

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）
「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」
平成 28 年度分担研究報告書

食品媒介リステリア症のリスク制御
（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 下島優香子 東京都健康安全研究センター 微生物部
井田美樹 東京都健康安全研究センター 微生物部
西野由香里 東京都健康安全研究センター 微生物部
吉田麻利江 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
百瀬愛佳 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
渡邊真弘 一般財団法人 日本冷凍食品検査協会
泉谷秀昌 国立感染症研究所 細菌第一部

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)は、主に本菌に汚染された食品を媒介して感染することが知られている。本菌は動物の腸管内、河川水、土壌等の自然界に広く分布しており、食品原料の一次汚染が起こりやすい。また、低温や高食塩濃度等への環境抵抗性が強く、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。欧米諸国では例年、様々な食品を原因とするリステリア症の集団感染が起こっている。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、散発事例は年間約 200 例と推定されている。髄膜炎、敗血症等侵襲型リステリア症の潜伏期間は長いことが多く、数週間から最長 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となっている。

本研究では、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。本年度は、研究室保有の食品株のデータを蓄積するとともに、国内で発生した散発事例由来株の解析を行った。また、研究協力者によるデータの統合を行い、データベースの充実を図った。

A. 研究目的

食品媒介感染症の中で最も致命率が高いことが知られているリステリア症は、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。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。米国での近年の主な集団事例には、2011年のカンタロープメロンを原因食品とした事例(患者数147、死者33名)、2010年から2015年にかけて発生したチーズを原因とする事例(患者数30名、死者3名)、2010年から2015年にかけて発生したアイスクリームを原因とする事例(患者数10名、死者3名)、2014年から2015年にかけてカナダも含め発生したキャラメル掛けりんご(患者数36、死者7名)、2015年から2016年にかけて発生したパック詰めサラダを原因とする事例(患者数19、死者数1名)及び2013

年から2016年にかけて発生した冷凍野菜を原因とする事例(患者数9、死者数3名)等がある。欧州では、デンマークで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、イタリアでは2015年から2016年にかけて、原因食品が同定されていない同一株による集団事例が発生している。また、2015年のリステリア症確定患者数はドイツが580例、フランスが410例、イギリスが186例、スペインが206例、イタリアが153例等となっている。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。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 373 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。

A. 研究方法

1. 検体

日本国内で分離された *L. monocytogenes* 患者由来株 108 株、リステリア症感染牛由来株 2 株、牛腸内容物由来株 1 株、食品由来株 260 株、環境由来株 1 株及び標準菌株 1 株を用いた。血清型の内訳は、1/2a が 149 株、1/2b が 60 株、1/2c が 35 株、4b グループ (4ab、4b、4d 及び 4e) が 113 株、その他の血清型が 17 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、optimization は 0%、tolerance は 1.5 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

2016 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、米国 CDC、ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases、Eurosurveillance 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 PFGE 解析の結果を図 1 に示した。75% 以上の相同性を示す菌株を同一クラスターとした結果、全菌株は 27 クラスターに分類された。各クラスターは血清型との強い相関を示した。血清型 1/2b グループ (1/2b 及び 3b) に属する菌株は食品由来株 49 株、環境由来株 1 株及び患者由来株 14 株が含まれており、3 クラスターに属していた。本グループの患者由来株の内 12 株は、同一クラスターに分類された。また、牛肉由来株 21 株の中で、本グループに属する株は 1 株のみであった。血清型 4b グループ (4ab、

4b、4d 及び 4e) に属する菌株は食品由来株 45 株、患者由来株 63 株及び感染牛由来株 2 株及び牛腸内容物由来株 1 株が含まれており、5 クラスタに分類された。5 クラスタ中 2 クラスタはそれぞれ 1 株が属しており、複数の菌株からなるその他の 3 クラスタ (第 23、24 及び 25 クラスタ) には、患者由来株が偏りなく分布していた。また、全患者株の 62% (67 株) がこれら 3 クラスタに属していた。本グループに属する牛肉由来株は 7 株のみであったが、その内 5 株が第 24 クラスタに属していた。血清型 1/2a グループ (1/2a、1/2c 及び 3a) に属する菌株は食品由来株 166 株及び患者由来株 25 株が含まれ、19 クラスタに広く分布しており、分子疫学的に多様性が高いことが示された。一方、同グループ内の血清型 1/2c に属する 35 菌株は単一クラスタに分類された。また、本グループの患者由来株 25 株中 13 株は単一クラスタ (第 16 クラスタ) に属していた。本クラスタは、鶏肉及び水産食品との相関は高かった。

食品由来株で患者由来株と 100% の相関性を示したものは、明太子由来株、豚肉・鶏肉及びマグロ由来株、牛肉由来株 (3 株)、豚肉由来株、エシャロット由来株、ソーセージ由来株、松前漬由来株であった (表 2)。

患者株間で同一血清型に属し、PFGE 解析で 100% の相関性を示したものは 5 組存在した (表 3)。

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

2016 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 5 例の報告が見られた。原因食品は、3 例が野菜、2 例が不明であった (表 4)。発生国は米国、カナダ、ドイツ、イタリアであった。

D. 考察

本研究において、研究協力者の東京都健康安全研究センターとデータの統合を行い、患者由来株 108 株、リステリア症感染牛由来株 2 株、牛腸内容物由来株 1 株、食品由来株 260 株、環境由来株 1 株及び標準菌株 1 株について PFGE による解析を実施した結果、いくつかの食品由来株は特定のクラスタに高い相関をもって分類されることが示された。患者由来株と 100% の相関性を持つ食品由来株が 14 株検出されたが、分離年又は血清型の違いから、直ちにそれらの事例の原因食品とすることはできなかった。これらのデータの有効な活用には、更に菌株数を蓄積する必要があると思われた。一方、患者株間で 100% の相関性を示す株は 5 組見られ、同一或いは比較的近い分離年の株が含まれていたことから、未知の小規模な集団事例の可能性も考えられた。その同定には、さらに詳細な菌株間の解析が必要となり、今後の検討課題となった。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、国内のより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。海外事例からは、近年のリストeria症の集団事例の原因食品が従来多かった動物性食品から、野菜、果物等多様な食品に拡がりを見せており、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同時に、国内汚染実態についても、様々な食品について調査を行う必要があると思われた。

E. 結論

本研究の結果、リストeriaの PFGE 解析において、現時点で直接的な散発事例の原因食品同定には至らなかったものの、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トeria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。また、過去の散発事例の中で同一菌株による可能性が高いものが見られたため、今後の解析により未発見の小規模な集団事例の解明に繋がり得ると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 . PFGE 解析結果

	血清型	合計 菌株数	牛肉	豚肉	鶏肉	食肉製 品	水産 加工品	乳 製品	野菜類	複合食品	牛 関連	患者	その他
Cluster 1	1/2a	30	2	5	2	15		1		4		1	
Cluster 2	1/2a, 1/2c, 3c	43	7	7	3	13	7	1		1		4	
Cluster 3	1/2a	13				7	2		1			3	
Cluster 4	1/2a	1							1				
Cluster 5	1/2a	7				7							
Cluster 6	1/2a, 3a	3				2	1						
Cluster 7	1/2a	3			1	2							
Cluster 8	1/2a	1							1				
Cluster 9	1/2a	18	2	4	3	5	3					1	
Cluster 10	1/2a	3					2		1				
Cluster 11	1/2a, 3a	7			2	2		3					
Cluster 12	1/2a, 3a	7					1	1	2			3	
Cluster 13	1/2a	3				2			1				
Cluster 14	1/2a	1					1						
Cluster 15	1/2a	1								1			
Cluster 16	1/2a, 3a	47	2	1	14	4	13					13	
Cluster 17	1/2a	1				1							
Cluster 18	1/2a	1						1					
Cluster 19	1/2a	1					1						
Cluster 20	1/2b, 3b, UT	50		5	5	8	8	4	3	3		12	2
Cluster 21	1/2b, 3b	4					3			1			
Cluster 22	1/2b	11	1	2		4	1					3	
Cluster 23	4b, 4d	18	1		2		1	2	1	3		8	
Cluster 24	4ab, 4b, 4d, 4e, UT	58	5	3		7			3	1	3	36	
Cluster 25	4ab, 4b, 4d, UT	39	1	4	1	8	1					23	1
Cluster 26	4b	1					1						
Cluster 27	4b	1										1	
		合計	21	31	33	87	46	13	14	14	3	108	3

表 2 . 患者株と 100%の相同性を示した食品由来株

	由来食品	血清型	分離年	相同パターンの患者由来株の分離年	
1	明太子	1/2a	2009	2006	
2	豚肉	1/2a	2012	2002	
3	鶏肉 1	1/2a	2012	同上	
4	鶏肉 2	1/2a	2012	同上	
5	鶏肉 3	1/2a	2012	同上	
6	マグロすきみ 1	1/2a	2009	同上	
7	マグロすきみ 2	1/2a	2009	同上	
8	マグロ刺身	1/2a	2009	同上	
9	ソーセージ	1/2a	2013	2011	
10	松前漬け	4b	2002	1987	
11	牛肉	4d	1991	1988	1991(血清型は 4 b)
12	エシャロット	4b	2004	2002	
13	牛肉	4b	1991	不明	
14	豚肉	4b	1991	1988(2 株)	

表 3 . 患者株間で 100%の相同性を示したもの

	血清型	分離年
1	1/2b	1998 及び 1992
2	4b	1988 及び 1991
3	4b	1989、1992 及び 1995
4	4b	1988
5	4b	1988

表 4 . 2016 年に発生した主なリステリア症集団事例

	発生国	時期	原因食品	患者数	死者数	備考
1	米国	2015.7 ~ 2016.1	包装済みサラダ	19	1	周産期 1 名
2	カナダ	2015.5 ~ 2016.2	包装済みサラダ	14	3(リステリア症によるかは不明)	1 と同一食品
3	米国	2013.9 ~ 2016.7	冷凍野菜	9	1	
4	ドイツ	2012.11 ~ 2016	不明	66	3	周産期 4 名
5	イタリア	2015.1 ~ 2016	不明	11	1	