

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「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」
平成 24～26 年度総合分担研究報告書

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

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
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
門田 修子 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
鈴木 穂高 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部

研究要旨

汚染食品の摂取により人に媒介されるリステリア症は、グラム陽性の短桿菌である *Listeria monocytogenes*(リステリア)を原因とする。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、食品製造環境における汚染の排除が難しい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。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、欧州では数年に一度、北米では年に数回の頻度で発生しており、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、リンゴ菓子等が知られている。現在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、潜伏期間が1か月から最長3か月と長期にわたるため、原因食品の同定は大変困難である。

現在国内では、腸管出血性大腸菌症や赤痢等について、集団事例の同定や原因食品特定のための分子疫学的解析が実施されており、国際的にも同様の手法が米国 Center for Disease Control and Prevention(CDC) を中心に行われている。本研究では、平成 24 年度より海外から食品を通じ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、国内散发例の原因食品究明に役立て得るデータベースの作成を目的として、CDC で用いられている手法に基づくプロトコールを作成して食品及び患者由来菌株のパルスフィールドゲル電気泳動法による分子疫学的解析を実施した。その結果、得られたクラスターが血清型との相関が高いことが示された一方で、同一検体由来の複数の菌株においても識別が可能であり、株の同一性を高感度に示せることが明らかとなった。

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 工場で作ら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、その患者数は明らかでない。2004年に国立医薬品食品衛生研究所により実施されたアクティ

ブサーベイランスでは、年間約80例と推定された。また、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は、2008 - 2011年の患者数は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。一方集団事例については、日本国内ではこれまで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。健康成人では非侵襲性リステリア症にとどまることが多いが、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では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发事例で原因食品が特定されることはほとんどない。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過去の研究で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

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。また、海外における集団事例について、原因食品、患者数等の情報収集を行った。

B. 研究方法

1. 検体

初年度には、日本国内で分離された *L. monocytogenes* 64 菌株を解析に使用した。その内訳は、国内患者由来株 3 株、国内産食品由来株 42 株及び輸入食品由来株 17 株、調理環境由来株 1 株及び標準菌株(ATCC19115 株)1 株であった(平成 24 年度報告書 表 1)。次年度には、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(平成 25 年度報告書 表

1)。最終年度には、平成 25 年の CDC プロトコルの改正に伴い実施方法の改変と、総括的な結果解析のために過去 2 年に実施した株も含めて再検討を行うこととし、*L. monocytogenes* 合計 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(平成 26 年度報告書 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

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作成し、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(平成 25 年度報告書 別添 1)。この方法により、研究室保有株よりプラグを作成し、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

平成 24 年 4 月から平成 27 年 2 月までの期間での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* 合計 130 菌株について PFGE 解析を行った。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(平成 26 年度報告書 表 2)。二種類の制限酵素のどちらを用いた場合でも、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(平成 24 年度報告書 図 1、平成 25 年度報告書 図 1、平成 26 年度報告書 図 1 及び 2)。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(平成 26 年度報告書 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

2009 ~ 2015 年に諸外国で発生した主なリステリア症集団事例は 22 例であった。原因食品は乳製品が 11 例、食肉製品が 4 例、野菜が 2 例、果物類が 2 例、その他の食品が 3 例、不明が 2 例であった(表 1)。発生国は米国、カナダ、デンマーク、オーストリア、ドイツ、チェコ、スイス、イギリス、フィンランド、オーストラリアであった。

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る。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、散発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。そのためには、海外で標準的に実施されている解析方法を国内でも用いる必要があり、解析手法の改定について常時情報を収集する必要があると思われた。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。作成した系統樹から、食品由来株は血清型によりクラスターが形成される傾向が見られたが、患者由来株は必ずしも同様の結果を示さなかったため、さらなるデータの蓄積が必要と思われた。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

原著論文

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.

ISOLATED FROM IMPORTED
AND DOMESTIC FOODS IN
JAPAN FAVA2013 (2013.1)

学会発表

1. Okada Y, Monden S, Suzuki H,
Nakama A, Ida M, Yamamoto S,
Igimi S. ANTIMICROBIAL
SUSCEPTIBILITIES OF
LISTERIA MONOCYTOGENES

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1. 2009 年から 2015 年 2 月までに海外で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	流産
USA	2009	米国産チーズ	18	不明	
USA	2009	米国産チーズ	8	不明	
オーストリア・ドイツ・チェコ	2009～2010	サワーミルクチーズ (quargel)	34	8	
デンマーク	2009	宅配の牛肉料理	8	2	
USA	2010	豚のヘッドチーズ	8	2	
USA	2010	セロリ	10	5	
USA	2010	未定 (病院食)	4	不明	
USA	2010	米国産チーズ	6	不明	
スイス	2011	イタリア産加熱ハム	6 (+3 疑い例)	不明	
イギリス	2011	病院食のサンドイッチとサラダ	3	不明	
USA	2011	カンタロープメロン	147	33	
USA	2011	ブルーチーズ	15	不明	
フィンランド	2012	調査中	12	0	
USA	2012	イタリア産チーズ	22	2	1
オーストラリア	2013	チーズ	18	2	1
USA	2013	米国産チーズ	6	1	1
USA	2014	米国産チーズ	8	1	
デンマーク	2013～2014	デリミート	41	17	
USA	2014	もやし	5	2	
USA	2013～2014	チーズ	3	1	
USA・カナダ	2014	キャラメルアップル	34	6	
USA	2015	チーズ及びサワークリーム	3	1	