

厚生労働科学研究費補助金(食の安全確保推進研究事業)
総括研究報告書

水産物におけるリステリアのリスク評価及び防除に関する研究

研究代表者 中村 綾花 東京海洋大学食品生産科学部門 助教

研究要旨：令和5年度では、日本国内に流通する Ready-to-eat (RTE)の水産加工食品について、*Listeria monocytogenes* の汚染実態を調査した。その結果、たらこ、明太子、いくら及びすじこ、まぐろのたたき、スモークサーモンにおける陽性率はそれぞれ、3.0, 4.0, 9.0, 22.0 および 2.0%であった。令和6年度では、水産加工食品から分離された40株の *L. monocytogenes* について次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行い、得られたドラフトゲノムデータをもとに cgMLST 解析によるタイピングや病原性遺伝子の保有状況を調べた。その結果、同じ遺伝型の *L. monocytogenes* が同一会社の複数商品から分離されており、サンプリング期間も離れていたことから、*L. monocytogenes* が食品製造現場に長期間生残し、製品への汚染を繰り返している可能性が示唆された。また、病原性遺伝子の保有状況も明らかとなり、令和7年度は、細胞培養系を用いた病原性の評価を行う予定である。

研究分担者

高橋 肇 教授

A. 研究目的

令和5年度では、500検体の水産加工食品を対象にリステリア菌の分布調査を行った。その結果、40検体からリステリア菌が分離され、RTE水産加工食品はある一定数リステリア菌に汚染されていることが明らかになった。近年、菌株の識別法は core genome Multi-Locus Sequence Typing (cgMLST)解析などの全ゲノム解析を用いた手法に移行しつつあり、国際的にデータベースが日々更新されている。海外の報告では、食品由来株は特有の遺伝型に属する傾向にあり、その病原性は低いとされているが、日本国内に分布するリステリア菌の基本的知見は乏しい。実際に、日本国内においてリステリア菌の cgMLST 解析を行った事例はほとんどなく、従来法である PFGE(pulsed-field gel electrophoresis)法にとどまっている。cgMLST 解析は、数千 loci の塩基配列の差異に基づいて割り振られるアレル番号のパターンを数字で表しているため、解像度が高く、研究室間での菌株の比較が容易である。このことから、アウトブレイク株を含めた世界中の分離株のデータベースが構築されており、株識別をする上で豊富なリソース

となっている。本研究で得られた水産分離株について cgMLST 解析を行うことで、日本国内に分布するリステリア菌の国際的な立ち位置を把握することが可能となる。令和6年度では、RTE水産加工食品から分離されたリステリア菌について、次世代シーケンサーを用いてゲノム解析を行うこととした。

B. 研究方法

1. 全ゲノム解析

第2章の性状試験の結果、*L. monocytogenes* であると同定された水産加工品由来株計40株について全ゲノム解析を実施した。マイクロバンクを使用して-80°Cで保存していた各菌株をパールコア®ブレインハートインフュージョン寒天培地 (Eiken Chemical Co., Ltd.) に画線し37°Cで一晩培養した。培地上に形成したコロニーを釣菌し、BHI液体培地 (Eiken Chemical Co., Ltd.) 7 mLに懸濁し、37°Cで一晩培養することで得られた培養液500 µLを5000×g、10分間の条件で遠心分離をすることで集菌ペレットを得た。集菌ペレットは、Genomic Micro AX Bacteria+ Gravity (A&A Biotechnology, Gdansk, Poland) を用いてDNA抽出を行い、Novogene Co., Ltd (Beijing, China) にNGS解析を外注した。ゲノムライブラリーはペア

エンド 150 bp シーケンスによってシーケンスされた。ドラフトゲノムアセンブリは SPAdes (Prjibelski et al., 2020) によって行った。

2. ゲノムデータの解析

全ゲノム解析によって得られたゲノムデータは BIGSdb-Lm (<https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/>) に登録し、株識別および解析を行った。2024 年 11 月 30 日時点で BIGSdb-Lm に登録された分離株のうち、本研究で得られた分離株と同一の Clonal Complex に属する食品分離株および臨床分離株を検索した。これらの分離株と本研究で得られた分離株の cgMLST scheme に基づいた Minimum spanning tree と、本研究で得られた分離株の cgMLST scheme に基づいた Minimum spanning tree を GrapeTree (Zhou et al., 2018) を用いてそれぞれ図示した。遺伝子の保有状況は BIGSdb-Pasteur (<https://bigsdb.pasteur.fr/>) の Gene Presence を使用して確認した。cgMLST scheme に基づいた系統樹および病原性遺伝子および耐性遺伝子の保有状況のヒートマップは Interactive Tree Of Life (iTOL) v7 (<https://itol.embl.de/>) を用いて作成した。inlA におけるナンセンス変異は、BIGSdb-Pasteur を用いて各菌株の inlA 配列を抽出し、GENETYX® Ver.14 (Nihon Server Corporation, Tokyo, Japan) を用いてナンセンス変異の有無を確認した。BIGSdb-Pasteur によって inlA 配列を抽出できなかった菌株については、GENETYX® Ver.14 (Nihon Server Corporation, Tokyo, Japan) を用いて、*L. monocytogenes* EGD-e 株の inlA 配列とのホモロジー検索を行い、相同性が 99%であった配列を使用した。

C. 結果及び考察

1. 水産分離株のタイピング

RTE 水産加工食品から分離された 40 株は 14 種類の Clonal Complex (CC)、と 15 種類の Sequence Type (ST) に分類された。2024 年 11 月 30 日時点で BIGSdb-Lm に登録された分離株のうち、本研究で得られた分離株と同一の CC に属する食品分離株および臨床分離株は 1691 株であった。これらの分離株を含めた

Minimum spanning tree を作成したところ、本研究で分離された水産分離株は世界各地で分離された菌株と同一のノードに位置していた。このことから、日本国内に分布する菌株は世界各地で分離された菌株と近縁であることが示された。また、同一の CC であった一部の菌株では、cgMLST Type (CT) も一致していた。CC1 のマグロのたたき由来株 2 株は CT15309、CC3 のマグロのたたき由来株 2 株は CT15326 であり、それぞれ同一の製造所で製造された検体から分離された菌株であった。また、CC101 に属する菌株のうち、ST101 のスジコ由来株 2 株は CT15438、ST3237 のマグロのたたき由来株 2 株は CT15439 であり、CT が一致していた。いずれも検体の製造所は異なったものの、グループ会社が製造した製品であった。CT が一致した菌株の分離源となった検体の一部は、製造所または購入場所が一致していたことから、製造工程中での汚染や、製造所から出荷された後、小売店の調理場などで汚染された可能性が推測された。特に、CT15326 の 2 株については、購入日が約 3 か月離れていたことから、製造所での長期的な汚染が発生している可能性が考えられた。

2. 水産分離株の遺伝子の保有状況

塩化ベンザルコニウム耐性に関わる遺伝子である、*bcrABC*、*qacA*、*qacC*、Tn6188_*qac* (*emrC*) については、40 株のうち CC1 の 1 株と CC7 の 2 株の計 3 株が *bcrABC* を保有していた。CC5 の 1 株は *bcrA*、CC121 の 1 株は *emrC* を保有しており、*qacA* と *qacC* を保有する株はなかった。複数の食品品目を対象とした *bcrABC* の保有状況の調査では、CC や分離源の食品品目によって *bcrABC* の保有率にばらつきがあり、本研究で分離された菌株の多くが属する CC5 と CC155 の *bcrABC* 保有率は乳製品や食肉製品では高いことが報告されている。CC3、5、315、155、7、8、9 の複数の CC に属する菌株が SSI-1 を保有していた一方で、SSI-2 を保有していたのは CC121 と CC193 の菌株のみであった。本研究で確認された SSI-1 と SSI-2 の保有状況は、SSI-1 は多様な ST の菌株で見られ、SSI-2 は CC121 で頻繁に見られるという過去

の報告と一致していた。*bcrABC* や *emrE* を保有する菌株は食品製造環境中での生存に有利であることが、長期的な食品加工現場における分布調査で明らかになっている。また、養鶏所と水産加工施設における持続性株が *bcrABC* と SSI-1 を保有していたことが報告されている。以上のように、これらの耐性遺伝子は食品製造環境中における長期的な汚染に影響する可能性があることから、今後も継続して耐性遺伝子保有状況のモニタリングを行う必要性が示された。

Moura らの報告に基づいて、獲得性耐性遺伝子と内在性耐性遺伝子の有無について示した。その結果、薬剤耐性に関連する遺伝子の保有状況は 40 株すべてで共通しており、獲得性耐性遺伝子である *aacA4*、*aphA*、*dfiD*、*lnuG*、*mphB*、*ermB*、*fexA*、*tetM* を保有する株はなかった。一方で、40 株すべてが内在性耐性遺伝子である *fosX*、*lin*、*norB*、*sul*、*mprF*、*mdrL*、*lde* を保有していた。酸ストレス耐性および耐塩性に関わる Stress survival islet (SSI-1) をコードする 5 つの遺伝子を保有していたのは、CC5、3、315、155、8、9、7 に属する 23 株であり、CC183、1、2、121 の 8 株は SSI-1 をコードする遺伝子の一部を保有していた。アルカリストレスおよび酸化ストレス耐性に関わる SSI-2 をコードする *lim0464-0465* を保有した分離株は、CC121 と CC193 に属する 4 株であった。なお、いずれの株も、塩化ベンザルコニウムおよび乾燥ストレスに対する耐性に関与する *Listeria* Genomic island (LGI-1) を保有していなかった。

病原性遺伝子の保有状況については、40 株すべてが *Listeria* pathogenicity island 1 (LIPI-1) (*prfA*、*plcA*、*hly*、*mpl*、*actA*、*plcB*) および *inlA*、*inlB* を保有していた。CC3、CC183、CC1 に属する 8 株は LIPI-3 (*llsA*、*llsB*、*llsD*、*llsG*、*llsH*、*llsP*、*llsX*、*llsY*) を保有しており、CC183 と CC315 は LIPI-4 (LM9005581_70012、LM9005581_70013、*licC*、*licB*、*licA*) を保有していた。*inlA* 配列における未熟終始コドン (Premature stop codon (PMSC)) の有無を確認したところ、4 株で PMSC が確認された。CC193 の 3 株では、12 番目にアデニンが挿入されたことによるフレームシフトが起こり、CC121 の 1 株では、1474 番目の塩基がシト

シンからチミンに置換されたことで、*inlA* 配列中に PMSC が出現した。*inlA* 遺伝子における PMSC の存在は *L. monocytogenes* の弱毒化に関係することが知られている。本研究では、40 株中 4 株 (10%) で PMSC が確認されたが、過去の調査では、日本国内に流通する水産加工食品から分離された 59 株の *L. monocytogenes* のうち PMSC が確認されたのは 1 株のみ (1.7%) であった。5 か所の加工施設内での PMSC を有する *inlA* の分布率は施設によって 0~47.1% と異なったことから、*inlA* に PMSC を有する株の分布率は環境に依存するとされている。本研究で分離された菌株のうち、*inlA* に PMSC が確認された株はいずれも異なる製造者であり、購入日および購入場所も異なった。PMSC の分布状況の傾向について明らかにするためには、今後の継続したモニタリングが望まれる。

D. 結論

水産分離株について全ゲノム解析を行うことで、遺伝型が明らかとなり、食品製造現場に長期間生残している可能性が考えられた。また、病原性遺伝子の保有状況も明らかとなり、今後、真のリスクを明らかにするべく、細胞培養系を用いた病原性の評価を行う予定である。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

学会発表

- 「非加熱喫食水産加工食品における *Listeria monocytogenes* の分布調査」中村綾花、小森香莉、河野由奈、久田孝、高橋肇、第 45 回日本食品微生物学会学術総会 (2024 年 9 月、青森)
- 「MPN 法を用いた *Listeria monocytogenes* の定量における選択増菌培地の比較検討」小森香莉、河野由奈、中村綾花、久田孝、高橋肇、第 45 回日本食品微生物学会学術総会 (2024 年 9 月、青森)

3. “Distribution rate of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood processed products in Japan and its potential risk assessment” Ayaka Nakamura, Kaori Komori, Yuna Kono, Takashi Kuda, Hajime Takahashi, Food Micro conference (2024年6月、スペイン)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし