

リステリア菌の疫学的研究

特に、黒毛和牛由来リステリア菌の
分子疫学的研究

○長谷川めぐみ、岩渕絵里子、高島郁夫



Listeria monocytogenes (L. m)

低温でも増殖する

低温でも、長期保存により増殖し、食中毒を引き起こす。

致死率が高い

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・死産の原因にもなる。



L. m による食中毒事例

アメリカ

年間約1,600人が罹患し、約260人が死亡。
2011年、メロンを原因とする食中毒が発生し、
146名が罹患、30名が死亡。



牧畜用トラックが
汚染源

EU

年間約1,600人が罹患し、約270人が死亡。
2010年には、肉製品および魚製品を原因とする
食中毒が発生している。

日本

北海道十勝のナチュラルチーズに起因する事例のみ。
罹患者38名、死亡者なし。



肉牛における*L. m*の調査報告

国	報告年	場所	検体	検体数	陽性率(%)
アメリカ Mohammed et al	2010	繁殖農家	仔牛	705	3.7
			牛	1,761	3.1
		肥育農家	牛	975	0.3
スペイン Esteban et al	2009	農家	群れ(混合検体)	124	30.6
			個体(陽性の群れ)	39	7.7
オーストラリア Bailey et al	2003	農家	肥育牛	100	0
			放牧牛	100	0
日本 Iida et al	1998	屠畜場 (全国)	牛の大腸内容物	9,539	2.0
日本 Takahashi et al	2007	屠畜場 (岩手県)	牛の大腸内容物	60	0
			皮膚	60	5.0



研究の目的

- 全国3地域：北海道、中部および九州における黒毛和牛の*L. m*汚染の実態を明らかにする。
- 分離株の性状を解析し、また、ヒトおよび動物の症例由来株と分子疫学的に比較解析する。
- 農水省では、昨年から疫学的基礎資料のため、大学や研究所などに委嘱し、野菜や乳製品などの全国的な調査を開始している。

和牛肉製品の*L. m*汚染の基礎資料を提供する。



牛糞からの *L. m* の分離

牛糞25gをブイヨン培地225mlで、4°C2週間増菌



UVM培地で、30°C24時間増菌



Fraser Brothで、35°C48時間増菌



Oxford 寒天培地およびCHROM agar™ *Listeria*

寒天培地に塗抹し、*L. m*を選択分離



L. m の性状解析

血清型別

診断用抗血清を用いた。

病原性に関わる遺伝子

PCRにて、病原性の指標となる遺伝子 *inlA*, *inlC* および *inlJ* を解析した。

遺伝子型別

パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) を用い、Pulse Net USA のプロトコルに準じた。

薬剤感受性試験

微量液体希釈法により、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。



黒毛和牛からの *L.m* 分離結果

北海道

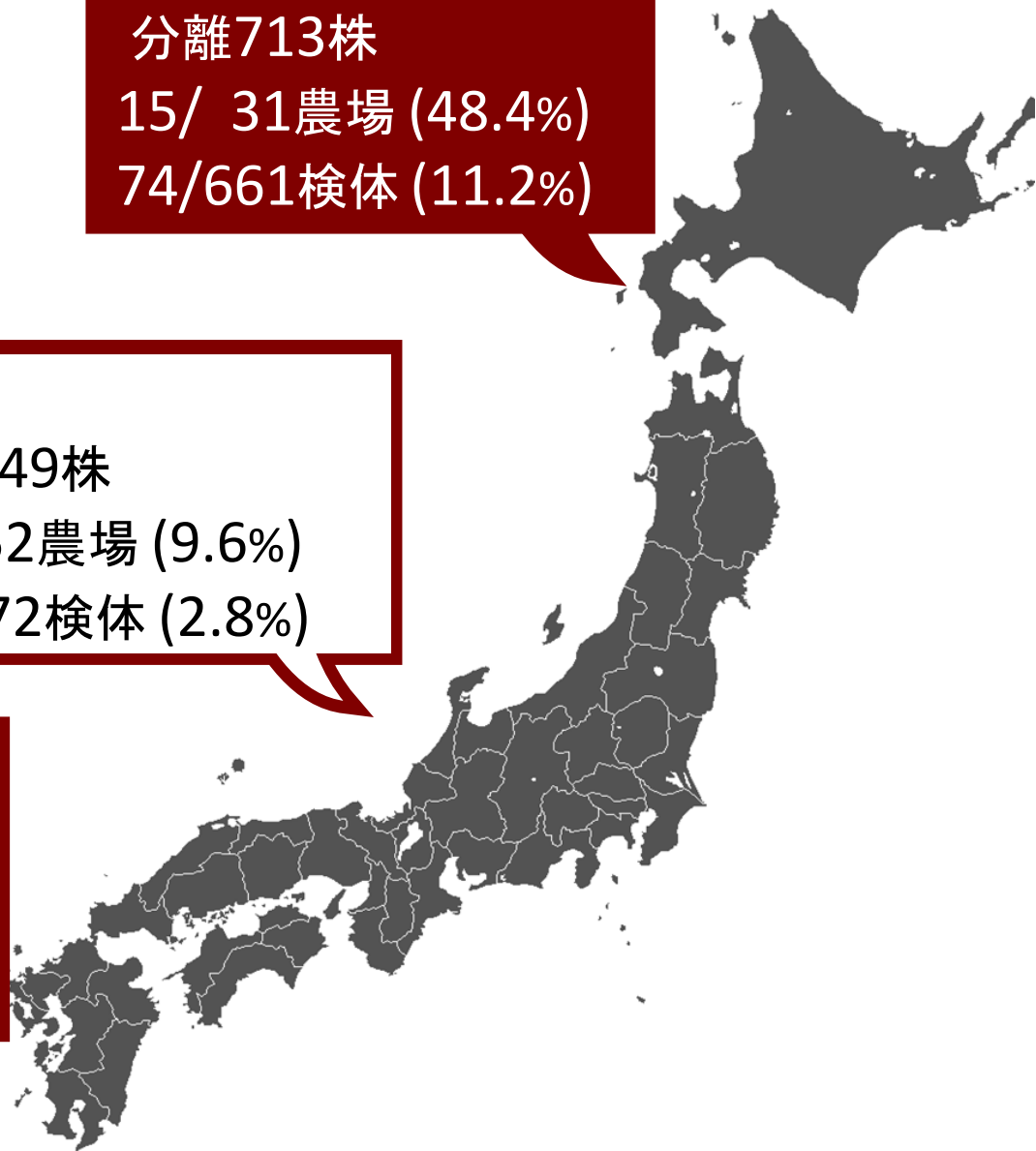
分離713株
15/ 31農場 (48.4%)
74/661検体 (11.2%)

中部

分離149株
5/ 52農場 (9.6%)
16/572検体 (2.8%)

九州

分離134株
4/ 47農場 (8.5%)
15/515検体 (2.9%)



牛糞由来 *L. m* の血清型

	北海道	中部	九州
1/2a	278 (39.0)	80 (53.7)	10 (7.5)
1/2b	339 (47.5)		64 (47.8)
4b	86 (12.1)	69 (46.3)	60 (44.8)
4ab	10 (1.4)		
合計	713 (100)	149 (100)	134 (100)

株数(%)



牛糞由来 *L. m* の血清型(農家別)

血清型	北海道	中部	九州
1/2a	2(13)	2(40)	1(25)
1/2b	3(20)		2(50)
4b	1(7)	3(60)	1(25)
1/2a, 1/2b	3(20)		
1/2b, 4b	1(7)		
1/2b, 4ab	1(7)		
1/2a, 1/2b, 4b	4(27)		
合計	15(100)	5(100)	4(100)

農家数(%)



L. mの薬剤耐性に関する報告

国	アメリカ	アメリカ	イタリア	レバノン	中国	日本
報告年	2005	2009	2009	2009	2007	2011
由来	酪農場	動物、ヒト 食品、環境	食品	乳製品	食品	患者、食品 環境
供試株数	38	90	200	30	72	201
ペニシリン	15(39)	0(0)	0(0)	27(90)	0(0)	
オキサシリン		89(99)	196(98)	28(93)		
アンピシリン	35(92)	0(0)	4(2)	18(60)		0(0)
アモキシシリン	0(0)					
ゲンタマイシン	0(0)	0(0)	0(0)	2(7)	0(0)	0(0)
カナマイシン	0(0)				1(1)	0(0)
ストレプトマイシン	38(100)	0(0)			0(0)	
エリスロマイシン	0(0)	0(0)	4.8(2)	8(27)	0(0)	0(0)
バンコマイシン	0(0)	0(0)	1.6(1)	8(27)		0(0)
テトラサイクリン	17(45)	1(1)	1.6(1)	6(20)	0(0)	
ホスホマイシン			194(97)			
シプロフロキサシン		2(2)	3.2(2)		1(1)	
ST合剤		0(0)	3.2(2)	5(17)	13(19)	

菌株数(陽性率%)



和牛由来*L. m*の各薬剤に対するMIC値

薬剤	濃度 (μg/ml)														
	0.16	0.31	0.62	<0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	128<
ペニシリン				17	223	75									
オキサシリン								6	281	28					
アンピシリン				7	145	155	8								
アモキシシリン				9	272	34									
ゲンタマイシン				75	189	47	4								
カナマイシン						7	130	139	36	3					
ストレプトマイシン							1	49	194	70	1				
エリスロマイシン				2	295	18									
バンコマイシン						6	309								
テトラサイクリン					14	192	109								
クロラムフェニコール									58	257					
ホスホマイシン												9	14	5	287
シプロフロキサシン						15	278	20	2						
ST合剤	1	176	138												

数字は株数を示す。

供試315株の感受性結果



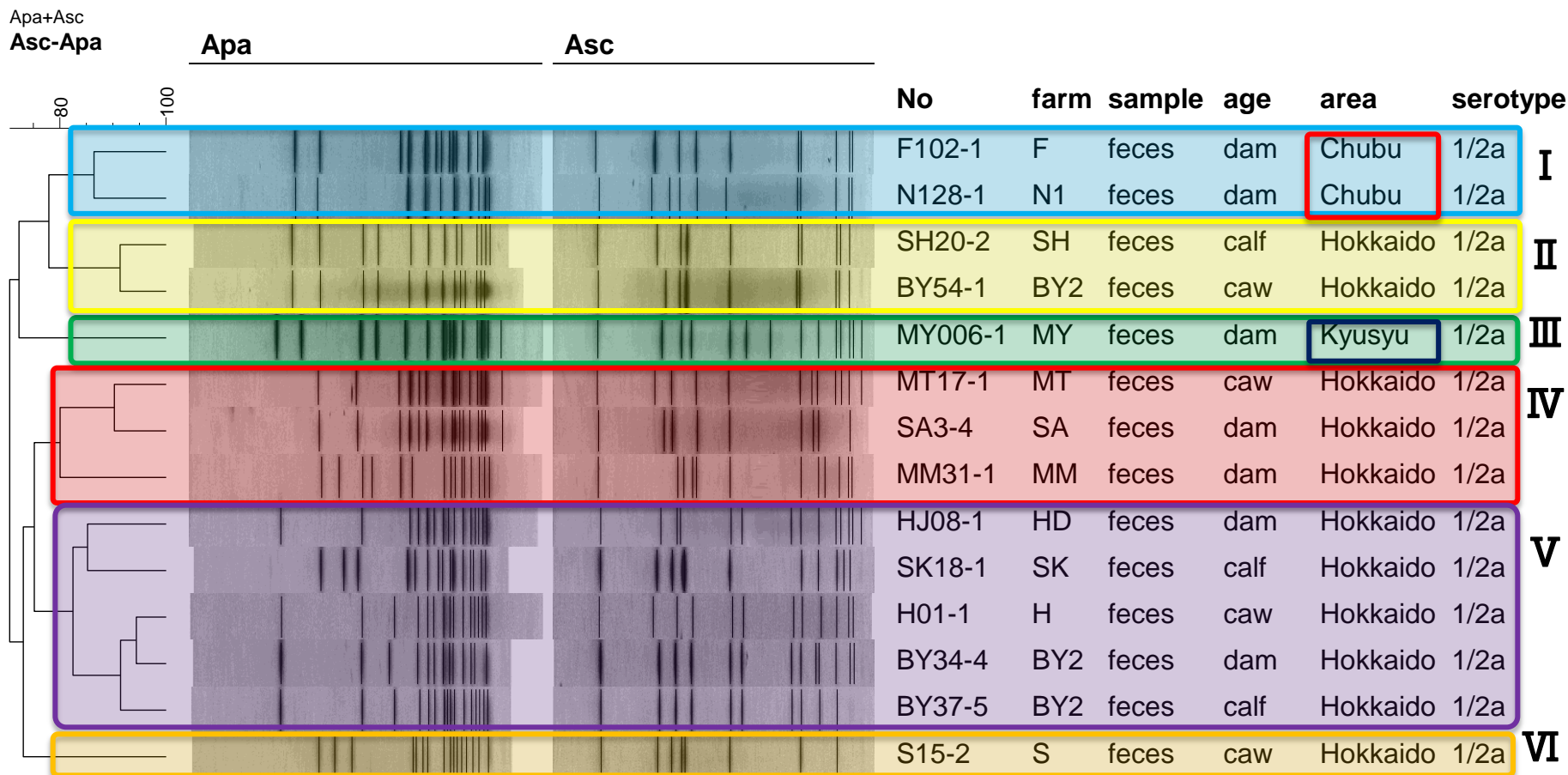
分離36株の病原性遺伝子の保有状況

病原性遺伝子	北海道	中部	九州
<i>inlA, inlC, inlJ</i>	27(96)	2(50)	4(100)
<i>inlA, inlC</i>	1(4)	2(50)	
合計	28(100)	4(100)	4(100)

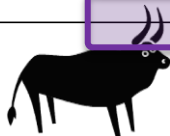
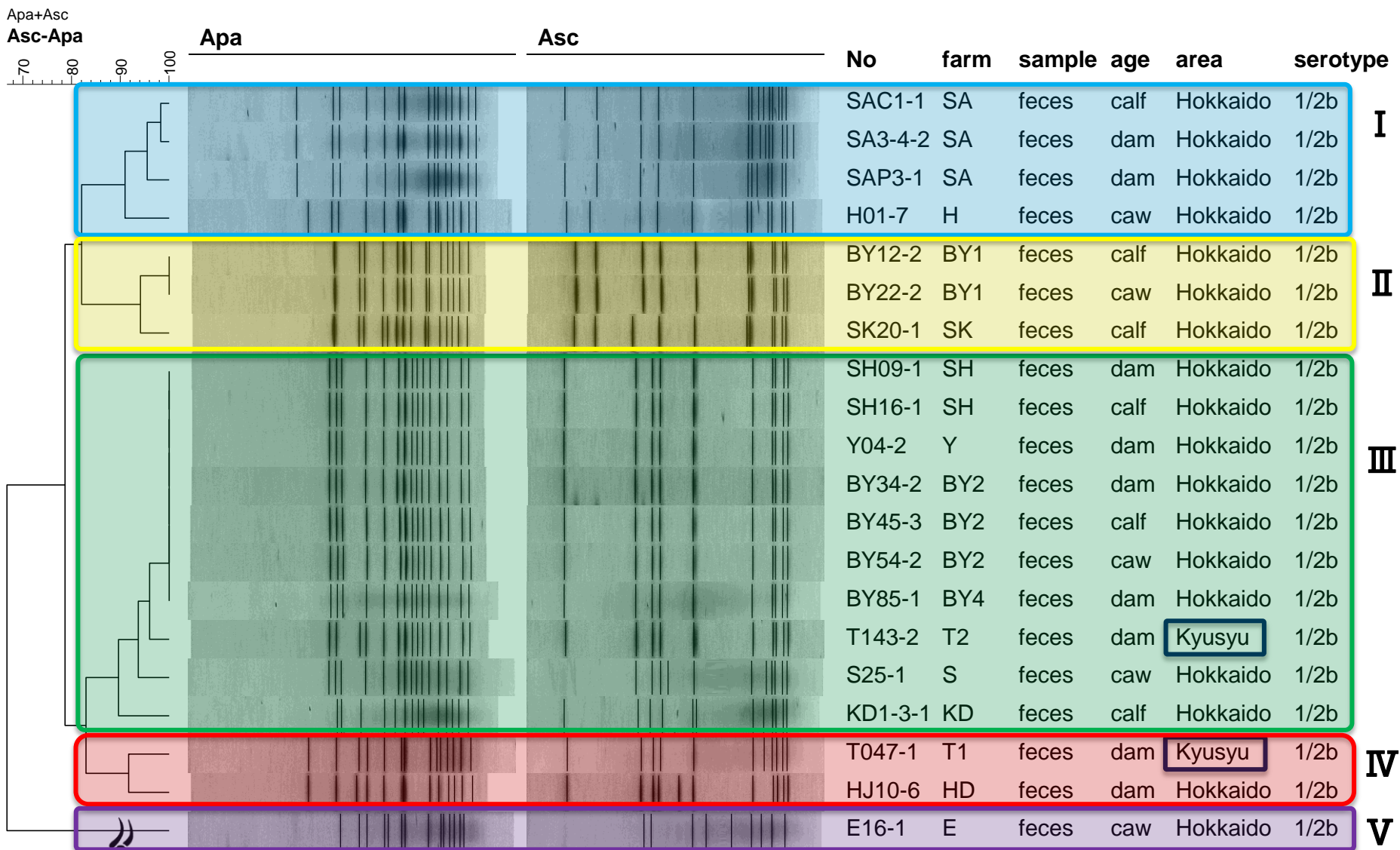
数字は供試株数(陽性率)



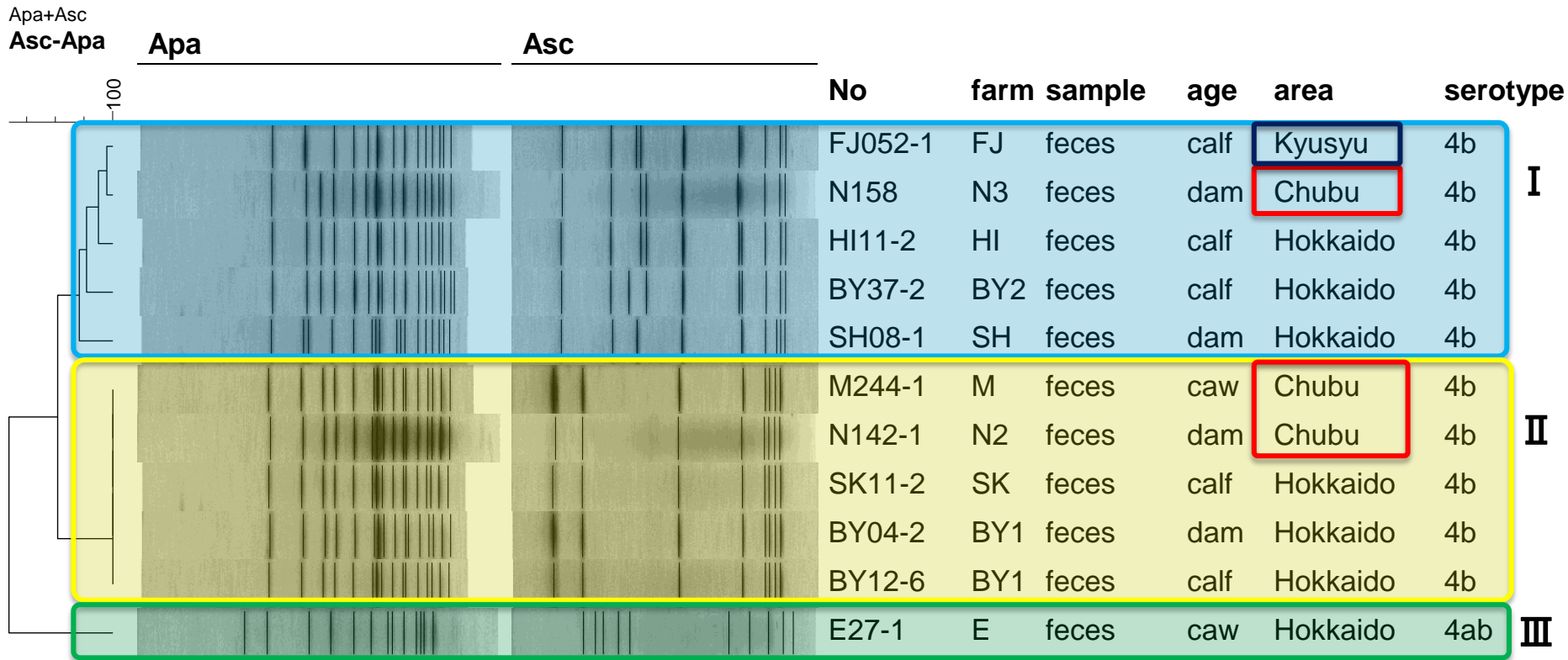
PFGEによる遺伝子型別 (1/2a株)



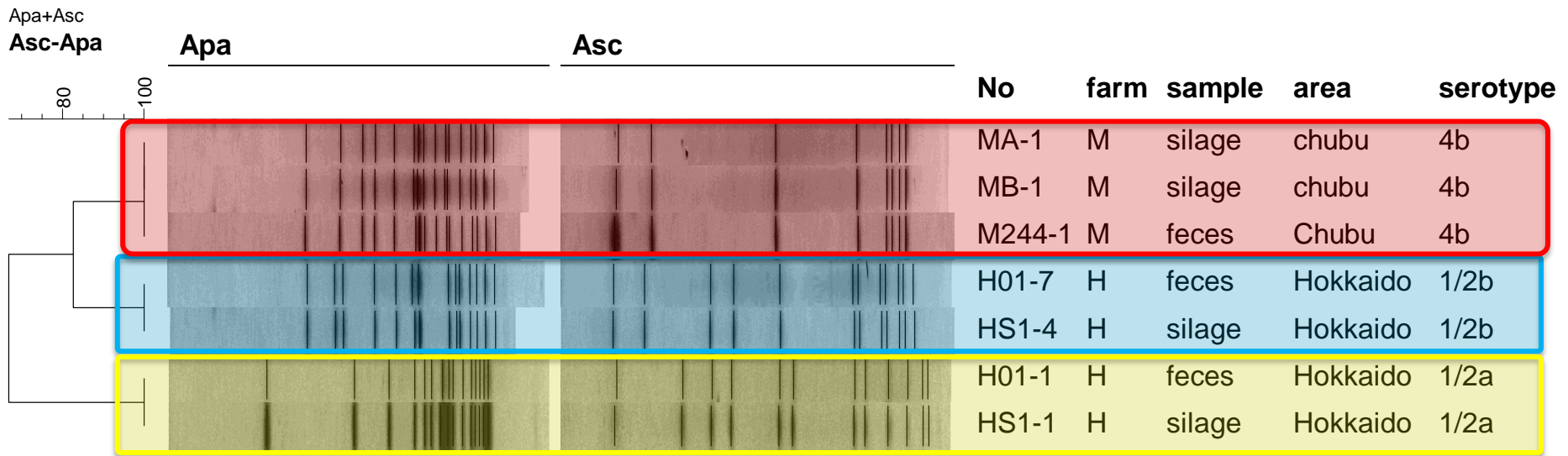
PFGEによる遺伝子型別 (1/2b)



PFGEによる遺伝子型別 (4b・4ab)



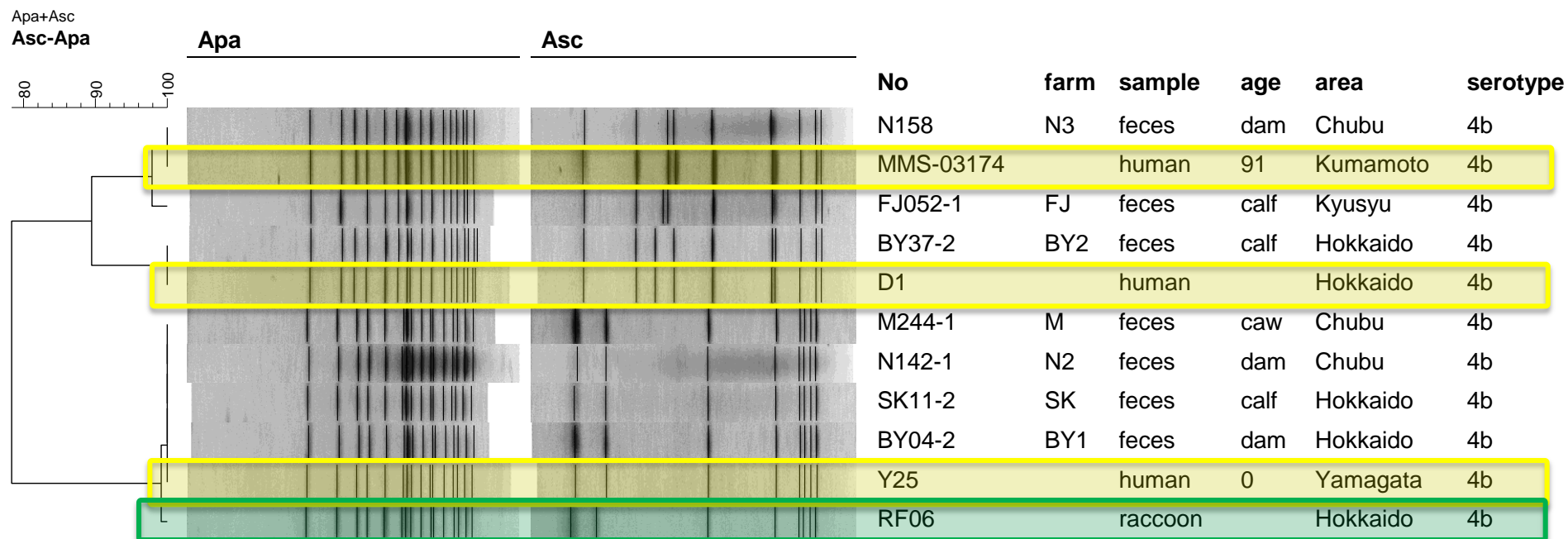
サイレージ由来株の遺伝子型



- サイレージは、牧草などを乳酸発酵させてpHを低下させ、有害微生物の増殖を防ぎ、長期貯蔵できる。
- *L. m*は、**pH4.4**~9.4で増殖可能であるため、乳酸発酵が不良なサイレージでは増殖し、農場環境を汚染する。



リステリア症患者、黒毛和牛および アライグマ由来株の遺伝子型



ヒト症例由来株との遺伝子型の比較解析

番号	由来	地域	分離年	血清型	和牛由のクラスター
O-02		北海道	2001	1/2a	1/2a- II (H-84%)
O-03		北海道	2001	4b	4b- I (H-98%, C-88%, K-86%)
O-11	食中毒(チーズ)	北海道	2001	1/2b	
D1	静脈血	北海道	2009	4b	4b- I (H-100%, C-90%, K-88%)
D2	静脈血	北海道	2009	1/2b	
S1	動脈血	北海道		4b	
S2	胸水	北海道		1/2b	1/2b- I (H-87%)
Y24	髄膜炎	青森	1991	4b	
Y25	胎児敗血症	山形	1991	4b	4b- II (H-100%, C-100%)
Y26	髄膜炎	栃木	1991	4b	4b- I (H-94%, C-98%, K-91%)
Y07	敗血症	埼玉	1988	1/2b	
MMS-03174	敗血症、髄膜炎	東京都	2003	1/2a	
Y05	敗血症、肺炎	神奈川	1991	1/2b	
Y08	脊髄髄膜炎	神奈川	1991	1/2b	1/2b-IV (H-83%, K-92%)
Y29	髄液	長野	2001	4b	4b- I (H-92%, C-92%, K-90%)
Y04	髄膜炎	鳥取	1991	1/2b	1/2b-IV (H-87%, K-92%)
Y27	髄膜炎、敗血症	愛媛	1991	4b	4b- I (H-88%, C-86%, K-83%)
Y06	敗血症	福岡	1988	1/2b	
11H	髄膜脳炎	福岡	2000	4b	4b- I (H-88%, C-88%, K-90%)
12H	髄膜炎	福岡	2002	1/2a	1/2a- V (H-92%)
MMS-03094	敗血症	熊本	2003	4b	4b- I (H-96%, C-100%, K-98%)
O-19	髄膜炎			4b	4b- II (H-98%, C-98%)
ScottA	食中毒(牛乳)	USA	1983	4b	

%は相同性を示す。

H: 北海道
C: 中部
K: 九州



まとめ1

- 北海道の黒毛和牛は、中部および九州の和牛と比較して、リステリア菌の保菌率が高かった。
- 北海道の生産農家では、約半数から、*L. m*が分離された。
- サイレージからも、*L. m*が分離され、和牛の汚染と環境の汚染要因の一つであることが示された。
- 供試315株は13薬剤に全株が感受性を示した。



まとめ2

- 全国3地域、北海道、中部および九州における和牛由来L. mの血清型および遺伝子型には、地域差が認められる株と認めれない株があった。

北海道・九州産の素牛は、他地域へ移動・肥育されること、牧草も他へ市販され利用されることから、血清型および遺伝子型が混在すると考えられる。



まとめ3

- 和牛由来*L. m*株は、ヒトのリステリア症を起こす血清型と一致し、また、病原性遺伝子も高率に保有していた。
- ヒトの症例由来株の23株中3株は、和牛由来株と遺伝子型が100%一致する株があった。

和牛由来*L. m*は、肉製品や接触などを介し、ヒトのリステリア症を起こす可能性が示された。



今後の研究

- 以上の成績は「Journal of Food Protection」に投稿準備中である。
- 全国3地域における市販和牛肉の *L. m* 汚染状況と分離株の性状解析を、進展中である。
- ヒトおよび動物の症例由来株、牛肉および牛乳由来 *L. m* の各種性状を解析し、ヒトおよび動物の症例との関連をはじめ、今後の食中毒集団発生の基礎資料を提供したい。



謝 辞

本研究の推進に当たり、ご協力いただきました
下記の先生方に、心より感謝申し上げます。

材料収集の協力者: 酪農家、全国3地区の獣医師
中部・九州の大学教員、元天使大教授 平井克哉
研究補助・協力者: 大久保由佳、田之畑由希
ヒト症例株の分与者: 落合由嗣、仲真晶子、川本恵子、
吉田徹也、牧野壯一、臨床検査センターの職員
特別研究費: 理事長、学長、学科長、山部秀子教授
畜産安全研究所の職員: 江寄、江口および村松博士

