン 0.25 μ g/mL 含有ペーパーディスクをおいて 30℃18 時間培養し、現れる阻止円直径が 14 \pm 1mm であることを確認する。

7.4.2 試験溶液の作製

- ① 食肉、養殖魚類・・・各材料 5g にクエン酸・アセトン緩衝液 20mL を加え、ホモジナイズした後濾紙で濾過し、その濾液を試験溶液とする。濾過がしにくい場合は、3,000rpm で 15 分間遠心分離し、その上清液を濾過する。
- ② 卵・・・卵黄の全量に 4 倍量のクエン酸・アセトン緩衝液を加えて乳剤としたものを試験溶液とする。
- ③ 蜂蜜・・・蜂蜜 5g にクエン酸・アセトン緩衝液 20mL を加えて溶解したものを試験溶液とする。

7.4.3 試験方法

- ① ペーパーディスクに試験溶液及び各抗生物質を 700 μ L ずつアプライする。(この場合、試験溶液ペーパーディスクは 2 枚以上実施する) これを各検査用平板培地 (7.4.1 試験菌添加培地で作成した) に置き、30℃で 18 時間培養する。

7.4.4 判定

阻止円直径が 12mm 以上示したものを陽性とする。

8. 管理試料及び標準物質の取り扱い

クエン酸・アセトン緩衝液含有ペーパーディスクを陰性対照とする。

各抗生物質含有ペーパーディスクを標準物質とし、現れる阻止円直径が $14 \pm 1\text{mm}$ であることを確認する。

9. 測定にあたっての注意事項

1) 検体不可材料

食肉、養殖魚類、卵、はちみつ以外の材料
加熱、加工材料。

2) 測定値の変動要因

3) 測定上の注意事項

試験菌添加培地の作成で各抗生物質含有ペーパーディスクの現れる阻止円直径が $14 \pm 1\text{mm}$ の範囲からはずれる時は、各抗生物質の濃度の調節を行なう。

10. 基準値及び判定基準

1) 基準値

阻止円の直径が 12mm 未満のものを陰性とする。

2) 基準値設定根拠

畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改定)に準ずる。

11. 異常値を示した検体に対処方法

1) 再検の実施基準

阻止円の直径が 12mm 以上のものは陽性とする。

2) 異常値を示した検体の取扱い

再度検査を行う。

3) 異常値を示した検体の保存

検体は $4 \sim 6^\circ\text{C}$ の冷暗所に2週間保存する。

4) 異常値を示した検体の報告形態

再検済みコメントを付記して報告。

12. 精度管理の方法及び評価基準

標準抗生物質での阻止円の確認。

表1. 日本国内で採取された輸入冷凍水産食品の検査結果

#	製品名	原産国	赤痢菌	抗生物質
1	ホワイトエビ	インドネシア	陰性	陰性
2	天然エビパック	インドネシア	陰性	陰性
3	天然エビ	インドネシア	陰性	陰性
4	ムキエビ	インドネシア	陰性	陰性
5	ブラックタイガーエビ	インドネシア	陰性	陰性
6	ブラックタイガーエビ	インドネシア	陰性	陰性
7	エビパック	インドネシア	陰性	陰性
8	えび(天麩羅・フライ用)	インドネシア	陰性	陰性
9	ムキエビ	インドネシア	陰性	陰性
10	殻付無頭エビ	インドネシア	陰性	陰性
11	養殖ブラックタイガー	インドネシア	陰性	陰性
12	天然ホワイトエビ	インドネシア	陰性	陰性
13	養殖エビ	インドネシア	陰性	陰性
14	ムキエビ	インドネシア	陰性	陰性
15	天然ホワイトエビ	インドネシア	陰性	陰性
16	ムキエビ	インドネシア	陰性	陰性
17	養殖ブラックタイガー	インドネシア	陰性	陰性
18	サラダエビ(バナメイ)	タイ	陰性	陰性
19	無頭バナメイエビ(養殖)	タイ	陰性	陰性
20	養殖バナメイエビ	タイ	陰性	陰性
21	ボイルムキエビ	タイ	陰性	陰性
22	養殖バナメイエビ	タイ	陰性	陰性
23	ボイル有頭エビ	タイ	陰性	陰性
24	生食用バナメイエビ	タイ	陰性	陰性
25	養殖バナメイエビ	タイ	陰性	陰性
26	養殖バナメイエビ	タイ	陰性	陰性
27	ムキエビ	タイ	陰性	陰性
28	ムキエビ	タイ	陰性	陰性
29	養殖バナメイエビ	タイ	陰性	陰性
30	ボイルムキエビ生食用	タイ	陰性	陰性
31	無頭バナメイエビ	タイ	陰性	陰性
32	ムキエビ	タイ	陰性	陰性
33	ムキエビ	タイ	陰性	陰性
34	バナメイエビ	タイ	陰性	陰性
35	殻付無頭エビ(加熱用)	タイ	陰性	陰性
36	養殖ブラックタイガー	ベトナム	陰性	陰性
37	ムキエビ	ベトナム	陰性	陰性
38	ムキエビ加工品	ベトナム	陰性	陰性
39	ボイルムキエビ	ベトナム	陰性	陰性
40	養殖ブラックタイガー	ベトナム	陰性	陰性
41	ムキエビ(背ワタとり)	ベトナム	陰性	陰性
42	ムキエビ	ベトナム	陰性	陰性
43	殻付無頭エビ	ベトナム	陰性	陰性
44	養殖ホワイトエビ	マレーシア	陰性	陰性
45	ムキエビ	マレーシア	陰性	陰性
46	無頭エビ	マレーシア	陰性	陰性
47	養殖バナメイエビ	マレーシア	陰性	陰性
48	養殖ブラックタイガー	ミャンマー	陰性	陰性
49	ムキエビ	ミャンマー	陰性	陰性
50	天然エビパック	ミャンマー	陰性	陰性
検出率	50 検体	5 か国	0.0%	0.0%

表2(1). ベトナム・ハノイ市内で採取された冷凍水産食品の検査結果

#	冷凍水産食品	腸炎ビブリオ	赤痢菌	抗生物質
1	Whole clean squid	陰性	陰性	陰性
2	Squid fillet	陰性	陰性	陰性
3	Clam	陽性	陰性	陰性
4	Oyster	陽性	陰性	陰性
5	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
6	Red-shell clam	陽性	陰性	陰性
7	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
8	Crab meat	陰性	陰性	陰性
9	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
10	Crab meat	陰性	陰性	陰性
11	Shrimp	陰性	陰性	陰性
12	Shrimp	陰性	陰性	陰性
13	Crab meat	陰性	陰性	陰性
14	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
15	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
16	Crab meat	陰性	陰性	陰性
17	Clam	陰性	陰性	陽性
18	Red-shell clam	陰性	陰性	陰性
19	Crab	陽性	陰性	陰性
20	Crab	陽性	陰性	陰性
21	Red-shell clam	陽性	陰性	陰性
22	Clam	陰性	陰性	陰性
23	Oyster	陰性	陰性	陽性
24	Shrimp	陽性	陰性	陰性
25	Squid	陰性	陰性	陰性
26	Scallop	陰性	陰性	陰性
27	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
28	Crab meat	陰性	陰性	陰性
29	Shrimp	陰性	陰性	陰性
30	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
31	Crab meat	陰性	陰性	陰性
32	Shrimp	陰性	陰性	陰性
33	Crab meat	陰性	陰性	陰性
34	Crab meat	陰性	陰性	陰性
35	Shrimp	陰性	陰性	陰性
36	Crab meat	陰性	陰性	陰性
37	Crab meat	陰性	陰性	陰性
38	Crab meat	陰性	陰性	陰性
39	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
40	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
41	Crab	陽性	陰性	陰性
42	Shrimp	陰性	陰性	陰性
43	Crab	陰性	陰性	陰性
44	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
45	Squid	陰性	陰性	陰性
46	Red-shell clam	陽性	陰性	陰性
47	Clam	陰性	陰性	陽性
48	Red-shell clam	陰性	陰性	陰性
49	Clam	陰性	陰性	陽性
50	Oyster	陰性	陰性	陰性

表 2(2). ベトナム・ハノイ市内で採取された冷凍水産食品の検査結果

#	冷凍水産食品	腸炎ビブリオ	赤痢菌	抗生物質
51	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
52	Crab meat	陰性	陰性	陰性
53	Shrimp	陰性	陰性	陰性
54	Scallop	陰性	陰性	陰性
55	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
56	Crab meat	陰性	陰性	陰性
57	Shrimp	陰性	陰性	陰性
58	Shrimp	陰性	陰性	陰性
59	Crab meat	陰性	陰性	陰性
60	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
61	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
62	Crab meat	陰性	陰性	陰性
63	Shrimp	陰性	陰性	陰性
64	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
65	Crab meat	陰性	陰性	陰性
66	Shrimp	陰性	陰性	陰性
67	Crab meat	陰性	陰性	陰性
68	Crab meat	陰性	陰性	陰性
69	Shrimp	陰性	陰性	陰性
70	Crab meat	陰性	陰性	陰性
71	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
72	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
73	Shrimp	陰性	陰性	陰性
74	Scallop	陰性	陰性	陰性
75	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
76	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
77	Crab meat	陰性	陰性	陰性
78	Shrimp	陰性	陰性	陰性
79	Scallop	陰性	陰性	陰性
80	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
81	Crab meat	陰性	陰性	陰性
82	Shrimp	陰性	陰性	陰性
83	Shrimp	陰性	陰性	陰性
84	Crab meat	陰性	陰性	陰性
85	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
86	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
87	Crab meat	陰性	陰性	陰性
88	Shrimp	陰性	陰性	陰性
89	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
90	Crab meat	陰性	陰性	陰性
91	Shrimp	陰性	陰性	陰性
92	Crab meat	陰性	陰性	陰性
93	Crab meat	陰性	陰性	陰性
94	Shrimp	陰性	陰性	陰性
95	Crab meat	陰性	陰性	陰性
96	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
97	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
98	Shrimp	陰性	陰性	陰性
99	Scallop	陰性	陰性	陰性
100	Black tiger shrimp	陰性	陰性	陰性
検出率	100 検体	9.0%	0.0%	4.0%

平成22年度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

分担研究報告書

6. 食品由来 *Listeria monocytogenes* 菌株の Multi Locus Variable-Number
of Tandem Repeat Analysis を用いた分子疫学的解析

研究分担者 岡田由美子
研究協力者 五十君静信、門田修子、泉谷秀昌

厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

食品由来 *Listeria monocytogenes* 菌株の Multi Locus Variable-Number of Tandem Repeat Analysis を用いた分子疫学的解析

分担研究者 岡田由美子
国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 主任研究官
協力研究者 門田修子
国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 流動研究員
協力研究者 泉谷秀昌
国立感染症研究所 細菌第一部 第二室長
協力研究者 五十君静信
国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部 第一室長

研究要旨

自然界に広く分布しているグラム陽性細菌 *Listeria monocytogenes* (リステリア) は、人及び動物に脳脊髄膜炎、流死産を引き起こし、致命率が 20% にも及ぶ重篤な感染症リステリア症の原因菌である。欧米諸国では数年に一度の頻度で大規模な集団事例が発生しており、非加熱食肉製品、乳製品、サラダ類などがその原因食品として知られている。しかしながら、これまで日本国内で発生しているリステリア症はその大半が散发例であり、集団事例は 1 例のみが報告されている。食品媒介感染症の発生予防には原因食品の究明が大変重要であるが、1 ヶ月にも及ぶ長い潜伏期間を示すリステリア症の散发事例について、その原因食品を同定するのは大変困難となっている。一方、さまざまな食中毒菌において、症例発生時の原因食品同定のために、菌株の DNA を用いた分子疫学的解析が実施されており、リステリアでも国内のいくつかの研究機関において Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE) 法による解析が実施されている。今回、輸入食品及び国内産食品由来のリステリア菌株を分類したデータベース構築の基礎とする目的で、輸入食品から分離されたリステリア及び研究室保有の国内食品からの分離株の型別を、近年注目されている分子型別法である Multi Locus Variable-Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA) により解析した。その結果、昨年度実施した PFGE 解析と比較して手技が比較的簡便であり、型別に用いるデータが特定遺伝子内のタンデムリピート数で表されるため、画像データを解析する PFGE 法に比べ再現性や他の機関とのデータの互換性に優れていると思われた。作成された系統樹からは、その近縁度が血清型とある程度相関している可能性が示された。また、MLVA による近縁度は、概して PFGE 解析によるものよりも高い数値を示していたことから、MLVA は株の同一性の鑑別により有効であると思われた。一方で PFGE はゲノム全体の相違を観察できるため、実用的なリステリア分離株データベースの構築は、これら両方及びその他の型別情報を含めた包括的なものが望ましいと思われた。

A. 研究目的

人及び動物に脳脊髄膜炎、流死産を引き起こし、発症時の致命率が 20-30% にも及ぶリステリア症の原因菌である *Listeria monocytogenes* (以下リステリア) は、動物の腸管内、土壌、河川水や食品工場、冷蔵庫

内など様々な環境に存在している。また、本菌は 0°C 以上での低温増殖性、20% の食塩濃度下でも生存可能な高塩濃度耐性を持ち、加工・保存過程での増殖制御が困難である。欧米諸国で数年に一度の頻度でリステリア症の集団事例が見られており、原因食品とし

ては乳製品、水産物及びその加工品、食肉及びその加工品、サラダ等様々な食品が知られている。食品媒介感染症の発生予防には過去の事例の原因究明が大変重要であるが、これまで日本国内で発生しているリステリア症はその大半が散発例であり、その原因食品が特定されることはほとんどない。一方、国内流通食品がある程度本菌に汚染されていることは以前から知られており、分担研究者らが実施した平成 19 年度の厚生労働科学研究「輸入食品における食中毒菌サーベイランス及びモニタリングシステム構築に関する研究」の分担研究「輸入非加熱食肉食品の *Listeria monocytogenes* による汚染状況」においても、国内で一般に流通している非加熱食肉製品 68 検体中 4 検体 (5.9%) から本菌が分離されていた。これら食品からの分離菌株と患者由来株の分子疫学的情報をデータベースとして集積することにより、散発事例においてもある程度の原因食品の究明が可能になると思われる。本研究では、食品媒介リステリア症の発生を予防するための効率的なリステリアモニタリングシステム構築のための研究の一端として、輸入食品由来株及び国内産食品由来リステリア菌株の効率的な分子型別データベースを構築することを目的として、これらの食品から分離された *L. monocytogenes* の MLVA による解析を実施した。

B. 研究方法

1. 検体

国内産食品由来株 21 株及び輸入食品由来株 7 株の計 28 株の *L. monocytogenes* 菌株に標準菌株として ATCC19115 株を加え、合計 29 株を用いた(表 1)。血清型の内訳は、1/2a が 19 株、1/2b が 3 株、1/2c が 2 株、3b が 1 株、4b が 3 株、4d が 1 株であった。

2. Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis による分子型別

各菌株を Brain Heart Infusion (BHI) 寒天平板 (Difco) 上で 37°C 一夜培養し、単一コロニーを形成させた。1 白金耳を 100 μ l の滅菌精製水に懸濁し、95°C で 10 分間加熱した菌液を直ちに氷冷し、4°C 8000g にて 10 分間遠心分離してその上清を回収した。上清は

-20°C に保存し、PCR の鋳型として用いた。

Multiplex PCR の組成は、DNA 2 μ l、10×バッファ 2.5 μ l、dNTP 2 μ l、0.3 μ M プライマー各 0.75 μ l、Ex Taq 0.125 μ l で反応液量を 25 μ l とした。プライマーは、Sperry らの論文 (Journal of Clinical Microbiology, 2008. vol. 46, No. 4, p1435-1450) に基づき、表 2 に示したものをを用いた。ただし、論文で使用されたオートシーケンサーが Roche 社製であるのに対し、本研究では国内で普及している Applied Biosystems 社製オートシーケンサーである ABIPRISM310 ジェネティックアナライザを用いたため、適合した種類の蛍光プライマーに条件を改変して使用した。即ち、論文で使用された Beckman Dye 2、3 及び 4 に替わり、HEX、NED 及び 5、6-FAM を用いた。Multiplex PCR の反応条件は、加熱変性を 95°C 5 分で行い、94°C 20 秒・50°C 20 秒・72°C 20 秒を 35 サイクル、extension を 72°C 5 分実施した。PCR 産物は MinElute PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製し、得られた 20 μ l の抽出液を滅菌精製水で 1000 倍希釈したもの 1 μ l を 0.5 μ l の ROX500 size standard (Applied Biosystems) と 18.5 μ l の Hi-Di formamide と混和して、ABIPRISM310 を用いてピークを検出した。得られた波形データは GeneMapper ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いてピークサイズを検出し、リピート数を算出した。各菌株における合計 8 領域のリピート数から、BioNumerics ソフトウェア (Applied Maths) を用いて系統樹を作成し、昨年度実施したパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析の結果と比較検討した。

3. 国内におけるリステリア汚染食品の検疫関連情報収集

平成 22 年 4 月から平成 23 年 3 月までに、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室より出された事務連絡の内、リステリアが検出された輸入食品に関する情報を抽出し、輸出国、対象食品等について集計した。

4. 各国におけるリステリア汚染食品のリコール状況

平成22年4月から平成23年3月までの期間で、食品安全委員会の発表している食品安全関係情報及び日報と、国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部が発表している食品安全情報より、諸外国におけるリステリア汚染食品のリコール情報及び欧州委員会 健康・消費者保護総局 (EC DG-SANCO: Directorate-General for Health and Consumers) による食品および飼料に関する早期警告システム (RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed) の主なリステリア関連情報を抽出し、食品種、原産国、患者発生の有無等について集計した。

5. 各国におけるヒトリステリア症の発生状況

平成18年から平成21年までの期間における、諸外国でのリステリア症発生状況に関する統計を各国及びEUにおける公的報告書より抽出、精査した。

C. 研究結果

1. MLVAによる分子型別

輸入食品及び国内産食品由来の *L. monocytogenes* の MLVA 解析の結果を UPGMA 法により作成した系統樹として図1に示した。その結果、使用菌株は3つのクラスターに大別された。第1のクラスターには、血清型4bのイクラ由来株1株のみが分類された。第2クラスターには、血清型4bに属する標準株、ホタテ由来株、血清型1/2bに属する鮭刺身及び輸入サラミ由来株、血清型3bに属する輸入生ハム由来株及び血清型4dに属する国内産生ハム由来株が分類された。第3クラスターには血清型1/2a及び1/2cに属する全ての菌株と、白菜漬け由来の血清型1/2bに属する1株が分類された。第3クラスターは更に3つのサブクラスターに分類され、第1サブクラスターにはローストビーフ由来の2株が分類された。第2及び第3サブクラスターには、それぞれに食肉製品や水産食品由来株が分類され、第2サブクラスターは血清型1/2aに属する株のみで、第3サブクラスターは血清型1/2a、1/2b及び1/2cに属する菌株が混在していた。それらのうち、近縁度(similarity)が

100%とされた株について、昨年度実施した PFGE 解析の結果(制限酵素 *AscI*)と比較したところ、PFGE においては輸入サラミ及び輸入生ハム由来株では62%、ローストビーフ由来株では58%、串カツ及び輸入生ハム由来株では40%、スモークサーモン由来株では85%、漬物及びマグロ由来株では90%等の数値を示した。このうち、スモークサーモン由来株及びローストビーフ由来株各2株は同一の製造所において同日に加工された後販売店に出荷された製品であり、ほぼ同一の株と考えられた。

2. 国内におけるリステリア汚染食品の検疫関連情報収集

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課輸入食品安全対策室より平成22年4月から平成23年3月までの1年間に輸出された、リステリアが検出された輸入食品に関する事務連絡を、輸出国、対象食品等について年度ごとに集計した(表3)。その結果、平成22年度には29件の食品衛生法違反事例が見られた。対象食品は、ナチュラルチーズ2件及び非加熱食肉製品27件であった。輸出国は、イタリア12件、スペイン14件、フランス2件及びカナダ1件であった。また、市販輸入食品における違反事例は、フランス産ナチュラルチーズの1件であった。

3. 各国におけるリステリア汚染食品のリコール状況に関する情報収集

食品安全委員会から報告された食品安全関係情報及び日報と、国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部報告された食品安全情報より、平成22年4月から平成23年3月までの諸外国におけるリステリア汚染食品のリコール情報を抽出し、重複を除いて食品種、原産国、患者発生の有無等について集計した(表4)。また、欧州委員会 健康・消費者保護総局 (EC DG-SANCO: Directorate-General for Health and Consumers) による食品および飼料に関する早期警告システム (RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed) で報告された主なリステリア関連情報についても集計した(表5)。その結果、89件の食品リコールがリステリアに関連して出されていた。国別には、米国42件、カナダ21件、オーストリア7件、オーストラリア5件、フランス4

件、ベルギー3件、イギリス・アイルランド各2件、香港・ニュージーランド各1件であった。また、対象食品をカテゴリー別に分類すると、食肉製品30件、乳製品19件、水産食品15件、野菜類8件、複合食品15件、その他の食品3件であった。回収対象食品に起因するリステリア症の発生が明確なものは2件あり、それぞれ患者数は1名及び10名(うち死者5名)であった。

RASFFにおけるリステリア関連情報には、主に警報通知(Alert Notifications)、情報通知(Information Notifications)及び通関拒否通知(Border Rejections)の3種があり、今年度のリステリア関連では警報通知が29件、情報通知が42件及び通関拒否通知が8件見られた(表5)。食品種別には、警報通知において乳製品が7件、食肉製品が6件、乳及び食肉製品が1件、水産食品が14件、その他が1件であった。情報通知においては乳製品が9件、肉製品が9件、乳及び肉製品が1件、水産食品が21件、その他が2件であった。通関拒否通知は全て水産食品であった。原産国別には、警報通知においてポーランド6件、ドイツ及びフランス各5件、スペイン及びベルギー各3件、イタリア及びアイルランド各2件、デンマーク、エストニア及びチェコ各1件であった。情報通知においては、フランス7件、スペイン6件、イタリア及びポーランド各4件、ドイツ、オーストリア、イギリス、デンマーク、ベトナム及びアルゼンチン各2件、チェコ、リトアニア、ギリシャ、オランダ、アメリカ、中国、スリランカ、ケニア及びチリ各1件であった。通関拒否通知においては、ベトナム7件及びアルゼンチン1件であった。RASFFの情報には、当該食品による患者発生の有無は記載されていない。

4. 各国におけるヒトリステリア症の発生状況

平成18年から平成21年までの期間における、ヨーロッパ諸国及び北米でのリステリア症発生状況を表6に示した。一部記載のない部分も見られたが、報告期間においてリステリア症の症例が見られなかった国はマルタ、ルーマニア及びリヒテンシュタインであった。期間内の最も高い罹患率(人口10万人

対)が0.1未満から0.5未満の間であった国は、ブルガリア、キプロス、エストニア、ギリシャ、ハンガリー、アイルランド、イタリア、ラトビア、リトアニア、オランダ、ポーランド、スロバキア、スロベニア、スペイン、イギリス及び米国であった。0.5以上1.0未満の間であった国は、オーストリア、ベルギー、チェコ、デンマーク、フィンランド、フランス、ドイツ、ルクセンブルク、スウェーデン、スイス及びカナダであった。期間内の最も高い罹患率(人口10万人対)が1.0を超えている国は、アイスランド及びノルウェーであった。期間内における罹患率の増減傾向では、オーストリア、デンマーク、エストニア、イタリア、ラトビア、リトアニア、スウェーデン及びカナダに増加傾向が、キプロス、チェコ、スロバキア、スロベニア及びスイスに減少傾向がみられた。

D. 考察

本研究において、国内産食品由来株21株、輸入食品由来株7株及び標準菌株1株の計29株の*L. monocytogenes*菌株についてMLVA解析を実施した結果、昨年度同じ菌株を用いて実施したPFGE法に比べ株の同一性を検出しやすいことが示された。また、電気泳動を主体とし画像データを用いるPFGE法よりもデータの再現性が高く、他の研究者とのデータの比較・交換が容易であると思われる。一方で、その解析にはオートシーケンサーが必要であり、今後の普及に当たっては、特殊な電気泳動装置が必要なPFGE法と共に解析に要する費用が高価であることが懸念された。一方でPFGEはゲノム全体の相違を観察できるため、特定の遺伝子座のリピート数を検出するMLVAとは全く異なる点から株を型別するため、多くの菌株情報を含むデータベースを構築する際には、可能な限り両型別法の情報を得ることが望ましいと思われる。

今年度における国内の輸入食品検疫及び輸入業者の自主検査によるナチュラルチーズ及び非加熱食肉製品からのリステリア検出は29例であり、その大半が非加熱食肉製品からの検出であった。また、諸外国における本菌の検出による食品リコール89件においても、その34%が食肉製品であった。乳製

品のリコール件数は全体の23%であり、海外で製造された食肉製品の本菌による汚染率が高い可能性が示された。しかしながら、非加熱食肉製品はその多くが本菌の増殖が可能な水分活性0.95よりも低い水分活性を示しており、保存中の菌数増加は起こりづらいと考えられる。一方ナチュラルチーズは、低温保存中に本菌が著しく増殖する可能性があることが知られている。平成21年度に実施された「食品におけるリステリアに関する規格基準に係る調査研究」の中の「一般流通食品におけるリステリア汚染実態調査」においても、食肉製品の汚染菌量は定量法における検出限界以下であったのに対し、輸入白カビチーズの汚染菌量は490CFU/gと、Codexの微生物規格を超えるものであった。以上より、今後も非加熱食肉製品及びナチュラルチーズのモニタリング試験は強化すべきであると思われた。また、RASFFのリステリア関連情報では、警報通知及び情報通知の半数が水産食品に関するものであり、通関拒否通知は全件が水産食品であった。警報通知と情報通知の対象となった水産食品は主にスモークサーモンであり、今後国内でもその監視について検討すべきであると思われた。

本研究の結果より、今後輸入された非加熱喫食食品を通じてリステリア症が発生する可能性は高く、その原因食品を明らかにするため、食品由来リステリアの分子疫学的サーベイランスを継続的に実施し、データベース化することが重要であることが示唆された。なお、本研究の前期研究課題である一昨年の厚生労働科学研究「輸入食品における食中毒菌サーベイランス及びモニタリングシステム構築に関する研究」において実施した、薬剤感受性試験の結果では、今年度のMLVA解析で同一とされたローストビーフ由来の2株について、ゲンタマイシン及びカナマイシン耐性での最小発育阻止濃度(MIC)が大きく異なっていた。本菌におけるこれらの抗生剤への耐性メカニズムはまだ明らかではないが、本菌と同じグラム陽性菌である*Staphylococcus* やグラム陰性菌である*Enterococcus* において、水平伝達性DNAであるトランスポゾン上に耐性遺伝子が存在していることが知られていることから

(Culebras *et al.* 1999)、本菌においても同様の機構が存在している可能性がある。前述の2株は同じ製造現場から出荷されたものであり、ほぼ同一のクローンであるものの一方がアミノグリコシド耐性を獲得しており、薬剤耐性試験の実施によりその鑑別が可能となった。これらの結果から、様々な由来のリステリア菌株を有効に分類し、散发例を含むリステリア症事例の原因食品を特定するためには、多くの食品由来株や患者由来株については、PFGEやMLVAのみならず、リボタイピングや薬剤感受性プロファイルも含めた多面的な解析を行い、それらの情報をデータベース化することが必要であることが示唆された。

E. 結論

本研究の結果、MLVA解析によるリステリア菌株の分子疫学的型別は、昨年度実施したPFGE解析と比較して、手技が比較的簡便であり、特定遺伝子内のタンデムリピート数により型別を行うことから、画像データを解析するPFGE法に比べ再現性や他の機関とのデータの互換性に優れていると思われた。作成された系統樹からは、その近縁度が血清型とある程度相関している可能性が示された。また、MLVAによる近縁度は、概してPFGE解析によるものよりも高い数値を示していた。したがって、MLVAは株の同一性の判断により有効であると思われた。しかしながら、MLVAで同一とされた株の中に一昨年に実施した薬剤感受性パターンが異なっていた株もあり、食品及び患者由来リステリア菌株の有益なデータベース作成には、MLVA及びPFGE解析のみならず、様々な型別法による解析が必要であると思われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 学会発表

Monden S, Okutani A, Suzuki H, Asakura H, Nakama A, Igimi S and Okada Y.

Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan.

17th International Symposium on Problems of Listeriosis. (2010. 5)

岡田由美子、大貫泉美、五十君静信
*Listeria monocytogenes*の国内流通食品からの分離状況と低温保存食品中での消長
第 150 回日本獣医学会(2010. 9)

門田修子、岡田由美子、五十君静信、山本茂貴
食品から分離されたリステリア菌株の分子疫学的解析
第 100 回日本食品衛生学会(2010. 9)

2. 原著論文

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 使用菌株

	由来食品	国産/輸入	血清型	分離年
1	ホタテ	国産	4b	2008
2	串カツ	国産	1/2a	2008
3	生ハム	輸入	1/2a	2007
4	サラミ	輸入	3b	2007
5	サラミ	輸入	1/2b	2007
6	生ハム	輸入	1/2c	2007
7	サラミ	輸入	1/2c	2007
8	サラミ	輸入	1/2a	2007
9	ナチュラルチーズ	輸入	1/2a	2010
10	ネギトロ	国産	1/2a	2010
11	生ハム	国産	4d	2010
12	イクラ	国産	1/2a	2010
13	ネギトロ	国産	1/2a	2010
14	ネギトロ	国産	1/2a	2010
15	イクラ	国産	1/2a	2010
16	イクラ	国産	4b	2010
17	ネギトロ	国産	1/2a	2010
18	マグロ刺身	国産	1/2a	2010
19	スモークサーモン	国産	1/2a	2010
20	ネギトロ	国産	1/2a	2010
21	スモークサーモン	国産	1/2a	2010
22	鮭刺身	国産	1/2b	2010
23	ローストビーフ	国産	1/2a	2010
24	ローストビーフ	国産	1/2a	2010
25	明太子	国産	1/2a	2010
26	明太子	国産	1/2a	2010
27	白菜漬け	国産	1/2b	2010
28	ネギトロ	国産	1/2a	2010
29	ATCC19115	標準株	4b	不明

表 2. 使用プライマー

VNTR locus	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
PCR1		
Lm-2	CGTATTGTGCGCCAGAAAGTA	CAGCAACGGCAACAACAACACAG
Lm-8	ACGCGCAATACTATAAAGGGTGTC	AGAAAAAGCGGAAGCAGATAAGAA
Lm-10	CAGATATCGATACGATTGAC	CAGTTAGTATTTCCAACGTC
Lm-11	GAATAAAATGCTAGATGTGG	CCGATTCAAAAAATAGTAAAC
PCR2		
Lm-3	CAAACCAGATGGTGTAGCA	TGGTTTTGATGGATCAACTGG
Lm-15	GGACTTAACGGAATACAAAAG	GCTGTTACAAGTAAAACTGG
Lm-23	TACGCCAGTTCCTCCGTTAG	TTGAAAGCTGGAGATGTTATTCA
Lm-32	AAAGCTTTGCCAGTGCAAGT	TTGTGACTTGGCACCTTCTGG

Sperry *et al.* 2008. J. Clin. Microbiol. vol. 46, No. 4, p. 1435-1450

図1. 輸入及び国内産食品由来*L. monocytogenes*菌株のMLVA結果

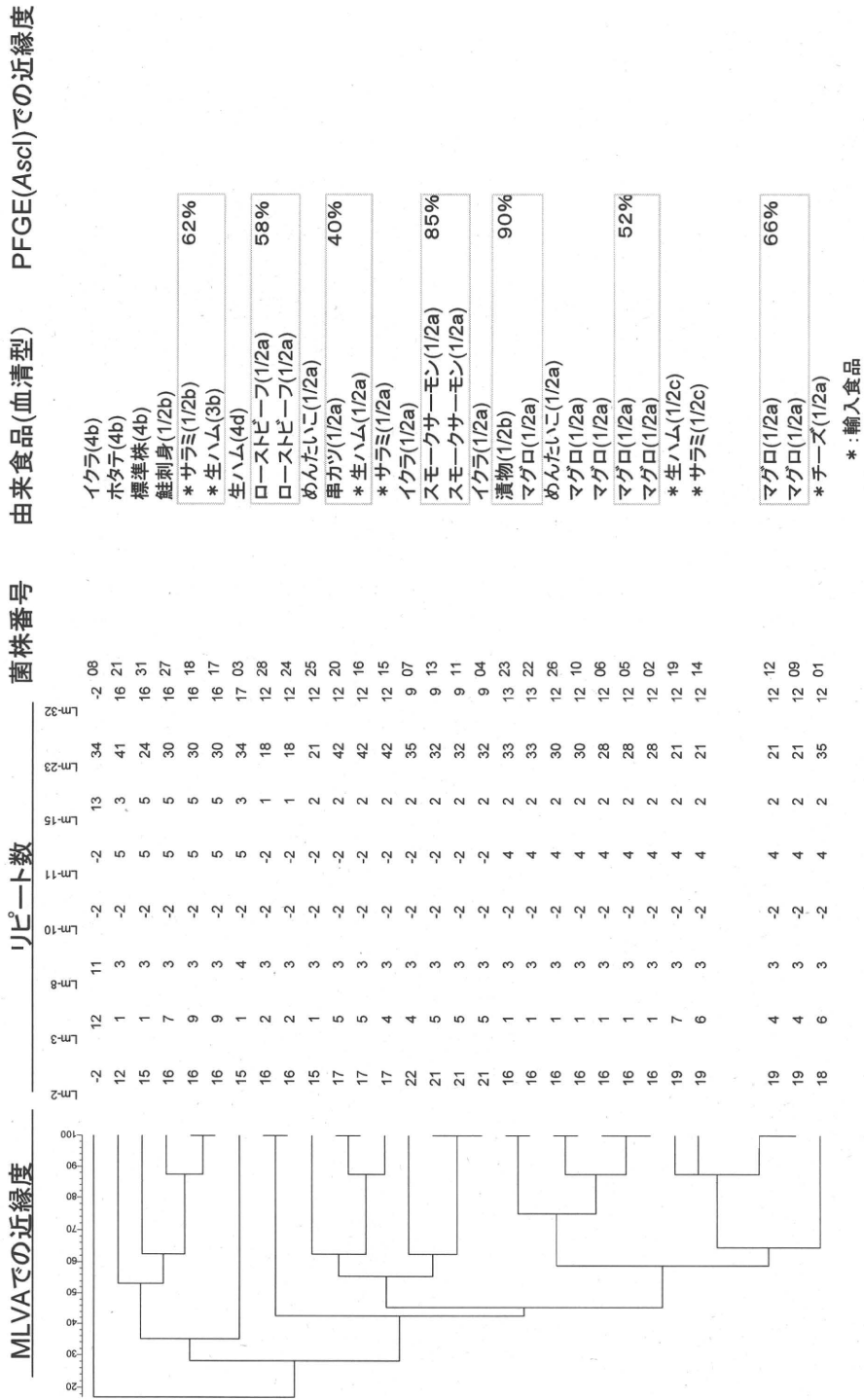


表3. 平成22年度 厚生労働省医薬食品局食品安全監視安全課輸入食品安全対策室 リステリアに関する事務連絡

日付	品名	食品種	原産国	精製し	廃棄	検査所	検出機関	原産国試験
14月	PROSCIUTTO PARMA DISSOSSATO	非加熱食肉製品	イタリア	○		○	自主検査	
25月	SALSICCIA PICCANTE CURVA MINI	非加熱食肉製品	イタリア	○		○	自主検査	
35月	PROSCIUTTO CRUDE HAM	非加熱食肉製品	イタリア	○		○	自主検査	
45月	JAMON IBERICO BELLOTTA LONCHEADO	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
56月	MILANO SALAMI STYLE CURED PORK SAUSAGE	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
66月	CHORIZO IBERICO BELLOTTA E.V	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
76月	LOMO IBERICO BELLOTTA	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
86月	FUET IBERICO BELLOTTA	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
96月	CHEVROTIN AOP	ナチュラルチーズ	フランス	○		○	自主検査	
108月	SALAME FELINO	ナチュラルチーズ	フランス	○		○	自主検査	
118月	TALEGGIO	ナチュラルチーズ	フランス	○		○	自主検査	
128月	CENTRO DE PALETA SERRANA	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
139月	CHORIZO CASERO CURED RED SAUSAGE	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
149月	SALCHICHON IBERICO 280G	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
159月	SALAME VISMARINO	非加熱食肉製品	イタリア	○		○	自主検査	
169月	SALAME MILANO	非加熱食肉製品	イタリア	○		○	自主検査	
1710月	PALETA SERRANA LONCHEADA	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
1811月	JAMON D.O. TERUEL LONCHEADO (JAMON D.O.T.LONCHEADO)	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
1911月	AGORNI PURE IBERIAN PORK LOIN- SLICES	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
2011月	CHORIZO IBERICO MINI	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
2111月	SLICED PARMA HAMLACKS HAM PARMA HAM)	非加熱食肉製品	イタリア	○		○	自主検査	
2211月	PARMA PROSCIUTTO SLICED(PROSCIUTTO DI PARMA HAM S)	非加熱食肉製品	イタリア	○		○	自主検査	
2311月	BRESAOLA DI SUINO BIO	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
2411月	COPPA STAGIONATA FLAT SLICED	非加熱食肉製品	カナダ	○		○	自主検査	
2512月	SLICED PARMA HAM	非加熱食肉製品	イタリア	○		○	自主検査	
2612月	PROSCIUTTO PARMA TIP TIP DIS SQUARE CUT(PROSCIUTTO)	非加熱食肉製品	イタリア	○		○	自主検査	
2712月	SALAME SPANATA ROMANA	非加熱食肉製品	イタリア	○		○	自主検査	
2813月	CHORIZO IBERICO BELLOTTA ADMIRACION LONCHEADO	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	
2913月	SLICED PARMA HAM	非加熱食肉製品	イタリア	○		○	自主検査	
3013月	CHORIZO IBERICO BELLOTTA ADMIRACION LONCHEADO	非加熱食肉製品	スペイン	○		○	自主検査	

平成22年度 国内違反事例

1 5月	PONT LEVEQUE	ナチュラルチーズ	フランス
--------	--------------	----------	------