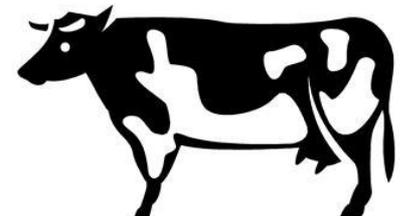


食中毒起因菌の疫学的研究

—特に、牛初乳由来リステリア菌の
分子疫学的研究—

○長谷川めぐみ、平井克哉



Listeria monocytogenes (L. m)

- 低温増殖も可能であるため、低温流通と長期保存により他の微生物の増殖が抑制される環境でも増殖し、食中毒を引き起こす。
- 高齢者や乳幼児などの易感染者に脳脊髄膜炎や敗血症などを引き起こし、致死率は15～20%である。妊婦が感染した場合は流産・死産の原因となる。
- 海外では、乳製品をはじめ、ready-to-eat食品に起因する食中毒事例が多数報告されている。アメリカでは、年間約1,590人の食中毒事例が発生し、約255人が死亡している。
- 我が国では、起因食品不明の散発事例はあるが、集団発生は北海道のナチュラルチーズに起因する事例のみである。
- 食品の*L. m*汚染は、諸外国と同程度と推定されているが、疫学的成績が極めて少ない。



生乳・乳製品における *Listeria monocytogenes* (*L. m*) 検出率

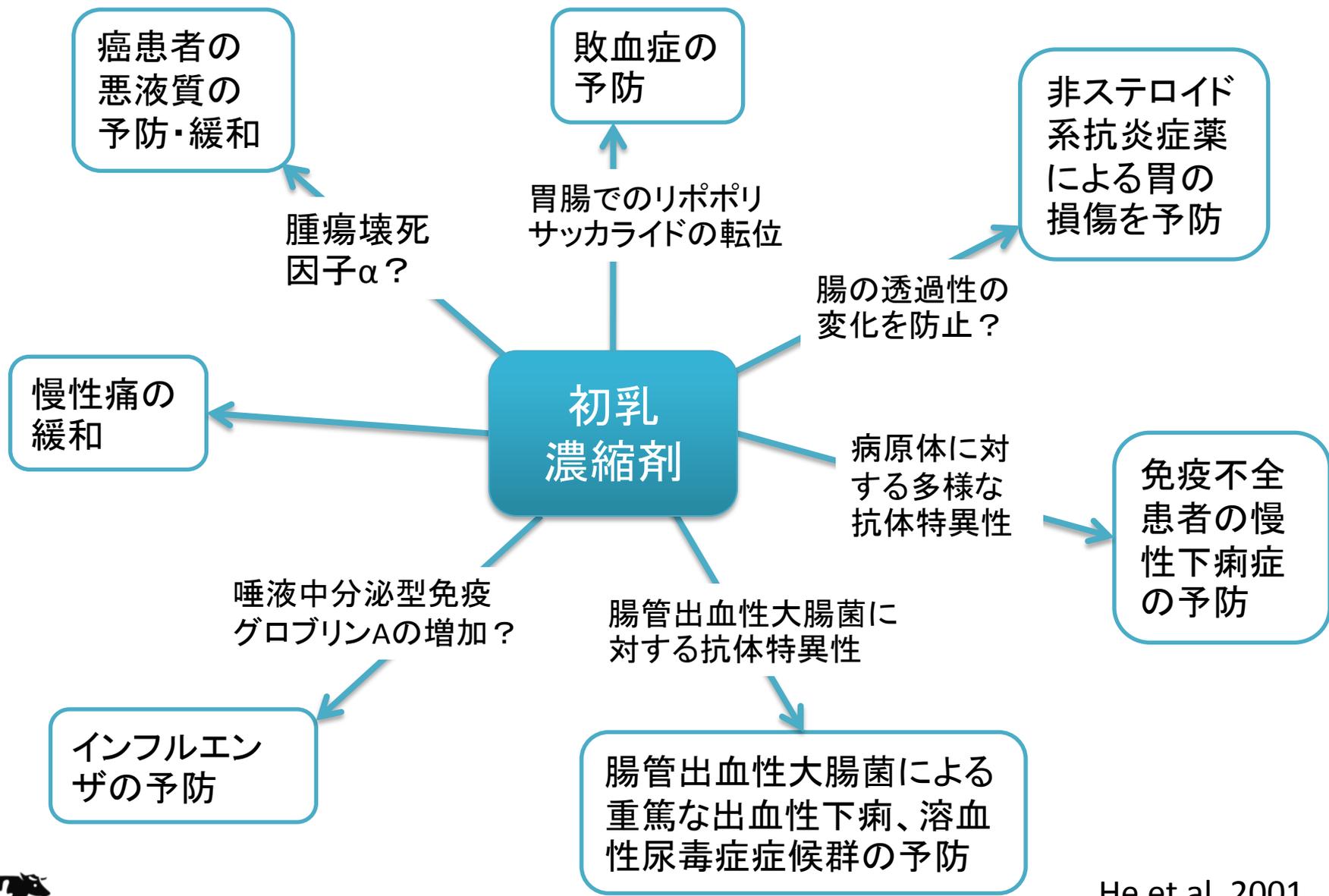
食品名	国	検出数	(検出率)	文献
未殺菌乳	日本	3/362	(0.8%)	Yoshida, T. et al. 1998
未殺菌乳	日本	6/150	(4.0%)	Satio, A. et al. 1991
未殺菌乳	アメリカ	56/948	(5.9%)	Muraoka, S.M. et al. 2003
未殺菌乳	カナダ	47/1,720	(2.7%)	Steele, M.L. et al. 1997
未殺菌乳	フランス	60/1,787	(3.4%)	Meyer-Broseta, S. et al. 2003
未殺菌乳	イギリス	102/2,009	(5.1%)	O'Donnell, E.T. 1995
未殺菌乳	トルコ	1/100	(1.0%)	Ahrabi, S. S. et al. 1998
牛乳	イギリス	11/1,039	(1.1%)	Greenwood, M.H. et al. 1991
牛乳	スコットランド	4/115	(1.1%)	Gilmour, A. et al. 1992
牛乳	北アイルランド	1/95	(5.0%)	Ahrabi, S.S. et al. 1998
アイスクリーム	韓国	8/132	(6.1%)	Baek, S.Y. et al. 2000
バター	イタリア	5/130	(3.8%)	Quagilo, G. et al. 1992



牛初乳における微生物の検出率

微生物	検出数(検出率)	文献
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	8/126 (6.3%)	Streeter, R. N. et al. 1995
<i>Staphylococcus spp.</i>	135/234 (57.7%)	Fecteau, G. et al. 2002
<i>Corynebacterium spp.</i>	31/234 (13.2%)	Fecteau, G. et al. 2002
<i>Streptococcus spp.</i>	23/234 (9.8%)	Fecteau, G. et al. 2002
<i>Echerichia coli</i>	9/234 (3.8%)	Fecteau, G. et al. 2002
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	2/234 (0.8%)	Fecteau, G. et al. 2002
<i>Pasteurella spp.</i>	1/234 (0.4%)	Fecteau, G. et al. 2002

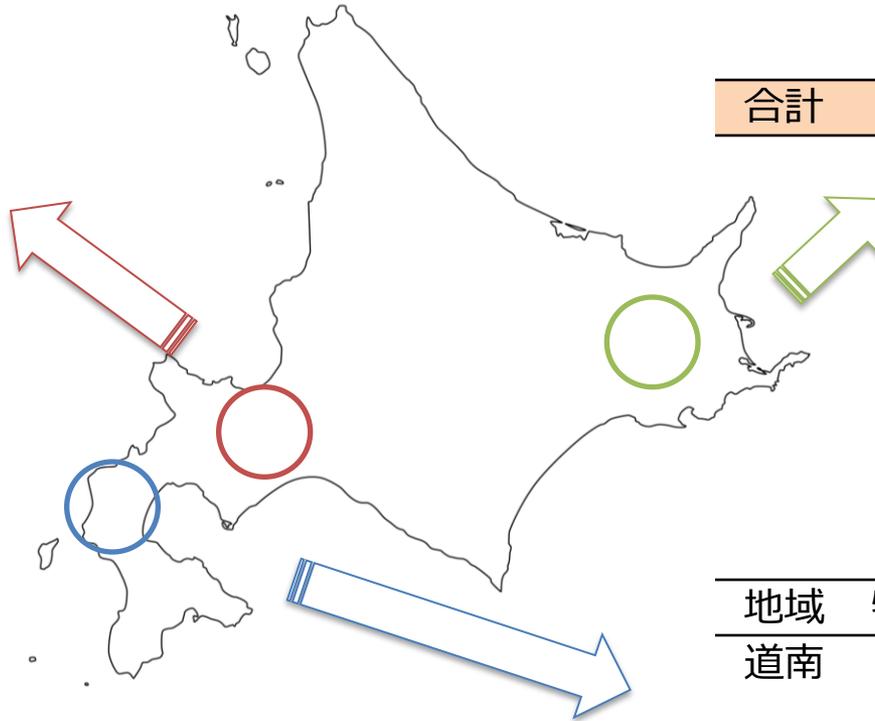




検体の採取

- 道内21酪農家より、初乳210検体を採取した。

地域	牧場	初乳検体数
道央	E	8
	F	14
	FJ	3
	H	16
	HA	7
	HY	9
	I	41
	K	10
	KB	9
	KU	10
	N	6
	NS	6
	S	4
	T	17
	Y	1
	YW	27
合計	16	188



地域	牧場	初乳検体数
道東	HT	6
	M	3
	NO	1
合計	3	10

地域	牧場	初乳検体数
道南	KA	10
	KO	2
合計	2	12

初乳からの *L. m* の分離

初乳5mlをUVM Modified *Listeria* Enrichment Brothで1次増菌



Fraser Brothで2次増菌



Oxford 寒天培地に塗抹し、*L. spp.* を選択分離



CHROMagar *Listeria* 寒天培地で培養し、*L. m*を選択分離

* 上記方法で、*L. m*が分離できなかったため、初乳25mlを4°Cで低温増菌後、上記の方法で*L. m*を選択分離



L. m の性状解析

- 血清の型別は、診断用抗血清を用いた。
- パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) は、Pulse Net USA のプロトコルに準じた。
- PCRにて、病原性に関わる11遺伝子 (*actA*, *hly*, *iap*, *inlA*, *inlC*, *mpl*, *plcA*, *plcB*, *opuCA*, *prfA*, *clpC*) および流行株 (ECI, ECII) のマーカー遺伝子を解析した。



遺伝子型の比較に用いた *L. m* 株

番号	由来	血清型
N1	患者(髄膜脳炎)	4b
N2	患者(髄膜炎)	1/2b
O-02	患者	1/2a
O-03	患者	4b
O-10	患者	1/2b
O-11	患者	1/2b
O-12	患者	1/2b
O-13	患者	1/2b
O-14	患者	1/2b
O-15	患者	1/2b
O-18	患者	4b
O-19	患者	4b
D1	患者(静脈血)	4b
D2	患者(静脈血)	1/2b
Y04	患者(髄膜炎)	1/2b
Y05	患者(敗血症,肺炎)	1/2(b)
Y06	患者(敗血症)	1/2b
Y07	患者(敗血症)	1/2b
Y08	患者(脊髄髄膜炎)	1/2b
Y24	患者(髄膜炎)	4b
Y25	患者(胎児敗血症)	4b
Y26	患者(髄膜炎)	4b
Y27	患者(髄膜炎,敗血症)	4b
Y29	患者(髄液)	4b

番号	由来	血清型
O-04	チーズ	1/2b
O-05	チーズ	1/2b
O-06	チーズ	1/2b
O-07	チーズ	1/2b
O-08	チーズ	1/2b
O-09	チーズ	1/2b
O-16	ステーキ	1/2b
O-17	ステーキ	1/2b
Y01	バルク乳	1/2a
Y02	バルク乳	1/2a
Y09	食肉	1/2b
Y12	バルク乳	4b
Y13	バルク乳	4b
Y15	バルク乳	4b
Y16	バルク乳	4b
Y17	バルク乳	4b
Y18	バルク乳	4b
Y19	食肉	4b
Y28	食肉	4b
Y03	カラス(腸内容)	1/2b
Y20	タヌキ(肝臓)	4b
Y21	シカ(腸内容)	4b
Y22	カラス(腸内容)	4b
Y23	カラス(腸内容)	4b

牛初乳からのリステリア菌の分離

地域	農場数	初乳 検体数	検出数 (%)		
			<i>L. m</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>
道央	16	188	15(8.0)	29(15.4)	1(0.5)
道東	3	10	0	2(20.0)	0
道南	2	12	1(8.3)	1(8.3)	0
合計	21	210	16(7.6)	32(15.2)	1(0.5)



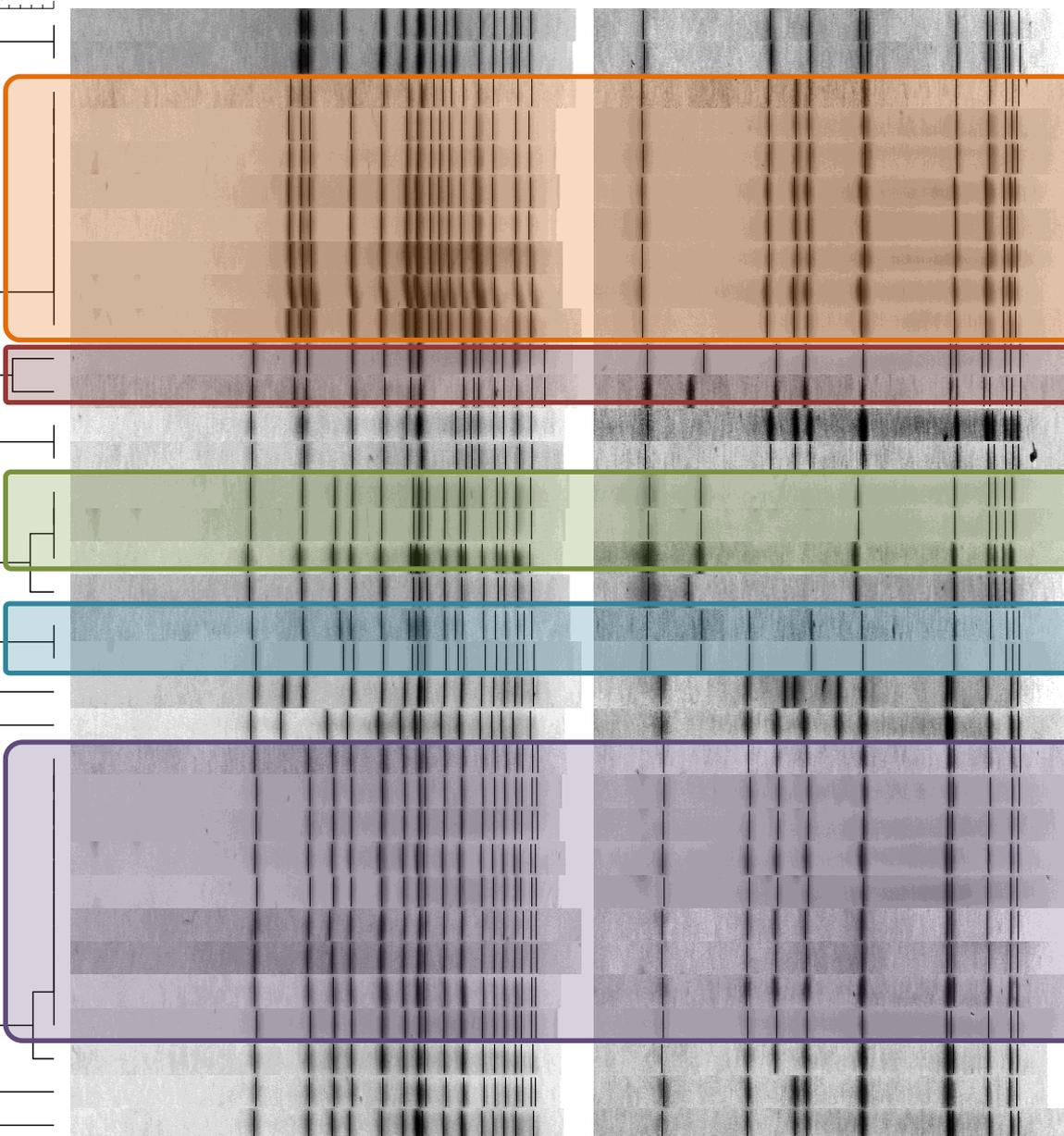
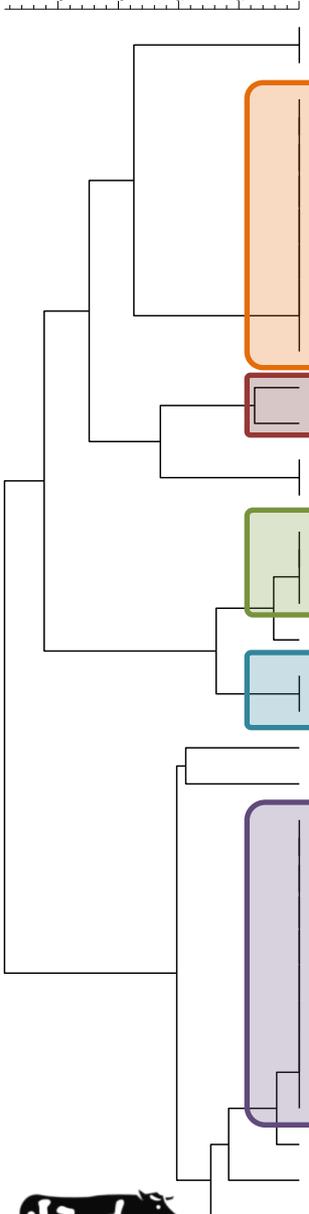
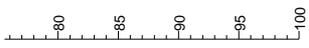
Apa I

Asc I

検体
番号

血清
型別

由来



O09	678	1/2b	cheese (outbreak)
O11	685	1/2b	human (outbreak)
KB7	24	1/2b	colostrum
KU1	35	1/2b	colostrum
KU2	34	1/2b	colostrum
KU7	33	1/2b	colostrum
KO1	35	1/2b	colostrum
T16	34	1/2b	colostrum
T17	34	1/2b	colostrum
KB9	40	1/2b	colostrum
H12	24	1/2b	colostrum
YW20	22	1/2b	colostrum
Y04	684	1/2b	human
Y08	685	1/2b	human
KB3	24	4b	colostrum
KB4	34	4b	colostrum
Y25	686	4b	human
O19	777	4b	human
KB6	27	4b	colostrum
KB9	39	4b	colostrum
N1	11H	4b	human
Y27	690	4b	human
KO1	31	4b	colostrum
KU10	35	4b	colostrum
KB6	30	4b	colostrum
KB8	24	4b	colostrum
KB9	38	4b	colostrum
D1	1	4b	human (venous blood)
O03	522	4b	human
Y22	OLm30	4b	cow (intestinal content)
KU4	34	4b	colostrum
Y21	OLm5	4b	deer (intestinal content)
Y20	OLm2	4b	raccoon dog (liver)
Y26	689	4b	human



L. m 20株の病原性に関わる遺伝子の検出率

<i>actA</i>	<i>hly</i>	<i>iap</i>	<i>inlA</i>	<i>inlC</i>	<i>mpl</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>opuCA</i>	<i>prfA</i>	<i>clpC</i>
20	20	19	20	20	19	20	20	19	20	20
(100 %)	(100 %)	(95 %)	(100 %)	(100 %)	(95 %)	(100 %)	(100 %)	(95 %)	(100 %)	(100 %)



流行株 (Epidemic clones)

	国	原因食品	年	血清型
ECI	カナダ アメリカ スイス	コールスロー チーズ ソフトチーズ	1981 1985 1983-1987	4b
ECII	アメリカ	ホットドッグ	1998-1999	4b
ECIII	アメリカ	デリミート	2002	1/2a
ECIV	アメリカ イギリス	野菜 パテ	1979 1989	4b
ECV	アメリカ	チーズ	2000-2001	4b



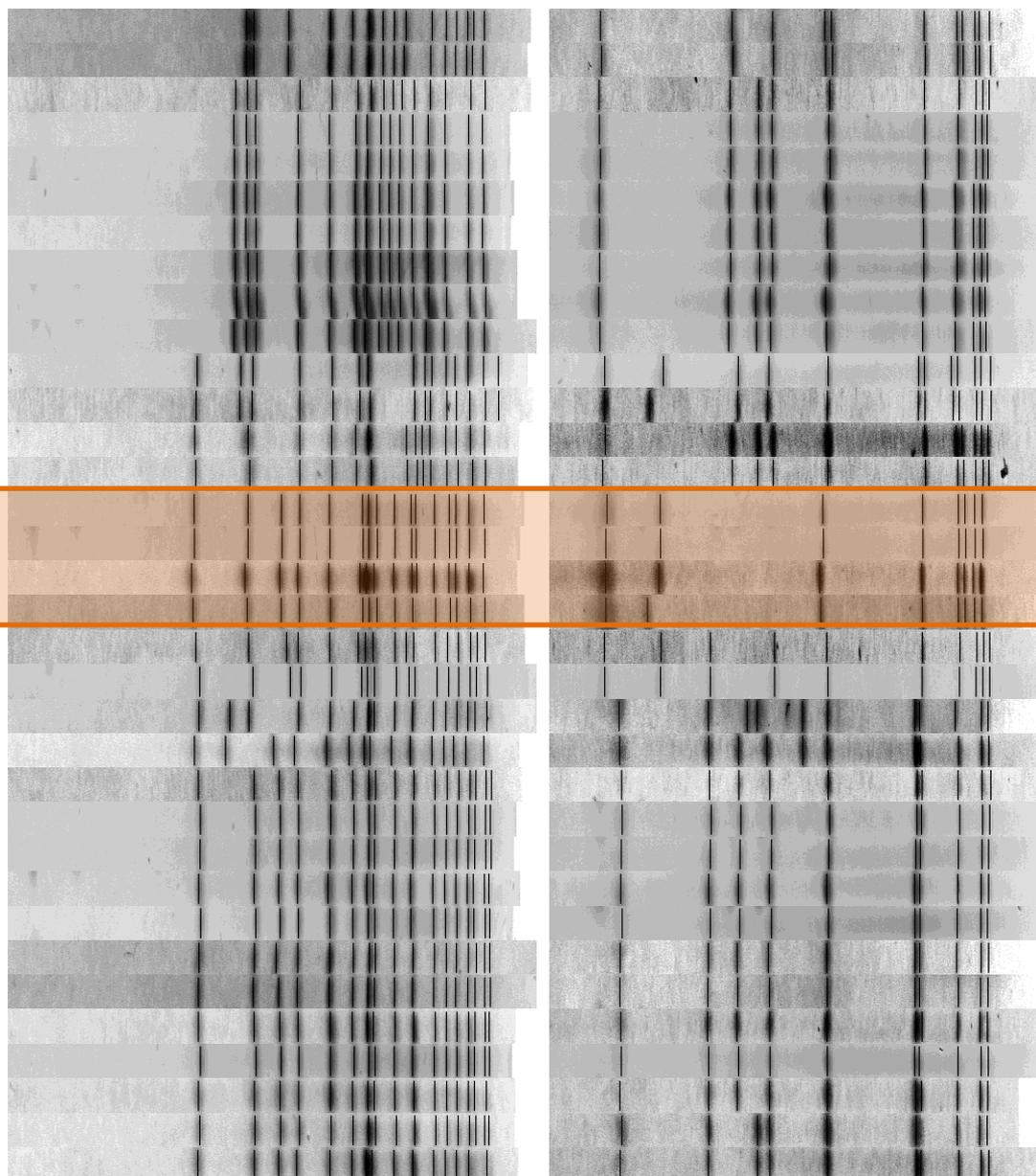
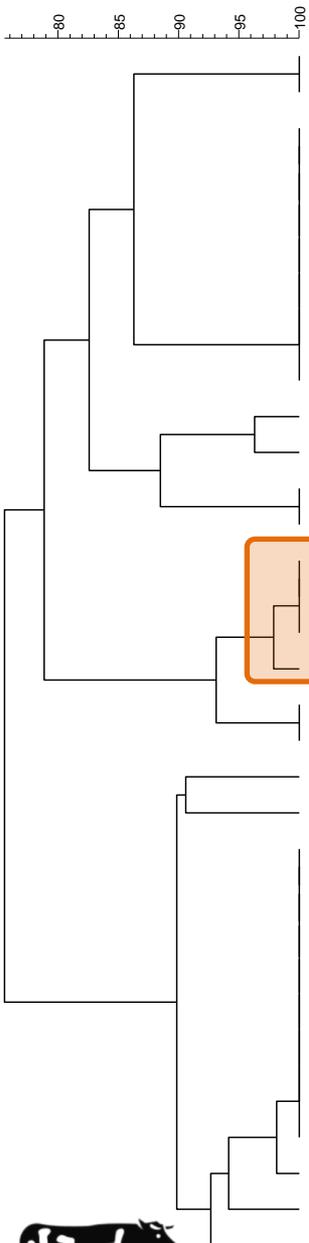
Apa I

Asc I

検体
番号

血清
型別

由来



O09	678	1/2b	cheese (outbreak)
O11	685	1/2b	human (outbreak)
KB7	24	1/2b	colostrum
KU1	35	1/2b	colostrum
KU2	34	1/2b	colostrum
KU7	33	1/2b	colostrum
KO1	35	1/2b	colostrum
T16	34	1/2b	colostrum
T17	34	1/2b	colostrum
KB9	40	1/2b	colostrum
H12	24	1/2b	colostrum
YW20	22	1/2b	colostrum
Y04	684	1/2b	human
Y08	685	1/2b	human
KB3	24	4b	colostrum
KB4	34	4b	colostrum
Y25	686	4b	human
O19	777	4b	human
KB6	27	4b	colostrum
KB9	39	4b	colostrum
N1	11H	4b	human
Y27	690	4b	human
KO1	31	4b	colostrum
KU10	35	4b	colostrum
KB6	30	4b	colostrum
KB8	24	4b	colostrum
KB9	38	4b	colostrum
D1	1	4b	human (venous blood)
O03	522	4b	human
Y22	OLm30	4b	crow (intestinal content)
KU4	34	4b	colostrum
Y21	OLm5	4b	deer (intestinal content)
Y20	OLm2	4b	raccoon dog (liver)
Y26	689	4b	human

まとめ

- 牛初乳から分離された*L. m*の遺伝子型が、患者由来の3株と一致し、患者由来株1株が類似したパターンを示した。
 - 牛初乳由来株は、血清型が1/2bおよび4bで、患者由来株に多くみられる型と一致し、病原性に関連する遺伝子も陽性を示した。
 - 牛初乳由来株は、EC II（アメリカで大規模な食中毒を引き起こした流行株）のマーカ―遺伝子も検出された。
- 
- 牛初乳もヒトと動物のリステリア症の原因となる可能性が強く示唆された。



L. m 検出を試みた初乳サプリメント

商品名	製造会社	国	形状
たたかう初乳	小林製薬株式会社	日本	タブレット
ALTERNATIF THE POWER OF NATURE Colosrum 600	Immuno Laboratories Ltd	New Zealand	Tablet
NZ health naturally colostrum	NZ Health Naturally Ltd	New Zealand	Tablet
COLOSTRUM Boosts Immune Function Vanilla Flavour	body by nature	New Zealand	Tablet
“healthy as a COW” colostrum ・ IgG	Pro-life NZ Ltd	New Zealand	Tablet
Chewable Colostrum for Kids	Nutri Cology	New Zealand	Tablet
100% Pure Colostrum	Good Health Products Ltd	New Zealand	powder
Colostrum Powder 100% Bovine Colostrum	Health &Herbs International Ltd	New Zealand	powder
Bio Active Colostrum	Bio Active Technologies International Ltd	New Zealand	powder
100% PURE COLOSTRUM	Nutra-Life Health & Fitness (NZ) Ltd	New Zealand	powder
Colostrum Gold Liquid-Flavoured	KIRKMAN	New Zealand	liquid
colostrum Milká Shake	MORLIFE PTY Ltd	Australia	powder
COLOSTRUM POWDER	SOURCE NATURALS, INC	U.S.A.	powder
Colostrum PLUS	Naturade, Inc	U.S.A.	powder
Colostrum 100% Pure Powder	NOW FOODS	U.S.A.	powder
初乳	(有)ソフィア	日本	粉末

Prevalence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in bovine colostrum

Journal of Food Protection

Hasegawa, M., Tanohata, Y., Ochiai, Y., Ueda, F., Yoshida, T., Kawamoto, K., and Hirai, K.



今後の研究

1. 全国の黒毛和牛におけるリステリア菌の保菌状況と分離菌の分子生物学的性状
2. 全国の黒毛和牛肉におけるリステリア菌の保菌状況と分離菌の分子生物学的性状
3. 北海道産ホルスタイン雄肉牛におけるリステリア菌の保菌状況と分離菌の分子生物学的性状
4. 牛初乳由来腸内細菌、*Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*および*Enterobacter*の薬剤耐性の保有状況

