

## 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

研究分担者 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

人に脳脊髄膜炎、流死産及び敗血症を引き起こすリステリア症の原因菌 *Listeria monocytogenes*（リステリア）の主要な感染経路は、本菌に汚染された食品であることが明らかとなっている。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乳製品、水産加工品、野菜等様々な食品から本菌の検出が報告されている。欧米諸国では数年に一度の頻度でリステリア症の集団感染が起こっており、その原因食品も食肉製品や乳製品のみならず、セロリ、メロン、リンゴ菓子等々である。現時点では、日本国内においてリステリア症の集団感染事例はほとんど見られていないが、散発事例の発生件数は海外と比較して極端に低いわけではない。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、国内の散発事例における原因食品の同定は大変困難である。

本研究では、平成 24 年度より海外から侵入しうる感染症の原因菌として、パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE）を用いたリステリアの分子疫学的解析を行い、国内散発例の原因食品究明に役立て得るデータベース作成を行い、国内産食品や輸入食品および患者由来株のデータを蓄積すると共に、得られた情報の解析を行った。

### A. 研究目的

重篤な食品媒介感染症であり人獣共通感染症でもあるリステリア症は、発症時の致命率が 20 - 30%にも及び、主な症状は脳脊髄膜炎、敗血症である。また、妊産婦の感染時には流死産を引き起こすことが知られている。その原因菌である *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、本菌は高度な環境抵抗性をもち、-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存能を有し、食品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。ヨーロッパ諸国では数年に一度の頻度で、北米ではほぼ毎年リステ

リア症の集団事例が見られている。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名の死亡が報告された。また、デンマークでは2013年から2014年に冷製肉を感染源とする患者数41人、死者17人に上る集団事例が発生し、2014年に米国ではもやしやリンゴ菓子製品等を原因とした集団事例が発生している。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報告されている。国内においては、リステリア症は報告義務のない疾患であり、2008 - 2011年の患者数は感染症研究所による院内感染対策サーベイランス検査部門データを用いた調査で、307例で、人口100万人当たりの推定罹患率は約1.6人であった。一方、日本国内では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。リステリア症は健康成人には主に下痢や風邪様症状を主症状とする非侵襲性となるが、高齢者、基礎疾患を持つ人、妊産婦等のハイリスクグループには流産、髄膜炎、敗血症等を引き起こす侵襲性リステリア症を引き起こす。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発事例で原因食品が特定されることはほとんどない。また、過去の調査により、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、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、国内発生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計130株を用いた*L. monocytogenes*のパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)による分子疫学的解析を実施した。

## B. 研究方法

### 1. 検体

日本国内で分離された*L. monocytogenes* 130菌株を解析に使用した。その内訳は、国内患者由来株13株、鶏肉由来株35株、豚肉由来株28株、牛肉由来株22株、水産食品由来株17株、その

他の食品由来株 13 株、環境由来株 1 株及び標準菌株 (ATCC19115 株) 1 株であった (表 1)。それらのうち、牛肉は 11 検体から、豚肉は 14 検体から各 2 株、鶏肉は 12 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 64 株、1/2b が 21 株、1/2c が 25 株、4b が 13 株、その他の血清型が 6 株、血清型不明株が 2 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の改正版にしたがって、PFGE 解析を実施した。制限酵素は *ApaI* と *AscI* を用いた。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

2014 年に発生した海外におけるリステリア症の集団事例について、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を基に、情報を収集した。

## C. 研究結果

### 1. PFGE による分子型別

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、*AscI* 切断の結果を図 2 に示した。*AscI* を用いた場合の系統樹は、*ApaI* を用いた場合と全体的には同じような結果が得られたが、*AscI* を用い

た場合の方が菌株の相同性が高くなる傾向にあることが示された。同じ食品由来の 2 株の解析結果の比較においても、*ApaI* を用いた場合の方が *AscI* を用いた場合よりも高い相同性が検出される傾向が示された (表 2)。また、同一食品由来株で異なる血清型の菌株が分離される例が 3 例あり、血清型が同一でも 2 菌株間の相同性が低い例も 6 例見られた。また、どちらの制限酵素を用いた場合でも、食品由来株は血清型によりクラスターが大別されることが示された。しかしながら、患者由来株においては、必ずしも食品由来株による血清型ごとのクラスターと一致しないことが示された (図 1 及び 2)。また、わずかではあるが食品由来株においても血清型ごとのクラスターの中に別の血清型の菌株が分類されるものがあった。今回の解析では、明太子由来株、鶏肉由来株、食肉製品由来株において患者由来株と高い相同性を示した株が見られた。これらのうち、食品由来株と患者由来株で 2 種類の PFGE パターンと血清型の全てが完全に一致しているものはなかった。また、フランス産チーズ、マグロすきみ及びいくら由来の 3 菌株が他の菌株と大きく離れたパターンを示しており、極めて独自性の高いクローンであることが明らかとなった。

### 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

2014 年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 6 例見られた。原因食品は、3 例が乳製品、1 例がデリミート、1 例が野菜、1 例が果物であった (表 3)。発生国は米国、カナダ、デンマークであった。

#### D. 考察

本研究において、国内患者由来株 13 株、食品由来株 115 株、環境由来株 1 株及び標準菌株の計 130 菌株について PFGE による解析を実施した結果、制限酵素 *ApaI* を用いた解析は分解能が高く、*AscI* を用いた解析は菌株間の類似性の検出に優れていることが明らかとなった。これは、リステリアゲノム中の *ApaI* 切断部位が *AscI* 切断部位よりも多く存在することに起因していると思われた。どちらの制限酵素を用いた解析でも、食品由来株は血清型と高い相関をもって分類されることが示された。一方、患者由来株は異なる傾向を示したため、これらの菌株について PCR 法などを加えた血清型の詳細な再検討が必要であるとともに、患者由来株について更にデータを蓄積する必要があると思われた。また、牛肉、豚肉及び鶏肉において、同一検体から分離された同一血清型の複数の菌株において、PFGE パターンが異なる例が複数見られ、一つの食品が複数のクローンに汚染されている例がしばしば存在することが示された。このことから、食中毒発生時の原因食品究明時には、疑い食品から分離された本菌の複数のクローンについて血清型別及び分子疫学解析をする必要があることが示唆された。以上の結果から、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の分子疫学的データを蓄積し、解析していくことで、散发例を含むリステリア症事例の原因食品を推定し、検疫強化や消費者への情報提供を通じて、食品媒介リステリア症の発生を低減しうる可能性が示唆された。そのためには、より多くの食品由来株や患者由来株について、多面的な分子疫学的解析を行い、国内

の多くの試験所からの情報を統合、データベース化するとともに、国際的な情報の共有が必要であると思われた。また、国際的にリステリア症の集団事例の原因物質は従来多かった動物性食品から、野菜、果物等多様な食品に広がってきており、国内への侵入経路として様々な食品を考慮に入れる必要性が高まっていると思われた。

#### E. 結論

本研究の結果、リステリアの PFGE 解析において、制限酵素 *ApaI* を用いた解析は分解能が高く、*AscI* を用いた解析は菌株間の類似性の検出に優れていることが示された。これらのデータの継続的蓄積と有効活用により、米国等で行われているのと同様に、現在原因食品が特定されていない国内のリステリア症事例の原因食品を推定することが可能になると思われる。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Yumiko Okada, Shuko Monden, Hodaka Suzuki, Akiko Nakama, Miki Ida, Shizunobu Igimi. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated from the imported and the domestic foods in Japan. Journal of Food and Nutrition Sciences, (2015) Vol. 3, p70-73.
2. Sayaka Asahata, Yuji Hirai, Yusuke Ainoda, Takahiro Fujita, Yumiko Okada, Ken Kikuchi. Fournier's



gangrene caused by *Listeria monocytogenes* as the primary organism.

Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology, (2014) In press.

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

表 1 . 使用菌株の由来と血清型

血清型	合計	鶏	豚	牛	水産物	その他	患者
1/2a	64	20	12	8	13	7	4
1/2b	21	7	7	1	1	3	1
1/2c	25	4	8	9	0	2	2
4b	13	3	0	4	2	1	3
その他	8	1	1	0	1	2	3
合計	130	35	28	22	17	15	13

表 2 . 同一食品由来の 2 菌株における PFGE パターンの相同性

由来食品	制限酵素	同一食品由来の 2 菌株間の相同性 (%)													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
牛	<i>Apal</i>	89.4	97.6	<b>50.7</b>	100	100	96.3	92.2	100	<b>59.9</b>	90.1	95.9	-	-	-
	<i>Ascl</i>	98.7	100	<b>46.8</b>	98.7	100	98.7	100	93.1	<b>54.1</b>	100	100	-	-	-
豚	<i>Apal</i>	63.9	46.8	50.7	87	87	100	93.8	100	100	97.7	-	95.9	100	90.9
	<i>Ascl</i>	64.7	50.7	46.8	88.6	88.6	100	95	96.3	99.3	89.7	-	94.8	100	100
鶏	<i>Apal</i>	100	100	91.6	100	96.8	100	95.1	94.7	<b>50.7</b>	94.7	55.4	97.3	-	-
	<i>Ascl</i>	100	100	97.3	100	100	100	100	100	<b>46.8</b>	92.3	54.1	100	-	-

太字は 2 菌株間の血清型が異なるもの

表 3 . 2014 年に発生した主なリステリア症集団事例

	国名	発生時期	原因食品	患者数	死者数	母子感染
1	USA	2014.2	チーズ	8	1	2 組
2	デンマーク	2013.9 ~ 2014.8	デリミート	41	17	
3	USA	2014.6 ~ 8	もやし	5	2	
4	USA	2013.9 ~ 2014.8	チーズ	3	1	1
5	USA・カナダ	2014.10 ~ 12	キャラメルアップル	34	6	
6	USA	2015	チーズ及びサワークリーム	3	1	

図 1 . 制限酵素 *AbaI* を用いた PFGE 解析の結果 ( 1/3 )

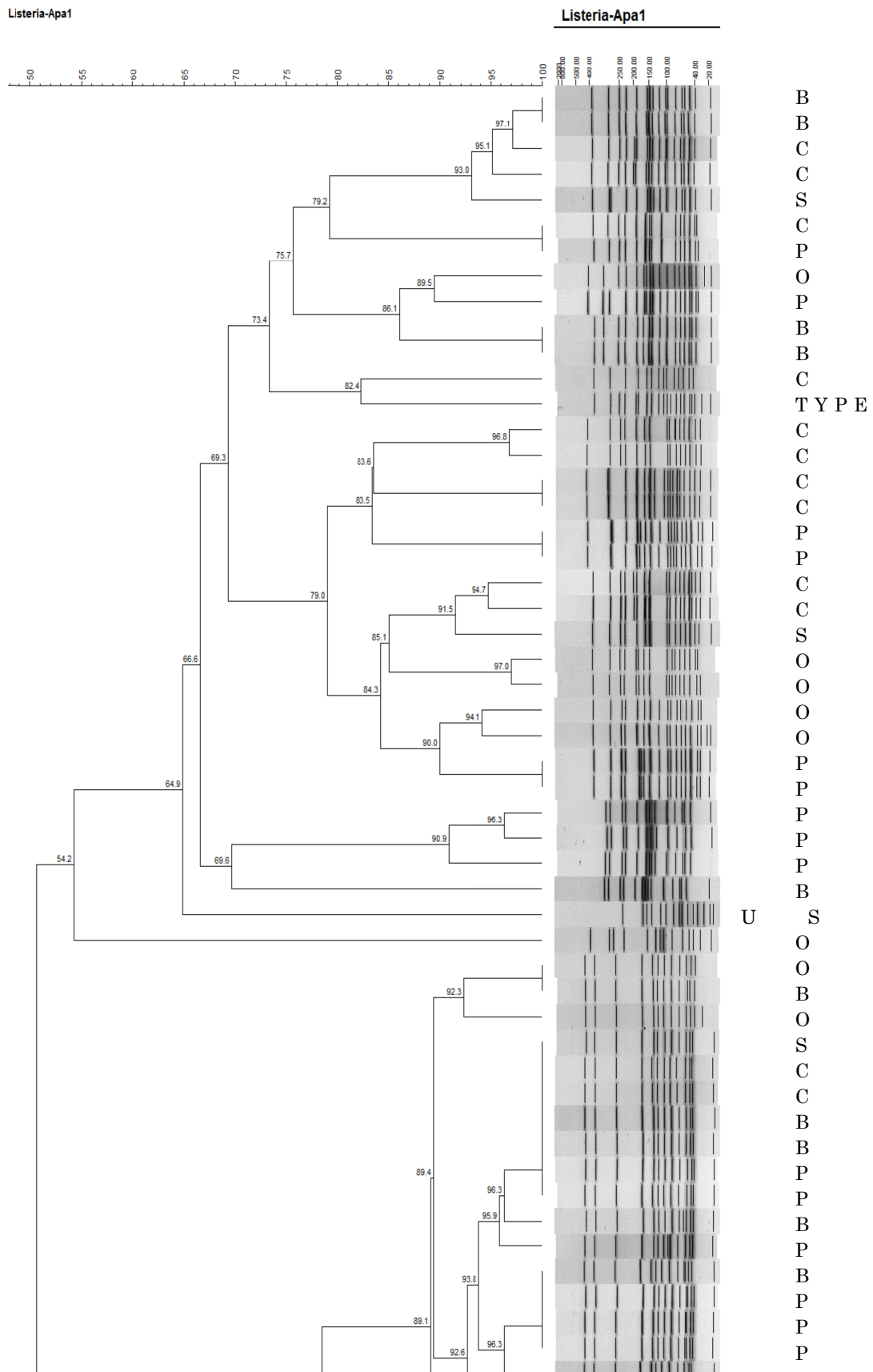


図 1 . 続き (2/3)

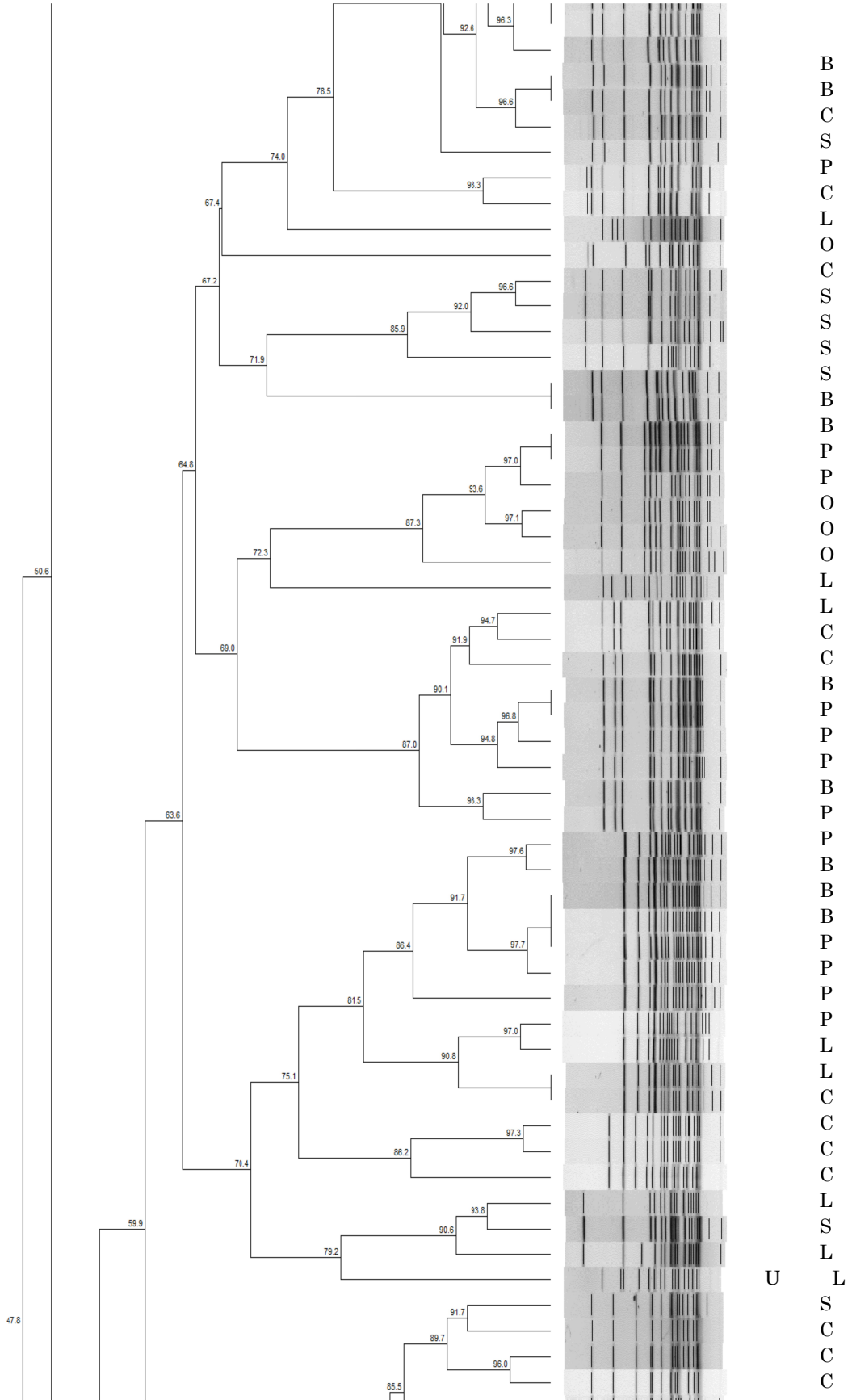
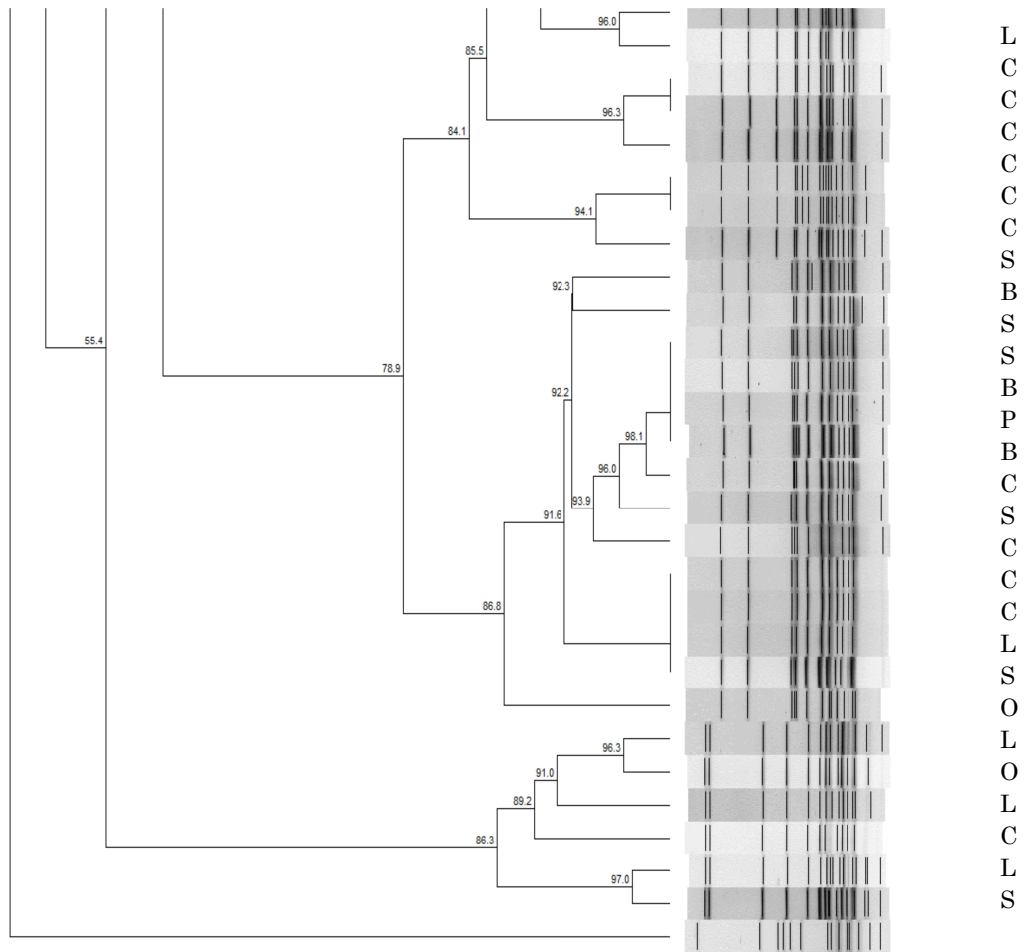


図1 . 続き (3/3)



C:鶏肉、B:牛肉、 P:豚肉、 S:水産食品、 O:その他、 L: 臨床、 TYPE:標準菌株  
 : 血清型 1/2b、 : 4b、 : 3b、 : 4d、 : 1/2a、 : 1/2c、 : 3b、 U:不明

図2 . 制限酵素 *AscI* を用いた PFGE 解析の結果  
(1/3)

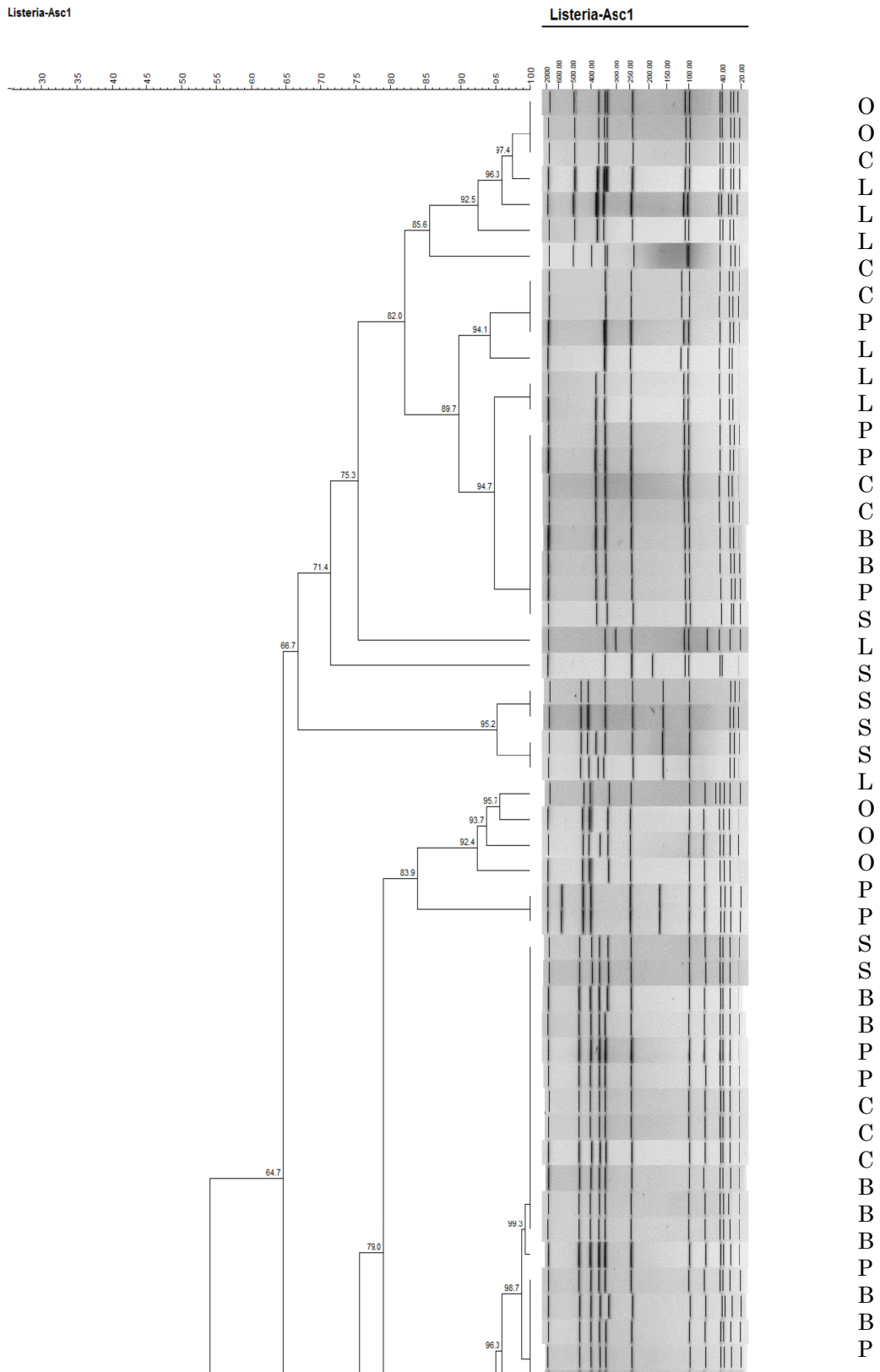


図 2 . 続き (2/3)

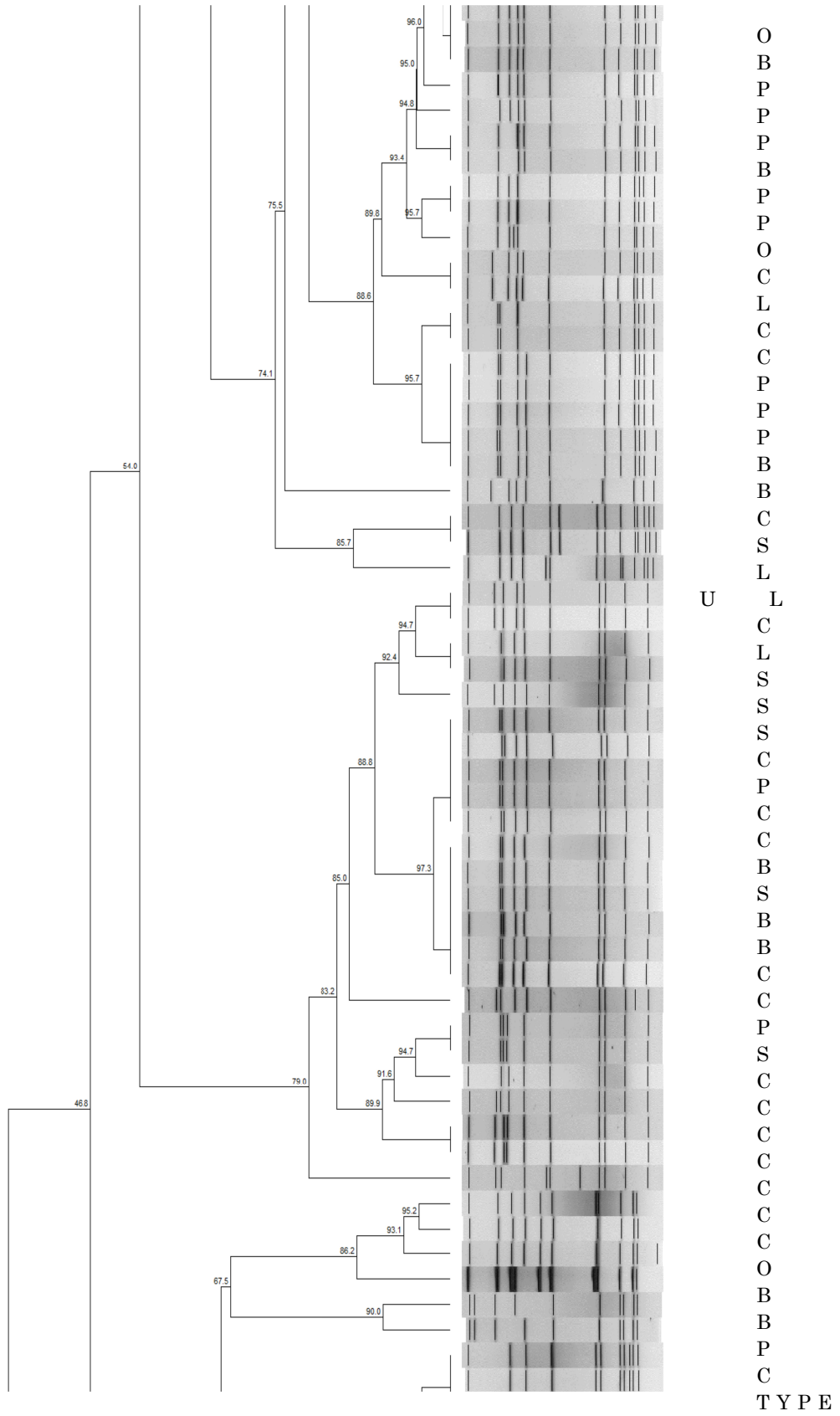


図 2 . 続き ( 3 / 3 )

