

厚生労働科学研究費補助金(食の安全確保推進研究事業)  
総合研究報告書

## 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: 本研究課題では、非加熱喫食 (Ready-to-eat: RTE) 水産加工食品における *Listeria monocytogenes* のリスク評価及び防除に資する基礎的知見の集積を目的とした。令和 5 年度には国内流通 RTE 水産加工食品 500 検体を対象に汚染実態を調査し、たらこ、明太子、いくら及びすじこ、まぐろのたたき、スモークサーモンから *L. monocytogenes* を検出した。令和 6 年度には分離株 40 株の全ゲノム解析を行い、cgMLST 解析により、同一又は近縁の遺伝型の株が同一製造者又は関連する製造者の複数製品から検出される事例を確認し、製造環境等における長期残存又は反復汚染の可能性を示した。令和 7 年度は、これらの知見に基づき、食品製造現場における防除方策の検討として、RTE 水産加工食品由来 *L. monocytogenes* 22 株を用い、塩化ベンザルコニウム、次亜塩素酸ナトリウム系洗浄剤、過酢酸系洗浄剤及びアルキルアミン系洗浄剤に対する感受性を評価した。MIC 及び MBC 測定の結果、十分な殺菌効果を得るための濃度は洗浄剤及び菌株により異なり、特に次亜塩素酸ナトリウム系洗浄剤では株間差が大きかった。また、塩化ベンザルコニウム耐性関連遺伝子又は Tn6188 を保有する株では、塩化ベンザルコニウムに対する MIC 又は MBC が高い傾向を示し、ゲノム情報と表現型の関連が示唆された。以上より、RTE 水産加工食品における *L. monocytogenes* のリスク低減には、食品製造環境における洗浄剤の適切な選択、濃度管理及び有効成分の異なる洗浄剤の組合せ運用が重要であることが示された。

## 研究分担者

東京海洋大学食品生産科学部門

高橋 肇 教授

## A. 研究目的

*Listeria monocytogenes* は、ヒトのリステリア症の原因菌であり、特に高齢者、妊婦、乳幼児、免疫不全者等の高リスク群において敗血症や髄膜炎等の重篤な症状を引き起こす。本菌は 0~10℃程度の低温条件下でも増殖可能であり、食品が本菌に汚染された場合、冷蔵管理のみで増殖を完全に制御することは困難である。欧米諸国では RTE 食品を原因とするリステリア症の集団発生が数多く報告されており、日本においても推定患者数や重症化リスクを考慮すると、注意すべき食品媒介病原菌である。

本研究では、国内に流通する RTE 水産加工食品を対象に、*L. monocytogenes* の汚染実態を定量的に把握するとともに、分離株の遺伝学的特徴、病原性関連遺伝子及び耐性関連遺伝子の保有状況を明らかにし、

さらに食品製造現場における防除方策として洗浄剤感受性を評価することにより、水産物におけるリステリアのリスク評価及び防除に資する基礎的知見を得ることを目的とした。

## B. 研究方法

1. RTE 水産加工食品における *L. monocytogenes* の汚染実態調査

令和 5 年度は、たらこ、明太子、いくら及びすじこ、まぐろのたたき、スモークサーモンの 5 品目を各 100 検体、合計 500 検体収集し、通知法 (NIHJSJ-08) に準拠して *L. monocytogenes* の定性検査を行った。典型コロニーについては 16S rRNA 領域のシーケンス解析、β 溶血性及び炭水化物分解能試験により同定した。また、MPN 法に用いる選択増菌培地の性能を比較し、陽性検体について MPN 法による定量を実施した。

## 2. 分離株の全ゲノム解析

令和 6 年度は、令和 5 年度に分離した *L. monocytogenes* 40 株について DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を実施した。得られたドラフトゲノムデータを BIGSdb-Lm 等に登録し、cgMLST 解析、Clonal Complex、Sequence Type、cgMLST Type の同定、Minimum spanning tree の作成、病原性遺伝子、抗菌薬耐性関連遺伝子、消毒剤耐性関連遺伝子及びストレス耐性関連遺伝子の保有状況を解析した。*inlA* については未熟終止コードの有無を確認した。

### 3. 洗浄剤に対する感受性評価

令和 7 年度は、RTE 水産加工食品由来 *L. monocytogenes* 22 株を供試し、塩化ベンザルコニウム (BAC)、サニプラン フォーミング洗浄剤 LA (SAN)、Aqua des Foam PAA (ADF) 及び Aqua San AM Plus (AQS) の 4 種類の洗浄剤に対する MIC 及び MBC を測定した。96 ウェルマイクロプレートを用いて各洗浄剤を 2 倍段階希釈し、菌液を接種後 37°C で 24 時間培養した。OD650 の測定により MIC を算出し、段階希釈後の生菌数測定により MBC を決定した。さらに、令和 6 年度の全ゲノム解析データに基づき、塩化ベンザルコニウム耐性関連遺伝子又は Tn6188 の保有状況と感受性試験結果を比較した。

(倫理面への配慮) 本研究は市販食品から分離した細菌株及び食品試料を対象とする研究であり、人を対象とする生命科学・医学系研究及び動物実験には該当しない。病原細菌の取扱いに際しては、所属機関の安全管理規程に従い、適切な封じ込め、个人防护具の使用、廃棄物の滅菌処理等を行った。

## C. 研究結果

### 1. 汚染実態及び定量結果

500 検体を対象とした調査の結果、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 *L. monocytogenes* 陽性率は、それぞれ 2.0、4.0、9.0、23.0 及び 2.0% であった。まぐろのたたきで最も陽性率が高く、RTE 水産加工食品の中でもリスク管理上注目すべき食品群であることが示さ

れた。陽性検体の MPN 値は比較的低く、最大でも 46 MPN/g 程度であった。MPN 法に用いる選択増菌培地の検討では、24 時間培養のみでは接種菌数を反映した MPN 値が得られにくく、48 時間培養が適切であることが確認された。また、緩衝リステリア増菌ブイオンは他の培地に比べて接種菌数を反映した MPN 値が得られやすく、水産加工食品中の *L. monocytogenes* 定量に適することが示された。

### 2. 全ゲノム解析による分離株の特徴

RTE 水産加工食品由来 40 株は、14 種類の Clonal Complex 及び 15 種類の Sequence Type に分類された。BIGSdb-Lm に登録された食品由来株及び臨床由来株との比較では、本研究の水産分離株は世界各地で分離された株と近縁であることが示された。一部の株では cgMLST Type が一致し、同一又は関連する製造者の複数製品から検出されていた。特に、購入日が約 3 か月離れていた株でも同一 cgMLST Type が確認され、製造環境における長期残存又は反復汚染の可能性が考えられた。

消毒剤耐性関連遺伝子については、40 株中 3 株が *bcrABC* を保有し、1 株が *bcrA*、1 株が *emrC* を保有していた。ストレス耐性関連遺伝子では、SSI-1 をコードする遺伝子を 23 株が保有し、SSI-2 を 4 株が保有していた。薬剤耐性関連遺伝子については、獲得性耐性遺伝子は確認されなかった一方、内在性耐性遺伝子は 40 株すべてで確認された。病原性遺伝子については、40 株すべてが LIPI-1 及び *inlA*、*inlB* を保有していた。一部の株は LIPI-3 又は LIPI-4 を保有し、*inlA* 配列中の未熟終止コードは 4 株で確認された。

### 3. 洗浄剤感受性及び耐性関連遺伝子との関連

4 種類の洗浄剤はいずれも濃度依存的に *L. monocytogenes* の増殖を抑制したが、洗浄剤及び菌株により効果の程度は異なった。MIC 値の平均は、BAC、SAN、ADF、AQS の順に 0.00027%、0.045%、0.13%、0.012% であり、MBC 値はそれぞれ 0.00079%、0.58%、0.18%、0.017% であった。十分な殺菌効果を得るため

には、BAC では 0.00129%、SAN では 2%、ADF では 0.25%、AQS では 0.025%以上が必要であることが示された。SAN では株間差が大きく、MBC/MIC 比も高かったことから、増殖抑制濃度と殺菌濃度を区別した評価が重要であると考えられた。BAC 耐性関連遺伝子 *bcrABC* を保有する 3 株及び *Tn6188* 関連遺伝子を保有する 1 株では、BAC に対する MIC 又は MBC が高い傾向を示し、ゲノム情報と洗浄剤感受性の表現型との関連が示唆された。

#### D. 考察

本研究により、国内流通 RTE 水産加工食品における *L. monocytogenes* の汚染実態が定量的に把握された。陽性検体の菌数は比較的低かったものの、まぐろのたたきで高い陽性率が確認されたことから、食品群ごとのリスクに応じた衛生管理が必要である。RTE 水産加工食品は加熱せず喫食されるため、低菌数であっても流通・保管中の温度管理不備や高リスク群の摂食を考慮すると、継続的なモニタリングが重要である。

全ゲノム解析では、国内水産分離株が国際的に報告されている食品又は臨床由来株と近縁であること、同一又は関連する製造者の複数製品から同一遺伝型株が検出されたことが明らかとなった。これは、原料由来の汚染に加え、製造環境又は小売段階での二次汚染、さらに食品製造環境内での長期残存が RTE 水産加工食品の汚染に寄与している可能性を示している。

洗浄剤感受性評価では、洗浄剤の有効成分により殺菌効果や株間差が異なることが示された。特に、消毒剤耐性関連遺伝子を保有する株で BAC 感受性の低下傾向が認められたことは、全ゲノム解析情報が食品製造環境における衛生管理や防除策の検討に有用であることを示す。単一の洗浄剤を長期的に使用することは、感受性の低い株又は耐性関連遺伝子を保有する株の選択につながる可能性があるため、有効成分の異なる洗浄剤を組み合わせた運用、適切な濃度管理、接触時間及び有機物残渣除去を含む洗

浄手順の遵守が重要である。

#### E. 結論

本研究では、令和 5 年度から令和 7 年度にかけて、RTE 水産加工食品における *L. monocytogenes* の汚染実態、分離株の遺伝学的特徴及び防除方法を総合的に検討した。令和 5 年度には 500 検体の調査により、まぐろのたたき等で比較的高い陽性率が確認され、陽性検体の菌数は最大 46 MPN/g 程度であった。令和 6 年度には分離株 40 株の全ゲノム解析により、遺伝型、病原性遺伝子、消毒剤耐性関連遺伝子及びストレス耐性関連遺伝子の保有状況を明らかにし、製造環境中での長期残存又は反復汚染の可能性を示した。令和 7 年度には洗浄剤感受性評価により、洗浄剤ごとに必要な殺菌濃度及び株間差が異なること、BAC 耐性関連遺伝子又は *Tn6188* の保有が BAC 感受性低下と関連する可能性を示した。以上より、RTE 水産加工食品における *L. monocytogenes* リスク低減には、継続的な汚染実態把握、ゲノム情報を活用した分離株の解析、及び製造現場における洗浄剤の適切な選択・濃度管理・組合せ運用が重要である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Kaori Komori, Yuna Kono, Ayaka Nakamura, Takashi Kuda, Hajime Takahashi. Evaluation of selective enrichment media for accurate most probable number enumeration of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafood products. *Journal of Microbiological Methods*, 107527, 2026
- Thorben Ogihara Reiche, Ayaka Nakamura, Inga Folkedal, Kaori Komori, Yuna Kono, Mare Marie Sisjord Nyvoll, Sunniva Hoel, Hajime Takahashi, Anita Nordeng Jakobsen. *Listeria monocytogenes* from salmon processing and ready-to-eat seafood: Antibiotic susceptibility and disinfectant tolerance. *Food Control*, 112090, 2026
- Ayaka Nakamura, Kaori Komori, Yuna Kono,

Takashi Kuda, Hajime Takahashi. Distribution rate of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat processed seafood products in Japan and a potential risk assessment. International Journal of Food Microbiology (査読中)

## 2. 学会発表

- ・ 13th Joint International Symposium on Food Science and Technology Among NUS, TUMSAT, HU, ZJU, and KU、2023 年 11 月、タイ

- ・ 中村綾花、小森香莉、河野由奈、久田孝、高橋肇「非加熱喫食水産加工食品における *Listeria monocytogenes* の分布調査」第 45 回日本食品微生物学会学術総会、2024 年 9 月、青森

- ・ 小森香莉、河野由奈、中村綾花、久田孝、高橋肇「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」第 45 回日本食品微生物学会学術総会、2024 年 9 月、青森

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

- ・ 中村綾花「RTE 水産加工食品における *Listeria monocytogenes* のリスクに関する研究」食源性病原菌に関する日中交流学術会議、2025 年 7 月、中国・上海

- ・ 小森香莉、河野由奈、中村綾花、久田孝、高橋肇「日本国内に流通する水産加工食品における *Listeria monocytogenes* の分子疫学的解析」第 46 回日本食品微生物学会学術総会、2025 年 9 月、東京

## G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし