

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全総合研究事業）
「国内侵入のおそれがある生物学的ハザードのリスクに関する研究」
分担研究報告書

**各国におけるリステリア症発生状況
及び *Listeria monocytogenes* 菌株の分子疫学的解析に関する研究**

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 第三室長
研究協力者 吉田麻利江 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

グラム陽性の短桿菌 *Listeria monocytogenes* (リステリア)は、汚染食品を通じて人に感染するリステリア症の原因菌である。本菌は自然界に広く分布しており、動物の腸管内、河川水、土壌等から分離されるため、食肉、乳及び乳製品等の農産物の一次汚染を防止することは困難である。また、本菌は低温や高食塩濃度等への抵抗性が強く、冷蔵庫内でも増殖すること、食品製造環境で長期間生残することが知られている。そのため、生ハム・サラミ等の非加熱食肉製品やナチュラルチーズ等の輸入食品や、水産加工品等の国内産食品からは一定の割合で本菌の検出が報告されている。リステリア症の集団感染事例は、日本国内ではほとんど見られていないが、欧米諸国では頻繁に起こり、原因食品は非加熱食肉製品、乳製品、サラダ類を中心に、セロリ、メロン等多岐に亘っている。しかしながら、日本国内で発生しているリステリア症の大半が散发事例となっている。リステリアによる髄膜炎、敗血症等の潜伏期間は長く、1 か月から最長 3 か月にも及ぶため、ほとんどの症例において原因食品は同定されていない。

本研究では、昨年度より海外から侵入しうる感染症の原因菌として、リステリアの分子疫学的解析を行い、国内散发例の原因食品究明に役立て得るデータベース作成を目指している。その手法には、米国 CDC を中心として国際的に行われているパルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用いた。今年度は、昨年度制限酵素 *AscI* で切断したパターンの解析を行った菌株について、*Apal* での切断を行い、泳動パターンの解析を行った。

A. 研究目的

Listeria monocytogenes (以下リステリア)は、人及び動物に脳脊髄膜炎、流死産を引き起こし、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。本菌は動物の腸管内、土壌、河川水や食品製造工場、冷蔵庫内など様々な環境に存在している。また、本菌は-1 もの低温下での低温増殖能、20%もの高食塩濃度下での生残性等高度な環境抵抗

性を持ち、食品原料の一次汚染並びに加工・保存過程での二次汚染の制御が困難である。欧米諸国ではしばしばリステリア症の集団事例が見られており、2008 年にはカナダで、1 工場で製造されたローストビーフ等の食肉加工品数品目を原因食品とする集団事例により、57 名が発症、うち 23 名が死亡した。平成 23 年 9 月には米国でカンタロープメロンを原因食品とした複数の州にまたがる集団事例が発

生し、146名の患者数、うち30名が死亡する事態となった。その他、過去の事例における原因食品としてはナチュラルチーズ等の乳製品、スモークサーモン等の水産物及びその加工品、ローストビーフ等の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。我が国においてリステリア症は報告義務のない疾患であり、推定患者数は1996～2002年で人口100万人当たり0.65人、2008～2011年で同じく1.06～1.57人されている。一方国内での集団事例はほとんど報告されておらず、2001年の国内産ナチュラルチーズを原因食品とする1例が確認されているのみである。リステリア症は下痢や風邪様症状を主症状とする非侵襲性リステリア症と流産、髄膜炎、敗血症等を引き起こす侵襲性リステリア症に分類され、潜伏期間は前者で数日、後者は長い場合には3ヶ月にも達する。そのため、侵襲性リステリア症の散发事例で原因食品が特定されることはほとんどない。また、過去の研究から国内で流通する食品がある程度本菌に汚染されていることが明らかとなっている。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」では、国内で一般に流通している生ハム、サラミ等の非加熱食肉製品68検体中4検体(5.9%)から、平成21年度の食品等検査費で実施された「一般流通食品におけるリステリア汚染実態調査」においては市販非加熱喫食食品1500検体中21検

体(1.4%)から本菌が分離された。輸入時の検疫で非加熱食肉製品とナチュラルチーズのリステリア汚染検査がなされているものの、輸入量の一部にとどまっている。本研究では、海外から汚染食品を媒介して国内に侵入しうる感染症の一つとしてリステリア症に着目し、その発生状況を正確に把握するための情報を収集するとともに、輸入食品、国内産食品等様々な由来のリステリア菌株の分子型別データを収集、蓄積することにより、国内での散发事例及び集団事例の原因食品同定に役立てることを目的として、研究室保有の輸入食品、国内産食品及び患者由来株を用いた*L. monocytogenes*のパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による解析を昨年度に引き続き実施した。

B. 研究方法

1. 検体

日本国内で分離された*L. monocytogenes* 61菌株を解析に使用した。その内訳は、国内患者由来株2株、国内産食品由来株45株及び輸入食品由来株8株、調理環境由来株1株及び標準菌株(ATCC19115株)1株であった(表1)。食品種は、サラミ由来4株、生ハム由来2株、チーズ由来1株、鶏肉由来4株、豚肉由来3株、牛肉由来22株、串カツ由来1株及びホタテ由来1株であった。豚肉は11検体から各2株、1検体から1株、牛肉は11検体から各2株分離されたものを用いた。血清型の内訳は、1/2aが25株、1/2bが10株、1/2cが19株、3bが1株、4bが6株、4dが1株であった。

2. PFGE による分子型別

昨年度作成した、米国 CDC の方法を基本とした *L. monocytogenes* の PFGE 解析法の標準的プロトコールを、2013 年 5 月に行われた CDC の方法の改正に合わせ、再検討を行った（別添 1）。この方法により、研究室保有株の PFGE プラグを作成し、制限酵素 *ApaI* で切断後に電気泳動を行い、得られた画像は BioNumerics ソフトウェア（ver.6.1）を用いて解析した。系統樹作成には、非加重結合法（Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean、UPGMA 法）を用い、tolerance は 1.0 に設定した。

3. 諸外国におけるリステリア症集団事例に関する情報収集

過去 5 年間に、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等により、諸外国におけるリステリア症集団事例についての情報を収集した。

C. 研究結果

1. PFGE による分子型別

国内産食品、輸入食品及び患者等に由来する *L. monocytogenes* 菌株の *ApaI* 切断による PFGE 解析の結果を図 1 に示した。その結果 *ApaI* 切断においても、昨年度実施した *AscI* と同様に、血清型でクラスターが大きく分けられることが示された。また、血清型 1/2a では株による泳動パターンに大きな違いが見られた。一方、ブラジル産鶏肉由来の 3 株は 90% 以上の相動性を示し、昨年度実施した *AscI* 解析の結果（80%）よりも高い結果とな

った（PFGE 番号 3、4、及び 12）。牛由来株と豚由来株が同一のパターンを示す例が 3 通り見られた（PFGE 番号 25、46、69、PFGE 番号 35、60、64 及び PFGE 番号 38、41、50）。血清型の異なるサラミ由来株 2 株も同一パターンを示し（PFGE 番号 16 及び 17）。食肉加工品に分布しているクローンの存在が示唆された。また、血清型 4b に属する菌株は、まとまったクラスターに分類されたものの株ごとのパターンの違いが大きく、二組のパターンに分けられた牛由来株はそれぞれ同一検体から分離されたものであり、各クローンで泳動パターンが異なることが示された。血清型 1/2c に属する菌株では、ブラジル産鶏肉由来株、スペイン産ハム及びサラミ由来株、国内産牛肉由来株、国内産豚肉由来株の合計 18 株が同じサブクラスターに分類された。昨年度実施した *AscI* による血清型 1/2c 株の切断パターンでも同様の結果を示し（平成 24 年度報告書 図 1）本血清型に属する菌株が、遺伝的に相動性が高いことが示された。しかしながら、同一の豚肉から分離され、血清型 1/2c に属する 2 株が異なる泳動パターンを示した例も 1 例あり（PFGE 番号 47 及び 48）通常行われる血清型別のみでは識別できない場合でも、食品が複数のクローンで汚染されている例があることが示された。また、今回の解析においても、フランス産チーズは他の菌株との相同性が著しく低いことが示された（PFGE 番号 2）。

2. 諸外国におけるリステリア症集団事例に関する情報収集

過去 5 年間に諸外国で発生した患者数が 3 名以上のリステリア症集団事例は 17 例見られ、そのうち 9 例でチーズが原因食品であった(表 2)。また、それらの内輸入食品を原因とする事例は 3 例みられた。

D. 考察

本研究において、国内患者由来株 2 株、国内産食品由来株 45 株及び輸入食品由来株 8 株、調理環境由来株 1 株及び標準菌株の計 62 株について制限酵素 *ApaI* を用いた PFGE による解析を実施した結果、昨年度実施した *AscI* と同様に、血清型と高い相関をもって分類されることが示された。また、同一食品から分離され、同じ血清型に属する複数の菌株において、PFGE パターンが異なる例が 1 例見られ、一検体が複数のクローンに汚染されている例が存在することが示された。血清型 1/2c に属する菌株は *ApaI* 切断においても *AscI* 切断と同様に、由来食品や原産国に係わらず高い相同性を示し、本血清型に属する菌株の詳細な型別には、第 3 の制限酵素を用いるか、別の手法による分子疫学的解析を実施する必要があると思われる。一方、血清型 4b に属する菌株については、検体数が限られているものの株ごとの相動性は低く、型別法として PFGE 解析が有用であることが示された。1/2a、1/2b 等についても同様であった。

これらの結果から、米国 CDC の手法を基にした PFGE 解析法により、国内の様々な由来のリステリア菌株を有効に分類していくことで、散発例を含むリステリア症事例の原因食品を類推しうる可能

性が示唆された。リステリア症の原因食品の推定に結び付け、集団事例発生時にアウトブレイクとして早期に検出するためには、更に多くの食品由来株について、原産国、血清型ごとのデータの蓄積が必要であり、患者由来株のデータと合わせて PFGE 解析を行っていくことが必要であることが示された。そのためには、CDC と同様の方式で国内の多くの試験所からの解析情報を統合し、共通に利用しうるデータベースを作成することが重要であると思われる。

E. 結論

本研究の結果、リステリアの *ApaI* 切断による PFGE 解析を用いた分子疫学的解析は、昨年度実施した *AscI* 切断による解析と同様に、クラスターと血清型に高い相関がみられた。また、同一検体由来株で同じ血清型に属する複数の菌株について泳動パターン結果が一致しないことがあり、株の同一性を高い感度で検出できることが明らかとなった。最終年度は公共データベースの構築を目標とし、更にデータを蓄積するとともに、国内の試験機関との協力でデータの充実を目指す。

F. 研究発表

特になし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 使用菌株

PFGE 番号	由来食品	国産/輸入	血清型	分離年
2	チーズ	輸入	1/2a	2010
3	鶏肉	輸入	1/2a	2008
4	鶏肉	輸入	1/2a	2007
11	鶏肉	輸入	1/2a	2006
12	鶏肉	輸入	1/2a	2006
13	串カツ	国産	1/2a	2008
14	ホタテ	国産	4b	2008
15	生ハム	輸入	1/2a	2007
16	サラミ	輸入	1/2b	2007
17	サラミ	輸入	3b	2007
18	生ハム	輸入	1/2a	2007
19	患者	-	1/2a	2007
20	サラミ	輸入	1/2a	2007
21	サラミ	輸入	1/2c	2007
22	調理環境	-	1/2b	2006
23	患者	-	1/2a	2006
24	標準菌株	-	4b	不明
25	牛肉 1	国産	1/2c	2012
26	牛肉 1	国産	1/2c	2012
27	牛肉 2	国産	1/2a	2012
28	牛肉 2	国産	1/2a	2012
29	牛肉 3	国産	1/2a	2012
30	牛肉 3	国産	1/2b	2012
31	牛肉 4	国産	1/2c	2012
32	牛肉 4	国産	1/2c	2012
33	牛肉 5	国産	4b	2012
34	牛肉 5	国産	4b	2012
35	牛肉 6	国産	1/2c	2012
36	牛肉 6	国産	1/2c	2012
37	牛肉 7	国産	1/2a	2012
38	牛肉 7	国産	1/2a	2012

39	牛肉 8	国産	4b	2012
40	牛肉 8	国産	4b	2012
41	牛肉 9	国産	1/2a	2012
42	牛肉 9	国産	1/2c	2012
43	牛肉 10	国産	1/2a	2012
44	牛肉 10	国産	1/2a	2012
45	牛肉 11	国産	1/2c	2012
46	牛肉 11	国産	1/2c	2012
47	豚肉 1	国産	1/2c	2012
48	豚肉 1	国産	1/2c	2012
49	豚肉 2	国産	1/2a	2012
50	豚肉 2	国産	1/2b	2012
51	豚肉 3	国産	1/2a	2012
52	豚肉 3	国産	1/2b	2012
53	豚肉 4	国産	1/2a	2012
54	豚肉 4	国産	1/2a	2012
55	豚肉 5	国産	1/2a	2012
56	豚肉 5	国産	1/2a	2012
57	豚肉 6	国産	1/2b	2012
58	豚肉 6	国産	1/2b	2012
59	豚肉 7	国産	1/2c	2012
60	豚肉 7	国産	1/2c	2012
61	豚肉 8	国産	1/2b	2012
62	豚肉 8	国産	1/2b	2012
63	豚肉 9	国産	1/2c	2012
64	豚肉 9	国産	1/2c	2012
65	豚肉 10	国産	1/2a	2012
66	豚肉 11	国産	1/2a	2012
67	豚肉 12	国産	4d	2012
68	豚肉 13	国産	1/2a	2012
69	豚肉 14	国産	1/2c	2012

図 1 . *L. monocytogenes* の PFGE 結果 (*ApaI* 切断)

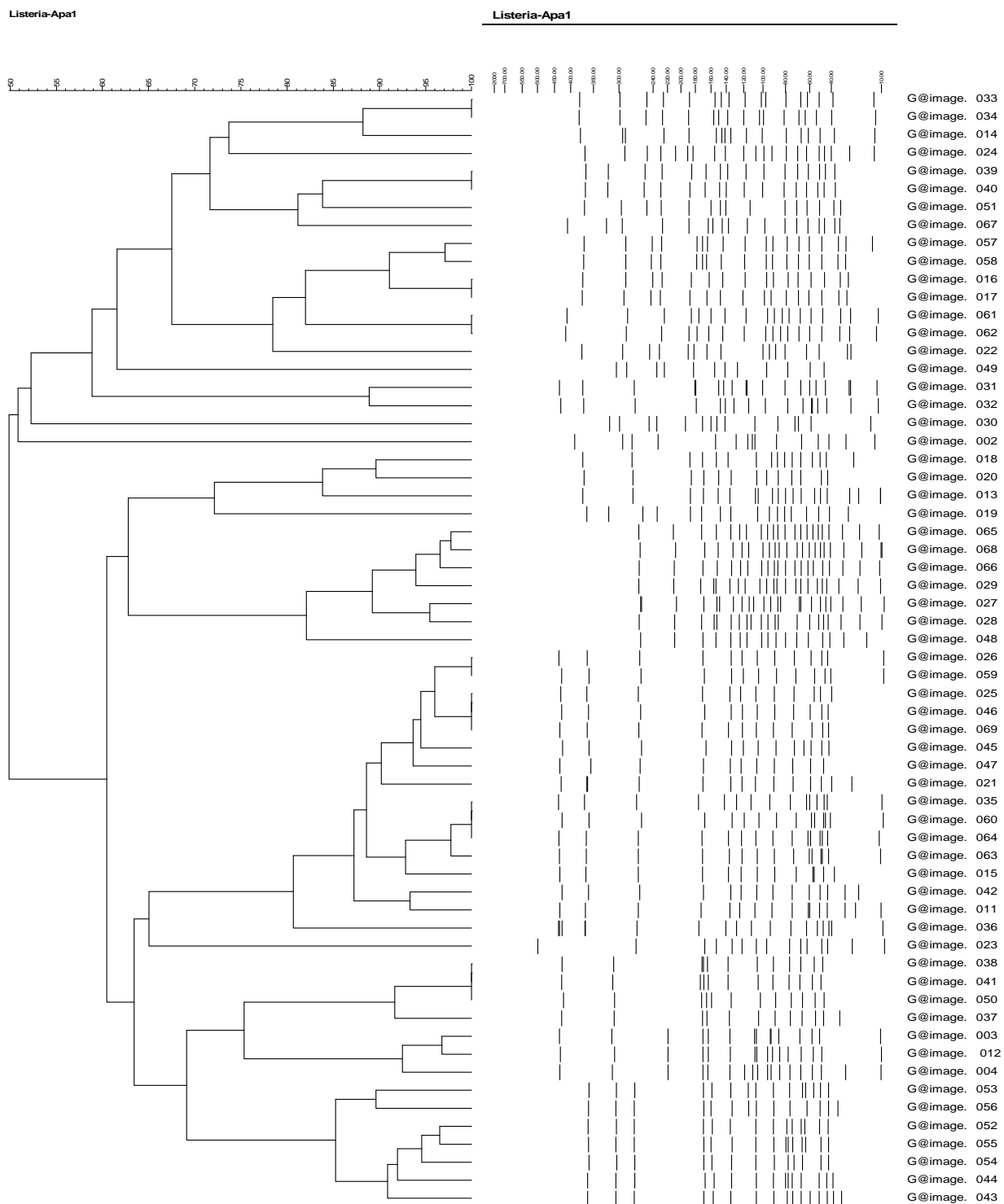


表 2 .

	国名	発生時期	原因食品	患者数	死者数	流産
1	USA	2009	米国産チーズ	18		
2	USA	2009	米国産チーズ	8		
3	オーストリア・ドイツ・チェコ	2009.6-2010.2	サワーミルクチーズ(quargel)	34	8	0
4	デンマーク	2009.5	宅配の牛肉料理	8	2	
5	USA(レイジアナ)	2010.1-6	豚のヘッドチーズ	8	2	0
6	USA(テキサス)	2010.11	セロリ	10	5	0
7	USA	2010	未定(病院食)	4	不明	
8	USA	2010	米国産チーズ	6	不明	
9	スイス	2011.4-7	イタリア産加熱ハム	6(+3 疑い例)		
10	イギリス	2011.2	病院食のサンドイッチとサラダ	3		
11	USA(28 州)	2011.7 - 10	カンタローブメロン	147	33	1
12	USA	2011	ブルーチーズ	15	不明	
13	フィンランド	2012.7	調査中	12	0	0
14	USA	2012.3-10	イタリア産チーズ	22	2	1
15	オーストラリア	2013.1	チーズ	18	2	1
16	USA(5 州)	2013.5-7	米国産チーズ	6	1	1
17	USA(2 州)	2014.2	米国産チーズ	8	1	0