

研究課題の概要

研究課題名	非加熱喫食食品から検出されるリステリア・モノサイトゲネスのリスク評価に関する研究
主任研究者	藤井 建夫
所属機関	東京海洋大学
研究成果の概要	<p>欧米では100万人あたり4～5人のリステリア症患者が発生しているが、我が国ではほとんど問題となっていない。一方、我が国におけるリステリア・モノサイトゲネスの食品汚染率は欧米と比較して大きな差は認められず、特に、魚卵やネギトロなど加工工程の多い非加熱喫食食品を中心に高頻度に検出されている。本研究では、わが国で市販されている非加熱喫食水産食品について、リステリアモノサイトゲネスの分布、汚染菌量、分離株の病原性を総合的に評価し、また、菌株の遺伝子性状を簡便に解析できる手法を開発し、我が国において分離されるリステリア菌株のリスク評価手法を確立した。研究の結果、上記食品に広く汚染しているリステリアモノサイトゲネス菌株の遺伝子性状やマウスへの病原性は米国やヨーロッパで重篤な食中毒を引き起こした臨床株のそれと差がないことが明らかとなった。今後は、これらの増殖動態やその制御法が重要な課題になると結論した。</p>

食品安全委員会 の本研究課題に 対する事後評価・ 総合コメント	<p>目標以上の成果が得られた。現在、本食中毒の本邦での大規模な発生は、確認されていない。しかし、今後の発生に備え我が国における分離株の病原性の評価や検査法の開発が行われ、リステリア・モノサイトゲネスに関する食品健康影響評価に活用が期待される。</p>
--	--

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	非加熱喫食食品から検出されるリステリア・モノサイトゲネスのリスク評価に関する研究
主任研究者名	所属： 東京海洋大学 氏名： 藤井建夫(研究課題番号 0605)

○研究要旨

リステリア・モノサイトゲネスは、欧米においては重要な食中毒細菌として知られており、低温増殖性であり、主に非加熱喫食食品を摂食することによって食中毒を引き起こす。わが国においては、これまでにリステリアによる食中毒と疑われる事例は1件しか報告がないものの、ネギトロや魚卵製品が本菌に広く汚染されていることが過去の研究で明らかになっており、これらの食品のリステリアリスクを検証する必要性は高い。そこで我々はこれらの食品におけるリステリアリスクの総合的な評価を行った。

まず、東京近郊で小売されている非加熱喫食食品における本菌の分布調査を行った。欧米で多くのリステリア食中毒を引き起こしているナチュラルチーズやスモークサーモンからは本菌はほとんど分離されなかった一方で、ネギトロと魚卵製品（いくら、筋子、たらこ、明太子）からは高率（～18.1%）で分離された。本菌は少ない菌量であれば摂食しても重篤な症状に陥ることは少ないとされているため、これらの食品の汚染菌量を調べたが、菌数は少なく、ほとんどが 10^0 MPN/g 以下であった。そのため、消費者が購入直後に喫食すれば危険性は低いものと思われた。しかしながら、冷蔵温度に不備が生じ 10°C 下に置かれた場合は2日ほどで菌数は危険域に達し、しかもこの時点では外見やにおいからは腐敗を感じさせないため、消費者が喫食し食中毒を起こす可能性は十分にあると考えられた。

また、本菌は株によって宿主に対する病原性が異なるとされている。本菌が宿主の腸管上皮細胞から侵入する際に必要な InlA タンパク質は、食品から分離される株では菌体から遊離してその機能を果たさないことがしばしばあるが、我々が分離した非加熱喫食水産食品からの分離株は、そのほとんどが野生型の InlA タンパク質を保有しており、通常レベルの腸管上皮細胞への侵入性を有することが示された。また、このことは、腸管上皮細胞のモデルとしてしばしば用いられる Caco-2 細胞への非加熱喫食水産食品分離株の侵入性を調べたところ、臨床由来株と同程度であったことから裏付けられた。また、マウスの尾静脈から本菌を接種し、脾臓及び肝臓への本菌の感染性を調べたが、これについても、非加熱喫食水産食品分離株と臨床株とでは有意差がないという結果になった。また、6つの病原遺伝子（*prfA*, *inlB*, *inlC*, *dal*, *clpP*, *lisR*）の一部配列を用いて本菌株のタイピングを行ったが、同じクラスターに食品分離株と臨床株とが混在しており、両者の違いは明確にならなかった。これらの病原性ならびに病原性遺伝子の評価により、わが国の非加熱喫食水産食品から分離されるリステリア菌株は、過去に食中毒を起こした臨床株と同様、高い病原性を有することが示唆された。

これらの結果から、わが国に流通している非加熱喫食水産食品のリステリアリスクは否定できるものではなく、今後も注目していく必要があると思われた。

また、我々は本菌の株分け法として、簡便で時間的・コスト的に優れている Multilocus Single Strand Conformation Polymorphism と、遺伝的に近似している血清型 4b 株を高い解像度で株分けできる Multilocus Variable-number of Tandem Repeat を開発した。

研究成果報告書(本体)

研究課題名	非加熱喫食食品から検出されるリステリア・モノサイトゲネスのリスク評価のための株の識別に関する研究
主任研究者名	所属： 東京海洋大学 氏名： 藤井建夫(研究課題番号 0605)

1. 研究の概要

リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*; 以下 **Lm**)は欧米においてはナチュラルチーズ等の非加熱喫食(Ready-to-Eat; 以下 **RTE**)食品を介して多くの食中毒を起こしているため、重要な食中毒細菌のひとつとして捉えられている。そのため米国においては **RTE** 食品から **Lm** が検出されてはならないとする規制がある。一方、わが国では、本菌に感染し重篤な症状に陥る人が年間で数十人に上るという推計が出ているが、実際にわが国で食品が原因のリステリア症と判明した例は1例(北海道ナチュラルチーズによるもの)のみにとどまる。しかしながら、わが国の市販食品の一部が本菌に汚染されているということを示す報告はいくつかあり、わが国のリステリアリスクは十分に評価されているとは言えない。

わが国においても、欧米で多くのリステリア食中毒を引き起こしているナチュラルチーズやスモークサーモンについて、本菌による汚染実態を把握することは重要である。しかしながら、これらの食品は欧米と比較してわが国での摂食量は少ない。一方、わが国独自の **RTE** 食品である寿司や刺身等の生食魚介類は、日常的に摂食されており、また、工場での製造工程から家庭での消費までの間に加熱過程を含まないため、消費時に **Lm** が生存している可能性は十分に考えられる。そこで、当研究室では、以前にこれら **RTE** 水産食品における **Lm** の分布調査を行った。東京近郊の小売店で購入した208サンプルの生食魚介類を調査した結果、ほとんどの製品に **Lm** は存在しなかったが、一部の製品、ネギトロ及び魚卵製品(いくら、筋子、たらこ、明太子)に限っては、**Lm** の汚染が高率で認められた(Handa *et al.* 2005. *Journal of Food Protection* vol.68 p.411-415)。このような結果は、わが国にもリステリアリスクが存在することを示唆するもので、更なる調査の必要性を生んだ。

しかしながらその一方で、汚染菌量も重要なリスク要因となる。欧米における多くの大規模食中毒や散発事例においては、原因となった食品からは多量の **Lm** ($>10^4$ cfu/g) が検出された。そのため、汚染菌量が低ければ、リステリア症を発症する危険性は少ないとされている。そこで、汚染分布調査を行うと同時に、汚染菌量調査の実施も必要である。しかし、重要なのは購入当時の汚染菌量だけではない。**Lm** は低温増殖性を持つため、消費者が製品を購入後、消費までの間に冷蔵庫内に保存していたとしても、**Lm** は増殖をし、消費時には菌数が増えている可能性がある。更に想定されるのは、消費者により、もしくは消費者の手に渡るまでの流通の段階で、温度管理不備が起こることである。このような様々な起こりうる温度環境を想定して、**RTE** 水産食品の消費段階での **Lm** 菌数を予測する必要がある。

又、欧米において大規模食中毒や散発事例を引き起こした **Lm** 菌株は血清型 4b のものが多いこと等から、**Lm** は菌株によって病原性に違いがあるとされている。**RTE** 水産食品を汚染している **Lm** 菌株の病原性の強弱によっても、これらの食品のリステリアリスクは大きく異なってくるため、これら

の製品から分離された Lm 菌株の病原性の強弱の決定はリスク評価に不可欠であると考えられる。

また、この病原性の差異という点について、RTE 水産食品から分離された Lm 菌株と、これまでに大規模食中毒もしくは散発事例を引き起こした菌株との遺伝子上の差異を調べることも、リステリアリスクを評価する上で有効な手段のひとつであると考えられる。そのためには臨床株を入手する必要がある。しかも、わが国のみならず欧米からの臨床株も入手できれば広い範囲での遺伝子比較が可能になる。また、遺伝子の差異を比較し、株分けする手法については多数存在する。しかし、そのほとんどは操作が煩雑であったり多くの時間を要したり、あるいは高価であるなど、何らかの欠点を持つ。そのため、より簡便で短時間で結果を得ることができ、そして安価な手法の開発の必要性は常に叫ばれている。しかもそれは高い解像度を持ち、そしてなにより信頼性がなければならない。

以上の背景をふまえ、本助成研究では、3年間にわたって、①広範囲の RTE 食品における Lm の分布状況調査、②RTE 水産食品を汚染している Lm の菌数調査、及び消費時の菌数予測、③RTE 水産食品から分離された Lm 菌株の病原性の検証、④RTE 水産食品から分離された株と臨床株との遺伝子比較、⑤遺伝子を比較し株分けする手法の開発、の5点について行った。また、これらの実験を行うにあたり、米国コーネル大学から米国の食品分離及び臨床の 100 株、そして分担研究者である国立医薬品食品衛生研究所の五十君静信氏から国内の食品分離及び臨床の 50 株の提供を受けた。以下、各項目につき、具体的に方法を示す。

- ① 東京近郊の小売店にて、ネギトロや魚卵製品を始めとした各種水産食品、及びその他の RTE 食品、特に賞味期限が比較的長く設定されているチーズやスモークサーモン等を購入した。各サンプルから 25g を無菌的に切り取り、225ml のハーフフレイザー培地内で 230rpm で 1 分間ホモジナイズし、30℃で 24 時間培養した（一次増菌）。培養後、1ml を新たに 10ml フレイザー培地に移し、再び、30℃で 24 時間培養した（二次増菌）。その後 500 μ l を mini-VIDAS LMO II (bioMérieux) のストリップに入れ、Lm の有無を確認した。これと同時に二次増菌液 100 μ l を Palcam 寒天培地 (Merck) にし、30℃で 48 時間培養した。Lm の典型コロニーが認められた場合には釣菌し、羊血液寒天培地 (日水製薬) に穿刺し、 β 溶血が認められたコロニーは分離した。最終的にはリポプリンター (Qualicon) にて同定を行った。
- ② 上記①で購入した RTE 食品の菌数は MPN 法にて測定した。まず滅菌した空試験管と University of Vermont Medium (UVM) (Oxoid) を 10ml 分注したものを用意した。検体 25g を UVM225ml に入れた後、ストマッカーでホモジナイズし、これを試料とした。試料 10ml を 3 本ずつ空試験管に、1ml と 0.1ml を、UVM10ml を入れた試験管 3 本ずつに接種した。これらを 30℃で 48 時間培養した。陽性本数を調べるために Palcam 寒天培地に 1 白金耳面線し、更に 30℃で 48 時間培養した。*Listeria* 属菌だと判定した菌については、羊血液寒天培地に接種し、 β 溶血性を示した菌を *L. monocytogenes* とした。この反応を利用して陽性本数を数え、最確数表を元に検体中の菌数測定を行った。

また、上記の購入時の菌数とは別に、消費者が実際に消費する段階で予想される菌数についての検証を行った。これについては、ネギトロ及びいくらを用いて実験を行った。RTE 水産食品から分離された菌株 2-9 (筋子由来) 及び 20-5-1 (たらこ由来) を 30℃で 2 代継代培養したものを実験に供した。サンプル 25g に菌液を 10⁰ cfu/g レベルになるように食品表面に滴下し、5℃及び 10℃で 7 日間保存し、1、2、3、5、7 日後に 1 袋ずつ開封し、MPN 法により菌数の測定を行った。また、一般生菌数測定用として、各温度下で任意の時間保存したサンプル 25g に生理的

食塩水 225ml を加えホモジネートした後、スパイラルプレーターで TSA 平板に塗抹した。これを 20°C で 72 時間培養し、コロニー数を計測した。

- ③ まず、Lm がヒト腸管上皮細胞へ侵入する際に必要な InlA タンパク質に注目した。InlA は、Lm が経口摂取された後、食道・胃を経て腸に達し、腸管上皮細胞から侵入し、全身へ感染を広げていくため、本菌の感染において重要な役割を担っている。しかし株によっては *inlA* 遺伝子中にナンセンス変異を有し、終止コドンが存在するために、侵入性が著しく減少している株が存在する。また同様に、Lm の一連の病原遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしている *prfA* にもナンセンス変異が存在する場合がある。そしてこの変異を有する株は著しく病原性が低下していることが報告されている。そこで RTE 水産食品から分離された Lm59 株の *inlA* 及び *prfA* 遺伝子中の変異の有無の有無を調べ、更に一部の株を用いてその侵入性をヒト腸管上皮細胞のモデルである Caco-2 細胞を用いて検証した。変異の有無の検証には、まず Mag Extractor Kit (TOYOBO) を用いて DNA 抽出を行い、独自に設計したプライマー (*inlA*-F:AATCCTATACAACGAAACCTGA, *inlA*-R:ATATAGTCCGAAAACCACATCT, *prfA*-F:TGTTGTTACTGCCTAATGTTTT, *prfA*-R:ACTCCATCGCTCTTCCAGAA) で *inlA* 領域と *prfA* 領域を増幅し、ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でシークエンス反応を行った。得られた塩基配列は GENETYX-WIN (日本ジェネティクス) によりアラインメントをとり、ナンセンス変異の有無を調べた。

次に、ヒト腸管上皮細胞もモデルである Caco-2 細胞を用いて RTE 水産食品分離の株と臨床株との侵入性を比較した。Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地中で 37°C で一晩培養した菌液を遠心分離し、得られたペレットを Caco-2 用液体培地に懸濁した。これを希釈し 10^7 cfu/0.5ml に調整したものを接種菌液とした。24 ウェル細胞培養用平底マルチウェルプレートに植えた Caco-2 細胞に、1 ウェルあたり 500 μ l 接種し、37°C 2 時間培養した。その後 gentamycin で細胞に侵入しなかった菌を殺し、TritonX-100 で Caco-2 細胞から菌を溶出させ、これを回収菌液とし、スパイラルプレーターで TSA yeast extract 寒天培地に塗抹し、菌数を測定した。接種菌量に対する回収菌量の割合を侵入率とした。

次に、マウス臓器への感染性をもって RTE 水産食品株と臨床株との病原性を比較した。実験動物は BALB/cCrSlc マウス (三協ラボサービス)、♀、7 週齢 (19~20g) を用いた。BHI 液体培地で一晩培養した菌液を希釈によって $10^{3.4}$ cfu/0.4ml に調整したものを接種菌液とし、尾静脈から 0.4ml を投与した。投与 3 日後に炭酸ガスにてマウスを安楽死させた後、肝臓及び脾臓を摘出して 10 倍量の生理的食塩水内でホモジナイズした。スパイラルプレーターで Palcam 寒天培地に塗抹し、30°C 48 時間培養の後に生菌数を計測した。

また、Lm 病原遺伝子のひとつである *hly* にコードされる LLO タンパク質は宿主細胞内での食胞膜傷害において主要な役割を果たしている。*hly* 遺伝子を欠損させた株は食胞から抜け出すことができずにそのまま消化されてしまうため、その感染力が著しく低下する。この LLO は溶血毒素であるため、溶血活性試験により、その活性を測定した。羊血 (Sheep Red Blood Cells; SRBC) を $OD_{541}=0.4$ になるように調整し、試験に供した。BHI 液体培地で一晩培養した菌液を遠心分離し、その上清を倍数希釈したものを 500 μ l ずつに分注し、37°C で 30 分間培養した。その後、各試料に SRBC 溶液 50 μ l を加え、37°C で 30 分間反応させた。反応液を遠心分離し、上清の吸光度 (405 nm) を計測した。各株の試料における最も高い吸光度を 100% 溶血とし、100% 溶血を与える最大の希釈率の逆数を Hemolysis Unit (HU) とした。

- ④ 6つの病原遺伝子及び病原関連遺伝子 (*prfA*, *inlB*, *inlC*, *dal*, *clpP*, *lisR*) の一部配列 (~460bp) を解析し、MLST (Multilocus Sequence Typing) を行った。MLSTは通常、ハウスキーピング遺伝子を用いて行うのが一般的だが、今回はより細かい株分けのできる病原遺伝子を選択した。試験菌株は、RTE水産食品株の他、米国コーネル大学から分与を受けた米国臨床株や、分担研究者である国立医薬品食品衛生研究所の五十君静信氏から分与を受けたわが国の臨床株等も含んだ。上記6領域の増幅及びシーケンスにはZhangら (Applied and Environmental Microbiology, 2004, vol.70, p.913-920) のものを使用した。得られた配列は1塩基でも異なれば違う allele 番号を遺伝子毎に付与し、6つの遺伝子にそれぞれ付与された番号をもとに、BioNumerics software (Applied-Maths) を使用して系統樹を作成した。
- ⑤ Lm を株分けする手法を2法開発した。まずひとつめは、Multilocus Single Strand Conformation Polymorphism (MLSSCP)である。この手法は、従来のタイピング法よりも安価で簡便、且つ結果が早く得られる手法の開発、という目的で行った。まず、4つの病原遺伝子 (*hlyA*, *iap*, *actA*, *inlB*) をPCRで増幅し、制限酵素 (*iap*は *HhaI*, 他3遺伝子は *AluI*) で切断した。これをホルムアミド存在下で熱変性 (100°C 10分の加熱、急冷) させ、ポリアクリルアミドゲル (GE Healthcare Bio-Sciences) で GenePhor electrophoresis unit (GE Healthcare Bio-Sciences) 上で 5°C 90分間電気泳動した。泳動後、PlusOne DNA silver staining kit (GE Healthcare Bio-Sciences) で銀染色をし、バンドの確認を行った。得られたバンドパターンは BioNumerics software で解析をし、異なるバンドパターンを持つ株には異なる allele 番号を遺伝子毎に付与し、4つの遺伝子にそれぞれ付与された番号をもとに、BioNumerics software で系統樹を作成した。また、この系統樹及び得られた解像度を、パルスフィールドゲル電気泳動、amplified fragment length polymorphism (AFLP)、リボタイピングのそれと比較した。

次に2つめの手法として、Multilocus Variable-number of Tandem Repeat (VNTR) を開発した。Lm の血清型 4b は、多くの大規模食中毒や散発事例を引き起こしており、最もリスクの高い血清型とされているが、他の血清型と比較して株間の遺伝子変異が少なく、従来のタイピング法では株分けが難しい血清型である。そこで血清型 4b の株を高い解像度で、且つ簡便に株分けする手法の開発、という目的で行った。まず、全ゲノムが明らかになっている Lm 株 F2365 の配列からタンデムリピート領域 (短い配列、例えば TCA 等が繰り返し並んでいる領域) を探索し、高い解像度が得られる3領域を選択した。Lm 株から DNA を抽出後、この3領域をそれぞれ3種類 (6-carboxy-4,7,2',4'5'7'-hexachlorofluorescein, 6-carboxy-4,7,2'7'-tetrachloro-fluorescein, 5-carboxyfluorescein) の蛍光標識プライマーを使用してPCR増幅し、GeneScan-500 ROX size standard (Applied Biosystems) と共に ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でキャピラリー電気泳動を行った。得られたフラグメントサイズ毎に異なるリピート番号を領域毎に付与し、3領域それぞれに付与された番号をもとに、BioNumerics で系統樹を作成した。また、同領域をシーケンスすることによりフラグメントサイズとリピート回数との一致を確認した。更に、得られた系統樹及び解像度を、パルスフィールドゲル電気泳動、MLST のそれと比較した。

2. 研究の成果

(1) 研究の成果と概要

以下、研究の成果と概要を、上記「研究の概要」に記した項目毎に記す。

- ① 広範囲の小売 RTE 食品における Lm の分布状況を調査したところ、ネギトロ用マグロと魚卵

は高率で汚染されているものの、他製品における Lm 汚染はほとんど見られなかった (Table 1)。欧米において高い分布率が報告されているスモークサーモンやナチュラルチーズからは、国産と輸入品の違いにかかわらず、ほとんど汚染が確認されなかった。このことからわが国の RTE 食品における Lm の危険性はネギトロ用マグロと魚卵にほぼ限定されることが判明した。また、データには示していないが、同じ製造工場や小売店から数回に渡って Lm が分離されることがあり、工場や店舗に Lm が長期にわたって常在して食品を汚染している可能性が示唆され

Table 1. 小売RTE食品におけるリステリア・モノサイトゲネスの分布状況

検体名	検体数	陽性数(陽性率%)
RTE水産食品		
まぐろ		
ネギトロ	199	36 (18.1)
まぐろ柵	68	2 (2.9)
魚卵		
いくら	115	2 (1.7)
筋子	117	17 (14.5)
たらこ	172	18 (10.5)
明太子	162	19 (11.7)
寿司	36	0 (0.0)
スモークサーモン	33	1 (3.0)
乾燥珍味	16	0 (0.0)
その他RTE食品		
ナチュラルチーズ	65	0 (0)
サラダ	61	0 (0)
サンドイッチ	32	0 (0)
生ハム	17	0 (0)
計	1093	95 (8.7)

た。

- ② Lm 陽性であった RTE 水産食品の汚染菌数を MPN 法を用いて測定を行った。Lm の発症菌数は様々な要因 (宿主の年齢や健康状態、Lm 株の病原性の強弱等) に左右されるため明確にはなっていないが、 10^4 cfu/g 未満であれば重篤な症状に陥ることは少ないとされている。今回我々が調査した結果によると、RTE 水産食品の汚染菌数は微量であり、ほとんどが 10^0 MPN/g 以下であった (Table 2)。

Table 2. RTE水産食品中のリステリア・モノサイトゲネス菌数(MPN測定)

検体名	検体数	最確数 (MPN/g)			
		<0.3	0.3-0.94	1.1-9.3	12-15
ネギトロ	29	16	8	5	
いくら	2	1	1		
筋子	13	6	1	5	1
たらこ	14	11	2	1	
明太子	19	10	6	3	
計	77	44	18	14	1

この結果は、製品を小売店で購入した直後の菌量であるため、消費者が購入直後に摂食すれば、リステリア発症の危険性は低いものと考えられる。しかしながら重要なのは消費段階での菌数であるため、5°Cと10°Cに保存した場合の菌数の変遷を調べた (Fig. 1)。保存実験の結果、ネギトロといくらで近似の増殖曲線を示した (Fig.1 にはネギトロのみ示す)。実験期間の7日間の保存で、ネギトロは5°Cで約3 log、10°Cで約6 log 増加した。これは、欧米でリステリア食中毒の問題を引き起こしているチーズが5°Cで4 log 増加、スモークサーモンが10°Cで4 log 増加したという報告と同レベルである。ネギトロが5°Cで保存された場合、7日目には 10^3 MPN/g を超え、しかも外見・においからは腐敗を感じさせない状態であった。しかし、これらの食品の消費期限が通常1-2日であることを考慮にいと、7日目以降に摂食される可能性は低いと思われる。これに対し、10°Cで保存された場合、7日目になると Lm 菌数は 10^7 MPN/g をも超えてしまうが、上記の消費期限に加え、一般生菌数の増加に伴う明らかな腐敗により、摂食される可能性は低い。しかしながら、2日目の時点では 10^3 MPN/g を超えており、外見・においからは腐敗を感じさせない状態であったため、この時点で消費者が摂食してしまい食中毒を起こす可能性は十分にあると考えられた。

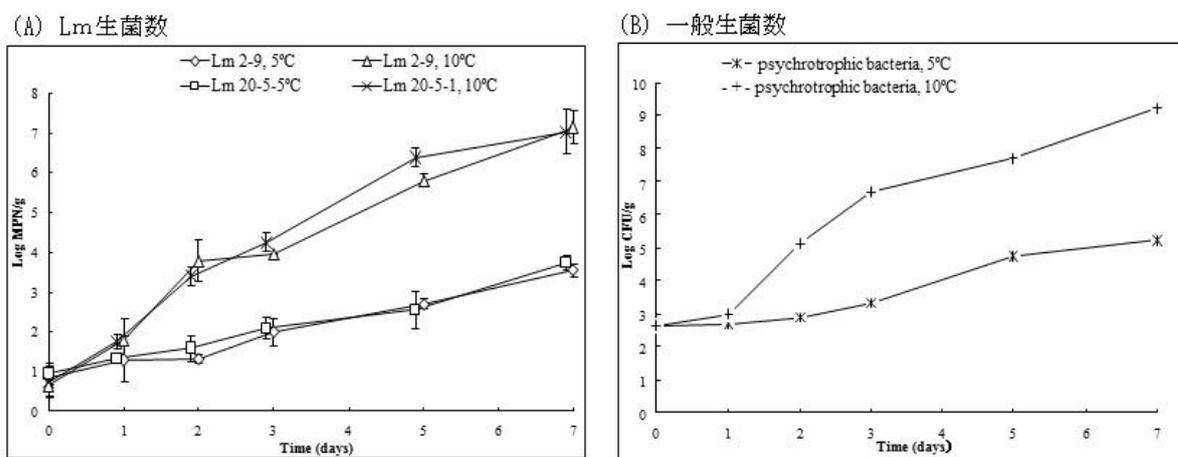


Fig.1. 5°C及び10°Cにおける (A) リステリア・モノサイトゲネスおよび (B) 一般細菌の菌数変化

- ③ RTE 水産食品から分離した 59 株について *inlA* 及び *prfA* 遺伝子におけるナンセンス変異の有無を調べた結果、*inlA* に変異を持っていたのは 1 株のみであり、*prfA* に至っては全株において変異が見つからなかった。*inlA* 遺伝子にナンセンス変異を有していたのは 36-25-1 株であり、*inlA* 遺伝子の 1579 番目の塩基の置換によりリシンをコードするコドンが終始コドンに変化していた。臨床株のわずか 4% が *inlA* 遺伝子にナンセンス変異を有しているのに対し、食品分離株では 37% が変異を有していたというフランスからの報告と比較すると、今回調査した RTE 水産食品の *inlA* 遺伝子におけるナンセンス変異率ははるかに低い。このことから、RTE 水産食品株の腸管細胞侵入性は臨床株のそれと同様であるということが示唆された。

次に、上記 *inlA* 遺伝子の変異の有無が Caco-2 細胞への侵入性と実際に一致するか、また、RTE 水産食品株と臨床株との間に侵入性の差があるか、を検証した (Fig. 2)。*inlA* 遺伝子中にナンセンス変異を有していた 2 株 (36-25-1、F2-563) の侵入率はその他の株と比べて著しく低く、*inlA* 遺伝子の配列が Caco-2 細胞への侵入性を評価する基準になることが示された。また、RTE 水産食品分離株の侵入率は 11~23% であり、これに対し臨床株の侵入率は 15~20% であった。*inlA* 遺伝子にナンセンス変異を持つ株を除いた平均値で student's t-test を行った

ところ、RTE 水産食品分離株と臨床株の侵入率に有意差は認められなかった ($P>0.05$)。

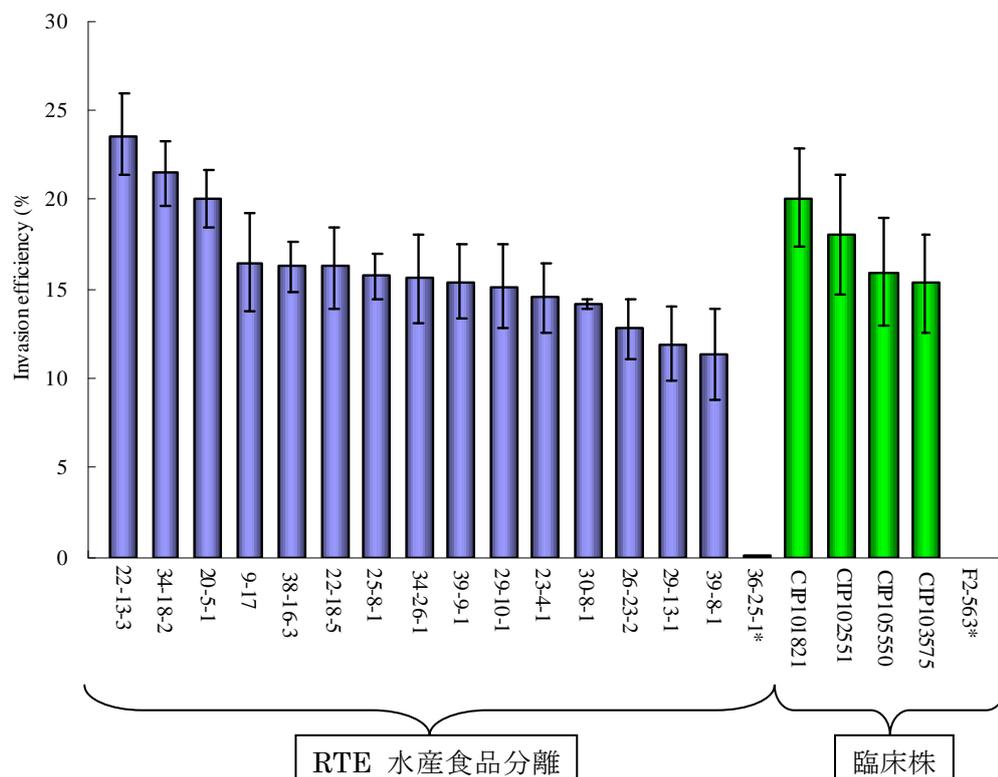


Fig. 2. Caco-2 細胞侵入性における RTE 水産食品分離株と臨床株との比較

次に、RTE 水産食品を汚染している Lm 株の病原性を検証するため、RTE 水産食品分離及び患者分離の Lm 株をマウス尾静脈から投与して、両者の感染力の強さを比較した (Fig. 3)。ネガティブコントロールとして用いた非病原性の *L. innocua* は肝臓及び脾臓の両臓器から検出されなかったのに対し、*L. monocytogenes* は全ての株が脾臓から検出されたが、肝臓からは検出されない株があった。これは菌数が少なく検出限界以下であったためと思われる。各臓器に感染した Lm の数について、両者間での有意な差は見られず、RTE 水産食品から分離された Lm 株は、臨床株と同程度の病原性を保持していることが示唆された。

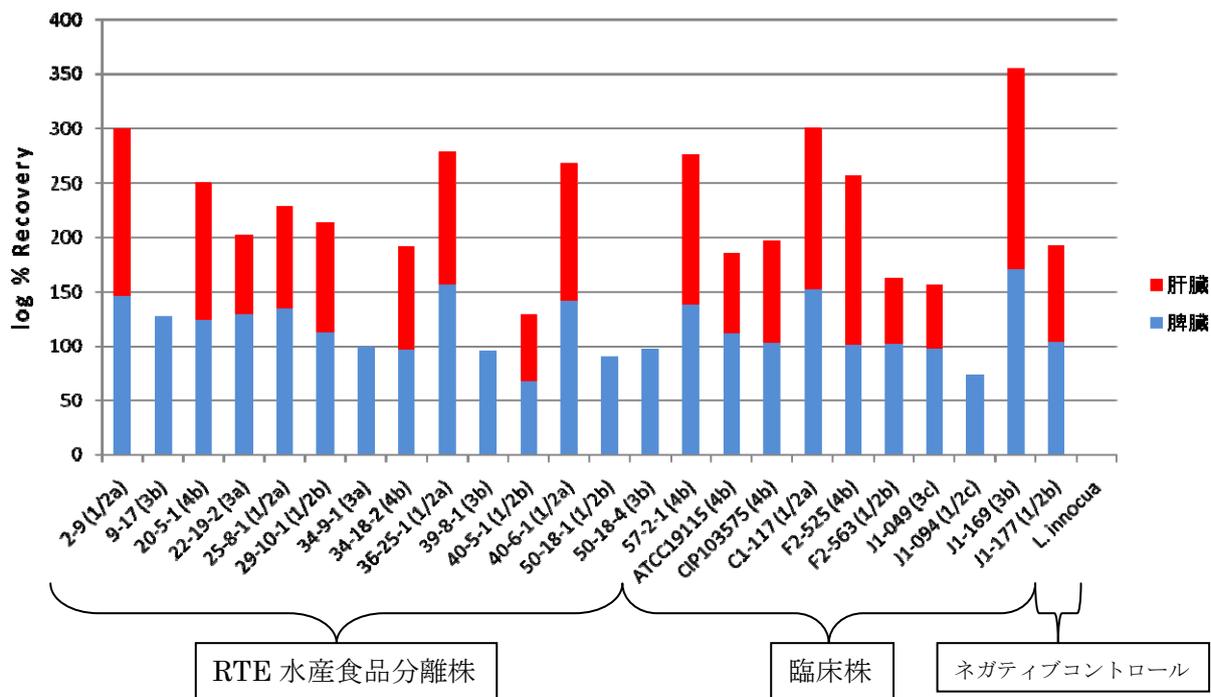


Fig. 3. マウス臓器（肝臓・脾臓）への感染性における RTE 水産食品分離株と臨床株との比較

また、溶血活性試験の結果を Fig.4 に示す。試験に供した全ての株について溶血活性が認められた。HU は RTE 水産食品株、臨床株ともに 32~128 であった。これにより、RTE 水産食品株は宿主細胞内への感染に必須である LLO 活性を有し、その値は株間での差が小さいことが分かった。

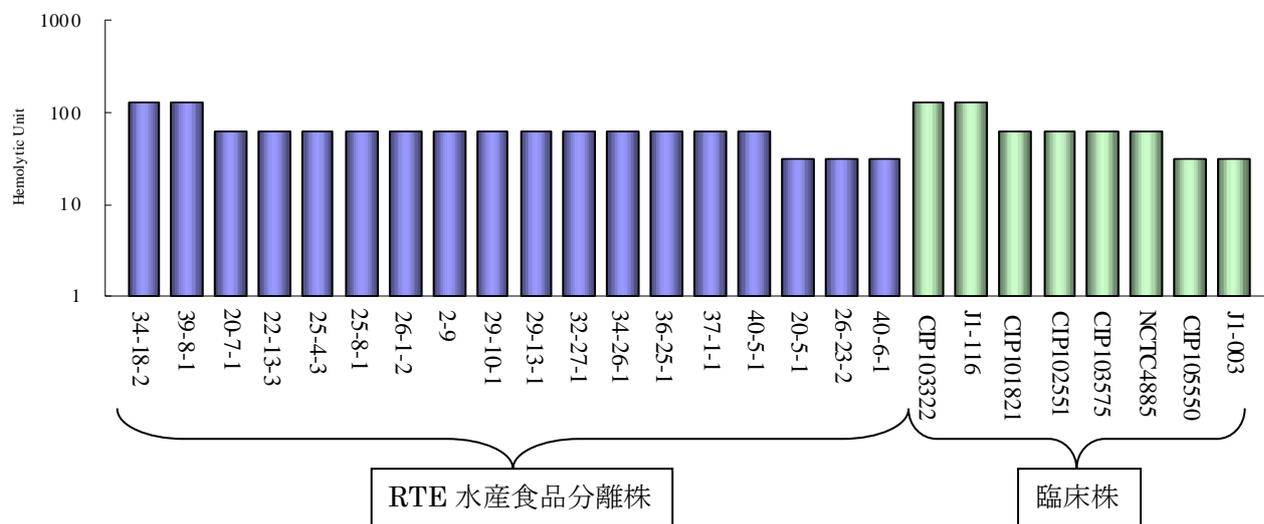
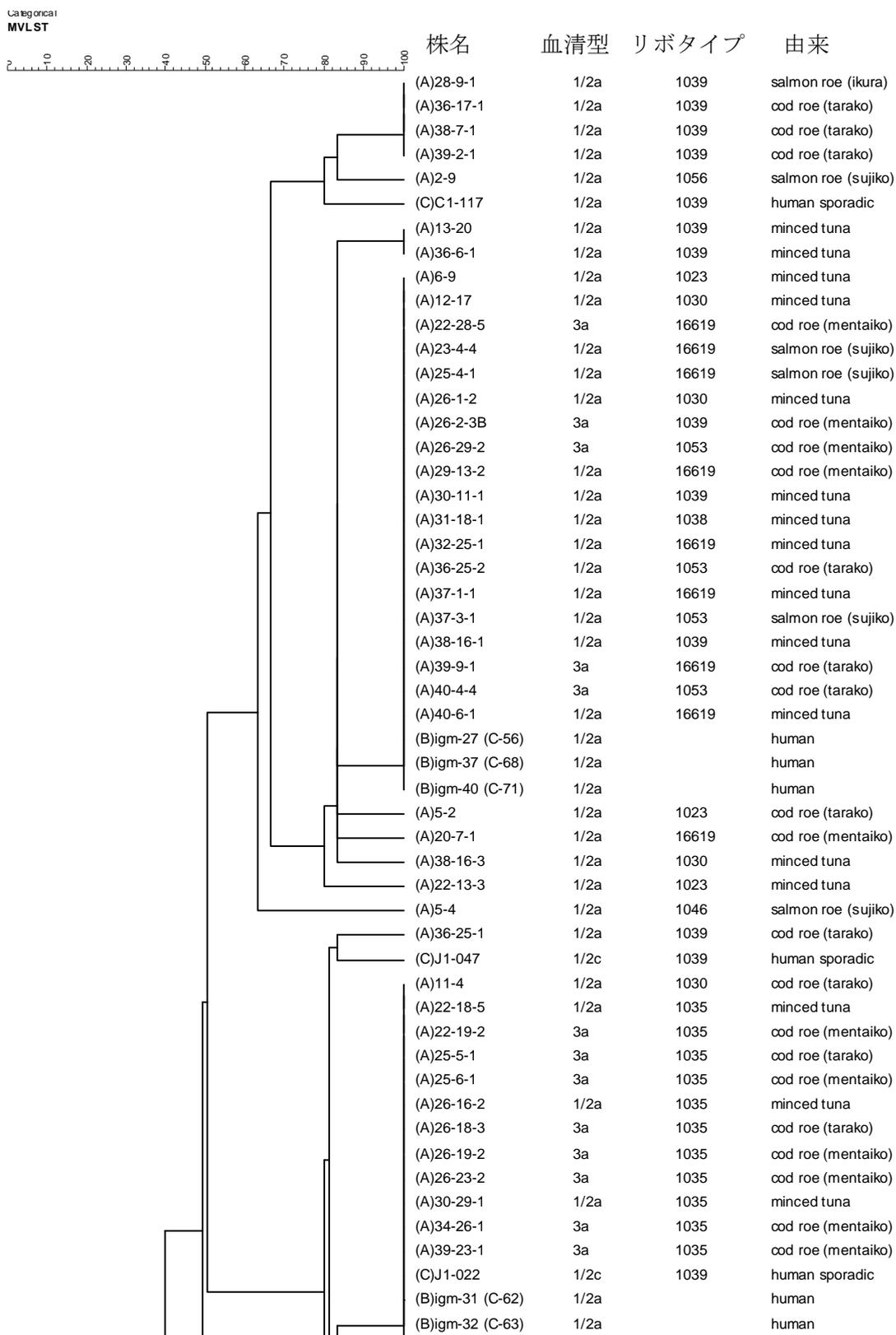


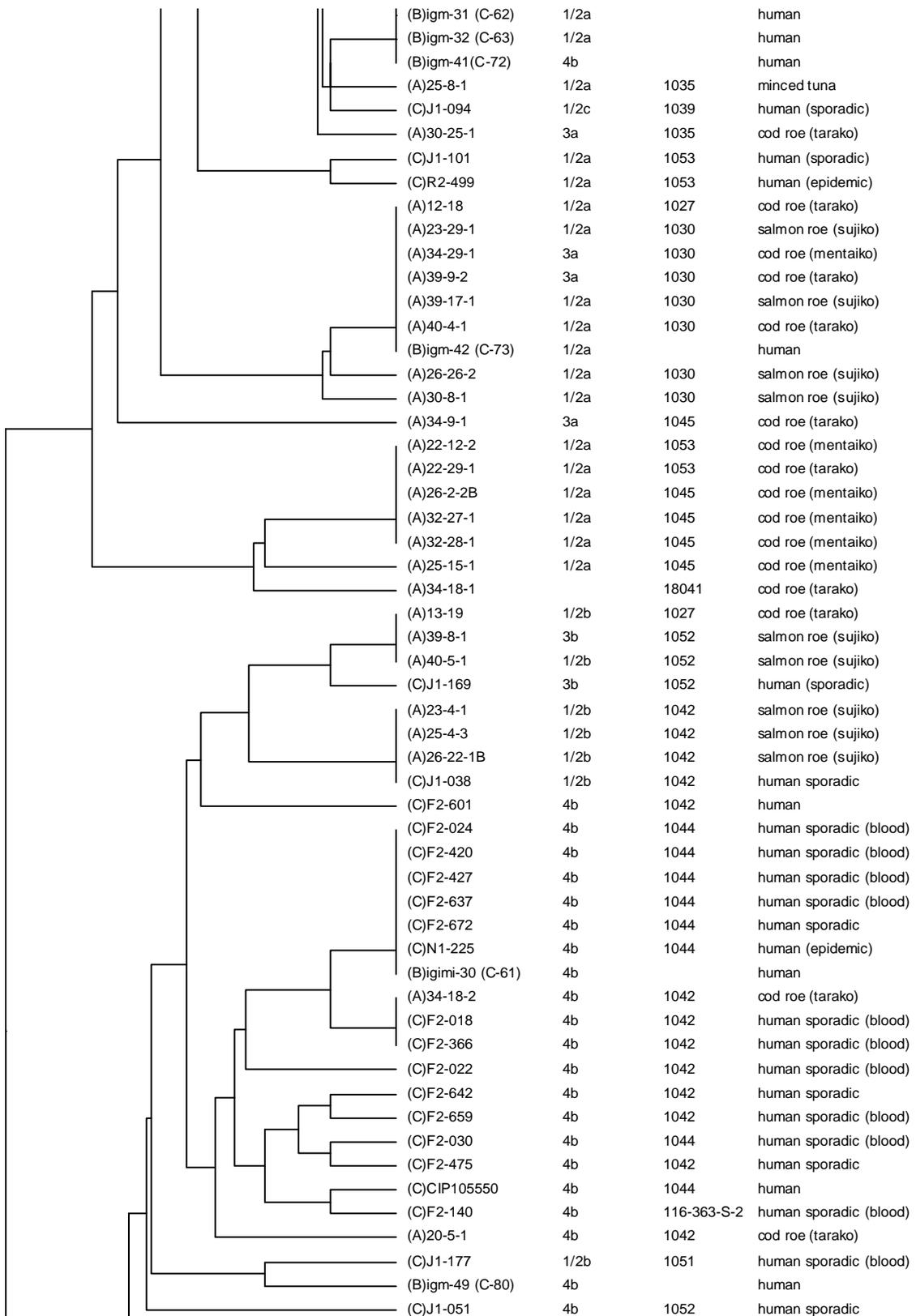
Fig. 4. 溶血活性における RTE 水産食品分離株と臨床株との比較

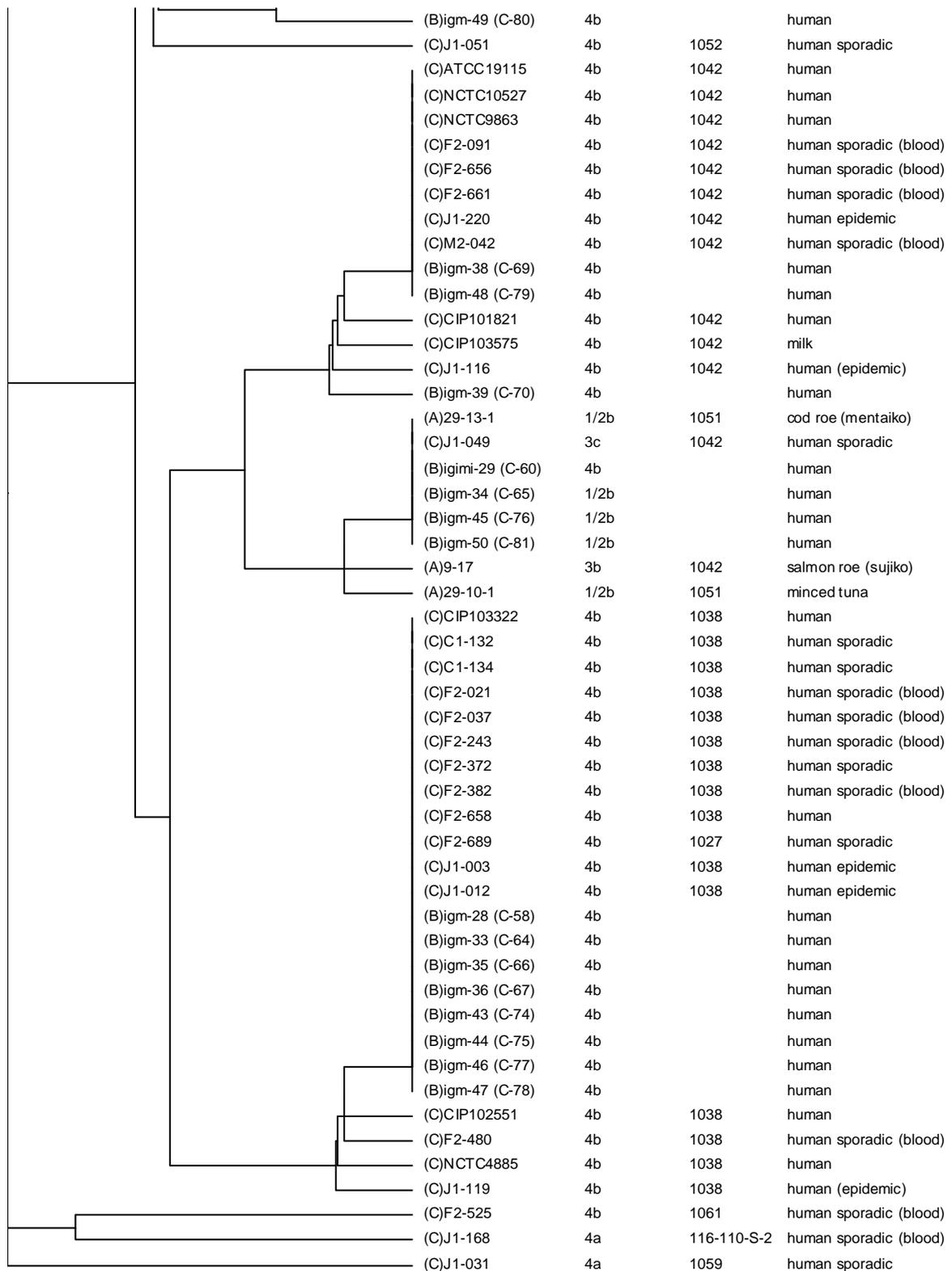
これらの病原性評価 (inlA 配列、Caco-2 細胞侵入性、マウス臓器感染性、溶血活性) により、RTE 水産食品分離株は臨床株と同様に病原性が高いことが示唆された。つまり、わが国で RTE 水産食品によるリステリア症の発症例報告がないことが、これら分離株の病原性の低さに起因するものではないことが判明した。

④ 水産食品分離株を、MLST によってわが国及び米国の臨床株との比較を行った (Fig. 5)。作

成した系統樹は大きく2つのクラスターに分かれた。血清型では主に lineage II 系統 (1/2a, 3a, 1/2c 等) と lineage I 系統 (1/2b, 3b, 4b 等) とに分かれ、本法が菌株の系統を調べるのに優れた方法であることを伺わせる。しかしながら、由来毎にクラスターが分かれることはなく、RTE 水産食品分離株、日本臨床株、米国臨床株が同じクラスターの中に混在していた。つまりこれら病原遺伝子においては、RTE 水産食品株は日本、米国にかかわらず、臨床株との違いがないことが示された。







株名について (A) RTE 水産食品分離株 (B) 日本臨床株 (C) 米国臨床株、を示す。

Fig. 5. MLST による RTE 水産食品分離株、日本臨床株、米国臨床株の病原遺伝子性状比較

⑤ MLSSCP による新しいタイピング法の開発を行い、これにより得られた電気泳動図を Fig.6

に示す。試験に使用した 64 菌株は、*hlyA* で 4 パターン、*iap* で 7 パターン、*actA* で 11 パターン、*inlB* で 12 パターンに分かれた。各パターンに allele 番号をふり、4 遺伝子のパターンを合計すると 18 の異なるパターンが得られた。これを系統樹に表したものを Fig.7A に、比較として PFGE と AFLP により作成された系統樹をそれぞれ Fig.7B と Fig.7C に示す。これらの系統樹から、今回開発した MLSSCP は、既存で且つ広く使用されている PFGE や AFLP と同様に、菌株を Lineage I と Lineage II とに分けることができた。解像度は PFGE や AFLP と比較してやや劣るものの、これらの方法よりも時間的・コスト的に優れており、また、操作が簡便である。素早く正確な結果が求められる現場に向いている方法であると言える。

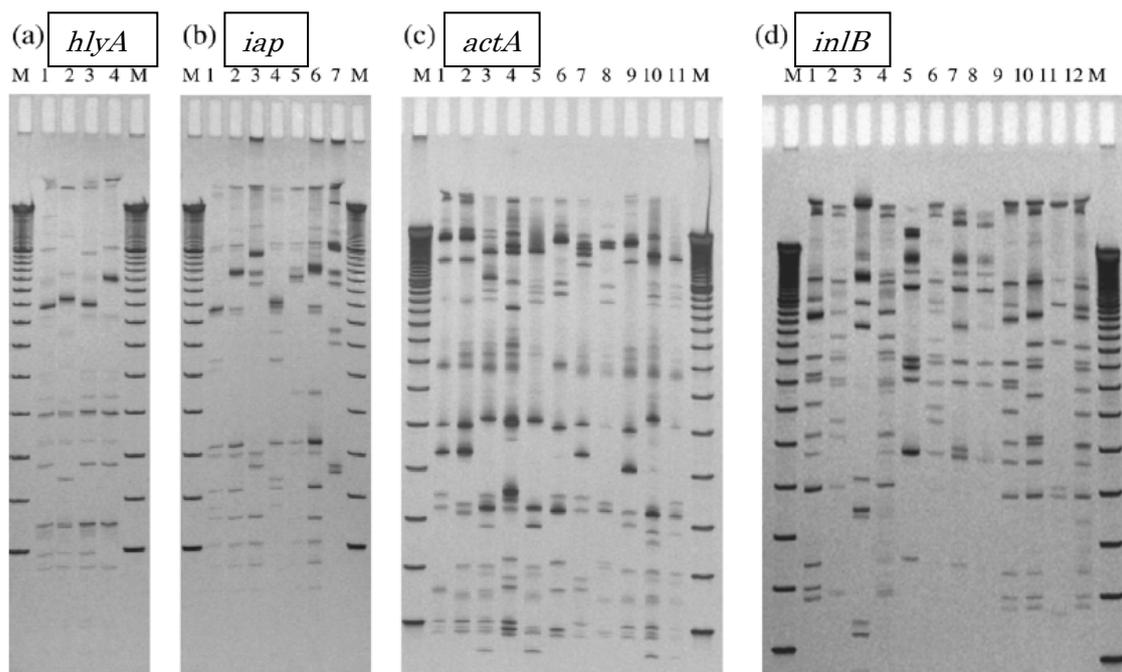
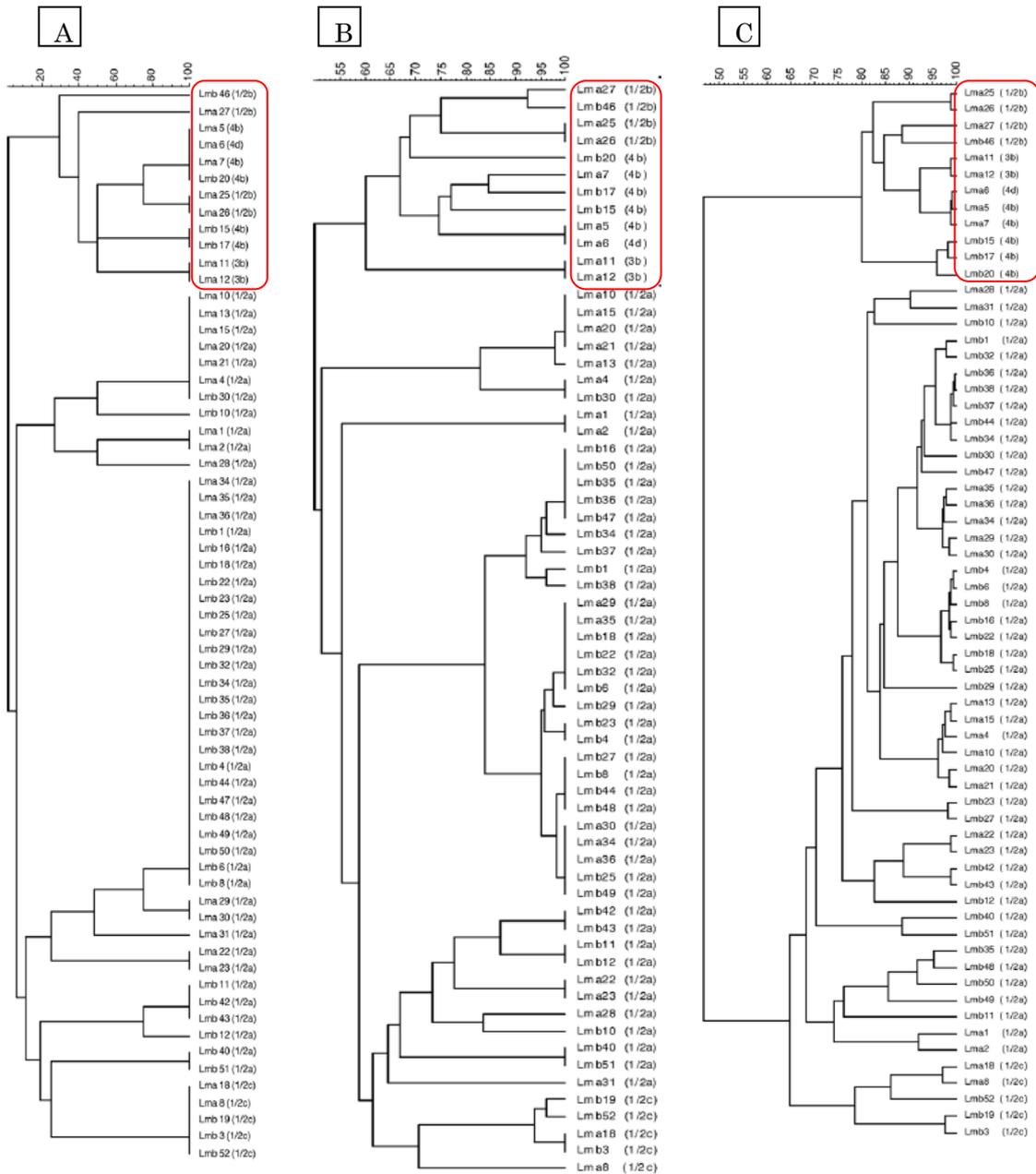


Fig.6. MLSSCP による 4 遺伝子のバンドパターン

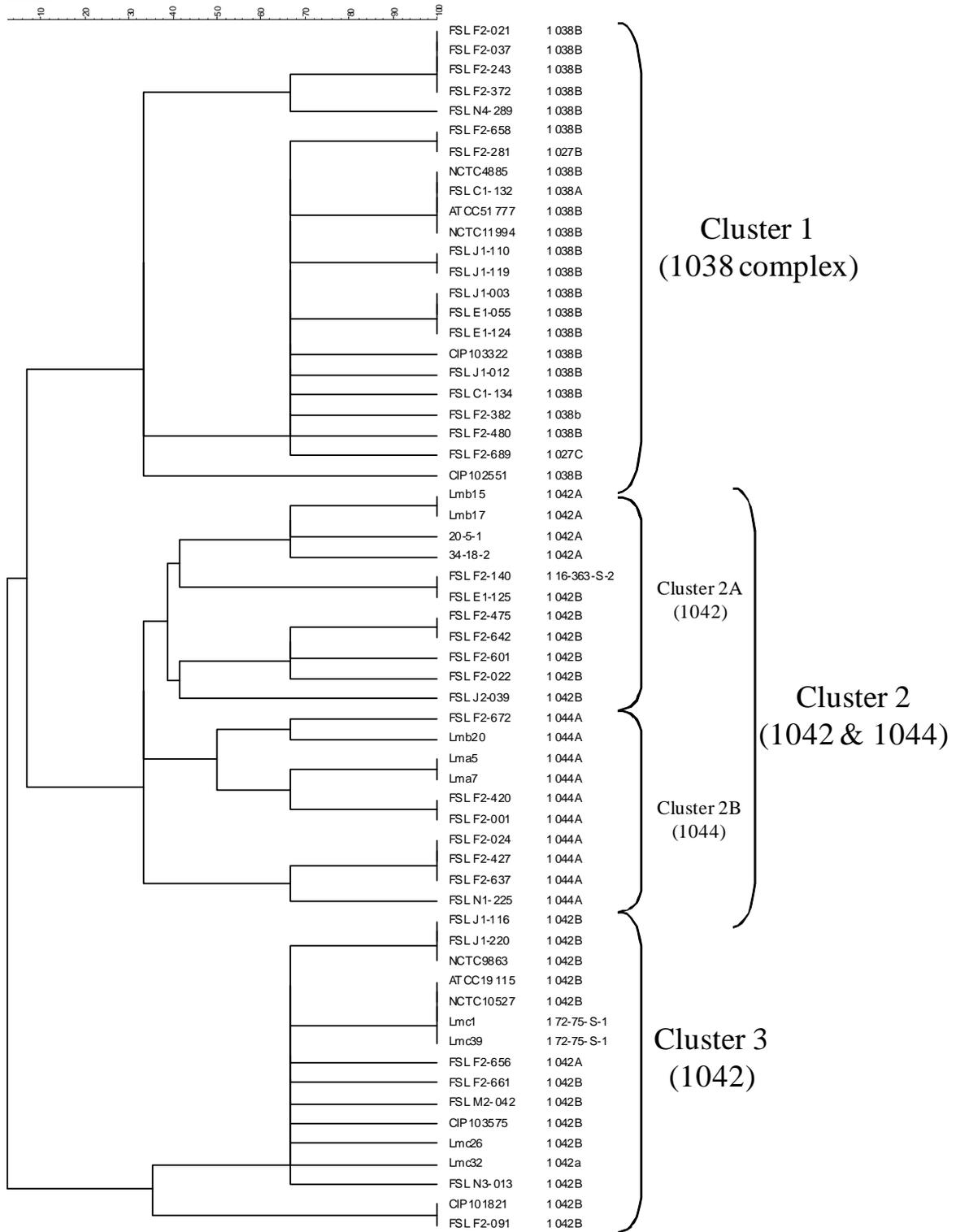


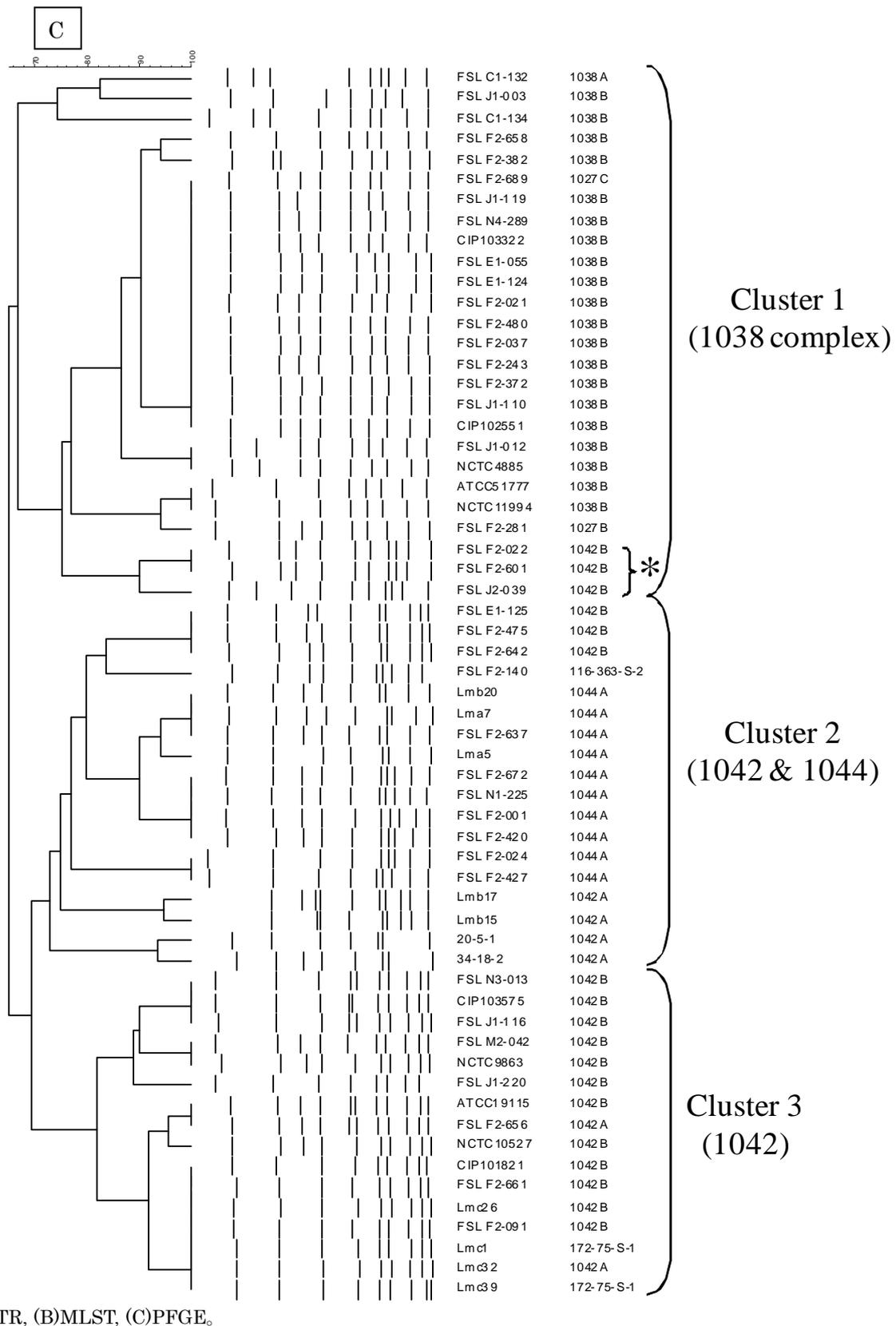
(A) MLSSCP, (B) PFGE, (C) AFLP。 枠内は Lineage I 株、その他は Lineage II 株を示す。

Fig. 7. MLSSCP、PFGE、AFLP により作成された系統樹

ふたつめのタイピング法として Lm の血清型 4b 株を用いて VNTR 法を開発した。本法は PFGEMLST と同様に 4b 株を 3 つのクラスターに分けることができ、また、そのクラスターリングはリボタイプにも対応していた (Fig.8)。更に、これまでの欧米で起こった多くの大規模食中毒は少数の遺伝的に似通っている株によるもので、それらは Epidemic Clone I (ECI)、ECIa、ECII、というグループに分けられているが、これらもそれぞれのクラスターに分けることを可能にした。また、血清型 4b は他の血清型と比べて遺伝子型が互いに似通っているため株分けが難しいとされているが、本法は PFGE、MLST、リボタイピングと比較しても高い解像度を得ることができた。

A





(A)VNTR, (B)MLST, (C)PFGE。

Fig.8. VNTR、MLST、PFGE により作成された系統樹

3年間の本助成研究の結果をまとめると、わが国で流通しているネギトロ及び魚卵製品は *Lm* に高率で汚染されているが、汚染菌量は低値である。しかしながら、温度管理に不備があった場合には消費時には感染菌量にまで増殖している恐れがある。更にこれらの *Lm* 菌株の病原性がリステリア症を発症させるに十分な強さである可能性を考慮すると、わが国におけるリステリア症発症のリスクは否

定できるものではなく、今後も更なる注意を払っていく必要がある。

(2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

Satoko Handa-Miya, Bon Kimura, Hajime Takahashi, Miki Sato, Tatsuya Ishikawa, Kazunori Igarashi and Tateo Fujii. 2007. Nonsense mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan. *International Journal of Food Microbiology* 117(3), 312-318. (論文添付)

Hajime Takahashi, Satoko Handa-Miya, Bon Kimura, Miki Sato, Asami Yokoi, Seitaro Goto, Itaru Watanabe, Takashi Koda, Kazuo Hisa and Tateo Fujii. 2007. Development of multilocus single strand conformation polymorphism (MLSSCP) analysis of virulence genes of *Listeria monocytogenes* and comparison with existing DNA typing methods. *International Journal of Food Microbiology* 118(3), 274-284. (論文添付)

Satoko Miya, Bon Kimura, Miki Sato, Hajime Takahashi, Tatsuya Ishikawa, Takayuki Suda, Chikako Takakura, Tateo Fujii, and Martin Wiedmann. 2008. Development of multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains. *International Journal of Food Microbiology* 124(3), 239-249. (論文添付)

Hajime Takahashi, Satoko Miya, Kazunori Igarashi, Takayuki Suda, Shintaro Kuramoto, and Bon Kimura. Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolates from raw ready-to-eat seafood. (印刷中)

(3) 特許及び特許出願の数と概要

なし

(4) その他 (各種賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

なし

3 今後の問題点等

本研究を行った結果、RTE 水産食品における Lm の分布状況、及び分離株の病原性の観点から、わが国に流通する RTE 水産食品にリステリアリスクがないと言い切ることはできない。特に、リスクグループに属する人々(妊婦、免疫不全者、高齢者等)は少量の菌数摂取で発症する可能性があり、また、致死率も高いため(20-30%)、重要な問題となる。食品由来のリステリア症が多発している欧米とは異なり、わが国ではいまだに1件の食中毒(北海道においてナチュラルチーズにより発生)が判明しているのみであるが、実際にはその発生状況を正確に把握できていない可能性がある。今後はわが国のリステリア症患者から分離された株の性状を検証し、国内リステリア症の実態を調査することが必要になるであろう。

また、本菌は工場や小売店舗内での二次汚染が一般的に疑われているが、これを明らかにするためには、工場や小売店舗内を拭き取り等により調査し、汚染源を追及していくことも必要である。