

食品における *Listeria monocytogenes* の
疫学解析に関する研究

2016 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

下島 優香子

目次

諸言	1
表	8
第一章 東京都内に流通する食品における <i>Listeria monocytogenes</i> 汚染実態調査	
第一節 東京都内に流通する ready-to-eat 食品中の <i>Listeria monocytogenes</i> 検出状況と汚染菌量 (2000-2012 年)	
序論	13
材料と方法	
1. 供試検体	14
2. <i>L. monocytogenes</i> および <i>Listeria spp.</i> の分離と同定	14
3. <i>L. monocytogenes</i> 菌数の測定	17
4. <i>L. monocytogenes</i> 血清型別	18
5. 食品の pH および Aw の測定	19
結果	
1. RTE 食品中の <i>L. monocytogenes</i> 検出状況	19
2. RTE 食品中の <i>L. monocytogenes</i> 汚染濃度	22
3. RTE 食品から分離された <i>L. monocytogenes</i> の血清型	22

4. <i>L. monocytogenes</i> が検出された RTE 食品の pH と Aw	23
考察	24
表	30
図	37

第二節 東京都内に流通する牛内臓肉からの *Listeria monocytogenes* および食中毒菌検出状況

序論	40
材料と方法	
1. 供試検体	41
2. <i>L. monocytogenes</i> の検出および血清型別検出方法	41
3. VTEC の検出および病原因子保有状況	42
4. <i>C. jejuni</i> および <i>C. coli</i> の検出	46
5. サルモネラの検出および血清型別試験	48
6. 糞便系大腸菌群の検出	49
結果	
1. <i>L. monocytogenes</i> 検出状況	50
2. VTEC 検出状況	50
3. <i>C. jejuni</i> および <i>C. coli</i> 検出状況	51

4. サルモネラ検出状況	51
5. 複数の食中毒菌検出状況	51
6. 糞便系大腸菌群検出状況	52
7. 糞便系大腸菌群と <i>L. monocytogenes</i> およびその他食中毒菌との関係	52
考察	52
表	55
第二章 食品からの <i>Listeria monocytogenes</i> 検出法の比較	
序論	61
材料と方法	
1. 供試検体	62
2. <i>L. monocytogenes</i> 検出法	63
3. <i>L. monocytogenes</i> 定量法	64
4. コーデックス委員会の微生物規格におけるサンプリングプランの検証	65
結果	
1. <i>L. monocytogenes</i> の検出	65
2. <i>L. monocytogenes</i> の定量	66
3. コーデックス委員会の微生物規格におけるサンプリングプラン	

の 検 証	67
-------	----

考 察	68
-----	----

表	71
---	----

第三章 *Listeria monocytogenes* の Multiplex PCR による血清群別法の検討

序 論	76
-----	----

材料と方法

1. 供試菌株	77
---------	----

2. <i>L. monocytogenes</i> 血清型別法	77
----------------------------------	----

3. <i>L. monocytogenes</i> PCR serogrouping のための Multiplex PCR 法	78
------------------------------------------------------------------	----

4. <i>orf2110</i> を検出する PCR	81
-----------------------------	----

5. <i>orf2110</i> , <i>lmo0737</i> PCR 増幅産物の塩基配列解析	82
----------------------------------------------------	----

6. Pulsed-Field Gel Electrophoresis 解析	85
----------------------------------------	----

7. Multilocus Sequence Typing	87
-------------------------------	----

結果

1. PCR 条件の検討	88
--------------	----

2. <i>L. monocytogenes</i> 分離株の PCR serogrouping	89
--------------------------------------------------	----

3. <i>L. monocytogenes</i> MMS 10081 株の塩基配列解析, PFGE 解析および	
-----------------------------------------------------------	--

び MLST	90
4. PCR serogroup IVb-v1 株の解析	91
考察	92
表	96
図	102
総括	110
謝辞	114
引用文献	115

略語一覧

Aw : Water activity (水分活性)

BHI : Brain heart infusion

BPW : Buffered peptone water (緩衝ペプトン水)

CAMP 試験 : Christie Atkins Munch-Peterson test

CF : セファロチン

CFU : colony forming unit (コロニー形成単位)

CT-SMAC 寒天培地 : Cefixime, Potassium Tellurite 加 Sorbitol

MacConkey agar

CT-RMAC 寒天培地 : CT 加 Rhamnose MacConkey agar

CT-SBMAC 寒天培地 : CT 加 Sorbose MacConkey agar

DHL 寒天培地 : Deoxycholate-hydrogen sulfide-lactose agar

EB 培地 : Enrichment broth

EHEC : Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (腸管出血性大腸菌)

EMB 培地 : Eosin methylene blue agar

EtBr : Ethidium bromide (臭化エチジウム)

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations (国際
連合食糧農業機関)

flaA : flagellin A gene

H 抗原 : Flagella antigen (鞭毛抗原)

IDF : International Dairy Federation (国際酪農連盟)

ISO : International Organization for Standardization (国際標準化機構)

JANIS : Japan Nosocomial Infections Surveillance (厚生労働省院内感
染対策サーベイランス)

LIM : Lysine indole motility

mCCDA 培地 : Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar

mEC 培地 : modified *E. coli* medium

MLST : Multilocus Sequence Typing

MPN : Most Probable Number (最確数)

NA : ナリジクス酸

O 抗原 : Somatic antigen (菌体抗原)

OUT : O untypable (O 群型別不能)

PALCAM 寒天培地 : Polymyxin acriflavine lithium chloride ceftazidime
aesculin mannitol agar

PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis

prfA : Positive regulatory factor A gene

prs : Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase gene

RTE 食品 : ready-to-eat 食品 (加熱しないでそのまま食べる食品)

RV : Rappaport-Vassiliadis

SS 寒天培地 : *Salmonella Shigella* agar

ST : Sequence type

TE バッファー : Tris-EDTA バッファー

TSA : Tryptone soya agar (トリプトソイ寒天培地)

TSI : Triple sugar iron

USDA, FSIS : United States Department of Agriculture, Food Safety and
Inspection Service (米国農務省食品安全検査局)

UVM 培地 : University of Vermont enrichment broth

VP 試験 : Voges-Proskauer 試験

VT : Verotoxin (ベロ毒素)

VTEC : Verotoxin-producing *Escherichia coli* (ベロ毒素産生性大腸菌)

WHO : World Health Organization (世界保健機関)

諸言

リステリア症は *Listeira monocytogenes* を原因とする人獣共通感染症である。*L. monocytogenes* は、通性嫌気性のグラム陽性、無芽胞の短桿菌で運動性を有する(74)。哺乳類、鳥類、魚介類、水、土壌など自然界に広く分布し、菌体外多糖を分泌してバイオフィルムを形成すると、環境に対する抵抗性が増加して清掃、消毒薬による除去が困難となる。*Listeriaceae* 科の *Listeria* 属には現在 19 菌種が含まれ(9)、ヒト、食品および環境から主に分離されるものは *L. monocytogenes* のほか、*L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* の 6 菌種である。そのうち *L. monocytogenes* がヒトおよび動物に病原性を有する。

L. monocytogenes は、獣医学領域では反芻動物の流産、敗血症、髄膜炎の原因として知られており、ヒトにおいても 1924 年に同菌の初めての感染が報告された(51)。ヒトが *L. monocytogenes* に感染すると、風邪様症状や嘔吐、下痢等の急性胃腸炎症状を示すが(非侵襲性疾病)、健康な成人では発症しないことも多い(11)。一方、基礎疾患のあるヒト、免疫機能が低下したヒトや高齢者などでは、髄膜炎や敗血症に進展する場合があります、重症化すると致死率は 15～20%に及ぶ。また妊婦が *L. monocytogenes* に感染した場合には、妊婦自身は無症状か軽症であっても、胎盤を通じて胎児に感染し新生児敗血症や髄膜炎を起こすこと、流産、早産や死産の原因となることがある(侵襲性疾病)。

ヒトのリステリア症の診断は、髄液、血液、羊水、胎盤、関節液などの臨床材料から、*L. monocytogenes* を分離することにより行う。

わが国においては感染症法の対象疾病ではないため、明確な患者数の把握はできないが、厚生労働省院内感染対策サーベイランス（JANIS）によると、血液または髄液から *L. monocytogenes* が分離された患者をリステリア症患者と定義した場合、患者数は2011年では年間200人程度に達し、その75%以上が高齢者と推定されている（78）。

食品がヒトのリステリア症の感染源として初めて証明されたのは東ドイツでの牛の生乳を原因とする事例で、1950年代になってからである（62）。日本国内で食品媒介リステリア症の集団発生と証明されたのは、2001年に北海道で発生したナチュラルチーズを原因食品とする事例のみである（46）。この国内事例では、喫食者86人のうち風邪様症状を主体とする発症者は38人（44.4%）、重症例は報告されず、非侵襲性疾患と考えられた。一方、欧米やオーストラリアでは、チーズ、アイスクリーム等の乳製品、ミートパテ等の食肉加工品、スモークサーモン等の魚介類加工品、サラダ類、果物を原因食品とする事例が発生している（11）（表1）。それらの多くは侵襲性疾患で高い致死率を示している。最近ではリステリア症の主な原因は汚染食品等の喫食であると考えられているが（11, 50）、国内に流通する食品の汚染率および汚染菌量は十分に明らかにされていない。

Food and Agriculture Organization of the United Nations（FAO；国際連合食糧農業機関）、World Health Organization（WHO；世界保健機関）で、*L. monocytogenes* のリスク評価にヒトの50%発症率に対応する摂取菌量が用いられているが、それは用量反応モデルを用いて推定されており、免疫機能が低下しているヒトでは $10^9 \sim 10^{10}$

colony forming unit (CFU) /人，重度に免疫が抑制されているヒトでは $10^4 \sim 10^5$ CFU/人，健康な妊婦では 10^6 CFU/人とされている(10)。

L. monocytogenes の最適発育温度は 37°C 付近であるが，発育温度の上限は 45°C ，下限は -0.4°C であり，低温での増殖性がサルモネラ等，他の食中毒起因菌に比べて高い(20)。なお，本菌の 4.4°C での世代時間は 36.0 時間， 10°C では 10.0 時間である(67)。また，本菌は耐塩性があり，増殖可能な最大食塩濃度は 13~16%とされる(53, 56)。各種殺菌剤については，次亜塩素酸ナトリウム，ヨード，塩化ベンザルコニウムで十分な殺菌効果がある(20)。しかし，環境中でバイオフィルムを形成すると，殺菌剤に対する抵抗性が増すので注意が必要である。そのため，食品製造施設等においては清掃・消毒しやすい設計の機械の使用，蒸気加熱による殺菌，効果が持続しエアロゾルを発生させない泡状およびジェル状の消毒剤使用，室内環境を低温・低湿度・清浄に保つこと等が重要とされている(29)。

L. monocytogenes は食肉，魚介類，環境中に広く存在し，また環境中ではバイオフィルムを形成し長期間生存するため，食品の汚染は原材料由来の汚染および加工施設の環境からの二次汚染が考えられている。更に低温増殖性があるため，ナチュラルチーズ，食肉製品（ハム等）などの ready-to-eat 食品（RTE 食品，加熱しないでそのまま食べる食品）では，*L. monocytogenes* に汚染されていた場合，冷蔵で長期間保存する間の本菌の増殖が問題である。米国では，調理済み食品の衛生管理には *L. monocytogenes* の制御が規定されており，FAO/WHO および United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (USDA, FSIS；米国農務省食品安全検査局) の食品衛生ガイドラインにも製造施設内環境中の *L.*

monocytogenes あるいは *Listeria spp.* のモニタリングの重要性，方法等が示されている（11，13）。

Codex Alimentarius Commission（コーデックス委員会）は，消費者の健康の保護，食品の公正な貿易の確保等を目的として，1963年にFAOおよびWHOにより設置された国際的な政府間機関であり，国際食品規格の策定等を行っている。コーデックス委員会は2007年に「食品中の *L. monocytogenes* の制御のために食品衛生の一般原則を適用するガイドライン」を，2009年にその付属文書として「RTE食品の *L. monocytogenes* 微生物規格」を策定した（4，5）。この規格では，*L. monocytogenes* の増殖が起こりえない食品では，製品の各製造・出荷単位（ロット）の5サンプルについて100 CFU/g以下，増殖が起こりうる食品では各ロットの5サンプルについて25 g中に陰性であることとし，その試験法は International Organization for Standardization（ISO；国際標準化機構）の方法として公表した（22，23）。増殖が起こりうるとは，RTE食品の消費期限の間に平均 $10^{0.5}$ CFU/g 増加が起こることと考えられ，増殖が起こりえない例として，pHが4.4未満，水分活性（water activity: Aw）が0.92未満，pHとAwの組み合わせが例えば pH5.0未満かつ Aw0.94未満および凍結保存があげられた。

わが国では，1993年以降，加熱せずにそのまま喫食する食肉製品やナチュラルチーズの25 gから *L. monocytogenes* が検出された場合に，食品衛生法第6条3号に基づき，輸入や販売が制限される場合があった（38）。その検査法として，当時の International Dairy Federation（IDF；国際酪農連盟）の試験法（21）に準拠する方法が「乳、乳製品中のリステリア検査法手順（IDF標準法）」として通

知されていた（平成 5 年通知法）（38）。その後 2007 年に IDF の試験法は ISO 法（22）に統合された。国際ハーモナイゼーションの必要性から，2014 年に内閣府食品安全委員会のリスク評価を経て（53），ナチュラルチーズ（ソフトおよびセミハードタイプ）と非加熱食肉製品について *L. monocytogenes* が 1 g につき 100 CFU 以下とする成分規格が定められ（32，33），試験法としては ISO 法（22，23）に準じた検査法が採用された（35）。国内での公定法が変わるため，試験法の比較が必要であるが，比較検証はされておらず，その差異は明らかでなかった。

L. monocytogenes の汚染源を明らかにするための疫学解析に分離株の型別は必要不可欠であり，血清型別（65），Pulsed-Field Gel Electrophoresis（PFGE）（16），Multilocus Sequence Typing（MLST）（63）などが用いられている。血清型別は第一に行われる方法で，*Listeria spp.* の血清型は I ～ X V の菌体抗原（O 抗原）と鞭毛抗原（H 抗原）の組合せにより決定され，*L. monocytogenes* には 13 血清型が報告されている（56，65）（表 2）。これらの血清型は遺伝学的に 4 つのグループ（Lineage I, II, III, IV）に分けられる（58）。Lineage I には血清型 1/2b, 4b, 4d, 4e, 3b, 7 が，Lineage II には 1/2a, 1/2c, 3a が，Lineage III, IV には 4a, 4c が含まれる。食品媒介性リステリア症集団事例の原因菌の血清型は 4b が最も多いが，1/2a および 1/2b も認められる。また，食品安全委員会の調査によれば，国内で 1958～2001 年に髄膜炎，敗血症を伴うリステリア症 796 人から分離された *L. monocytogenes* の血清型は 4b（59.9%）が最も多く，次いで 1/2b（26.4%），1/2a（5.8%）の順であったとされる（53）（表 3）。一方，国内流通食品由来 174 株の血清型は，1/2a（47.1%），1/2c（15.5%），

1/2b (13.8%) の順であった (53) (表 4)。リステリア症患者由来株と食品由来株の血清型は傾向が異なり, それはおそらく病原性の強さが血清型によって異なるためと考えられている (25, 64)。

従来の O 抗原と H 抗原を組み合わせる血清型別試験は, 判定までに時間を要し, また各抗原の発現が弱く, 判定が困難な株や不能な菌株も存在する。近年, PCR serogrouping と呼ばれる PCR を応用した血清型別法が *L. monocytogenes* 分離株の迅速・正確な型別ツールとして開発された (7, 26, 42)。本法は, *L. monocytogenes* DNA 上の 5ヶ所の遺伝子領域 (内 1ヶ所は *Listeria* spp. に共通の領域) を増幅する Multiplex PCR 法により検出されるバンドの組合せで群別する型別法であり, WHO リステリア国際レファレンスセンターで型別法としての導入が検討されている方法である。この手法を用いることにより, *L. monocytogenes* は Lineage に対応する 5つの血清群に分けられることが期待されるが, 国内分離株における検証の報告はない。

本論文では, このような状況から食品を介しての *L. monocytogenes* によるヒトの健康危害を防ぐため, まず流通する食品からの *L. monocytogenes* 検出状況, 汚染菌濃度を明確にした。さらに, 分離菌株の血清型等の疫学解析を行うことで, 汚染実態を解析することを目的とした。また, 食中毒発生時の感染源解明や製品製造時の汚染経路の推定には分離された菌株間の識別が重要である。より正確に, また迅速に, *L. monocytogenes* 菌株の形別が可能な方法を開発することが求められる。そこで, 型別法の一つとして, 最近開発された分子疫学法の一つである PCR serogrouping について, 国内分離株を用いて検討した。

第一章では、各種食品および食品原材料における *L. monocytogenes* の汚染実態を調査した。すなわち第一節では、2000年から2012年に東京都内に流通した RTE 食品の *L. monocytogenes* の検出状況、汚染菌濃度、分離菌株の血清型を調査した。その結果、*L. monocytogenes* の危害要因として最も大きいと考えられる RTE 食品は、本菌に汚染されている実態を明らかにした。

第二節では、牛内臓肉を対象に *L. monocytogenes* の検出状況、分離菌株の血清型別の調査を行った。併せて他の食中毒起因細菌、汚染指標菌として糞便系大腸菌群の汚染実態を調べた。それらの成績に基づき、食中毒起因細菌の汚染率が高いとされる牛内臓肉では21.2%と高率に *L. monocytogene* に汚染される実態を明らかにした。

第二章では、国内の食品からの *L. monocytogenes* 検出法が旧 IDF に準拠した平成5年通知法から、ISO法準拠の平成26年通知法に変わったことから、平成5年通知法と、平成26年通知法の基となったISO法による *L. monocytogenes* の検出を比較検討することで、通知法変更の影響は少ないことを明らかにした。

第三章では、PCRを応用した *L. monocytogenes* の血清型別法として新たに開発された PCR serogrouping に関して、さらに迅速性を高めるために既報から条件を改良し、プライマー濃度、反応条件、使用試薬を決定した。その条件を用いて1989年から2012年に日本で分離された *L. monocytogenes* 菌株を対象に PCR serogrouping を行い、従来の血清型別法による結果と比較検討した。その結果、PCR serogrouping が簡易・迅速で再現性のある有用な疫学解析ツールであることを明らかにした。

表 1. 食品媒介リステリア症の主な集団発生例

発生年	発生国 (地方)	患者数	死者数	血清型	原因食品
1981	カナダ	41	17	4b	コーンスロー (キヤバツサラダ)
1983	アメリカ	49	14	4b	殺菌乳
1985	アメリカ	142	48	4b	ソフトタイプチーズ
1983-87	スイス	122	34	4b	ソフトタイプチーズ
1986-87	アメリカ	36	16	4b他	アイスクリーム、サラミソーセージ、ブリーチーズ
1987-89	イギリス	355	94	4b,4bx	ミートパテ
1989-90	デンマーク	23	6	4b	青カビタイプなどのチーズ
1990	オーストラリア	11	6	1/2a	パテ、ミートスプレッド (食肉製品)
1992	フランス	279	85	4b	豚タンのゼリー寄せ
1993	フランス	31	11	4b	リーエット (豚肉調理品)
1993	イタリア	18	0	1/2b	ライスサラダ
1994	アメリカ	45	0	1/2b	チョコレートミルク
1995	フランス	33	4	4b	ソフトタイプチーズ
1997	フランス	14	0	4b	ソフトタイプチーズ
1997	イタリア	1,566	0	4b	コーンサラダ
1998-1999	フィンランド	25	6	3a	バター
1998-1999	アメリカ	101	21	4b	ホットドッグなどの食肉製品
1999-2000	フランス	26	7	4b	豚タンのゼリー寄せ
2000	アメリカ	30	7	1/2a	調理済み七面鳥
2000-2001	アメリカ	12	5	4b	ソフトタイプチーズ
2001	アメリカ	16	0	1/2a	調理済み七面鳥 (スライス)
2001	日本	38	0	1/2b	ソフト、セミハードタイプチーズ
2002	アメリカ	63	7	4b	調理済み七面鳥
2002	カナダ	17	0	4b	ソフト、セミハードタイプチーズ
2003	イギリス	17	0	4b	バター

2005	スイス	12	3	1/2a	ソフトタイプチーズ
2006	チェコ	20~30		1/2b	チーズ、ミックスサラダ
2006-2007	ドイツ	189	27	4b 他	殺菌乳から製造した酸性カードチーズ
2008	カナダ	57	22	1/2a	食肉製品
2009	オーストリア・ドイツ・チェコ	34	8	1/2a	酸チーズ
2010	アメリカ	10	5		セロリ
2011	アメリカ	147	33	1/2a,1/2b	カンタロープメロン
2012	オーストリア・ドイツ・チェコ	22	4	1/2a	リコッタチーズ
2013-2014	デンマーク・マケドニア	41	17		スパイスミートロール
2014	アメリカ	35	7		キャラメルリンゴ
2014-2015	アメリカ	10	3		アイスクリーム
2010-2015	アメリカ	30	3		ソフトチーズ
2015-2016	アメリカ・カナダ	29	4		包装済みサラダ製品

(文献番号 53, 55 より改変引用)

表2. *Listeria* 属菌の血清型およびその抗原構造

血清型	抗原構造			菌種
	O抗原	H抗原		
1/2a	I (III) a)	A B		<i>L. monocytogenes</i>
1/2b	I (III)	A B C		<i>L. monocytogenes</i>
1/2c	II (III)	B D		<i>L. seeligeri</i>
3a	II (III) IV	A B		<i>L. monocytogenes</i>
3b	II (III) IV	A B C		<i>L. monocytogenes</i>
3c	II (III) IV	B D	(X II X III) (X II X III)	<i>L. monocytogenes</i>
4a	(III) (V)	A B C	IX	<i>L. monocytogenes</i>
4ab	(III) (V) VI VII	A B C	IX X	<i>L. monocytogenes</i>
4b ^{b)}	(III) (V) VI	A B C		<i>L. innocua</i>
4c	(III) (V) VII	A B C		<i>L. monocytogenes</i>
4d	(III) (V) VI VIII	A B C		<i>L. monocytogenes</i>
4e	(III) (V) VI (VIII) (IX)	A B C		<i>L. seeligeri</i>
5	(III) (V) VI (VIII)	A B C	X	<i>L. monocytogenes</i>
7	(III) (V) VI (VIII)	A B C	X II X III	<i>L. ivanovii</i>
6a	(III) (V) (VI) (VII) (IX)	A B C		<i>L. monocytogenes</i>
6b	(III) (V) (VI) (VII) (IX) X XI	A B C	XV	<i>L. innocua</i>
	(III)		X II X III X IV	<i>L. welschimeri</i>
				<i>L. innocua</i>
				<i>L. welschimeri</i>
				<i>L. seeligeri</i>
				<i>L. grayi</i>

a) () : 存在しないこともある。

b) O抗原のVIIを含むものは4bxとして分類。
(文献番号56より改変引用)

表3. 国内のリステリア症由来 *Listeria monocytogenes* の血清型 (1958-2001年)

性別	血清型										合計
	1	1/2a	1/2b	1/2c	3	4a	4b	4c	4d	UT	
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	46	210	11	5	1	477	1	2	18	796
(%)	(3.1)	(5.8)	(26.4)	(1.4)	(0.6)	(0.1)	(59.9)	(0.1)	(0.3)	(2.3)	(100)

(文献番号53より改変引用)

表 4. 国内流通食品由来 *Listeria monocytogenes* の血清型

食品群	食品検体数	<i>L. monocytogenes</i> 菌株数	血清型				
			1/2a	1/2b	1/2c	4b	その他
食肉・食肉加工品	47	55	16	8	17	7	7
乳製品	2	2		2			
魚介類・魚介類加工品	95	103	53	14	10	8	18
野菜類・野菜加工品	13	14	13			1	
合計	157	174	82	24	27	16	25
(%)		(100)	(47.1)	(13.8)	(15.5)	(9.2)	(14.4)

(文献番号 53 より改変引用)

第一章 東京都内に流通する食品における *Listeria monocytogenes* 汚染実態調査

第一節 東京都内に流通する ready-to-eat 食品中の *Listeria monocytogenes* 検出状況と汚染菌量（2000-2012年）

序論

リステリア症の原因食品の多くはナチュラルチーズ、アイスクリーム等の乳製品、食肉加工品、燻製等魚介類加工品、サラダ類、果物などの RTE 食品と考えられる。本章では、2000～2012年に都内に流通した RTE 食品の *L. monocytogenes* 検出状況を調査した。近年、食品製造施設等の衛生管理が向上し（4, 13）、食品の保存料が各種開発されてきたため（69）、食品の *L. monocytogenes* 汚染が低減されている可能性がある。今回は、汚染状況を比較するために調査期間を前半（2000～2005年）と後半（2006～2012年）に分けて行った。

また、リステリア症の発症リスクを検討するためには、検出状況だけではなく、汚染菌量の把握も重要である。そのため、*L. monocytogenes* 陽性検体については、本菌の菌数測定も行った。

さらに、*L. monocytogenes* 陽性検体の一部について、その食品中で本菌の増殖が起こり得るかどうか、対象食品の pH と A_w の測定も試みた。

材料と方法

1. 供試検体

2000年から2012年の13年間に東京都内に流通した RTE 食品を供試した。製造業，流通拠点，輸入食品の倉庫業および小売店から合計 2,980 検体が収去または購入され，乳製品は収去または購入後 4 時間以内に，その他のチルド食品は 6 時間以内に，凍結食品は解凍後すみやかに試験に供した。内訳は，乳製品 626 検体，生食用食肉（規格基準設定（30）以前），食肉製品および食肉調理品 1,491 検体，魚介類および魚介類加工品 718 検体，野菜の漬物 145 検体である。調査期間を前半（2000～2005 年）と後半（2006～2012 年）に分け，それぞれの検体数は 1,710 検体および 1,270 検体であった。

2. *L. monocytogenes* および *Listeria spp.* の分離と同定

1) 増菌培養：供試材料は旧 IDF 準拠の平成 5 年通知法に準じて一段階増菌法にて増菌培養を行った（38）。一部は ISO 法に準じた二段階増菌法も併用して増菌培養を行った（22）。

一段階増菌法：無菌的に試料 25 g を秤量し，増菌培地を 225 ml 加え，30℃で 48 時間培養した。増菌培地は乳製品については EB 培地（Merck, Darmstadt, Germany），それ以外の試料については UVM 培地（Merck）を用いた（38, 54）。

二段階増菌法：試料 25 g に half-Fraser 液体培地（Merck）225 ml を加えて 30℃で 24 時間一次増菌培養し，その一次増菌培養液 0.1 ml を Fraser 液体培地（Merck）10 ml に加えて 37℃で 48 時間二次増菌培養を行った（22）。

2) 選択分離培養：各増菌培養液を PALCAM 寒天培地 (Merck) に画線塗抹し、30℃で24時間から48時間培養した。一部の試料は酵素基質培地；クロモカルトリステリア選択寒天培地 (Merck), CHROMagar Listeria (CHROMagar, Paris, France) にも画線塗抹し、37℃で24～48時間培養した。平板上に *Listeria* spp.と思われる集落が認められた場合は、トリプトソイ寒天培地 (TSA, 栄研化学, 東京, 日本) に釣菌して、30℃で24時間培養し純培養菌を得た。

各培地の調製は、購入した製品に添付の説明書に従って行った。

3) *L. monocytogenes* の同定：2.2)でTSA上に発育した集落をISO法に準じて同定した(22)。すなわちヘンリーの斜光法による観察、カタラーゼ試験、運動性試験、炭水化物分解試験(ラムノース, キシロース, マンニット), CAMP試験により分離菌の同定を行った。

A. ヘンリーの斜光法

TSA上の *Listeria* spp.の集落は、直径1～2mmで凸状を呈する無色不透明で、辺縁が明瞭である。実体顕微鏡を用いて45度の角度の反射光による透過光線で観察を行った(図1A)。*Listeria* spp.は真珠様の青緑色～青白色の特有の形態が観察される(図1B)。

B. カタラーゼ試験

TSA上の集落を、スライドグラス上に滴下した3%過酸化水素水中で懸濁させた。気泡が発生した場合、カタラーゼ試験陽性で、*Listeria* spp.は陽性を示す。

C. 運動性試験

TSA 上の集落を，カジトン半流動培地に穿刺して，30℃で48時間培養した。*Listeria* spp.は特有の傘状発育を示す（図2）。なお，本培地による傘状発育は，ISO法に記載される運動性試験培地

（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）を用いて30℃で72時間培養した結果と比較して，短い培養時間で良好な運動性が認められる（図2）。

カジトン半流動培地（1Lスケール）

① Bacto Casitone（Becton Dickinson, Sparks, MD, USA） 10 g

② Bacto agar（Becton Dickinson） 5 g

③ NaCl（和光純薬，大阪，日本） 5 g

蒸留水 1L に加温溶解し pH7.4 に調整後，小試験管に 4 ml ずつ分注し，121℃で15分間高圧蒸気滅菌して高層に固めた。

D. 炭水化物分解能試験

TSA 上の集落を，炭水化物分解能試験培地に接種し，35℃で72時間培養した。培地が黄変した場合に陽性とした。ラムノース，キシロースおよびマンニットの分解能を調べた。*Listeria* spp.の性状を表5に示す（22，54）。

炭水化物分解能試験培地（1Lスケール）

① Purple Broth Base（Becton Dickinson） 15 g

蒸留水 900 ml を加え，115℃で10分間加熱した。

② ラムノースまたはキシロースまたはマンニット（和光純薬）5 g 蒸留水 100 ml に溶解して 0.45 μm のフィルターでろ過滅菌を行い、①に混合した。

E. CAMP 試験

重層羊血液寒天培地に *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) と *Rhodococcus equi* (ATCC6939) を並行に画線した。次に TSA 上の集落を、*S. aureus* と *R. equi* に直角にそれぞれから 1~2 mm 離して画線し、35℃で 12~18 時間培養した。試験菌株の溶血性、*S. aureus* または *R. equi* と交差する部位で溶血が増強するかを判定した(図 3)。*Listeria spp.*の性状を表 5 に示す (22, 54)。

重層羊血液寒天培地

Blood agar base No. 2 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) に添付の説明書に従い精製水を加え、121℃で 15 分間高压蒸気滅菌した。シャーレに 8 ml 分注して固化させた後に、5%羊血液を加えたものを 6 ml 重層して固化させた。

3. *L. monocytogenes* 菌数の測定

L. monocytogenes 菌数は Most Probable Number (MPN 法, 最確数法) の 3 本法で算定した (14, 54)。すなわち、試料 25 g に増菌培地 225 ml を加えて混和し、空の試験管 3 本にそれぞれ 10 ml ずつ、増菌培地 10 ml の入った試験管に 1 ml ずつ 3 本および 0.1 ml ずつ 3 本接種した。増菌培地は乳製品の場合は EB 培地をその他の試料の

場合は UVM 培地を用いた。これらを 30℃で 48 時間培養後、培養液を PALCAM 寒天培地または第一章第一節 材料と方法 2.2) に記載された酵素基質培地に画線塗抹して、それぞれ 30℃, 37℃で 24 時間～48 時間培養した。寒天培地上に *L. monocytogenes* と推定される集落が認められた場合は第一章第一節 材料と方法 2.3) の方法に従い同定を行い、対応する試験管の数とその希釈倍率から MPN 表に基づき菌数を求めた。検出限界以下の場合には < 0.3 MPN/g となる。

4. *L. monocytogenes* 血清型別

L. monocytogenes と同定された菌株は、リステリア型別用免疫血清「生研」(デンカ生研, 東京, 日本)を用い、添付の説明書を一部改変して血清型別を行った。すなわち、第一章第一節 材料と方法 2.2)で得られた TSA 上の *L. monocytogenes* 集落を生理食塩水 1 ml に McFarland 濁度 3-4 に懸濁し、121℃で 30 分高圧蒸気滅菌を行った。冷却後 3,000 rpm で 20 分間遠心分離後、沈渣を生理食塩水 0.1 ml に再浮遊し、O 抗原液とした。O 抗原液と O 血清でスライド凝集反応を行い、O 抗原を決定した。また、TSA 上の集落またはクレイギー管の入った半流動培地を 3～4 回通過させた試験菌を Brain heart infusion (BHI)液体培地 (Becton Dickinson) に接種し、30℃で 18～24 時間培養を行った。培養液に等量の 1%ホルマリン化生理食塩水を加えて混和し、室温で 4 時間以上静置して H 抗原液とした。H 抗原液 250 μl と血清付属のスポイトで 1 滴の H 血清を試験管内で混和後 50℃, 1 時間静置し、試験管内凝集反応を行い、H 抗原を決定した。O 抗原と H 抗原の組み合わせにより、試験菌の血清型を決定し

た（表 2）。

5. 食品の pH および Aw の測定

pH は、試料 10 g に 9 倍量以内の精製水を加え、濾液について pH メーター HM-50V（東亜ディーケーケー，東京，日本）を用いて測定した。Aw は Decagon Model CX-2（Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA）を用いて測定した。

結果

1. RTE 食品中の *L. monocytogenes* 検出状況

1) 食品全般

2000～2012 年に都内およびその周辺地域に流通した RTE 食品からの *Listeria* 検出状況を表 6 に示した。全 2,980 検体中，*L. monocytogenes* は 52 検体（1.7%）から，*Listeria* spp. は 132 検体（4.4%）から検出された。試験期間を 2 分した場合の *L. monocytogenes* は、前半（2000-2005 年）では 1,710 検体中 37 検体（2.2%）、後半（2006-2012 年）は 1,270 検体中 15 検体（1.2%）であった。前半の陽性率は後半と比べて有意に高かった（ χ^2 二乗検定， $p < 0.05$ ）。

2) 乳製品

乳製品のうち、ナチュラルチーズについて、*L. monocytogenes* は全期間のソフト・セミソフトタイプチーズ 288 検体およびハード・

セミハードタイプチーズ 290 検体から、それぞれ 1 検体ずつ(0.3%, 0.3%) 検出された。*Listeria* spp.はそれぞれ 6 検体 (2.1%), 1 検体 (0.3%) から検出された。*Listeria* spp.の菌種は *L. monocytogenes* の他, *L. innocua* であった。*L. monocytogenes* が検出された検体は、フランス産セミソフトタイプチーズおよびオランダ産セミハードタイプチーズ各 1 検体であり、*L. innocua* が検出された検体は、フランス産セミソフトタイプチーズ 4 検体およびイタリア産セミソフトタイプチーズ 1 検体であった。

Listeria spp.陽性となった 7 検体は、調査前半の検体が 6 検体、後半 1 検体であった。*L. monocytogenes* が陽性となった 2 検体はいずれも前半の検体であった。

調製粉乳 39 検体, バター 8 検体, クリーム 1 検体からは *Listeria* spp. は検出されなかった。

3) 生食用食肉, 食肉製品および食肉調理品

生食用食肉, 食肉製品および食肉調理品 1491 検体において、*L. monocytogenes* は 26 検体 (1.7%), *Listeria* spp.は 53 検体 (3.6%) から検出された。*Listeria* spp.の内訳は *L. monocytogenes* のほか、*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi* であった。

L. monocytogenes は、生食用食肉 96 検体中 3 検体 (3.1%), 非加熱食肉製品 128 検体中 14 検体 (10.9%), 加熱殺菌後包装の加熱食肉製品 1091 検体中 9 検体 (0.8%) で陽性であった。特定加熱食肉製品および食肉調理品からは、*L. monocytogenes* は検出されなかったが、*L. monocytogenes* 以外の *Listeria* spp.がそれぞれ 37 検体中 3 検体 (8.1%), 42 検体中 1 検体 (2.4%) から検出された。包装後加

熱殺菌の加熱食肉製品および乾燥食肉製品は全て *Listeria* spp.陰性であった。

調査期間前半と後半の検出状況をみると、*L. monocytogenes* が陽性となったのは、非加熱食肉製品において、前半が 85 検体中 13 検体（15.3%）、後半が 43 検体中 1 検体（2.3%）、加熱殺菌後包装の食肉製品では前半 474 検体中 2 検体（0.4%）、後半 617 検体中 7 検体（1.1%）で、生食用食肉の 3 検体は全て前半の検体であった。*Listeria* spp.の検出状況は、非加熱食肉製品において、前半が 19 検体（22.4%）、後半が 3 検体（7.0%）、加熱殺菌後包装の食肉製品では前半が 5 検体（1.1%）、後半が 10 検体（1.6%）で、生食用食肉の 12 検体は全て前半の検体であり、*L. monocytogenes* 検出状況と類似していた。また、特定加熱食肉製品および食肉調理品の *Listeria* spp.陽性検体（それぞれ 3 検体、1 検体）は全て前半の検体であった。

4) 魚介類，魚介類加工品

魚介類および魚介類加工品 718 検体のうち、*L. monocytogenes* は 21 検体（2.9%）、*Listeria* spp.は 69 検体（9.6%）から検出された。*Listeria* spp.は *L. monocytogenes* のほか、*L. innocua*、*L. seeligeri*、*L. grayi* であった。

L. monocytogenes は鮮魚 86 検体中 5 検体（5.8%）、貝 160 検体中 1 検体（0.6%）、魚卵加工品 124 検体中 6 検体（4.8%）、魚介類惣菜・珍味 198 検体中 4 検体（2.0%）、魚介類乾製品 131 検体中 5 検体（3.8%）から検出された。ボイルした魚介類 19 検体は *Listeria* spp.陰性であった。

前半と後半の検出状況をみると、*L. monocytogenes* 陽性検体は、

鮮魚では前半の検体 38 検体中 1 検体 (2.6%)、後半 48 検体中 4 検体 (8.3%)、魚卵加工品では前半 79 検体中 5 検体 (6.3%)、後半 45 検体中 1 検体 (2.2%)、魚介類惣菜・珍味では前半 108 検体中 2 検体 (1.9%)、後半 90 検体中 2 検体 (2.2%) で、貝の 1 検体は前半の検体であった。*Listeria* spp. 検出状況は、鮮魚では前半が 4 検体 (10.5%)、後半が 11 検体 (22.9%)、魚卵加工品では前半が 17 検体 (21.5%)、後半が 6 検体 (13.3%)、魚介類珍味・惣菜では前半が 12 検体 (11.1%)、後半が 4 検体 (4.4%) で、貝の 3 検体は前半の検体であり、*L. monocytogenes* 検出状況と類似していた。

5) 野菜の漬物

野菜の漬物は、調査期間前半 (2000-2005 年) にのみ調査を実施した。145 検体中 *Listeria* spp. が検出されたのは 3 検体 (2.1%) で、全て *L. monocytogenes* であった。

2. RTE 食品中の *L. monocytogenes* 汚染濃度

L. monocytogenes が検出された RTE 食品 52 検体のうち、汚染濃度を検査した 46 検体の *L. monocytogenes* MPN 値は、<0.3 MPN/g; 32 検体、0.3-1 MPN/g; 10 検体、>1 MPN/g; 4 検体であった (表 7)。>1 MPN/g であった検体は、ナチュラルチーズ; フランス産のセミソフトタイプチーズ (1.6 MPN/g)、鮮魚; マグロ剥き身 2 検体 (2.1 MPN/g, 2.3 MPN/g)、魚介類惣菜・珍味; 松前漬 (1.5 MPN/g) であった。

3. RTE 食品から分離された *L. monocytogenes* の血清型

L. monocytogenes が検出された 52 検体から分離された *L. monocytogenes* 63 株の血清型は、1/2a ; 30 株 (47.6%), 1/2b ; 13 株 (20.6%), 4b ; 9 株 (14.3%), 1/2c ; 7 株 (11.1%), 3b ; 2 株 (3.2%), 3a および 3c ; 各 1 株 (1.6%) の順であった (表 8)。

1 つの検体から複数血清型の菌株が分離されたのは、非加熱食肉製品 5 検体、鮮魚 1 検体、魚卵加工品 2 検体、魚介類惣菜・珍味 1 検体であった。非加熱食肉製品では、1/2a, 4b が分離されたのが 2 検体、1/2a, 3b が 1 検体、1/2a, 1/2b, 4b が 1 検体、1/2a, 1/2c, 4b が 1 検体であった。鮮魚 1 検体からは 1/2b, 1/2c が、魚卵加工品 2 検体および魚介類惣菜・珍味 1 検体からは 1/2a, 1/2c が同時に分離された。

なお、*L. monocytogenes* 菌量が >1 MPN/g であった 4 検体 (表 7) から検出された株の血清型は、ナチュラルチーズ由来株は 1/2b, マグロ剥き身 2 検体由来株は 1/2a および松前漬由来株は 4b であった。

4. *L. monocytogenes* が検出された RTE 食品の pH と Aw

L. monocytogenes が検出された RTE 食品のうち 11 検体について pH と Aw を測定した結果を表 9 に示した。コーデックス委員会の微生物規格によると *L. monocytogenes* の増殖が起こりえない条件は、pH4.4 未満、Aw0.92 未満、pH と Aw の組み合わせが例えば pH5.0 未満かつ Aw0.94 未満となっている。pH \geq 4.4, Aw \geq 0.92 および pH \geq 5.0 かつ Aw \geq 0.94 であって、*L. monocytogenes* の増殖が起こりえる食品

は、非加熱食肉製品 4 検体中 1 検体（サラミソーセージ）、加熱殺菌後包装の食肉製品 1 検体中 1 検体（ソーセージ）、鮮魚 4 検体全て（マグロ剥き身）および魚卵加工品 1 検体中 1 検体（たらこ）の計 7 検体であった（表 9）。それらの *L. monocytogenes* MPN 値は、 <0.3 MPN/g; 4 検体（サラミソーセージ, マグロ剥き身 2 検体, たらこ）, 0.36 MPN/g; 1 検体（ソーセージ）, 0.92 MPN/g; 1 検体（マグロ剥き身）, 2.3 MPN/g; 1 検体（マグロ剥き身）であった。

考察

厚生労働大臣からの諮問により、食品安全委員会は食品中の *L. monocytogenes* に係る食品健康影響評価を行い、その結果を通知した（53）。その報告によると、国内流通食品の *L. monocytogenes* 汚染率は、輸入ナチュラルチーズ 2.2%、国産ナチュラルチーズ 0%、その他の乳・乳製品 0%、非加熱喫食食肉製品 3.89%、鮮魚介類 2.26%、魚介類加工品 7.19%、一夜漬け 46.67%、一夜漬けを除く漬物 6.06%であった。また U.S. Food and Drug Administration（FDA；アメリカ食品医薬品局）、USDA、Centers for Disease Control and Prevention（CDC；アメリカ疾病管理予防センター）のリスクアセスメントによると、米国での各食品群の *L. monocytogenes* 汚染率は、チーズ 2.5%、チーズ以外の乳製品 0.3%、食肉加工品 3.0%、鮮魚介類 7.0%、魚介類加工品 9.5%、野菜 3.6%であった（12）。報告ごとの検出状況を比較すると、本調査で明らかになった *L. monocytogenes* 汚染は、これまでの報告に比べ、有意に野菜の漬物（2.1%）では低く、非加熱食肉製品（10.9%）では高かった（フィッシャーの正確確率検定, $p < 0.05$ ）。

ナチュラルチーズについては、*L. monocytogenes* が 2 検体および *L. innocua* が 5 検体から検出されたが、いずれも輸入品であった。国産ナチュラルチーズからは、食品安全委員会の報告と同様に *L. monocytogenes* は検出されず、*Listeria spp.* の検出も認められなかった。国内では、ナチュラルチーズの原料乳は加熱するよう指導されているため、リスクが低いと考えられる。

加熱食肉製品においては、包装後に加熱殺菌を行う加熱食肉製品からは *L. monocytogenes* を含む *Listeria spp.* が検出されなかったが、加熱殺菌後に包装を行う加熱食肉製品には *Listeria* 汚染が認められた。このことから、加熱殺菌後に包装を行う加熱食肉製品は、加熱殺菌後の製造環境から二次汚染を受けていることが示唆された。コーデックス委員会や USDA, FSIS のガイドラインに示されるように、食品製造環境の衛生状態を向上させ、食品の *Listeria* 汚染を防止していく必要があると考えられる (4, 13)。

野菜の漬物に関する本調査結果では 145 検体中 3 検体 (2.1%)、きゅうりの糠漬けから *L. monocytogenes* が検出された。北海道で市販された浅漬けを対象にした *L. monocytogenes* の汚染調査では、工場内の汚染が疑われたという報告がある (47)。この報告では、工場内の製造室、包装室および保管室等、複数にわたる区域において、設備、器具および環境の拭取り材料から *L. monocytogenes* が検出され、それらの菌株と製品由来株が同一の PFGE パターンを示した。従業員に HACCP システムに関する講習を行うことで、環境の汚染が改善されたとのことである。また、2012 年には白菜の浅漬けが原因の大規模な Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC; 腸管出血性大腸菌) O157 食中毒も発生しており (19), 浅漬けは *L. monocytogenes*

以外の食中毒菌においても危害要因となりうる。これらのことから、野菜の漬物においても乳製品や食肉製品と同様に、*L. monocytogenes* のコントロールのための食品衛生ガイドラインを適用し、製造環境からの二次汚染を防ぐための衛生管理面の向上が必要と考えられる。

今回調査した 2000 年から 2012 年を前半と後半に分けて検出状況を比較した結果、非加熱食肉製品や魚卵のような加工食品は後半の方が低い汚染率となる傾向が認められた。近年、食品加工施設で *Listeria* 汚染対策が提案されていること (4, 13)、安息香酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、ナイシン(69)などの保存料の開発が進んでいることで、減少傾向にある可能性が考えられた。

コーデックス委員会による、RTE 食品中の *L. monocytogenes* 菌数を定めた国際規格では、1 ロットにつき 5 サンプル全てについて、増殖が起こりうる食品では 25 g 中に *L. monocytogenes* が陰性であること、増殖が起こりえない食品では <100 CFU/g であることとされている (5)。定量法について、CFU/g は食品 1g 中に存在するコロニーを形成する単位の量を示し、MPN は検体中の菌数を確率論的に推計する方法で、比較的低菌量の検体においても定量が可能となる。本研究の結果では、*L. monocytogenes* MPN は、調査を実施した RTE 食品の 90%以上が <1 MPN/g であり、最大でも 2.3 MPN/g と少量であった。一方、今回 *L. monocytogenes* が検出された食品のうちコーデックス委員会により増殖が起こりえるとされた pH と A_w の食品が存在した (5)。それらの食品の *L. monocytogenes* MPN は 2.3 MPN/g 以下と低かったが、*L. monocytogenes* は 0°C でも増殖可能である。また、世代時間は 4.4°C で 36 時間、10°C では 10 時間と報告されている (67)。

また、マグロ剥き身およびいくらを汚染する *L. monocytogenes* は 10°C の保存温度では、急速に増殖するという報告もある (52)。その報告では、食品に本菌を 10^0 - 10^1 MPN/g 接種し、10°C で保存した場合、2 日で 10^3 - 10^4 MPN/g となった。EU では、増殖が起こりえる RTE 食品であっても 25g 中陰性と規定せず、保存期間内 <100 CFU/g との基準を適用している。コーデックス委員会のガイドラインでは製造・輸送等には 6°C を超えないように管理するべきとしており (4)、*L. monocytogenes* が検出される可能性のある食品は、より低温での温度管理が重要と考える。また、低温であっても長期間の保存は適切ではないと考えられる。

本研究で、分離された株の血清型は 1/2a (47.6%) が最も多く、ついで 1/2b (20.6%)、4b (14.3%)、1/2c (11.1%) であった。食品安全委員会の報告では、1/2a (47.1%) が最も多く、次いで 1/2c (15.5%)、1/2b (13.8%)、4b (9.2%) の順であり (53)、ほぼ同様の結果であった。一方、1958~2001 年に認められた国内のリステリア症患者由来 *L. monocytogenes* の血清型は 4b (59.9%) が最も多く、次いで 1/2b (26.4%)、1/2a (5.8%) であった (53)。*L. monocytogenes* の病原性は病原遺伝子の変異などにより低下し、変異の種類や発生率は血清型により異なると報告されている (25, 64)。病原性の強い株の割合が血清型により異なることで、患者由来と食品由来で血清型の傾向が異なる可能性も考えられる。また、2000 年以降のヒト由来株は、米国では依然として 4b が主流であるが (3)、ヨーロッパでは 1/2a が増加する傾向にあるとの報告がある (61)。集団発生事例の血清型も、2000 年以前は 4b が主流であったが、2000 年以降は 1/2a の事例が多く (53, 55) (表 1)、流行血清型に変化が生じている可能性も

考えられる。本調査の 2000 年から 2012 年の東京都内に流通する食品を対象とした分離菌株において、最も多い血清型は 1/2a 株であり、ヒト由来と食品由来株を比較していくために、食品中の *L. monocytogenes* の疫学解析を継続的に行っていくことは意義のあることと考える。

国内での *L. monocytogenes* 食中毒事例、集団発生事例はほとんど認められていないが、JANIS によれば年間 200 人程度のリステリア症患者が発生していると推定される(78)。リステリア症が高い致死率であることを考慮すると、国内においてもリステリア症の対策を進めていく必要がある。今回、都内で市販される RTE 食品は、菌量は少ないものの、本菌に汚染されていることが明らかとなった。*L. monocytogenes* は、汚染菌量が少なくても冷蔵保管中に増殖する可能性があり、問題である。また、*Listeria spp.* はヒトに病原性はないとされるが、*L. monocytogenes* と挙動を共にしているため、その存在は *L. monocytogenes* が存在する潜在的な可能性があることを示すもので、汚染の指標となるとされる(4)。コーデックス委員会のガイドラインでは、効果的なモニタリングプログラムでは *Listeria spp.* を対象とすることが勧められている(4)。今回、*L. monocytogenes* は検出されなくても、*L. monocytogenes* 以外の *Listeria spp.* が検出される検体が比較的多く認められ、それらの食品は *L. monocytogenes* 汚染の危険性があることが示された。この疾患の原因は食品から *L. monocytogenes* を摂取することであると考えられていることから(11, 50)、食品製造業、輸入業および流通業者への注意喚起と取扱い指導、消費者への啓蒙が重要であり、その基礎資料として食品中の *L. monocytogenes* 汚染実態の把握は必須である。食品の消費段階での

L. monocytogenes 汚染状況の把握，菌株の病原性の解析は重要であり，今後も継続して調査していく必要があると考えられる。

表 5. *Listeria* spp. の鑑別性状

菌種	溶血性	炭水化物分解能			CAMP 試験		
		ラムノース	キシロース	マンニット	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	
<i>L. monocytogenes</i>	+ ^{a)}	+	-	-	+	-	-
<i>L. innocua</i>	-	v ^{c)}	-	-	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	-	+	+
<i>L. seeligeri</i>	(+) ^{b)}	-	+	-	(+)	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	v	+	-	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	+	-	-	-

a) + : 90%以上陽性

b) () : 弱い陽性

c) v : 多様な反応

(文献番号 22, 54 より改変引用)

表 6. RTE 食品中の *Listeria* spp. 検出状況 (2000-2012 年, 東京)

食品	期間	試験 期間	検体数	陽性検体数 (検体数における割合, %)					
				<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>	<i>Listeria</i> spp.
ナチュラルチーズ (ソフト/セミソフト)	2000-2005	前半	127	1 (0.8)	4 (3.1)				5 (3.9)
	2006-2012	後半	161		1 (0.6)				1 (0.6)
	小計		288	1 (0.3)	5 (1.7)				6 (2.1)
ナチュラルチーズ (ハード/セミハード)	2000-2005	前半	217	1 (0.5)					1 (0.5)
	2006-2012	後半	73						0 (0)
	小計		290	1 (0.3)					1 (0.3)
調製粉乳	2000-2012		39						0 (0)
バター	2000-2012		8						0 (0)
クリーム	2000-2012		1						0 (0)
計			626	2 (0.3)	5 (0.8)				7 (1.1)
生食用食肉・食肉製品 ・食肉調理品									
生食用食肉	2000-2005	前半	83	3 (3.6)	8 (9.6)		5 (6)		12 (14.5)
	2006-2012	後半	13						0 (0)
	小計		96	3 (3.1)	8 (8.3)		5 (5.2)		12 (12.5)
非加熱食肉製品	2000-2005	前半	85	13 (15.3)	6 (7.1)		2 (2.4)		19 (22.4)
	2006-2012	後半	43	1 (2.3)	2 (4.7)		2 (4.7)	1 (2.3)	3 (7)
	小計		128	14 (10.9)	8 (6.3)		4 (3.1)	1 (0.8)	22 (17.2)
2000-2005	前半	27				3 (11.1)		3 (11.1)	
2006-2012	後半	10						0 (0)	
小計		37				3 (8.1)		3 (8.1)	
特定加熱食肉製品	2000-2005	前半	474	2 (0.4)	4 (0.8)		1 (0.2)		5 (1.1)
2006-2012	後半	617	7 (1.1)	2 (0.3)		2 (0.3)		10 (1.6)	
小計									
加熱食肉製品 (加熱後包装)	2000-2005	前半	474	2 (0.4)	4 (0.8)		1 (0.2)		5 (1.1)
2006-2012	後半	617	7 (1.1)	2 (0.3)		2 (0.3)		10 (1.6)	
小計									

小計	1091	9 (0.8)	6 (0.5)	3 (0.3)	15 (1.4)
加熱食肉製品 (包装後加熱)	57				0 (0)
乾燥食肉製品	40				0 (0)
2000-2005 前半	37			1 (2.7)	1 (2.7)
2006-2012 後半	5				0 (0)
小計	42			1 (2.4)	1 (2.4)
計	1491	26 (1.7)	22 (1.5)	16 (1.1)	53 (3.6)
魚介類・魚介類加工品					
2000-2005 前半	38	1 (2.6)	3 (7.9)		4 (10.5)
2006-2012 後半	48	4 (8.3)	7 (14.6)	4 (8.3)	11 (22.9)
小計	86	5 (5.8)	10 (11.6)	4 (4.7)	15 (17.4)
2000-2005 前半	111	1 (0.9)	1 (0.9)	1 (0.9)	3 (2.7)
2006-2012 後半	49				0 (0)
小計	160	1 (0.6)	1 (0.6)	1 (0.6)	3 (1.9)
ボイルした魚介類	19				0 (0)
2000-2005 前半	79	5 (6.3)	13 (16.5)	1 (1.3)	17 (21.5)
2006-2012 後半	45	1 (2.2)	4 (8.9)		6 (13.3)
小計	124	6 (4.8)	17 (13.7)	1 (0.8)	23 (18.5)
2000-2005 前半	108	2 (1.9)	10 (9.3)	1 (0.9)	12 (11.1)
2006-2012 後半	90	2 (2.2)	1 (1.1)		4 (4.4)
小計	198	4 (2)	11 (5.6)	1 (0.5)	16 (8.1)
魚介類製品	131	5 (3.8)	9 (6.9)		12 (9.2)
計	718	21 (2.9)	48 (6.7)	7 (1)	69 (9.6)
野菜の漬物					
2000-2005 前半	145	3 (2.1)			3 (2.1)

表 7. RTE 食品中の *Listeria monocytogenes* MPN 値 (2000-2012 年, 東京)

食品	検体数	MPN 値(g)		
		<0.3	0.3-1	>1
ナチュラルチーズ	2	1		1 ^{a)}
生食用食肉	3	3		
非加熱食肉製品	13	10	3	
加熱食肉製品(加熱後包装)	7	3	4	
鮮魚	5	2	1	2 ^{b)}
魚卵加工品	5	5		
魚介類惣菜・珍味	4	2	1	1 ^{c)}
魚介乾製品	4	4		
野菜の漬物	3	2	1	
計	46	32	10	4

a) フランス産セミソフトタイプチーズ (1.6 MPN/g)

b) マグロ剥き身 (2.1 MPN/g, 2.3 MPN/g)

c) 松前漬 (1.5 MPN/g)

表 8. RTE 食品由来 *Listeria monocytogenes* の血清型 (2000-2012 年, 東京)

食品	菌株数 (%)							計
	1/2a	1/2b	1/2c	4b	3a	3b	3c	
ナチュラルチーズ	1 (50.0)	1 (50.0)						2 (100)
生食用食肉・食肉製品	17 (51.5)	6 (18.2)	2 (6.1)	6 (18.2)		1 (3.0)	1 (3.0)	33 (100)
魚介類・魚介類加工品	10 (40.0)	5 (20.0)	5 (20.0)	3 (12.0)	1 (4.0)	1 (4.0)		25 (100)
野菜の漬物	2 (66.7)	1 (33.3)						3 (100)
計	30 (47.6)	13 (20.6)	7 (11.1)	9 (14.3)	1 (1.6)	2 (3.2)	1 (1.6)	63 (100)

表 9. RTE 食品の pH および Aw (2000-2012 年, 東京)

食品	食品名	MPN 値 (g)	pH	Aw	増殖 ^{a)}
非加熱食肉製品	サラミンソーセージ	<0.3	7.0	0.93	○
	サラミンソーセージ	<0.3	6.4	0.83	×
	生ハム	0.4	6.1	0.91	×
	生ハム	<0.3	6.0	0.89	×
加熱食肉製品 (加熱後包装)	ソーセージ	0.36	6.4	0.98	○
	マグロ剥き身	0.92	5.8	0.99	○
	マグロ剥き身	<0.3	6.1	0.98	○
	マグロ剥き身	2.3	6.2	0.99	○
魚卵加工品	マグロ剥き身	<0.3	6.9	0.98	○
	たらこ	<0.3	6.0	0.95	○
魚介類惣菜・珍味	うにくらげ	<0.3	5.8	0.86	×

a) コーデックス委員会による増殖の可能性, ○: 起こりえる, ×: 起こりえない

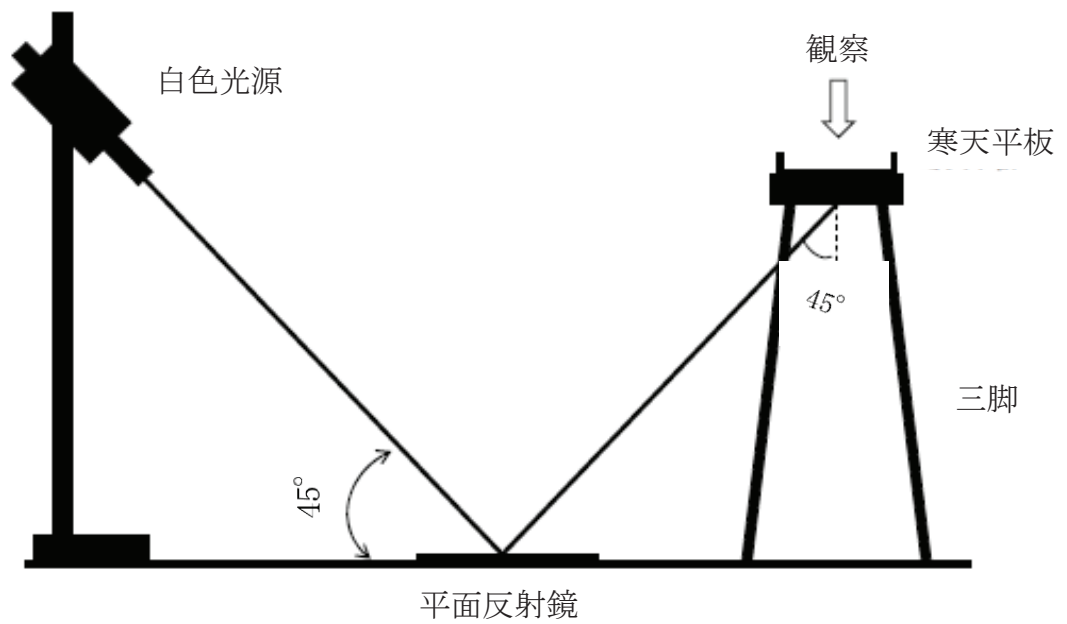


図1A. ヘンリーの斜光法
 (文献番号22, 23, 35より改変引用)

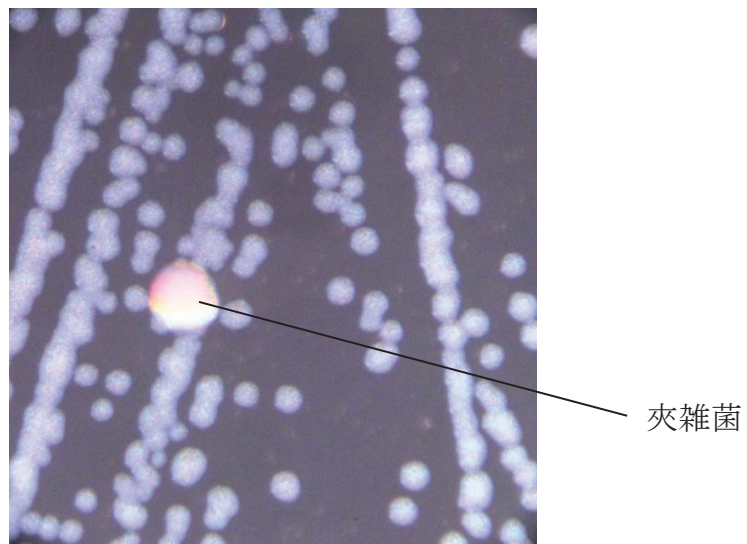
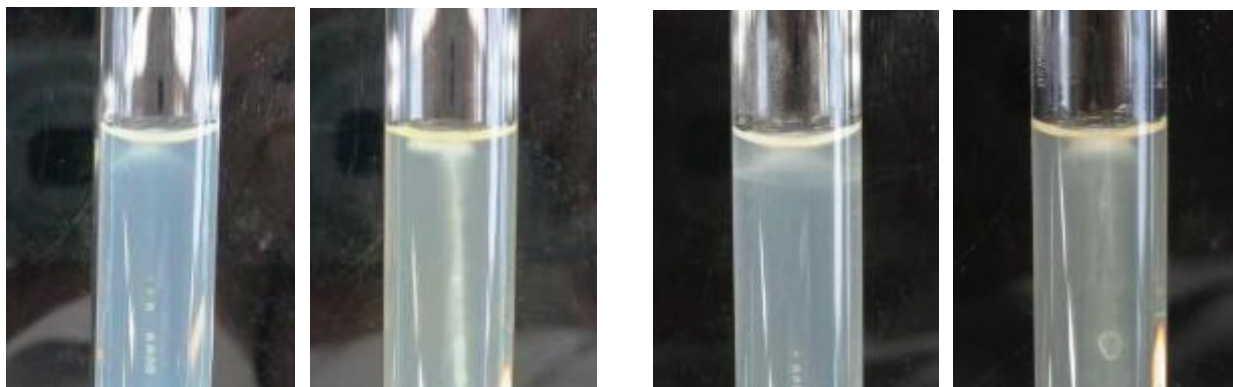
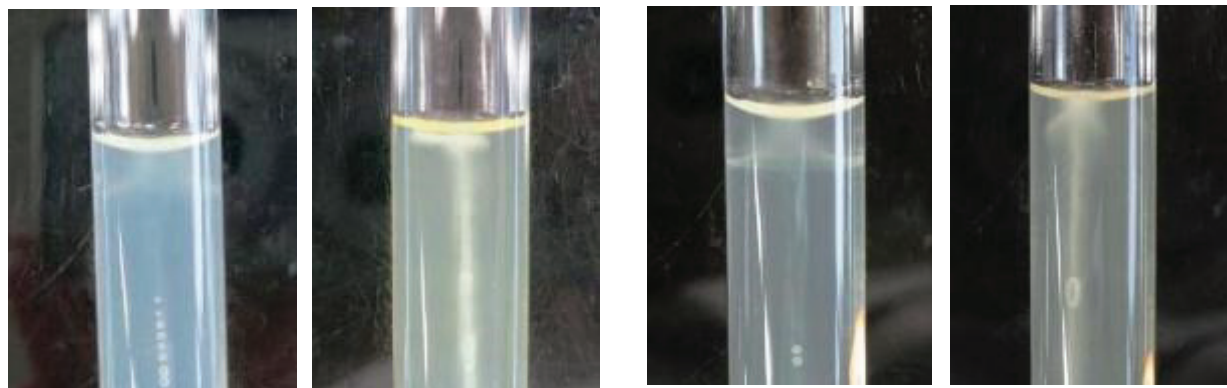


図1B. ヘンリーの斜光法で観察した*Listeria* spp.

L. monocytogenes ATCC19115



L. monocytogenes ATCC43256



カジトン
半流動培地

運動性試験培地
(ISO法)

カジトン
半流動培地

運動性試験培地
(ISO法)

48時間培養

72時間培養

図2. *Listeria monocytogenes*の運動性試験にみられる傘状発育

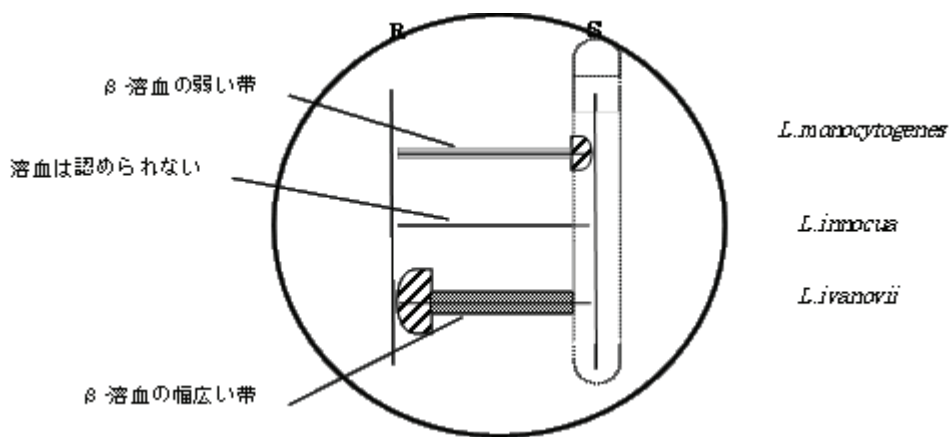


図3A. CAMP試験

R: *R. equi*, S: *S. aureus*

(文献番号22, 23, 35より改変引用)

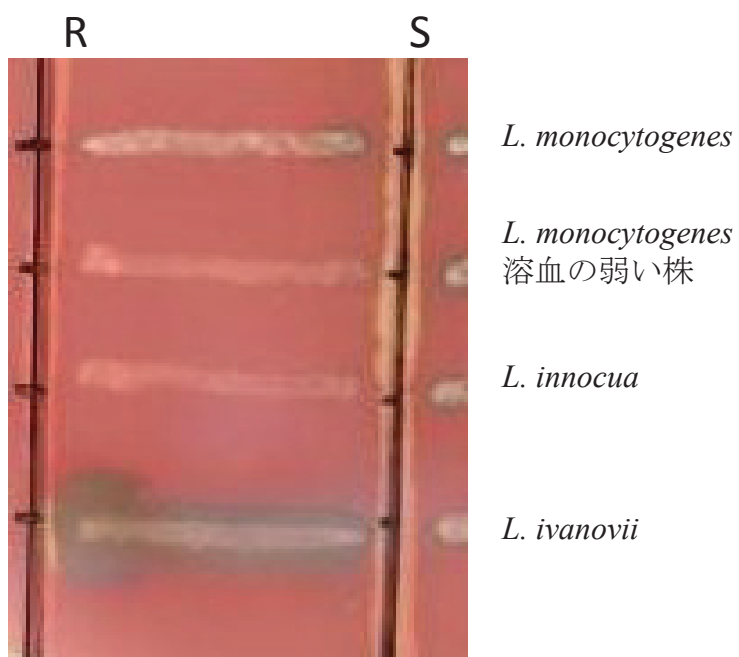


図3B. CAMP試験での *Listeria* spp.

R: *R. equi*, S: *S. aureus*

第二節 東京都内に流通する牛内臓肉からの *Listeria monocytogenes*

および食中毒菌検出状況

序論

近年、食中毒菌に汚染された牛肉および牛内臓肉の生食、加熱不足食品の喫食、または二次汚染を原因とする食中毒が発生し、問題視されている（24, 49）。生食用食肉については、1998年に衛生基準（38）が厚生省により通知されていたが、対策強化のため、2011年に規格基準（30）が設定された。更に2012年7月に牛の肝臓を生食用として販売することが禁止された（31）。その結果、腸管出血性大腸菌 O157 による感染症の発生動向を例にとると、生肉・生レバーを喫食した事例数は2011および2012年で顕著に減少した（77）。しかし、焼肉等を喫食したことによる食中毒事例はそれ以前と同様に発生している（77）。また、焼肉料理を原因とした *Campylobacter* 食中毒事例も毎年報告されており（34）、依然として牛肉・牛内臓肉は細菌性食中毒の重要な原因食品である。特に牛内臓肉は様々な食中毒菌に汚染されていることが報告されている（1, 27, 40, 44）。

食品安全委員会による食品中の *L. monocytogenes* に係る食品健康影響評価報告書に、牛肉の *L. monocytogenes* 検出状況は4,945検体中377検体陽性（7.6%）とまとめられている（53）。そのうち、牛内臓肉の検出状況は牛レバー26検体中4検体陽性（15.4%）のみであり、十分に調査されているとはいえない。そこで本節では、東京都内に流通する牛内臓肉等を対象に、*L. monocytogenes* の汚染状況を調査した。また、牛内臓肉が危害食品になる可能性がある食中毒

菌である Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC; ベロ毒素産生性大腸菌), *C. jejuni/coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (サルモネラ) の汚染状況を調査した。さらに生食用食肉の衛生基準において安全性を確保するための成分規格目標となっている糞便系大腸菌群 (37, 39) についても併せて調査を行った

材料と方法

1. 供試検体

2010年7月から2013年8月に都内の食肉処理場2カ所および小売店17カ所で購入した牛内臓肉等104検体を供試した。その内訳は、レバー（肝臓）38検体、ハツ（心臓）18検体、ハラミ（横隔膜肉）2検体、テール（尾）9検体、タン（舌）5検体、ハチノス（第2胃）5検体、センマイ（第3胃）9検体、ギアラ（第4胃）9検体、モウチョウ（盲腸）9検体であった。

2. *L. monocytogenes* の検出および血清型別検出方法

1) *L. monocytogenes* の分離と同定

無菌的に試料25gを秤量し、UVM培地を225ml加え、30℃で48時間培養した。増菌培養液をPALCAM寒天培地に画線塗抹し、30℃で24時間から48時間培養した。平板上に *Listeria* spp.と思われる集落が認められた場合は、TSAに釣菌して、30℃で24時間培養し純培養菌を得た。分離菌株の同定および培地の調整は第一節 材料と

方法 2.3) に従い実施した。

2) *L. monocytogenes* 血清型別

分離菌株の血清型別は，第一節 材料と方法 4.の方法に従い実施した。

3. VTEC の検出および病原因子保有状況

1) VTEC の分離

通知法 (36) に従い増菌培養と分離培養を行った。試料 25 g にノボビオシン加 modified *E. coli* Medium (ノボビオシン加 mEC 培地，栄研化学) または mEC 培地 (日水製薬，東京，日本) 225 ml を加えて 42°C で 22 時間培養した。

培養液について通知法に準じて VT 遺伝子を検出するリアルタイム PCR (36, 57) を行い，スクリーニングを行った。すなわち，培養液 0.1 ml を 13,000×g，10 分間遠心し，沈渣に 50 mM NaOH を 85 μl 加え混和後，100°C で 10 分間加熱して DNA を抽出 (アルカリ熱抽出) した。中和のために 1 M Tris-HCl (pH7.0) を 15 μl 加えて混和後，13,000×g，3 分間遠心した上清を PCR 用 Template genomic DNA とした。プライマーおよびプローブの塩基配列は表 10 の通りであり，機器は ABI PRISM 7500 (Thermo Fisher Scientific)，試薬は TaqMan Universal Master Mix II (Thermo Fisher Scientific)，反応液組成および反応条件は以下の条件で行った。反応液は検査するサンプル分をまとめて調製し，分注して使用した。反応後，PCR 産物の対数的増加が認められた場合に陽性とした。

リアルタイム PCR 反応液組成 (20 μ l スケール, 1 サンプル分)

①	2 \times TaqMan Universal Master Mix II	10 μ l
②	Forward primer (10 μ M)	1.2 μ l
③	Reverse primer (10 μ M)	1.2 μ l
④	Probe (2 μ M)	2 μ l
⑤	Template genomic DNA (<1 μ g)	2 μ l
⑥	滅菌 MilliQ 水	3.6 μ l

反応条件

①	50 $^{\circ}$ C	2 分	} 40 サイクル
②	95 $^{\circ}$ C	10 分	
③	95 $^{\circ}$ C	15 秒	
④	60 $^{\circ}$ C	1 分	

培養液中に VT 遺伝子が検出されてスクリーニング陽性の場合、VTEC 血清群 O157, O26 および O111 の分離を試みた。分離培養は増菌培養液の直接塗抹および免疫磁気ビーズ (デンカ生研) による濃縮液の塗抹によって行った。選択分離培地は, Cefixime, Potassium Tellurite 加 Sorbitol macconkey agar (CT-SMAC 寒天培地, Thermo Fisher Scientific), CT 加 Rhamnose macconkey agar (CT-RMAC 寒天培地, 基礎培地: Becton Dickinson, CT: Thermo Fisher Scientific) および CT 加 Sorbose macconkey agar (CT-SBMAC 寒天培地, 基礎培地: Becton Dickinson, CT: Thermo Fisher Scientific), CHROMagar O157 TAM 培地 (CHROMagar), Vi RXO26 寒天培地 (栄研化学),

CHROMagar STEC 培地（関東化学，東京，日本）を用いた。各培地に発育した定型集落を釣菌し，その株を VTEC と推定した。

スクリーニング陽性で血清群 O157，O26 および O111 の VTEC が分離されなかった場合には，さらに，それ以外の血清群の VTEC の検出を試みた。すなわち，培養液を DHL 寒天培地（栄研化学），XMG 寒天培地（日水製薬）および CT-SMAC 寒天培地に画線塗抹し，出現した 100 から 300 集落について VT 遺伝子を検出するリアルタイム PCR 法により VT 遺伝子保有の有無を確認した。すなわち，滅菌 MilliQ 水 50 μ l に 10 集落をまとめて懸濁し，50 mM NaOH を 50 μ l 加え混和後，100 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱して DNA を抽出（アルカリ熱抽出）した。中和のために 80 mM Tris-HCl (pH7.0) を 100 μ l 加えて混和後，13,000 \times g，3 分間遠心した上清を PCR 用 Template genomic DNA とした。VT 遺伝子を検出するスクリーニングと同様に，VT 遺伝子を検出するリアルタイム PCR 法を行った。VT 遺伝子が陽性となった場合には，10 集落の各集落について同様に VT 遺伝子保有の有無を確認した。VT 遺伝子陽性の集落を釣菌し，その株を VTEC と推定した。

2) 血清型別試験

VTEC と推定された株については，病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研) を用い，添付の説明書に従い血清型別を行った。

3) 生化学性状試験

VTEC と推定された株については，生化学性状試験により *E. coli* と同定した。すなわち，Triple sugar iron (TSI) 寒天（日水製薬），

Lysine indole motility (LIM) 培地 (日水製薬) での性状を確認した。次に, ウレアーゼ陰性, Voges-Proskauer (VP) 試験陰性, シモンズの培地によるクエン酸塩利用能陰性, マロン酸塩利用陰性, Indole pyruvic acid 試験陰性, 酢酸塩利用陽性により, 同定した。

4) VT 遺伝子確認試験

VTEC と推定された株については, 上記と同様に VT 遺伝子を検出するリアルタイム PCR を行い, VT1 および VT2 遺伝子保有状況を確認した。

また, VT2 には VT2c および VT2e のバリエーションが存在するが, 既報の PCR 法 (73, 79) により, バリエーションを決定した。各プライマーの塩基配列は表 10 の通りである。増幅用酵素は *Takara Ex Taq Hot Start Version* (タカラバイオ, 滋賀, 日本) を, 反応液組成および反応条件は以下の条件を用いた。反応液は検査するサンプル分をまとめて調製し, 分注して使用した。

PCR 反応液組成 (25 μ l スケール, 1 サンプル分)

①	10× <i>Ex Taq</i> Buffer	2.5 μ l
②	dNTP Mixture (それぞれ 2.5 mM)	2 μ l
③	Forward primer (10 μ M)	1.25 μ l
④	Reverse primer (10 μ M)	1.25 μ l
⑤	<i>Ex Taq</i> Hot Start Version (5 unit/ μ l)	0.125 μ l
⑥	Template genomic DNA (<1 μ g)	2.5 μ l
⑦	滅菌 MilliQ 水	15.375 μ l

反応条件

①	94°C	4.5 分	} 30 サイクル
②	94°C	30 秒	
③	55°C	30 秒	
④	72°C	30 秒	
⑤	72°C	2.5 分	

反応物を 2%アガロースゲル (Agarose S; ニッポンジーン, 東京, 日本) で電気泳動した。0.5 µg/ml Ethidium bromide (EtBr) 溶液 (Sigma-Aldrich) にアガロースゲルを浸漬し DNA を染色した。ゲル撮影装置 AE-6932GXEX (ATTO, 東京, 日本) を用いて紫外線照射し, バンドを検出した。増幅フラグメントの大きさは, VT2c は 385 bp, VT2e は 686 bp である。

5) 接着因子関連遺伝子確認試験

VTEC と同定された株については, 接着因子関連遺伝子 *eae*, *saa* および *aggR* の保有状況を PCR により調べた (28, 72)。各プライマーは表 10 に示したものをを用いて, VT2c および VT2e を検出する PCR と同様に行った。増幅フラグメントの大きさは, *eae* は 924 bp, *saa* は 119 bp, *aggR* は 254 bp である。

4. *C. jejuni* および *C. coli* の検出

1) *C. jejuni* および *C. coli* の分離

リンス法 (66) を一部改変して検出を行った。すなわち, 乾燥ブ

イオン（日水製薬）を添付の説明書に従いブイオンを調製し、その 30 ml を試料 25 g に加え、その懸濁液 10 ml に規定量の Preston *Campylobacter* Selective Supplement（Thermo Fisher Scientific）と馬脱繊維血液 0.5 ml を加え、微好気条件下（酸素 4%、二酸化炭素 12%、水素 4%、窒素 80%）で 42℃、24 時間増菌培養を行った。増菌培養液を Modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar（mCCDA）培地（Thermo Fisher Scientific）または CCDA 培地（SEL）（関東化学）に画線塗抹し、微好気条件下で 42℃、48 時間培養した。

2) *C. jejuni* および *C. coli* の同定

発育した *Campylobacter* と推定される集落をスライドグラス上に懸濁し、位相差顕微鏡観察によりコルクスクリュー状の運動を行う螺旋状桿菌の確認を行った。さらに、ナリジクス酸（NA）およびセファロチン（CF）に対する薬剤感受性ディスク（センシディスク，Becton Dickinson）を用いたディスク拡散法による薬剤感受性試験，馬尿酸加水分解試験，酢酸インドキシル加水分解試験，*C. jejuni* および *C. coli* に特異的な PCR 法（43，76）を組み合わせた Multiplex PCR 法により，同定を行った。すなわち，VTEC と同様に PCR 用 Template genomic DNA を調製した。各プライマーの塩基配列は表 10 に示した。増幅用酵素は *Takara Ex Taq Hot Start Version*（タカラバイオ）を，反応液組成および反応条件は以下の条件を用いた。反応液は検査するサンプル分をまとめて調製し，分注して使用した。

PCR 反応液組成（25 μ l スケール，1 サンプル分）

① 10×*Ex Taq* Buffer 2.5 μ l

②	dNTP Mixture (それぞれ 2.5 mM)	2 μ l
③	<i>C. jejuni</i> Forward primer (20 μ M)	0.25 μ l
④	<i>C. jejuni</i> Reverse primer (20 μ M)	0.25 μ l
⑤	<i>C. coli</i> Forward primer (20 μ M)	0.25 μ l
⑥	<i>C. coli</i> Reverse primer (20 μ M)	0.25 μ l
⑦	<i>Ex Taq</i> Hot Start Version (5 unit/ μ l)	0.125 μ l
⑧	Template genomic DNA (<1 μ g)	2.5 μ l
⑨	滅菌 MilliQ 水	16.875 μ l

反応条件

①	95°C	4.5 分	} 30 サイクル
②	95°C	30 秒	
③	57°C	30 秒	
④	72°C	30 秒	
⑤	72°C	2.5 分	

反応物はゲルで電気泳動，EtBr で DNA を染色後，紫外線照射し，バンドを検出した。増幅フラグメントの大きさは，*C. jejuni* は 159 bp，*C. coli* は 502 bp である。

5. サルモネラの検出および血清型別試験

1) サルモネラの分離

試料 25 g に前増菌培地として Buffered peptone water (BPW, 緩衝ペプトン水, Thermo Fisher Scientific) を 225 ml 加え，35°C で 18 時

間培養した。その培養液 0.1 ml を選択増菌培地の Rappaport-Vassiliadis (RV, Thermo Fisher Scientific) 培地 10 ml に接種し 42℃, 24 時間培養した。選択増菌培養液を DHL 寒天培地 (栄研化学) および SS 寒天培地 (栄研化学) に画線塗抹した。

2) サルモネラの同定

発育したサルモネラと推定される集落について, TSI 寒天および LIM 培地を用いた生化学的性状試験により同定を行った。

3) サルモネラの血清型別試験

分離菌株の血清型別試験は, サルモネラ免疫血清「生研」(デンカ生研) を用いて行った。

6. 糞便系大腸菌群の検出

通知法 (39) に準じて行った。試料 25 g にペプトン食塩緩衝液 (日水製薬) 225 ml を加え混和し, 2 倍濃度 EC 発酵管 10 ml (日水製薬) 3 本に 10 ml ずつ加え, 44.5℃ で 24 時間培養した。ガス発生を認めた場合は EMB 培地 (日水製薬) に画線塗抹して培養した。発育した大腸菌群の定型的集落について, 乳糖分解, ガス発生およびグラム陰性無芽胞桿菌であることを確認した場合に糞便系大腸菌群陽性とした。

結果

1. *L. monocytogenes* 検出状況

L. monocytogenes は牛内臓肉等 104 検体中 22 検体 (21.2%) が陽性であった (表 11)。部位ごとにみると、レバー 38 検体中 2 検体 (5.3%), ハツ 18 検体中 7 検体 (38.9%), ハラミ 2 検体中 1 検体 (50%), テール 9 検体中 4 検体 (44.4%), タン 5 検体中 1 検体 (20%), センマイ 9 検体中 4 検体 (44.4%), ギアラ 9 検体中 3 検体 (33.3%) であり、ハチノス 5 検体およびモウチョウ 9 検体からは検出されなかった。

22 検体から検出された 23 株の血清型は 1/2a が 9 株 (39.1%), 1/2c が 14 株 (60.9%) であった。

2. VTEC 検出状況

VTEC は 104 検体中 25 検体 (24.0%) において陽性で、合計 31 株が分離された (表 11-13)。VTEC のうち血清群 O157 がレバー 2 検体、ハツ 3 検体、センマイ 4 検体、ギアラ 7 検体、モウチョウ 1 検体の計 17 検体から 18 株、O26 がレバー 1 検体から 1 株、その他の血清群 (O1, O28, O91, O103, O153, 型別不能 (O untypable; OUT)) がレバー、ハツ、センマイ、モウチョウの計 7 検体から 12 株検出された (表 12, 13)。

分離された VTEC の毒素産生性は、O157 については VT2 産生性および VT1+VT2 産生性がそれぞれ 9 株、O26 の 1 株は VT1 産生性であった。その他の血清群では VT1 産生性 3 株、VT2 産生性 8 株、VT1+VT2 産生性 1 株であった (表 13)。

接着因子関連遺伝子の保有状況については、*eae* は血清群 O157, O26, O103 の 20 株で陽性、*saa* は血清群 O28, O153, OUT の 5 株で陽性であり、*aggR* はすべての株で陰性であった（表 13）。

3. *C. jejuni* および *C. coli* 検出状況

C. jejuni/coli は 104 検体中 50 検体（48.1%）から分離された（表 11）。菌種別には *C. jejuni* は 42 検体（40.4%）から、*C. coli* は 16 検体（15.4%）から検出された（表 14）。*C. jejuni* および *C. coli* の両者が検出された検体は 8 検体あった。

4. サルモネラ検出状況

サルモネラは 104 検体中テール 1 検体およびモウチョウ 3 検体の計 4 検体（3.8%）で陽性で、5 株が検出された（表 11）。血清群は O4 群が 4 株（いずれも血清型 Derby）、O3,10 群が 1 株（血清型 Amsterdam）であった。

5. 複数の食中毒菌検出状況

牛内臓肉 104 検体中、*L. monocytogenes*、VTEC、*C. jejuni/coli*、サルモネラがいずれも検出されなかったのは 40 検体で、64 検体はいずれかのまたは複数の食中毒菌が検出された。*L. monocytogenes* が陽性であった 22 検体のうち、同時に VTEC および *C. jejuni/coli* も

検出されたのが 5 検体，*C. jejuni/coli* も検出されたのが 10 検体存在した（表 15）。

6. 糞便系大腸菌群検出状況

糞便系大腸菌群は，104 検体中 85 検体（81.7%）が陽性であった。部位別にみると，レバー38 検体中 25 検体（65.8%），ハツ 18 検体中 14 検体（77.8%），ハチノス 5 検体中 3 検体（60.0%），その他の部位（ハラミ，テール，タン，センマイ，ギアラ，モウチョウ）43 検体中 43 検体（100%）が陽性であった（表 11）。

7. 糞便系大腸菌群と *L. monocytogenes* およびその他食中毒菌との関係

糞便系大腸菌群陰性検体は，104 検体中レバー13 検体，ハツ 4 検体およびハチノス 2 検体の計 19 検体（18.3%）であった。そのうち *L. monocytogenes* はハツ 2 検体から，その他食中毒菌は，レバー1 検体から VTEC OUT:H21，2 検体から *C. jejuni* および 1 検体から *C. coli* が検出された。

考察

今回の調査において，牛内臓肉等の *L. monocytogenes* 汚染率は 21.2%であり，食品安全委員会の報告した牛肉の汚染率（7.6%）および第一節の調査で示された生食用食肉，食肉製品および食肉調理

品の *L. monocytogenes* 汚染率 (1.7%) と比べて有意に高かった (χ^2 乗検体, $p < 0.05$) (53)。牛の内臓肉が, 正肉, 生食用食肉, 食肉製品および食肉調理品と比べて *L. monocytogenes* に高率に汚染されているのは, 食肉処理方法の違いや加熱処理の有無などによると考えられ, 喫食時の十分な加熱や二次汚染の防止の必要性が示唆された。

部位別検出状況をみると, VTEC はセンマイ (第三胃), ギアラ (第四胃) およびモウチョウ (盲腸) からの検出数が多いが, *L. monocytogenes* は偏りなく, 全体に汚染が認められた。このことは, VTEC が腸管に定着することに対して, *L. monocytogenes* はヒトや動物腸管に長期間保菌されるのではなく, 通過菌として排泄されると考えられていること (56) を反映していると考えられた。また, 枝肉の *L. monocytogenes* 汚染要因は, 腸内容物や体表に存在する本菌により汚染された解体処理環境からの二次汚染であると報告がある (70)。牛内臓肉の *L. monocytogenes* 汚染についても, 牛内臓肉に付着しているのみならず, 環境から二次汚染を受けている可能性があり, 解体処理工程の改善の必要性が示唆された。

国内のリステリア症患者由来 *L. monocytogenes* の血清型 (1958~2001 年) は 4b (59.9%) が最も多く, 次いで 1/2b (26.4%), 1/2a (5.8%) であり, 食品由来株では, 1/2a (47.1%) が最も多く, 次いで 1/2c (15.5%), 1/2b (13.8%), 4b (9.2%) と内閣府食品安全委員会によりまとめられている (53)。また, 食品では食品群により傾向が異なり, 食肉および食肉加工品では 1/2c, 1/2a, 1/2b の順に多いと報告されている (53)。今回の調査でも 1/2c, 1/2a の順であった。リステリア症患者から最も多く分離される血清型 4b は検出されなかつ

たが、3番目に多い血清型である 1/2a の *L. monocytogenes* が、調査した 104 検体中 9 検体 (8.7%) から検出された。以上の結果、牛内臓肉は、血清型 4b 株によるリステリア症の原因となる可能性は低いものの、血清型 1/2a 株によるリステリア症の原因となりうることが示唆された。

糞便系大腸菌群陰性の検体は、19 検体 (18.3%) と少なかったが、陰性検体であっても *L. monocytogenes*、VTEC OUT:H21、*C. jejuni* および *C. coli* が検出され、糞便系大腸菌群と食中毒菌の存在は関連していない場合も認められた。その理由のひとつには、試験法が異なることが考えられる。すなわち、各食中毒菌の検出は試料 25 g 中对象の菌が存在するかを検査するのに対して、糞便系大腸菌群は試料 3 g 中に存在するかを検査すると換算され、検出感度が低いことである。もうひとつには、*L. monocytogenes* や *C. jejuni* および *C. coli* が糞便系大腸菌群ではないことが考えられる。今回の調査から、衛生指標菌である糞便系大腸菌群が陰性であり、安全性が確保されていると考えられる食品でも *L. monocytogenes* およびその他の食中毒菌が存在する場合もあることが示唆された。食品の *L. monocytogenes* の危害性を知るには、衛生指標菌だけではなく、*L. monocytogenes* を直接的に検出・定量することが必要であると考えられた。

本節で、牛内臓肉は *L. monocytogenes* に高率に汚染されていることおよび *L. monocytogenes* を含む複数の食中毒菌に同時に汚染されている場合があることを報告した。牛内臓肉製造方法の改善、流通や販売の現場および消費者への注意喚起が必要である。

表 10. 本章で使用したオリゴヌクレオチド

目的	遺伝子または位置	配列(5'→3')	標識
VT 遺伝子検出	<i>vx1</i>	Forward	GGATAAATTTGTTTGCAGTTGATGTC
		Reverse	CAAATCCTGTGCACATATAAAATTAITTCGT
		Probe	CCGTAGATTATTAAACCCCTTCCCTCTGGA
<i>vx2</i>	Forward	GGGCAGTTAATTTTGCTGTGGA	
	Reverse	GAAAGTAATTTGTTGCCGTATTAACGA	
	Probe	ATGTCTATCAGGGCGGTTTTGACCATCTT	5' FAM-labeled, 3' BHQ-labeled
接着因子関連遺伝子検出	<i>vx2c</i>	Forward	CATTCACAGTAAAAAGTGGCC
		Reverse	GGGTGCCCTCCCGGTGAGTTC
		Forward	AAGCCTTACGGTTCAGGCAA
<i>vx2e</i>	Reverse	CAGTTAAAACCTTCACCTGGGC	
	Forward	CCCGGCACAAGCATAAAGCTAA	
	Reverse	ATGACTCATGCCAGCCCGCTCA	
<i>saa</i>	Forward	CGTGATGAACACAGGCTATTGC	
	Reverse	ATGGACATGCCTGTGGCAAC	
	Forward	GTATACACAAAAAGGAAGC	
<i>aggR</i>	Reverse	ACAGAAATCGTCAGCATCAGC	
	Forward	CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT	
	Reverse	GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT	
<i>C. jejuni</i> 検出	<i>C. jejuni</i> 染色体	GGTATGATTTCTACAAAGCGAG	
<i>C. coli</i> 検出	Forward	ATAAAAAGACTATCGTCGCGGTG	
	Reverse		

表 11. 牛内臓肉の *Listeria monocytogenes*, Verotoxin-producing *E. coli*, *Campylobacter jejuni/coli*, サルモネラおよび糞便系大腸菌検出状況

牛内臓肉	検体数	陽性検体数 (検体数における割合, %)				
		<i>L. monocytogenes</i>	VTEC	<i>C. jejuni/coli</i>	サルモネラ	糞便系大腸菌群
レバー (肝臓)	38	2 (5.3)	4 (10.5)	8 (21.1)	0 (0)	25 (65.8)
ハツ (心臓)	18	7 (38.9)	5 (27.8)	5 (27.8)	0 (0)	14 (77.8)
ハラミ (横隔膜)	2	1 (50.0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2 (100)
テール (尾)	9	4 (44.4)	0 (0)	8 (88.9)	1 (11.1)	9 (100)
タン (舌)	5	1 (20.0)	0 (0)	2 (40.0)	0 (0)	5 (100)
ハチノス (第二胃)	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (60.0)
センマイ (第三胃)	9	4 (44.4)	5 (55.6)	7 (77.8)	0 (0)	9 (100)
ギアラ (第四胃)	9	3 (33.3)	7 (77.8)	9 (100)	0 (0)	9 (100)
モウチョウ (盲腸)	9	0 (0)	4 (44.4)	9 (100)	3 (33.3)	9 (100)
計	104	22 (21.2)	25 (24.0)	50 (48.1)	4 (3.8)	85 (81.7)

表12. 牛内臓肉から検出された Verotoxin-producing *E. coli* の血清型

牛内臓肉	検体数	陽性検体数 (検体数における割合, %)		
		VTEC O157	VTEC O26	その他 ^{a)}
レバー (肝臓)	38	2 (5.3)	1 (2.6)	1 (2.6)
ハツ (心臓)	18	3 (16.7)	0 (0)	2 (11.1)
ハラミ (横隔膜)	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)
テール (尾)	9	0 (0)	0 (0)	0 (0)
タン (舌)	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)
ハチノス (第二胃)	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)
センマイ (第三胃)	9	4 (44.4)	0 (0)	1 (11.1)
ギアラ (第四胃)	9	7 (77.8)	0 (0)	0 (0)
モウチョウ (盲腸)	9	1 (11.1)	0 (0)	3 (33.3)
計	104	17 (16.3)	1 (1)	7 (6.7)

a) O1, O28, O91, O103, O153, OUT (O untypable, 型別不能)

表 13. 牛内臓肉から検出された Verotoxin-producing *E. coli* の血清型, 毒素型および接着因子関連遺伝子保有状況

血清型	毒素型	接着因子遺伝子			菌株数	小計
		<i>eae</i>	<i>saa</i>	<i>aggR</i>		
O157	O157:H7	+	-	-	9	8 ^{a)}
	VT1+VT2	+	-	-		
	VT1+VT2	+	-	-	1	
O26	O26:H11	+	-	-	1	1
その他	O103:H2	+	-	-	1	
	O28ac:H25	-	+	-	1	
	O153:H25	-	+	-	1	
	OUT:H21	-	+	-	3	
	O1:H45	-	-	-	1	
	O91:H14	-	-	-	1	
	OUT:H8	-	-	-	1	
	OUT:H18	-	-	-	1	
	OUT:H21	-	-	-	1	
	OUT:H45	-	-	-	1	12
計				31	31	

a) VT1+VT2c を 1 株含む

表 14. 牛内臓肉からの *Campylobacter jejuni/coli* 検出状況

牛内臓肉	検体数	陽性検体数 (検体数における割合, %)	
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>
レバー (肝臓)	38	5 (13.2)	3 (7.9)
ハツ (心臓)	18	2 (11.1)	3 (16.7)
ハラミ (横隔膜)	2	2 (100)	2 (100)
テール (尾)	9	7 (77.8)	3 (33.3)
タン (舌)	5	2 (40.0)	0 (0)
ハチノス (第二胃)	5	0 (0)	0 (0)
センマイ (第三胃)	9	6 (66.7)	1 (11.1)
ギアラ (第四胃)	9	9 (100)	1 (11.1)
モウチョウ (盲腸)	9	9 (100)	3 (33.3)
計	104	42 (40.4)	16 (15.4)

表 15. 牛内臓肉の *Listeria monocytogenes*, Verotoxin-producing *E. coli*, *Campylobacter jejuni/coli*, サルモネラ検体別検出状況

牛内臓肉	検体数	食中毒菌検出検体数									
		<i>L. monocytogenes</i> VTEC <i>C. jejuni/coli</i>	<i>L. monocytogenes</i> <i>C. jejuni/coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	VTEC <i>C. jejuni/coli</i> サルモネラ	VTEC <i>C. jejuni/coli</i>	VTEC	<i>C. jejuni/coli</i> サルモネラ	<i>C. jejuni/coli</i>	<i>C. jejuni/coli</i>
レバー (肝臓)	38			2		4				8	24
ハツ (心臓)	18		3	4		4		1		1	5
ハラミ (横隔膜)	2		1							1	
テール (尾)	9		4					1		3	2
タン (舌)	5		1							1	3
ハチノス (第二胃)	5										5
センマイ (第三胃)	9	2	1	1				3		1	1
ギアラ (第四胃)	9	3						4		2	
モウチョウ (盲腸)	9							3	1	2	3
計	104	5	10	7		8		11	3	20	40

第二章 食品からの *Listeria monocytogenes* 検出法の比較

序論

わが国では 1993 年以降, *L. monocytogenes* がナチュラルチーズ(ソフトおよびセミソフトタイプ) や非加熱食肉製品から検出された場合, 食品衛生法第 6 条 3 号違反として取り扱われ, 輸入禁止・製品回収などの措置がとられてきた (38)。その検査法として, 当時の IDF の試験法 (21) に準拠する方法が「乳、乳製品中のリステリア検査法手順 (IDF 標準法)」として通知された (平成 5 年通知法) (38)。

L. monocytogenes の増菌培地としては, USDA, FSIS から提示されている, 食肉・卵およびその製品, 環境を対象とした検査法 (14) で使用される UVM 培地の検出率が高いことから (18), 国内では平成 5 年通知法に示される増菌培地である EB 培地に代えてしばしば使用されてきた (54)。東京都健康安全研究センターにおいても, 乳・乳製品では EB 培地, それ以外の検体では UVM 培地を増菌培地として使用してきた。以下, EB 培地または UVM 培地による本菌の増菌を行う方法を従来法とする。

一方, コーデックス委員会の微生物規格では, 本菌の増殖が起こりえない食品では 1 ロットに対し 5 サンプルについて 100 CFU/g 以下, 増殖が起こりうる食品では 1 ロットに対し 5 サンプルについて 25 g 中に陰性であることとし, その試験法を ISO 法とした (22, 23)。2014 年, 国際ハーモナイゼーションの目的で, わが国もナチュラルチーズ (ソフト, セミソフト, セミハードタイプ) および非加熱食肉製品を対象に 1 g につき 100 CFU 以下と成分規格が定められ (32,

33), ISO 法 (22, 23) に準じた検査法が採用された (35)。以下, 平成 26 年通知法と記載する。この方法は試験内容が変わるため, 従来の試験法と検出感度等の違いを明らかにする必要がある。したがって, 本研究では平成 26 年通知法の基となった ISO 定性法 (22) および ISO 定量法 (23) と従来法について比較を試みた。

本章では, RTE 食品等について従来法 (38, 54) および ISO 定性法 (22) による増菌培養を行い, *L. monocytogenes* の検出について両方法の比較を試みた。また, ISO 定性法の増菌法は二段階増菌法であり, それぞれの増菌段階で増菌培養液から選択分離培地に画線塗抹して *L. monocytogenes* の分離を行うが, 一次増菌で検出された検体でも, 二次増菌では夾雑菌の影響で検出されない場合があると報告される (59)。その検証のため, 本研究では ISO 定性法において, 二段階増菌の各段階の検出率を調べ, 各段階における *L. monocytogenes* 検出の正確さを比較検討した。さらに *L. monocytogenes* 陽性検体について, ISO 定量法 (23) と MPN 法 (14, 54) により定量を行い, それぞれの方法による結果を比較検討した。さらに, コーデックス委員会の規格に従い 1 ロットに対し 5 サンプルの定性試験を行った場合の *L. monocytogenes* 検出状況と汚染菌量の相関を調べた。

材料と方法

1. 供試検体

2000-2015 年に東京都内で流通した, RTE 食品 829 検体および加

熱せずにそのまま喫食する可能性のある要加熱食品 59 検体，計 888 検体を供試した。内訳は，成分規格が設定されたナチュラルチーズ 96 検体，非加熱食肉製品（生ハム，セミドライソーセージ，生ベーコン等）41 検体のほか，RTE 食品として生食用食肉（ユッケ用牛肉，馬刺し等），加熱殺菌後包装の加熱食肉製品（ハム，焼豚等），包装後加熱殺菌の加熱食肉製品（蒸し鶏，ソーセージ），マグロ加工品（マグロスライス，ネギトロ等），魚卵塩蔵品（たらこ，明太子等），スモークサーモン，魚介類珍味（松前漬け，塩辛等），魚介類乾製品（あたりめ，つまみたら等），魚介類その他（刺身，寿司だね等），加熱せずにそのまま喫食する可能性のある要加熱食品として，加熱殺菌後包装の加熱食肉製品（ソーセージ等），魚介類珍味（いかとんび），魚介類その他（貝等）であった（表 16）。

2. *L. monocytogenes* 検出法

1) 増菌：従来法

平成 5 年通知法（38）に準じた方法で増菌培養を行った。すなわち，試料 25 g にナチュラルチーズには EB 培地（Merck），その他の検体には UVM 培地（Merck）225 ml を加え，30℃で 48 時間培養した。

2) 増菌：ISO 定性法

ISO 11290-1（22）に従って増菌培養を行った。すなわち，試料 25 g に half-Fraser 培地（Merck）225 ml を加え，30℃で 24 時間培養し

た（一次増菌）。その 0.1 ml を Fraser 培地（Merck）10 ml に加え、37℃で 48 時間培養した（二次増菌）。

3) 選択分離培養

従来法では増菌培養液を PALCAM 寒天培地（Merck）に、ISO 定性法では各増菌培養液を PALCAM 寒天培地およびクロモカルトリステリア選択寒天培地（Merck）またはクロモアガーリステリア（CHROMagar）(68) に画線塗抹し、第一章 第一節 材料と方法 2.2) の方法に準じて、選択分離培養を行った。培養後 *Listeria* spp. とと思われる集落が認められた場合は、TSA に釣菌して純培養菌を得た。

4) 同定

第一章 第一節 材料と方法 2.3) の方法に従って、*L. monocytogenes* の同定を行った。

3. *L. monocytogenes* 定量法

1) ISO 定量法

ISO 11290-2(23) に従って行った。試料 25 g に BPW (Thermo Fisher Scientific) を 225 ml 加え、20℃で 1 時間蘇生培養した。その 1 ml を 3 枚のクロモカルトリステリア培地（Merck）に塗抹することを 2 組行い、37℃で 48 時間培養後、*L. monocytogenes* と推定される集落について第一章 第一節 材料と方法 2.3) の方法に従って、*L. monocytogenes* の同定を行い、菌数を算出した。検出限界は、2 組のうち 1 組に 1 コロニーのみ検出される場合で 5 CFU/g と算出され、

検出限界以下の場合は < 10 CFU/g と算出される (23)。

2) MPN 法

第一章 第一節 材料と方法 3.の方法に従って、MPN 値を算出した。

4. コーデックス委員会の微生物規格におけるサンプリングプランの検証

2012年に都内小売店で購入したマグロ加工品 16 検体，魚卵加工品 35 検体，非加熱食肉製品 1 検体の計 52 検体を対象とした。1 検体に対し 25g，5 サンプルについて ISO 定性法による検出を，25g，1 サンプルについて従来法による検出を試みた。いずれかの方法で陽性の場合，4℃で保管された検体について 2 日以内に ISO 定量法と MPN 法による定量試験を行った。

結果

1. *L. monocytogenes* の検出

L. monocytogenes は，従来法および ISO 定性法の両方法またはいずれかの方法により，RTE 食品 829 検体中 34 検体 (4.1%)，加熱せずにそのまま喫食する可能性のある要加熱食品 59 検体中 9 検体 (15.3%)，計 888 検体中 43 検体 (4.8%) から検出された (表 16)。従来法と ISO 定性法の両方法で本菌が検出されたのは 25 検体，従来法のみ，ISO 定性法のみで検出されたのはそれぞれ 10 検体，8 検

体であった。両方法とも本菌が陰性であったのは 845 検体であった。そのうち成分規格が設定されたナチュラルチーズ・非加熱食肉製品についてみると、ナチュラルチーズでは、*L. monocytogenes* が検出された 1 検体は従来法および ISO 定性法の両方法により検出された。非加熱食肉製品では、6 検体は両方法により、従来法および ISO 定性法のいずれかの方法で検出されたのは各 1 検体であった。よって、ナチュラルチーズ・非加熱食肉製品については、従来法、ISO 定性法で *L. monocytogenes* が検出されたのはそれぞれ 8 検体であり、検出検体数は同数であった。

また、従来法と ISO 定性法の増菌方法別の検出数を表 17 に示した。陽性検体 43 検体中、従来法、ISO 法一次増菌、二次増菌いずれの増菌方法でも検出されたのは 21 検体であり、22 検体は増菌方法により検出結果が異なった。従来法が陽性で、ISO 法一次増菌陽性、二次増菌陰性が 4 検体、一次、二次とも陰性が 10 検体であった。従来法が陰性で、ISO 法一次、二次とも陽性が 4 検体、一次のみ陽性が 1 検体、二次のみ陽性が 3 検体であった。

さらに、*Listeria* spp.存在下での従来法と ISO 定性法の増菌方法別の検出数を表 18 に示した。ISO 法一次増菌陽性で二次増菌陰性の検体は、従来法増菌陽性、ISO 一次増菌陽性、ISO 二次増菌陰性 (+/+, -) の 4 検体および従来法増菌陰性、ISO 一次増菌陽性、ISO 二次増菌陰性 (-/+, -) の 1 検体で、計 5 検体であった。そのうち 4 検体は *L. innocua* 等、*L. monocytogenes* 以外の *Listeria* spp. が同時に検出された。

2. *L. monocytogenes* の定量

L. monocytogenes が陽性の 24 検体について、*L. monocytogenes* 菌数を、ISO 定量法および MPN 法で定量し、定量値を比較した（表 19）。ISO 定量法では、290 CFU/g, 65 CFU /g, 35 CFU /g, 20 CFU /g, その他 20 検体は 5 CFU/g または <10 CFU/g であった。対応する検体の MPN 法での値は、それぞれ >110 MPN/g , 110 MPN/g, 7.5 MPN/g , 9.3 MPN/g であり、その他 20 検体は 2.3 MPN/g またはそれ以下であった。

3. コーデックス委員会の微生物規格におけるサンプリングプランの検証

マグロ加工品 16 検体中 5 検体、魚卵加工品 35 検体中 1 検体、非加熱食肉製品 1 検体中 1 検体から従来法もしくは ISO 定性法で *L. monocytogenes* が検出された。*L. monocytogenes* が検出された検体について、*L. monocytogenes* 検出サンプル数および定量値を表 20 に示した。

ISO 定性法で 5 サンプル全てから *L. monocytogenes* が検出された 4 検体はマグロ加工品で、従来法でも陽性となり、ISO 定量法による定量値は <10 CFU/g または 5 CFU/g, MPN 法による定量値は <0.3-2.3 MPN/g であった。ISO 定性法で 5 サンプル中 4 サンプルが陽性であったマグロ加工品、1 サンプルが陽性であった非加熱食肉製品、全て陰性であった魚卵加工品の 3 検体は、従来法ではそれぞれ陰性、陽性、陽性となった。これらの 3 検体はいずれも、ISO 定量法による定量値は <10 CFU/g, MPN 法による定量値は <0.3 MPN/g であった。

考察

本章での検討で、*L. monocytogenes* 陽性検体は少なかったが、従来法と ISO 定性法による検出数は、ほぼ同等であった。Eld ら (8) は、ブルーチーズ（アーデルウストとゴルゴンゾーラ）に *L. monocytogenes* を接種したものおよび市販のナチュラルチーズを対象に IDF 法と ISO 定性法で検出を比較した調査を行っている。その結果、両方法による *L. monocytogenes* 検出率は、菌を接種したアーデルウストおよび市販のナチュラルチーズでは同等であったが、菌を接種したゴルゴンゾーラでは ISO 定性法の方が高かったと報告している。今回の調査でいずれかの方法でのみ検出された検体は、従来法のみが 10 検体、ISO 定性法のみが 8 検体の計 18 検体であった。それらの検体の *L. monocytogenes* 菌数は MPN 法で <0.3 MPN/g と低値であり、いずれかの方法でのみ検出された要因のひとつとして、汚染菌量が少ないことが考えられた。もうひとつの要因として、検体の種類により適した試験法が異なることが考えられる。魚介類乾製品では、113 検体中 3 検体から *L. monocytogenes* が検出され、それらは全て ISO 定性法の二次増菌後の Fraser 培地から分離されたもので、従来法の UVM 培地および ISO 定性法の一次増菌後の half-Fraser 培地では検出されなかった。今回、二次増菌後の Fraser 培地からのみ分離された検体は *L. monocytogenes* が検出された 43 検体中この 3 検体のみであった。このことから、魚介類乾製品では、*L. monocytogenes* を検出するためには ISO 定性法の二段階増菌が有効であったという可能性も考えられた。

本調査において、ISO 定性法で陽性であった 33 検体のうち、一次増菌培地からのみ検出され、二次増菌培地からは検出されなかった検体が 5 検体あった。そのうち 4 検体では同時に *L. innocua* 等 *Listeria spp.*が検出された。培地中に *L. innocua* と *L. monocytogenes* が共存すると、*L. monocytogenes* の増殖が抑制される場合があると報告されている (6, 45)。その原因は、*L. innocua* が各種選択増菌培地で *L. monocytogenes* よりも早く増殖すること (45)、*L. innocua* が産生するバクテリオシンにより *L. monocytogenes* の増殖が抑制されること (6, 80) が考えられている。また、Gnanou Besse ら (15) も、Fraser 培地での二次増菌は、夾雑菌の発育等の影響で *L. monocytogenes* が偽陰性となる可能性があり、そのため、Fraser 培地での二次増菌の培養時間を 48 時間から 24 時間に短縮することを提案している。このように夾雑菌の影響により、*L. monocytogenes* 検出に適した増菌方法が異なることが示唆された。現時点で全ての食品に最も適した試験法を決定することは困難であるが、国際ハーモナイゼーションの観点から、輸入食品を含む国内流通食品の *L. monocytogenes* 試験法は、国際標準法に従うべきと考える。

ISO 定量法と MPN 法による定量法の比較では、両方法の測定可能な範囲が異なるものの、定量値に矛盾は認められなかった。

今回、1 検体につき 5 サンプル ISO 定性法および 1 サンプル従来法による *L. monocytogenes* 定性試験を行った。*L. monocytogenes* 陽性検体のうち、ISO 定性法で 5 サンプル中に陰性サンプルが存在した検体は 3 検体あった。これら 3 検体の *L. monocytogenes* 菌数は ISO 定量法および MPN 法のいずれも検出限界以下、すなわち <10 CFU/g および <0.3 MPN/g であった。このことより、*L. monocytogenes* が存

在する検体であっても，1 サンプルのみの定性試験では陰性となる場合があるが，その場合は菌数が少ないことが示唆された。現在の通知法（35）に示される，1 サンプル定性試験を行って陰性であれば，5 サンプルの定量値が<100 CFU/g であると推定される予備試験の妥当性を確認するものであった。

以上の結果から，食品の特性や夾雑菌の存在により，適した検出方法が異なる可能性も考えられたものの，今回の検討では従来法および ISO 定性法による定性試験法，ISO 定量法および MPN 法による定量法ともに，大きな違いは認められなかった。国際ハーモナイゼーションの目的で通知法が変更されたが，平成 5 年通知法と ISO 定性法による食品からの *L. monocytogenes* 検出率に大きな差は生じないと想定された。従って，これまで日本で行われた *L. monocytogenes* に関する汚染調査成績にみられる陽性率や菌数の正確さは担保されており，過去の *L. monocytogenes* に関する疫学情報の利用の正当性が確認されることとなる。

表 16. 従来法と ISO 法の検査方法別 *Listeria monocytogenes* 検出状況

RTE 食品	検体の種類	検体数	陽性検体数 (検体数における割合, %)		検査法別陽性検体数	
			両方法	従来法のみ	ISO 法のみ	
	ナチュラルチーズ	96	1 (1.0)	1		
	非加熱食肉製品	41	8 (19.5)	6	1	1
	生食用食肉	69	3 (4.4)	1		2
	加熱食肉製品 (加熱殺菌後包装)	83	1 (1.2)		1	
	加熱食肉製品 (包装後加熱殺菌)	2	0 (0)			
	マグロ加工品	69	5 (7.2)	4		1
	魚卵塩蔵品	71	5 (6.9)	2		3
	スモークサーモン	38	1 (2.6)	1		
	魚介類珍味	26	4 (15.4)		3	1
	魚介類乾製品	113	3 (2.7)			3
	魚介類その他	93	0 (0)			
	野菜の漬物	128	3 (2.3)	2		1
	小計	829	34 (4.1)	17	9	8
加熱せずにそのまま喫食する可能性のある食品						
	加熱食肉製品 (加熱殺菌後包装)	53	8 (1.5)	7		1
	魚介類珍味	1	1 (100)	1		
	魚介類その他	5	0 (0)			
	小計	59	9 (15.3)	8		1
	計	888	43 (4.8)	25	10	8

表 17. 従来法と ISO 定性法の増菌方法別 *Listeria monocytogenes* 検出状況

検体の種類	陽性検体数	増菌方法別陽性検体数				
		従来法 / ISO 一次増菌, ISO 二次増菌 +/+,+ ^{a)}	+/+,-	+/+,-	-/+,-	-/+,-
RTE 食品						
ナチュラルチーズ	1	1				
非加熱食肉製品	8	5	1	1	1	
生食用食肉	3	1		1	1	
加熱食肉製品 (加熱殺菌後包装)	1		1			
マグロ加工品	5	4		1		
魚卵塩蔵品	5	1	1	3		
スモークサーモン	1	1				
魚介類珍味	4		3	1		
魚介類乾製品	3					3
野菜の漬物	3	2	1			
加熱せずにそのまま喫食する可能性のある食品						
加熱食肉製品 (加熱殺菌後包装)	8	5	2	1		
魚介類珍味	1	1				
計	43	21	4	10	4	1
						3

a) +/+,+ : 従来法の増菌 ; 陽性, ISO 一次増菌 ; 陽性, ISO 二次増菌 ; 陽性

表 18. *Listeria* spp.存在下の *Listeria monocytogenes* 検出状況

<i>Listeria</i> spp. (<i>L. monocytogenes</i> 以外)	<i>L. monocytogenes</i> 陽性検体数	増菌方法別陽性検体数					
		+/+,+ ^{a)}	+/+,-	+/,-,-	-/+ ,+	-/+ ,-	-/-,+
<i>L. innocua</i>	15	4	2	4	2	1	2
<i>L. innocua, L. welshimeri</i>	1	1					
<i>L. innocua, L. seeligeri</i>	1			1			
<i>L. innocua, L. welshimeri, L. grayi</i>	1		1				
<i>L. welshimeri</i>	2						
<i>L. seeligeri</i>	3						
<i>L. grayi</i>	1						
-	19	10	1	5	2		1
計	43	21	4	10	4	1	3

a) +/+,+ : 従来法の増菌 ; 陽性, ISO 一次増菌 ; 陽性, ISO 二次増菌 ; 陽性

表 19. ISO 定量法と MPN 法による *Listeria monocytogenes* 定量結果の比較

<i>L. monocytogenes</i> 菌数		検体数	食品
ISO 定量法 (CFU/g)	MPN 法 (g)		
290	>110	1	レカとんび ^{b)}
65	110	1	ソーセージ ^{b)}
35	7.5	1	ソーセージ ^{b)}
20	9.3	1	ソーセージ ^{b)}
5	0.92	1	マグロスライス
5	0.36	1	ソーセージ
5	<0.3	2	ネギトロ, 生ハム
<10 ^{a)}	2.3	1	ネギトロ
<10	2.1	1	ソーセージ ^{b)}
<10	0.36	1	ソーセージ ^{b)}
<10	<0.3	13	RTE 食品等

^{a)} 全ての平板に *L. monocytogenes* のコロニーなし

^{b)} 要加熱食品

表 20. コーデックス委員会の微生物規格におけるサンプリングプラン調査結果

検出サンプル数(陽性サンプル数/検査サンプル数)		<i>L. monocytogenes</i> 菌数		検体の種類
ISO 法	従来法	ISO 法 (cfu/g)	MPN 法 (g)	
5/5	1/1	5	0.92	マグロ加工品
5/5	1/1	5	<0.3	マグロ加工品
5/5	1/1	<10 ^{a)}	2.3	マグロ加工品
5/5	1/1	<10	<0.3	マグロ加工品
4/5	0/1	<10	<0.3	マグロ加工品
1/5	1/1	<10	<0.3	非加熱食肉製品
0/5	1/1	<10	<0.3	魚卵加工品

^{a)}全ての平板に *L. monocytogenes* のコロニーなし

第三章 *Listeria monocytogenes* の Multiplex PCR による血清群別法の研究

序論

食中毒事件や感染症事例から分離される *L. monocytogenes* 菌株を分類識別することは、疫学解析に必要不可欠であり、血清型別、PFGE、MLST などによって行われている (16, 63, 65)。血清型別は事例株の解析の際に第一に行われる方法で、O 抗原と H 抗原の組み合わせにより決定される。しかし、血清型別試験は判定までに時間を要し、また各抗原の発現が弱く判定が困難な株や不能な株も存在する。最近、Multiplex PCR 法を応用した PCR serogrouping と呼ばれる分子生物学的血清群別法が、*L. monocytogenes* 分離株の迅速・正確な型別ツールとして開発された (7, 26, 42)。PCR serogrouping は、6 つの DNA フラグメント、*lmo1118*, *lmo0737*, *orf2110*, *orf2819*, *prs* (*Listeria* spp. 特異的遺伝子), *prfA* (*L. monocytogenes* 特異的遺伝子) を標的とした Multiplex PCR と、特定の血清型の *L. monocytogenes* 株が保有する遺伝子 *flaA* を標的とした追加の PCR による方法である。Multiplex PCR profiling では、検出パターンにより 5 つの PCR serogroup ; IIa, IIb, IIc, IVa, IVb に群別される。*flaA* は 1/2a と 3a の株のみが保有する遺伝子であり、Multiplex PCR profiling で IIc のパターンを示しても、この遺伝子の検出により PCR serogroup は IIa に補正される。5 つの PCR serogroup の中で、IVb については、異なる検出パターンを示すバリエーション IVb-v1 が報告されている (42)。

本法は、WHO リステリア国際レファレンスセンターで型別法としての導入が検討されている方法である。

本章では、*L. monocytogenes* 菌株の PCR serogrouping について、迅速性、正確性を高めるために既報から条件を改良するための検討を行った。すなわち、プライマー濃度、反応条件の改良を行い、その方法を用いて、本法を試みた。従来の血清型別と結果を比較し、改良した PCR serogrouping の型別能について検証を行った。さらに、バリエーションである IVb-v1 株、未報告のパターンを示す株について解析を行い、PCR serogrouping の有用性を高めることを目的とした。

材料と方法

1. 供試菌株

1989年から2012年に日本で分離された *L. monocytogenes* 187株を供試した。供試菌株は食品由来159株、食品製造環境由来17株、ヒト由来11株である（表21）。本菌が分離された食品は、牛肉、豚肉、鶏肉、食肉製品、魚介類、魚介類加工品、ナチュラルチーズ、その他であり、その産地は13か国であった（表22）。

供試 *L. monocytogenes* 株はドルセットの卵培地（日水製薬）による4℃保存または菌株保存用バイアル マイクロバンク（イワキ、東京、日本）による-80℃保存をした。

2. *L. monocytogenes* 血清型別法

第一章 第一節 材料と方法 4.の方法に従って，血清型別を行った。

3. *L. monocytogenes* PCR serogrouping のための Multiplex PCR 法

供試 *L. monocytogenes* 187 株の PCR serogrouping は，Doumith ら (7)，Kérouanton ら (26)，Leclercq ら (42) により報告された方法を，一部改変して実施した。以下に詳細を記載する。

1) PCR 用 Template DNA の調整

保存されている菌株を BHI 液体培地 (Becton Dickinson) を用いて 1 回継代し，TSA 寒天培地 (栄研化学) に塗抹培養した。平板上に発育した単一コロニーを釣菌し，滅菌 MilliQ 水 50 μ l に懸濁し，50 mM NaOH を 50 μ l 加え混和後，100 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱して DNA を抽出 (アルカリ熱抽出) した。中和のために 80 mM Tris-HCl (pH7.0) を 100 μ l 加えて混和後，13,000 \times g，3 分間遠心分離した上清を PCR 用 Template genomic DNA とした。

2) Multiplex PCR profiling

lmo1118, *lmo0737*, *orf2110*, *orf2819*, *prs*, *prfA* を増幅するプライマーは Doumith ら (7) および Kérouanton ら (26) の報告したプライマー配列を用いた。各プライマーの塩基配列は表 23 の通りである。Multiplex PCR の条件として，使用試薬，反応液組成，反応温度，反応時間を検討した。予備的に検討した結果，増幅用酵素は *Takara Ex Taq Hot Start Version* (タカラバイオ) を，反応液組成および反応

条件は以下の条件を採用した。反応液は検査するサンプル分をまとめて調製し，分注して使用した。

Multiplex PCR 反応液組成 (25 μ l スケール, 1 サンプル分)

①	10× <i>Ex Taq</i> Buffer	2.5 μ l
②	dNTP Mixture (それぞれ 2.5 mM)	2 μ l
③	<i>lmo1118</i> Forward primer (50 μ M)	0.5 μ l
④	<i>lmo1118</i> Reverse primer (50 μ M)	0.5 μ l
⑤	<i>lmo0737</i> Forward primer (50 μ M)	0.1 μ l
⑥	<i>lmo0737</i> Reverse primer (50 μ M)	0.1 μ l
⑦	<i>orf2110</i> Forward primer (50 μ M)	0.1 μ l
⑧	<i>orf2110</i> Reverse primer (50 μ M)	0.1 μ l
⑨	<i>orf2819</i> Forward primer (50 μ M)	0.1 μ l
⑩	<i>orf2819</i> Reverse primer (50 μ M)	0.1 μ l
⑪	<i>prs</i> Forward primer (50 μ M)	0.1 μ l
⑫	<i>prs</i> Reverse primer (50 μ M)	0.1 μ l
⑬	<i>prfA</i> Forward primer (50 μ M)	0.1 μ l
⑭	<i>prfA</i> Reverse primer (50 μ M)	0.1 μ l
⑮	<i>Ex Taq</i> Hot Start Version (5 unit/ μ l)	0.125 μ l
⑯	Template genomic DNA (<1 μ g)	2 μ l
⑰	滅菌 MilliQ 水	16.375 μ l

反応条件

- | | | |
|---|------|------|
| ① | 94°C | 3 分 |
| ② | 60°C | 30 秒 |

③	72°C	2 分	} 34 サイクル
④	94°C	30 秒	
⑤	60°C	30 秒	
⑥	72°C	30 秒	
⑦	72°C	7 分	

3) *flaA* を対象とした追加の PCR

flaA および *prs* を増幅するプライマーはそれぞれ Borucki ら (2) および Doumith ら (7) の報告したプライマー配列を用いた。プライマーの配列は表 23 の通りである。PCR の条件は、Kérouanton らの報告する条件 (26) を、さらなる迅速化を目指して一部改変して実施した。反応液は検査するサンプル分をまとめて調製し、分注して使用した。

PCR 反応液組成 (25 μ l スケール, 1 サンプル分)

①	10× <i>Ex Taq</i> Buffer	2.5 μ l
②	dNTP Mixture (それぞれ 2.5 mM)	2 μ l
③	<i>flaA</i> Forward primer (100 μ M)	0.3 μ l
④	<i>flaA</i> Reverse primer (100 μ M)	0.3 μ l
⑤	<i>prs</i> Forward primer (20 μ M)	0.05 μ l
⑥	<i>prs</i> Reverse primer (20 μ M)	0.05 μ l
⑦	<i>Ex Taq</i> Hot Start Version (5 unit/ μ l)	0.125 μ l
⑧	Template genomic DNA (<1 μ g)	2 μ l
⑨	滅菌 MilliQ 水	17.675 μ l

反応条件

①	94℃	30 秒	} 40 サイクル
②	60℃	30 秒	
③	72℃	30 秒	
④	72℃	7 分	

4) PCR serogrouping

反応物を 2%アガロースゲル (Agarose S ; ニッポンジーン) で電気泳動した。0.5 µg/ ml EtBr 溶液 (Sigma-Aldrich) にアガロースゲルを浸漬し DNA を染色した。ゲル撮影装置 AE-6932GXEX (ATTO) を用いて紫外線照射し, バンドを検出した。

Multiplex PCR profiling では, *lmo1118*, *lmo0737*, *orf2110*, *orf2819* のバンドの検出パターンにより, PCR profile IIa, IIb, IIc, IVb, IVb-v1 にわけられる (表 24, 図 4A)。PCR profile IIb, IVb, IVb-v1 は, PCR serogroup IIb, IVb, IVb-v1 と決定される。PCR profile IIa, IIc を示した菌株については, *flaA* を対象とした追加の PCR を実施し (図 4B), *flaA* を保有している株は PCR serogroup IIa, 保有していない株は PCR serogroup IIc と決定される。たとえば, PCR profile IIa を示して *flaA* を保有している株は PCR serogroup IIa, PCR profile IIa を示しても *flaA* を保有していない株は PCR serogroup IIc と補正される。逆に, PCR profile IIc を示しても *flaA* を保有している株は PCR serogroup IIa と補正される。

4. *orf2110* を検出する PCR

orf2110 を検出する単独 PCR は第三章 材料と方法 3.2) の方法に準じて実施した。

PCR 反応液組成 (25 μ l スケール, 1 サンプル分)

①	10 \times <i>Ex Taq</i> Buffer	2.5 μ l
②	dNTP Mixture (それぞれ 2.5 mM)	2 μ l
③	<i>orf2110</i> Forward primer (50 μ M)	0.1 μ l
④	<i>orf2110</i> Reverse primer (50 μ M)	0.1 μ l
⑤	<i>Ex Taq</i> Hot Start Version (5 unit/ μ l)	0.125 μ l
⑥	Template genomic DNA (<1 μ g)	2 μ l
⑦	滅菌 MilliQ 水	18.175 μ l

5. *orf2110*, *lmo0737*PCR 増幅産物の塩基配列解析

orf2110 および *lmo0737*PCR 増幅産物は, 第三章 材料と方法 4. に準じて, KOD -Plus- (東洋紡, 大阪, 東京) を使用して得た。

PCR 反応液組成 (25 μ l スケール, 1 サンプル分)

①	10 \times Buffer for KOD -Plus-	2.5 μ l
②	dNTP Mixture (それぞれ 2 mM)	2.5 μ l
③	MgSO ₄ (25 mM)	1 μ l
④	Forward primer (20 μ M)	0.625 μ l
⑤	Reverse primer (20 μ M)	0.625 μ l
⑥	KOD -Plus- (1 unit/ μ l)	0.5 μ l
⑦	Template genomic DNA (<1 μ g)	2.5 μ l

⑧ 滅菌 MilliQ 水

14.75 μ l

得られた PCR 増幅産物を, Montage PCR (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) を用いて精製した。方法はキットに添付の説明書に従った。すなわち, Montage PCR カラムに TE バッファー (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA (pH8.0)) 400 μ l と PCR 反応液 25 μ l を加え, 1,000 \times g で 15 分間遠心分離した。カラムを上下逆にしてマイクロチューブにセットし, 20 μ l の TE バッファーを加え, 1,000 \times g, 2 分間の遠心分離により精製 PCR 増幅産物を得た。

上記の精製 PCR 増幅産物を鋳型にして, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてサイクルシーケンス反応を行った。なお, それぞれの Forward primer および Reverse primer をそれぞれシーケンス用プライマーとして使用した。反応溶液および反応条件は以下の通りである。

シーケンス反応液組成 (20 μ l スケール, 1 サンプル分)

①	5 \times Sequencing Buffer	2 μ l
②	Template DNA (100-200 ng)	1 μ l
③	Forward もしくは Reverse primer (3.2 μ M)	1 μ l
④	Terminator Ready Reaction Mix	4 μ l
④	滅菌 MilliQ 水	12 μ l

反応条件

① 96 $^{\circ}$ C 1 分

② 96 $^{\circ}$ C 10 秒



- | | | | |
|---|------|-----|-----------|
| ③ | 50°C | 5 秒 | } 25 サイクル |
| ④ | 62°C | 4 分 | |

反応液を Ethanol/EDTA 沈殿法により精製を行った。すなわち，20 μl のサイクルシーケンス反応液に 5 μl の 125 mM EDTA を加え，次に 60 μl のエタノール（99.5%）試薬特級（和光純薬）を加え 4 回転倒混和した。室温で 15 分間静置し，13,000 $\times g$ ，10 分間遠心分離した。上清を除き，70%エタノールを 60 μl 加え，13,000 $\times g$ ，3 分間遠心分離した。上清を除き，乾燥させた。Hi-Di Formamide（Thermo Fisher Scientific）を 25 μl 加えて，ボルテックスミキサーで攪拌し，95°C，2 分間のヒートショック後氷上で冷却したものをキャピラリー電気泳動に用いた。

塩基配列の決定には，ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer（Thermo Fisher Scientific）を使用し，以下の条件でキャピラリー電気泳動を行った。

- ① キャピラリー；50 cm \times 50 μm
- ② ポリマー；POP-7（Thermo Fisher Scientific）
- ③ 泳動用バッファー；10 \times Capillary Electrophoresis Running Buffer（Sigma-Aldrich）
- ④ Dye Set；Z
- ⑤ Instrument Protocol；FastSeq50_POP7_BDv3
- ⑥ Analysis Protocol；3130KB_POP7_v3

得られた塩基配列を MEGA5 software (71) を用いて整列させ、解析を行った。

6. Pulsed-Field Gel Electrophoresis 解析

血清型 4d, 7 株, PCR serogroup IVb-v1, 8 株および PCR serogroup IVb, 4 株について PFGE 解析を行った (表 26)。PFGE 解析は, CDC のパルスネットの標準プロトコール (16, 17) を一部改変して実施した。

1) サンプルプラグの調整

供試菌株を BHI 液体培地 (Becton Dickinson) で 30°C, 14~16 時間培養した。培養液 120 μ l をマイクロチューブにとり, 13,000 \times g, 10 分間遠心分離し, 沈渣を 150 μ l の TE バッファーに浮遊させた。7.5 μ l の Lysozyme solution (20 mg/ml in TE バッファー) を加え, 穏やかに混和し, 56°C で 10~15 分インキュベートした後, Proteinase K (20 mg/ml) 7.5 μ l を加え, 穏やかに混和した。54~56°C に保持された, 1% Sodium dodecyl sulfate (Lonza Rockland, Rockland, ME, USA) 含有 TE に溶解した 1% SeaKem Gold agarose を 150 μ l 加えて 2~3 回ピペティングし, 直ちに 0.7-mm sample plug caster (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) 内で固化させることによって各菌株を寒天に包埋したサンプルプラグを作製した。

次に, サンプルプラグを 1.5 ml の Cell Lysis Buffer (0.1 mg/ml Proteinase K 含有 Tris/ EDTA sarcosyl lysis Solution) に入れ, 54°C で

1 時間 30 分～2 時間，160 rpm で振とうすることによってプラグ中の菌を溶菌し，ゲノム DNA を露出させた。

サンプルプラグは 6 mm×5 mm に切り，1 mM Pefabloc SC (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) 含有 TE バッファーで 50°C，30 分間処理し，Pefabloc SC 含有バッファーを入れ替えてもう 30 分間処理することによって Proteinase K を失活させた後，TE バッファーで 10～15 分間氷上に静置した。

その後，サンプルプラグ内のゲノム DNA を制限酵素 *Asc I* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) および *ApaI* (タカラバイオ) を用いて切断した。制限酵素反応は，*Asc I* は 25 U で 37°C，2～3 時間，*ApaI* は 20 U で 30°C，2～5 時間の処理により行った。

2) PFGE

制限酵素処理後の DNA 断片は，1.0% SeaKem Gold agarose gel および CHEF Mapper XA システム (Bio-Rad Laboratories) を用いた PFGE により解析した。泳動条件は角度 120°，電界強度 6 V/cm，温度 12°C で，*AscI* で処理した断片は泳動時間 18 時間，スイッチ時間 4-40 秒，*ApaI* で処理した断片は泳動時間 18 時間 31 分，スイッチ時間 0.35-30.82 秒とした。泳動用緩衝液は 0.5×TBE buffer を用いた。0.5×TBE buffer は 10×TBE Buffer (Thermo Fisher Scientific) を MilliQ 水で希釈して作製した。泳動終了後，前項(第三章 材料と方法 3.4)) の方法に従いバンドを検出した。DNA 断片パターンは BioNumerics software version 7.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) を用いて解析した。類似度の計算は DICE 法により行い，クラスター分析は Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)

を用いて，制限酵素 *AscI* と *ApaI* の結果を 1:1 の比率で合成して行った。なお，各断片の位置補正のための **Tolerance** 値は 1.5% に，各検体間の移動差補正のための **Optimization** 値は 0% に設定した。

7. Multilocus Sequence Typing

解析対象となる 7 つの遺伝子座，プライマー配列および PCR 反応条件は，Institut Pasteur の MLST データベース

(<http://bigsd.db.web.pasteur.fr/listeria/listeria.html>) に公開されているものに従った。各プライマーの配列は表 23 の通りである。PCR は第三章 材料と方法 3.1) で調整した Template DNA を用いて KOD-Plus- (東洋紡) で行った。反応溶液および反応条件は以下の通りである。

PCR 反応液組成 (25 μ l スケール，1 サンプル分)

①	10 \times Buffer for KOD -Plus-	2.5 μ l
②	dNTP Mixture (それぞれ 2 mM)	2.5 μ l
③	MgSO ₄ (25 mM)	1 μ l
④	Forward primer (10 μ M)	0.5 μ l
⑤	Reverse primer (10 μ M)	0.5 μ l
⑥	KOD -Plus- (1 unit/ μ l)	0.5 μ l
⑦	Template genomic DNA (<1 μ g)	2.5 μ l
⑧	滅菌 MilliQ 水	15 μ l

反応条件

①	94°C	4 分	} 35 サイクル
②	94°C	30 秒	
③	52°C *	30 秒	
④	72°C	2 分	
⑤	72°C	10 分	

* : ただし 7 つの遺伝子座の内 *bglA* においては 45°C で反応を行った。

反応終了後，第三章 材料と方法 5.の方法に従い，PCR 増幅産物の精製，サイクルシーケンス反応，キャピラリー電気泳動，塩基配列の決定，解析を行った。決定した配列を上記の MLST データベースに照合し，各遺伝子座の allele number およびその組み合わせから導かれる Sequence type (ST) を得た。

結果

1. PCR 条件の検討

Multiplex PCR profiling の条件について検討を行った。プライマー濃度は，既報 (26) では *lmo1118*, *lmo0737*, *orf2110*, *orf2819* が 0.4 μM, *prs*, *prfA* が 0.2 μM と報告されていた。この条件で *lmo1118* のバンドが薄くなる傾向が認められたため，*lmo1118* を 1 μM, それ以外のプライマーを 0.2 μM とした。annealing の温度は，既報 (26) では 53°C であるが，55°C, 60°C と比較したところ，60°C が最も非特異反応が少なかった。また，反応時間は，既報では 94°C, 3 分間 (initial

denaturation) を 1 回, 94°C, 40 秒間 (denaturation) – 53°C, 45 秒間 (annealing) – 72°C, 1 分 15 秒間 (extention) のサイクルを 35 回, 72°C, 7 分間 (final extention) を 1 回と報告されていた。反応時間を短縮するため, 35 回の条件を 94°C, 30 秒間 – 53°C, 30 秒間 – 72°C, 30 秒間とし, 1 回目の extention のみ 2 分間とした結果, 良好な反応が得られた (図 5)。試薬を *Takara Ex Taq Hot Start Version* と *KOD -Plus-*で実施したところ, 同等の増幅が認められた。以上の結果より, 第三章 材料と方法 3. 2) に記載した条件を採用した。

flaA を対象とした追加の PCR の条件は, 既報 (26) では, 94°C, 3 分間を 1 回, 94°C, 30 秒間 – 61°C, 40 秒間 – 72°C, 1 分間を 40 回, 72°C, 7 分間を 1 回であった。*Takara Ex Taq Hot Start Version* を使用して, 反応時間を短縮し, 94°C, 30 秒間 – 60°C, 30 秒間 – 72°C, 30 秒間を 40 回とした。その結果, 既報と比較して PCR serogroup IIa の株について *flaA* および *prs* のバンドおよび PCR serogroup IIc の株について *prs* のバンドが安定して認められたため (図 6), 第三章 材料と方法 3. 3) に記載した条件を採用した。

2. *L. monocytogenes* 分離株の PCR serogrouping

供試菌株 187 株のうち, 血清型 1/2a, 45 株の Multiplex PCR profiling のバンドパターンは, 44 株が IIa, 1 株が IIc, 3a の 7 株は IIa, 1/2b の 25 株および 3b の 2 株は IIb, 1/2c の 36 株は, 35 株が IIc, 1 株が IIa, 4ab の 1 株は IVb, 4b あるいは 4e の 65 株は, 57 株が IVb, 8 株が IVb-v1, 4d の 6 株は 5 株が IVb, 1 株 (MMS 10081) は *prs*, *prfA*, *orf2819* および約 400bp のフラグメントからなるバンドパターンを

示した（図 7A）。PCR profile が IIa および IIc を示した株は，*flaA* を対象とした追加の PCR を実施した。その結果，血清型 1/2a，PCR profile IIa の 44 株，IIc の 1 株，血清型 3a，PCR profile IIa の 7 株は *flaA* を保有，血清型 1/2c，PCR profile IIc の 35 株，IIa の 1 株は保有していなかった。そのため，血清型 1/2a，PCR profile IIc の 1 株は PCR serogroup IIa に，血清型 1/2c，PCR profile IIa の 1 株は PCR serogroup IIc に補正された。以上の結果，供試菌株 187 株のうち 186 株（99.5%）については，4 つの血清群と 1 つのバリエーション血清群：IIa，IIb，IIc，IVb，IVb-v1 に群別され，抗 O および H 血清を用いる従来の血清型別法の結果と矛盾が認められなかった（表 25）。

3. *L. monocytogenes* MMS 10081 株の塩基配列解析，PFGE 解析および MLST

1) *orf2110* を検出する PCR

MMS 10081 株は，2010 年に国産牛肉から分離された血清型 4d の株であるが，*prs*，*prfA*，*orf2819* を示すバンドは認められるものの，血清型 4d が示すべき *orf2110*（597 bp）のバンドが検出されなかった。一方，新たな約 400 bp のバンドが認められた。以上の DNA バンドの出現パターンはこれまでに報告されておらず，新しい PCR profile を示した（図 7A）。約 400 bp のバンド（以下 Δ *orf2110*）は *orf2110* を検出する単独の PCR でも増幅された（図 7B）。

2) Δ *orf2110* PCR 増幅産物の塩基配列解析

MMS 10081 株の $\Delta orf2110$ PCR 増幅産物の塩基配列を決定した。Dr. J. C. Feeley (CDC) より分与された MMS 11160 株 (血清型 4d, PCR serogroup IVb) の *orf2110* PCR 増幅産物 (597 bp) についても併せて塩基配列を決定し, $\Delta orf2110$ のそれと比較した。MMS 10081 株の $\Delta orf2110$ PCR 増幅産物は, *orf2110* のポジション 205-405 の 201 bp が欠損していて, それ以外の配列は同一であった (図 8)。塩基配列は DDBJ/GenBank/EMBL に登録および公開した (GenBank accession no. AB890369)。

3) 血清型 4d 株の PFGE 解析

MMS 10081 株, 血清型 4d で PCRserogroup IVb に属する 5 株および CDC 分与株 1 株の計 7 株 (表 26) について PFGE 解析を行った。7 株の PFGE パターンの類似度は 74.4%以上であり, そのうち国内で分離された 6 株については 82.1%以上と高い類似度を示した。MMS 10081 株 (Lane 1) と同じパターンを示す株は MMS 09228 (Lane 4) と MMS 12267 (Lane 7) の 2 株存在した (図 9)。

4) MLST 解析

MMS 10081 株の MLST 解析を行った。7 つの遺伝子座の allele number は, *abcZ* が 3, *bglA* が 1, *cat* が 1, *dapE* が 1, *dat* が 3, *ldh* が 1, *lhkA* が 3 であり, ST 型は ST1 と決定された。

4. PCR serogroup IVb-v1 株の解析

1) *lmo0737* PCR 増幅産物のシーケンス解析

PCR serogroup IVb-v1 は，PCR serogroup IVb のバンドパターン *orf2110*, *orf2819*, *prs*, *prfA* に加えて *lmo0737* のバンドが加わったパターンを示し，PCR serogroup IVb のバリエーションと報告されていた (42)。今回，PCR serogroup IVb-v1 は 1998 年から 2007 年のブラジル産鶏肉 7 検体，2012 年のオーストラリア産牛肉 1 検体から分離された。そのうち MMS 99107 株 (1999 年ブラジル産鶏肉由来株) および MMS 12001 株 (2012 年オーストラリア産牛肉由来株) について *lmo0737* PCR 増幅産物のシーケンス解析を行った結果，その塩基配列は，以前に報告された IVb-v1 である CLIP 2007/01070 株の配列 (GenBank accession no. HQ123583) と 100% 一致しており，それは *L. monocytogenes* EGD-e 株 (血清型 1/2a, PCR serogroup IIa, GenBank accession no. NC_003210) の配列と比べて 4 塩基多形を有していた (図 10)。

2) PFGE 解析

PCR serogroup IVb-v1, 8 株と PCR serogroup IVb, 4 株 (表 26) について PFGE 解析を行った。Lane 1 から 8 に示される IVb-v1 の 8 株は，類似度 95% で分類すると 4 つのパターンに分類された。しかしいずれも類似度 89.5% 以上であり，同様のパターンを示した。それに対して Lane 9 から 12 に示される IVb の 4 株は多様なパターンを示した (図 11)。

考察

L. monocytogenes の疫学解析のために開発された分子生物学的血清型別法である PCR serogrouping については、日本で分離された株についての検証報告はない。本章では、国内分離株を対象として本法の有用性を検証するために、1989年から2012年に日本で分離された *L. monocytogenes* 菌株を対象に PCR serogrouping を行い、従来の血清型別法による結果と比較検討した。食品由来株については、国産の食品由来株および12か国からの輸入食品由来株を対象として実施した。まず、PCR 反応条件について検討し、既報よりも迅速に、安定した反応が得られるようになった。供試菌株187株の内186株（99.5%）については、従来の血清型と矛盾しない既知の血清群に群別され、日本で分離された *L. monocytogenes* 菌株についても、PCR serogrouping の有用性が確認された。

MMS 10081 株は2010年に国産牛肉から分離された血清型4dの株であるが、未報告の PCR profile を示したため、報告されていない約400bpのバンドの塩基配列の決定、PFGE 解析および MLST 解析を行った。約400bpのバンドの塩基配列の決定により、MMS 10081 株には、PCR serogroup IVb の PCR profile のうち、*orf2110* の増幅フラグメントに201bpの欠損があることが明らかとなった。MMS 10081 株の PFGE パターンを、血清型が4dで PCR serogroup IVb の6株と比較したところ、2009年から2012年の国内分離株5株とは82.1%以上の類似度を示し、全く同じパターンを示す株が2株あった。MMS 10081 株と同一の PFGE パターンを示した2株は、かなり近縁であると考えられる。また、MMS 10081 株の MLST 解析の結果、ST型は ST1 と決定した。ST1 は、通常 Lineage I に属する株に見られる ST型で (48, 60, 63, 75)、Lineage I には血清型4bや4dの PCR

serogroup IVb 株が含まれる。それゆえ、MMS 10081 株は IVb のバリエーションと推察される。2011 年に Leclercq らが PCR serogroup IVb のバリエーション IVb-v1 を報告した際は、1959 年から 2007 年にわたり複数の国で認められた 22 株について解析していた (42)。今回認められた MMS 10081 株は 1 株のみであるが、PCR serogroup IVb のバリエーション IVb -v2 と提唱したい。PCR serogroup IVb-v2 が、日本や世界に広まりつつあるのかについて、今後継続して調査していく必要がある。

既に報告されている PCR serogroup IVb のバリエーション PCR serogroup IVb-v1 (42) は、今回、8 株存在した。7 株はブラジル産鶏肉由来、1 株はオーストラリア産牛肉由来であった。PCR serogroup IVb-v1 に型別される株は、既報 (42) のフランス、ブラジル、スイス、アルジェリアだけでなく、オーストラリア産牛肉にも分布することが明らかになった。PCR profile IVb-v1 は、PCR profile IVb に、PCR profile IIa および IIc に認められる *lmo0737* のバンドが追加されるバンドパターンを示す。PCR serogroup IVb-v1 の株は、PCR serogroup IIa の株の *lmo0733* から *lmo0740* にわたる 6.3 kbp の遺伝子カセットを保有すると報告されている (41)。今回 PCR profile IVb-v1 を示した 8 株のうち 2 株の *lmo0737* 増幅フラグメントの塩基配列を決定したところ、以前の報告 (42) と同一で、PCR profile IIa を示す *L. monocytogenes* EGD-e 株の *lmo0737* とは 4 塩基多形を有していた。また、今回 PCR serogroup IVb-v1 に型別された 8 株の PFGE パターンは、類似のパターンを示したが同一パターンではなかった。この結果は、PCR serogroup IVb-v1 の株が同一クローンではなく、出現してから分化したことを示唆しており、Leclercq らの報告 (42)

にある PCR profile IVb-v1 がごく最近に出現したバリエントではないという説を再確認するものである。

本章の研究で，PCR serogrouping を改良し，更に短時間で明瞭に判定可能とした。改良された PCR serogrouping により，日本で分離された *L. monocytogenes* 菌株が迅速に型別されることを示し，今後の迅速・確実な疫学解析の実現に貢献した。既報のバリエント PCR serogroup IVb-v1 について更なる知見を加えることができ，更に，新たなバリエント PCR serogroup IVb-v2 を提唱した。PCR serogroup IVb-v2 を示す株は，国産牛肉由来株であり，新たな進化の発見の可能性がある。この新しいバリエントを検出した改良 PCR serogrouping により本法の有用性，型別の精度が高められ，その結果，リステリア疫学への貢献が可能となった。

表 21. *Listeria monocytogenes* 菌株の分離年と由来

分離年	由来別検体数			計
	食品	食品製造環境拭取り	ヒト	
1989-2000	37	2	2	41
2001-2004	33	0	5	38
2005-2008	19	1	1	21
2009-2012	70	14	3	87
計	159	17	11	187

表 22. 供試 *Listeria monocytogenes* が分離された食品検体の種類と原産国

原産国	牛肉	豚肉	鳥肉	食肉製品	魚介類		ナチュラルチーズ	その他	計
					魚介類	魚介類加工品			
日本	15	6	23	1	24	6 ^{a)}			75
ブラジル			26						26
オーストラリア	6	1		1					8
アメリカ	6				1				7
タイ			4						4
カナダ	1	1							2
中国		1	1						2
フィリピン			2						2
チリ		1	1						2
メキシコ	2								2
スペイン				1					1
ハンガリー				1					1
フランス			1						1
不明	5	8	7	1			4	1 ^{b)}	26
計	35	18	65	5	25		4	7	159

a) 野菜：4, 生乳：2

b) 鹿肉

表23. 本章で使用したオリゴヌクレオチド

目的	遺伝子	配列 (5'→3')	
PCR serotyping	<i>Imo1118</i>	Forward AGGGTCTTAAATCCTGGAA Reverse CGGCTTGTTCGGCATACTTA Forward AGGGCTTCAAGGACTTACCC Reverse ACGATTTCTGCTTGCCATTC Forward AGTGGACAATTGATTGGTGAA Reverse CATCCATCCCITACTTTGGAC Forward AGCAAAATGCCAAAACACTCGT Reverse CATCACTAAAGCCTCCCATTG Forward GCTGAAAGAGATTGCGAAAAGAA Reverse CAAAGAAACC TTGGATTTGCGG Forward TTACTAGATCAAACTGCTCC Reverse GTGTAATCTTGATGCCATCAGG Forward TTACTAGATCAAACTGCTCC Reverse AAGAAAAGCCCCTCGTCC	
	MLST	<i>abcZo</i>	Forward GTTTTCCCAGTACGACGTTGTATCGCTGCTGCCACTTTTATCCA Reverse TTGTGAGCGGATAACAATTTCTCAAGGTCGCCGTTTAGAG
		<i>bgl4o</i>	Forward GTTTTCCCAGTACGACGTTGTAGCCGACTTTTATGGGTGGAG Reverse TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGATTAATAACGGTCCGGACATA
		<i>cato</i>	Forward GTTTTCCCAGTACGACGTTGTAAATGGCCGCAATTTGATAGAGA Reverse TTGTGAGCGGATAACAATTTICAGATTGACGATTCC TGCTTTTG
		<i>dapEo</i>	Forward GTTTTCCCAGTACGACGTTGTACGACTAATGGGCATGAAGAACAAG Reverse TTGTGAGCGGATAACAATTTICATCGAACTATGGGCATTTTACC
		<i>dato</i>	Forward GTTTTCCCAGTACGACGTTGTAGAAAAGAGAAAGATGCCACAGTTGA Reverse TTGTGAGCGGATAACAATTTCTCGTCCATAATACACCATCTTT
		<i>ldho</i>	Forward GTTTTCCCAGTACGACGTTGTAGTATGATTGACATAGATAAAGA Reverse TTGTGAGCGGATAACAATTTCTATAAATGTCGTTTATACCAT
		<i>lhk4o</i>	Forward GTTTTCCCAGTACGACGTTGTAAAGAAATGCCAACGACGAAACC Reverse TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGGAAACATCAGCAATAAAC
		<i>o^{a)}</i>	Forward GTTTTCCCAGTACGACGTTGTA Reverse TTGTGAGCGGATAACAATTTIC

a) Sequencing primers

表 24. *Listeria monocytogenes* の Multiplex PCR 検出パターンと PCR profile

PCR profile	遺伝子					
	<i>lmo1118</i>	<i>lmo0737</i>	<i>orf2110</i>	<i>orf2819</i>	<i>prs^{a)}</i>	<i>prfA^{b)}</i>
IIa		+			+	+
IIb				+	+	+
IIc	+	+			+	+
IVb			+	+	+	+
IVb-vI		+	+	+	+	+

a) *Listeria* spp. 保有

b) *L. monocytogenes* 保有

表 25. *Listeria monocytogenes* の PCR serogroup と血清型

PCR serogroup	菌株数				血清型			
	1/2a	3a	1/2b	3b	1/2c	4ab	4b or 4e	4d
IIa	52	45 ^{b)}	7					
IIb	27		25	2				
IIc	36				36 ^{c)}			
IVb	63			1		57		5
IVb-v1	8					8 ^{d)}		
報告されていないノンパターン ^{a)}	1							1 ^{e)}
計	187	45	7	25	2	36	1	65

a) PCR profile : IVb with $\Delta orf2110$

b) PCR profile が IIc で *flaA*(+)により IIa に補正された 1 株を含む

c) PCR profile が IIa で *flaA*(-)により IIc に補正された 1 株を含む

d) 7 株 : ブラジル産鶏肉由来 (1998-2007), 1 株 : オーストラリア産牛肉由来 (2012)

e) MMS10081, 国産牛肉由来 (2010)

表 26. PFGE 解析を実施した *Listeria monocytogenes* 株

菌株名	PCR serogroup	serotype	分離年	由来	原産国, 分離国
MMS 10081	未報告	4d	2010	牛肉	日本
MMS 09059	IVb	4d	2009	食品製造環境拭取り	日本
MMS 09166	IVb	4d	2009	食品製造環境拭取り	日本
MMS 09228	IVb	4d	2009	豚肉	日本
MMS 11160	IVb	4d		Dr. J. C. feeley (CDC) 分与株	
MMS 12049	IVb	4d	2012	食肉製品	日本
MMS 12267	IVb	4d	2012	食品製造環境拭取り	日本
MMS 98003	IVb-v1	4b or 4e	1998	鶏肉	ブラジル
MMS 99107	IVb-v1	4b or 4e	1999	鶏肉	ブラジル
MMS 07081	IVb-v1	4b or 4e	2007	鶏肉	ブラジル
MMS 99118	IVb-v1	4b or 4e	1999	鶏肉	ブラジル
MMS 99145	IVb-v1	4b or 4e	1999	鶏肉	ブラジル
MMS 99146	IVb-v1	4b or 4e	1999	鶏肉	ブラジル
MMS 07092	IVb-v1	4b or 4e	2007	鶏肉	ブラジル
MMS 12001	IVb-v1	4b or 4e	2012	牛肉	オーストラリア
MMS 12159	IVb	4b or 4e	2012	鶏肉	ブラジル
MMS 12176	IVb	4b or 4e	2012	牛肉	オーストラリア
MMS 99487	IVb	4b or 4e	1999	牛肉	オーストラリア
MMS 12037	IVb	4b or 4e	2012	鶏肉	日本

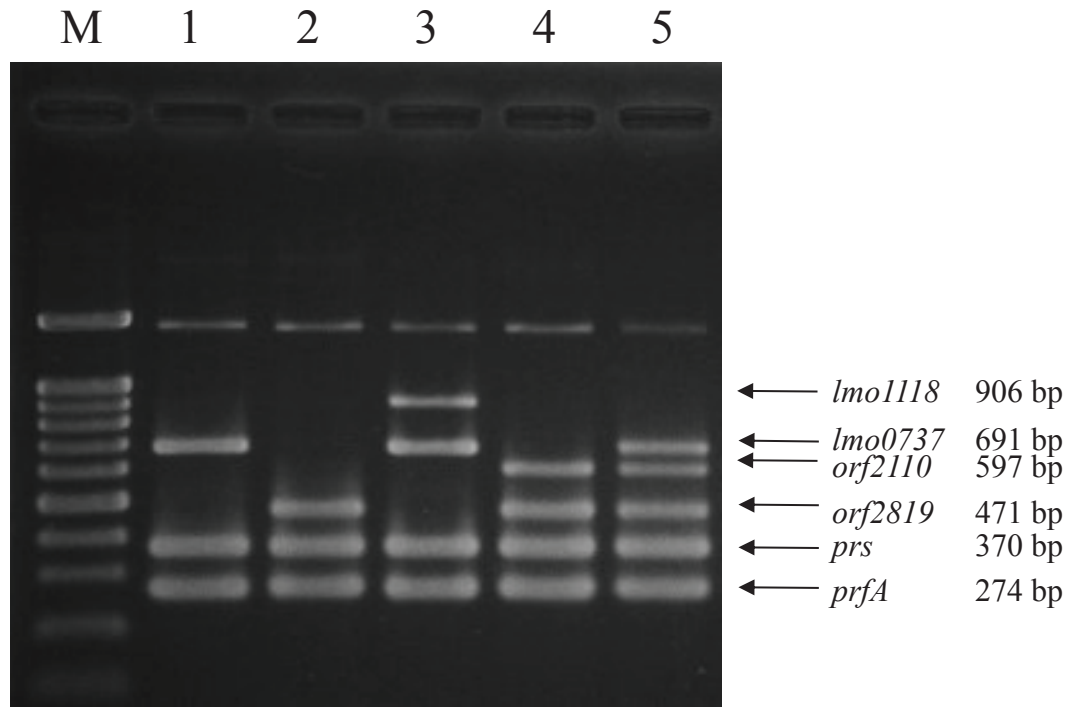


図4A. *Listeria monocytogenes*を型別するMultiplex PCR profilingの検出パターン

M: 100bp ladder (100-1000, 1500 bp)

Lane 1: PCR profile IIa

Lane 2: PCR profile IIb

Lane 3: PCR profile IIc

Lane 4: PCR profile IVb

Lane 5: PCR profile IVb-v1

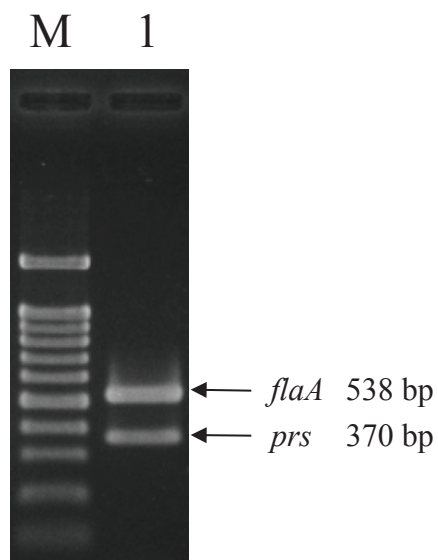


図4B. *Listeria monocytogenes* *flaA*を対象とした追加のPCR

M: 100bp ladder (100-1000, 1500 bp)

Lane 1: *flaA*遺伝子保有株；血清型1/2aまたは3a

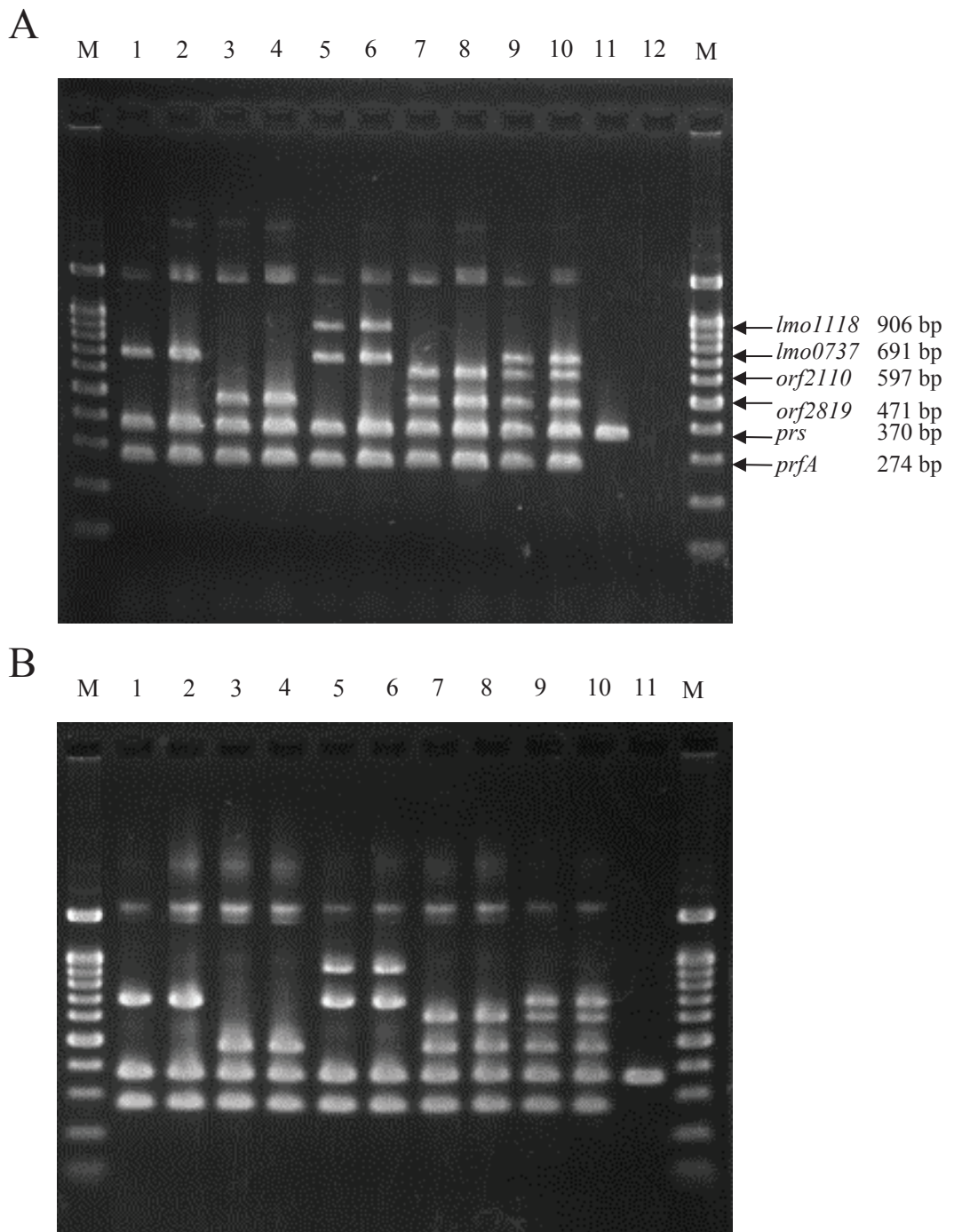


図5. *Listeria monocytogenes*を型別するmultiplex PCR profilingの条件検討結果

A: 採用した条件, B: 既報の条件
 M: 100 bp ladder (100-1000, 1500 bp)
 Lane 1, 2: PCR profile IIa
 Lane 3, 4: PCR profile IIb
 Lane 5, 6: PCR profile IIc
 Lane 7, 8: PCR profile IVb
 Lane 9, 10: PCR profile IVb-v1
 Lane 11: *L. innocua*
 Lane 12: Negative control

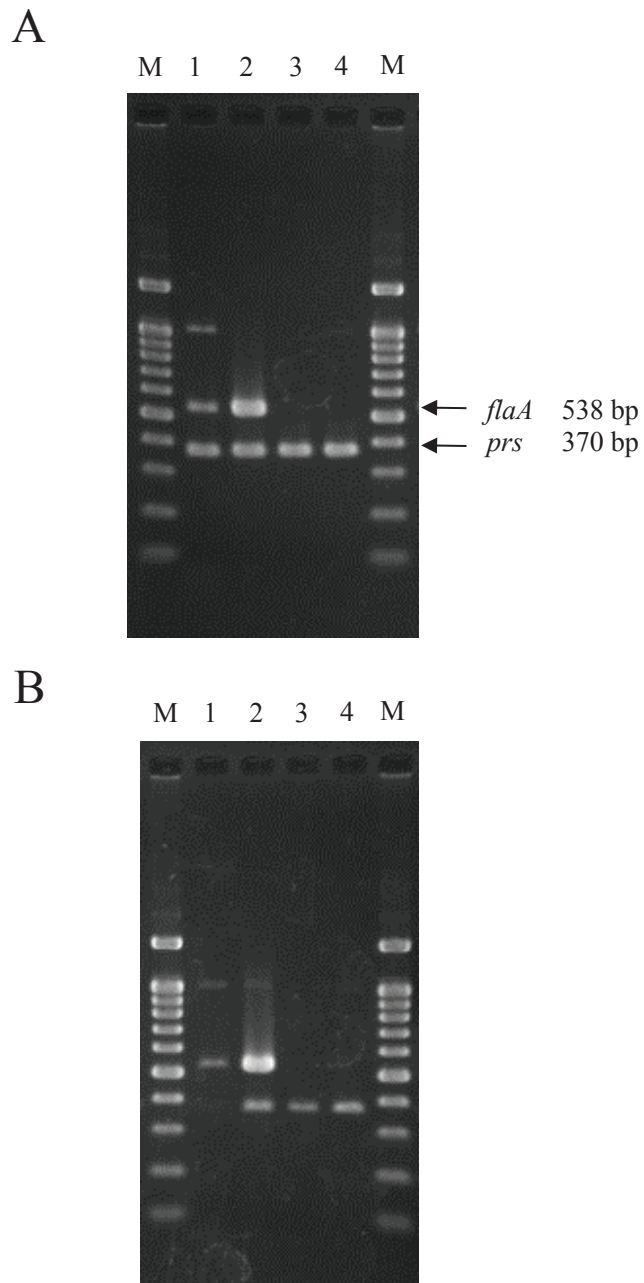


図6. *Listeria monocytogenes flA*を検出するPCR条件検討結果

A: 採用した条件, B: 既報の条件
M: 100 bp ladder (100-1000, 1500 bp)
Lane 1, 2: PCR serogroup IIa
Lane 3, 4: PCR serogroup IIc

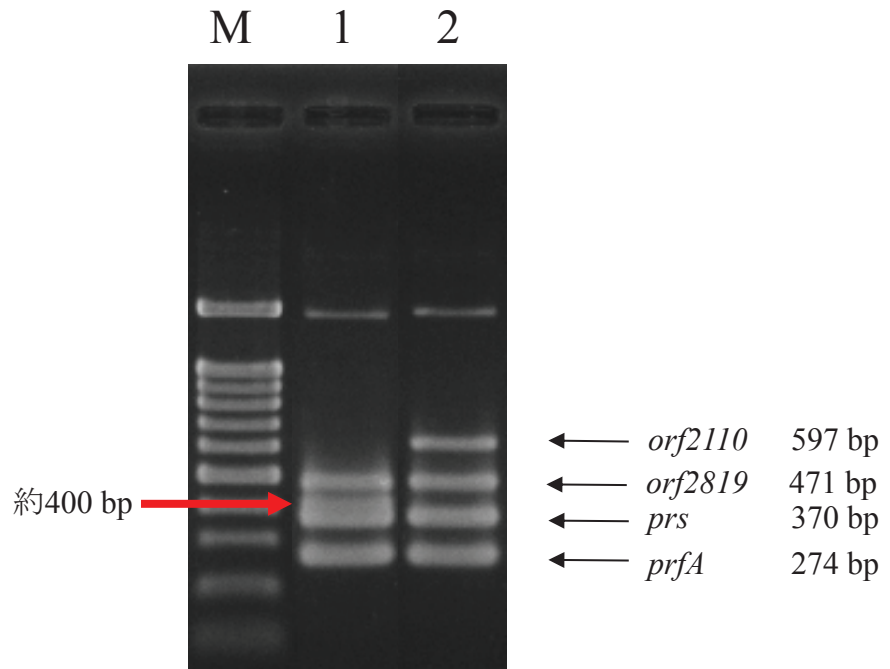


図7A. *Listeria monocytogenes*を型別するPCR profile IVbとMMS10081株の検出パターン

M: 100 bp ladder (100-1000, 1500 bp)

Lane 1: MMS10081株

Lane 2: PCR profile IVb

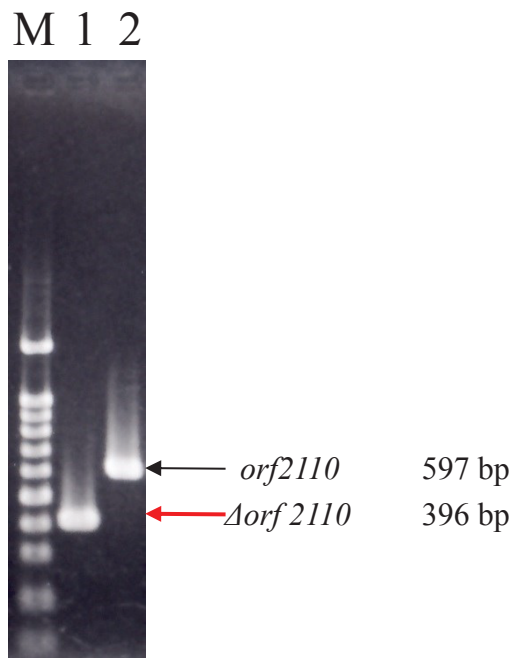


図7B. *Listeria monocytogenes orf2110*PCR

M: 100 bp ladder (100-1000, 1500 bp)

Lane 1: MMS10081株

Lane 2: PCR profile IVb

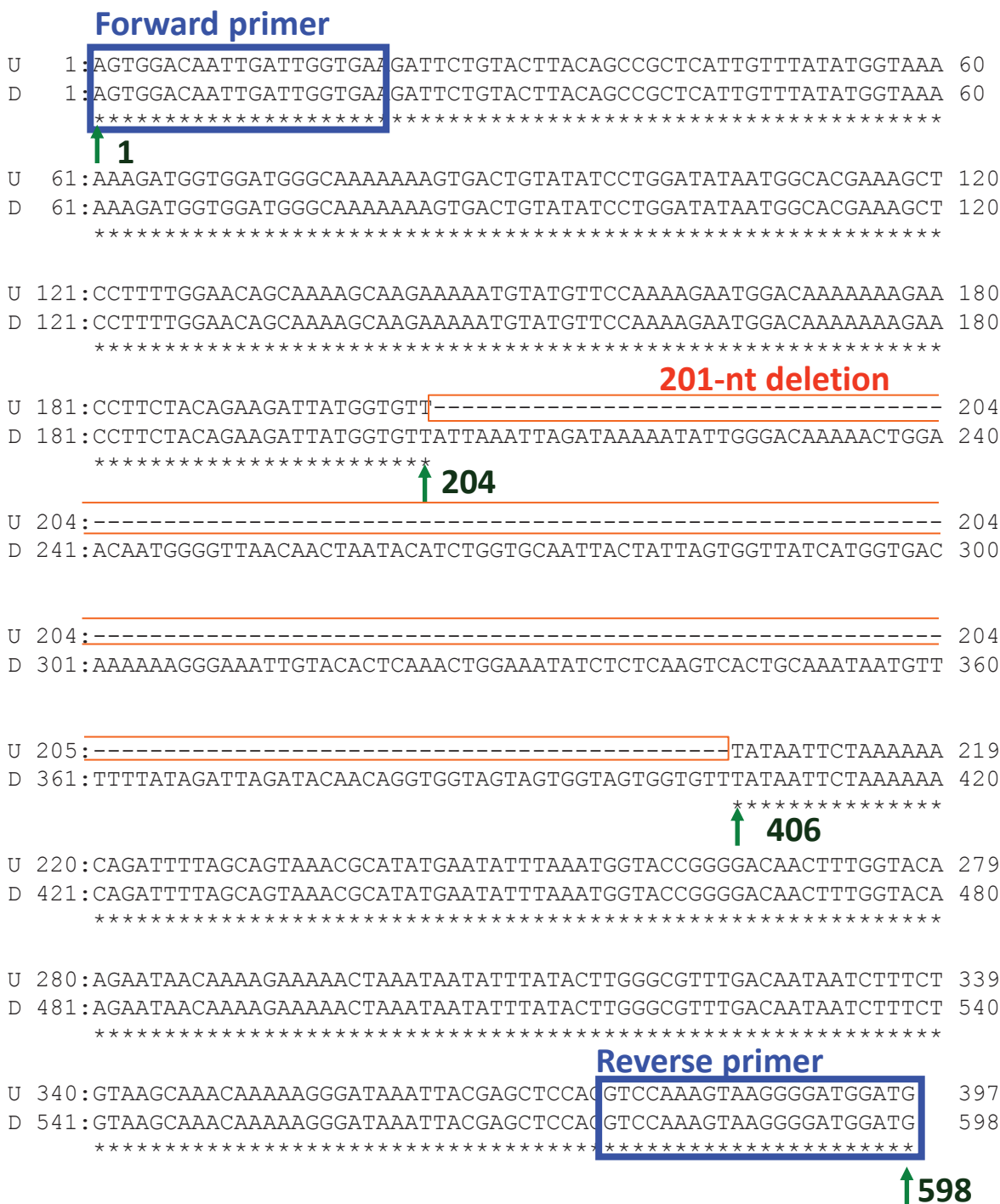


図8. *Listeria monocytogenes orf2110* PCR増幅産物の塩基配列

U : MMS10081株

D : MMS 11160株

(Dr. J. C. Feeley (CDC) より分与された血清型4d, PCR serogroup IVb株)

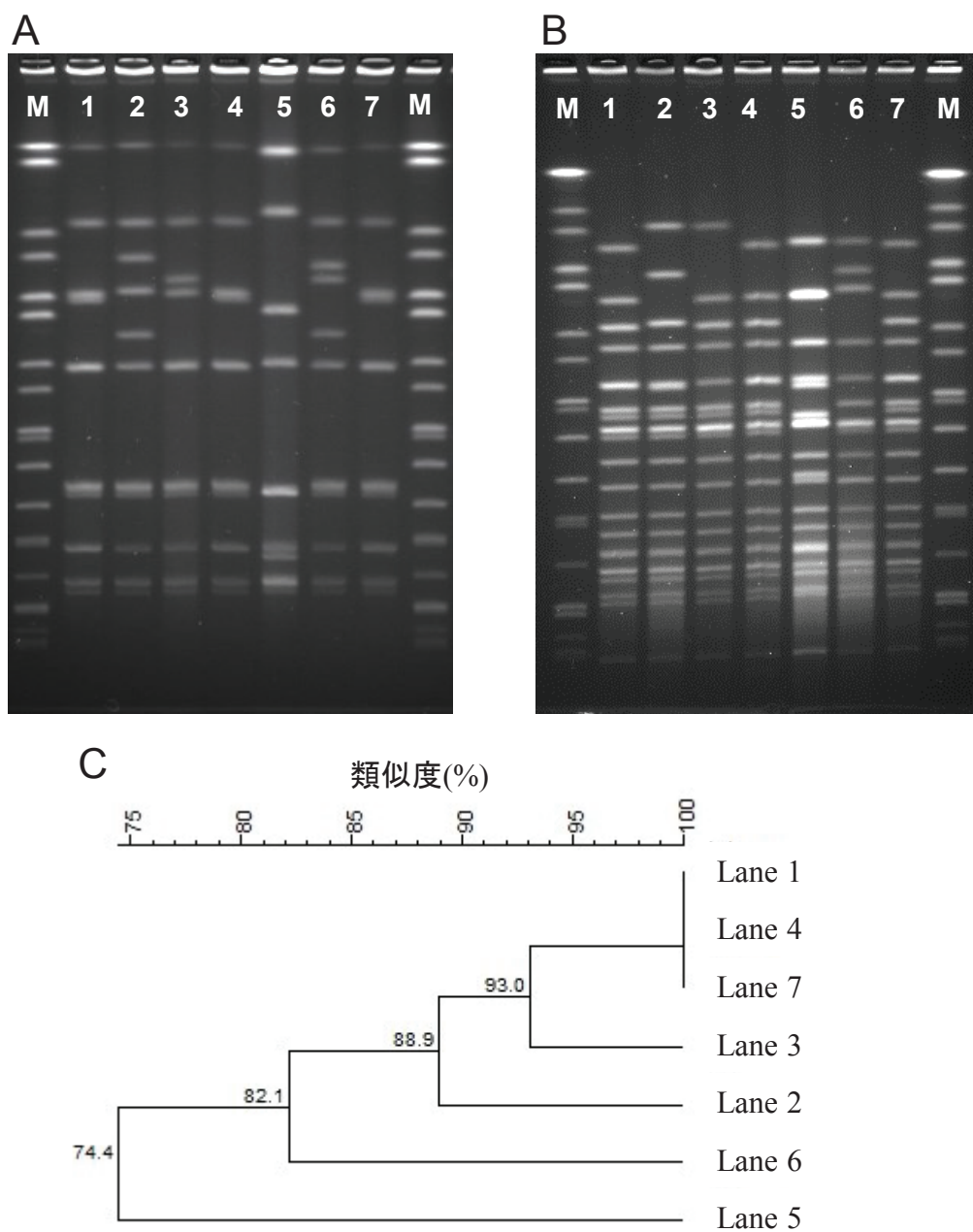


図9. *Listeria monocytogenes*血清型4d株のPFGE解析

A: 制限酵素*AscI*による切断パターン

B: 制限酵素*ApaI*による切断パターン

C: デンドログラム

Lane M: *Salmonella* Braunderup H9812 制限酵素*XbaI*で消化

lane 1: MMS 10081, PCR serogroup 未報告

lane 2: MMS 09059, PCR serogroup IVb

lane 3: MMS 09166, PCR serogroup IVb

lane 4: MMS 09228, PCR serogroup IVb

lane 5: MMS 11160, PCR serogroup IVb

lane 6: MMS 12049, PCR serogroup IVb

lane 7: MMS 12267, PCR serogroup IVb

Forward primer

```

V1 1 AGGGCTTCAAGGACTTACCTCGAAGATTTGAAAAACGCGTGAACATCCCTTTAGGAATTTATCTTGGTTGTCCAGGTG 80
V2 1 AGGGCTTCAAGGACTTACCTCGAAGATTTGAAAAACGCGTGAACATCCCTTTAGGAATTTATCTTGGTTGTCCAGGTG 80
V3 1 -----TCGAAGATTTGAAAAACGCGTGAACATCCCTTTAGGAATTTATCTTGGTTGTCCAGGTG 60
A1 1 AGGGCTTCAAGGACTTACCTCGAAGATTTGAAAAACGCGTGAACATCCCTTTAGGAATTTATCTTGGTTGTCCAGGTG 80
*****

V1 81:AAAATAAGACTTCAGAAAACATTATTTATGATGCGGCAGGAATGTTAGCTACCGATGAACATTTATTAAGAGCAAAGAA 160
V2 81:AAAATAAGACTTCAGAAAACATTATTTATGATGCGGCAGGAATGTTAGCTACCGATGAACATTTATTAAGAGCAAAGAA 160
V3 81:AAAATAAGACTTCAGAAAACATTATTTATGATGCGGCAGGAATGTTAGCTACCGATGAACATTTATTAAGAGCAAAGAA 140
A1 81:AAAATAAGACTTCAGAAAACATTATTTATGATGCGGCAGGAATGTTAGCTACCGATGAACATTTATTAAGAGCAAAGAA 160
*****

V1 161:ATTGGCGCAGATTTTATTGTTTTAGGTGGAATCCTGGTTCAGGAACTTCTATTCAAGATATCATTGAAACAACAAAAG 240
V2 161:ATTGGCGCAGATTTTATTGTTTTAGGTGGAATCCTGGTTCAGGAACTTCTATTCAAGATATCATTGAAACAACAAAAG 240
V3 161:ATTGGCGCAGATTTTATTGTTTTAGGTGGAATCCTGGTTCAGGAACTTCTATTCAAGATATCATTGAAACAACAAAAG 220
A1 161:ATTGGCGCAGATTTTATTGTTTTAGGTGGAATCCTGGTTCAGGAACTTCTATTCAAGATATCATTGAAACAACAAAAG 240
*****

V1 241:AGCACGGAAGTTGCTAGGTACGATGCTCTTAATTTTCGCTGGTAAATGGGAAGATGGTATTGATGAGAAAGTGTGGGCG 320
V2 241:AGCACGGAAGTTGCTAGGTACGATGCTCTTAATTTTCGCTGGTAAATGGGAAGATGGTATTGATGAGAAAGTGTGGGCG 320
V3 241:AGCACGGAAGTTGCTAGGTACGATGCTCTTAATTTTCGCTGGTAAATGGGAAGATGGTATTGATGAGAAAGTGTGGGCG 300
A1 241:AGCACGGAAGTTGCTAGGTACGATGCTCTTAATTTTCGCTGGTAAATGGGAAGATGGTATTGATGAGAAAGTGTGGGCG 320
*****

V1 321:ATCCACTTGCTAAACAAGATGCAAAAAGAAGTGATTAAGCAATTGATTGATGCAGGCGCGGATGTGATTGATTTACCTGCT 400
V2 321:ATCCACTTGCTAAACAAGATGCAAAAAGAAGTGATTAAGCAATTGATTGATGCAGGCGCGGATGTGATTGATTTACCTGCT 400
V3 321:ATCCACTTGCTAAACAAGATGCAAAAAGAAGTGATTAAGCAATTGATTGATGCAGGCGCGGATGTGATTGATTTACCTGCT 380
A1 321:ATCCACTTGCTAAACAAGATGCAAAAAGAAGTGATTAAGCAATTGATTGATGCAGGCGCGGATGTGATTGATTTACCTGCT 400
*****

V1 401:CCAGGATCAAGACACGGTATAAGTGTGCGTATGATTCAAGAGTTAGTGCAGTTTATTCATTTATACAAATCAGGTACACT 480
V2 401:CCAGGATCAAGACACGGTATAAGTGTGCGTATGATTCAAGAGTTAGTGCAGTTTATTCATTTATACAAATCAGGTACACT 480
V3 401:CCAGGATCAAGACACGGTATAAGTGTGCGTATGATTCAAGAGTTAGTGCAGTTTATTCATTTATACAAATCAGGTACACT 460
A1 401:CCAGGATCAAGACACGGTATAAGTGTGCGTATGATTCAAGAGTTAGTGCAGTTTATTCATTTATACAAATCAGGTACACT 480
*****

V1 481:CGCAATGACATTCTTAAATAGTTCAGTTGAAGGGGCGGATCAAGATACAATTCGTTTGATTGCATTGATGATGAAAGAAA 560
V2 481:CGCAATGACATTCTTAAATAGTTCAGTTGAAGGGGCGGATCAAGATACAATTCGTTTGATTGCATTGATGATGAAAGAAA 560
V3 481:CGCAATGACATTCTTAAATAGTTCAGTTGAAGGGGCGGATCAAGATACAATTCGTTTGATTGCATTGATGATGAAAGAAA 540
A1 481:CGCAATGACATTCTTAAATAGTTCAGTTGAAGGGGCGGATCAAGATACAATTCGTTTGATTGCATTGATGATGAAAGAAA 560
*****

V1 561:CCGGTGCCGATATTCACGCGATTGGTGATGGTGGTTTTCTGGCTGTACGACACCGGAAAAATGTTATGCAATTATCTATT 640
V2 561:CCGGTGCCGATATTCACGCGATTGGTGATGGTGGTTTTCTGGCTGTACGACACCGGAAAAATGTTATGCAATTATCTATT 640
V3 561:CCGGTGCCGATATTCACGCGATTGGTGATGGTGGTTTTCTGGCTGTACGACACCGGAAAAATGTTATGCAATTATCTATT 620
A1 561:CCGGTGCCGATATTCACGCGATTGGTGATGGTGGTTTTCTGGCTGTACGACACCGGAAAAATGTTATGCAATTATCTATT 640
*****

Reverse primer
V1 641:TCACTTAAAGGAAAACCTTATACGTACTTTTGAATGGCAAGCAGAAATCGT 691
V2 641:TCACTTAAAGGAAAACCTTATACGTACTTTTGAATGGCAAGCAGAAATCGT 691
V3 641:TCACTTAAAGGAAAACCTTATACGTACTTTA----- 651
A1 641:TCACTTAAAGGAAAACCTTATACGTACTTTTGAATGGCAAGCAGAAATCGT 691
*****

```

図10. *Listeria monocytogenes* Imo0737 PCR増幅産物の塩基配列

V1 : MMS 99107株

V2 : MMS 12001株

V3 : CLIP 2007/01070 株 (GenBank accession no. HQ123583)

A1 : EGD-e株 (GenBank accession no. NC_003210)

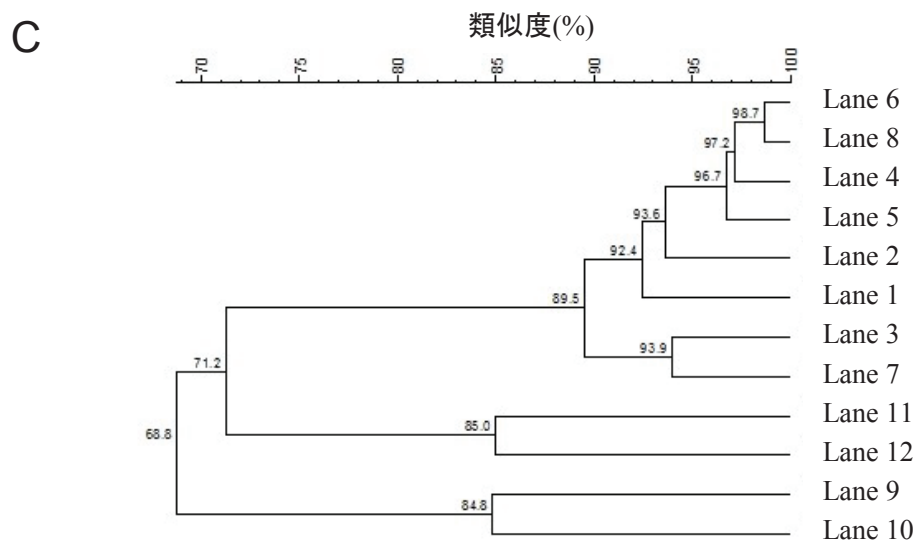
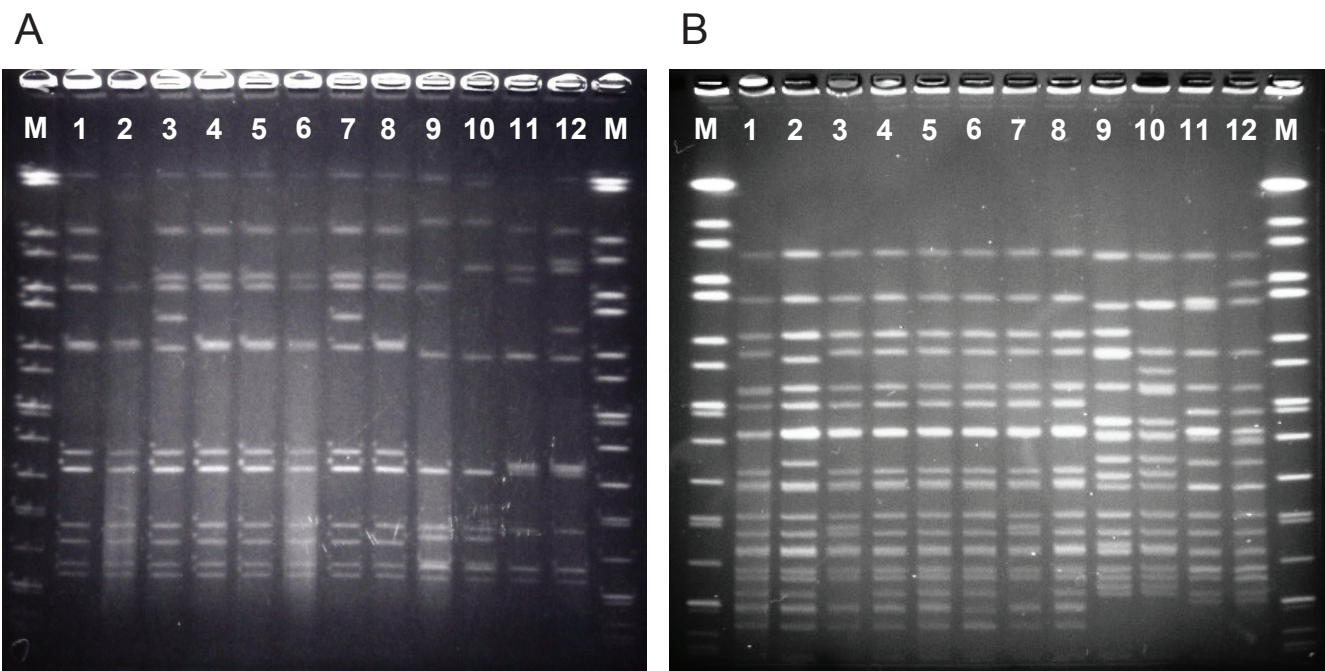


図11. *Listeria monocytogenes* PCR serogroup IVb-v1およびIVbのPFGE解析

A : 制限酵素*AscI*による切断パターン

B : 制限酵素*ApaI*による切断パターン

C : デンドログラム

Lane M : *Salmonella* Braunderup H9812 制限酵素*XbaI*で消化

lane 1 : MMS 98003, PCR serogroup IVb-v1

lane 2 : MMS 99107, PCR serogroup IVb-v1

lane 3 : MMS 07081, PCR serogroup IVb-v1

lane 4 : MMS 99118, PCR serogroup IVb-v1

lane 5 : MMS 99145, PCR serogroup IVb-v1

lane 6 : MMS 99146, PCR serogroup IVb-v1

lane 7 : MMS 07092, PCR serogroup IVb-v1

lane 8 : MMS 12001, PCR serogroup IVb-v1

lane 9 : MMS 12159, PCR serogroup IVb

lane 10 : MMS 12176, PCR serogroup IVb

lane 11 : MMS 99487, PCR serogroup IVb

lane 12 : MMS 12037, PCR serogroup IVb

総括

リステリア症の主な原因は *L. monocytogenes* に汚染された食品の喫食で、その多くは RTE 食品であると考えられている。RTE 食品における *L. monocytogenes* の規制は国によって異なり、EU はコーデックス基準に準じて増殖が起りうる RTE 食品、起りえない RTE 食品等に分けて、それぞれ 25 g 中不検出、100 CFU/g と規格を定めている。一方米国は、食品 25 g から *L. monocytogenes* が検出された場合には流通販売が禁止される「ゼロトレランス」をとっている。わが国では、ナチュラルチーズと非加熱食肉製品については、1993 年以来 25 g 中に *L. monocytogenes* が検出された場合は輸入や流通が制限されてきたが、内閣府食品安全委員会のリスク評価を経て、2014 年に厚生労働省により成分規格が制定された。この成分規格では、ソフト、セミソフトタイプのナチュラルチーズと非加熱食肉製品については *L. monocytogenes* が 1 g につき 100 CFU 以下であることとされた。しかし、その他の食品については現在も成分規格は設定されていない。年間 200 名程度のリステリア症患者が発生している *L. monocytogenes* による健康危害を防ぎ、食の安全、安心を守るためには、流通している食品の *L. monocytogenes* 汚染率および汚染菌量を把握することは極めて重要である。また、リステリア症患者、食品および食品製造環境から分離された株の型別を行い、疫学解析を行っていくことは、汚染の拡大を防ぎ、集団発生を未然に防ぐために不可欠である。

本研究では、第一章で都内周辺に流通する食品の *L. monocytogenes* 汚染状況を明らかにした。

第一節では、2000年から2012年に東京都内に流通した RTE 食品の *L. monocytogenes* の検出状況、汚染菌量、分離菌株の血清型を明らかにし、汚染実態を解析した。*L. monocytogenes* は、ナチュラルチーズ等乳製品 626 検体中 2 検体 (0.3%)、生食用食肉・食肉製品・食肉調理品 1491 検体中 26 検体 (1.7%)、魚介類・魚介類加工品 718 検体中 21 検体 (2.9%)、野菜の漬物 145 検体中 3 検体 (2.1%) から検出された。その汚染菌量は最大でも 2.3 MPN/g と少量で、危害性は非常に低いと推察された。しかしながら、今回 *L. monocytogenes* が検出された食品の中には、コーデックス委員会により増殖が起こりえるとされる pH と Aw の食品が存在した。増殖が起こりえる食品では、少量の菌数であっても、食品中で *L. monocytogenes* が増殖し、食中毒を誘発する可能性を示唆する。これを防ぐには、*L. monocytogenes* を食品中で増殖させないことおよび食品を *L. monocytogenes* により汚染させないことが重要である。

分離された株の血清型は 1/2a (47.6%) が最も多く、ついで 1/2b (20.6%)、4b (14.3%)、1/2c (11.1%) であり、ヒトから検出される株とは傾向が異なるが、同じ血清型の菌株も分離されることが明らかになった。

本節では、都内で市販される RTE 食品は、菌量は少ないものの、*L. monocytogenes* に汚染されている場合のあることを明らかにした。

第二節では、食中毒菌の汚染率が高いとされる牛内臓肉の *L. monocytogenes* の検出状況、分離菌株の血清型を調べた。併せて他の食中毒菌、汚染指標菌として糞便系大腸菌群の汚染実態も調べた。それらの成績に基づき、*L. monocytogenes* の汚染実態を明らかにした。*L. monocytogenes* は、104 検体中 22 検体 (21.2%) から検出され

た。血清型は 1/2a が 39.1%， 1/2c が 60.9%であった。リステリア症患者から最も多く分離される血清型 4b は検出されなかったが，3 番目に多い血清型である 1/2a が検出された。糞便系大腸菌群陰性検体であっても，*L. monocytogenes* が 2 検体，VTEC が 1 検体，*C. jejuni* が 2 検体，*C. coli* が 1 検体から検出され，汚染指標菌が陰性であっても，*L. monocytogenes* や食中毒菌が検出される場合のあることが示唆された。食品の *L. monocytogenes* の危害性を知るには，衛生指標菌だけではなく，*L. monocytogenes* を直接的に検出・定量することが必要であると考えられた。

本節により，牛内臓肉は *L. monocytogenes* に高率に汚染されていることおよび *L. monocytogenes* を含む複数の食中毒菌に同時に汚染されている場合があることを報告した。

第二章では，国内での食品からの *L. monocytogenes* 検出法が旧 IDF 準拠の平成 5 年通知法から，ISO 法準拠の平成 26 年通知法に変わったことから，平成 5 年通知法と ISO 法により *L. monocytogenes* の検出を比較検討した。その結果，従来法および ISO 法による定性試験法では，魚介乾製品において ISO 法の 2 段階増菌が有効である可能性が考えられたものの，大きな違いは認められなかった。このことから，通知法の変更で検出率に大きな差は生じないと想定されることを明らかにした。従って，これまで日本で行われた *L. monocytogenes* に関する汚染調査成績にみられる陽性率や菌数の正確さは担保されており，過去の *L. monocytogenes* に関する疫学情報の利用の正当性が確認されることとなる。

第三章では，分子生物学的血清型別法として新たに開発された PCR serogrouping に関して，さらに迅速性を高めるために既報から

条件を改良し，プライマー濃度，反応条件，使用試薬を決定した。その条件で1989年から2012年に日本で分離された *L. monocytogenes* 菌株を対象に PCR serogrouping を行い，従来の血清型別法による結果と比較検討した。その結果，供試菌株187株中186株は，従来の血清型と矛盾を生じない既知の血清群に群別された。MMS10081株（2010年に国産牛から分離された血清型4d株）は，未報告のPCR profileを示したため，解析を行った。その結果，PCR serogroup IVbのPCR profileのうち，*orf2110*のバンドに201bpの欠損があること，PFGEパターンが，血清型4d，PCR serogroup IVb 2株と同じパターンを示したこと，MLSTがST1であったことから，その株はPCR serogroup IVbのバリエントと推察された。本研究で改良したPCR serogrouping法により発見したこのバリエントを，PCR serogroup IVbのバリエントIVb-v2と提唱する。

本章では，簡易・迅速で再現性のある有用な疫学解析ツールであるPCR serogroupingの有用性および型別の精度を更に高めることができた。

以上，本研究により都内流通食品の *L. monocytogenes* 汚染実態の一端を明らかにするとともに，型別法の一つとして，新たな手法である Multiplex PCR を応用した PCR serogrouping の有用性を示した。

本研究により得られた知見は，リステリア症および *L. monocytogenes* の疫学解析に貢献するだけでなく，食品の製造，輸送，販売の各現場や保健所などの行政機関および消費者に対しての注意喚起，清浄化および汚染拡大の防止の目的において，有益な情報を提供するものであると結論した。

謝辞

本研究にあたり，終始有益なご助言ならびにご指導を賜りました主指導教官である東京農工大学農学部共同獣医学科藤川浩教授に深甚なる謝意を表します。また本稿作成にあたり，有益なご助言とご高閲を賜りました岩手大学農学部共同獣医学科鎌田洋一教授，帯広畜産大学動物・食品検査診断センターの小川晴子教授，東京農工大学農学部共同獣医学科竹原一明教授，岐阜大学応用生物科学部獣医学課程石黒直隆教授に深謝いたします。

論文の作成にあたり有益なご助言を賜りました，国立医薬品食品衛生研究所の岡田由美子博士に深く感謝の意を表します。

本研究の実施ならびに本稿作成にあたりご助言を賜りました東京都健康安全研究センター微生物部の仲真晶子博士，甲斐明美博士，貞升健志博士，平井昭彦博士，鈴木康規博士，鈴木淳博士，宗村佳子博士に心から感謝いたします。

本研究の実施および解析にあたり多くのご助言およびご協力をいただきました，東京都健康安全研究センター微生物部の井田美樹主事，西野由香里主事，福井理恵主事，黒田寿美代主事，神門幸大主事，猪股光司博士をはじめ，同食品微生物研究科の皆様心から感謝いたします。

最後に，見守り支えてくれた家族，友人に心からの謝意を記します。

引用文献

- 1) Asakura, H., Saito, E., Momose, Y., Ekawa, T., Sawada, M., Yamamoto, A., Hasegawa, A., Iwahori, J., Tsutsui, T., Osaka, K., Matsushita, T., Kakinuma, M., Motoyama, K., Hayama, Y., Kitamoto, H., Igimi, S., Kasuga, F. (2012). Prevalence and growth kinetics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine offal products in Japan. *Epidemiol. Infect.* 140, 655-664.
- 2) Borucki, M. K. and Call, D. R. (2003). *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5537-5540.
- 3) Centers for Disease Control and Prevention. *Listeria* (Listeriosis). Surveillance. <http://www.cdc.gov/listeria/surveillance.html> (accessed 2015-08-07).
- 4) Codex Alimentarius Commission CAC/GL 61 (2007). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Codex, Rome, Italy.
- 5) Codex Alimentarius Commission CAC/GL 61 (2009). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Annex2. Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Codex, Rome, Italy.
- 6) Cornu, M., Kalmokoff, M. and Flandrois, J. P. (2002). Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *Int. J. Food Microbiol.* 73, 261-274.
- 7) Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. and Martin, P.

- (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3819-3822.
- 8) Eld, K., Danielsson-Tham, M. L., Gunnarsson, A., Tham, W. (1993). Comparison of a cold enrichment method and the IDF method for isolation of *Listeria monocytogenes* from animal autopsy material. *Vet. Microbiol.* 36, 185-189.
 - 9) EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Listeria*. <http://www.bacterio.cict.fr/> (Last update: February 4, 2016).
 - 10)FAO/WHO (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. Microbiological risk assessment series 4.
 - 11)FAO/WHO (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. Microbiological risk assessment series 5.
 - 12)FDA/USDA/CDC (2003). Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods, Appendix 7.
 - 13)Food Safety and Inspection Service (2012). Controlling *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready to eat meat and poultry products, FSIS Compliance guideline. United States Department of Agriculture, Washington, D.C., USA.
 - 14)Food Safety and Inspection Service (2013). Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples. MLG 8.09. Effective: 05/01/2013. United States Department of Agriculture, Washington, D.C., USA.

- 15) Gnanou Besse, N., Audinet, N., Kérouanton A., Colin, P. and Kalmokoff, M. (2005). Evolution of *Listeria* populations in food samples undergoing enrichment culturing. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 123-134.
- 16) Graves, L. M. and Swaminathan, B. (2001). PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 55-62.
- 17) Halpin, J. L., Garrett, N. M., Ribot, E. M., Graves, L. M. and Cooper, K. L. (2010). Re-evaluation, optimization, and multilaboratory validation of the PulseNet-standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 293-298.
- 18) 飯田孝, 神崎政子, 小久保禰太郎, 丸山務 (1994). Palcam 培地に発育する真菌の抑制及び培養温度の検討. *東京衛研年報* 45, 7-10.
- 19) 飯島義雄, 坂本裕美子, 綿引正則, 大西貴弘, 五十君静信 (2014). 事例に学ぶ細菌学. *日本細菌学雑誌* 69, 349-355.
- 20) International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1996). *Listeria monocytogenes*, *Microorganisms in foods 5. Characteristics of microbial pathogens*, pp. 141-182. Blackie Academic & Professional, London.
- 21) International Dairy Federation, IDF Standard 143: 1990. (1990). IDF, Brussels, Belgium.
- 22) International Organization for Standardization, ISO 11290-1. (1996/

- Amendment1:2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Part 1: Detection method. ISO, Geneva, Switzerland.
- 23) International Organization for Standardization, ISO 11290-2. (1998/ Amendment1:2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Part 2: Enumeration method. ISO, Geneva, Switzerland.
- 24) Isobe, J., Shima, T., Kanatani, J., Kimata, K., Shimizu, M., Kobayashi, N., Tanaka, T., Iyoda, S., Ohnishi, M., Sata, T. and Watahiki, M. (2014). Serodiagnosis using microagglutination assay during the food-poisoning outbreak in Japan caused by consumption of raw beef contaminated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 and O157. J. Clin. Microbiol. 52, 1112-1118.
- 25) Kanki, M., Naruse, H., Taguchi, M., Kumeda, Y. (2015). Characterization of specific alleles in *InlA* and *PrfA* of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Osaka, Japan and their ability to invade Caco-2 cells. Int. J. Food Microbiol. 211, 18-22.
- 26) Kérouanton, A., Marault, M., Petit, L., Grout, J., Dao, T.T. and Brisabois, A. (2010). Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. J. Microbiol. Methods 80, 134-137.
- 27) 北瀬照代, 石井 眞次 (2005). 市販の牛内臓肉の腸管出血性大腸菌 O157 汚染状況について. 大阪市立環境科学研究所報告 67,

15-19.

- 28) 小林一寛, 勢戸和子, 八柳潤, 斉藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹川俊彦, 倉本早苗, 藤沢倫彦, 鈴木理恵子, 山崎貢, 林賢一, 松根渉, 安岡富久, 堀川和美, 村上光一, 河野喜美子, 山田亨, 伊藤健一郎 (2002). 下痢原性大腸菌における付着因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察. 感染症誌 76, 911-920.
- 29) Kornacki, J. L. and Gurtler, J. (2007). Incidence and control of *Listeria* in food processing facilities. In: Ryser, E. T. and Marth, E. H. [eds] *Listeria, listeriosis and food safety*, 3rd ed., pp. 681-766. CRC Press, Boca Raton.
- 30) 厚生労働省(2011). 食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件. 平成 23 年 9 月 12 日, 厚生労働省告示第 321 号.
- 31) 厚生労働省(2012). 食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件. 平成 24 年 6 月 25 日, 厚生労働省告示第 404 号.
- 32) 厚生労働省 (2014). 食品、添加物等の規格基準の一部を改正する件. 平成 26 年 12 月 25 日, 厚生労働省告示第 496 号.
- 33) 厚生労働省 (2014). 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令. 平成 26 年 12 月 25 日, 厚生労働省令第 142 号.
- 34) 厚生労働省 : 食中毒統計資料 .
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoushokuhin/syokuchu/04.html (2015 年 8 月 11 日現在)
- 35) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長 (2014). リステリア・モノサイトゲネスの検査について. 平成 26 年 11 月 28 日, 食安発 1128 第 2 号.

- 36)厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長（2012）. 腸管出血性大腸菌O26、O111及びO157の検査法について. 平成24年12月17日, 食安監発1217第1号.
- 37)厚生省生活衛生局長（1998）. 生食用食肉等の安全性確保について. 平成10年9月11日, 生食発第1358号.
- 38)厚生省生活衛生局乳肉衛生課長（1993）. 乳及び乳製品のリスクリアの汚染防止等について. 平成5年8月2日, 衛乳第169号.
- 39)厚生省生活衛生局乳肉衛生課長（1998）. 生食用食肉等の安全性確保について. 平成10年9月11日, 衛乳第221号.
- 40)Kuan, C. H., Wong, W. C., Pui, C. F., Mahyudin, N. A., Tang, J. Y., Nishibuchi, M. and Radu, S. (2014). Prevalence and quantification of *Listeria monocytogenes* in beef offal at retail level in Selangor, Malaysia. *Braz. J. Microbiol.* 44, 1169-1172.
- 41)Laksanalamai, P., Steyert, S. R., Burall, L. S. and Datta, A. R. (2013). Genome sequences of *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains isolated from clinical and environmental sources. *Genome Announc.* 17, e00771-13.
- 42)Leclercq, A., Chenal-Francisque, V., Dieye, H., Cantinelli, T., Drali, R., Brisse, S. and Lecuit, M. (2011). Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. *Int. J. Food Microbiol.* 14, 74-77.
- 43)Linton, D., Lawson, A. J., Owen, R. J. and Stanley, J. (1997). PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2658-2572.

- 44) Little, C. L., Richardson, J. F., Owen, R. J., de Pinna, E. and Threlfall, E. J. (2008). *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003-2005. *Food Microbiol.* 25, 538-543.
- 45) MacDonald, F. and Sutherland, A.D. (1994). Important differences between the generation times of *Listeria monocytogenes* and *List. innocua* in two *Listeria* enrichment broths. *J. Dairy Res.* 61, 433-436.
- 46) Makino S.-I., Kawamoto K., Takeshi K., Okada Y., Yamasaki M., Yamamoto S. and Igimi S. (2005). An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 189–196.
- 47) Maklon, K., Minami, A., Kusumoto, A., Takeshi, K., Thi Bich Thuy, N., Makino, S. and Kawamoto K. (2010). Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from commercial asazuke (Japanese light pickles). *Int. J. Food Microbiol.* 139, 134–139.
- 48) Martín, B., Perich, A., Gómez, D., Yangüela, J., Rodríguez, A., Garriga, M. and Aymerich, T. (2014). Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiol.* 44, 119-127.
- 49) Maruzumi, M., Morita, M., Matsuoka, Y., Uekawa, A., Nakamura, T. and Fuji, K. (2005). Mass food poisoning caused by beef offal contaminated by *Escherichia coli* O157. *Jpn. J. Infect. Dis.* 58, 397.
- 50) McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J. and Jewell, K.

- (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 15-33.
- 51)McLauchlin, J. (2006). *Listeria*. Emerging foodborne pathogens, pp. 406-428. Woodhead publishing limited, Cambridge.
- 52)Miya, S., Takahashi, H., Ishikawa, T., Fujii, T. and Kimura, B. (2010). Risk of *Listeria monocytogenes* contamination of raw ready-to-eat seafood products available at retail outlets in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3383–3386.
- 53)内閣府食品安全委員会 (2013). 食品健康影響評価の結果の通知について. 平成 25 年 5 月 20 日, 府食第 393 号, <http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20120116331>.
- 54)仲真晶子 (2004). リステリア. 厚生労働省監修, 食品衛生検査指針, 微生物編, pp. 249-265. 日本食品衛生協会, 東京.
- 55)仲真晶子 (2006). 食品の *Listeria monocytogenes* 汚染実態. 日食微誌 23, 183-189.
- 56)仲真晶子 (2009). A 細菌感染症, 11 *Listeria monocytogenes*. In : 食品由来感染症と食品微生物, pp. 401-421. 中央法規出版, 東京.
- 57)Nielsen, E. M. and Andersen, M. T. (2003). Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2884-2893.
- 58)Orsi, R. H., den Bakker, H. C. and Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and

- phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 79-96.
- 59) Oravcová, K., Trncíková, T., Kuchta, T. and Kaclíková, E. (2008). Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. *J. Appl. Microbiol.* 104, 429-437.
- 60) Parisi, A., Latorre, L., Normanno, G., Miccolupo, A., Fraccalvieri, R., Lorusso, V. and Santagada, G. (2010). Amplified Fragment Length Polymorphism and Multi-Locus Sequence Typing for high-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. *Food Microbiol.* 27, 101-108.
- 61) Pontello, M., Guaita, A., Sala, G., Cipolla, M., Gattuso, A., Sonnessa, M. and Gianfranceschi, M. V. (2012). *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010). *Ann. Ist. Super Sanita.* 48, 146-150.
- 62) Potel, J. (1953). Aetiologie der granulomatosis infantisepticum. *Wiss Z der martin Luther Univ HalleWittenberg* 3, 341-349.
- 63) Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le, M.A. and Brisse, S. (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathog.* 4, e1000146.
- 64) Roche, S. M., Grépinet, O., Kérouanton, A., Ragon, M., Leclercq, A., Témoign, S., Schaeffer, B., Skorski, G., Mereghetti, L., Monnier, A. L. and Velge, P. (2012). Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent *Listeria monocytogenes* isolates. *BMC Microbiol.* 12, 304.
- 65) Seeliger, H. P. and Höhne, K. (1979). Serotyping of *Listeria*

- monocytogenes* and related species. In: Bergan, T. and Norris, J. R. [eds] *Methods in Microbiology*, 13, pp. 31-49. Academic Press, New York.
- 66) 下島優香子, 井田美樹, 樋口容子, 金子誠二, 横山敬子, 高橋正樹, 仲真晶子, 甲斐明美 (2010). 食肉中のカンピロバクター検出法の検討. 東京健康安全研究センター年報 61, 901-906.
- 67) Snyder, O. P. Jr. (1995). HACCP-based safety and quality assured pasteurized-chilled food systems. pp. 20-24. Hospitality Institute of Technology and Management, St. Paul, MN, USA.
- 68) 食品からの微生物標準試験法検討委員会. リステリア・モノサイトゲネス標準試験法(定性法). <http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/pdf/protocol/NIHSJ-08-ST4%20201412.pdf>.
- 69) Takahashi, H., Kuramoto, S., Miya, S., Koiso, H., Kuda, T. and Kimura, B. (2011). Use of commercially available antimicrobial compounds for prevention of *Listeria monocytogenes* growth in ready-to-eat minced tuna and salmon roe during shelf life. *J. Food Prot.* 74, 994-998.
- 70) 竹重都子, 飯田孝, 高木裕, 栗原重成, 小川純一, 天正孝, 丸山務 (1995). と畜場における枝肉の *Listeria monocytogenes* 汚染要因. 日獣会誌 48, 131-135.
- 71) Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731-2739.

- 72)塚本定三，山崎伸二，牧野壮一（2003）．ヒトおよび動物由来の志賀毒素産生性大腸菌の *eae*（Intimin 型）および *saa* 遺伝子保有状況．日食微誌 20, 191-195.
- 73)Tyler, S. D., Johnson, W. M., Lior, H., Wang, G. and Rozee, K. R. (1991). Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 29, 1339-1343.
- 74)Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. and Whitman, W. [Eds] (2009) . Bergey's manual of systematic bacteriology, second edition. vol. 3, pp. 244-257. Springer, Berlin.
- 75)Wang, Y., Zhao, A., Zhu, R., Lan, R., Jin, D., Cui, Z., Wang, Y., Li, Z., Wang, Y., Xu, J. and Ye, C. (2012). Genetic diversity and molecular typing of *Listeria monocytogenes* in China. BMC Microbiol. 12, 119.
- 76)Winters, D. K. and Slavik, M. F. (1995). Evaluation of a PCR based assay for specific detection of *Campylobacter jejuni* in chicken washes. Mol. Cell. Probes 9, 307-310.
- 77)柳楽真佐実，八幡裕一郎，齊藤剛仁，加納和彦，山岸拓也，砂川富正，多田有希，大石和徳（2013）．腸管出血性大腸菌 O157 の発生動向の変化－2011 年以降の生肉・生レバー規制強化の影響について．病原微生物検出情報（IASR）34, pp. 129-130. 国立感染症研究所 感染症情報センター．
- 78)山根一和，鈴木里和，柴山恵吾（2012）．厚生労働省院内感染対

策サーベイランス検査部門データを用いた本邦におけるリステリア症罹患率の推定. 病原微生物検出情報 (IASR) 33, pp. 247-248. 国立感染症研究所 感染症情報センター.

- 79) Yamasaki, S., Lin, Z., Shirai, H., Terai, A., Oku, Y., Ito, H., Ohmura, M., Karasawa, T., Tsukamoto, T., Kurazono, H. and Takeda, Y. (1996). Typing of verotoxins by DNA colony hybridization with poly- and oligonucleotide probes, a bead-enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 40, 345-352.
- 80) Yokoyama, E., Maruyama, S. and Katsube, Y. (1998). Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 133-137.