

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：84406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350180

研究課題名(和文) リステリアの食品製造施設への定着要因を探る

研究課題名(英文) Investigation of the factor for persistence of *Listeria monocytogenes* in food processing plants

研究代表者

中村 寛海 (Nakamura, Hiromi)

大阪市立環境科学研究所・調査研究課 微生物保健グループ・研究主任

研究者番号：00332445

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：*Listeria monocytogenes* (リステリア)の食品製造施設への定着要因を明らかにするために、食品および食品製造施設から分離されたリステリア149株について遺伝子解析(PFGE法およびMLST法)を実施した。また、浅漬製造施設3施設から81検体のふきとり材料等を採取してリステリアおよび自由生活性アメーバ(FLA)の検出を試みた。その結果、複数の製造元由来の食品から検出される特定の遺伝子型のリステリアの存在を明らかにした。また、2製造元由来のふきとり材料3検体からリステリアとFLAが同時に検出された。これらのうち2検体は包装機から採取したものであった。

研究成果の概要(英文)：One hundred and forty-nine of *Listeria monocytogenes* (LM) strains isolated from the food and the food-processing plants were classified by genetic analysis (PFGE and MLST). We detected LM and free-living amoebae (FLA) in 81 swab samples obtained from the three lightly-pickled vegetables processing plants. As the result of this, we specified some genetic types of LM which were consistently detected from several foods processed by different manufacturers. Three swab samples from two different plants detected both LM and FLA, of which two samples were from packaging machines.

研究分野：食品細菌学

キーワード：リステリア PFGE MLST 遺伝子型別 自由生活性アメーバ 食品製造施設 食品

1. 研究開始当初の背景

Listeria monocytogenes (リステリア) は、食品を介してヒトに髄膜炎や敗血症などの重篤な感染症 (リステリア症) を引き起こす。リステリア症の 99% は食品媒介性であり、致死率は 16% で他の食中毒菌に比べて圧倒的に高い。実際に発生したリステリア症集団事例の検証結果から、食品のリステリア汚染は製造・加工工程で引き起こされると考えられている。水産加工品、乳製品や食肉製品など様々な食品製造施設において同じ DNA 型のリステリアが長期間繰り返し検出される現象が報告されており、これらの菌株は長期間施設に定着しているように見えることから、persistent strains (P 株) と呼ばれている。リステリアの P 株に特有の性状は不明であるが、消毒剤の耐性に関わる複雑な細胞壁合成系を有しており、Fox らによって非定着株と生理的な違いがあることが報告された (Appl. Environ. Microbiol., 2011)。

2. 研究の目的

本研究では、食品製造施設および様々な食品に由来するリステリア菌株を用いて遺伝子解析を行い、リステリアの施設定着に関連する遺伝系統を明らかにする。また、リステリアの施設への定着要因の一つとして自由生活性アメーバ (FLA) と本菌の共生の可能性を探るため、食品製造施設内から FLA とリステリアの検出を試み、これらの分布について検討する。また、施設定着株 (P 株) と非定着株 (T 株) を用いて、リステリアバイオフィーム中の菌体外多糖類 (EPS) に含まれる多糖の構成糖について比較検討を行う。

3. 研究の方法

(1) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法および Multi locus sequence typing (MLST) 法によるリステリア菌株の型別
1999 ~ 2013 年に 13 製造元由来 Ready-to-eat (RTE) 食品から分離された 40 株および立入調査を実施した 4 製造元 (A, K, L, および M 社) 由来 109 株のリステリアについて、制限酵素 *Apal* および *AscI* による PFGE 型別と MLST による ST 型別を実施した。PFGE 型別は得られたパターンを Fingerprinting II で解析後、任意にアルファベットを付与し、PFGE 型とした。ST 型は MLST データベース上から入手した。

(2) 浅漬製造施設におけるリステリアと FLA の分布状況調査

2014 年 6 ~ 8 月に浅漬製造施設 3 施設から 81 検体のふきとり材料等を採取し、リステリアおよび FLA の検出を試みた。リステリアの検出は IS011290-1 および 11290-2 に従った。分離されたリステリア菌株は血清型別、PFGE 型別、MLST による ST 型別を実施した。FLA の検出は図 1 に従った。すなわち、ふきとり水をマニホールドにセットした 0.65 μm のフィルターでろ過した。濁りの著しいものは遠

心分離後、上清のみをろ過し、沈渣はそのまま培地に接種した。ろ過後のフィルターを非病原大腸菌 (60°C で 30 分加熱処理済み OP50 株) を塗布した無栄養寒天平板上で 30°C で 1 週間まで培養し、シスト (嚢子) あるいは栄養体が観察されたものを陽性と判定した。FLA を遺伝子レベルで種同定するためにクローン化を試み、FLA 陽性検体のプレートから 27 個のクローン株を得た。次に、各クローン株の 18S rRNA 遺伝子を増幅後、その塩基配列の相同性検索により FLA を同定した。*Acanthamoeba* については、同領域の塩基配列の分子系統樹解析により遺伝子型を同定した。

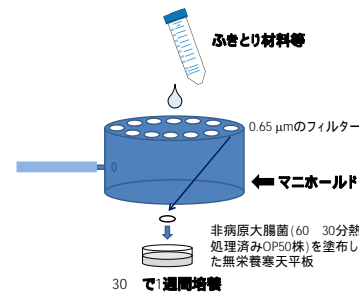


図 1 ふきとり水からのアメーバ分離法

(3) アイスクリーム製造施設におけるリステリア汚染調査

2016 年 6 ~ 9 月の間にアイスクリーム製造施設 3 施設からふきとり水等 81 検体、アイスクリーム等製品および半製品 25 検体の計 106 検体をリステリア検査に供した。リステリアの検出は IS011290-1 および 11290-2 に従った。アイスクリーム等を乳及び乳製品の成分規格等に関する省令で定められている成分規格に基づいて 4 種類 (アイスクリーム、アイスマルク、ラクトアイス、氷菓) に分類し、それぞれに 5 種類のリステリア菌株の混合菌液 (標準菌株 2 種、野生株 3 種) を添加して -20 で 6 週間まで保管し、その消長を調べた。

(4) バイオフィーム中の EPS を構成する多糖類の構成糖の解析

リステリアバイオフィームの EPS から多糖類を精製して凍結乾燥し、以下の試験に供した。

パルスドアンペロメトリ検出器を用いた陰イオン交換クロマトグラフィー (HPADC-PAD) 法

P 株、T 株の各リステリア EPS サンプル 1 mg を 500 μl の水に溶解し、等量の 4N トリフルオロ酢酸 (TFA) と混合し、121°C で 90 分加水分解した。加水分解されたサンプルを 500 μl の蒸留水に溶かし、標準物質として 9 種類の単糖とリボース、デオキシリボース、ガラクトサミン (GalN)、グルコサミン (GlcN) を用いて HPADC-PAD 分析を行った。

ペーパークロマトグラフィーによる単糖組成分析

P 株、T 株の各リステリア EPS サンプルと 3

µg 相当の 9 種類の単糖とリボース、デオキシリボース、GalN、GlcN の標準物質をろ紙に塗布し、1-ブタノール：ピリジン：水 = 6:4:3 (v/v) の展開溶媒で 24 時間展開した。展開後、ペーパーをドラフト内で十分に乾燥させ、硝酸銀発色法で発色させた。

4. 研究成果

RTE 食品から分離された 40 株は 2 種類の制限酵素により 12 の PFGE 型 (A, B, C, D, E, I, K, L, M, N, O, P 型) と 8 種の ST (ST2, ST5, ST7, ST8, ST87, ST155, ST193, ST321) に分類された (表 1)。PFGE 型が B 型で ST155 のリステリアは 4 製造元 (D, E, F および M 社) 由来の様々な RTE 食品で検出された (表 1 中網かけ)。

表 1 Ready-to-eat 食品由来リステリアの PFGE 型と ST

製造元	検体名	検体採取日	血清型	PFGE型		ST
				AscI	ApaI	
A社	スモークサーモンマリネ用	1999年9月	1/2a	C	C	ST321
	スモークサーモン	1999年10月	1/2a	C	C	ST321
	スモークサーモントラウト	2000年6月	1/2a	C	C	ST321
	スモークサーモンマリネ用	2000年6月	1/2a	C	C	ST321
	スモークサーモントラウト	2000年9月	1/2a	C	C	ST321
	スモークサーモンマリネ用	2000年9月	3a	C	C	ST321
			1/2a	D	D	ST5
B社	スモークサーモンマリネ用	1999年8月	UT	E	E	ST193
	スモークサーモンマリネ用	1999年9月	UT	E	E	ST193
C社	スモークサーモン	1999年10月	4b	A	A	ST2
	スモークサーモン	2000年1月	4b	A	A	ST2
D社	スモークサーモン	1999年8月	1/2a	B	B	ST155
	スモークサーモントラウト	1999年9月	1/2a	B	B	ST155
E社	辛子明太子	2003年7月	1/2a	B1	B	ST155
F社	たらこ	2003年8月	3a	B	B	ST155
	辛子明太子	2003年8月	3a	K	K	ST7
	辛子明太子	2003年9月	3a	B1	B	ST155
	辛子明太子	2003年10月	3a	B1	B	ST155
G社	スモークサーモン	2003年8月	1/2b	L	L	ST5
H社	たらこ	2003年8月	3a	M	M	STND
	1/2b		I-1	I-1	ST87	
	UT		M	M	STND	
I社	辛子明太子	2003年10月	3a	K	K	ST7
J社	ナチュラルチーズ	2003年10月	1/2a	N	N	STND
K社	刻みみぶな	2013年5月	1/2b	O2	O	ST5
	刻みみぶな	2013年8月	1/2b	O3	O	ST5
	刻みみぶな	2013年10月	1/2a	P	P1	ST8
	刻みみぶな	2013年10月	1/2b	O3	O	ST5
	刻みみぶな	2014年2月	1/2a	P	P1	ST8
	刻みみぶな	2014年6月	1/2b	O3	O	ST5
	刻みみぶな	2014年6月	1/2b	O3	O	ST5
	刻みみぶな	2014年6月	3a	P	P1	ST8
L社	うりスライス	2013年8月	1/2a	P	P1	ST8
	大阪漬 (だいこん、みぶな)	2013年10月	1/2a	P	P1	ST8
	白菜漬	2014年7月	3a	P	P1	ST8
M社	水なす切漬	2013年8月	1/2a	B	B	ST155
	秋茄子切漬	2013年10月	1/2a	B	B	ST155
	ゆず白菜	2013年10月	1/2a	B	B	ST155

13 製造元のうち 4 製造元 (A, K, L および M 社) については製造施設内から分離されたリステリアについても同様に遺伝子型別を実施した。その結果、施設由来リステリアは製品由来リステリアと同じ遺伝子型を示す傾向が見られた (表 2)。

同一製造元由来の製品からは、その採取時期や種類にかかわらず、同一遺伝子型のリステリアが分離される傾向が認められ、さらに、各製造施設においては、製品由来リステリアと同じ遺伝子型を示すリステリアが分離される傾向が認められた (表 2 中網かけ)。また、浅漬製造施設 3 社由来リステリアには施

設間で共通の遺伝子型を示すものが見られた。特定の遺伝子型 (PFGE : B 型、ST155) を示すリステリアが、地理的、時期的に離れた施設間あるいは種類の異なる食品からも検出された。

浅漬製造施設 3 施設内のふきとり水等 81 検体のうちリステリアが 29 検体、FLA が 11 検体から検出された。2 施設由来 3 検体のふきとり水から LM と FLA の両方が検出された (表 3 中網かけ)。これらは、包装室の包装機の袋を回す部分と調味液充填ノズルの外側、冷蔵室の下漬タンク付近の床のふきとりであった。LM と FLA が検出された 3 検体のうち 2 検体の FLA はそれぞれ *Acanthamoeba* sp. および *Hartmannella vermiformis* であった。1 検体では FLA の継代培養ができなかった。

検出された FLA は *Acanthamoeba*, *Hartmannella vermiformis* および *Naegleria* sp. であった (表 3)。FLA が検出された 11 検体のうち FLA を継代培養できた 6 検体から 21 クローンの *Acanthamoeba* を分離し、それらの遺伝子型は T2、T4 および T11 であった (図 2)。

表 2 最終製品および製造施設由来リステリアの PFGE 型と ST

施設名	由来	採取年月	血清型	PFGE pattern		ST	菌株数		
				AscI	ApaI				
A社	最終製品	1999年9月	1/2a	C	C	ST321	1		
		1999年10月	1/2a	C	C	ST321	1		
		2000年6月	1/2a	C	C	ST321	1		
		2000年6月	1/2a	C	C	ST321	1		
		2000年6月	1/2a	C	C	ST321	1		
		2000年9月	3a	C	C	ST321	1		
			1/2a	D	D	ST5	1		
			1/2a	C	C	ST321	19		
			1/2a	G	G	ST199	21		
			1/2a	J	J	ST204	2		
K社	製造施設	2002年8月~2004年5月	3a	G	G	ST199	4		
			3a	H	H	ST9	1		
			1/2b	D	D	ST5	6		
			1/2b	I	I	ST87	1		
			3b	F	F	ST3	10		
			UT	G	G	ST199	1		
			UT	F	F	ST3	1		
			2013年5月	1/2b	O2	O	ST5	1	
			2013年8月	1/2b	O3	O	ST5	1	
			2013年10月	1/2a	P	P1	ST8	1	
L社	最終製品	2014年2月	1/2b	O3	O	ST5	2		
			1/2a	P	P1	ST8	1		
			1/2b	O3	O	ST5	1		
		2014年6月	1/2a	P	P1	ST8	1		
			1/2b	O3	O	ST5	1		
			1/2b	O3	O	ST5	1		
			1/2b	O3	O	ST5	1		
			3a	P	P1	ST8	1		
		M社	製造施設	2014年6月	1/2a	P	P1	ST8	1
					1/2a	P	P	ST8	7
	3a			P	P	ST8	3		
	1/2b			O1	O	ST5	1		
	1/2b			O2	O	ST5	1		
	1/2b			O	O	ST5	2		
	2013年8月			1/2a	P	P1	ST8	1	
	2013年10月			1/2a	P	P1	ST8	1	
	2014年7月			3a	P	P1	ST8	1	
	2014年7月			1/2a	P	P1	ST8	6	
M社	最終製品	2013年8月	1/2a	B	B	ST155	3		
		2013年10月	1/2a	B	B	ST155	2		
		2014年6月	1/2a	B	B	ST155	8		
製造施設		3a	B	B	ST155	7			
	2014年8月	1/2a	B	B	ST155	2			
		3a	B	B	ST155	2			

表 3 FLA 陽性検体

施設名	採取年月	Sample No.	場所	検体の分類	検体名	FLA同定結果	Acanthamoeba 遺伝子型
K社	2014年6月	y1	下漬処理室	原材料	みぶなの根元の部分	<i>Acanthamoeba</i> sp.	T4
		y2	下漬処理室	原材料	みぶなの葉の部分	<i>Acanthamoeba</i> sp.	T2
		y13	下漬処理室	ふきとり	カットしたみぶなを上げる台	<i>Hartmannella vermiformis</i> <i>Naegleria</i> sp.	T2
L社	2014年7月	y17	包装室	ふきとり	包装機 袋を回す部分	<i>Hartmannella vermiformis</i>	T2, T11
		14 (H)	下処理室	その他	1Fから5F抜き用水	<i>Acanthamoeba</i> sp.	
		116	包装室	その他	2F調味液	継代培養できず*	
		121	包装室	その他	2F充填前濃物入るカップ	継代培養できず	
						すすぎ水	継代培養できず
M社	2014年6月	110	包装室	ふきとり	調味液充填ノズル(外側)	継代培養できず	
		117	製造室	ふきとり	8つ切りカッターの柄	継代培養できず	
		128	冷蔵室	ふきとり	冷蔵室の下漬タンク付近の床(排水溝付壁)	<i>Acanthamoeba</i> sp.	T2
2014年8月	129	冷蔵室	ふきとり	冷蔵室の下漬タンクの床	継代培養できず		

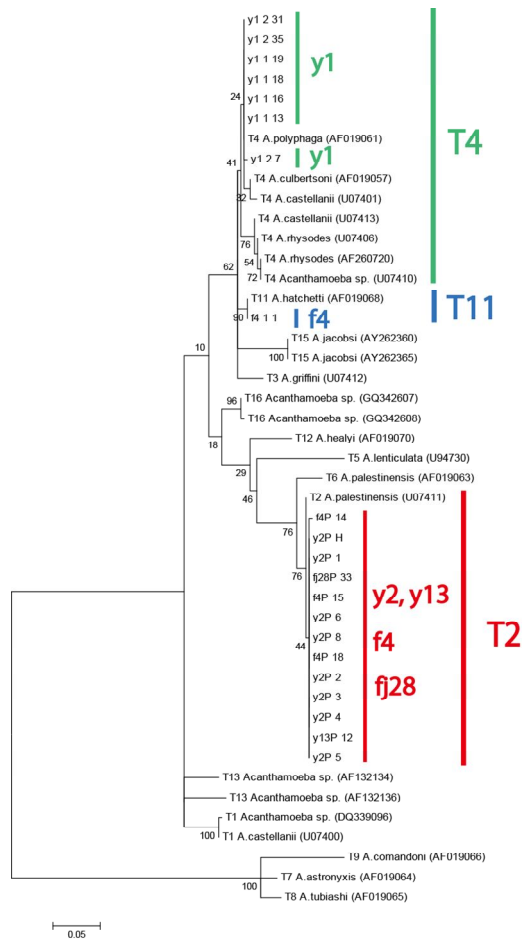


図2 *Acanthamoeba* の 18SrRNA 遺伝子に基づく系統樹 (最尤法にて構築)

アイスクリーム製造施設3施設から採取したふきとり水 81 検体、半製品を含むアイスクリーム等 25 検体、計 106 検体のいずれからもリステリアは検出されなかった。また、アイスクリーム類をアイスクリーム、アイスマルク、ラクトアイス、氷菓に分類し、それぞれに5種類のリステリア混合菌液を添加して、-20 で6週間まで保管し、その消長を調べた。その結果、氷菓のみ3週間後に約2オーダーの LM 菌数の低下が見られた。アイスクリーム、アイスマルク、ラクトアイスでは6週間後も菌数の変化は見られなかった。リステリア P 株と T 株のバイオフィーム中に含まれる多糖類の構成糖の解析を HPAEC-PAD 分析により行った結果、P 株の単糖組成はグルコサミン (GlcN)、ラムノース (Rha)、キシロース (Xyl)、ガラクトース (Gal)、グルコース (Glc)、リボース、ガラクトン酸 (GalA)、アラビノース (L-Ara) であり、T 株は Xyl、Rha、Gal、Glc と同定された。また、ペーパークロマトグラフィーの結果、P 株の単糖組成は Rha、Xyl、Gal、L-Ara、GalA であり、T 株は Xyl、Rha、Gal と同定された。P 株の L-Ara および GalA は EPS の構成糖である可能性があるが、厳密には他の糖と区別ができず、確定することは困難であった。また、

GlcN、リボースはペーパークロマトグラフィーで確認できなかった。P 株、T 株ともに、Rha、Xyl、Gal が EPS の構成糖であることが判明した。

<引用文献>

Fox, E.M., Leonard, N., Jordan, K. Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 6559-6569 (2011)

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3件)

Taguchi M., Kanki M., Yamaguchi Y., Koganei Y., Sano T., Nakamura H., Asakura H. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retail lightly pickled vegetables and its successful control at processing plants *J Food Prot* 80, 467-475 (2017), 査読有 doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-062.

中村寛海. 食品媒介リステリア症と食品製造施設のリステリア汚染 リステリアの施設定着株を取り巻く話題. *日本食品微生物学会雑誌* 32, 1-11 (2015), 査読無

Nakamura H., Takakura K., Sone Y, Itano Y., Nishikawa Y. Biofilm formation and resistant to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. *J Food Prot* 76, 1179-1186 (2013), 査読有, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-225

[学会発表](計4件)

中村寛海、田口真澄、井口純、西康之、安福潔、村井千里、西川禎二、小笠原準. 食品製造施設から分離された *Listeria monocytogenes* の遺伝子型の特徴と施設汚染要因の考察, 第37回日本食品微生物学会, 2016年9月16日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

Nakamura H., Taguchi M., Abe N., Iguchi A., Yamaguchi K., Nishio T., Nishikawa Y. Distribution of free-living amoeba and *Listeria monocytogenes* in food processing plants, *Problems of Listeriosis (ISOPOL XIX)*, 2016/6/16, Pasteur Institute (Paris, France)

中村寛海、田口真澄、井口純、西川禎二. 食品製造施設における自由生活性ア

メーバおよび *Listeria monocytogenes* の分布, 第 88 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 27 日, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

中村寛海、井口 純、長谷 篤、西川禎二. 食品製造施設および食品由来 *Listeria monocytogenes* の MLST による型別と系統解析, 第 87 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 27 日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 寛海 (NAKAMURA HIROMI)

大阪市立環境科学研究所・調査研究課微生物保健グループ・研究主任

研究者番号: 00332445

(2) 研究分担者

西川 禎一 (NISHIKAWA YOSHIKAZU)

大阪市立大学大学院・生活科学研究科・教授

研究者番号: 601835539

井口 純 (IGUCHI ATSUSHI)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号: 00437948

(3) 連携研究者

阿部 仁一郎 (ABE NIICHIROU)

大阪市立環境科学研究所・調査研究課微生物保健グループ・研究副主幹

研究者番号: 10321936

和田 崇之 (WADA TAKAYUKI)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号: 70332450

(4) 研究協力者

なし