

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 27～29 年度総合分担研究報告書

***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はグラム陽性芽胞非形成桿菌の *Listeria monocytogenes*（リステリア）を原因菌としており、人へは汚染食品を媒介して感染することが知られている。本菌は自然界に広く分布しており、食品原料からもしばしば分離される。また、冷蔵庫内でも増殖が可能であり、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検出されている。欧米諸国では例年、ソフトチーズ、食肉製品及び野菜果物等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おり、日本国内においても年間約 200 例の散発事例が起きていると推定されている。髄膜炎、敗血症等侵襲型リステリア症の潜伏期間は数週間から最長 3 か月にも及ぶため、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。また、リステリア症に限らず、発生時期や発生場所がまとまっていない **Diffuse Outbreak**（散在的集団事例）の発見には、患者由来菌株の分子疫学的解析が必須である。

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、検疫所から分与された輸入食品由来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 PFGE 解析を行い、データベースの充実を図ると共に、これまでの国内事例間の関連性、原因食品推定等の解析を行った。その結果、菌株間で極めて高い相同性を示す株が得られ、リステリア症の原因食品が推定される例も見いだされた。

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

A. 研究目的

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、冷蔵庫内など自然界や人の生活圏の様々な環境に広く存在している。本菌は高度な環境抵抗性をもち、 -1°C 程度の低温下での増殖能、20%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。本菌を原因菌とするリステリア症は、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おり、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を示すが、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、敗血症等を示す侵襲性リステリア症を引き起こす。非侵襲性リステリア症の潜伏期間は数日間であるが、侵襲性の場合には数週間、長い場合には3ヶ月にも達することから、患者の喫食歴調査や冷蔵庫残品の検査が困難であるため、侵襲性リステリア症の散发事例での原因食品の特定も困難となっている。一方、集団事例については、欧米ではほぼ毎年発生しており、そのいくつかは輸入食品に関連している。米国での近年の主な集団事例には、2014年から2015年にかけて発生したキャラメル掛けりんごを原因食品とする事例が、2015年から2016年にかけてパック詰めサラダを原因とする事例が発生したが、これらはカナダでも同じ食品による患者の発生が見られた。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)では、日本国内においても輸入された関連製品の回収とモニタリング検査の実施が行われた(生食監発0530第2号)。欧州では、イタ

リアで2015年から2016年にかけて、原因食品が同定されていないものの同一株による集団事例が発生している。また、ドイツでも2012年から2016年にかけて、同一工場の複数製品が原因の疑いが濃厚でありながら、確定に至っていない大規模事例(患者66、死者3名)が発生した。更に、2016年から2017年にかけてはポーランドで生産されたスモークサーモンを原因としてデンマークとフランスで患者7名、死者1名の集団事例が、2015年から2017年にかけてEU内の5か国で同一株に由来する26名の患者(内4名死亡)の事例が発生しており、原因食品の究明が急がれている。また、オーストラリアでは2018年1月からメロンによる集団事例(患者20名、死者7名)が、南アフリカ共和国では2017年1月から現在まで、食肉加工品を原因とする患者数が1000人近くの過去最大規模の集団事例が発生している。これらの株の同一性の評価には全て、分子疫学的解析が用いられている。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、年間約200例と推定されている。現在までに日本国内では集団事例はほとんど確認されておらず、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が、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おり、高齢化や潜在的糖尿病患者数の増加により、リステリア症のハイリスク群該当者が増えるため、国内患者数が増加していくことが懸念される。また、Codexによる食品中の

リステリアの国際規格設定を受けて、日本国内でも平成 26 年に非加熱食肉製品及びナチュラルチーズ（ソフト及びセミハードに限る）中のリステリア菌数を 100 colony forming unit (CFU)/g 以下とする微生物規格が設定された。同時に、平成 5 年から用いられていた食品中のリステリア試験法が改正され、国際標準化機構（International Organization for Standardization; ISO）の試験法に準拠した方法となり、1 ロットにつき 5 検体を検査して全数の合格が要求されるサンプリングプランも設定された。

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等を用いた *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* 432 株について解析を実施し、同一食品及び患者由来で血清型及び PFGE 型が完全に一致していた株については最終的な解析からは除外したため、患者由来株 111 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 257 株、環境由来株 1 株及び標準菌株 1 株を対象とした（平成 29 年度報告書 表 1）。血清型の

内訳は、1/2a グループ（1/2a、1/2c、3a 及び 3c）が 195 株、1/2b グループ（1/2b 及び 3b）が 57 株、4b グループ（4ab、4b、4d 及び 4e）が 121 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 1.2 に設定した。得られた相同性が 75%以上のものを同一クラスターとして分類し、相同性が 95%以上の株については、個々に泳動パターンを目視して同一性の確認を行った。

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

諸外国において、2015 年から 2017 年に発生した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. 研究結果および考察

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 解析の結果を平成 29 年度報告書 表 2 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 39 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 1/2a グループ (1/2a、1/2c、3a 及び 3c) に属する 195 菌株は 26 クラスターに分類され、その内 10 クラスターは 1 菌株のみで構成されていた。本血清型 1/2a に属する菌株は 25 クラスターに分かれており、分子疫学的に多様性が高いことが示された。一方、同血清型の患者株 24 株のうち 12 株は同一クラスターに属していた。血清型 1/2c に属する 34 菌株は、1 菌株を除いて同一クラスターに分類されていた。血清型 3a に属する 6 菌株のうち 3 菌株は同一クラスターに属していた。血清型 1/2b グループ (1/2b 及び 3b) に属する 57 菌株は 5 つのクラスターに分かれており、その内 2 つのクラスターに 50 菌株が分類された。4b グループ (4ab、4b、4d 及び 4e) に属する 121 株は 8 つのクラスターに分類され、その内 3 クラスターは 1 菌株のみで構成されていた。本グループに属する患者由来株 70 菌株は 7 クラスターに分かれたが、そのうちの 3 つのクラスターにそれぞれ 8 菌株、20 菌株及び 35 菌株が属していた。1/2b グループと 4b グループの患者由来株の多くは、食品由来株も多く属する大きいクラスターに属していたが、血清型 1/2a グループの患者由来株の多くは特定のクラスターに分類されていた。本クラスターは、鶏肉及び水産食品との相関が高かった。

菌株間で PFGE 解析の結果が 100% の相同性を示したものの、及び 95% 以上の相同性を示し、個別の確認で同一であることが確認されたものは、31 組見られた (平成 29 年度報告書 表 3)。患者株間で、分離年 (1

年以内) と分離場所が近い (同一県又は隣県) ものは 4 群、19 群、20 群、26 群、27 群及び 30 群の 6 群 (平成 29 年度報告書 表 4; 青色部分) であり、これらは集団事例の可能性が高いと思われた。また、食品由来株と患者株で分離年の近いものは 7 群、8 群、9 群、14 群、15 群、26 群及び 27 群の 7 群 (平成 29 年度報告書 表 4; 茶色部分) であった。なかでも 14 群の患者 2 は聞き取り調査により複数種類の非加熱食肉製品の喫食歴が明らかになっており、同年の非加熱食肉製品由来菌株と同一であったことから、原因食品として有力であると推察された。一方、同群の患者 1 については喫食歴の情報に非加熱食肉製品は見られなかった。同様に、15 群の患者についても、喫食歴の情報に非加熱食肉製品は見られなかった。

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

2015 年から 2017 年度に諸外国で発生した主なリステリア症集団事例は 10 例の報告が見られた (表 1)。原因食品は、乳製品が 2 例、野菜果物が 3 例、食肉製品が 1 例、水産食品が 1 例であり、2 例が不明であった。集団事例の発生国は米国が 4 例 (内 1 例はカナダでも発生)、オーストラリア、南アフリカ共和国で各 1 件、ドイツとイタリアで各 1 例、EU 圏内の複数の国で 2 例あった。

D. 考察

本研究において、患者由来株 111 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 257 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。患者由来株と分離年が近い食品由来株 6 株のうち、食肉製品由来株が 3 株であり、食肉製品がいくつかの国内散発事例の原因食品となっている可能性が示唆された。また、PFGE 解析において同一とされた菌株群については、より高い精度で相同性を解析するため、ここ数年欧米でリステリア集団事例菌株の解析に多く用いられている全ゲノム塩基配列解析を行う必要があると思われた。更に、平成 29 年度の研究で患者の喫食歴と食品由来株の型別が一致したものが見られ、散発事例の原因の推定が可能となった。原因食品の同定には患者の喫食歴の情報が不可欠であり、今後の国内事例発生時に、保健所等によりできる限り迅速に聞き取り調査を行うためのフォーマット等の整備や、より多くの地方衛生研究所等との情報共有やデータベースの拡充が必要であると思われた。

諸外国でのリステリア症発生状況は、概ね例年と同様の発生頻度である一方で、南アフリカ共和国では 650 名を超える患者数、180 名の死者数となる大規模事例が発生した。EU 諸国では、分子疫学解析によって、過去 2 年間に各国で同じ菌株による患者が出現していることが明らかとなっている（表 1）。また、EU 内での輸入食品により、複数の国での事例が発生していることも明らかとなった。EU 内での非加熱喫食食品の検査では Codex のリステリア規格に違反する食品がほとんど検出されないにもかかわらず、リステリア症発生率が減少していないことが明らかとなっており、より高感度な試験法や、迅速な分子疫学解析と結果の共有が望まれている。本研究の結果から、分子疫学的解析を行うことで、国内の様々

な由来のリステリア菌株のデータが蓄積され、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。今後の課題として、継続的な調査の必要性と共に、国内のより多くの試験所からの情報を統合し、国内全体からの情報のデータベース化が必要と思われる。また、リステリアの分子疫学解析の国際的な進展に対応して、より深度の高い情報の集積全ゲノム塩基配列解析への移行を行い、海外発生事例と比較検討のため国際的な情報の共有が必要であると思われた。

E. 結論

本研究の結果、リステリアの血清型別及び PFGE 解析により、これまで散発事例と思われた事例間で高い相関が見られ、集団事例の可能性のある例や、散発事例の原因食品として可能性の高い例が見出された。今後、新しい患者由来株や食品分離株の解析を継続し、データの蓄積と有効活用を行うことで、米国等で行われているのと同様に、集団事例の早期発見や、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た。

F. 研究発表

学会発表

- 1 Y Shimojima, M Ida, A Nakama, Y Nishino, R Fukui, S Kuroda, M Yoshida, A Hirai, K Sadamasu and Y Okada. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Listeria*

monocytogenes isolated in Japan.
19th International Symposium on
Problems of Listeriosis (Paris),
2016.6

- 2 岡田由美子、下島優香子、吉田麻利江、
井田美樹、百瀬愛佳、平井昭彦、泉谷
秀昌. 日本国内で分離された *Listeria*
monocytogenes の分子疫学的解析. 第
90回日本細菌学会 (仙台)、2017.3

G. 知的所有権取得状況

なし

表 1. 2015-2017 年度に海外で発生した主なリステリア集団事例

| 発生国 | 発生時期 | 原因食品 | 患者数 | 死者数 |
|--|--------------------|-------------------------|-----|--------|
| 米国 | 2015.8-9 | ソフトチーズ | 24 | 1 |
| 米国、カナダ | 2015.5~2016.2 | 包装済みサラダ (アメリカ産) | 33 | 1 (+3) |
| 米国 | 2013.9~2016.7 | 冷凍野菜 | 9 | 1 |
| ドイツ | 2012.11~2016 | 1工場の複数製品 (食肉製品等) の疑い | 66 | 3 |
| イタリア | 2015.1~2016 | 不明 | 11 | 1 |
| 米国 | 2016.9~2017.3 | ソフトチーズ | 8 | 2 |
| オーストラリア | 2018.2 時点 | メロン | 10 | 2 |
| 南アフリカ共和国 | 2017.1~2018.3 上旬時点 | 食肉製品 | 659 | 180 |
| デンマーク、フランス | 2016~2017 | ポーランド産 スモークサーモン | 7 | 1 |
| EU (オーストリア、デンマーク、 フィンランド、スウェーデン、英国) | 2015~2017.12 時点 | 不明 | 26 | 4 |