

食品を紹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

五十君 静信 (いぎみ しずのぶ)

国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部長



1984年 東京大学農学部畜産学科卒業
1989年 東京大学大学院博士課程修了農学博士（獣医学）
1989年 国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）・食品衛生部研究員
1996年 米国メリーランド大学医学部・ワクチン開発センターへ留学
1996年 国立予防衛生研究所・食品衛生部主任研究官
2001年 国立感染症研究所・食品衛生微生物部食品微生物室長
2002年 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部第一室長
2013年 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部長（現職）
岐阜大学大学院連合獣医学研究科連携教授、麻布大学客員教授、
東京農業大学客員教授

<研究成果概要>

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。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に曝される機会が多いと思われる。食品を通じ本菌に曝される機会が多いが、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す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。

平成23～25年度食品健康影響評価技術研究 研究課題番号:1101

「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」

研究分担

- 研究代表者:五十君静信 (H23-25)
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
- 研究分担者:岡田由美子 (H23-25)
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
- 研究分担者:朝倉宏 (H23-25)
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
- 研究分担者:仲真晶子 → 田中廣行(H23)→天野富美夫(H24,25)
食品・環境由来株の検討 →細胞を用いた株の評価

リステリア モノサイトゲネス

- 自然界に広く分布する
- 低温増殖性がある
- 耐塩耐酸性が強い
- 低い菌数ではあるが**広く食品を汚染している**
生肉で数10%程度
その他の食品で、数%の汚染が報告されている
- 海外では、食品による**集団発症事例**が報告されている

リステリア感染症の重要性

- 重症化したリステリア感染症は、髄膜炎や敗血症を発症し、全身性、神経系の症状を呈する
- 発症した場合、致死率は約20%と高い
- 感染経路は、ほぼ食品と考えられている
- 発症までの期間が長いため、原因食品や感染経路の特定が困難である
- 市販食品には、リステリアの汚染が広く認められる
- リステリア症の患者数は100万人あたり1人ないしは数人と、それほど多くない

リステリア感染症は、どんな病気

初期症状

38～39℃の発熱、頭痛、悪寒、嘔吐など、
インフルエンザ様症状を示す **感染後24時間程度**

重症化、全身性、神経系まで感染

髄膜炎・敗血症 **20～30日(3ヶ月)程度**

妊婦が感染すると軽いインフルエンザ様症状

胎児は、影響が強く、早産や死産の原因となる

新生児の髄膜炎・敗血症

腹痛、下痢などの急性胃腸炎症状は通常みられない

国内におけるリステリア症発生状況 (1996年～2002年)

全国の100床以上の病院を対象に行われたアンケート結果より

項目	患者数
1996年以降の発症報告総数	95人
単年度当たりの発症数	13例



年間推定発症数(病床数から推定)	83例
リステリア症発症率	0.65人/100万人

- 2007年7月に開始した厚生労働省院内感染対策サーベイランス(JANIS)事業では、327の参加医療機関のデータに基づく集計(2007年7月～2008年6月)において、リステリア・モノサイトゲネス(LM)及びリステリア属菌は、58名から分離されたと報告されている

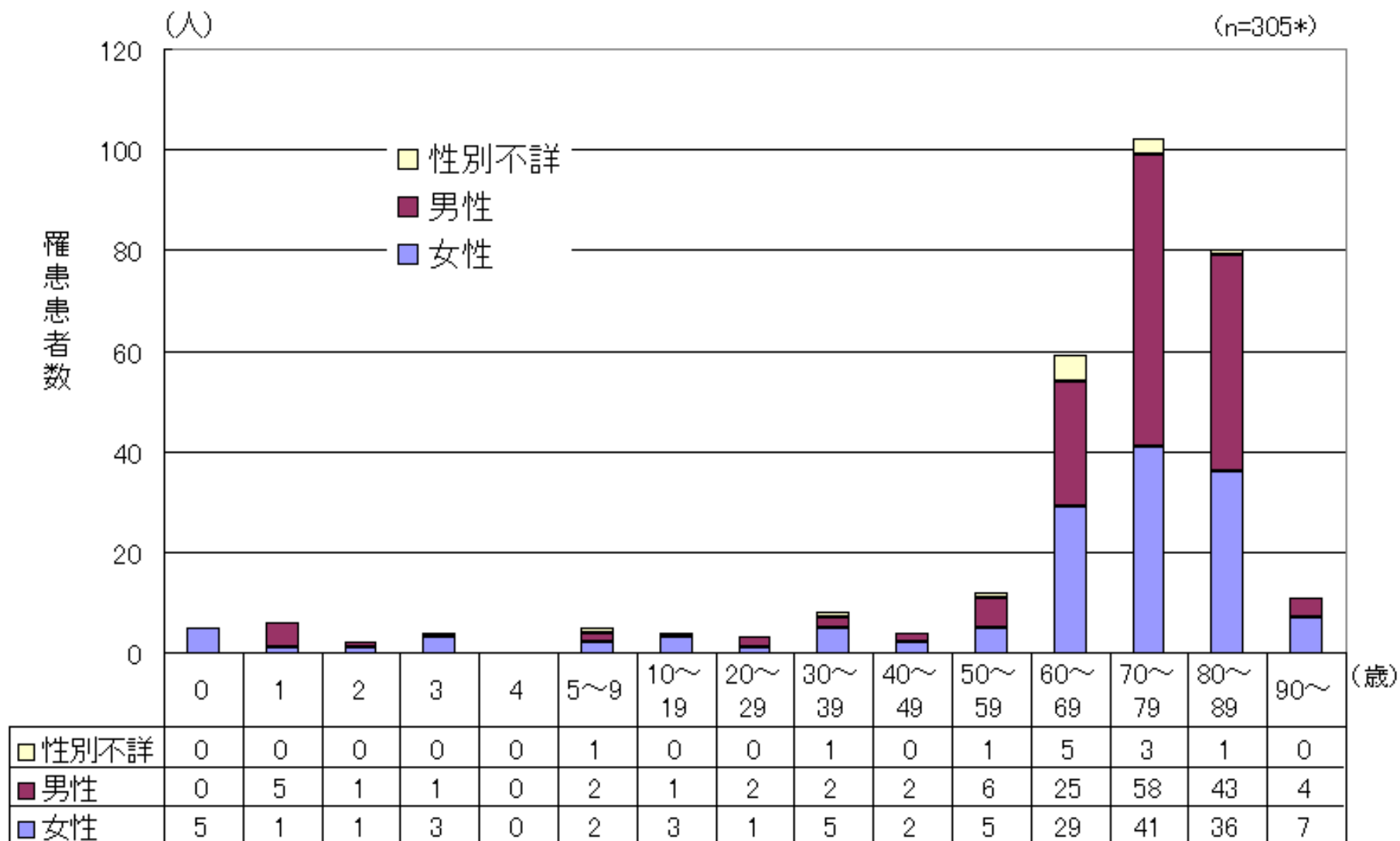
表 1. 推定リステリア症罹患率と JANIS 検査部門集計対象医療機関の年次推移

	2008 年	2009 年	2010 年	2011 年
推定罹患率 (/100 万人・年)	1.06	1.38	1.58	1.57
推定リステリア症患者数(人)	135.2	176.0	202.1	200.9
JANIS リステリア患者数(人)	49	65	84	109
集計対象医療機関数	426	480	483	579



Infectious Agents Surveillance Report

図1. 年齢群、性別リステリア症罹患患者数 2008～2011年



*年齢不詳であった2例は集計から削除

患者由来リステリアの血清型 (1958～2001年)

単位：人

血清型	1	1/2a	1/2b	1/2c	3	4a	4b	4c	4d	UT	合計
男性	13	21	119	8	1	0	267	0	2	9	440
女性	12	24	90	3	4	1	209	1	0	9	353
不明	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3
合計 (%)	25 (3.1)	46 (5.8)	210 (26.4)	11 (1.4)	5 (0.6)	1 (0.1)	477 (59.9)	1 (0.1)	2 (0.3)	18 (2.3)	796 (100)

リステリア症患者の血清型は、4b(59.9%) > 1/2b(26.4%) > 1/2a(5.8%)の順に多い

食品安全委員会のリスク評価資料から

本研究の目指すもの

- ヒトは食品を通じリステリア・モノサイトゲネス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2000年頃の推定で0.65人/100万人と極端に少ない。最新のJANISによる2011年の推計では、1.57/100万人である
- 菌株の病原性の差異については、はっきりしていない
- 血清型間、菌株間の病原性の差はあるのか→**ありそうだ！**
- あるとすると、どのような方法で振り分けられるか→**鑑別法**

LMの細胞や動物を用いた病原性評価系の確立

- 食品・環境での高病原株の分布はどのようになり、重篤なLM感染症の発症をどのように考えたら良いのか

病原性発現に係わる生体側の要因に関する知見とワクチン効果

細胞や動物評価系を用いてLMの発症に至る過程を考察

これらの知見から、LM菌株の病原性の違いを
加味した食品健康影響評価が可能か試みる

研究班の構成と分担

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 (五十君)
 - 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

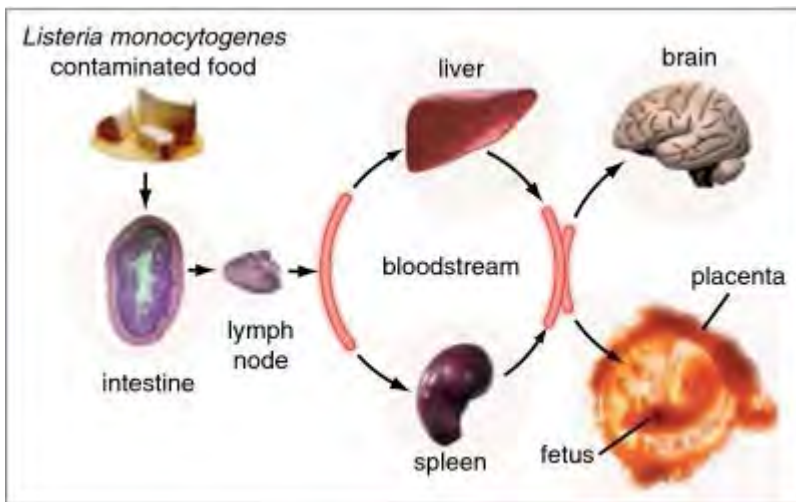
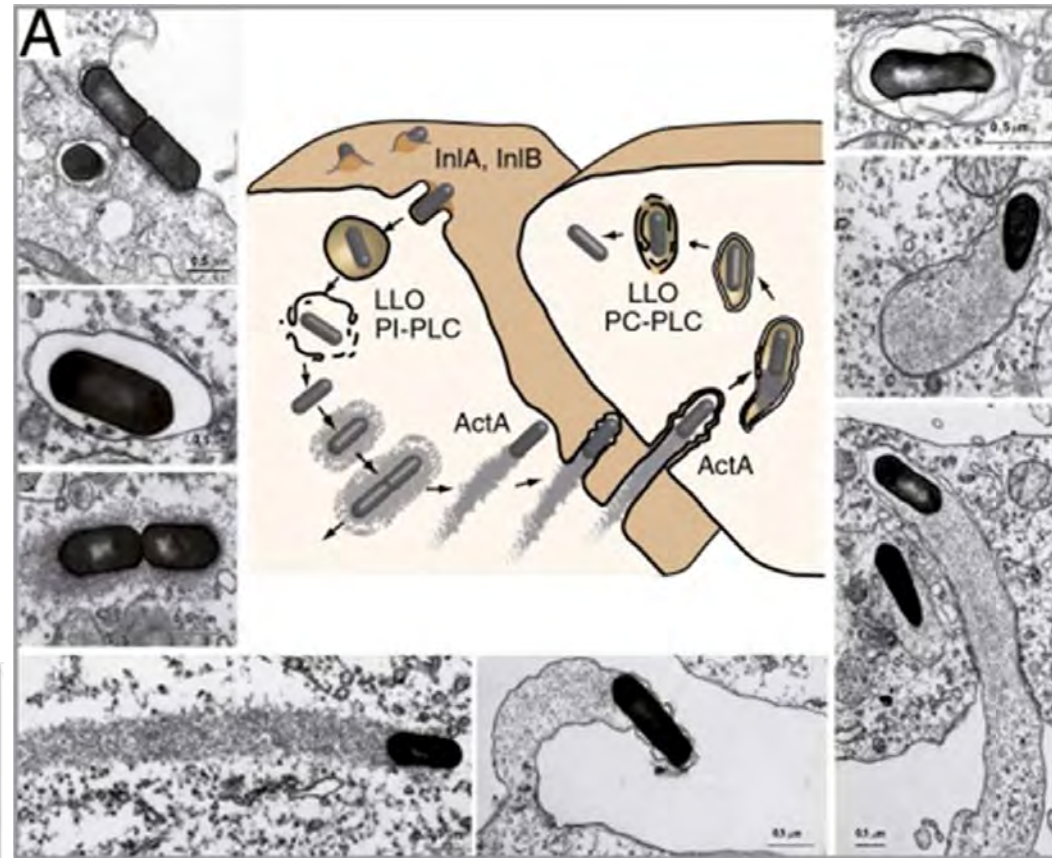
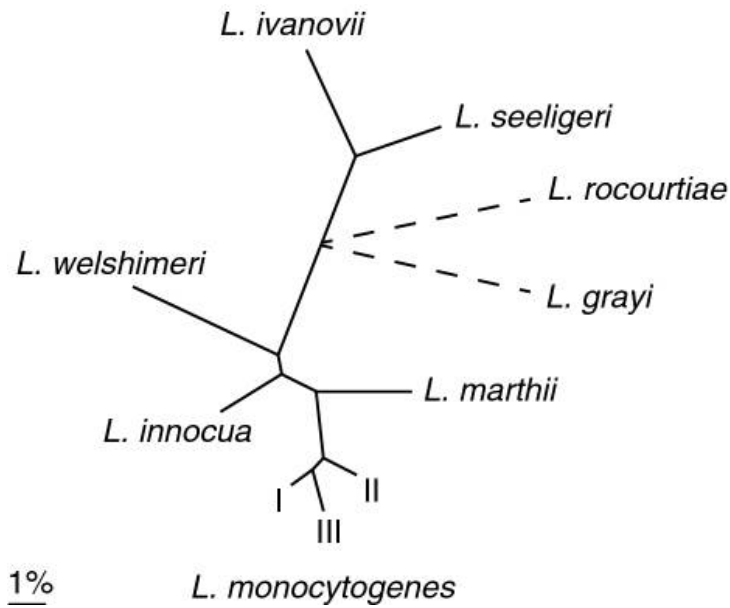
2. 血清型4bのリステリアの遺伝子レベルの解析と病原性評価 (岡田)
 - 4) LM血清型4b菌株群の病原性評価法の確立
 - 5) LM血清型4b菌株群における高病原性株の同定と感染リスク評価
 - 6) LM血清型4b菌株群における高病原性株識別マーカーの同定

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 (朝倉)
 - 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

4. 食品・環境由来株の病原性に関する検討 (田中、天野)
 - 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

LM感染症概要

Cossart P. PNAS 2011



LMの病原性に関わる主な遺伝子
prf A, *plc A*, *hly*, *act A*, *mpl*,
plc B, *inl A*, *iap*, *clp C*, *opuCA*

血清型4b株の病原性評価法の確立 及び病原性評価

- スナネズミMGW雌3か月齢(自家繁殖)
- 経口投与4日目に肝臓、脾臓の摘出
→臓器内菌数の計測
- 免疫不全モデルとして、経口投与前日に
免疫抑制剤(シクロスポリンA)を腹腔内投与
- 1菌株につき5頭のスナネズミを使用
- 各菌株に1頭、脳を摘出して病理組織学的解析

- 食品由来株及び患者由来株 各6株について病原性評価を
実施

血清型4bに関するまとめ及び結論

- 健常動物において有意に低い菌数を示した株でも、免疫不全動物では大幅な菌数の増加がみられた。
- 脳の病理組織学的解析を行った40個体のうち、脳炎又は髄膜炎が見られた個体は10個体であった。
- そのうち9頭はシクロスポリンAによる免疫不全状態の個体であった。一方、脳炎及び髄膜炎の有無と、肝臓及び脾臓の菌数には相関はみられなかった。



血清型4bの病原性評価に関しては、健常動物に加え、免疫不全動物での評価を行う必要があると思われ、この検討により供試菌株のほとんどもに病原性が確認された。

小 括

生体通過による酸抵抗性・病原性変動に関する検討

- 2001年集団感染疑い事例由来株(血清型1/2b)のうち、生体通過により酸抵抗性の減弱を認める菌株を見出した。
- タンパク変動及び比較ゲノム解析等を通じ、上記形質変化は*rsbW*遺伝子変異に基づくSigB依存性機能喪失に因ることを明らかにした。

血清型1/2b株間でのゲノム多様性と病原性との関連性に関する検討

- 国内分離株の血清型1/2b株は4b株に比べ、ゲノム多様性に富んでいた。
- 1/2b株はカイコ致死毒性にも菌株間多様性を示した。
- 1/2b株においては、LLO等のタンパク分泌活性の弱い株は、カイコ致死毒性も弱い傾向を示し、病原性マーカーとしての有用性が示唆された。
- 4b株は高いカイコ致死毒性を示す一方、1/2c株は致死毒性を示さなかった。

LM感染に伴うRAW264.7細胞のNF- κ B関連遺伝子群応答性に関する研究

- LLO欠損は、LMのM ϕ 侵入性やTNF- α 誘導活性を低下させた。
- LM感染に伴う同細胞での*cc15* (RANTES)遺伝子発現がLLO発現の有無と関連を示し、LLO依存性の細胞毒性を評価するマーカーとしての有用性が示唆された。

ヒトKB細胞を用いた、リステリアの病原性の評価系の開発

【研究目的】

ヒトに対する病原性の評価系を確立するため、ヒト扁平上皮がん細胞であるKB細胞を用いた実験系を検討した。

【研究の背景】

- ①リステリア菌のヒトへの経口感染における組織・細胞内への侵入系を考える上で、上皮組織に対する細菌の親和性・付着(接着)性、ならびに侵入性を考慮する必要がある。
- ②マウスやスナネズミを用いた従来の動物実験系において行われた、致死毒性を含めたさまざまな病原性の検討結果は、臨床における病原性・毒性の程度と、必ずしも一致しない場合があった。
- ③その原因の一つとして、動物とヒトにおける口腔から上部消化管の構造の違いが考えられる。

【研究の方法】

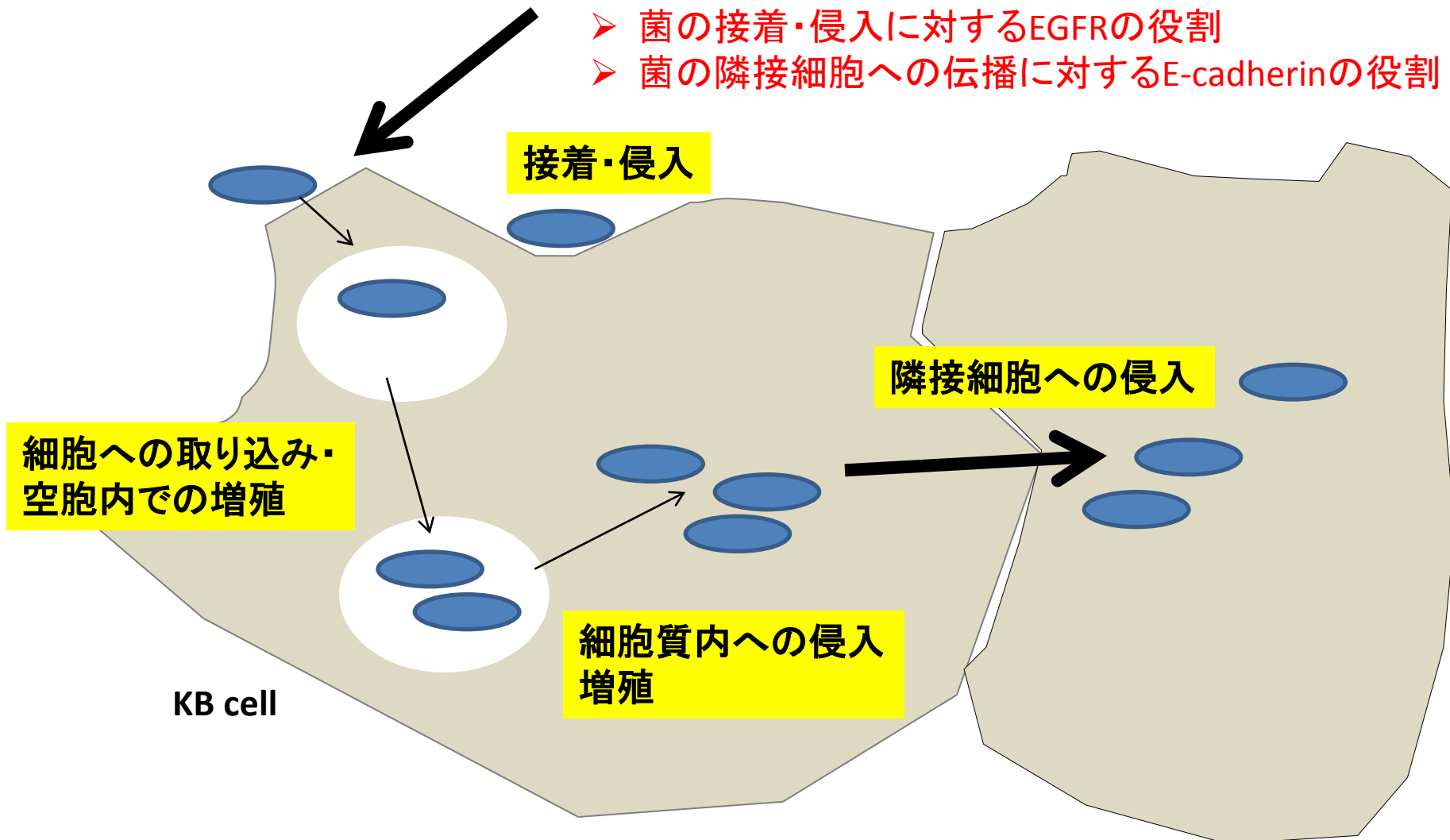
KB細胞、及びKB細胞由来のEGF応答性変異株を用いて、細胞表面のEGFRの数・分布だけでなく、E-cadherinの量ならびに細胞間のtight junctionの発達に大きな差がある細胞を用いて、リステリア感染に対する感受性、感染細胞内における菌の増殖、細胞間での菌の伝播の違いについて検討する

【モデル図】

Listeria monocytogenes (LM)

宿主要因:

- 菌の接着・侵入に対するEGFRの役割
- 菌の隣接細胞への伝播に対するE-cadherinの役割

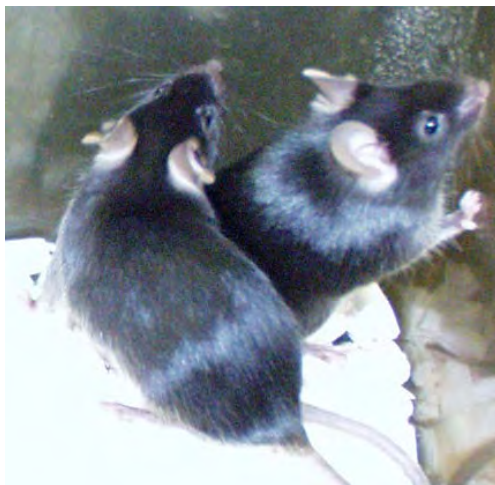
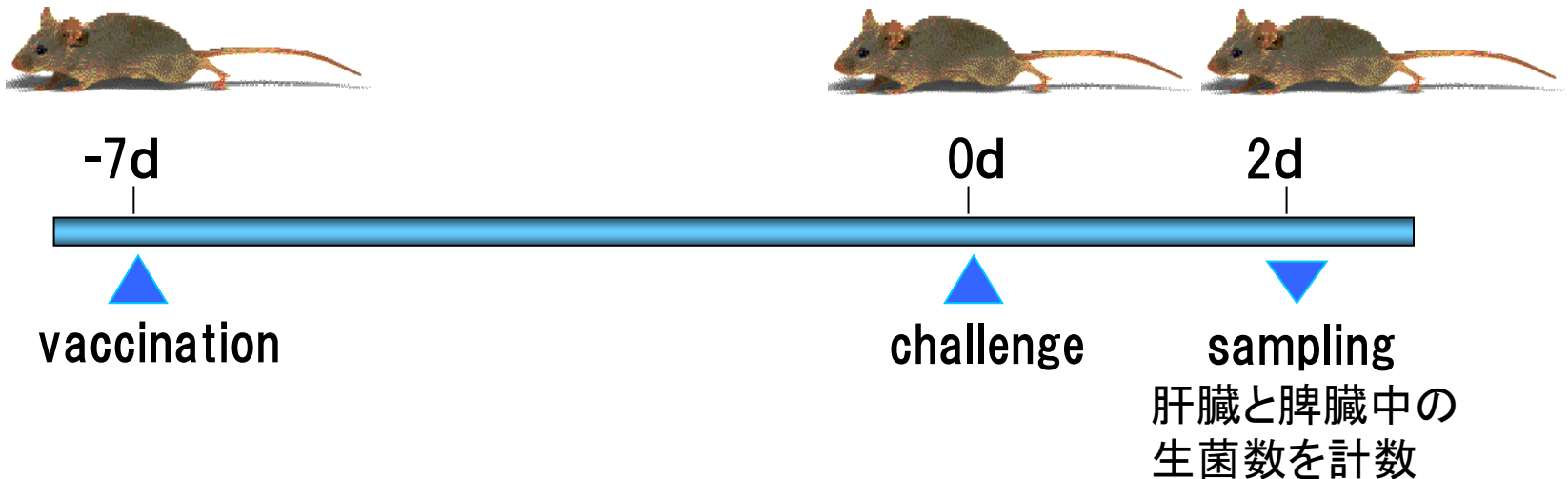


ヒトKB細胞評価系のまとめ

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が示唆された。

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が示唆された。

C57BL/6マウスにおける免疫効果の観察



予め、少数のLMを投与した群



コントロール群

腹腔内に 10^7 CFUのY7株を投与(ほぼ100%致死菌数)し、2日後のマウスの状態
脾臓中の菌数は、予め少数を投与することにより、コントロールに比べ 10^3 個低下していた

研究班の構成と分担成果

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: スナネズミ、継代細胞、カイコなど
- 2) 生体側の免疫効果の評価検討: マウス、スナネズミにより、確認
- 3) 高病原性株や免疫効果を加味した食品健康影響評価: 一部が関与

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) 4b菌株群の病原性評価法の確立: スナネズミの経口モデル
- 5) 4b菌株群における高病原性株の同定と感染リスク評価: 宿主の免疫状態
- 6) 4b菌株群における高病原性株識別マーカーの同定: 候補遺伝子選定

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: 比較ゲノム、カイコ、タンパク分泌
- 8) 菌株の病原性の評価手法に関する検討: RAW264.7細胞、cc15

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: 検討済み
- 10) 高病原性LMマーカーの分布調査: マーカーの検討

研究の総括

1. 細胞、スナネズミなどの動物による病原性評価法を確立し、これらの評価法を用いて、LM分離株の病原性評価を行った。
2. 血清型4bの臨床株と食品由来株について病原性の評価を行い、菌株の病原性以上に宿主の免疫状況が感染病態に強く関与することが示された。
3. 血清型1/2a、1/2bの複数の病原遺伝子に関する保有・転写活性状況を検討し、血清型1/2b菌株については、遺伝的に多様であり、その病原性は一律ではないことを示した。
4. 遺伝子レベルでの解析結果と、実験動物における病原性を考察し、高病原性のマーカーとなる遺伝子情報を検討し、血清型や特定の遺伝子産物をマーカーとして高病原性株の特定が可能であることを示した。
5. 免疫効果について、スナネズミ(経口投与)により評価し、低菌数暴露が後の高菌数暴露に於いて発症抑制効果があることを示した。