

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	食品を介するリステリア感染症に係わる高病原性リステリア株の評価と生体側の要因を加味した食品健康影響評価に関する研究（課題番号：1101） （研究期間：平成23年度～平成25年度）
主任研究者名	研究者名：五十君 静信 所属機関：国立医薬品食品衛生研究所

リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*; LM) は環境に広く分布し、食品からもしばしば分離される。喫食前の加熱処理をしない調理済食品においては、国内の市販食品から平均約2%程度のLMが分離される。日本人は生食が多く調理済食品の種類も多いため、欧米先進国に比べ食品を通じLMに曝される機会は多いと思われる。食品を通じ本菌に曝される機会は多いが、重篤なリステリア感染症を発症する患者は極端に少ない。重篤なリステリア感染症の発症は生体側の免疫との関わりがあり、宿主側の要因が強く働いているためであると理解されている。2004年のFAO/WHOの専門家会議によるLMのリスク評価では、LMの菌株毎の病原性の違いについては未だ科学的に十分解明されておらず、血清型や特定の菌群に関し病原性の違いの有無を言える段階ではないとして、LMを一律同様な扱いとしてリスク評価を行っている。一方、ヒト臨床から分離される血清型は特定の血清型に偏っており、国内のヒト臨床分離株の65%以上は血清型4bであり、食品や環境由来株の血清型の分離頻度の傾向とは明らかに異なっている。

本研究ではLMの侵入メカニズムが、継代細胞やヒトの腸管に類似している感染モデル動物としてスナネズミを用いてLM菌株の病原性を評価し、高病原性株の存在を明らかにした。血清型4bは高病原性であり、ほぼいずれの株も高病原性と考えて良いと思われた。血清型1/2aと1/2bの検討ではこれらの血清型の一部に高病原性が認められた。一方、食品や環境からしばしば分離されるその他の血清型には、ほとんど病原性が無いと思われた。LMの病原性は一律に考えることは出来ず、血清型4bと血清型1/2a、1/2bの一部の高病原性の菌株をどのようにコントロールするかが重要である。

また、スナネズミを用いた実験により、あらかじめ少量のLMに曝された場合、その後大量のLMに曝されても感染が軽度で済むことが証明された。すなわち、通常の商品摂取時のような低菌数のLMへの暴露があれば、その後の高病原性のLMの高菌数の暴露に対して、明らかに発症を抑える経口ワクチン効果があることが示された。スナネズミを用いたLMの経口ワクチン効果はヒトにおいても同様に起こっている可能性は高く、このような観点からLMの制御を考えていく必要があることが示された。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	食品を介するリステリア感染症に係わる高病原性リステリア株の評価と生体側の要因を加味した食品健康影響評価に関する研究 (研究期間：平成23年度～平成25年度)
主任研究者名	所属：国立医薬品食品衛生研究所 氏名：五十君 静信（研究課題番号：1101）

I 研究の期間及び研究目標等

1 研究期間：平成23年度～25年度（3年間）

2 研究目的

リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*; LM)は、環境に広く分布し、食品からしばしば分離される。生の食肉では10～40%からLMが分離されており、食肉の加熱が不十分であるとヒトは喫食によりLMに曝されることとなる。喫食前の加熱処理をしない調理済食品に於いては、国内の市販食品から平均約2%程度のLMが分離される。日本人は生食が多く、調理済食品の種類も多いため、欧米先進国に比べ食品を通じLMに曝される機会は多いと思われる。国内の健康成人の糞便からのLMの分離は1.3%と報告されており、この値は食品摂取によりLMがヒト消化管を通過し糞便から検出されているものと思われる。一方、国内の重篤化したリステリア感染症の患者数は100万人あたり年間平均0.65と推定されている。ヒトは食品を通じ本菌に曝される機会は多いと思われるが、重篤なリステリア感染症を発症する患者は極端に少ない。そしてその理由についてははっきりしていない。

一般的な解釈としては、重篤なリステリア感染症の発症は生体側の免疫との関わりがあるため、宿主側の要因が強く働いているためであると理解されている。2004年のFAO/WHOの専門家会議によるLMのリスク評価書では、LMの菌株毎の病原性の違いについては、未だ科学的に十分解明されておらず、血清型や特定の菌群に関し病原性の違いの有無を言える段階ではないとして、LMを一律同様な扱いとしてリスク評価を行っている。一方、文献的には、ヒト臨床から分離される血清型は、特定の血清型に偏っていることが報告されている。例えば、国内のヒト臨床分離株の65%以上は血清型4bであり、食品や環境由来株の血清型の分離頻度の傾向とは明らかに異なっている。海外においてもヒト臨床で分離されるLMは特定の血清型に偏りがあることが報告されている。近年、LMの株間の病原性の違いを示す論文が報告されはじめている。もし特定の血清型や菌群が高病原性であり、実際に食品を汚染している高病原性のLMがそれほど多くないとすれば、当初の疑問であるLMが食品を広く汚染しているにもかかわらず、重篤なリステリア感染症患者在極端に少ないことの説明ができる。高病原性株が存在し、食品や環境中の高病原性株を識別し、その集団を特定することができれば、LMのリスク評価は格段に正確に行うことが可能となる。また、このような知見や、生体側の要因に関する知見を得ることは、LMの食品健康影響評価を行うために必須である。

そこで、本研究では、ヒト臨床分離株と食品や環境由来株を対比させ、遺伝子レベルでの株間の相違を明らかにし、細胞や動物実験による病原性評価の結果を合わせて、高病原性 LM の特徴に関する情報とその検知法を提供し、得られた検知法を用いて、高病原性 LM が食品や環境中にどのような頻度でどのように分布しているかの情報を提供することを目的とする。また、検討した動物評価系を用いて、宿主側の要因につき検討し、LM の発症に至る過程を考察する。これらの知見を総合的に考察し、LM の食品健康影響評価を試みる。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
(1) 高病原性株と生体側の要因を加味した食品健康影響評価	1) 病原性評価法の開発 2) 生体側の免疫効果の評価検討 3) 高病原性株や免疫効果を加味した食品健康影響評価	五十君 静信 (国立医薬品食品衛生研究所)
(2) 血清型 4b のリステリアの遺伝子レベルの解析と病原性評価	4) LM 血清型 4b 菌株群の病原性評価法の確立 5) LM 血清型 4b 菌株群における高病原性株の同定と感染リスク評価 6) LM 血清型 4b 菌株群における高病原性株識別マーカーの同定	岡田 由美子 (国立医薬品食品衛生研究所)
(3) 血清型 4b 以外のリステリアにおける主要病原性遺伝子の発現制御分布と病原性評価系に関する検討	7) 血清型 4b 以外の高病原性株の評価 8) 菌株の病原性の評価手法に関する検討	朝倉 宏 (国立医薬品食品衛生研究所)
(4) 食品・環境由来株の病原性に関する検討	9) 食品・環境由来株の収集と性状検査 10) 高病原性 LM マーカーの分布調査	田中 廣行 (財団法人 日本食品分析センター) 天野 富美夫 (大阪薬科大学)

4 倫理面への配慮について

本研究では、実験動物を用いた病原性評価を行うため、“国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適正な実施に関する規程”に基づき、動物実験計画書を作成し、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験審査委員会の審査を受けた後、“国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針”に従い動物愛護の精神をもって動物実験を行った。病原体等の

取扱は、“国立医薬品食品衛生研究所病原体等安全管理規程”に従い、適切な取扱を行った。

II 研究内容及び成果等

1 研究内容及び方法

(1) 研究項目名：高病原性株と生体側の要因を加味した食品健康影響評価（研究担当者名：五十君静信 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）

1) 個別課題名：病原性評価法の開発

ヒト腸管上皮由来培養細胞であるCaCo-2細胞やT84細胞等への付着性・細胞内増殖性及び細胞間拡散性等による病原性の差異を解析する*in vitro*評価系と、マウスなどの実験動物を用いて、リステリア分離株の脾臓・肝臓等臓器内での消長を測定することによる*in vivo*評価系を作出し、病原性評価手法を検討する。

2) 個別課題名：生体側の免疫効果の評価検討

マウスを用いた病原性評価系や、分担研究者が開発したスナネズミやモルモットを用いた*in vivo*評価系を比較・検討して、感染モデル系として最も適当と思われる評価系を選択する。高病原性リステリアと評価された株や食品や環境由来株を用いて、低菌数の暴露の後、高菌数の高病原性リステリアの経口感染をおこない、リステリア感染症発生の有無を観察し、生体側の要因によるリステリア感染症発症の可能性について評価を行う。

3) 個別課題名：高病原性株や免疫効果を加味した食品健康影響評価

同定された高病原性株及び低病原性株の食品や環境中での分布状況、生体における免疫効果などを加味した食品健康影響評価を試みる。

(2) 研究項目名：血清型4bのリステリアの遺伝子レベルの解析と病原性評価（研究担当者名：岡田由美子 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）

4) 個別課題名：LM血清型4b菌株群の病原性評価法の確立

過去の研究により明らかにされた病原遺伝子保有状況の異なる血清型4b菌株群の中から代表的な株を数株使用して、ヒト腸管上皮由来培養細胞であるCaCo-2細胞やT-84細胞等に一定時間感染させ、細胞への付着性の観察、細胞外の菌体を抗生剤で殺菌した後に細胞を溶解して菌数を測定する細胞内増殖性、スライドグラス上で培養した細胞及び感染菌体を顕微鏡で観察することによる細胞間拡散性等の手法を用いて病原性の差異を解析する*in vitro*病原性評価系を作出する。また、本菌の上皮細胞進入因子であるinternalinに対するレセプターがヒト型と相溶性が高いスナネズミやモルモットを用いて、同様の菌株を経口投与し、数日後に脾臓・肝臓等から菌を回収することによる*in vivo*病原性評価系を作出する。シクロスポリンA等の免疫抑制剤投与により免疫を低下させた動物及び妊娠動物を用いて同様の試験を行い、リステリア感染症ハイリスク群への感染モデルとした評価系を確立する。

5) 個別課題名：LM血清型4b菌株群における高病原性株の同定と感染リスク評価

個別課題名1)で確立された病原性評価系を用いて、研究室保有の臨床、食品及び環境由来血清型4b菌株群の病原性評価を行う。各菌株における病原遺伝子保有状況をPCR、Southern Hybridization等によって解析し、それらの病原性の高低との相関を明らかにし、ヒトにとっての感染リスクが高い可能性のある株を同定する。

6) 個別課題名：LM 血清型 4b 菌株群における高病原性株識別マーカーの同定

同定された高病原性株及び低病原性株を用い、全塩基配列解析の結果得られた配列の比較を行う。高病原性株に特異的な配列や発現を示すものについて、それらをマーカーとして迅速簡便に高病原株を検出できるプライマー、プローブ等を作成する。

(3) 研究項目名：血清型 4b 以外のリステリアにおける主要病原性遺伝子の発現制御分布と病原性評価系に関する検討（研究担当者名：朝倉宏 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）

7) 個別課題名：血清型 4b 以外の高病原性株の評価

血清型 4b 以外の LM 株を対象に、複数の病原遺伝子の保有状況とそれらの転写活性を RT-PCR により評価する。更に、それぞれの遺伝子制御に関わる主要遺伝子群の機能性についても併せて検証することで、ターゲットとする病原遺伝子群の機能性を明らかにする。準備段階として行った成績より、2001 年に国内で発生した集団食中毒事例由来株（血清型 1/2b）のうち、特に酸抵抗性の強い食品（チーズ）由来株はマウス生体を通過させることで、酸抵抗性を減弱させる現象を見出した。生体通過により酸感受性となった菌株は、同事例におけるヒト臨床分離株と同様に、RNA ポリメラーゼ SigmaB (SigB) を発現しえない状況となっていた。SigB は、LM の主要な病原因子である InlB（細胞侵入に関与）やリステリオリジン LL0（溶血毒素）の発現制御に関与することが近年報告されており、SigB をマーカーとする菌株の病原性発現評価も考慮に入れて検討を行いたい。

8) 個別課題名：菌株の病原性の評価手法に関する検討

上述のとおり、LM の病原性発現には複数の病原遺伝子の関与が広く知られているが、とりわけリステリオリジン (LL0) は、マクロファージ細胞における Phagosome から Cytosol への拡散、すなわち宿主免疫応答への回避過程において重要な役割を担う。LL0 検出には、多くの場合、溶血を指標とした表現形質の測定が用いられるが、近年では、LM の菌体内に滞留する LL0 は、免疫原性は有するものの、生体感染時における LM の病原性発現、すなわち回避機構そのものには作用しないとの報告がある (Carrero et al., 2009)。一方で、抗原性を顕す LL0 産生株は、in vitro 下において培養上清中に LL0 を分泌することが知られている (Cabrita et al., 2010 Talanta. 83(2): 457-463.)。そこで、本研究では LL0 をはじめとする分泌型の病原性因子について、タンパクレベルでのプロファイル (Secretome) を多数の LM 株間で比較検討し、上述の遺伝子保有状況および転写活性に関するデータと併せて、総合的に菌株の病原性に関する情報を整理する予定である。

上記の研究項目は、菌株の側面からみたプロファイリングである。しかしながら、病原性の強弱を測るためには、宿主との相互作用および病態形成についての検討が必須である。こうしたことから、本研究課題では、培養細胞系を用い、LL0 に対する免疫応答にかかる宿主因子をマーカーとした細胞評価系の構築を試み、病原性評価系としての有用性を検証した上で、菌株のプロファイリングデータと

の互換性を検討したい。必要に応じて、実験動物を用いた検証も併せて行う。

(4) 研究項目名：食品・環境由来株の病原性に関する検討（研究担当者名：天野富美夫 所属機関名：大阪薬科大学）

9) 個別課題名：食品・環境由来株の収集と性状検査（平成 23 年度研究担当者名：田中廣行 所属機関名：財団法人 日本食品分析センター）

食品および環境材料から LM を分離する。分離された LM 株およびこれまでに収集した LM 株について血清型、生化学性状等を検査し、その結果に基づき分子レベルの検討を行う株を選別する。

10) 個別課題名：高病原性 LM 菌株の病原性の検討（平成 24-25 年度研究担当者名：天野富美夫 所属機関名：大阪薬科大学）

本研究の別項目で設定された高病原性 LM マーカーについて食品および環境由来株における分布状況を調査する。病原性評価法の開発を個別課題 1) と協力して行う。

2 研究成果、考察、今後の課題

(1) 研究項目名：高病原性株と生体側の要因を加味した食品健康影響評価（研究担当者名：五十君 静信 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）

1) 個別課題名：病原性評価法の開発

マウスを用いた病原性評価系や、分担研究者が開発したスナネズミを用いたin vivo評価系を比較・検討して、感染モデル系として最も適当と思われるスナネズミの評価系を用い、生体側の要因によるリステリア感染症発症の可能性について評価を行った。実験動物特にスナネズミを用いた評価法の研究結果については、研究分担者：岡田由美子が詳しくまとめた。また、カイコを用いた病原性評価法を新たに開発し、研究分担者：朝倉宏が詳しくまとめた。さらに、細胞を用いた評価法については、研究分担者：天野富美夫が詳しくまとめた。

2) 個別課題名：生体側の免疫効果の評価検討

低菌数の暴露の後、高菌数の高病原性リステリアの経口感染については、初年度、マウスの評価系でワクチン効果が観察されたことから、平成24-25年度は、ヒトの腸管上皮細胞との類似性が高くLMの腸管からの進入メカニズムが類似していると考えられるスナネズミを用いて評価を行った。実験では、スナネズミに一頭あたり 10^4 CFU、 10^6 CFUのLM LC6株経口的に投与し、7日後に 10^8 CFUのLMを経口的に暴露させ、暴露4日後の脾臓中の菌数を測定した。評価法の概要は図1に示す。LMを投与されていないコントロール群では、7頭すべてから菌が検出されたのに対し、あらかじめLMを与えられている群は、 10^4 CFU投与群、 10^6 CFU投与群では、それぞれ10頭中7頭、7頭中4頭からは菌が検出されなかった。検出された個体については、コントロール群では、LMの脾臓中の菌数は個体あたり $10^3 \sim 10^8$ CFUであったのに対し、あらかじめ低菌数を与えていた群では、 $10^2 \sim 10^3$ CFUであった。図2に個体ごとの脾臓中から検出されたLMの菌数を示す。感染実験後陰性対照（コントロール）群では3頭が死亡したが、あらかじめ低菌数を投与した群では、投与によるてんかん発作以外では死亡したスナネズミはいなかった。スナネズミの評価系は、投与に伴いてんかん発作により死亡することも多く、実験はマウスに比べると高い技術が求められる。そのため実験結果は安定せず、個体ごとのばらつきが大きいことが、病原性評価の実験でも明らかとなっている（研究分担者岡田の結果参照）。今回の実験では、あらかじめ投与した菌数のレベルの違いによる効果の差までははっきりしなかったが、あらかじめ低い菌数のLMへの感作があると、感作がない場合はほぼ全数から検出される菌数投与で、半数以上の個体の脾臓から菌が検出されなくなった。この結果から“免疫効果”はあると思われる。どの程度低い菌数で効果があるのか、その効果がどの程度持続するかについては今後検討する必要があると思われる。

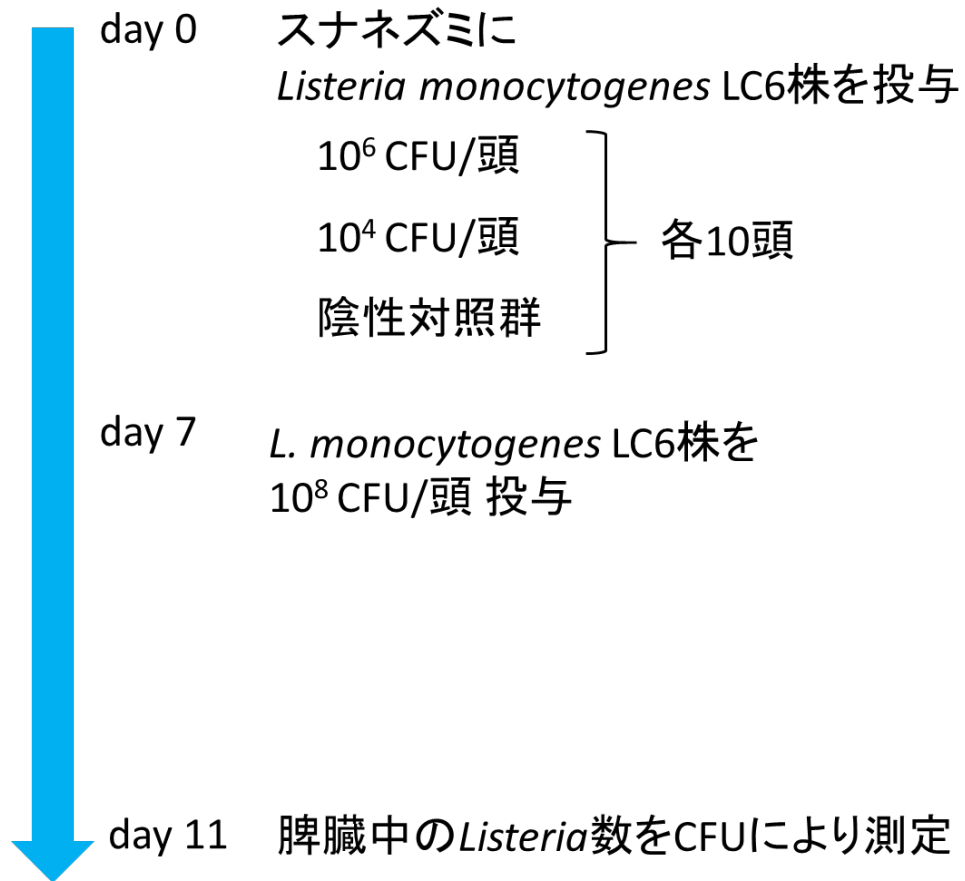


図1. スナネズミを用いた低菌数LM暴露によるワクチン効果評価法

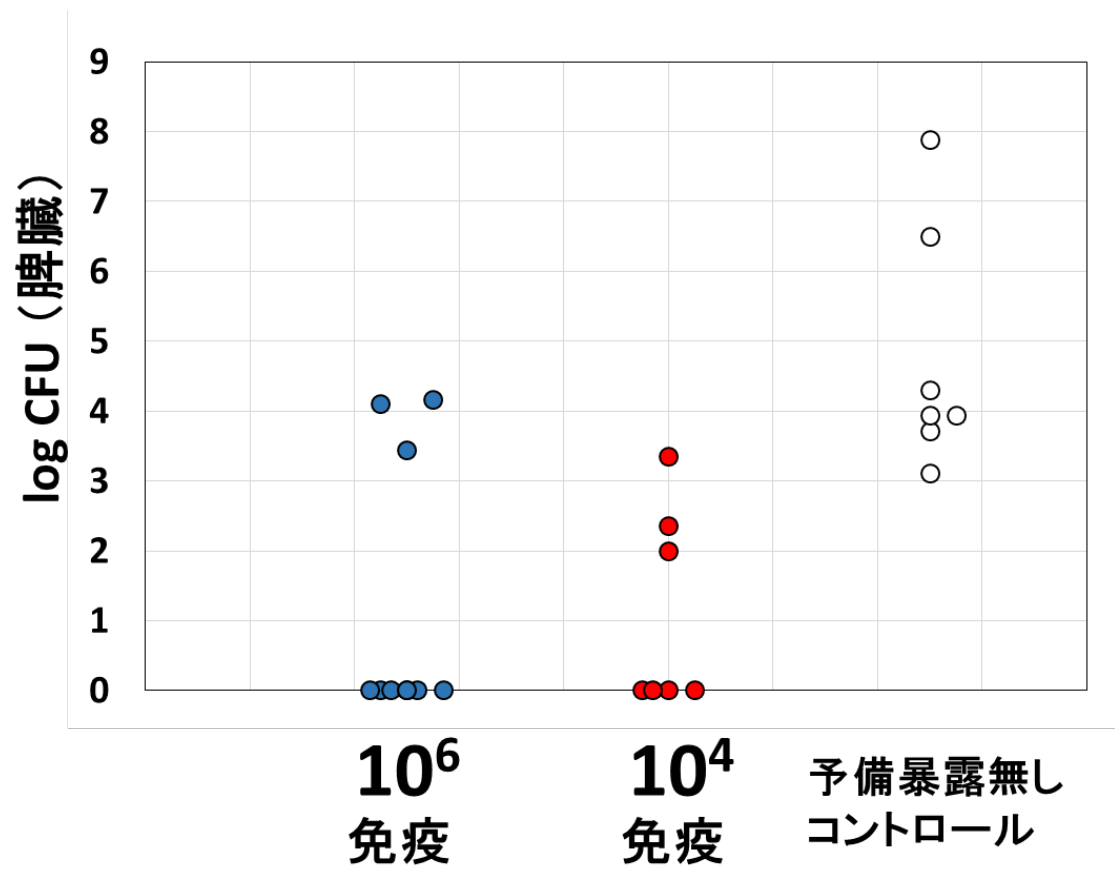


図 2. スナネズミを用いた低菌数 LM 暴露によるワクチン効果

3) 個別課題名：高病原性株や免疫効果を加味した食品健康影響評価

研究分担者：岡田由美子から血清型4bに関する病原性の評価、朝倉宏から4b以外の血清型に関する病原性の評価、天野富美夫からの細胞による評価結果を受けて、同定された高病原性株及び低病原性株の食品や環境中での分布状況から、LMのリスク評価は病原性を加味して行う必要があることを確認した。

国内のリストeria菌株の分離状況と血清型の割合について、総括したものを図3に示した。臨床分離株は、約65%が、血清型4bで、次いで1/2bが約20%、1/2aが10%弱であった。その他の血清型は、ほとんど分離されていない。一方、食品分離株は、1/2a、1/2b、1/2cがほぼ同様な割合で分離されており、次いで4bが分離されていた。環境からの分離株を見ると1/2cが約70%分離されており、次いで1/2b、1/2a、4bの順で分離されている。環境中や食品のデータは、ある程度検査対象が偏っていることもあり、バイアスがかかったデータであることは否定できないが、臨床分離株のデータから、LMで病原性が強く重要な血清型は、ほぼ4b、1/2b、1/2aを検討すれば良く、その他の血清型は、環境や食品からの分離頻度などを考慮しても病原性の強いと思われる株の存在は非常にまれであると思われる。今回はこれら3つの血清型を主な対象として病原性に関する検討を重点的に行っている。

総合的に考えると、血清型4bについては、病原性の強弱はある程度認められるものの、この血清型については、JEMRAなどで行われたリスク評価に用いられた感受性および健康者集団に対する用量反応曲線（図4）を、用いて評価するのが、妥当であると結論された。病原性の評価を試みたが、試験方法によりその評価は別れ、カイコの致死による評価では、他の血清型と比べ4b株は致死性が高い結果が得られた。若干の病原性はあるとは思われるが、4bについては一律の評価で良いと考えられた。

一方、血清型4b以外の血清型では、1/2aと1/2bが重要である。それ以外の血清型については、臨床分離例が少なく、一般的に病原性はあまりないと思われる。血清型1/2aと1/2bについては、今回の検討から、いずれも遺伝子レベルでの多様性が非常に広いことが確認された。さらに菌株間の病原性の違いは顕著であり、これらの血清型の菌株をすべて同様に考えて上述の用量反応曲線を用いて評価することは、LMのリスク評価としては、過大評価となると考えられる。現段階では、各種の病原性や遺伝子レベルの評価結果から、いくつかのマーカーとなりそうな候補が示されたが、菌株の多様性は非常に大きく、一律の方法で病原性を評価できるとされるマーカーの特定にまでは至らなかった。現段階で、定量的な評価を行うことは難しい。環境分離株の70%を占め、食品からも頻繁に分離される1/2cについては、病原性のある菌株は非常にまれであると考えられ、LMのリスク評価の対象としての重要性は低く、臨床分離率の2%程度の重み付けで評価を行うか、評価対象として除外しても差し支えないと思われた。それ以外の血清型については、リスク評価の対象外として良いと思われる。

	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	4a	4b	4c	4e	6a(4f)	other
食品以外	57	82	601	0	0	0	30	0	1	4	51
食品由来	129	115	134	1	2	6	69	1	0	12	19
臨床由来	7	21	2	1	2	0	65	0	0	0	0

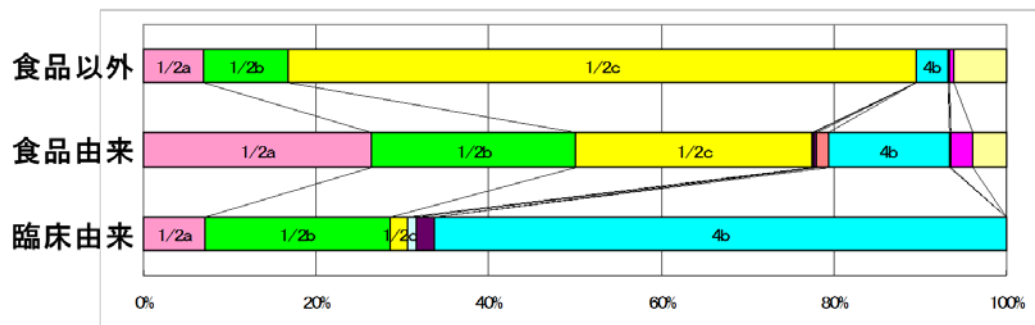


図3. 国内のリステリア菌株の分離状況と血清型の割合

厚生労働科学研究費補助金平成13～15年度研究報告書“食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究”のデータを基に、一部菌株データを追加し作成。

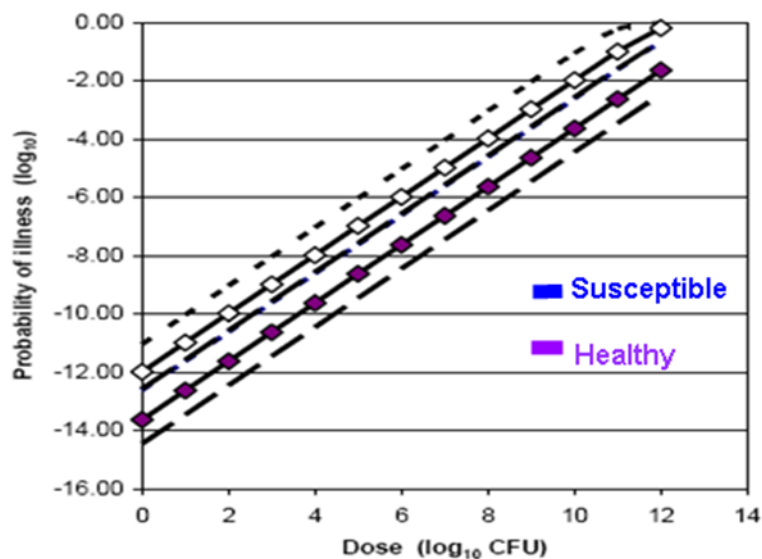


図4. 感受性および健常者集団に対する用量反応曲線

(WHO/FAO 2004 Microbiological Risk Assessment Series 4より引用)

今回の研究により明らかとなった最も重要な知見としては、LM感染には、生体における免疫効果などを加味した食品健康影響評価の必要性が示されたことである。従来の病原菌のリスク評価では、生体側の免疫効果に関する考慮がされることは無かった。あらかじめ低菌数の暴露を受けたマウスでは、致死量を超えるLMの暴露を受けてもほぼ100%のマウスが生残することを明らかにした。さらに、腸管の上皮細胞が、ヒトの腸管と類似しており、LMの腸管からの進入メカニズムがヒトと類似していると考えられているスナネズミの実験では、経口投与による同様な“ワクチン効果”が確認された。このことは、ヒトにおけるリステリア感染初期の状況も同様と考えられ、LMに関しては、日常的に起こる低菌数のLMの暴露は、リステリアの感染発症を抑える効果があることを示している。すなわち、リステリアへの暴露が無い状況では、LM感染が容易に起こり、かつ重篤化しやすいことを示しており、今後はこのような低い菌数による暴露による経口感作の影響を加味したリスク評価が求められる。

(2) 研究項目名：血清型4b のリステリアの遺伝子レベルの解析と病原性評価（研究担当者名：岡田由美子 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）（研究協力者名：鈴木穂高、百瀬愛佳 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）

4) 個別課題名：LM 血清型4b 菌株群の病原性評価法の確立

高齢者及び免疫弱者等のリステリア症ハイリスクグループにおけるLM血清型4b 菌株群の病原性評価法を作成するため、リステリアの上皮細胞進入因子であるinternalinA及びinternalinBに対するレセプターE-cadherin及びMetがヒト型と相同性が高いスナネズミに、免疫抑制剤であるシクロスポリンAをあらかじめ投与したうえで、24時間後に血清型4b 菌株を経口投与し、感染後4日に脾臓・肝臓等から菌を回収することによる*in vivo*病原性評価系を作出した。腹腔内投与で用いるシクロスポリンAの1頭当たりの投与量は、昨年度からの検討で十分な免疫不全効果を示しながら感染症死を起こさないことが明らかとなった1.875mgとした。シクロスポリンA投与スナネズミと非投与スナネズミそれぞれをLMに感染させたのちの血液生化学性状を解析し、感染性以外に大きな影響がないことを確認した（表1）。また、スナネズミの特徴であるてんかん様発作による誤嚥が多くみられたことから、接種菌量を昨年度の0.5mlから0.2mlに変更したところ、誤嚥による死亡を大幅に減少させることが可能となり、免疫弱者におけるLM血清型4b 菌株群の病原性評価法が確立された。

表1. シクロスポリンA投与及び非投与スナネズミのLM感染時における血液生化学性状

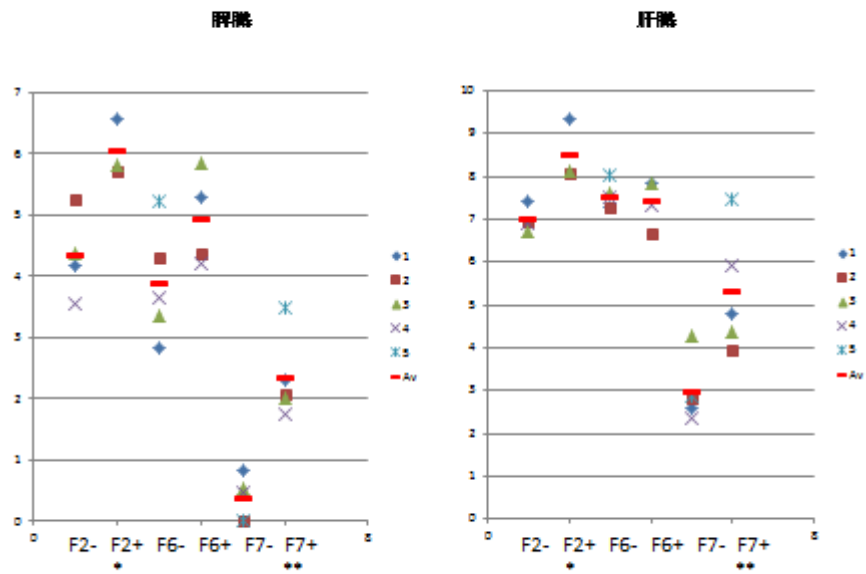
	CA+LM+				CA-LM+				CA-LM-				CA+LM-			
	1	2	3	Av	1	2	3	Av	1	2	3	Av	1	2	3	Av
GLU	82	21	166	89.7	141	172	221	178.0	155	226	310	230.3	165	173	78	138.7
NH3	409	408	519	445.3	374	416	534	441.3	319	404	584	435.7	300	347	489	378.7
GGT	4	3	2	3.0	1	1	14	5.3	2	4	5	3.7	3	3	13	6.3
GOT	981	1000	1000	993.7	846	507	967	773.3	325	273	424	340.7	209	310	1000	506.3
GPT	470	1000	249	573.0	239	162	275	225.3	71	83	109	87.7	85	88	386	186.3
ALP	492	640	448	526.7	346	284	317	315.7	615	621	702	646.0	440	410	611	487.0
BUN	15	108.6	15	46.2	21.4	21.1	20.4	21.0	31.5	28.6	28.9	29.7	24.9	17.3	17.9	20.0
TG	56	127	78	87.0	247	225	273	248.3	227	184	155	188.7	223	123	136	160.7
TCHO	112	100	138	116.7	129	120	117	122.0	105	89	148	114.0	97	80	144	107.0
TP	6.8	6.4	8	7.1	5.6	5.6	5.3	5.5	5.8	6.1	6.7	6.2	6.7	6.2	6.4	6.4
ALB	3.5	3.1	3.6	3.4	3.4	3	2.9	3.1	3.7	3.7	4.3	3.9	3.8	3.7	4.1	3.9
TBIL	0.9	0.8	0.4	0.7	0.3	0.3	0.8	0.5	0.4	0.2	0.6	0.4	0.3	0.3	0.8	0.5
UA	5	2	8	5.0	6.5	8.7	8.7	8.0	1.1	2.3	4.3	2.6	1.4	1.8	1.1	1.4
CRE	0.2	0.4	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
AMY	241	535	247	341.0	160	140	138	146.0	146	160	147	151.0	180	150	114	148.0
LDH	72	434	94	200.0	88	37	181	102.0	29	24	43	32.0	9	18	101	42.7
Na	-	143	140	141.5	153	149	147	149.7	155	156	156	155.7	157	155	153	155.0
K	-	7.6	13.3	10.5	8.5	8.6	13.1	10.1	6.8	7.8	11.1	8.6	5.4	6.1	10.5	7.3
Cl	-	102	102	102.0	106	108	109	107.7	107	112	107	108.7	113	111	113	112.3
CFU in spleen	5.85	6.34	5.02	5.74	1.74	1.59	1.58	1.64	-	-	-		-	-	-	

5) 個別課題名：LM 血清型 4b 菌株群における高病原性株の同定と感染リスク評価

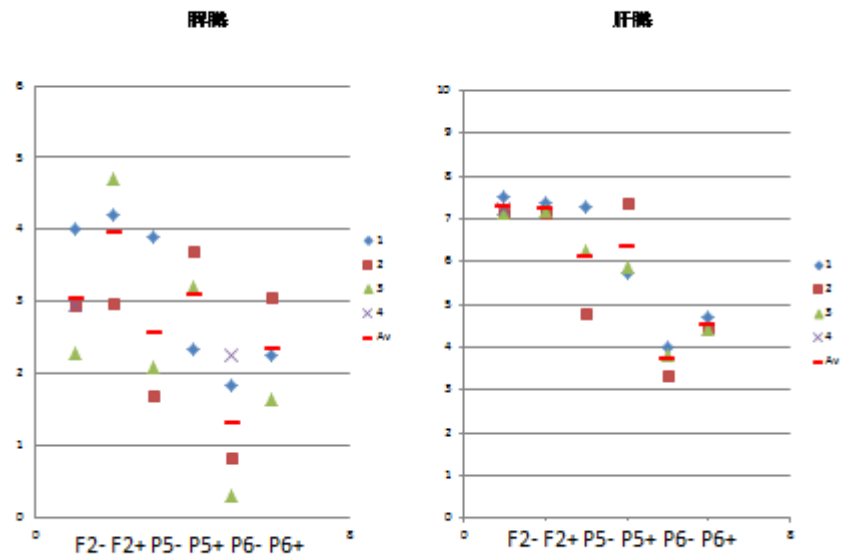
昨年度の個別課題名 1) で確立された病原性評価系を用いて、研究室保有の臨床、食品及び環境由来血清型4b菌株群の病原性評価を行った。10月末までに、食品由来株及び臨床由来株各6株の計12株について検討した。その結果、臨床由来の2株を除く12株でシクロスポリンAの全投与による臓器からの回収菌量の増加がみられた。シクロスポリン非投与群では、食品由来株でコントロール株と同等の病原性を示した株が2株、低い病原性を示した株が3株みられ、臨床由来株では同等の病原性を示した株が3株、低い病原性を示した株が3株であった。シクロスポリンA投与群では、食品由来株でコントロール株よりも低い病原性を示した株が4株みられ、豚肉由来の1株はシクロスポリンA処理によりコントロール株よりも病原性が増強した。臨床由来株ではコントロール株と同等の病原性を示した株が2株、コントロール株以上の増強を示した株が1株、低い病原性を示した株が3株であった。今回の結果より、シクロスポリンA非投与群では非常に弱い病原性を示した株でも、シクロスポ

リンA投与による免疫不全状態では病原性の大幅な増強がみられることが明らかとなり、LM血清型4b菌株群においては個々の菌株の病原性以上に宿主の免疫状態が重篤度にかかわる可能性が高いことが示された。1また、免疫不全群及び健常群の病理組織学的な解析を実施したところ、12株中8株（F2, F4, F6, F7, P1, P3, P5, P7）で髄膜炎や限局性脳炎が観察された（表2）。脳脊髄膜炎症状が見られた8株のうち6株は、シクロスポリンAを投与した免疫不全状態でのみ症状が見られたが、患者由来の1株（P5）はシクロスポリンA非投与で、別の1株（P1）は投与及び非投与のいずれにおいても症状が見られた。脳脊髄膜炎症状が見られなかった4株はいずれも、スナネズミの脾臓及び肝臓からの回収菌数がコントロール株よりも低い株であった（P6, P8, F10, F11）。一方、脾臓及び肝臓からの回収菌数がコントロール株よりも有意に低いにもかかわらず、脳脊髄膜炎症状を示した株（F7）も見られた。以上の結果から、脳脊髄膜炎が人と同様主に免疫不全状態のスナネズミに表れており、今回の感染系が人のリステリア症脳脊髄膜炎モデルとして利用しうることが示された。また、肝臓及び脾臓への移行性が低い株（F7）においても、免疫不全動物には脳脊髄膜炎症状を引き起こしうることが明らかとなった。更に、患者由来の2株（P1及びP5）において、免疫不全状態でなくとも脳脊髄膜炎症状を示す例があり、そのうち1株は肝臓及び脾臓からの回収菌数が低かったことから、リステリアによる敗血症と脳脊髄膜炎のリスクを一律に評価できない可能性が示唆された。

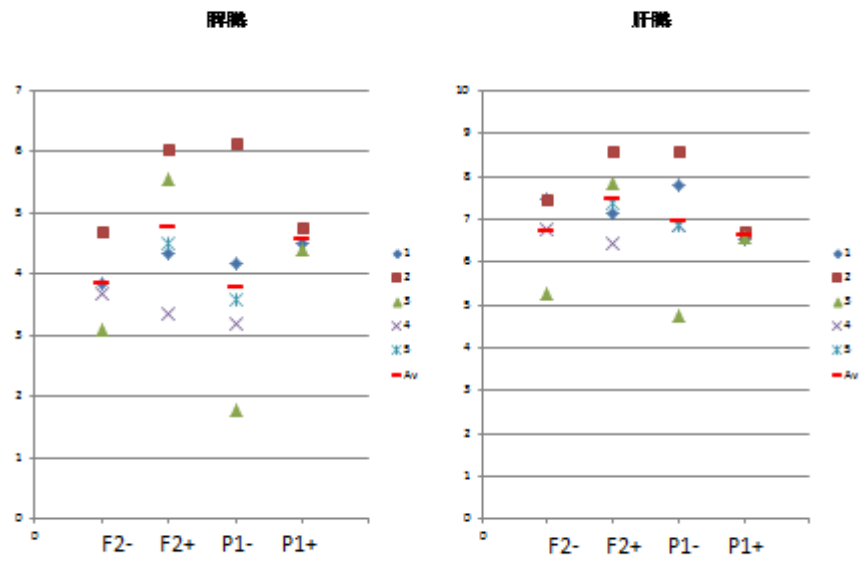
シクロスポリンA投与(+)及び非投与(-)スナネズミからのLM回収(CFU(log)/organ) (1)



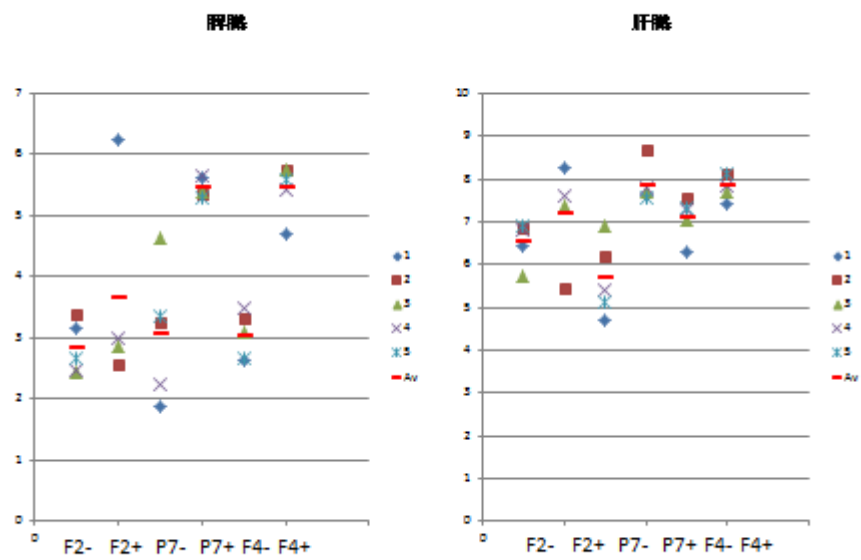
シクロスポリンA投与(+)及び非投与(-)スナネズミからのLM回収(CFU(log)/organ) (2)



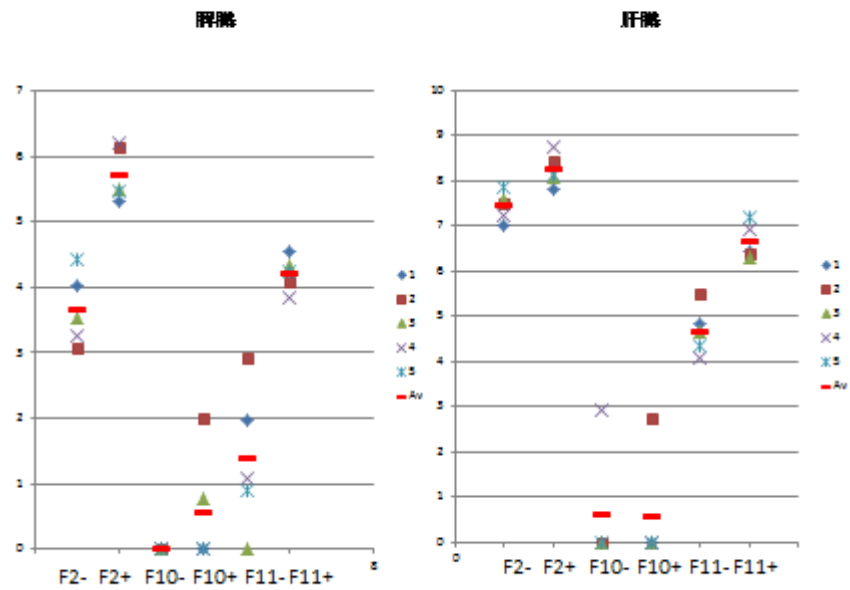
シクロスポリンA投与(+)及び非投与(-)スナネズミからのLM回収(CFU(log)/organ) (3)



シクロスポリンA投与(+)及び非投与(-)スナネズミからのLM回収(CFU(log)/organ) (4)



シクロスポリンA投与(+)及び非投与(-)スナネズミからのLM回収(CFU(log)/organ) (5)



シクロスポリンA投与(+)及び非投与(-)スナネズミからのLM回収(CFU(log)/organ) (6)

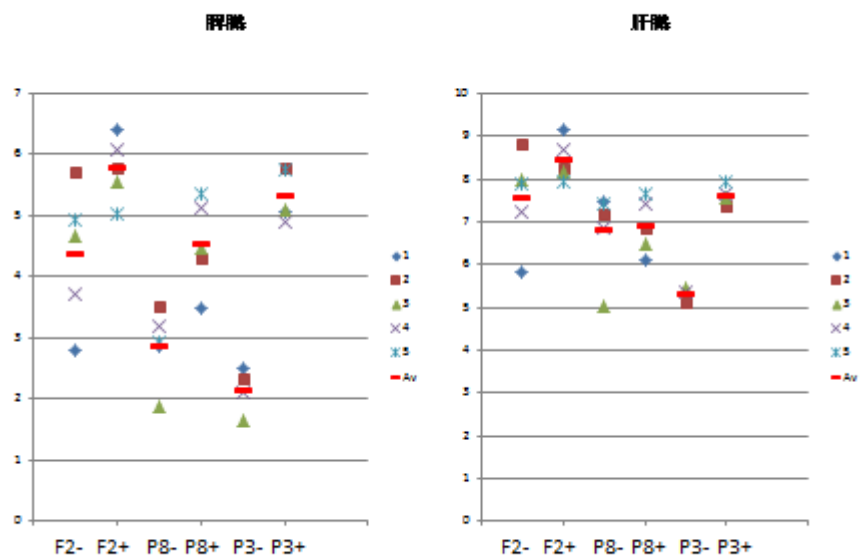


表2. シクロスポリン投与及び非投与スナネズミのリステリア感染後の脳脊髄膜炎症状

	菌株番号及び CA	右		左	
		髄膜炎	限局性脳炎	髄膜炎	限局性脳炎
1	F2-	-	-	-	-
2	F2-	-	-	-	-
3	F2-	-	-	-	-
4	F2-	-	-	-	-
5	F2-	-	-	-	-
6	F2-	-	-	-	-
7	F2-	-	-	-	-
8	F2+	-	-	-	-
9	F2+	-	-	-	-
10	F2+	1	-	1	-
11	F2+	1	-	2	2
12	F2+	-	-	-	-
13	F2+	-	-	-	-
14	F2+	-	-	-	-
15	F4-	-	-	-	-
16	F4+	1	-	1	-
17	F6-	-	-	-	-
18	F6+	1	-	1	-
19	F7-	-	-	-	-
20	F7+	1	1	1	-
21	F10-	-	-	-	-
22	F10+	-	-	-	-
23	F11-	-	-	-	-
24	F11+	-	-	-	-
25	P1-	-	-	-	-
26	P1-	1	2	2	2
27	P1+	1	-	1	-
28	P1+	-	-	-	-
29	P3-	-	-	-	-
30	P3+	1	-	1	-
31	P5-	1	-	1	-
32	P5-	-	-	-	-
33	P5+	-	-	-	-
34	P6-	-	-	-	-

35	P6-	-	-	-	-
36	P6+	-	-	-	-
37	P7-	-	-	-	-
38	P7+	1	-	1	-
39	P8-	-	-	-	-
40	P8+	-	-	-	-

6) 個別課題名：LM 血清型 4b 菌株群における高病原性株識別マーカーの同定

これまでに実施した3株の血清型4b株の全ゲノム塩基配列解析の結果を解析し、血清型4bの標準菌株であるF2365株の塩基配列と比較検討を行った。その結果、コントロール株として用いているF2株（食品由来）において、F2365株と100%の相同性を持つ遺伝子は1893個、臨床由来のP1株及びP3株においては、それぞれ2617個と2625個であった（表1）。同様に95から99%の相同性を持つ遺伝子はF2株で872個、P1株で209個、P3株で211個であった。0%より多く95%未満の遺伝子はF2株で21個、P1株で14個、P3株で13個あり、F2365株には存在しない遺伝子はF2株で124個、P1株で73個、P3株で64個みられた。そのうちF2株のみにみられる遺伝子は4個、P1株及びP3株に存在しF2株にない遺伝子は74個存在していた（表2）。この中から選別した病原性マーカーの候補遺伝子10個について、スナネズミによる病原性評価を行った12株におけるそれらの分布状況をリアルタイムPCRで解析した。その結果、遺伝子番号87がコントロール株と同等の病原性を持つ菌株に多く存在し（5株中4株）、コントロール株よりスナネズミにおける病原性が低い菌株には分布が少ない（7株中4株）傾向が示された（表4）。また、遺伝子番号2774は、12株中6株に分布が見られず、菌株特異性が高いと思われることから、何らかのマーカーとして利用しうる可能性が考えられた。

表3. 各菌株における遺伝子のF2365株全ゲノム塩基配列との相同性

相同性(%)	菌株名		
	F2	P1	P3
100	1893	2617	2625
95-99	872	209	211
>0-<95	21	14	13
0	124	73	64

表4. 3菌株間の独自遺伝子の分布状況

F2	P1	P3	遺伝子数
-	+	+	74
-	-	+	3
+	-	-	4
-	+	-	1
+	-	+	8
+	+	-	1
合計			91

表5. 病原性マーカー候補遺伝子の検索

菌株番号		F2	F4	F6	P7	P1	P5	P8	P3	F11	P6	F10	F7
遺伝子番号	機能												
87	hypothetical protein	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+
253	LSU ribosomal protein L33p	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
434	sugar transporter	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
446	hypothetical protein	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
447	hypothetical protein	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
487	hypothetical protein	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1144	hypothetical protein	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
1849	hypothetical protein	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2602	ABC transporter, ATP-binding protein	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+
2683	Glucosamine-6-phosphate deaminase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
2774	Transcriptional regulator, XRE family	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
病原性		Control	同等	同等	同等	同等	低	低	低	極低	極低	極低	極低
由来		生ハム	豚肉	鶏肉	患者	患者	患者	患者	患者	豚肉	患者	牛肉	豚肉

(3) 研究項目名：血清型 4b 以外のリステリアにおける主要病原性遺伝子の発現制御分布と病原性評価系に関する検討（研究担当者名：朝倉宏 所属機関名：国立医薬品食品衛生研究所）

7) 個別課題名：血清型 4b 以外の高病原性株の評価

研究内容

リステリア・モノサイトゲネス（以下LM）はヒトにおける髄膜炎や流産の原因菌として生体を含めた環境中に広く分布する。LMは複数の血清型に大別されるが、その中で血清型1/2a, 1/2b, 4bはヒト感染症と深い疫学的関連性がある。近年のゲノム生物学の進展に伴い、血清型1/2a, 4bに属する複数株のゲノム情報が解読されてきた。これらにより同2血清型の菌株は比較的多様性に乏しいと目されるに至っている。一方で、血清型1/2b株の情報には極めて乏しく、本血清型の菌株間での病原性の違いがゲノム多様性により裏付けられる可能性が示唆された。こうした背景から、本項目では国内分離1/2b株間での遺伝学的多様性を検証すると共に、代表3株を用いた比較ゲノム解析を実施することで、同血清型間での多様性を明らかにし、病原性との関わりを考察することとした。

研究方法

①菌株及び培地：LM血清型1/2b 31株、及び4b 19株を本研究に供した。LMの培養はBrain heart infusion (BHI) ブロスもしくはBHI寒天培地を用い、37度下にて実施した。

②MLST解析：各LM株からDNeasy genomic extraction kit（キアゲン）を用いてDNA抽出を行った。PCR反応及びサイクルシーケンス反応については定法に従った。非特異増幅断片の不在をアガロースゲル電気泳動にて確認した後、PCR増幅断片をExoSAP-IT（Life technologies）を用いて精製した後、これを鋳型として、ABI3730x DNA Analyzer (Life Technologies)を用いてサイクルシーケンス反応を実施した。得られた配列情報はMLST module を搭載したCLC Main Workbenchソフトウェア(CLC bio, Aarhus, Denmark)上にてアセンブリ及びSequence type (ST)の同定を行った。各株のMLSTプロファイルを基に、*Listeria monocytogenes* MLST data base上のガイドラインにしたがい、minimum spanning treeを作成した。全ての配列および菌株情報は同データベースに登録を行った。

③カイク感染実験：昆虫類の中でもカイクは、LMの病原性評価モデルとして過去に報告されている。本研究では血清型1/2b及び4b群からそれぞれ7菌株を無作為に抽出し、感染実験に供した。接種後、14日目まで1日毎の生存性を確認した。また、研究対象菌株として新たに血清型1/2c株、計4株を加え、同様に試験に供した。

④蛋白分泌プロファイル及びイムノブロット：50mlのmodified welshimerブロス中でOD600=1.35-1.40まで培養したLM培養液より1mlを1.5mlチューブに移し、全菌体蛋白として冷凍保存した。残りの培養液については、遠心し、得られた上清をシリンジフィルターでろ過した後、TCAおよびアセトン沈殿により蛋白精製/濃縮を行った。ペレットは先の全菌体サンプルと共にLaemniバッファーに懸濁し、5分間ボーイルした。10%アクリルアミドゲルで泳動後、タンパクプロファイルをCBB染色により可視化した。同時に、ゲル中のタンパクをPVDF膜 (Millipore)に転写し、マウ

ス抗LLO抗体およびHRP標識抗マウスIgG二次抗体を用いたウェスタンブロットを実施した。

⑤ゲノム解析およびバイオインフォマティクス：LM代表株（3株：Lm_0003 (ST-3), Lm_0008 (ST-3), Lm_0010 (ST-5)) よりGenomic tip-500 kit (キアゲン)を用いてゲノムDNAを抽出した後、2株(Lm_0003, Lm_0008)についてはGS FLX+ system (Roche Diagnostics)を用いた、8 kb ペアエンド解析に供した（昨年度解析済）。また、Lm_0010株については200ベースリード対応のpyrosequencingプラットフォームをIon Torrent PGM System (Life Technologies)を用いて解析した。出力データはDe novo アセンブリ後、それぞれ57, 74, 113 contigs (>500 bases)を得た（Coverageは21,22,52倍相当）。当該ドラフトゲノムシーケンスは、GenBank databaseに登録した（accession numbers DRA001165）。

ORF抽出およびアノテーションは、RAST service pipelineに因った。菌株間での塩基配列およびアミノ酸配列比較はArtemis Comparison Tool/Bi-BLASTにより実施した。この他、Prophage配列およびCRISPR同定に際しては、PHAST (PHAge Search Tool)/ CRISPR Finderを用いた。

⑥統計手法：MLST解析配列におけるPolymorphic sitesおよびTajima's D ValueはDnaSP ver. 5.10.1 プログラムを用いて算出した。Neighbor-Joining treeの作成にはMEGA ver. 5 プログラムを用いた。カイコ生存性評価には、median survival time (MST)を用いることとし、Kaplan-Meier plotと共に、その算定はMedCalc ソフトウェアを用いて行った。

研究成果

①LM血清型1/2b及び4b国内代表株における遺伝学的多様性解析：計50株のLM国内分離株（1/2b 31株及び4b 19株）をMLST解析に供した。最終的に、42株（84%）は12種のST型に分類され、残り8株はそれぞれ新規ST型としてデータベースに登録を行った（STs-627, 628, 674-679）。1/2b群のうち、54.8% (n=17/31)は3種のST型（ST-3 (n=9, 29.0%), ST-87 (n=5, 16.1%), ST-5 (n=3, 9.7%)) に収束した。一方で、4b群では94.7% (n=18/19)がST-1 (n=9, 47.4%), ST-2 (n=6, 31.6%),またはST-6 (n=3, 15.8%)に分類された。Tajima's D-valueの比較を各血清群で実施したところ、1/2b群は4b群に比べ、Neutralityからの距離が遠く (-2.4479 vs -0.0817)、1/2bに属する菌株間では4b群内のそれに比べて、遺伝学的多様性に富むことが示された。実際にNJ系統樹を作成したところ、全ての4b株は3グループに分類されるにとどまった。更に、Minimum spanning treeでは4b群内の遺伝学的近縁性が示された（図1）。以上より、1/2b血清型に属する菌株間での高い遺伝学的多様性が示された。

②血清型1/2b株はカイコ致死毒性に多様性を示す：遺伝学的多様性は表現形質の多様性と深い関連性を示すことが多い。上述の成果を受けて、分担者は病原性との関わりに着目し、カイコを用いた病原性評価を実施することとした。興味深いことに、4b株を接種したカイコはいずれも接種後9日目迄に全てが死亡したが、1/2b群では接種菌株による生存率のVariationが認められた。1/2b株のMST値は、7.2～13.5日(平均10.4 ± 2.2日)であったが、4b株のそれは6.3～7.2日(平均6.6 ± 0.4日)であり、両

群間での顕著な有意差を認めた ($p=0.0037$) (図2)。上記の成績より、1/2b株は菌株間でのカイコ致死毒性に差異を示す一方、4b株では安定的に同宿主に対する高い致死性を顕すことが明らかとなった。また、4株の血清型1/2c株を接種した動物群については、観察期間中に死亡は認められなかった。

③血清型1/2b代表株におけるゲノム特性概要：カイコ毒性の差異に係るゲノム特性を検討するため、3代表株 (Lm_0003 (ST-3, 弱病原性), Lm_0008 (ST-3, 高病原性), 及びLm_0010 (ST-5, 高病原性)) を対象とする比較ゲノム解析を実施した。最終的に、2,963,893 bp (Lm_0003), 2,938,134 bp (Lm_0008), and 2,910,258 bp (Lm_0010)のドラフトゲノム配列を取得し、アノテーションとして2,952~2,967のCDSが付与された。比較解析にはSLCC2755株 (ST-3, accession No. AF532277)のゲノムを参照配列として用いた。DNA Plotterにより環状マップを作成したところ、矢印 (図3) で示した領域に菌株間相違性が認められた。

④Prophage領域における配列多様性：Artemis Comparison Tool/ bidirectional BLASTによる配列比較を通じ、prophage領域 (LMOSLCC2755_1716-1743)において配列相同性が低いことが明らかとなった。当該領域は先の環状ゲノムマップにおいて示された部分であった。

PHAST (PHAge Search Tool)による配列精査の結果、当該領域を構成するORFsの配列差異が明確化された。本プログラムでは、もうひとつのProphage領域も検出されたが、当該領域の配列相同性は極めて高いことが示された。

⑤CRISPRスペーサー配列の多様性：Artemis Comparison Tool/ bidirectional BLASTによる配列比較では、タイプ2 CRISPR/cas領域(LMOSLCC2755_2570-2652)の部分配列 (LMOSLCC2755_2601-2608) において高い菌株間配列変異性を示すことが明らかとなった。CRISPRfinderツールを用いた精査により、同領域での低い配列相同性は、CRISPR spacer配列の数的・配列的差異に基づくことが明らかとなった。

⑥その他の領域：配列比較の結果、細胞壁アンカータンパクをコードするLMOSLCC2755_1859遺伝子の多様性が挙げられた。マルチアライメント解析により、その差異はグルタミン-アルギニン繰り返し配列の分布に基づくことが明らかとなった。一方、4b株(F2365, 07PF0776, L312, CLIP 80459)等では配列が保持されていた。1/2a EGDeや4a L99株等では、ORFの中央及びC末に上記繰り返し配列は認められなかった。以上の知見は、1/2b株は血清型特異的に繰り返し配列を有し、その分布は菌株間で異なることが示された。この他、主要病原遺伝子の中では、Lm_0003株の*actA*遺伝子で少数の配列置換が認められたのみであり、病原性の主体となる各遺伝子自体の配列変化が病原性という形質へ直接関与する影響は小さいと考えられた。また、Mobile genetic elementsとしては、LMOSLCC2755_0669-0672 (IS3 transposase)および LMOSLCC2755_2079-2089 (IS3 family transposase)の配列に一部置換が認められた。

⑦LLO分泌性の多様性解析：LLOの発現を明らかにするため、全菌体タンパクをサンプルとしてウェスタンブロットを行ったところ、全供試株で発現が認められた。しかしながら、同分子の菌体外分泌性は2株 (Lm_0003、Lm_0009)で低いレベルをとることが示された。以上の結果より、血清型1/2bに属する菌株間ではLLO分泌

性に差異を示すことが明らかとなった。

⑧LLOによるカイコ毒性試験：異なる濃度によるカイコ致死毒性を評価したところ、精製LLOタンパクによる同宿主の致死毒性は、5 μ g以上の LLOを投与した場合にのみ認められた。また、*L. monocytogenes* 血清型4b 計3株 (Lm_0014, Lm_0037, Lm_0039) 破碎菌体は、生菌と同様の病態を顕したが、加熱死菌体による毒性は発現しなかった。以上の結果より、カイコに対する*L. monocytogenes* 4bが示す致死毒性は当該菌により産生されるLLO等のタンパク分子に起因することが想定された。

8) 個別課題名：菌株の病原性の評価手法に関する検討

研究内容

LMの病原性発現には複数の病原遺伝子の関与が広く知られているが、とりわけリステリオリジン (LLO) は、マクロファージ細胞におけるPhagosomeからCytosolへの拡散、すなわち宿主免疫応答への回避過程において重要な役割を担う。LLO検出には、多くの場合、溶血を指標とした表現形質の測定が用いられるが、近年では、LMの菌体内に滞留するLLOは、免疫原性は有するものの、生体感染時におけるLMの病原性発現、すなわち回避機構そのものには作用しないとの報告がある (Carretero et al., 2009)。本研究では、培養細胞系を用い、LLOに対する免疫応答の中で、特にNF- κ Bシグナル関連遺伝子に着目し、LLO刺激およびLM感染に伴う動態変化を把握することで、有意な変動遺伝子の同定とLM感染における病原性マーカーとしての有用性について検証することを目的とする。

研究方法

①菌株および細胞：LM EGDe野外株及び同*hlyA*欠損株 (Δ *hlyA*株)を用いた。また、培養細胞としてはRAW264.7を用いた。

②ウェスタンブロット：LM感染細胞をLamniバッファーで溶解後、5分間ボイルした。10%アクリルアミドゲルでの電気泳動後、PDVF膜へ転写したサンプルについて、ウサギ抗マウス

65 α

抗体 (Santa Cruz Biotechnology) 及びHRP標識抗ウサギIgG抗体 (GE Healthscience)を用いたウェスタンブロットによりNF- κ B p65を検出した。

③RNA抽出及びPCR array：LM感染から一定時間後、細胞をPBSで洗浄し、全RNAを抽出した。Oligo dTプライマーを用いた逆転写反応後、1 μ g cDNAを鋳型として、マウス NF- κ B PCR array (キアゲン) による遺伝子発現解析を行った。同発現解析には、Light Cycler 480 (Roche diagnostics)を用いた。

④LLO刺激：活性型LLO (Abcam) 1 μ g, 2 μ g, 4 μ gを1 μ m-diameter's Microsphere particle (Lite technologies) にCouplingした後、RAW264.7細胞に添加し、一定時間経過後、上述のとおりRNA抽出を行い、遺伝子発現解析に供した。

⑤データ解析：遺伝子発現データについては、LC480出力データを基に、相対定量を行った。系統樹作成にはCluster and TreeView (Stanford Univ., Eisen Lab)を用いた。

。

研究成果

①LLOの欠損はLM感染に伴うNF- κ B応答のOscillationを遅延させる：

EGD野外株及び $\Delta hlyA$ 株をRAW264.7細胞に感染させたところ、これまでの知見通り、 $\Delta hlyA$ 株の細胞内増殖抑制が認められた。ウエスタンブロットにより、両菌株感染細胞におけるp65動態を比較したところ、野外株では感染20分後に減少を示した後、40分後には再発現を認めた。一方、 $\Delta hlyA$ 株感染細胞では、感染40分まで減少傾向を示し、Oscillationは感染から60分後に遅延して認められた。以上の知見より、*hlyA*遺伝子の有無によりLM感染に伴うp65の動態に影響を及ぼすことが示された。

②LM感染に伴うNF- κ B関連遺伝子の発現応答：LM感染に伴うNF- κ B関連遺伝子の発現応答を把握するため、LM感染1,2,4時間後の発現応答をPCRアレイを用いて検証した。野外株感染に対する応答性が、 $\Delta hlyA$ 株感染での応答性に比べ、有意に高い値を示す遺伝子群群として以下が同定された。

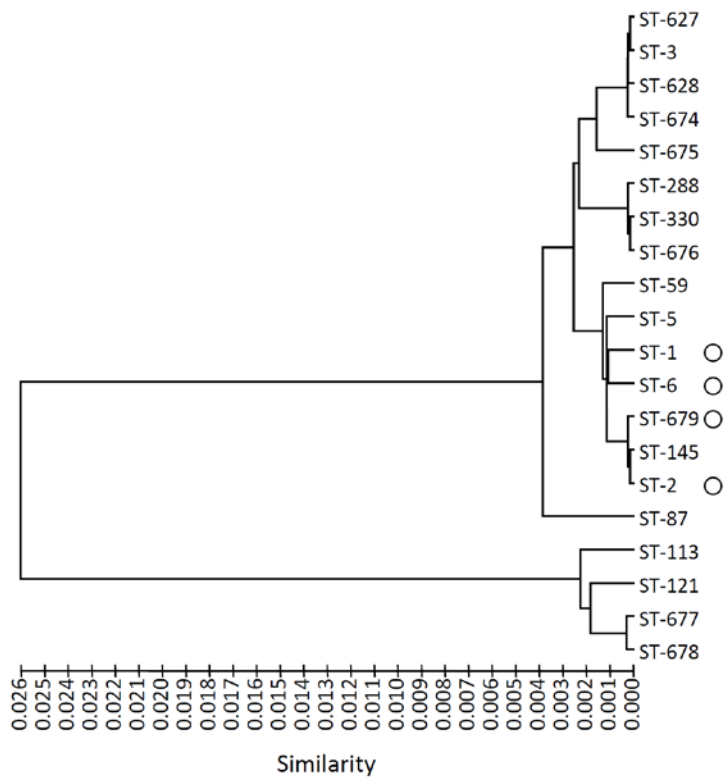
bcl2a1a (B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a), *ccl2* (chemokine ligand 2), *ccl5* (RANTES, chemokine ligand 5), *cd40* (CD40 antigen), *fasl* (Fas ligand), TNF superfamily 6), *il10* (interleukin-10), *il1ab* (interleukin-1alpha/beta), *lta* (lymphot oxin A), *nfkbia* (nuclear factor kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells), *rel* (reticuloendotheliosis oncogene), *slc20a1* (solute carrier family 20), *tnf* (Tumor necrosis factor), *tnfaip3* (TNF alpha-induced protein 3), *traf5* (TNF receptor associated factor 5)。

③LLO刺激に伴うNF- κ B関連遺伝子の発現応答：LLO刺激に対して発現変動を示す遺伝子群を同定するため、異なる量のLLOをMicrosphere particleにCouplingさせ、RAW264.7細胞と共培養させた。対照群であるNon-coupling beads添加群に比べ、LLO投与群は、以下の遺伝子群において有意に高い応答性を示した：*bcl2a1a* (B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a), *ccl2* (chemokine ligand 2), *ccl5* (RANTES, chemokine ligand 5), *cd40* (CD40 antigen), *csf2* (colony stimulating factor 2), *csf3* (colony stimulating factor 3), *il1ab* (interleukin-1alpha/beta), *egr1* (early growth response 1), *fos* (FBJ osteosarcoma oncogene), *fasl* (Fas ligand), TNF superfamily 6), *il1ab* (interleukin-1alpha/beta), *jun* (Jun oncogene), *nfkbia* (nuclear factor kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells), *relB* (Avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B), *slc20a1* (solute carrier family 20), *tnf* (Tumor necrosis factor), *tnfaip3* (TNF alpha-induced protein 3), *traf5* (TNFR-associated factor 5).
以上の成績から、LLOおよびLm感染に伴い共通に発現亢進を示す遺伝子群には、TNF関連遺伝子が数多く含まれることが明らかとなった。

④LLO刺激に伴う、RAW264.7細胞におけるRANTES産生に関する評価

LLO刺激に伴うRAW264.7細胞におけるRANTES産生について、刺激前後の培養上清中のRANTESをELISA法により測定した。RANTESはLLO刺激2時間後より上清中より検出され、刺激4時間後における検出量は上昇傾向を示した。

A



B

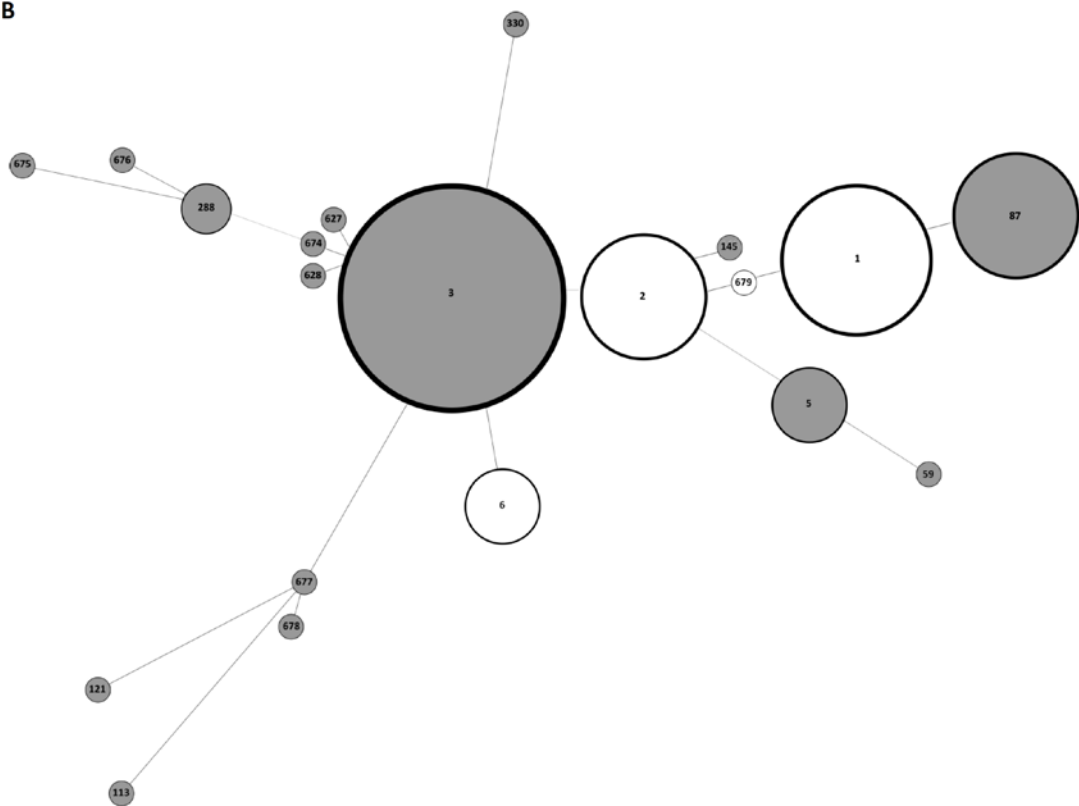


図 1 . LM供試株におけるNeighbour-joining tree及びMinimum spanning tree解析

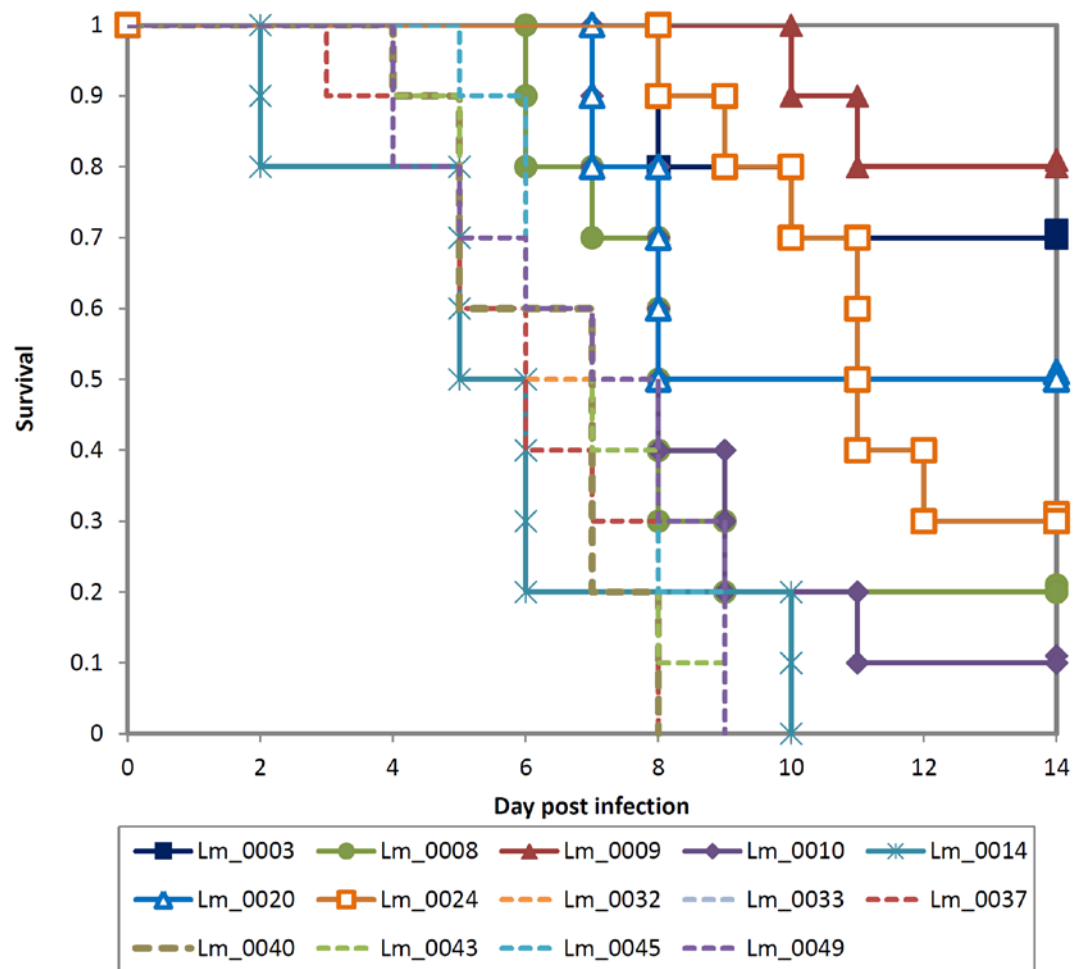


図2. カイコ生存性試験

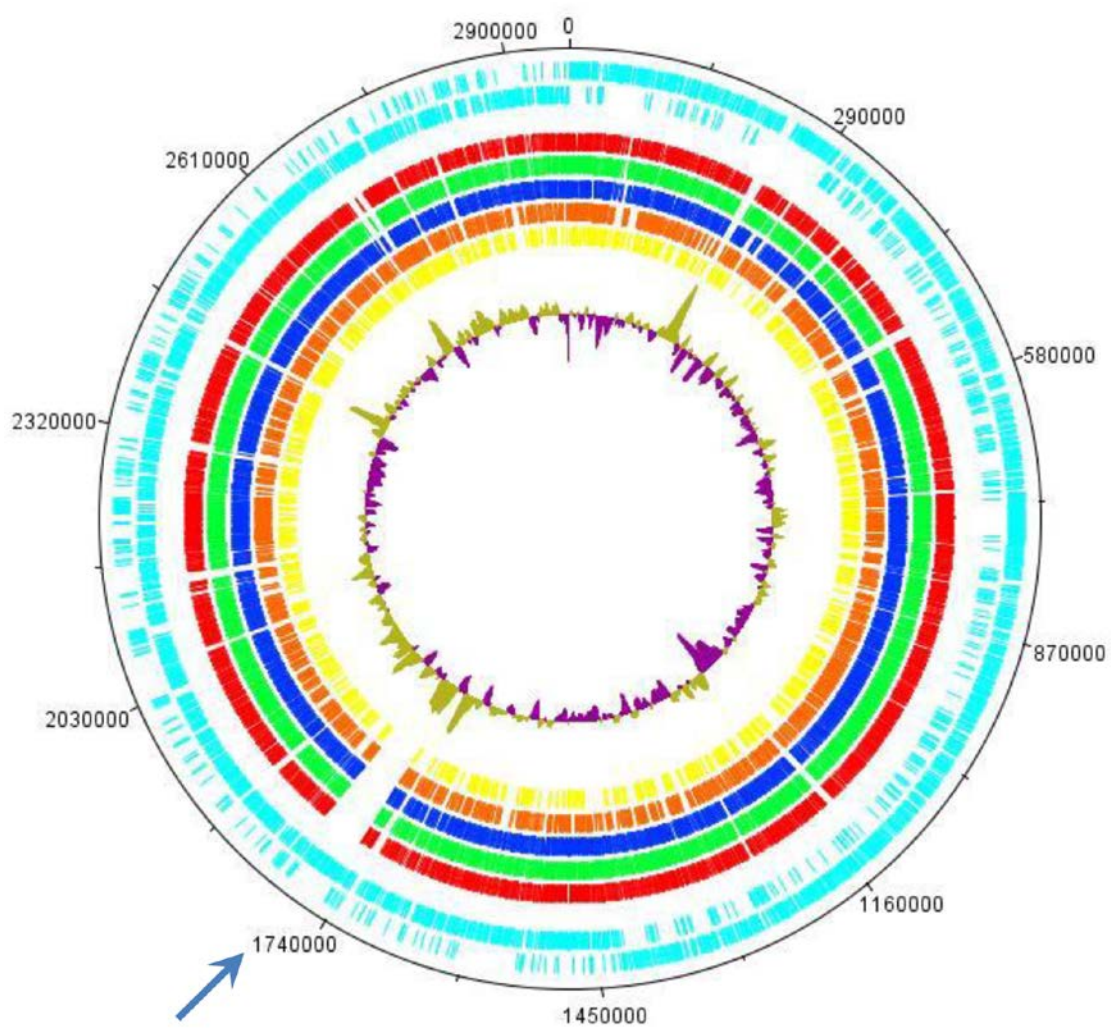


図3. LM 血清型1/2b代表株の環状ゲノムマップ

図 4. *L. monocytogenes* 感染に伴う RAW264.7 細胞における NF- κ B 関連遺伝子群の発現応答

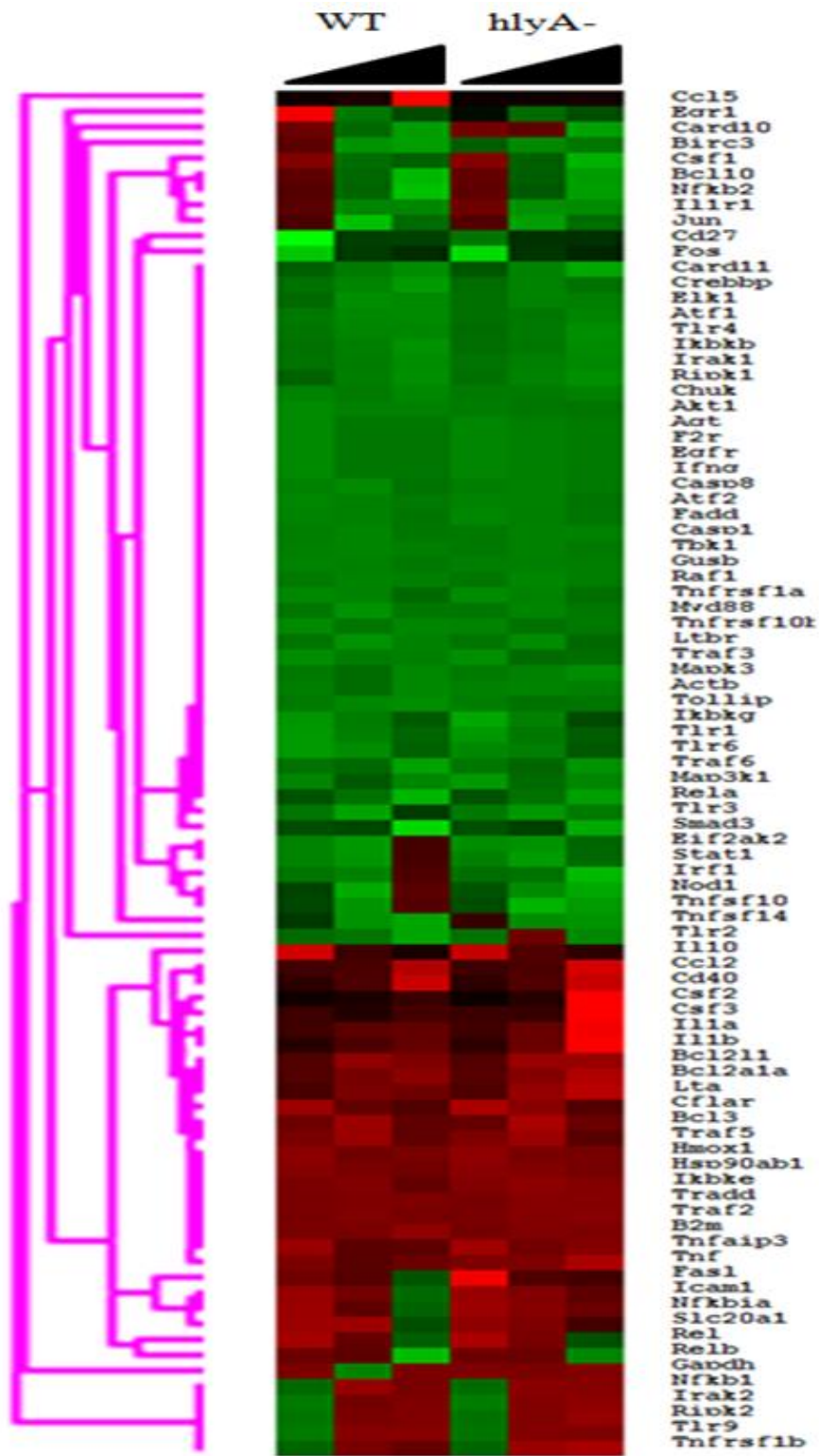
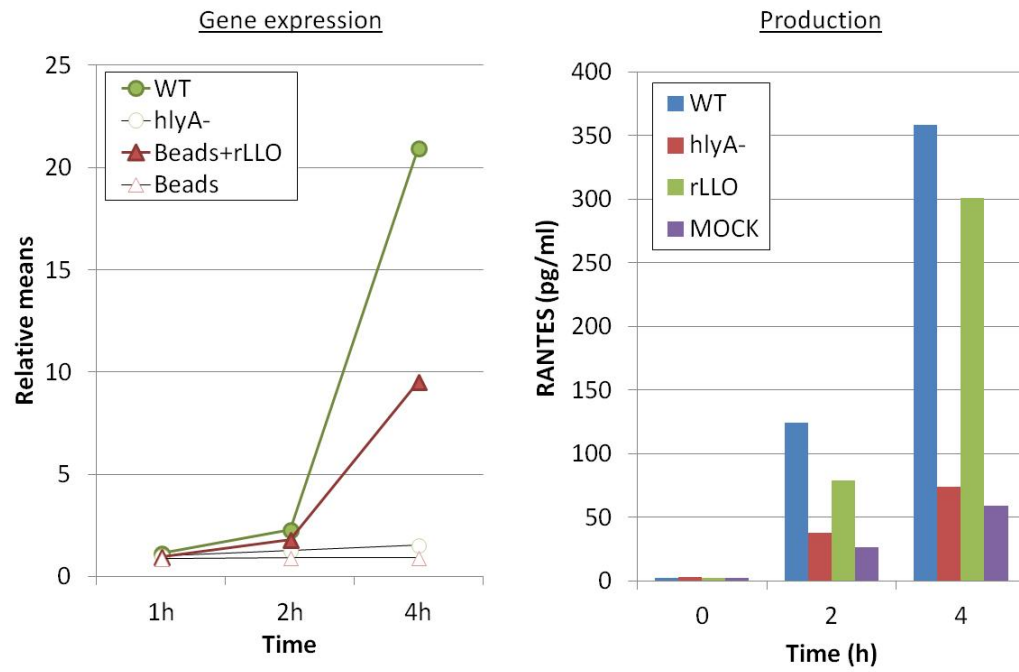


図 5. LLO 刺激に伴う RAW264.7 細胞の RANTES 応答



左右のパネルはそれぞれ遺伝子発現と培養上清中への分泌に関する動態を示す。

表 1. *L. monocytogenes* 1/2b および 4b 代表株感染に伴うカイコ生存性に関する統計学的成績

Inoculum			MST ^{*1}	SM	SD	Mean square	<i>p</i> -value ^{*2} (1/2b vs 4b)
serotype	strain	ST					
1/2b	Lm_0003	3	12.5				
	Lm_0008	3	13.5				
	Lm_0009	3	8.8				
	Lm_0010	5	8.9	10.44	2.24	4.32	
	Lm_0014	87	7.2				
	Lm_0024	675	11.4				
	Lm_0020	288	10.8				
4b	Lm_0037	1	6.0				0.0037
	Lm_0043	2	6.7				
	Lm_0049	6	6.9				
	Lm_0045	2	7.2	6.60	0.39	0.13	
	Lm_0032	1	6.5				
	Lm_0033	1	6.6				
	Lm_0040	2	6.3				

(4) 研究項目名：食品・環境由来株の病原性に関する検討（研究担当者名：天野富美夫 所属機関名：大阪薬科大学）

9) 個別課題名：食品・環境由来株の収集と性状検査（平成 23 年度研究担当者名：田中廣行 所属機関名：財団法人 日本食品分析センター）

食品および環境材料から LM を分離する。分離された LM 株およびこれまでに収集した LM 株について血清型、生化学性状等を検査し、その結果に基づき分子レベルの検討を行う株を選別した。分離株については、病原因子の保有状況を検討した。

10) 個別課題名：高病原性 LM 菌株の病原性の検討（平成 24-25 年度研究担当者名：天野富美夫 所属機関名：大阪薬科大学）

LM の臨床分離株のうち、非病原性の LC6 株、および病原性の LC24 株を用いて、①病原因子の遺伝子ならびに関連遺伝子の発現を解析し、②ヒト扁平上皮がん細胞株 KB 細胞のうち、EGF 受容体(EGFR)を高発現し、E-cadherin を高発現する KB-3-1 細胞株を親株とし、その体細胞変異株で EGF-緑膿菌外毒素(ET)結合体耐性変異株のうち、とくに EGFR の細胞外発現ならびに EGF に対する応答性が著しく低下した変異株、ET-22(F-22)細胞株を用いた。この F-22 細胞株では、E-cadherin の発現も低下し、細胞間接着が KB-3-1 細胞株と比較してゆるいという特徴がある。

従来のヒト大腸がん由来腸管上皮細胞の Caco-2 細胞株と比べて、KB-3-1 細胞株は、扁平上皮細胞であること、ならびに口腔粘膜上皮、あるいは食道の上皮組織細胞に類似の性質を有するという特徴がある。また、本研究の目的として、LM の感染における侵入経路に、腸管上皮以外の経路を考慮する必要がある、口腔粘膜や上部消化管組織などを考慮する場合に、扁平上皮細胞を用いた LM の感染実験系の確立と評価系の検討が挙げられるためである。

①LC6 株および LC24 株におけるリステリアの病原性関連遺伝子発現の解析：

TSA 培地で対数増殖期まで増殖させた LC6 株、および LC24 株から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR を行った。リステリアの病原因子として知られる *prfA*, *hly*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *flaA*, *sigB* ならびに転写制御因子としての *rpoB* に関して、それぞれの遺伝子発現を解析した（表 1）。

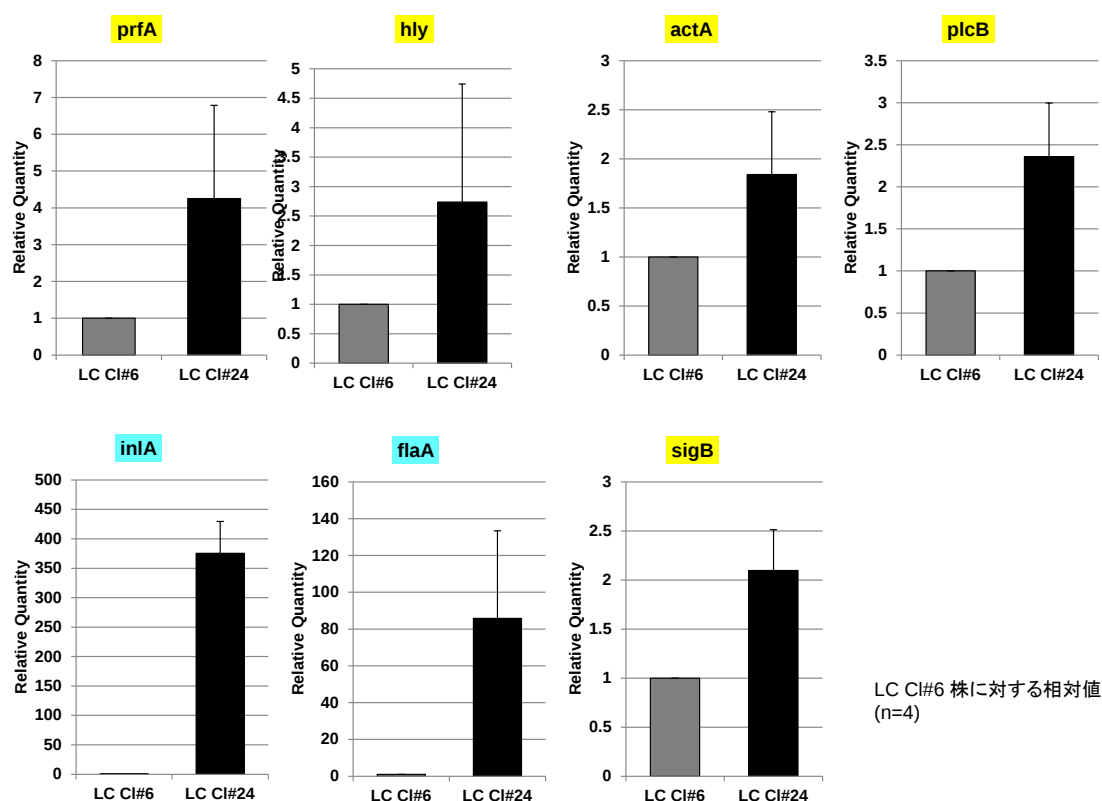
その結果、LC6 株は病原因子の遺伝子発現がいずれも低く、LC24 株では高かった。それらの中でも特に、*inlA* 及び *flaA* 遺伝子は、培養 3 時間目の対数増殖期中期、ならびに 6 時間目の対数増殖期後期において、LC6 株ではごくわずかしか発現しておらず、LC24 株における発現の数百分の一から千分の一の値であった(図 1)。これらを確認して、細胞培養系での感染実験に用いる LC6 株、ならびに LC24 株の培養時間を約 3 時間とすることにした。

表1. *Listeria monocytogenes*における遺伝子発現のqRT-PCRによる定量に使用したプライマー

Gene	Forward	Reverse
prfA	5'-TGAATAGCCTAACTCCTGCATTG-3'	5'-TGTATGGTAAAGAACTCCTGATGG-3'
hly	5'-ATGGAAAAATCAACATCGATCA-3'	5'-GATCATAATTTATTTTCATCCCAAGAGA-3'
actA	5'-GCCAAAATTTCTCTGATTTTCC-3'	5'-GGTATACCACCTCTCCCGTTC-3'
plcB	5'-TGCCAGGTTTTGCTAATGC-3'	5'-GGTAATCAGCCACCGATTGA-3'
inlA	5'-CGGCAAAGAAACAACCAAAG-3'	5'-CAGGCTTAGCTGGTTCAGTCA-3'
flaA	5'-CAACCAATCCATCGCAACTA-3'	5'-TCAGCAGCCATATCTGCATC-3'
sigB	5'-GCTGATTCGGATGGAAGTACA-3'	5'-ACACGTTCAAATCCATCATCC-3'
16s rRNA	5'-GAAAGCCACGGCTAACTACG-3'	5'-GACAACGCTTGCCACCTAC-3'

Gene symbol	Gene description
prfA	positive regulatory factor A
hly	listeriolysin O
actA	actin-assembly inducing protein
plcB	phosphatidylcholine-specific phospholipase C
inlA	internalin A
flaA	flagellin protein
sigB	RNA polymerase sigma-B factor
16s rRNA	16S ribosomal RNA

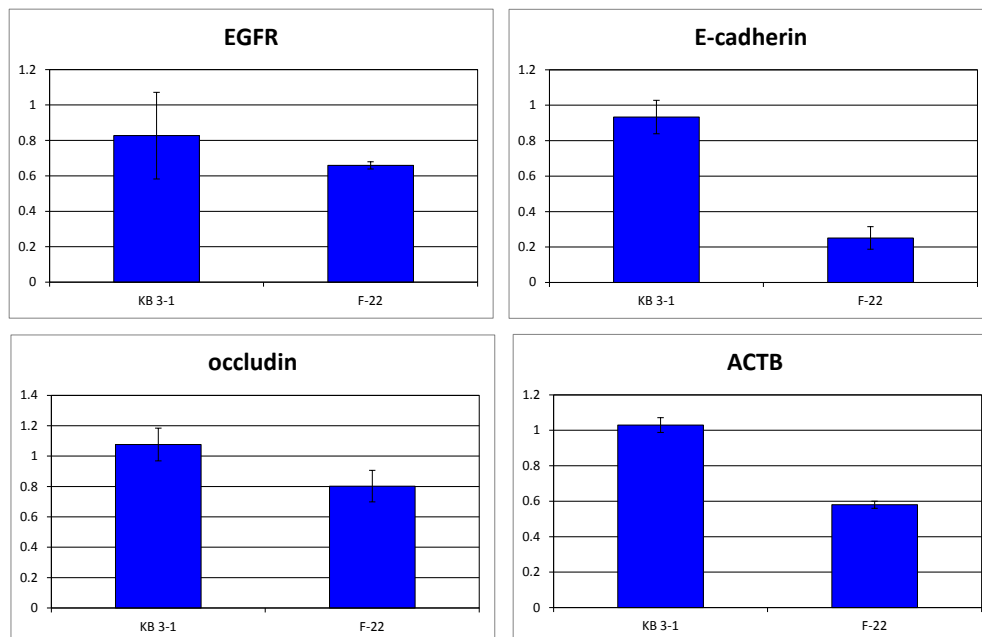
図1. *Listeria monocytogenes* clones菌株における遺伝子発現の定量的qRT-PCRによる測定



②ヒト KB-3-1 細胞株と EGF 応答性変異株 F-22 細胞株を用いたリステリア感染モデルにおける病原性の評価系の確立：

実験の前に、ヒト KB-3-1 細胞と F-22 細胞における EGFR、E-cadherin 等の遺伝子発現を定量的 qRT-PCR 法で測定した。その結果、F-22 細胞における EGFR および E-cadherin の発現が低下していることが確認された(図 2)。

図2. ヒト扁平上皮がん細胞株KB-3-1細胞とそのEGF応答性変異株、F-22細胞におけるEGFR、E-cadherin、occludin-1、及びACTB 遺伝子発現の qRT-PCRによる測定



BD 社の Insert cup (8 または $3\mu\text{m}$)を Costar 社 24 穴プレートに装着し、KB-3-1 細胞株、F-22 細胞変異株、および対照としてマウスマクロファージ系細胞株 J774.1/JA-4 細胞株を 1×10^5 cells/well になるように 10%FBS を含む DMEM 培地に播き、 37°C 、3 日間培養した。Costar 社 24 穴プレートの下層には、0.75 mL の培地のみを加えた。この間、KB-3-1 及び F-22 細胞は、単層培養を形成して Insert cup の膜表面を覆い、TEER(膜貫通性電気抵抗値)は測定しなかったものの、Insert cup 中の培地のシール状態は良好であることを確認した。

その後、培養系の培地を、抗生物質を含まない DMEM+10%FBS に交換し、3 回洗浄して新しい培地と置換した。実験ごとに毎回、Insert cup 中の細胞数をトリプシン処理によって剥がし、細胞数を計測した後、他の感染実験用の Insert cup 中にを LC6 株あるいは LC24 株を $\text{MOI}=100$ となるように、約 1×10^7 cfu/well/0.25 mL 含む培地と交換した。感染は、通常、氷上で 1 時間放置して菌の細胞表面への接着をさせ、続いて 37°C で 1 時間、培養して、菌を細胞に取り込ませて行った。その後、 $100\mu\text{g/mL}$ のゲンタマイシンを含む培地と交換し、 37°C で 0~2 時間培養して、細胞内における菌の増殖を測定した。なお、一部の実験では、菌を添加した後ただちに 37°C で 2 時間、 CO_2 インキュベーター内で培養して、細胞内への取り

込みと細胞内増殖を測定した。

氷冷して反応を停止した後、上層の Insert cup を回収し、細胞及び取り込まれなかった菌を氷冷した PBS で 3 回洗浄したのち、新たな 24 穴プレートに移した。これに対し、Insert cup の中に、0.1% Triton X-100/PBS を 1.00 mL/well ずつ添加して細胞を溶解し、細胞表面ならびに細胞内に取り込まれた菌を回収した。なお、一部の実験では、下層の培地を回収してそこに移行した菌数を測定した。また、菌数の測定は、TSA-agar 培地上への披検菌体希釈液の塗布によって生じたコロニー数の計測によって行い、測定は 2 連(duplicate assay)で行った結果の平均値で表した。

その結果を以下に示す。

(1) **Insert cup 中の細胞へのリステリアの結合・取込み数：**

LC6 株の結合と取り込みは、KB-3-1 細胞 5.36 ± 1.00 ($\times 10^5$ cfu/well/ 1×10^5 cells ; 以下同)、F-22 変異株 4.16 ± 1.88 、JA-4 マクロファージ細胞 6.52 ± 0.16 であったのに対し、LC24 株の結合と取り込みは、KB-3-1 細胞 18.4 ± 7.2 、F-22 変異株 6.20 ± 0.96 、JA-4 マクロファージ細胞 6.84 ± 0.28 、であった (図 3)。これらの結果から、F-22 変異株および JA-4 マクロファージ細胞への接着・取込みには両菌株の間で大きな差が見られないが、EGFR 及び E-cadherin を高発現する KB-3-1 細胞への接着・取込みは両菌株間で大きな違いがみられ、*inlA* 遺伝子発現の多い LC24 株では少ない LC6 株に比べて、約 3.4 倍多く結合・取込みが起きたことが示唆された。さらに、4℃における両菌株のこれらの細胞への結合は、菌株間の有意差が見られなかったものの、KB-3-1 細胞の方が F-22 細胞よりも多かった(図 4)。さらに、4℃での接着とそれに続く 37℃1 時間の取り込みの後の細胞内でのリステリアの増殖は、両菌株間の差はないが、KB-3-1 細胞の方が F-22 細胞よりも多かった(図 5)。これらの結果は、病原性の異なるリステリア菌株の感染ならびに病原性の評価において、リステリア菌側の *inlA* 遺伝子発現と宿主細胞側 EGFR, E-cadherin が関与している可能性を示唆すると共に、ヒト扁平上皮細胞株 KB-3-1 および EGFR の低下した F-22 変異株を用いた実験系がその評価系として有用であることを示唆する。

(2) **Insert cup の膜孔(membrane pore)を通過したリステリアの菌数：**

37℃、2 時間の培養時間中に Insert cup の膜孔(membrane pore)を通過して下層に移行したリステリアの菌数は、Insert cup に播いた細胞によって異なり、次の結果を得た。すなわち、LC6 株では、KB-3-1 細胞 1.73 ± 0.06 ($\times 10^7$ cfu/well/0.75 mL ; 以下同)、F-22 変異株 1.82 ± 0.11 、JA-4 マクロファージ細胞 1.87 ± 0.05 であったのに対し、LC24 株では、KB-3-1 細胞 0.98 ± 0.18 、F-22 変異株 1.22 ± 0.18 、JA-4 マクロファージ細胞 1.17 ± 0.12 、であった。これらの結果から、細胞の伸展が良好で Insert cup の膜孔をほぼシールしていたと思われる KB-3-1 細胞も F-22 変異株も、シールが不十分であった JA-4 マクロファージ細胞とあまり大きな違いが無く、LC6 株、LC24 株のいずれもそれぞれ細胞による差を示さなかったことが分かる。これは、膜孔のシール状態の差が直ちにリステリア菌の細胞間、続いて膜孔を通過した菌数に反映されていないことを示唆する。この実験で使用した膜孔の口径が $8 \mu\text{m}$ と大きく、短径約 $0.5 \mu\text{m}$ 、長径約 $1 \mu\text{m}$ のリステリアが自由に通過する可能性がある。

図3. リステリア菌株LC-6 及びLC-24のKB-3-1細胞ならびにEGF応答性変異株F-22細胞及びJA-4マクロファージに対する37℃、2時間での接着と取込み

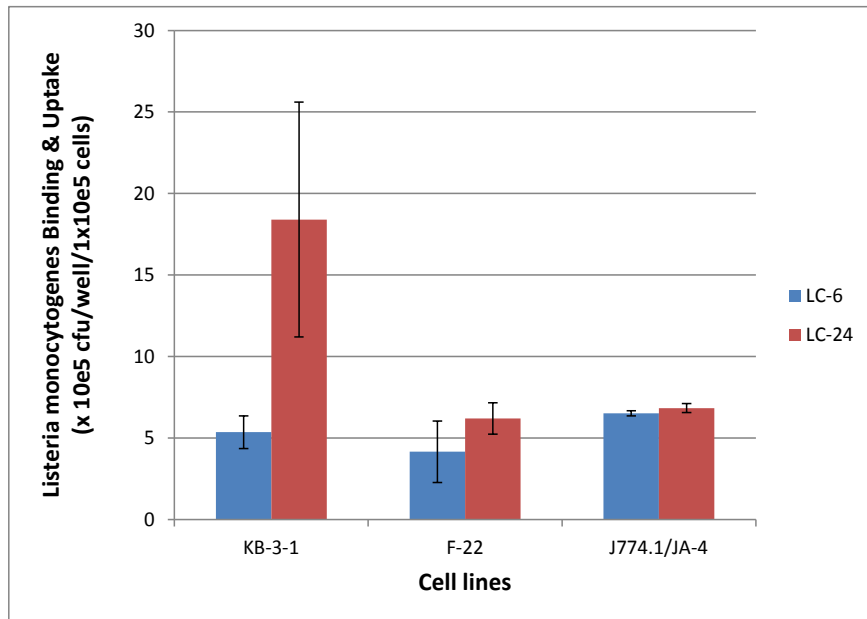


図4. リステリア菌株LC-6 及びLC-24のKB-3-1細胞ならびにEGF応答性変異株F-22細胞に対する4℃、1時間での接着

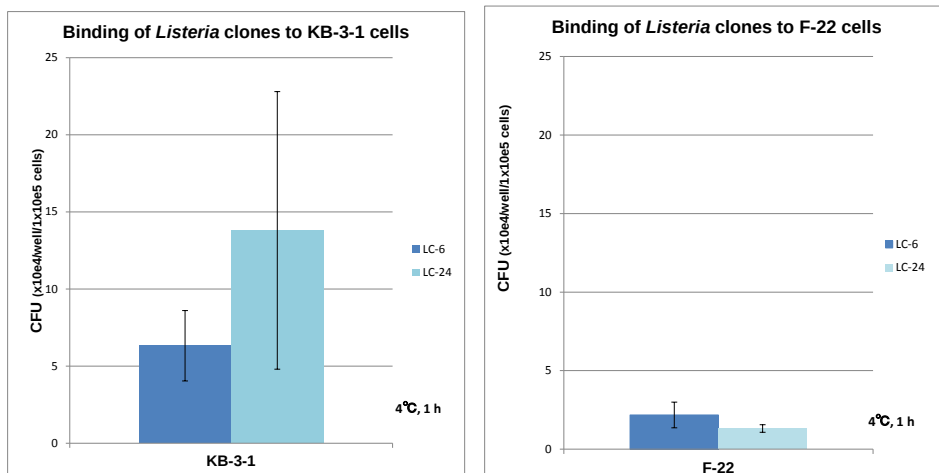
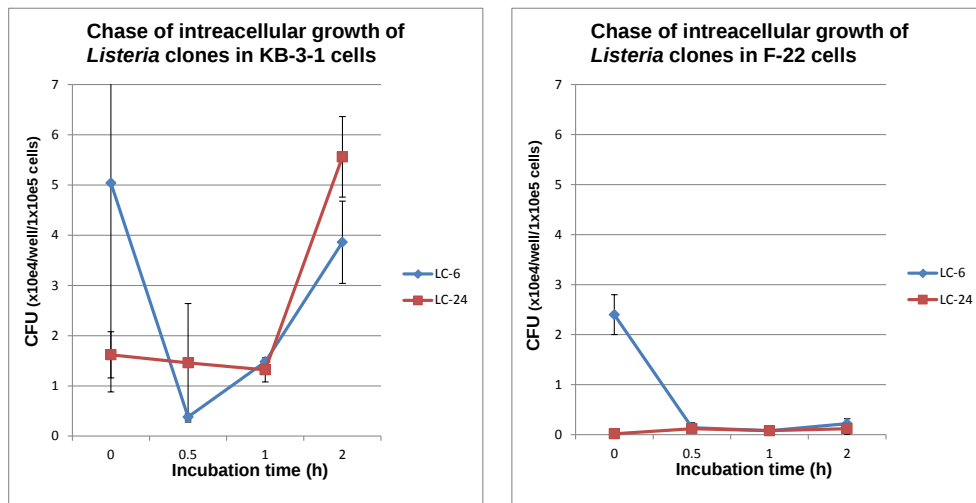


図5. リステリア菌株LC-6 及びLC-24のKB-3-1細胞ならびにEGF応答性変異株F-22細胞における細胞内増殖



（２）研究全体の成果、考察及び結論

リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes* ; LM) は、環境に広く分布し、食品からもしばしば分離される。喫食前の加熱処理をしない調理済食品に於いては、国内の市販食品から平均約 2% 程度の LM が分離される。日本人は生食が多く、調理済食品の種類も多いため、欧米先進国に比べ食品を通じ LM に曝される機会が多いと思われる。国内の健康成人の糞便からの LM の分離は 1.3% と報告されており、この値は食品摂取により LM がヒト消化管を通過し糞便から検出されているものと思われる。一方、国内の重篤化したリステリア感染症の患者数は 100 万人あたり年間平均 0.65 と推定されている。食品安全委員会のリスク評価時に採用された JANIS による 2011 年の推定では、年間 200 人の患者発生が見られ 100 万人あたりのリステリア感染症罹患はやや上昇して 1.6 と推定された。ヒトは食品を通じ本菌に曝される機会が多いと思われるが、重篤なリステリア感染症を発症する患者数は極端に少ないといえる。

一般的な解釈としては、重篤なリステリア感染症の発症は生体側の免疫との関わりがあるため、宿主側の要因が強く働いているためであると理解されている。2004 年の FAO/WHO の専門家会議による LM のリスク評価書では、LM の菌株毎の病原性の違いについては、未だ科学的に十分解明されておらず、血清型や特定の菌群に関し病原性の違いの有無を言える段階ではないとして、LM を一律同様な扱いとしてリスク評価を行っている。一方、文献的には、ヒト臨床から分離される血清型は、特定の血清型に偏っていることが報告されている。そこで、本研究では、ヒト臨床分離株と食品や環境由来株を対比させ、遺伝子レベルでの株間の相違を明らかにし、細胞や動物実験による病原性評価の結果を合わせて、高病原性 LM の特徴に関する情報とその検知法を提供し、得られた検知法を用いて、高病原性 LM が食品や環境中にどのような頻度でどのように分布しているかの情報を提供することを目的とした。また、検討した病原性評価系を用いて、宿主側の要因についても検討し、リステリア感染症の発症に至る過程を考察した。

国内のリステリア感染症のヒト臨床分離株の 65% 以上は血清型 4b であり、食品や環境由来株の血清型の分離頻度の傾向とは明らかに異なっている。臨床、食品、環境の分離株の疫学的検討から、LM の血清型 4b、1/2a、1/2b が、ヒトの臨床に関わる主な血清型であることを示した。それ以外の血清型については、ヒトの臨床と関わる可能性は低いと思われる。そこで、主にこれらの血清型の分離株を対象として、細胞や動物を用いた LM の病原性の評価方法を検討し、マウス、スナネズミなどの動物を用いた評価法、細胞を用いた評価法、カイコを用いた評価法を提供することができた。これらの評価法と菌株の分子生物学的な検討結果から、上述の血清型の分離菌株の病原性の評価を行った。血清型 4b は、最も病原性が高いグループで、遺伝学的な多様性はそれほど大きくない菌群であり菌株間の病原性の強弱はあるものの、JEMRA で用いた用量反応曲線に基づいて評価が必要な菌群であることが確認された。血清型 1/2b および 1/2a は、遺伝学的に多様性が大きい菌群であり、菌株により病原性が高いと思われる株と、病原性はそれほど高くない株が共存していると思われた。ヒトへの病原性を決定するマーカーについては、病原性の評価法によりいくつかの候補が示されたが、単一の方法でヒトへの病原性の強弱を決めるマーカーの特定には至らなかった。そのため、定量的な評価を行うことは困難と思われた。

今回の研究により、実際に環境や食品から分離される LM 菌株は、一律にヒトへの病原

性を持っているのでは無く、血清型 4b のほぼすべてと、血清型 1/2b 及び 1/2a の一部の菌株がヒトへの病原性を持っており、それ以外の血清型の LM については臨床的にはあまり重要でないと考えられる。この結果は、当初の疑問である LM が食品を広く汚染しているにもかかわらず、重篤なリステリア感染症患者が極端に少ないことの回答となると思われる。今回の研究では、高病原性株のマーカーがいくつか示されたが、単一のマーカーでの評価がヒトへの病原性を評価できるほど単純ではないことも示された。

さらに、今回の検討で生体側の要因に関する新たな知見を得ることができた。すなわち、高病原性の LM であっても、あらかじめ感染を起こさない程度の低い菌数の暴露を受けていると、リステリア感染症の発症やそれによる致死が抑制されることがスナネズミの実験で明らかとなった。あらかじめ低い菌数の LM への感作があると、リステリア感染症の発症が明らかに抑えられる。この事実は、今後本菌のリスク評価を行う上で、生体側の要因をどのように考慮すべきかを含め新たな重要な課題を提起したと思われる。

Ⅲ 本研究を基に発表した論文等

1 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

- ① Okada Yumiko, Monden Syuko, Igimi Shizunobu, Yamamoto Shigeki. The Occurrence of *Listeria monocytogenes* in imported ready-to-eat foods in Japan. The Journal of Veterinary Medical Science. 74(3):373-375 (2012)
- ② Asakura Hiroshi, Kawamoto Keiko, Okada Yumiko, Kasuga Fumiko, Makino Sou-ichi, Yamamoto Shigeki, and Igimi Shizunobu. Intrahost passage alters SigB-dependent acid resistance and host cell-associated kinetics of *Listeria monocytogenes*. Infection, Genetics and Evolution. 12(1):94-101 (2012)
- ③ Okada Yumiko, Ohnuki Ami, Suzuki Hodaka, Igimi Shizunobu. Growth of *Listeria monocytogenes* in refrigerated ready-to-eat foods in Japan. Food Additives & Contaminants: Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 30(8):1446-1449 (2013)

2 本研究を基にした学会発表の実績

- ① 五十君 静信。食品微生物制御に関するトピックスーリステリアおよびクロノバクター、患者及び食品等由来の血清型 4b に属する *Listeria monocytogenes* 菌株の病原性評価。平成 23 年度食品微生物技術懇話会。2011. 6.
- ② Yumiko Okada, Shuko Monden, Hidemasa Izumiya, Akiko Nakama, Shizunobu Igimi, Shigeki Yamamoto. Characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from the retailed foods in Japan. IUMS (2011. 札幌)
- ③ Yumiko Okada, Izumi Ohnuki, Hodaka Suzuki, Shuko Monden, Shizunobu Igimi. Growth of *Listeria monocytogenes* in refrigerated ready-to-eat foods in Japan. 11th International symposium on toxic microorganisms, "Risk Control and Food Safety", UJNR. 2012. 3.
- ④ Yumiko Okada, Yoshika Momose, Hodaka Suzuki, Hiroshi Asakura, Shizunobu

Igimi*. Diversity of virulence between the isolates of *Listeria monocytogenes* from patients, foods and animals. World Dairy Summit 2012. South Africa, Cape Town. 2012. 11

- ⑤ 岡田由美子, 百瀬愛佳, 鈴木穂高, 朝倉宏, 五十君静信. 患者及び食品等由来の血清型 4b に属する *Listeria monocytogenes* 菌株の病原性評価. 第 85 回日本細菌学会総会. (2012. 3. 長崎)
- ⑥ 岡田由美子, 鈴木穂高, 門田修子, 百瀬愛佳, 朝倉宏, 五十君静信. *Listeria monocytogenes* 血清型 4b 株の病原性関連遺伝子の解析. 第 86 回日本細菌学会総会. 千葉幕張メッセ (2013. 3. 千葉)
- ⑦ Yumiko Okada, Hodaka Suzuki, Shuko Monden, Yoshika Momose, Shizunobu Igimi. Comparison of pathogenicities of *Listeria monocytogenes* serotype 4b isolates to gerbils. 18th International Symposium on Problems of Listeriosis. Goa, India. 2013. 9.
- ⑧ 朝倉宏, 川本恵子, 倉園久生, 岡田由美子, 五十君静信. *Listeria monocytogenes* 1/2b 株間に認められる遺伝学・形質学的多様性. 第 87 回日本細菌学会総会 (2014. 3. 東京)

3 特許及び特許出願の数と概要
該当無し

4 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

- ① 著書: Okada Yumiko, Asakura Hiroshi, Igimi Shizunobu. A chapter of “Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Growth Kinetics of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat (RTE) Foods” in a book of “*Listeria monocytogenes*: Food Sources, Prevalence and Management Strategies” Nova Science Publishers. pp.191-204. ISBN: 978-1-63117-054-6

IV 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	5	リステリア感染症のリスク評価で、国際的にも残された課題について、検討を行うことができた。
2 研究目標の達成度	4	血清型の特徴に着目して、チームを組織・配分して研究に当たり効率の良い研究成果が得られたが、設定した目標の困難度が高く、定量的なリスク評価まで進めることはできなかった。
3 研究成果の有効性	5	リステリアの新たな病原性の評価法を複数提供し、さらには、免疫効果がリステリア感染症の発症に影響を与えるという全く新しい考え方を提供することができた。
合 計		

総合コメント：各分担研究者が、積極的に研究を進めて当初予定していた内容を上回る成果を上げてくれた。ヒトへの病原性を評価する方法を複数提供することができた。これらの方法は今後リステリアの病原性評価に広く活用されると思われる。最終的にはヒトへの病原性を評価することのできるマーカーとなるような単純な方法には至らなかった。これまでのリスク評価では想定されていない免疫効果がリステリア感染症の発症に影響を与えるという全く新しい考え方を提供することができた。

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。