

機関番号：12614

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380121

研究課題名（和文） 水産食品汚染リステリア・モノサイトゲネスのリスクの全容解明とその制御に関する研究

研究課題名（英文） Study of the risk and control of *Listeria monocytogenes* contaminating raw ready-to-eat seafood products available at retail outlets in Japan.

研究代表者

木村 凡（KIMURA BON）

東京海洋大学 海洋科学部・教授

研究者番号：50262340

研究成果の概要（和文）：

日本の非加熱喫水産食品から分離されるリステリア (*Listeria monocytogenes*) のリスクの解明を目的として、病原遺伝子の保有状況、マウス試験による病原性試験 (LD50、脾臓・肝臓への侵入性試験)、細胞培養での腸管上皮細胞への侵入や伝播性試験、ならびに食品での詳細な増殖実験等を行った。これらの実験により、日本の非加熱喫水産食品におけるリステリアによる危害リスクは否定できないと結論した。

研究成果の概要（英文）：

To gain basic knowledge on the risk of *L. monocytogenes* contamination in raw ready-to-eat seafood products available at retail outlets in Japan, detailed investigation of the virulence genes of strains, *in vivo* bioassays using a mouse model (LD50, recovery of *L. monocytogenes* from livers and spleens), the growth of this pathogen in these seafood products, were conducted. The data raise the concern that raw RTE seafood products available at retail outlets in Japan are at risk for food-borne listeriosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究代表者の専門分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：*Listeria monocytogenes*、食中毒、病原性、水産食品、ネギトロ

1. 研究開始当初の背景

食中毒菌リステリア・モノサイトゲネス（以下 *L. monocytogenes*）に国内で感染し、髄膜炎や敗血症などの重い症状に陥る人が、高齢者を中心に推計で年間数十人に上る。欧米ではナチュラルチーズなどを介した *L. monocytogenes* による集団食中毒が頻発しているが、日本では、まだ調査事例が少なく、リステリア症と食品との関連についての十

分な評価がなされていなかった。本食中毒の特徴として、健康人が本菌に汚染された食品を摂食しても、発症するまでに数日を要すること、発症しても風邪症状（発熱、下痢）しか呈さないことなどから、本食中毒の発生件数は米国 CDC でも大幅に過小評価されている可能性が高いとされている。一方、これら汚染食品を免疫弱者である妊婦や老人が摂食した場合、流産（妊婦）、死亡（老人）など

重篤な結果を起こし、毎年、500人以上の死者を出している。日本では、本菌は現時点では病院（食中毒、妊婦検診）での病原菌検査リストに入っていないため、本症の発生が大幅に過小評価見されている可能性がある。

最近、明太子、イクラなど非加熱で食べる水産食品の一部が、*L. monocytogenes* により汚染されている実態が報告され、申請者らの研究でも、特にネギトロ等でこれまでに食中毒患者から分離された血清型と同様の血清型（1/2a, 1/2b, 4b など）の本菌の汚染があることが確認されている。多くの水産食品を非加熱で食べている日本のような生食文化圏での本菌の汚染率は極めて重大な問題となるが、これらの食品については、現段階では、明確な行政判断は下されていない。その理由として、これらの食品での本菌汚染の詳細な実態、分離される *L. monocytogenes* 株の病原性や増殖性等、リスク評価データが現段階では欠如していることがあげられる。これらの食品から分離される本菌の汚染は、日本の食の安全上、きわめて重大な問題である。

現在、生食で日常的に摂食される日本の非加熱喫食水産食品から多数検出される *L. monocytogenes* 菌株の病原性や遺伝性状については世界的に重大な関心を持たれている。また、わが国内閣府食品安全委員会も水産食品での汚染を重大視し、申請者らは、これら食品の本菌リスク解明への研究費支援（食品健康影響評価技術研究平成 18～20 年度）を受け、これまでに、水産食品での本菌汚染の網羅的汚染実態の解明（菌株分離）、分離菌株の血清型、一部病原遺伝子の保有・欠損状況等を明らかにした。また、別途科研費基盤研究(C)の支援を受け、パルスフィールド電気泳動型別、リボパターン等の本菌の基本遺伝性状を明らかにするとともに、本菌の簡易鑑別法を開発した。

しかし、本科研費基盤研究(B)申請段階では、なお、わが国水産食品で広範に汚染の認められる *L. monocytogenes* 菌株と欧米での臨床株との差異を見出せておらず、これらの食品分離株についての病原性の強弱や病原遺伝子の有無の網羅的検索や食品での増殖条件等に関する詳細な検討等、本菌の非加熱水産食品でのリスクの全貌を解明する基礎研究が必要であった。

2. 研究の目的

日本の非加熱喫食水産食品から分離されるリステリア菌のリスクについて、上記「研究の背景」で述べたように、申請者らのこれまでの研究で、すでに、水産食品での本菌汚染の網羅的汚染実態の解明（菌株分離）、分離菌株の血清型、一部病原遺伝子の保有・欠損状況等、および本菌の基本遺伝性状を明らかにしていた。

そこで、本申請研究では、病原遺伝子の保有状況の網羅的解明、マウス試験による病原性試験（LD50、脾臓・肝臓への侵入性試験）、細胞培養での腸管上皮細胞への侵入や伝播性試験（ブランクアッセイ）、食品での詳細な増殖実験等を行うことにより、本菌の非加熱水産食品でのリスクの全貌を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、非加熱喫食水産食品の本菌汚染によるリスクの全貌を解明するために、1) 遺伝子手法によるアプローチ（主担当：高橋）、2) 動物・細胞培養によるアプローチ（主担当：木村）、および、3) 食品での増殖試験等、菌の培養や生残評価によるアプローチ（主担当：久田）という役割分担体制で行なった。1)、2)については、双方の成果を綿密に照会しながら、柔軟な研究遂行を集中的に行なった。一方、3)については、1)、2)の実験の性質が異なり、食品の準備や試料調整、増殖のタイムコースなど実験量が多く、そのため、1)、2)とは独立した研究者体制で遂行した。これらの体制により、短期間で効率的に成果をあげることが可能となった。

4. 研究成果

(1) 遺伝子マーカーの精査

平成 20 年度は、*L. monocytogenes* の全ゲノムからタンデムリピート領域を探索し、これらの配列の組み合わせを用いて、血清型 4b 株を高い解像度で株分けできる手法を開発した。わが国のヒトのリステリア症分離株の検討では 60%以上が血清型 4b を原因しており、最もリスクの高い血清型とされている。そこで、血清型 4b の株を高い解像度で、且つ簡便に株分けする手法を開発した。本法は血清型 4b 株を 3 つのクラスターに分けることができた。

平成 21 年度は、病原遺伝子以外の遺伝子のなかから重篤な食中毒を引き起こした欧米の臨床株（米国コーネル大学 M. Widman 教授から 30 株入手）とわが国の食品分離株を区別する遺伝子マーカーが存在するか否かを、種々の分子タイピング手法（MLST, tandem repeat 解析等）を用いて解析を行った。

平成 22 年度は、日本の臨床株（全国の病院から収集した患者分離株）とこれまでに世界的に重篤な食中毒を引き起こした欧米の臨床株の間に、わが国の水産食品分離株の 3 者を区別する遺伝子マーカーが存在するか否かを、パルスフィールド電気泳動ならびに MLST を用いて解析を行い、両者に明確な差がないことを明らかにした。

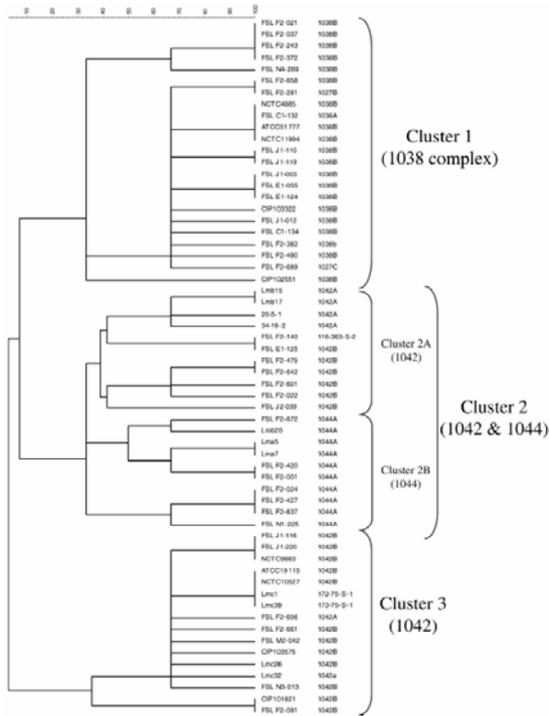


図1 *L. monocytogenes* 血清型 4b 株のタンデムリピート法によるクラスター解析による樹形図 (文献7)。

(2) 動物実験

平成 20 年度は、ネギトロやイクラなどの水産食品からの分離株をマウスへ感染させての経過観察を行った。分離株の培養液をマウス静脈に注入し、その後、LD50 を算出した。また、同様に静脈注入したマウスを解剖し、脾臓および肝臓への本菌の侵入性 (侵入菌数) を調べた。その結果、水産食品分離株は臨床株と同程度の病原性を保持していることが示唆された。

平成 21 年度は、ヒト結腸癌由来細胞への感染力試験を行い、ヒト結腸癌由来細胞への感染力については、細胞侵入性 (細胞培養への菌接種→抗生物質ゲンタマイシン処理→細胞内へ侵入した *L. monocytogenes* 菌数の測定) や細胞間伝播性 (細胞のプラークアッセイ) を明らかとした。

平成 22 年度は、引き続き、ヒト結腸癌由来細胞への感染力試験を行ない、細胞侵入性 (細胞培養への菌接種→抗生物質ゲンタマイシン処理→細胞内へ侵入した *L. monocytogenes* 菌数の測定) や細胞間伝播性 (細胞のプラークアッセイ) に顕著な差異が認められないことを明らかにした。

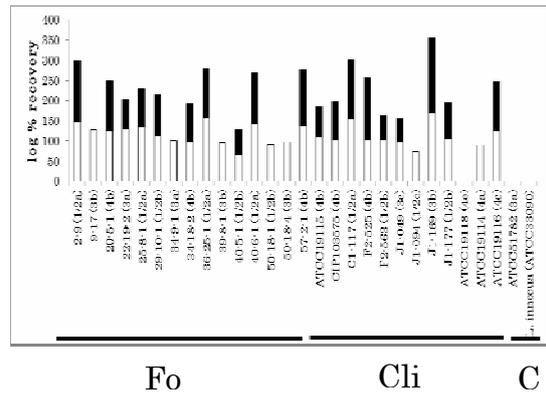


図2 脾臓および肝臓への *L. monocytogenes* の侵入性 (侵入菌数)。Fo:食品分離株、Cli:臨床株、C:対照株、肝臓 (黒いバー)、脾臓 (白いバー) (文献4)。

(3) 食品での増殖実験

平成 20 年度は、水産食品から分離された *L. monocytogenes* を食品に接種し、各温度条件下での増殖挙動を観察した。10 °C および 15 °C 保存においては 1~2 日目に 103MPN/g を超えた。したがって、これらの水産食品が適正に温度管理されずに流通・放置された場合の本菌の挙動が詳細に明らかとなり、標的とすべきリスクの制御ポイントが明確になった。

平成 21 年度は、本菌の食品中での制御法 (保存料、日持ち向上剤等の組み合わせ) の開発にも着手し、現在、日本の市販食品で最もよく用いられている保存料、日持ち向上剤の組み合わせにより、非加熱喫食水産食品での *L. monocytogenes* 増殖制御法を検討した。ネギトロにおいていくつかの日持ち向上剤が効果的であることを明らかとした。

平成 22 年度は、本菌の食品中での制御法 (保存料、日持ち向上剤等の組み合わせ) の開発を引き続き行い、現在、日本の市販食品で最もよく用いられている保存料、日持ち向上剤の組み合わせによる最適条件を明らかにした。

表1 *L. monocytogenes* のネギトロ中での増殖と各種制御剤 (保存料、日持ち向上剤) による増殖制御 (5°C) (文献1)。

Antimicrobial (ppm)	Sample type	Bacterial growth											
		<i>L. monocytogenes</i> (log MPN/g) ^a						Viable aerobic bacteria (log CFU/g) ^b					
		0 h	4 h	8 h	12 h	0 h	4 h	8 h	12 h				
Nisaplin (250)	Mixed fish	2.20	ND ^c	0.73	2.32	2.46	2.31	2.96	4.00				
	Salmon rsc	2.38	ND	ND	1.75	2.38	2.94	4.25	5.14				
Nisaplin (500)	Mixed fish	2.46	ND	0.07	1.94	2.46	1.43	2.72	4.00				
	Salmon rsc	2.38	ND	ND	1.28	2.38	2.87	3.93	5.06				
SAN KEEPER No. 381 (2,000)	Mixed fish	2.25	2.45	2.48	2.45	2.26	2.51	2.83	3.58				
	Salmon rsc	2.28	2.41	2.43	1.22	3.04	3.86	5.38	4.84				
SAN KEEPER K-3 (10,000)	Mixed fish	2.28	1.88	1.75	2.31	2.28	2.40	2.47	3.79				
	Salmon rsc	2.18	1.88	1.75	4.78	2.28	2.40	2.47	5.13				
ART FRESH S050 (2,000)	Mixed fish	2.26	1.91	1.80	2.88	2.26	2.47	3.23	4.20				
	Salmon rsc	2.28	1.94	2.43	1.91	3.04	3.78	5.32	5.21				
Control (no antimicrobial added)	Mixed fish	2.17	3.11	4.01	4.56	2.47	2.83	4.12	5.14				
	Salmon rsc	2.26	2.99	4.37	5.13	3.30	2.99	4.22	5.67				

^a *L. monocytogenes* was enumerated using the three-tube most probable number (MPN) method.
^b Viable aerobic bacteria were enumerated by plating on TSA.
^c ND: not detected.

以上 3 年間の成果は、これまでに、国際的にチーズ、生ハム、スモーク魚など、欧米

で食される非加熱喫食食品について偏ってきた *L. monocytogenes* のリスク研究について、明太子、イクラ、ネギトロなど、日本特有の非加熱喫食水産食品で解明した点で意義は大きく、日本の食文化特有の非加熱喫食水産食品における *L. monocytogenes* 汚染率の解明や、また、分離株の詳細な生理性状、遺伝性状評価を世界に提供することは、生食文化のわが国の水産研究者でしか実施できないことであり、得られる知見は、今後の世界のリストeria汚染食品の安全性を考える上で重要な情報の提供を行った点でインパクトは高いと判断できる。

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7件)

- 1) H. Takahashi, S. Kuramoto, S. Miya, H. Koiso, T. Kuda and B. Kimura. Prevention of *Listeria monocytogenes* growth in ready-to-eat minced tuna and salmon roe during shelf life by commercially available antimicrobial compounds. **J. Food Prot.**, 印刷中(2011) (査読有)
- 2) S. Koseki, Y. Takizawa, S. Miya, H. Takahashi, and B. Kimura. Modeling and Predicting the Simultaneous Growth of *Listeria monocytogenes* and Natural Flora in Minced Tuna. **J. Food Prot.**, 74, 176-178(2011) (査読有)
- 3) H. Takahashi, S. Kuramoto, S. Miya, and B. Kimura. Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential foodborne pathogens on stainless steel surfaces. **Food Control**, 22, 633-637 (2011) (査読有)
- 4) H. Takahashi, T. Suda, Y. Tanaka, and B. Kimura. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. **Lett. Appl. Microbiol.**, 50, 618-625 (2010) (査読有)
- 5) S. Miya, H. Takahashi, T. Ishikawa, T. Fujii, and B. Kimura. Risk of *Listeria monocytogenes* contamination of raw ready-to-eat seafood products available at retail outlets in Japan, **Appl. Environ. Microbiol.**, 76, 3383-3386 (2010) (査読有)
- 6) H. Takahashi, S. Miya, K. Igarashi, T. Suda, S. Kuramoto, and B. Kimura. Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolates from raw ready-to-eat seafood, **J. Food Prot.**, 72, 1476-1480(2009) (査読有)
- 7) S. Handa-Miya, B. Kimura, M. Sato, H.

Takahashi, T. Ishikawa, T. Suda, T. Fujii, and M. Wiedmann. Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains. **Int. J. Food Microbiol.**, 124, 239-249(2008) (査読有)

[学会発表] (計8件)

- 1) 樫村麻里奈ら、ナイシンと日持ち向上剤の併用による水産食品中の *Listeria monocytogenes* 増殖抑制効果、第100回日本食品衛生学会学術講演会、平成22年9月16日、熊本県立大学(熊本)
- 2) C. Yuphakhun ら、*Listeria monocytogenes* のバイオフィーム形成に及ぼすペルトコンベヤーの表面構造と洗浄効果の影響、第31回日本食品微生物学会学術総会、平成22年11月11日、びわ湖ホール(大津)
- 3) 宮聡子ら、非加熱喫食水産食品から分離された *Listeria monocytogenes* の病原性について、日本水産学会秋季大会、平成21年9月30日、岩手県民情報交流センター(岩手)
- 4) 上村周子ら、河川、沿岸海域におけるリストeria菌の分布に関する研究、日本水産学会秋季大会、平成21年9月30日、岩手県民情報交流センター(岩手)
- 5) 樫村麻里奈ら、ネギトロおよび魚卵製品におけるナイシンおよび各種日持ち向上剤を用いたリストeria菌の増殖制御、第98回日本食品衛生学会学術講演会、平成21年10月8日、函館国際ホテル(函館)
- 6) 宮聡子ら、非加熱喫食水産食品における *Listeria monocytogenes* の分布、増殖挙動、及び分離菌株の病原性について(ポスター発表)、第30回日本食品微生物学会学術総会、平成21年11月27日、タワーホール船堀(東京)
- 7) 倉本晋太郎ら、ステンレス上で乾燥させた *Listeria monocytogenes* の生残性についての研究、第95回日本食品衛生学会、平成20年5月16日、中央会館(東京)
- 8) 上村周子ら、CycleavePCR法を用いた *Listeria monocytogenes* の定量法および検出法の開発、第29回日本食品微生物学会、平成20年11月13日、広島国際会議場(広島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 凡 (KIMURA BON)
東京海洋大学 海洋科学部・教授
研究者番号：50262340

(2) 研究分担者

高橋 肇 (TAKAHASHI HAJIME)
東京海洋大学 海洋科学部・助教
研究者番号：40413116

久田 孝 (KUDA TAKASHI)
東京海洋大学 海洋科学部・准教授
研究者番号：00290081