

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380115

研究課題名(和文)日本のリステリア症原因食品の分子疫学的探査と危害防除および発症機構に関する研究

研究課題名(英文)Molecular epidemiological analysis of *Listeria monocytogenes* isolated from Japanese ready-to-eat food and study on its controlling method and pathogenic mechanism.

研究代表者

木村 凡 (Bon, Kimura)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：50262340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：日本の水産物に分布が確認されているリステリア菌について、そのリスクを調査し、制御法を確立することを目的に研究を行なった。リステリア菌は、免疫不全者等に対し高い致死性を示すため、食品業界を中心に注意が払われている。日本においては、加工度の高いネギトロやイクラといった水産加工品に分布が確認されているものの、それらの病原性や水産物における増殖性について、知見がほとんど存在しなかった。

本研究では、日本の臨床株と水産物等から分離された菌株との遺伝的差異をゲノム解析で確認し、両菌株間には遺伝的な差異はほとんどないことを明らかにした。また、増殖抑制法についても研究を進め、フェルラ酸による制御法を確立した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the potential risks associated with *Listeria* found in seafood and sought to establish a method of control. *Listeria* has received a great deal of attention in the food product sector, because they can prove highly fatal for people with compromised immunity and other vulnerable groups. In Japan, although they have been found in highly processed seafood such as minced tuna and salmon roe, very little is known about their pathogenicity and proliferation in seafood. In this study, we confirmed the genetic differences between Japanese clinical *Listeria* strains and strains previously isolated from seafood using genome analysis. As a result, we discovered almost no genetic difference between the strains found in seafood and the clinical strains. We also pursued research into methods of controlling in seafood products and discovered a *Listeria* control effect on the part of ferulic acid. In addition, we obtained information relating to its synergistic effect with other agents.

研究分野：食品微生物

キーワード：食品微生物 リステリア菌 ゲノム解析 増殖抑制

1. 研究開始当初の背景

Listeria monocytogenes は、家畜の腸管や環境に生息し、幅広い温度帯において増殖が可能な人畜共通の感染症の原因菌である。本菌による食中毒は、健康な人が発症しても風邪症状（発熱、下痢）しか呈さないため、見過ごされる場合が多いが、免疫弱者である妊婦や老人が摂取した場合、流産、死亡など重篤な結果をひき起こす。全米では毎年、2500人が感染し（全症例の約40%が妊娠に関係）、500人以上の死者を出している。これらの免疫弱者が汚染食品を食べてから重篤な症状を発症するまでに最高で70日もかかるため、食中毒として認知されにくく、本食中毒件数は米国でも大幅に過小評価されている可能性が高い。

日本では、本菌による食中毒事例はこれまでに1件のみであるため、漠然と「日本ではリステリア食中毒はほとんど起きない」と考えられてきた。しかし、近年の病院における臨床患者調査により、リステリア症は、毎年83件（0.65件/100万人）発生しており、その感染者は1歳未満と高齢者に多く、死亡者は70歳以上（致死率20%）であることが判明した。

日本のリステリア症の問題点は、発生原因食品が不明である点である。欧米では、非加熱で喫食する ready to eat（ナチュラルチーズやソーセージなど）がその原因の大半であるが、日本で流通するこれら食品でのリステリア汚染率は低い。一方、我々の調査では、魚介類加工品を中心とした ready-to-eat 食品（明太子、イクラ、ネギトロ）などに、本菌が高率で分布しているという実態を明らかにした。

実態調査に加え、我々は水産物より分離されるリステリア菌について詳細に解析を進め、これまでに、分離株のバイオフィルム形成能の解析、株識別法の開発（Multilocus Single Strand Conformation Polymorphism、Multilocus Variable-number of Tandem Repeat）、水産物における増殖予測プログラムの開発を行いその動態を明らかにした。また、水産分離株のほとんどが野生型の Internalin A タンパク質（腸管上皮細胞侵入に不可欠な病原タンパク）を保有し、通常レベルの腸管上皮細胞への侵入性を有することを明らかにするなど、その感染性についての知見も蓄積してきた。

しかしながら、水産分離株と日本での臨床分離株の関連性については知見がなく、関連性がわかっていないこと、増殖特性は明らかとなったものの、その制御法は確立されていないこと、病原性の発現についてはその詳細が不明であること、が問題であった。

2. 研究の目的

上記記載の背景より、本研究では以下3点について研究を遂行した。

1) 水産分離株と日本での臨床分離株の分子疫学解析

日本のリステリア症患者からの臨床株と水産食品から分離されるリステリア菌株との分子疫学的な解析を行い、両者の関係を明らかとするとともに、海外における臨床菌株とも比較を行い、その実態を明らかにする。

2) 増殖制御法の開発

リステリア菌は低温増殖性があるため、通常の冷蔵温度帯でその増殖を制御することはできない。実際、水産加工品にリステリア菌を接種し挙動を確認したところ、緩やかではあるが、増殖が確認されている。本研究では、各種日持ち向上剤等の中から効果的な薬剤を選択し、増殖の抑制に効果的な方法を確立する。

3) リステリアの腸内環境定着や病原性発現性と食品成分の関係解明

リステリアの病原性の第一ステップとして本菌の腸内での定着（増殖）が重要である。これまでの研究において、食品中の特定の成分が、食中毒菌の腸管定着を阻害することが報告されている。本研究では、日本型食品に含まれる成分の中に、リステリアの腸管付着を妨げるものがあるか探索し、その成分による影響について解析を行う。

3. 研究の方法

1) 水産分離株と日本での臨床分離株の分子疫学解析

日本において水産食品等より分離された95株の分離菌と日本の臨床株42株を2つのDNA typing法で比較した。比較には、Multilocus tandem-repeat sequence analysis (MLTSA) と Multi-virulence-locus sequence typing (MVLST)を用いた。MLTSAには *prfA*, *inlB*, *inlC*, *dal*, *lisR*, *clpP*, 6領域を用い、MVLSTには3領域を使用した。2つのタイピングによって区別された菌株に対し、アレルを振り、それぞれの方法、両者の組み合わせによるデータについて、検証を行った。

また、一連の解析の中で、タイピングにより海外の臨床分離株と同一のプロファイルを示した菌株については、次世代シーケンサーにて全ゲノムのドラフトシーケンスを決定し、その差異について詳細に検証した。

2) 増殖制御法の開発

我々はこれまでの研究において、既存添加物の一つであり、抗酸化剤として用いられているフェルラ酸（米ぬか抽出成分）が、リステリアを含めて数種の食中毒菌の増殖制御作用があるという現象を見出した。本研究では、水産食品へフェルラ酸を添加し、リステリア菌の増殖を抑制する最適条件を決定した。

また、ほかの抗菌剤においては、しばしば

使用継続により抗菌剤に対し耐性を獲得することが問題となっているが、フェルラ酸について耐性を獲得することがあるのか検証を行った。

3) リステリアの腸内環境定着や病原性発現性と食品成分の関係解明

これまでの研究において、一部の食品成分が食中毒菌の腸管付着を妨げることが知られている。日本におけるリステリア菌による食中毒の発生頻度と摂食している食品との関連性を調査するため、リステリア菌の腸管付着を妨げる成分が、わが国独自の食事に含まれているのか探索を行い、その成分による影響について解析を行った。具体的には A/J マウスへリステリア菌を経口投与し、食餌成分により腸管細胞への付着がどう変化するのかを観察し、マウス側の炎症マーカーについても解析を行った。

4. 研究成果

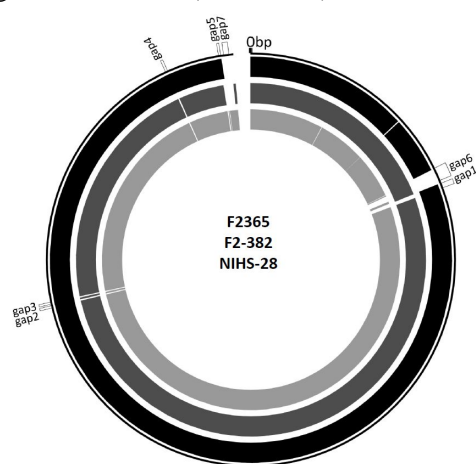
1) 水産分離株と日本での病床分離株の分子疫学解析

日本において水産食品等より分離された分離菌と日本の臨床株の比較の結果、日本の臨床株は遺伝的に多様性があることが判明し、日本のリステリア症は散発的に発生していることが示唆された。いくつかの臨床株は MVLST で同一のプロファイルを示しており、遺伝的に近似している可能性も示唆された(論文)。

上記タイピング手法にて同一のプロファイルを示した海外臨床株と日本の臨床株については、全ゲノムレベルでの比較を行った。

その結果、タイピング結果では同一とみなされた2菌株はゲノムレベルではクローンではないことが明らかとなったが、ゲノム構造は極めて近似しており(Fig.1)、このことから、日本における臨床分離株は海外のそれとほぼ同様の性状、挙動を示す可能性が示唆され、日本において分離される菌株に特段の特異な傾向はないことも明らかとなった(論文)。

Fig.1 海外臨床株(F2-365 株)と日本臨床株



(NIHS-28)のゲノム構造の比較

2) 増殖制御法の開発

本研究では、水産加工品に混入したリステリア菌の増殖をフェルラ酸によって抑制できることを見出した(Fig. 2,3)。

また、ほかの日持ち向上剤との併用により、その効果を高めることが可能であるということも明らかにした(論文)。

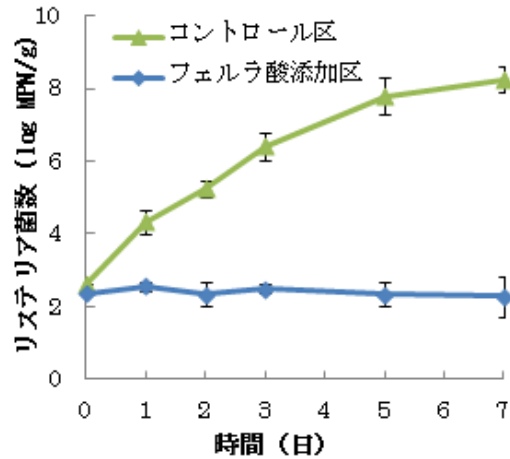


Fig.2 フェルラ酸を添加したネギトロを10で保存した際のリステリア菌の増殖

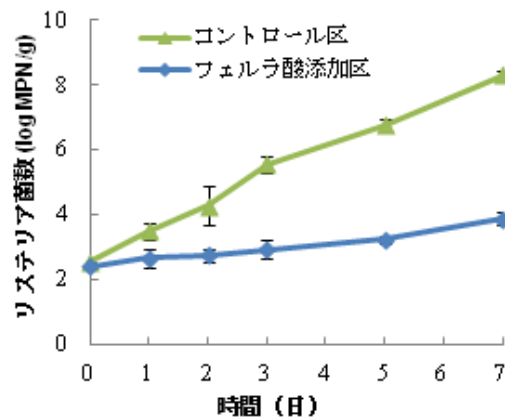


Fig.3 フェルラ酸を添加したイクラを10で保存した際のリステリア菌の増殖

また、フェルラ酸とリステリア菌に対し増殖抑制効果があることがわかっているナイシンについて、低濃度で暴露つづけた時の耐性獲得を検証したところ、低濃度のナイシンに暴露した菌株においては、次に高濃度のナイシンに暴露した際、強い抵抗性を示すのに対し、フェルラ酸に暴露した際にはそのような現象を示さないことを明らかにした(論文)。

新規抗菌剤の研究は数多くなされているものの、実用上、添加物としての認可はきわめて困難な状況のなかで、既存添加物として既に使用されている抗酸化剤であるフェルラ酸が食中毒細菌の増殖抑制効果をもつこと自体の意味は極めて大きい。今後、国際的に広く食品の微生物制御分野にブレイクス

ルーが期待できる。

3) リステリアの腸内環境定着や病原性発現性と食品成分の関係解明

A/J マウスに対し、ミルクタンパクを含む食餌と大豆タンパクを含む食餌を与えた群を用意し、これらにリステリア菌を経口的に投与したところ、臓器から回収されたリステリア菌数は大豆タンパクを与えた群で低い傾向が認められた。また、脾臓において発現している炎症性マーカーである TNF- α は、大豆タンパク投与群で有意に低いことが明らかとなり、食餌成分とリステリア菌の感染には関連があることが明らかとなった(Fig.4)。

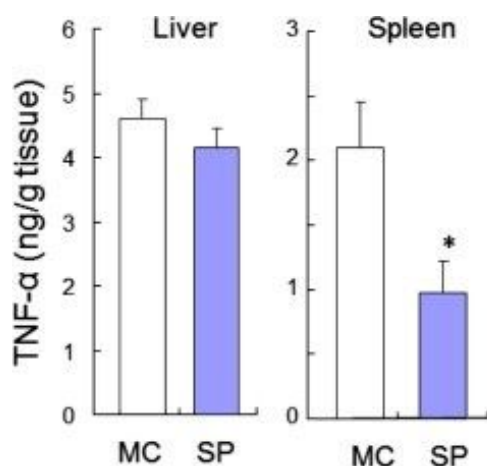


Fig.4 ミルクタンパクと大豆タンパクを投与した A/J マウスにリステリア菌を感染させた際の TNF- α の変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Hajime Takahashi, Tomomi Takahashi, Satoko Miya, Haruka Yokoyama, Takashi Kuda, Bon Kimura.

Growth Inhibition Effects of Ferulic Acid and Glycine/Sodium Acetate on *Listeria monocytogenes* in Coleslaw and Egg Salad
Food Control (2015), 57: 105–109. (査読有り)

Satoko Miya, Hajime Takahashi, Miku Nakagawa, Takashi Kuda, Shizunobu Igimi, Bon Kimura.

Genetic Characteristics of Japanese Clinical *Listeria monocytogenes* Isolates
PLoS ONE (2015)10(3):e122902. (査読有り)

Daisuke Kyoui, Hajime Takahashi, Satoko Miya, Takashi Kuda, Shizunobu Igimi and Bon Kimura.

Genetic distance in the whole-genome perspective on *Listeria monocytogenes* strains F2-382 and NIHS-28 that show similar subtyping results.

BMC Microbiology (2014), 14:309. (査読有り)

Daisuke Kyoui, Hajime Takahashi, Satoko Miya, Takashi Kuda and Bon Kimura.

Comparison of the major virulence-related genes of *Listeria monocytogenes* in Internalin A truncated strain 36-25-1 and a clinical wild-type strain.

BMC Microbiology (2014), 14:15. (査読有り)

Chihiro Ohshima, Hajime Takahashi, Chirapiphat Phraephaisarn, Mongkol Vesaratchavest, Suwimon Keeratipibul, Takashi Kuda, Bon Kimura.

Establishment of a Simple and Rapid Identification Method for *Listeria* spp. by Using High-Resolution Melting Analysis, and Its Application in Food Industry.

PLoS ONE (2014), 9(6); e99223. (査読有り)

Hajime Takahashi, Kaoru Takada, Tomoki Tsuchiya, Satoko Miya, Takashi Kuda, Bon Kimura.

Listeria monocytogenes develops no resistance to ferulic acid after exposure to low concentrations.

Food Control (2014), 47; 560–563. (査読有り)

Hajime Takahashi, Chihiro Ohshima, Miku Nakagawa, Krittaporn Thanatsang, Chirapiphat Phraephaisarn, Yuphakhun Chaturongkasumrit, Suwimon Keeratipibul, Takashi Kuda, Bon Kimura.

Development of new multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) for *Listeria innocua* and its application in a food processing plant.

PLoS ONE (2014)9(9):e105803. (査読有り)

Hajime Takahashi, Marina Kashimura, Hiroaki Koiso, Takashi Kuda, Bon Kimura.

Use of Ferulic Acid as a Novel Candidate of Growth Inhibiting Agent against *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat food.

Food Control (2013), 33; 244–248. (査読有り)

Satoko Miya, Hajime Takahashi, Chikako Kamimura, Miku Nakagawa, Takashi Kuda, Bon Kimura.

Highly discriminatory typing method for

Listeria monocytogenes using polymorphic tandem repeat regions.
Journal of Microbiological Methods (2012), 90; 285–291. (査読有り)

Takashi Kuda, Shinsuke Nakamura, Choa An, Hajime Takahashi, Bon Kimura
Effect of soy and milk protein-related compounds on *Listeria monocytogenes* infection in human enterocyte Caco-2 cells and A/J mice
Food Chemistry (2012), 134; 1719–1723. (査読有り)

〔学会発表〕(計6件)

日持ち向上剤を用いたサラダにおける *Listeria monocytogenes* の増殖抑制
高橋友美, 高橋肇, 横山遥, 久田孝, 木村凡
第 108 回日本食品衛生学会学術講演会 (2014.12.3-6, 金沢)

MLVA - HRM を用いた *Listeria innocua* の汚染源追跡法の開発
岩川愛, 高橋肇, 大島千尋, 中川未久, Chirapiphat Phraephaisarn, Krittaporn Thanatsang, Yuphakhun Chaturongkasumrit, Suwimon Keeratipibul, 久田孝, 木村凡
第 108 回日本食品衛生学会学術講演会 (2014.12.3-6, 金沢)

フェルラ酸および日持ち向上剤を用いた水産食品におけるリステリア菌の増殖制御法
河原 俊雄, 高田 薫, 高橋 肇, 久田 孝, 木村 凡, 小磯 博昭, 佐藤 博昭, 矢木 浩之
平成 24 年度日本水産学会秋季大会 (2012.9.14-17, 下関)

Establishment of a simple and rapid identification method for *Listeria* spp. by using high-resolution melting analysis, and its application in food industry
Chihiro Ohshima, Hajime Takahashi, Chirapiphat Phraephaisarn, Mongkol Vesaratchavest, Suwimon Keeratipibul, Takashi Kuda, Bon Kimura
Food Micro2014 (2014.9.1-4, Nantes, France)

リステリア菌の MLVA 法に用いる VNTR 領域の安定性について
河原 俊雄, 高橋 肇, 久田 孝, 木村 凡
第 34 回日本食品微生物学会学術総会 (2013.10.3-4, 東京)

VNTR 法を用いたリステリア属菌の汚染源追跡法の開発
中川 未久, 高橋 肇, Yuphakhun

Chaturongkasumrit, Suwimon Keeratipibul, 久田 孝, 木村 凡
第 104 回日本食品衛生学会学術講演会 (2012.9.20-22, 岡山)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

木村 凡

(東京海洋大学 海洋科学技術研究科 教授)

研究者番号：40262340

(2)研究分担者

高橋 肇

(東京海洋大学 海洋科学技術研究科 助教)

研究者番号：40413116