

細菌性食中毒の原因究明と汚染源探索への  
分子生物学的手法の適用に関する研究

–*Clostridium perfringens*による食中毒の原因究明と水産加工品の  
*Listeria monocytogenes*汚染源探索への分子生物学的手法の応用–

大阪市立大学大学院 生活科学研究科 生活科学専攻

平成 17 年度

いたの なかむら ひろみ  
板野 (中村) 寛海

# 目次

緒言.....	1
第1章 <i>Clostridium perfringens</i> 食中毒の原因究明調査における分子生物学的手法 の適用.....	9
1. 緒言.....	9
2. 材料と方法.....	12
3. 結果.....	23
4. 考察.....	34
5. 小括.....	38
第2章 市販の水産加工品の <i>Listeria monocytogenes</i> 汚染状況と分離菌株の分子生 物学的手法を用いた解析.....	39
1. 緒言.....	39
2. 材料と方法.....	42
3. 結果.....	55
4. 考察.....	63
5. 小括.....	65
第3章 スモークサーモン製造工場の <i>Listeria monocytogenes</i> 汚染状況と汚染源探 索における分子生物学的手法の適用.....	66
1. 緒言.....	66
2. 材料と方法.....	66
3. 結果.....	98
4. 考察.....	112
5. 小括.....	114
第4章 スモークサーモン製造施設から分離された <i>Listeria monocytogenes</i> のバイ オフィーム形成について.....	115
1. 緒言.....	115
2. 材料と方法.....	116
3. 結果.....	121
4. 考察.....	128
5. 小括.....	130
総括.....	131
謝辞.....	134
参考文献.....	135

## 緒言

わが国では、食品衛生学的な調査や食品を介した健康被害の事件対応を、食中毒菌と認定した菌種に限定して実施する傾向がこれまで強かった。しかしながら、欧米では飲食物に起因する健康被害をすべて Foodborne disease として、網羅的に対応しようとしている<sup>1)</sup>。このような世界情勢を踏まえて、わが国においても「伝染病予防法」が廃止されて「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）」が制定され、1999年4月より施行されている。同年には食品衛生法の一部が改正され、これまで伝染病菌とされてきた赤痢菌、チフス菌、パラチフスA菌、コレラ菌を食中毒原因菌とすることが可能になると同時に、リステリア、エロモナス、プレシオモナス等の新たな菌種が追加された<sup>2)</sup>。すなわち、飲食に起因する健康被害はすべて食中毒と位置づけられるようになり、これまで以上に幅広い菌種を視野に入れて対応することが求められるようになってきている。

平成16年の食中毒発生状況によると<sup>3)</sup>、わが国の食中毒事件数は1,666件で、患者数は28,175人であった。患者数は前年よりも減少したものの、事件数は前年の1,585件に比べて81件増加している。1,666件のうち患者1人の事例が678件(40.7%)を占めており、患者1人のいわゆる散発の食中毒事例が増加する傾向が見られる。一方、原因食品の判明した事例は、2人以上の事例が79.9%(789件)であったのに対して、1人の事例では12.7%(86件)であった。このように、散発事例の増加によって原因食品の究明はますます困難になってきている。

散発の食中毒事例増加の背景には、食品の大量生産と流通機能の発達、および衛生管理技術の向上や輸入食品の増加などが一要因として考えられる。すなわち、低レベルの汚染食品や食材が大量広域に配送されるようになった結果として、一見して散発的に発生している複数の食中毒事例が、実は同一の食品による広域拡散事例であることが明らかとなる例が増えている。このような事例は diffuse outbreak と呼ばれ<sup>4)</sup>、わが国においても、イカ、菓子原因の全国的なサルモネラ食中毒(1999年)<sup>5)</sup>や、北海道産イクラの醤油漬(1998年)<sup>6)</sup>および輸入冷凍牛肉(2001年)<sup>7)</sup>が原因の全国的な腸管出血性大腸菌 O157 感染症が実際に発生し、報告されている。Diffuse outbreak が発生した場合には、原因を迅速に特定しなければ被害の拡大を阻止でき

ないが、その原因究明や因果関係の立証は非常に困難である。

このような食中毒の原因究明には、原因となる病原体を患者および食品の双方から検出・同定し、分離された病原体と当該事件との因果関係を科学的に立証することが不可欠である。分離された細菌の型別法には大きく分けて2種類ある。1つは表現型に基づく型別 (phenotyping) であり、もう1つは遺伝子型に基づく型別 (genotyping) である<sup>8, 9)</sup>。表現型に基づく型別法には、菌の生化学性状に基づく型別、血清型別、薬剤感受性による型別、ファージ型別、バクテリオシン型別などがあり、古くから行われている。これらは遺伝子産物であるタンパク質をもとに特徴付ける方法である。これに対して遺伝子型別法は、病原体の染色体やプラスミドの構成成分である DNA の配列の多様性を利用した解析法であり、疫学領域では分子生物学的手法ともいわれ、近年急速に普及している。

これらの型別法にはそれぞれ一長一短があるが、全ての型別法において、型別能力 (typeability)、再現性 (reproducibility)、識別能力 (discriminatory power)、手技の容易さ、コストなどが評価する上での重要な基準となり、使用者はこれらを熟知した上で用いることが求められる。一般的に従来から行われてきた表現型に基づく型別法は遺伝子型別法に比較して、識別能力は劣るとされる<sup>8)</sup>。以下、各型別法の特徴について述べる。

生化学性状に基づく型別は、菌の代謝活性に基づいて種々の生物型に分類する方法である。調べようとする病原細菌の生化学性状は、多ければ多いほど識別能力は高くなるが、あまりにも多くの生物型に分類されすぎると疫学調査に適さない。Tenoverらは<sup>10)</sup>、集団発生の患者から分離された *Staphylococcus aureus* を用いて表現型あるいは遺伝子型の種々の型別法を比較した結果、生化学性状に基づく型別法では同一事例由来の菌株が多くの異なる生物型に分類されてしまうことを報告している。しかしながら、菌の生化学性状は比較的容易に調べられることから、分子生物学的手法とともに併用することにより疫学調査に有用とされる<sup>11)</sup>。

菌の血清型別は、細菌に感染した宿主 (哺乳類) が認識する病原細菌の抗原決定基 (多糖類やリポ多糖, タンパク質) に基づく分類法である。細菌に感染した宿主動物は、血中に病原細菌の抗原が存在すれば、抗原の三次元構造の違いを認識して、これらに特異的な抗体を作り出す。血清型別は、特異抗体を含む抗血清との反応性を利用した型別方法である。血清型別の問題点としては、同一菌種間あるいは異なる菌種間

で交差反応が見られるため、疑陽性と判定される危険性があることや、菌株によっては、菌体表層に抗原決定基を発現していないものがあり、型別不能になってしまうことが挙げられる。血清型別試験は、市販の型別用抗血清を利用したり、自家調製した抗血清を用いたりして手軽に行えるが、血清が高価であり、試験に多くの労力を必要とすることから、腸管出血性大腸菌 O157 のような特殊な細菌のスクリーニングを除き、血清型別を業務とする試験機関へ依頼することが多い<sup>11)</sup>。

細菌はそれぞれ異なる薬剤感受性を示すことから、薬剤耐性パターンもしばしば菌株の分類に用いられる。しかしながら、薬剤耐性に関わる遺伝子はプラスミドやトランスポゾンなど可動性の遺伝子上にコードされていることが多く、容易に獲得したり、脱落したりすることが多いため、薬剤耐性パターンは疫学調査に応用するほどの識別能力を有しないとされる。しかしながら、ニューヨークにおいて、煩雑な分子生物学的手法でしか特定することのできない多剤耐性結核菌が特定の薬剤（カナマイシン）に耐性を有することがわかり、カナマイシン耐性を多剤耐性結核菌のスクリーニングに使用し、実際に役立った事例があるように、薬剤耐性が分子生物学的手法による解析を容易にすることがある<sup>11)</sup>。

ファージ型別は、バクテリオファージに対する細菌の感受性を調べ、菌の溶菌パターンの違いによって菌株を分類する方法である。ファージ型別は、*Staphylococcus aureus* や *Salmonella* Typhi で実際の疫学調査に応用されているが、他の血清型の *Salmonella* や多くの病原細菌では行われていない。欧米や豪州で *Salmonella* Typhimurium や *Salmonella* Enteritidis<sup>11)</sup> および腸管出血性大腸菌 O157<sup>12)</sup> の疫学調査にファージ型別が利用され、その有用性が示されたが、型別用ファージの維持が難しいことや、型別に特殊な技術が必要とされることから広く普及していない<sup>11)</sup>。

バクテリオシン型別はファージ型別と同様にバクテリオシン（他の細菌によって産生され、試験菌の増殖を阻害するタンパク）に対する感受性を調べ、これらの感受性パターンによって分類する方法であるが、現在ではあまり用いられていない<sup>11)</sup>。

以上のような表現型に基づく分類法に対して、遺伝子型別法には染色体外 DNA であるプラスミドを利用したプラスミドプロファイル<sup>9, 13)</sup>、ゲノム DNA の多様性を利用した pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法<sup>8, 13)</sup>、insertion sequence (IS) タイピング法<sup>11)</sup>、リボタイピング法<sup>11)</sup>、DNA マイクロアレイ法<sup>13)</sup>、全塩基配列の解析<sup>11)</sup>がある。また、PCR 法を応用した型別法として、random amplified polymorphic

DNA (RAPD) あるいは arbitrarily primed PCR (AP-PCR) 法<sup>14)</sup>, repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) 法<sup>14)</sup>, enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) 法<sup>14)</sup>, amplified fragment length polymorphism (AFLP) 法<sup>8, 13)</sup>, multilocus sequence typing (MLST) 法<sup>13)</sup>があり, 実際の事例に適用されている. 以下, 遺伝子型を用いた各型別法の特徴について述べる.

プラスミドプロファイルとは, 細菌の染色体外 DNA であるプラスミドを用いて分類する方法である. プラスミド上には薬剤耐性遺伝子, 病原遺伝子や細菌が生存するために有利な機能を持つタンパク質をコードする遺伝子が存在し, 増殖や代謝に関わるような, いわゆるハウスキーピング遺伝子は存在しないことが多い. プラスミドを用いた型別法は細菌の持つプラスミドの種類や分子量の違いに基づいて分類する方法である. 細菌はそれぞれ異なる分子量のプラスミドを保有していることから, 細菌から抽出したプラスミドをアガロースゲル電気泳動で分離することにより, 違ったバンドパターンすなわちプロファイルが得られる. 本型別法は, *Salmonella Typhimurium* において, フェージ型別や薬剤感受性試験よりもすぐれた株間の識別能を有すると報告されている<sup>15)</sup>. しかしながら, 本型別法の欠点としては, 細菌が少なくとも1つのプラスミドを保有していなければならないことや, 識別能力は菌株が保有するプラスミドの数に依存することが挙げられる. また, 菌株を長期に保管したり, 細菌がおかれる環境によっては, プラスミドを脱落したり獲得したりする場合があります. 再現性にも問題点がある. しかしながら, プラスミドプロファイルは, 特別な装置や技術を必要とせず, 培養後すぐ (1日以内) の菌株を解析すれば結果の解釈も容易であることから, 菌種によっては疫学調査への応用は有用である<sup>11)</sup>.

PFGE 法は, 1984年に Schwartz と Cantor らにより, 酵母の染色体 DNA の構造解析ツールとして報告された技術であるが, 実際の疫学調査に応用され始めたのは 1990年代に入ってからである<sup>8)</sup>. 本型別法は, 染色体 DNA の restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析の一種である. 通常, 染色体 DNA を制限酵素により断片化してアガロースゲル電気泳動で分離する場合, 約 40 kb を超えると断片の解析は困難となる. PFGE 法は, 巨大分子の DNA を可能な限り物理的な断片化を防ぐ特殊な DNA 抽出操作を行い, アガロースゲルに 2 方向の電場を設けて任意の時間間隔で電場の方向を交互に変化させることによって, 約 5 Mb までの巨大分子 DNA

断片の分離を可能にした<sup>16)</sup>。本型別法の利点としては、理論的には全ての細菌について型別可能であるということが挙げられる。米国においては、米国疾病管理・予防センター (Center for Disease Control and Prevention, CDC) を中心として、米国内のいくつかの州立公衆衛生研究所、連邦食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) および米国農務省 (United States Department of Agriculture, USDA) の研究室間で 1995 年以來、パルスネット (Pulse Net ; PFGE 法を用いての菌株解析ネットワーク) の構築を行うことにより、diffuse outbreak の迅速な発見においてかなりの成果を上げている。パルスネットが対象としている病原菌の中には、現時点では *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei* が含まれている<sup>11)</sup>。また、カナダや欧州連合 (EU) においてもパルスネットの構築の準備が進められており、わが国でも、2000 年から国立感染症研究所と地方衛生研究所の間でパルスネット構築が進められている。食材の国際的流通がますます盛んになる今後、国を越えての食品媒介感染症の拡大も懸念され、このような国際的なネットワークが必要となる<sup>17)</sup>。

リボタイピング法および IS タイピング法は、細菌の染色体 DNA を制限酵素で処理し、得られた DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で分離した後にナイロンあるいはニトロセルロース膜に転写し、放射性物質や蛍光物質で標識した DNA (RNA) をプローブとして核酸ハイブリダイゼーションを行い、バンドとして検出する方法である。リボタイピング法は、染色体 DNA に数ヶ所存在するリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子をターゲットにした型別法であるが、解析に用いる rRNA 遺伝子には、遺伝的多型性が比較的少ないことが問題点として挙げられる。IS タイピング法は、ヒト型結核菌の IS6110 をターゲットとした結核菌の分子疫学の標準法として確立されている<sup>11, 13)</sup>。これらの方法の問題点としては、解析手技の煩雑さが挙げられる。

DNA マイクロアレイ法は、DNA チップを用いた解析技術であり、全遺伝子の発現を一度に調べることができる方法である。1 枚のチップ上に数千から数万種類の遺伝情報を埋め込むことが可能である。サンプルとする DNA には事前に PCR やその他の核酸増幅技術で蛍光物質を取り込んでおき、チップ上でハイブリダイズして結合している部位の蛍光を検知器でとらえ、コンピュータ上で解析する。本法は細菌感染症の領域で現在最も精力的に検討が進められているが<sup>13)</sup>、現時点ではコストの面で疫学調査への応用が難しい。

病原細菌の全ゲノム配列が次々と解読され、比較ゲノム解析により病原菌と非病原菌の違いを知ろうとする試みがなされている<sup>18)</sup>。細菌の全塩基配列の解読は黄色ブドウ球菌では1週間で解析可能なスピードまで改良されているが<sup>13)</sup>、現時点では、コスト、時間および労力の面で実用化には向かない<sup>9, 17)</sup>。

PCR法を応用した遺伝子型別法は、簡易であり、短時間での大量処理が可能であり、コストが安いという点で、他の型別法に比べて優れているが、DNAのコンタミネーションなどで結果の判定基準や正確性（再現性）が問題となる場合がある。これらのうち、AP-PCR法あるいはRAPD法は、PCR法を応用した型別法として最も汎用されている。これは、1種類の短いプライマーを用いて、低いアニーリング温度で緩やかにハイブリダイズさせる条件でPCRを行う方法である。複数のランダムな領域にプライマーDNAが結合し、これらにはさまれた領域がPCRによって増幅されることによって得られたバンドパターンを比較し、その多型性を解析するというものである。本型別法の利点としては、ターゲットとする細菌DNAの塩基配列に関する情報がなくても型別可能であるという点、また、欠点としては結果の再現性の問題が挙げられる。PCR条件とテンプレートDNAの濃度が一定でなければ、再現性のあるデータを得るのは困難である。特にテンプレートとなるDNAの濃度は最も重要な因子となる。長期にわたって多くの菌株を解析する場合においては、DNAのコンタミネーションに注意が必要となる<sup>14)</sup>。

REP-PCR法およびERIC-PCR法は真性細菌において発見されたDNA上に存在する繰り返し配列、すなわち、repetitive extragenic palindromic (REP) elements あるいは intergenic repeat units とよばれる繰り返し配列や enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) 配列中に存在する保存された領域を含むプライマーによるPCR法で得られたバンドパターンに基づいて型別を行う方法である。REP配列もERIC配列も細菌の染色体上の非遺伝子領域に分散して存在し、その機能は不明である。このほかにもグラム陽性菌で初めて報告されたBOX配列と呼ばれるものがある<sup>14)</sup>。これらの配列は真性細菌に広く存在することから、本型別法は様々な病原菌に適用可能である。また、AP-PCR法あるいはRAPD法と同様、ターゲットとする細菌のDNAの塩基配列に関する情報がなくても型別可能である<sup>14)</sup>。

AFLP法は2種類の制限酵素で切断した断片に対して、特徴的なプライマー（アダプター）を結合させ、増幅した領域をキャピラリー電気泳動で分離して得られたDNA



断片を蛍光励起により検出する方法である。AFLP 法は、細菌のゲノム DNA を対象としており、前述の 2 つの方法と同様にターゲットとする細菌の DNA の塩基配列に関する情報がなくても型別可能である。AFLP 法は DNA の精製、使用する制限酵素の種類を検討する必要がある。また、プライマーカセットのデザインの煩雑さや知的所有権の問題があり、これらは容易にはできない上に、コストがかかる。さらに、ゲノム DNA が完全に消化されないと、結果の解釈に影響を及ぼすことがある<sup>13, 14)</sup>。

MLST 法は、表現型を利用した型別法で古くから行われてきた multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) の概念を複数領域の DNA 配列の比較に導入した新たな DNA 型別法である。MLEE 法は、種間で高度に保存され、容易に変化しない代謝酵素に基づく型別法であるが、MLST 法は、これらの酵素をコードする複数の DNA 配列（遺伝子座）を解読し、菌株間で配列の比較を行う型別法である。MLST 法は病原細菌に関する世界規模のサーベイランスに適用することを目的としており、これまでに *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* について解析法が樹立された。AFLP 法や MLST 法は、高額な機器を必要とすることから現時点では広く普及していないが、今後、塩基配列決定法の迅速化に伴って付加価値の高い疫学情報として利用されることが期待される型別法である<sup>13)</sup>。

分子生物学的手法を用いた細菌の型別法には、以上のように様々な種類が存在するが、実用性、簡便さ、正確さ、安全性、コスト、識別能力、解析データの蓄積、多菌種への対応などを総合的に考えると、現時点では PFGE 法が感染症原因菌の標準的型別法とされる<sup>13)</sup>。

そこで、本研究では、これまでに分子生物学的手法による疫学調査の報告が少ない *Clostridium perfringens* による食中毒の原因究明と、欧米では致死率の高い食品媒介感染症原因菌として注目されているにもかかわらず、わが国ではこれまで注目されていなかった *Listeria monocytogenes* による食品の汚染状況とその汚染経路の解明に、分子生物学的手法の応用を試みた。

第 1 章では、大阪市内で実際に発生した食中毒事例由来 *C. perfringens* の型別に PFGE 法の応用を試みた。これまで、*C. perfringens* 菌株間の異同を識別するには Hobbs の開発した抗血清との反応性に基づく型別、もしくは東京都立衛生研究所が開発した TW 抗血清との反応が用いられてきた。しかしながら、前者では国内の *C.*

*perfringens* を型別できないものが多く、後者は市販されていないために利用が制限されてきた。そこで最初に、大阪市内で実際に発生した食中毒事例由来 *C. perfringens* を対象に PFGE 法による型別を行い、血清型別による分類と比較した。次に、増菌培養法と PFGE 法の併用の可能性について検討した。第 1 章で食中毒原因菌である *C. perfringens* の疫学調査に分子生物学的手法を用いて、その有用性が示されたことから、第 2 章では、PFGE 法のみならず PCR 法を応用した型別法として AP-PCR 法、REP-PCR 法、ERIC-PCR 法を *L. monocytogenes* による食品汚染実態調査に適用した。水産加工品から分離された *L. monocytogenes* の遺伝子型は、汚染品を製造していた各施設に特有であり、各製造元に特有のタイプの菌株による汚染であることが疑われた。本調査において、製品汚染率が特に高く、特定のリステリア菌株による長期的な施設汚染が疑われる一水産加工場が認められた。そこで、第 3 章では同施設内の *L. monocytogenes* 汚染状況を把握するとともに、型別に有効であった分子生物学的手法を応用して、施設内分離株と製品由来株との異同を識別し、*L. monocytogenes* の汚染源および汚染経路の推察に応用した。特定のタイプの *L. monocytogenes* が施設内から長期にわたって繰り返し分離されることから、これらの菌株が施設内でバイオフィルムを形成している可能性が考えられた。従って、第 4 章では、分子生物学的手法により分類された特定のタイプの菌株が同製造施設に定着した理由を調べるため、*L. monocytogenes* のステンレスやプラスチックおよびガラス表面への定着性とバイオフィルム形成について調べた。

# 第1章 *Clostridium perfringens* 食中毒の原因究明調査における

## 分子生物学的手法の適用

### 1. 緒言

*Clostridium perfringens* はグラム陽性の偏性嫌気性桿菌で芽胞および莢膜を形成し、鞭毛を持たず運動性を示さない。*C. perfringens* は食中毒原因菌の一種である。食品中で増殖した1 gあたり $10^7$  CFU (colony forming unit) 以上の栄養型の *C. perfringens* が食品とともに摂取され<sup>19)</sup>、一部は胃内で死滅するが、多くが小腸上部に到達し、そこで菌が芽胞型に移行する際にエンテロトキシン (*Clostridium perfringens* enterotoxin, CPE) を産生することが原因で食中毒が引き起こされる。このCPEが *C. perfringens* 食中毒の起因物質である<sup>19)</sup>。腸管内で産生されたCPEが食中毒の発症に重要であることから、本菌による食中毒は、生体内毒素型と呼ばれる<sup>20)</sup>。

CPEは、319アミノ酸残基からなる、脂質および糖を含まずS-S結合をもたない一本鎖のポリペプチドで、分子量約35,000のタンパク毒である<sup>19, 20)</sup>。本毒素は、55°C以上の加熱で失活する易熱性毒素であり<sup>31)</sup>、pH 4以下でも失活する<sup>19, 21, 32)</sup>。このCPEは、Vero, MDCK, Caco-2などの上皮系の培養細胞に作用させると、これらの細胞膜上に存在するクローデインに結合し、高分子の複合体(チャンネル)を形成する。この細胞膜上に形成されたチャンネルを通じてイオン・低分子が非選択的に透過し、細胞外からカルシウムイオンが細胞内に流入することによって、さらに高分子成分が透過するようになる。その結果、細胞は膜構造が破壊されて水泡を形成しながら膨潤して死滅する。従って、細胞膜上にクローデインが存在しない筋肉由来細胞や繊維芽細胞はCPEに感受性がない。CPEの受容体となるクローデインは、分子量約23 kDaのタイトジャンクションを構成する4回膜貫通型の膜タンパクであり、多数の分子種からなる大きなファミリーを形成している<sup>21)</sup>。一方、CPE分子のC末端にある30アミノ酸残基の領域にクローデインへの結合部位が存在し<sup>22)</sup>、C末端領域でクローデインと結合したCPEは、相互に会合してホモオリゴマーからなる膜孔を形成すると考えられている。CPEが標的細胞に結合した直後に比較的小さな膜孔を形成し、そ

の際、膜孔を拡大して最終的に細胞を破壊し<sup>21)</sup>、その結果下痢が引き起こされると考えられている。CPE をコードするエンテロトキシン遺伝子 (*cpe*) は *C. perfringens* 染色体 DNA の可変領域に 1 コピー存在する。*cpe* 遺伝子は食中毒由来株ではトランスポゾン上に存在し、2つのハウスキーピング遺伝子 (*uapC* と *nadC*) の間に位置する。このトランスポゾンは欠損させることが可能であることから、これが食中毒由来株の中に時々エンテロトキシン非産生株が存在する理由の一つと考えられている。一方、動物由来株や非食中毒性の下痢患者由来株の *cpe* 遺伝子は巨大プラスミド上に存在することが知られている<sup>22)</sup>。CPE 産生は菌の増殖とは関係なく、芽胞形成時にのみ起こる。*cpe* 遺伝子保有株では芽胞形成時に産生される全タンパクの 15~30%程度が CPE であるとされる。芽胞非形成株を用いた実験により、CPE は栄養型細胞の分裂増殖時には少量しか産生されないのに対して、芽胞形成時には大量に産生されることが明らかとなった。すなわち、CPE は菌体から分泌されるのではなく、菌体が溶菌するときに芽胞とともに放出される<sup>22)</sup>。

*C. perfringens* 食中毒の主症状は、8~12 時間の潜伏時間の後に激しい下痢と下部腹痛を呈するものであるが、通常 12~24 時間以内に回復し、予後は良好である。まれに、基礎疾患のある患者、特に高齢者で死の転帰をとることがある<sup>23)</sup>。

わが国における *C. perfringens* 食中毒事件数は、年間 9~27 件 (平均 22 件程度) で、それほど多くはない。しかしながら、1 事例あたりの患者数は平均 103.2 名で他の細菌性食中毒に比べて非常に多い<sup>24)</sup>。大阪市内においても、1996 年に 2 件、1997 から 2003 年までは毎年 1 件の *C. perfringens* 食中毒が発生しており<sup>25)</sup>、事件数はそれほど多くはないものの、患者数は年平均 86.9 名にのぼる。全国的な傾向と同様、1 事件あたりの患者数が多い。これは、本菌による食中毒が大量調理施設で発生しやすいことに起因している。

*C. perfringens* 食中毒の発生には、食品中で本菌が大量に増殖する必要がある。食肉など本菌に汚染された食品が加熱調理されることによって、食品中の溶存酸素が追い出され、*C. perfringens* の発育に適した嫌気状態になる。また、食品中に存在していた他の競合菌が死滅し、*C. perfringens* の芽胞だけが残る。この状態で数時間から一晩以上放置されることによって食品中で *C. perfringens* が速やかに増殖する<sup>24)</sup>。

*C. perfringens* は、一般的な食中毒菌に比べて至適発育温度帯が高く 43~45 °C 付近であることや<sup>26)</sup>、世代交代時間が大腸菌の半分のわずか 10 分であることから<sup>26)</sup>、加

熱終了後の食品中で温度の低下とともに急速に増殖するため、食中毒を起こしやすい。特に食肉は還元性物質を豊富に含み、嫌気的環境をつくりやすい食品であることから、欧米で *C. perfringens* 食中毒の原因食品といえ、ほとんどが加熱調理食肉である<sup>23)</sup>。

*C. perfringens* は環境中に偏在しており、土壌中には 1 g あたり  $10^3$  から  $10^4$  CFU の菌の存在が認められる。また、生あるいは冷凍食肉の約 50% が本菌に汚染されているとされており<sup>26)</sup>、食肉の中では特に鶏肉における汚染が著しい。埃や家畜の腸管内にも常在する。動物や環境由来 *C. perfringens* について *cpe* 遺伝子の保有状況を調べた結果、これらの菌株のうち食中毒の原因として重要である *cpe* 遺伝子保有株は 5% 未満であるとされている<sup>26)</sup>。また、本菌はヒト腸管内の常在細菌叢を構成する細菌の一種であり、健康なヒトの糞便中に 1 g あたり  $10^3$  から  $10^6$  CFU の *C. perfringens* が存在する<sup>26)</sup>。わが国においては健康人糞便において平均 14~17.5% から耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌が<sup>28, 29, 30)</sup>、また 1% から CPE 産生株が検出されている<sup>28)</sup>。このため、本菌を食中毒の原因微生物と断定するには、常在菌との区別が重要であり、以下のような細菌学的確認試験が必要とされる<sup>27)</sup>。

- i) 患者糞便 1 g 中に  $10^6$  CFU 以上の *C. perfringens* 芽胞が認められること。
- ii) 患者便中に CPE の存在が確認されること。
- iii) 原因と推定される食品 1 g 中に  $10^5$  CFU 以上の栄養型菌が存在すること。
- iv) 患者および食品から分離される *C. perfringens* の血清型が一致すること。

これらは古くから *C. perfringens* 食中毒を判定するための条件として用いられてきた。しかしながら、近年いくつかの問題点が含まれることがわかってきた。すなわち、i) については、高齢者では健康人でも糞便中に大量の *C. perfringens* の芽胞を含んでいること、iv) については、*C. perfringens* 株の比較には血清型別試験が一般的に用いられるが、特に米国と日本においては、市販の血清型に該当しない菌株がほとんどであるということである<sup>26)</sup>。

*C. perfringens* の血清群には、開発者 Hobbs の名に因んだ Hobbs 型と日本特有の TW 型がある。それぞれの抗血清の特異性を決める抗原は、主としてグルコース、ガラクトース、ガラクトサミン、グルコサミンなどからなる莢膜多糖である<sup>19)</sup>。Hobbs には現在 90 以上の血清群が知られているが、わが国では型別用血清はわずか 17 型しか市販されていない<sup>19)</sup>。また、食中毒起因 *C. perfringens* であっても、これらの血清型に該当しないことが多い<sup>28, 31)</sup>。Hobbs の血清型以外に東京都立衛生研究所（現

在の東京都健康安全研究センター) が提唱している TW の血清型<sup>30)</sup>があるが、現在のところ診断用血清の市販に至っていない。

本菌による食中毒は予後が良好で、下痢の回復とともに患者便中の CPE は急減するので、発病後 3 日を過ぎると検出不可能となり<sup>23, 26)</sup>、また患者便中の *C. perfringens* 芽胞数も急激に減少する<sup>32)</sup>。すなわち、上記の細菌学的確認試験によって *C. perfringens* 食中毒を確定するには、急性期の患者便を入手しなければ困難となる。

そこで、本研究では、大阪市内の食中毒原因究明調査より分離された *C. perfringens* 菌株の比較を血清型別試験およびパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) 法を用いて行い、PFGE の菌株識別能について検討を行うとともに、分離菌株の *cpe* 遺伝子保有状況について調べた。次に、疫学的に *C. perfringens* が原因として強く疑われたが、糞便の直接塗抹法では検出率が低く、患者便の増菌培養を行うことにより高率に本菌が分離された事例において、直接塗抹法および増菌培養法で分離された *C. perfringens* 株について同様に解析を行った。上記のように、*C. perfringens* はヒトの腸内に常在しており、増菌培養法を用いた検出では原因菌と常在菌の区別がつけられなくなるので食中毒事件の調査に用いるべきではないとされてきたが、分子生物学的手法により、常在菌と原因菌を識別できれば、増菌培養法を用いることも可能であると考え、その適用の可否を探った。

## 2. 材料と方法

### (1) 使用菌株

大阪市内で分離された *C. perfringens* の PFGE 法による解析には、1996 年から 2005 年の間に行われた大阪市内の食中毒原因究明調査で、患者便、調理人便および食品から分離された 7 事例由来 82 株の *C. perfringens* を使用した (Table 1)。増菌培養法と PFGE 法の併用による *C. perfringens* 食中毒の解析には、2001 および 2002 年に大阪市内の食中毒調査において 2 事例から分離された 102 株の *C. perfringens* を使用した (Table 3)。

### (2) 増菌培養法を適用した食中毒事例の概要

事例 8 は 2001 年 10 月 11 日に発生した。給食弁当を喫食した 464 名のうち 161 名 (34.7%) が発症し、患者の症状は、下痢 (96.9%)、腹痛 (67.7%)、倦怠感 (11.2%)、悪寒 (6.8%)、発熱 (5.0%)、嘔吐 (3.1%) であった。発症までの潜伏時間は約 11 時間であった。研究所に患者便が搬入されたのが 10 月 16 日であり、下痢の発症からは 4 日が経過していた。患者便から *C. perfringens* 以外の食中毒原因微生物は検出されず、*C. perfringens* が食中毒の原因として強く疑われたが、糞便中の菌数が非常に少なく、患者からの検出率も低かった。そこで、患者便を加熱処理後に増菌培養を行ったところ、94 株の *C. perfringens* が分離された。これらのうち、25 株が直接塗抹法で、69 株が増菌培養法で分離された。事例 9 は 2002 年に大阪市内の小中学校で発生した事例であり、42 名が発症した。患者糞便 21 検体中 16 検体からノロウイルスが検出され、患者は本ウイルスの典型的な症状を示していたことから、本ウイルスが原因と考えられた。しかしながら、17 名の患者のうち 8 名から *C. perfringens* が検出されたことから、事例 8 と比較を行うためのコントロールとして本事例由来株を使用した。

### (3) 培地

#### ① カナマイシン含有卵黄加 CW 寒天平板 (KMCW) 培地

蒸留水 400 ml にカナマイシン含有 CW 寒天基礎培地 (ニッスイ, #05403) 60 g を量り入れ、加温溶解後オートクレーブで 121 °C, 15 分滅菌したものを基礎培地とした。滅菌後、卵黄 1 個を滅菌生理食塩水 20 ml と無菌的に混和したものを 50 °C に冷ました基礎培地に加えて混和後分注し、平板とした。

#### ② 卵黄 GAM 寒天平板 (EY-GAM) 培地

蒸留水 400 ml に GAM 寒天培地 (ニッスイ, #05420) 74 g を量り入れ、加温溶解後オートクレーブで 115 °C, 15 分滅菌したものを基礎培地とした。滅菌後、卵黄 1 個を滅菌生理食塩水 20 ml と無菌的に混和したものを 50 °C に冷ました基礎培地に加えて混和後分注し、平板とした。

#### ③ GAM 寒天平板 (GAM) 培地

蒸留水 400 ml に GAM 寒天培地 (ニッスイ, #05420) 74 g を量り入れ, 加温溶解後オートクレーブで 115 °C, 15 分滅菌したものを分注し, 平板とした.

#### ④GAM 半流動高層培地

蒸留水 1,000 ml に GAM 半流動高層培地 (ニッスイ, #05424) 60.5 g を量り入れ, 加温溶解後, 小試験管あるいは大試験管にそれぞれ 4 あるいは 50 ml ずつ分注し, オートクレーブで 115 °C, 15 分滅菌した. 当日に使用しない培地は, 沸騰水中で 15 分加熱後急冷し, 培地中の溶存酸素を除いた.

#### ⑤チオグリコレート培地

蒸留水 1,000 ml にチオグリコール酸培地 II (ニッスイ, #05610) 28.5 g を量り入れ, 加温溶解後中試験管あるいは大試験管に 10 あるいは 50 ml ずつ分注してオートクレーブで 121 °C, 15 分滅菌後使用した. 当日に使用しない培地は, 沸騰水中で 15 分加熱後急冷し, 培地中の溶存酸素を除いた.

#### ⑥血液寒天培地

市販の生培地を使用した. すなわち, 5%ヒツジ血液加トリプトソイ寒天平板培地 (BD BBL, Franklin Lakes, NJ, USA, #251239) あるいは CDC 嫌気性菌用ヒツジ血液寒天培地 (BD BBL, #251733) を使用した.

#### ⑦1%ゼラチン加 GAM 寒天平板培地

GAM 培地 1%濃度になるようにゼラチン (BD Difco) を加えて滅菌後, 平板とした.

#### ⑧カナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地 (抗 $\alpha$ 毒素ろ紙入り)

蒸留水 400 ml にカナマイシン不含 CW 寒天基礎培地 (ニッスイ, #05401) 60 g を量り入れ, 加温溶解後オートクレーブで 121 °C, 15 分滅菌したものを基礎培地とした. 滅菌後, 卵黄 1 個を滅菌生理食塩水 20 ml と無菌的に混和したものを 50 °C に冷ました基礎培地に加えて混和後分注し, 寒天が固まる直前に乾燥 *C. perfringens* A 型抗毒素ろ紙 (ニッスイ, #05406) 1 枚を無菌的にシャーレの中央



に沈めて凝固させ、平板とした。

#### ⑨嫌気培養法

嫌気培養装置 (SANYO-FORMA, 大阪) を使用し、窒素ガス 80%, 二酸化炭素ガス 10%, 水素ガス 10%環境下でインキュベートを行った。あるいは、アネロパック・ケンキ (三菱ガス化学, 東京) と嫌気指示薬 (三菱ガス化学) を入れた嫌気ジャー (BD BBL, OXOID あるいは三菱ガス化学) 内に平板あるいは試験管を入れてインキュベートを行った。

#### (4) 試薬

##### ①滅菌水

蒸留水を 121 °C で 15 分間オートクレーブ後使用した。

##### ②滅菌生理食塩水

純水 1,000 ml に塩化ナトリウム (試薬特級) 8.5 g を溶解し、121 °C で 15 分間オートクレーブ後使用した。

##### ③30%トリクロロ酢酸溶液

500 g のトリクロロ酢酸 (試薬特級) に 227 ml の純水を加えて 100%トリクロロ酢酸溶液を作製した。100%トリクロロ酢酸溶液 30 ml に純水 70 ml を加えて 30%トリクロロ酢酸溶液とした。遮光し、冷蔵庫に保管した。

##### ④50 mM 水酸化ナトリウム水溶液

水酸化ナトリウム (試薬特級) 0.2 g を 100 ml の純水に溶解し、プラスチックボトルにストックした。



上記の割合になるよう調整し、ストック溶液とした。50倍希釈して1X TAEを作製し、アガロースゲル電気泳動に用いた。

#### ⑨5 M NaCl

純水約400 mlに塩化ナトリウム（試薬特級）146.1 gを量り入れ、攪拌後純水で500 mlとし、121 °Cで15分間オートクレーブ後使用した。

#### ⑩Saline-EDTA (SE) 溶液 (75 mM NaCl-25 mM EDTA)

5 M NaClと0.5 M EDTAを滅菌水でそれぞれ3/200および1/20となるように希釈した。使用時に調製した。

#### ⑪Lysozyme 溶液 (6 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 M NaCl, 100 mM EDTA, pH8.0-1 mg/ml Lysozyme, 0.5% sarkosyl)

1M Tris-HCl, pH8.0を6/1000に、5 M NaClと0.5 M EDTA, pH8.0を1/5となるように滅菌水で希釈し、Lysozyme（生化学工業，東京）およびN-lauroylsarcosine (SIGMA)を1 mlあたりそれぞれ1 mgおよび50 mgになるように加え、溶解した。使用時に調製した。

#### ⑫20 mg/ml Proteinase K ストック溶液

滅菌水10 mlにProteinase K（ロシュ・ダイアグノスティックス，東京）200 mgを溶解し、-20°Cでストックした。

#### ⑬Proteinase K 溶液 (0.5 M EDTA, pH 8.0, 2 mg/ml Proteinase K, 0.5% sarkosyl)

20 mg/ml Proteinase K ストック溶液を0.5 M EDTA, pH 8.0で10倍希釈し、N-lauroylsarcosine (SIGMA)を1 mlあたり50 mgになるように加え、溶解した。使用時に調製した。

⑭TE (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM EDTA, pH8.0)

1M Tris-HCl (pH8.0)	5 ml
0.5M EDTA (pH8.0)	1 ml
滅菌水	494 ml

滅菌したメディウムびんに上記試薬を量りいれて使用した。

⑮400 mM Pefabloc SC

滅菌水 5 ml に Pefabloc SC (AEBSF) (ロシュ) を 500 mg を溶解し, チューブに小分けして $-20^{\circ}\text{C}$  でストックした. 滅菌水で 100 倍希釈して 4 mM の濃度で使用した.

⑯5X TBE (0.5X TBE)

試薬	最終濃度	使用量
TRIZMA BASE (SIGMA)	0.445 M	108 g
ホウ酸 (試薬特級)	0.445 M	57.1 ml
0.5M EDTA (pH8.0)	0.01 M	40 ml
純水		1800 ml
純水 (メスアップ用)		+ $\alpha$
計		2,000 ml

上記の割合になるよう調整し, スtock溶液とした. 10 倍希釈して 0.5X TBE を作製し, パルスフィールドゲル電気泳動に用いた.

⑰1.0%Low Melting agarose

滅菌水に Certified Low-Melt アガロース(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA, #161-3111)を 1%になるようにはかり入れ, 加温溶解した後,  $65^{\circ}\text{C}$  に保温して使用した.

⑱1%PFC agarose

0.5X TBE 100 ml に PFC アガロース(Bio-Rad#162-0138)を 1.0 g はかり入れて

電子レンジで加温溶解後、余熱をとってモールドに流し込み、固化させてから使用した。

## (5) 糞便からの *C. perfringens* の分離

### ①直接塗抹法

糞便を KMCW 培地に滅菌ガラス棒を用いて直接塗抹し、37 °C で一晩嫌気培養を行った。培養後、周囲に黄色のレシチナーゼ（卵黄）反応が見られる黄色のコロニーを GAM 半流動高層培地に移植し、以下の方法で確認試験を行った。偏性嫌気性であり、抗 $\alpha$ 毒素血清によってレシチナーゼが抑制されたものを *C. perfringens* と同定した。一部の菌株については、ゼラチン液化試験によりゼラチン加水分解陽性を確認し、血液寒天培地上に発育したコロニーの溶血性を調べて *C. perfringens* に特徴的な二重溶血帯を確認するとともに、市販の嫌気性菌用キットを用いた菌株の同定を行った。

### ②増菌培養法

事例 8 については、以下の方法で患者糞便について増菌培養を行った。患者糞便 1 g を 10 ml のチオグリコレート培地に投入し、75 °C、20 分間水浴中で加熱した。加熱後、37 °C で 18~20 時間嫌気培養した。培養後、培養液の一白金耳を KMCW 培地に画線塗抹し、37 °C で 18~20 時間、嫌気培養を行った。KMCW 培地上で *C. perfringens* が疑われるコロニーについて、直接塗抹法と同様に *C. perfringens* の同定を行った。

### ③ *C. perfringens* の確認試験

#### a. 好気発育試験

分離菌株を GAM 半流動高層培地で一晩好気培養後、2 枚の GAM 平板に塗抹し、1 枚を好気、もう 1 枚を 37 °C で一晩嫌気培養した。好気培養下では発育せず、嫌気培養下でのみ発育の見られた菌株を偏性嫌気性菌とした。

#### b. レシチナーゼ抑制試験

抗 $\alpha$ 毒素ろ紙入りのカナマイシン不含卵黄加 CW 寒天培地にろ紙と垂直になるように試験菌を接種し、37 °C で一晩嫌気培養を行った。培養後、抗 $\alpha$ 毒素血清によ

ってろ紙の周囲のレシチナーゼ反応が抑制されていることを確認した。

#### c. ゼラチン液化試験

1%ゼラチン加 GAM 寒天平板培地に試験菌株を接種し、37 °C で一晩嫌気培養を行った。培養後、発育した菌の上から 1 平板あたり 3 ml の 30%トリクロロ酢酸溶液を寒天上にゆきわたるように加えた。培地に含まれるゼラチンが加水分解されたことにより、菌の発育した周囲に透明帯が形成されていれば、ゼラチン加水分解試験陽性とした。

#### d. 市販のキットによる *C. perfringens* の確認試験

市販のキットは、BBL CRYSTAL ANR 同定検査キット (BD BBL, #4345010) を使用した。CDC 嫌気性菌用ヒツジ血液寒天培地上に発育させた菌株を用いて、キット添付の説明書に従って *C. perfringens* の同定を行った。

#### e. 血液寒天培地上に発育したコロニーの溶血性

試験菌を血液寒天培地に塗布し、37 °C で一晩嫌気培養を行った。培養後、平板を 30 分間室温に放置させた後、嫌気ジャーから取り出して観察し、溶血性を確認した。特徴的な二重溶血帯が形成されていれば *C. perfringens* とした。

### (6) 食品からの *C. perfringens* の分離

食品 5 g を 50 ml の GAM 半流動高層培地あるいはチオグリコレート培地に接種し、嫌気培養装置内で 37 °C, 18~20 時間、嫌気培養を行った。培養後、プラスチックループを用いて培養液を KMCW 培地に画線塗抹し、37 °C で一晩嫌気培養を行った。KMCW 培地上で *C. perfringens* が疑われるコロニーについて、(5) 糞便からの *C. perfringens* の分離に従って確認試験を行い、*C. perfringens* と同定した。

### (7) 血清型別試験

*C. perfringens* と同定された菌株は、耐熱性 A 型ウェルシュ菌免疫血清「生研」(デンカ生研, 東京, #200501) により、Hobbs の血清型別を行った。すなわち、KMCW 培地上に発育した *C. perfringens* について、スライド凝集試験により、血清型別を行った。生菌で凝集が見られない場合、滅菌生理食塩水に懸濁した菌体を 121 °C で 15 分間オートクレーブし、同様の方法で凝集試験を行った。これらの血清に該当しないものを Hobbs 型別不能 (untypeable, UT) とした。Hobbs UT 株の一部

は、東京都衛生研究所に依頼し、TWの血清型別を実施した。

## (8) PCR法による *C. perfringens* エンテロトキシン (*cpe*) 遺伝子の検出

### ① 鋳型 DNA の作製

KMCW培地上に発育した *C. perfringens* コロニーを滅菌つまようじを用いて 25  $\mu\text{l}$  の滅菌水に懸濁し、等量の 50 mM 水酸化ナトリウム水溶液を加えてボルテックスミキサーにより混和し、95  $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間加熱した。加熱処理後、80 mM Tris-HCl を 50  $\mu\text{l}$  加え、中和し、3  $\mu\text{l}$  を PCR のための鋳型 DNA とした。一部の菌株については、KMCW培地上に発育した *C. perfringens* コロニーを滅菌つまようじを用いて 100  $\mu\text{l}$  の滅菌水に懸濁し、沸騰水中で 10 分間加熱した後に 15,000 rpm で 3 分間遠心分離を行った上清 3  $\mu\text{l}$  を PCR のための鋳型 DNA として使用した。

### ② PCR 用試薬の調整

プライマーは市販のウェルシュ菌毒素遺伝子検出用 Primer Set CPE-1/2 (宝酒造, 東京, #S020) を使用した。バッファーはプライマー添付の 10 倍濃度のものあるいは 10 X Ex Taq Buffer (宝酒造) を使用した。以下に従って PCR 用試薬を調整し、22  $\mu\text{l}$  ずつ 4 本の PCR 用チューブに分注したのちに鋳型 DNA を 1 サンプルあたり 3  $\mu\text{l}$  ずつ加えた。

試薬	最終濃度	使用量 (4 サンプルあたり)
10 X PCR Buffer		10 $\mu\text{l}$
dNTP mixture (2.5 mM each)		8 $\mu\text{l}$
プライマー-CPE-1	190 nM	1 $\mu\text{l}$
プライマー-CPE-2	190 nM	1 $\mu\text{l}$
TaKaRa Ex Taq	0.625 U	0.5 $\mu\text{l}$
鋳型 DNA		12 $\mu\text{l}$
滅菌水		67.5 $\mu\text{l}$
計		100 $\mu\text{l}$

### ③PCR 増幅条件

PCR には TaKaRa Thermal Cycler MP (宝酒造) を使用し、以下に示す条件で増幅を行った。

94 °C 1 分	1 サイクル
94 °C 1 分+55 °C 1 分+72 °C 1 分	35 サイクル
72 °C 5 分	1 サイクル

### ④PCR 産物の解析

PCR 産物の解析は、ミューピッド (ADVANCE, 東京) によるアガロースゲル電気泳動を用いて行った。泳動には NuSieve3:1Agarose (CAMBREX, East Rutherford, NJ, USA) を 3% の濃度で使用した。泳動用バッファーは 1 X TAE を使用した。5  $\mu$ l の PCR 産物を 1  $\mu$ l のゲルローディングバッファーと混合し、ゲルの各ウェルにアプライし、100 V で泳動を行った。マーカーには 100 bp Ladder (NEB, Ipswich, MA, USA) を使用した。泳動後のゲルを 0.5  $\mu$ l/ml のエチジウムブロマイド溶液に浸漬し、20 分間染色後、蒸留水でゲルを洗浄し、UV トランスイルミネーター (フナコシ) を用いて 254 nm の紫外線下で 456 bp の位置に DNA のバンドを確認したものを *cpe* 遺伝子保有と判定した。

## (9) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

### ①プラグの作製

EY-GAM 培地上に発育した *C. perfringens* のコロニーを 3~5 個かきとり、100  $\mu$ l の SE 溶液に懸濁した。菌懸濁液に融解後あらかじめ 65 °C に保温しておいた 300  $\mu$ l の 1.0% Low Melting agarose を加え、緩やかに混和し、プラグモールドに分注してゲルを氷上で固化させた。プラグをモールドから抜き取り、1 ml の Lysozyme 溶液で 37 °C、16 時間インキュベート後、1 ml の Proteinase K 溶液に入れ換えて 50 °C で 48 時間インキュベートした。プラグは泳動を行うまで 4 °C で保管した。

### ②制限酵素処理

プラグをウェルの大きさに合わせて切断した後、500  $\mu$ l の 4 mM Pefabloc SC に



浸漬して 50 °C で 30 分間インキュベートした。30 分後、500  $\mu$ l の 4 mM Pefabloc SC を入れ換えてさらに 30 分間インキュベートを行った。1 ml の TE Buffer に入れ換えて氷上で 30 分間処理後制限酵素用のバッファーでさらに 30 分間氷上で平衡化した後 20 U の *Sma*I (NEB) で 25°C, 18~20 時間消化した。

### ③電気泳動

制限酵素処理後のプラグは 500 $\mu$ l の 0.5X TBE バッファー中においた。電気泳動には Bio-Rad の CHEF-DRIII を使用し、1%PFC agarose, 0.5X TBE バッファーを用いた。バッファー温度 14 °C, アングル 120°, 6 V/cm でパルスタイム 0.5–40 秒, 20 時間泳動を行った。マーカーは、Bio-Rad の Lambda Ladder を使用した。泳動後のゲルを 0.5  $\mu$ l/ml のエチジウムブロマイド溶液に浸漬して 30-60 分間染色後、蒸留水でゲルを洗浄し、UV トランスイルミネーター (フナコシ) を用いて 254 nm の紫外線下で DNA のバンドを確認し、写真撮影を行った。

### ④バンドパターンの解釈

PFGE 法によって得られたバンドパターンは、3 バンド以上異なる場合をそれぞれ異なるパターンとして任意に A~X, a と名づけた<sup>33)</sup>。PFGE 法の結果バンドパターンがスメア状になったものは UT (Untypeable, 型別不能) とした。

## 3. 結果

### 1) 大阪市内で分離された *C. perfringens* のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

解析に使用した 7 事例由来 82 株の *C. perfringens* を Table 1 に示した。7 事例中 6 事例 (事例 1, 2, 3, 5, 6, 7) は *C. perfringens* 食中毒として届出された事例であった。患者便から *C. perfringens* が分離されたが、患者の多くが高齢者であり、便中に CPE が認められなかつたために *C. perfringens* として届出されなかつた事例が 1 事例 (事例 4) あった。7 事例中食品から *C. perfringens* が検出されたのは 3 事例 (事例 2, 3, 7) あり、2 事例 (事例 1, 6) は患者由来株のみであった (Table 1)。

Table 2 に *C. perfringens* の血清型と *cpe* 遺伝子保有状況および PFGE パターンを

示した。また、Fig. 1に PFGE パターンと血清型を示した。82株のうち PFGE パターンが得られたのが 74株 (90.2%) で、残り 8株 (9.8%) はスミア状になり型別不能であった。

事例 1 では、患者由来 7株のうち 5株が 3血清型 (TW61, TW62, Hobbs13) に分類され、残りの 2株は Hobbs および TW の血清型に該当しなかった。血清型が TW61 と TW62 に分類された 3株の PFGE パターンは同一であったが、残り 4株の PFGE パターンは異なっていた。これらの菌株は全て *cpe* 遺伝子を保有しなかった。事例 2 では食品から 2種類の血清型 (TW1, TW12) が検出された。患者便から分離された株と同じ血清型 (TW1) を示した食品由来株の PFGE パターンは、患者便由来株と一致した。血清型 TW12 の PFGE パターンはスミア状になり、型別不能であったが、いずれの菌株も *cpe* 遺伝子を保有していた。本事例は *cpe* 遺伝子陽性の TW1 型、PFGE タイプ A 型菌による事例と決定した。事例 3 では、患者由来 7株、食品由来 3株、調理人由来 1株の血清型は全て Hobbs1 であり、PFGE パターンも一致した。これらの菌株は全て *cpe* 遺伝子を保有していた。本事例は *cpe* 遺伝子陽性の Hobbs1 型、PFGE タイプ B 型菌による事例と決定した。事例 4 は、患者由来 14株のうち 1株が TW65 (*cpe* 遺伝子保有)、1株が Hobbs15 (*cpe* 遺伝子保有せず) で残り 12株は Hobbs にも TW にも該当しなかった。これらの 12株中 *cpe* 遺伝子を保有していたのは 1株のみであり、11株は *cpe* 遺伝子を保有しなかった。事例 5 では、患者便由来 *C. perfringens* の血清型は全て TW30 であり、*cpe* 遺伝子を保有し、PFGE パターンも一致した。調理人由来 2株のうち、1株は患者便由来株と同じ血清型で *cpe* 遺伝子を保有し、患者由来株と同一の PFGE パターンを示したが、もう 1株は血清型 TW23 で *cpe* 遺伝子を保有せず、PFGE パターンも異なった。本事例は *cpe* 遺伝子陽性の TW30 型、PFGE タイプ N 型菌による事例と決定した。事例 6 は患者由来 10株中 7株が血清型 TW62 で *cpe* 遺伝子保有であり、PFGE パターンが一致した。Hobbs5 に決定した 1株および Hobbs にも TW にも該当しなかった 2株は、*cpe* 遺伝子を保有しなかった。これら 3株の PFGE パターンをみると 1株は TW62 (*cpe* 遺伝子保有) と同一であったが、残り 2株はこれと異なるパターンを示した。本事例は *cpe* 遺伝子陽性の TW62 型、PFGE タイプ P 型菌による事例と決定した。事例 7 では、患者便、食品および調理人 (1株を除く) 由来 *C. perfringens* はすべて血清型 TW62 で *cpe* 遺伝子を保有し、PFGE パターンが一致した。本事例は *cpe* 遺伝子陽性の TW62 型、

PFGE タイプ P 型菌による事例と決定した。事例 6 と 7 は、発生年がそれぞれ 2003 および 2005 年であったが、同一の血清型で同一の PFGE パターンを示す *C. perfringens* による集団食中毒事例であった。

以上 7 事例由来の 82 株中 19 株は Hobbs にも TW にも該当しなかった (Table 2)。これらは 6 つの PFGE パターンに分類することができ、事例 4 の患者便由来のうち 7 株では PFGE パターンが一致した。

## 2) 増菌培養法とパルスフィールドゲル電気泳動法の併用による *C. perfringens* 食中毒の検出感度の向上

事例 8 では、食中毒原因調査にあたり、83 名の患者便が搬入されたが、患者便を直接 KMCW 寒天平板に塗抹する直接塗抹法で *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* が分離されたのは 83 検体のうちわずか 13 検体 (15.7%) であった (Table 4)。また糞便を直接塗抹した寒天平板上のコロニー数も非常に少なかった。一方、増菌培養法では 81 名由来患者便 81 検体のうち 53 検体 (65.4%) から、*cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* が分離された。直接塗抹法で *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* が分離された 13 検体のうち 12 検体は増菌培養後にも同菌が分離可能であった。搬入された 83 検体のうち 2 検体は増菌培養を行うことができなかったが、そのうちの 1 検体は直接塗抹法で *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* が分離された検体であった。直接塗抹法および増菌培養法の組み合わせで 83 検体の患者便のうち 54 検体 (65.1%) から *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* が分離された。一方、原因推定食品と考えられた給食弁当の検食から *C. perfringens* は分離されなかった。53 名の患者から分離された 65 株の *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* と 17 名の患者から分離された 23 株の *cpe* 遺伝子を保有しない *C. perfringens* について PFGE 法および血清型別試験を行った (Table 5)。これらのうち、*cpe* 遺伝子保有 1 株と *cpe* 遺伝子を保有しない 5 株はコンタミネーションのため再分離できなかった。65 株の *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* のうち 49 株 (75.4%) が PFGE パターン C に分類された (Fig. 2)。これらの血清型は TW69 であった。14 株は PFGE パターン D に分類され、血清型は Hobbs 1 であった。残り 2 株の *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* の PFGE パターンはそれぞれ異なっており、C および D とは違うパターンを示した (Table 5)。

*cpe* 遺伝子を保有しない 23 株の *C. perfringens* は、*cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens*

とは異なる PFGE パターンを示した。3名の患者において、直接塗抹法および増菌培養法のそれぞれから分離された *C. perfringens* の PFGE パターンはそれぞれ E, F, G であり、これら3名の患者は互いに異なる PFGE 型の *C. perfringens* を保有していた (Table 5, Fig. 2)。このように同一患者由来株は、培養法の違いに関わらず、同一の PFGE パターンを示した。PFGE パターンが F 型の菌株は血清型 TW40 に分類された。*cpe* 遺伝子を保有しないその他の 17 株のうち、11 株はそれぞれ異なる PFGE パターンを示したが、6 株は DNA の分解によってバンドパターンがスメア状になり、分類することができなかった。

ノロウイルスによる食中毒事例において、17名の患者便のうち8名から *C. perfringens* が分離された。8名由来の8株は全て *cpe* 遺伝子を保有しなかった。6株は H から M までの6種類の PFGE パターンを示し、2株は DNA が分解したため型別不能であった (Fig. 2)。1株の血清型が Hobbs4 を示した。

Table 1 *Clostridium perfringens* strains

Outbreak No.	Year	Source	No. of isolates
Outbreak 1 (96-58) <sup>a</sup>	1996	Patient	7
Outbreak 2 (97-276)	1997	Patient	3
		Food	2
Outbreak 3 (99-279)	1999	Patient	7
		Food	3
		Food handler	1
Outbreak 4 (01-108)	2001	Patient	14
		Food handler	2
Outbreak 5 (02-61)	2002	Patient	12
		Food handler	2
Outbreak 6 (03-44)	2003	Patient	10
Outbreak 7 (05-34)	2005	Patient	15
		Food	1
		Food handler	3
Total			82

<sup>a</sup> The outbreak number registered by Osaka City Public Health and Welfare Bureau

Table 2 Serotype, possession of *cpe* gene and PFGE pattern of *Clostridium perfringens*

Outbreak No.	Year	Source	Serotype	<i>cpe</i> gene	No. of strains	PFGE pattern
Outbreak 1 (96-58) <sup>a</sup>	1996	Patient	Hobbs and TW UT <sup>b</sup>	-	2	T(1), U(1)
			Hobbs13	-	2	V, UT <sup>b</sup>
			TW61	-	1	W
			TW62	-	2	W
Outbreak 2 (97-276)	1997	Patient	TW1	+	3	A, UT(1)
		Food	TW1	+	1	A
			TW12	+	1	UT
Outbreak 3 (99-279)	1999	Patient	Hobbs1	+	7	B
		Food	Hobbs1	+	3	B
		Food handler	Hobbs1	+	1	B
Outbreak 4 (01-108)	2001	Patient	Hobbs and TW UT	-	11	X(7), UT(4)
			Hobbs and TW UT	+	1	UT
			TW 65	+	1	Y
			Hobbs15	-	1	Z
		Food handler	Hobbs and TW UT	-	2	X
Outbreak 5 (02-61)	2002	Patient	TW30	+	12	N
		Food handler	TW30	+	1	N
			TW23	-	1	O
Outbreak 6 (03-44)	2003	Patient	TW62	+	7	P
			Hobbs5	-	1	R
			Hobbs and TW UT	-	2	P(1), a(1)
Outbreak 7 (05-34)	2005	Patient	TW62	+	15	P
		Food	TW62	+	1	P
		Food handler	TW62	+	2	P
			Hobbs and TW UT	-	1	S

<sup>a</sup> The outbreak number registered by Osaka City Public Health and Welfare Bureau

<sup>b</sup> UT; untypeable

Table 3 *Clostridium perfringens* isolates

Outbreak No.	Year	Source	No. of isolates
Outbreak 8 (01-213) <sup>a</sup>	2001	Patient (Direct plating)	25
		Patient (Enrichment)	69
Outbreak 9 (02-33)	2001	Patient	8
Total			102

<sup>a</sup> The outbreak number registered by Osaka City Public Health and Welfare Bureau

Table 4 Number of patients from which *C. perfringens* was isolated in the investigation of the outbreak 8

Culture method	<i>C. perfringens</i>		<i>C. perfringens</i> negative	Total number
	<i>cpe</i> -positive	<i>cpe</i> -negative		
Direct plating	13 (15.7%)	12	58	83
Enrichment	53 (65.4%)	16	12	81
Combined	54 (65.1%)	16	13	83



Table 5 PFGE pattern, serotypes, and possession of the *cpe* gene of *C. perfringens* isolates in the outbreak 8

PFGE pattern	Serotyping		Direct plating		Enrichment culture		Total
	Hobbs	TW	<i>cpe</i> - positive	<i>cpe</i> - negative	<i>cpe</i> - positive	<i>cpe</i> - negative	
C	UT	69	13	0	36	0	49
D	1	UT	0	0	14	0	14
E	UT	UT	0	1	0	1	2
F	UT	40	0	1	0	1	2
G	UT	UT	0	1	0	1	2
NC <sup>a</sup>	UT	NE <sup>c</sup>	0	1	2	10	13
UT <sup>b</sup>	UT	NE	0	3	0	3	6
Total			13	7	52	16	88

<sup>a</sup> not classified

<sup>b</sup> untypeable because of DNA degradation

<sup>c</sup> not examined

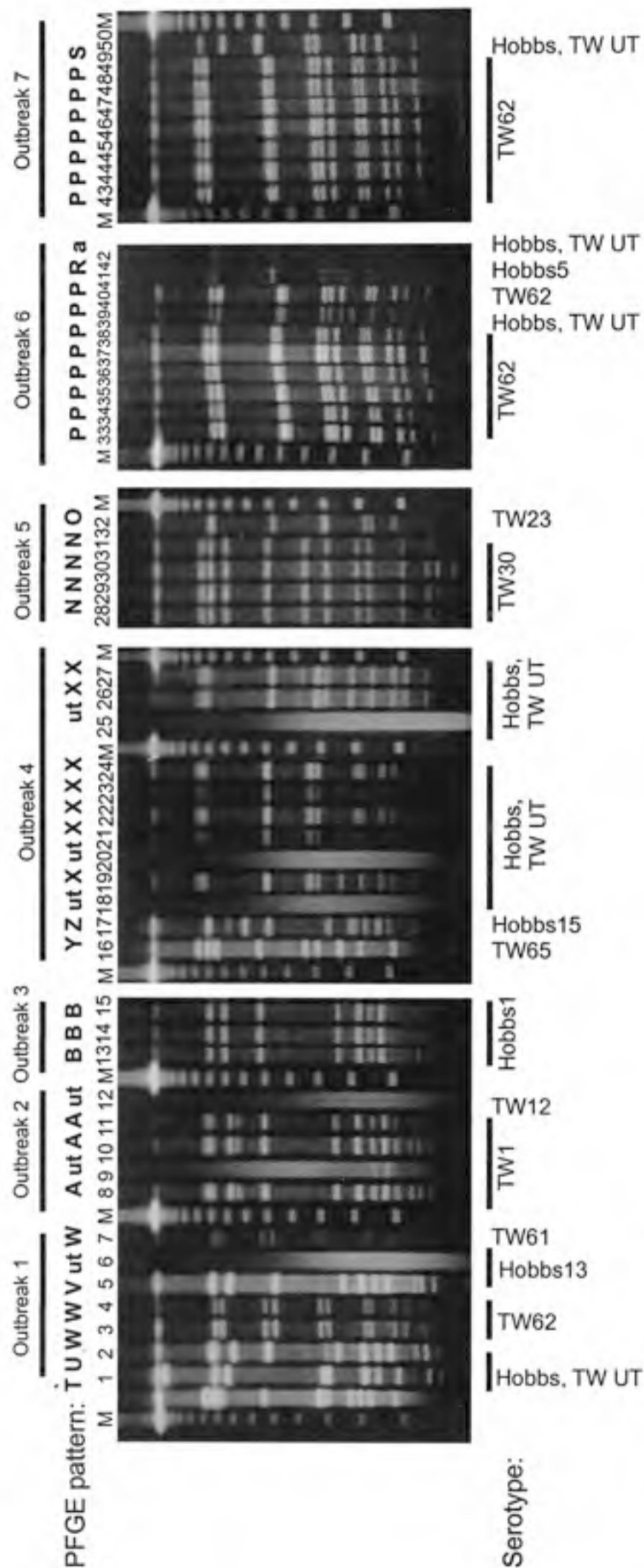


Figure 1. PFGE patterns with restriction enzyme *Sma*I and serotype of *C. perfringens* strains isolated from patients, foods, and food handlers of the outbreaks from 1 to 7. Serogrouping of the isolates which did not react with Hobbs antisera was performed with TW antisera. Lanes 1; PFGE pattern T, but serotype untypeable, lane 2; PFGE pattern U, but serotype untypeable, lanes 3 to 4; PFGE pattern W, serotype TW62, lane 5; PFGE pattern V and serotype Hobbs13, lane 6; PFGE pattern untypeable, but serotype Hobbs13, lane 7; pattern W, serotype TW61, lanes 8, and 10 to 11; PFGE pattern A, serotype TW1, lane 9; PFGE pattern untypeable, but serotype TW1, lane 12; PFGE pattern untypeable, but serotype TW12, lanes 13 to 15; PFGE pattern B, and serotype Hobbs1, lane 16; PFGE pattern Y, and serotype TW65, lane 17; PFGE pattern Z, and serotype Hobbs15, lanes 18, 20, and 25; PFGE pattern untypeable, and serotype untypeable, lanes 19, and 21 to 24, 26 and 27; PFGE pattern X, but serotype untypeable, lanes 28 to 31; PFGE pattern N, and serotype TW30, lane 32; PFGE pattern O, and serotype TW23, lanes 33 to 38, 40, 43 to 49; PFGE pattern P, serotype TW62, lane 39; PFGE pattern P, but serotype untypeable, lane 41; PFGE pattern R, serotype Hobbs5, lane 42; PFGE pattern a, but serotype untypeable, lane 50; PFGE pattern S, but serotype untypeable, Lane M; molecular marker of the lambda ladder. Lanes 8, 12 to 13, 47; strains isolated from foods, lanes 14, 31 to 32, 48 to 50; strains isolated from food handler, the other lanes; strains isolated from patient

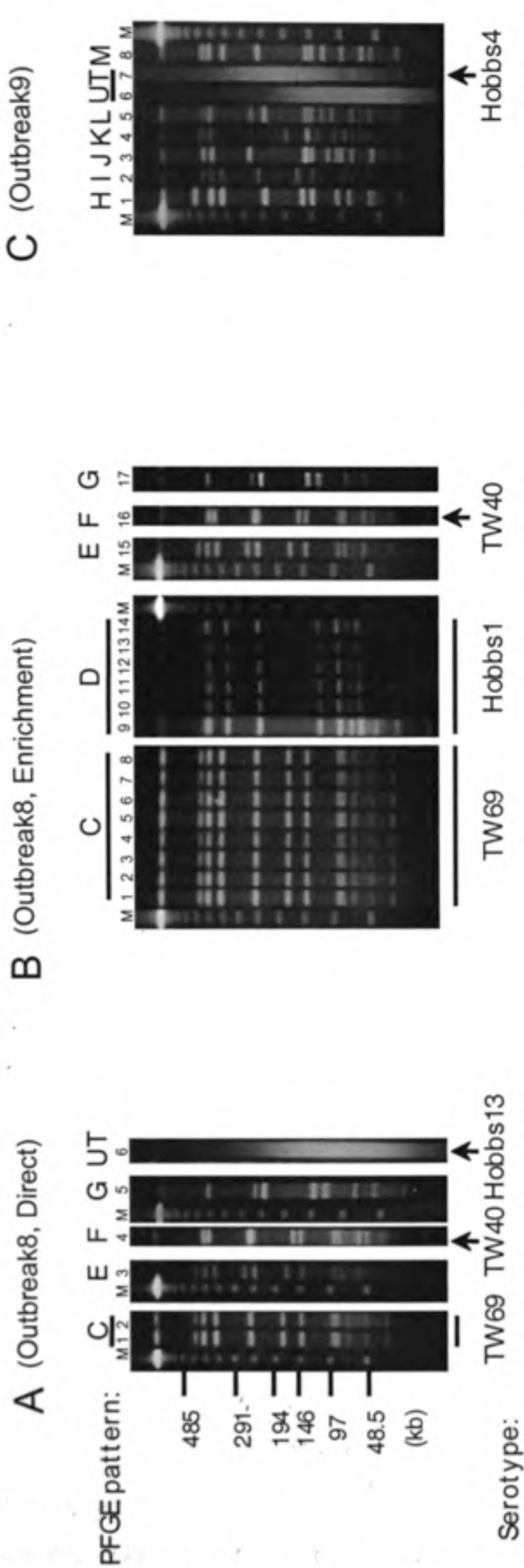


Figure 2. PFGE patterns with restriction enzyme *Sma*I and serotype of *C. perfringens* strains isolated from patients of the outbreak (A, B) and another outbreak (C) due to Norovirus. Serogrouping of the isolates which did not react with Hobbs antisera was performed with TW antisera. (A) Strains obtained by direct plating cultures. Lanes 1 and 2; PFGE pattern C and serotype TW69, lane 3; PFGE pattern E, lane 4; PFGE pattern F and serotype TW40, lane 5; PFGE pattern G, lane 6; PFGE untypeable but serotype Hobbs13. (B) Strains isolated with enrichment cultures. Lanes 1 to 8, PFGE pattern C and serotype TW69, lane 9 to 14; PFGE pattern D and serotype Hobbs 1, lane 15; PFGE pattern E, lane 16; PFGE pattern F and serotype TW40, lane 17; PFGE pattern G. (C) Each strain showed different PFGE pattern from one another and was classified into PFGE patterns H to M, respectively. One of two untypeable strains was serotyped Hobbs 4. Lane M; molecular marker of the lambda ladder

#### 4. 考察

##### 1) 大阪市内で分離された *C. perfringens* のパルスフィールドゲル電気泳動法による解析

大阪市内で発生した食中毒 7 事例由来 81 株の *C. perfringens* を用いて PFGE 法を適用し、それぞれの事例について血清型別試験との比較を行うとともに、菌株の *cpe* 遺伝子保有状況を調べた。7 事例のうち、市販の血清 (Hobbs) によって型別可能な菌株を原因とする事例は 1 事例 (事例 3) のみであり、4 事例が TW の血清型 (1, 30, 62) に該当する原因菌による事例であった。分離菌株の血清型が決定されたこれら 5 事例において、同一血清型の分離株は全て同じ PFGE 型を示した。したがって PFGE 法および TW の血清型別は *C. perfringens* 株の異同の解析に有用であると考えられたが、TW の抗血清は現在のところ市販されていない。また、Hobbs の血清型にも TW の血清型にも該当しない *C. perfringens* が 82 株中 19 株あったが、これらは PFGE 法により 6 パターンに分類された。PFGE 法は、血清に該当しない菌株の解析に有用であると考えられた。以上より、PFGE 法は、血清型別と同程度あるいはそれ以上の識別能を有する疫学マーカーとして食中毒事例由来ウェルシュ菌株の識別に利用できると考えられた。

TW62 の *C. perfringens* が 3 事例 (事例 1, 6, 7) から分離されたが、これらのうち、事例 6 および 7 は、食中毒の発生年が 2 年ずれているにも関わらず、同一の PFGE パターンを示した。事例 1 で分離された TW62 の *C. perfringens* の PFGE パターンは、これら 2 事例とは異なっていたが、同一事例内で分離された TW61 の PFGE パターンと同じパターンを示した。PFGE 法が同一血清型の *C. perfringens* 株間の異同を識別するのに有用であるかどうかは、今後さらに多くの菌株を用いて検討を行う必要がある。

PFGE 解析の結果、事例 2, 3, 5, 6 および 7 においては、患者便由来で *cpe* 遺伝子保有株の血清型および PFGE パターンがそれぞれの事例において全て一致した。これらはそれぞれ TW1 (事例 2), Hobbs1 (事例 3), TW30 (事例 5), TW62 (事例 6 および 7) の *C. perfringens* による食中毒であることが確認された。さらに、これら 5 事例のうち 3 事例 (事例 2, 3, 7) では食品からも同一血清型の *C. perfringens* が分離された。これら食品由来株は *cpe* 遺伝子を保有しており、PFGE パターンが患

者由来株のパターンと一致したことから、食中毒の原因食品であった可能性が高い。

事例1においては、菌株の血清型と同様、PFGEパターンも多種類を示した。2種類以上の血清型の菌株が原因となって起こる混合型の *C. perfringens* 食中毒事例がしばしばみられるが<sup>23)</sup>、この事例では患者便由来株が全て *cpe* 遺伝子を保有しなかったため、原因微生物は *C. perfringens* ではないと考えられる。事例4においては、Hobbs および TW の血清による型別が不可能な菌株の PFGE パターンにおいて11株中7株が同一の型 X を示した (Table 2)。これら7株が分離された7名の患者便中に CPE は検出されず、また7株は全て *cpe* 遺伝子を保有しなかった。新型エンテロトキシン産生 *C. perfringens* による食中毒<sup>34)</sup>の可能性もあることから、制限酵素 *ApaI* と *SacII* を用いて同様に PFGE 解析を行った結果、3種類の制限酵素の切断パターンは一致し、これらは同一のクローンと考えられた。そこで、東京都立衛生研究所に依頼し、新型エンテロトキシン産生 *C. perfringens* に対して細胞変性効果を示したマウスの L 細胞、Vero 細胞を用いてこれらの *C. perfringens* 株の細胞への影響を調べた結果、細胞変性は認められなかった。本事例の患者は特別養護老人ホームで共同生活を行っていたことから、同じ施設で飲食を共にしていたことが原因で、同一クローンの *C. perfringens* が分離されたものと考えられた。以上より、本事例由来 *C. perfringens* を食中毒の原因微生物とするのは困難と判断した。

事例6において、*cpe* 遺伝子を保有する *C. perfringens* と保有しない *C. perfringens* の PFGE パターンが P 型で一致したが、Ridell ら<sup>35)</sup>もこれと同様の結果を示している。

*Clostridium* 属菌の中には強い DNase 活性を有するものが存在し、PFGE のプラグを作製するとき内因性の DNase によって DNA を壊してしまい、泳動パターンがスメア状になってしまうことから、ホルマリン処理を行うなどの工夫がなされる<sup>36)</sup>。今回、DNA のデグラデーションにより PFGE パターンの得られない型別不能が8株 (9.9%) あったが、これらのうち5株は *cpe* 遺伝子を保有しない株であり、食中毒事例解析には影響を与えなかった。

*C. perfringens* 食中毒事例解析において、PFGE 法は血清型別試験と同程度もしくはそれ以上の解析能を有することがわかった。TW 型別用血清が市販に至っていない現状では、分離菌株の PFGE 法は分離菌株の *cpe* 遺伝子保有の有無との組み合わせによって、食中毒の原因究明に有用であると思われた。特に PFGE 法は、既存の血

清を用いて型別できない *C. perfringens* 株の比較において有用であった。

## 2) 増菌培養法とパルスフィールドゲル電気泳動法の併用による *C. perfringens* 食中毒の検出感度の向上

事例 8 においては、発症から 4~7 日経過してから患者便の採取が行われた。疫学的に *C. perfringens* が本食中毒の原因微生物として疑われたが、患者便中の CPE の検出は、発症から 2 病日以内でなければ正しく判定されないことから<sup>23, 26)</sup>、行わなかった。これらの便中の *C. perfringens* 数は少なかったが、他の食中毒菌も全て陰性であった。直接塗抹法で *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* が分離されたのが 13 名のみであったため、増菌培養での分離を試みた (Table 4)。

患者便からの *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* の検出率は、直接塗抹法では 15.7% (13/83) であったのに対し、増菌培養によって 65.4% (53/81) に増加した。食中毒患者便中の *C. perfringens* はほとんどが芽胞として存在しており、発症からの時間の経過とともに芽胞数が減少することが報告されている<sup>32, 37)</sup>。本事例のような発病後の日時が経過した患者便では、増菌培養前の 75 °C の加熱処理が *C. perfringens* 芽胞の発芽を促進させるのに有効であった<sup>38)</sup>と考えられる。

*cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* のうち 75.4% (49/65) の PFGE パターンが C で、血清型が TW69 であった (Table 5)。この株は、*cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* が検出された患者 53 名中 37 名 (69.8%) から分離された。しかしながら、14 名からは異なるタイプの *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* (PFGE パターン D, 血清型 Hobbs1) が分離された。*C. perfringens* 食中毒は、しばしば多種類の株によって引き起こされることから<sup>23)</sup>、このタイプの *C. perfringens* もまた、同じように食中毒の原因微生物であった可能性が高い。一人の患者から 2 タイプの *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* が同時に検出されなかったことから、便中に含まれる芽胞数が少なかったと考えられる。原因と疑われる食品の検食から *C. perfringens* が検出されなかったのは、菌数が少ない少量のサンプルを調理後すぐに採取し冷凍したためと推察される。

食中毒事例由来 *C. perfringens* の菌株の異同を調べるのには、古くから血清型別試験が行われてきた<sup>26)</sup>。しかしながら、日本国内においてエンテロトキシン産生 *C. perfringens* の多くが、市販の Hobbs の血清型に該当しない<sup>28, 31, 39)</sup>。そこで TW の血清型が伊藤によって提案された<sup>30)</sup>。TW 血清型別は、Hobbs の血清型に該当しない

菌株の識別に有用である<sup>28, 39)</sup>。本事例でも Hobbs の血清型に該当しなかった *cpe* 遺伝子保有 *C. perfringens* 株の多くが TW69 に分類された。TW の血清型別は、わが国の *C. perfringens* 食中毒の疫学マーカーとして非常に有用であるが、本血清は市販されていない。PFGE 法は血清型別に代わる *C. perfringens* 食中毒の疫学マーカーとして有用であると考えられる。

*C. perfringens* 食中毒が疑われる事例において、発症から数日間が経過した患者糞便から本菌を分離する際に、増菌培養は有用であった。ノロウイルスによる食中毒事例で示されるように、便中には食中毒に関係しない多くの腸内常在 *C. perfringens* が存在しており、これらの腸内常在 *C. perfringens* もともに増菌されるため、*C. perfringens* による食中毒事例の調査に増菌培養は適さないというのが定説であった。しかしながら、血清型別試験、PFGE 法および毒素産生試験のような適切な疫学マーカーを組み合わせることで、増菌培養を調査に適用することが可能になり、むしろ検出率向上の有効な手法となることが明らかになった。

## 5. 小括

1996 から 2005 年の間に大阪市内の食中毒原因調査において分離された *Clostridium perfringens* 菌株の比較に PFGE 法を適用した。分離菌株は、PFGE 法とともに血清型別試験を行い、*cpe* 遺伝子の保有状況について調べ、その有用性を検討した。その結果、PFGE 法は TW の血清型別試験と同程度あるいはそれ以上に食中毒事例由来菌株の異同を識別することができる有用な疫学マーカーと考えられた。PFGE 法とともに *cpe* 遺伝子保有状況を調べることにより、食中毒原因 *C. perfringens* を識別判定することが可能であった。特に、血清型別不能株の解析に PFGE 法は有用であった。



## 第2章 市販の水産加工品の *Listeria monocytogenes* 汚染状況と分離菌株 の分子生物学的手法を用いた解析

### 1. 緒言

*Listeria monocytogenes* は食品媒介感染症の原因菌の一つであり、食品を介してヒトにリステリア症を引き起こす。本菌は 1920 年頃より人畜共通感染症の原因菌として知られていたが、1980 年代に入り、カナダでコールスロー（キャベツサラダ）を原因とする集団発生事例が報告されて以来、欧米で食品を介したリステリア症の集団事例が相次いで報告され、食品媒介感染症の原因菌として急速に注目を集めるようになった<sup>40)</sup>。

わが国においては、感染症法の施行に伴って 1999 年に食品衛生法施行規則の一部が改正され、飲食に起因する健康被害はすべて食中毒として位置づけられた<sup>2)</sup>。*L. monocytogenes* についても「食中毒統計作成要領」の一部改正により食中毒の病因細菌として例示されることになり、リステリア症が食品媒介感染症であるとの認識が明確化された<sup>41)</sup>。厚生労働省の調査によると、わが国では年間平均 83 例のリステリア症の発生が推計されている<sup>42)</sup>。また、2001 年 3 月には、北海道でナチュラルチーズを原因とする国内最初の商品媒介リステリア症事例が発生した<sup>43)</sup>。

*L. monocytogenes* の発見は古く、1926 年に Murray et al. がウサギに単球増多症 (monocytosis) を起こすグラム陽性桿菌を分離し、*Bacterium monocytogenes* と名付けたのが最初であるとされる。その後、1927 年に Pirie がある種のネズミの肝から一桿菌を分離し、消毒法の創始者の Lister の名に因んで *Listerella hepatolytica* と名付けた。後になってこれらが同一菌であることがわかり、1940 年になって Pirie が *Listerella* を *Listeria* に改めて *Listeria monocytogenes* の名を提案した。菌名として公認されたのは 1954 年である<sup>40)</sup>。

*L. monocytogenes* はグラム陽性の桿菌で、莢膜および芽胞を有しない。周毛性で数本の鞭毛を有し、運動性は 25 から 30 °C で最も活発で、それ以下またはそれ以上の温度では著しく低下する。*Listeria* 属には *L. monocytogenes* のほか、*L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri* の 5 菌種が含まれるが、ヒトおよ

び動物の双方に起病性が明らかにされているのは *L. monocytogenes* のみである。

*L. monocytogenes* は菌体表層にテイコ酸を、また細胞外器官として鞭毛を有し、これらに存在する多様な抗原決定基により様々な血清型に分類される。一般に、抗原決定基のうち、菌体表層に存在するものは O 抗原、鞭毛に存在するものは H 抗原といわれるが、*Listeria* 属には全菌種を含めて I~XV の O 抗原、A~E の H 抗原が認められている。*Listeria* 属はこれらの O 抗原と H 抗原の組み合わせにより 16 血清型に分類され、それぞれの株が保有する O 抗原は数字で、H 抗原はアルファベットで表記される。*L. monocytogenes* はこれらのうち 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c および 4d の 11 血清型に属し<sup>40, 44, 45)</sup>、特に、ヒトの臨床例から検出される血清型の 95% は 4b, 1/2a, 1/2b の 3 血清型に属する<sup>44, 45, 46)</sup>。さらに、血清型 4b がヒトの散発例あるいは集団発生例の 33~50% を占めることが知られている<sup>46)</sup>。

*L. monocytogenes* の感染に最も高い感受性を示すのは新生児、高齢者、妊婦、および医療（とくに臓器移植後）または特殊な疾病（白血球、リンパ腫、骨髄腫などの悪性血液病）による免疫抑制状態にある成人で、また糖尿病、肝硬変、心弁膜不全、アルコール中毒、紅斑性狼瘡などの基礎疾患をもつ成人も一般成人に比べて感染率が高い<sup>40)</sup>。このうち妊婦は健康な成人より 20 倍リステリア症に罹りやすく<sup>47)</sup>、その感染は母体よりも胎児に深刻な影響を与える傾向があり、流産や死産の原因となったり、リステリア症の新生児として出産されることもある。1981 年にカナダ南東部の Nova Scotia で起きたリステリア症では 41 名の患者のうち 83% が周産期の患者であった<sup>48)</sup>。集団発生時に認められる一般的な症状として、38~39 °C の発熱、頭痛、筋肉痛など、インフルエンザ様症状から髄膜炎、敗血症が報告されている。*L. monocytogenes* に汚染された食品を食べておよそ 12 時間後にインフルエンザ様の症状が現れ、重い症状が出現するには 1~6 週間かかる。この他にも本感染症の病像は、伝染性単核球症様症候群、中耳炎、咽頭炎、扁桃炎などに合併した敗血症、肺炎、心内膜炎、局所性膿瘍、丘疹性または膿胞性皮膚炎、結膜炎、尿道炎、習慣性流産、小児の“知恵遅れ”、成人の精神病など、きわめて多岐にわたっている<sup>40)</sup>。最近では、これらの症状ばかりでなく、嘔吐、下痢および腹痛などの胃腸炎症状を起こすことも報告されている<sup>49, 50)</sup>。

*L. monocytogenes* の病原性や感染機序についてはまだ不明の点があるとはいえ、近年実験動物（マウス）や培養細胞を用いた実験でかなり詳細に解明されてきた。*L. monocytogenes* はきわめて侵入性の強い細胞内寄生菌であり、腸粘膜を容易に突破す

ることができる。経口的に摂取された *L. monocytogenes* は、インターナリン (internalin) と呼ばれるタンパクを介して腸管上皮細胞から侵入すると考えられる。細胞内に侵入した *L. monocytogenes* はエンドソーム (マクロファージではファゴソーム, 食胞) 内に封じ込められる。ファゴソーム内に封じ込められた *L. monocytogenes* は、溶血毒であるリステリオリジン O (listeriolysin O, LLO) を産生してファゴソーム膜を傷害して細胞質へ脱出する。LLO をコードする *hly* 遺伝子を変異させるとマウスに対する病原性が著しく低下することから、LLO がリステリアの最も主要な病原因子と考えられている。細胞内に脱出した *L. monocytogenes* は、37 °C では鞭毛の発現がなく、宿主細胞質を自力で移動することはできない。そこで、菌体表面に存在するタンパク (ActA) が宿主細胞質内のアクチンを集積して菌体端にコメットテイルを形成することで、細胞内を動く想定されている。細胞質内を宿主のアクチン重合の力を借りて移動した菌は隣接細胞へと貫入し、二重膜に囲まれる。LLO 活性の至適 pH は酸性側にあるため、弱アルカリ環境である細胞質内では活性を発揮できない。ここでは、広い pH 域で作用するレシチナーゼ (ホスホリパーゼ) が活性化され、二重膜を傷害し、隣接細胞へと感染を拡大すると考えられる。この一連の細胞内動態は、*L. monocytogenes* の染色体上に存在する病原遺伝子群 (*Listeria* pathogenicity island 1; LIPI-1) の存在により可能となっている<sup>51)</sup>。

リステリア症の原因食品としては、生乳やナチュラルチーズなどの乳製品<sup>52, 53, 54)</sup>、豚肉製品<sup>55)</sup>などが報告されているが、これらの原因食が欧米の食文化と密接に関連していたことから、わが国では本菌に対する意識は低く、1980 年代後半に米国、スイス、デンマークでナチュラルチーズを原因とする集団発生が相次いで報告された際に一時的に輸入チーズに注意が集まった程度であった<sup>56)</sup>。しかしながら、リステリア症は他の細菌性の食品媒介感染症に比べて致死率が高く、米国では年間約 2,500 名が感染し、そのうちの 20%にあたる 500 名が死亡すると推計されている<sup>57)</sup>。このため、連邦食品医薬品局 (FDA)、米国農務省 (USDA) とも食品サンプル (25 g) から本菌は検出されてはならないとしており、欧州でも 1 g あたり 100 個以下に抑えることが義務付けられている<sup>41)</sup>。

*L. monocytogenes* は環境中に広く存在するため、様々な食品が本菌により汚染される可能性がある。また、本菌は 4 °C 以下でも増殖する能力を有しており<sup>46)</sup>、食品の低温保存・流通を食品衛生の柱としているわが国において、本菌がもつ低温増殖性

は、汚染された食品における本菌の制御を困難にしている。すなわち、食品のリステリア汚染を防止することが、リステリア症の発生を予防するために重要である。

わが国の市販食品の本菌汚染状況は欧米諸国と同程度であり<sup>58)</sup>、このことは、今後食品を介したリステリア症の集団発生が突発的に起こる可能性を示している。また、近年、水産品を原因としたリステリア症の事例が報告されるようになり<sup>59)</sup>、水産品も乳製品や食肉製品と並びリステリア症の原因食品として注目されるようになった。水産品はわが国では主要なタンパク源で非常に消費量の多い食品あり、種類も多様で、また生食嗜好があることから、そのリスク査定は急務である。加熱調理せずにそのまま食べる、いわゆる ready-to-eat 食品には *L. monocytogenes* を多数含むものがあり、諸外国で *L. monocytogenes* の規制対象となっている<sup>41)</sup>。

以上の情勢を踏まえて、本研究では、大阪市内で販売されている ready-to-eat 水産加工品についてリステリアの汚染状況を調べた。また、これらの食品の *L. monocytogenes* 汚染源および汚染経路を推察するため、PFGE 法および PCR 法を応用した型別法；arbitrarily primed PCR (AP-PCR)，repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR)，enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) を用いて水産加工品から分離された菌株について解析を行った。

## 2. 材料と方法

### (1) 材料

1999年8月から2000年12月まで、毎月5~10検体(うちスモークサーモン2~5検体を含む)の計95検体の ready-to-eat 水産加工品について *L. monocytogenes* の検索を行った。95検体には5製造元由来のスモークサーモンが36検体、3製造元由来のスモークトラウトが12検体、3製造元由来のスモークサーモンマリネ用が18検体、11製造元由来の鮭フレークが20検体、1製造元由来のカツオのたたきが6検体と、タコの塩辛、カツオ生節、辛子明太子がそれぞれ1検体ずつ含まれていた。

### (2) 培地

#### ①0.1%ペプトン水

ポリペプトン（微生物培養基用）（日本製薬株式会社，東京，#394-00115）1 g を純水 1,000 ml に溶解し，オートクレーブで 121 °C，15 分間滅菌した。

#### ②20 (w/v)%グリセリン加 0.1%ペプトン水

グリセリン（試薬特級）100 g をコルベンにはかり入れ，純水を 500 ml 加えてからポリペプトン（微生物培養基用）（日本製薬）0.5 g を溶解した後にオートクレーブで 121 °C，15 分間滅菌した。

#### ③LEB 培地

純水 1,000 ml に *Listeria* enrichment broth base (OXOID, Hampshire, UK, #CM862) 36.0 g を溶解し，2 ml の滅菌水で溶解した *Listeria* selective enrichment supplement (OXOID, #SR141) を 1 バイアル加え，オートクレーブで 121 °C，15 分間滅菌した。*Listeria* Enrichment broth (BD Difco, O#222220) の場合は，純水 1,000 ml に 36.1 g を溶解後オートクレーブで 121 °C，15 分間滅菌した。

#### ④UVM I および UVM II 培地

純水 500 ml に *Listeria* enrichment broth base (UVM formulation) (OXOID, #CM863) 27.2 g を加温溶解し，オートクレーブで 121 °C，15 分間滅菌したものを基礎培地とした。滅菌後，50 °C に冷ました基礎培地に，2 ml の滅菌水で溶解した *Listeria* selective enrichment supplement I (OXOID, #SR142) 1 バイアルを無菌的に添加した (UVM I 培地)。同様に，2 ml の滅菌水で溶解した *Listeria* selective enrichment supplement II (OXOID, #SR143) 1 バイアルを無菌的に添加した (UVM II 培地)。

#### ⑤1/2-Fraser 培地

純水 1,000 ml に FRASER *Listeria* selective enrichment broth (base) (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA, #1.10398.0500) 57.4 g を加温溶解し，オート

クレーブで 121 °C, 15 分間滅菌したものを基礎培地とした。滅菌後, 50 °C に冷ました基礎培地に, 1 ml の滅菌水で溶解した Ammonium iron(III) citrate (Merck, #1.10399.0001) を 1 バイアルと 1 ml の滅菌水で溶解した FRASER *Listeria* selective supplement (Merck, #1.10399.0001) 1 バイアルを無菌的に添加した。

⑥PALCAM (Polymyxin Acriflavine Lithium chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol) 寒天平板培地

純水 1,000 ml に PALCAM *Listeria* selective agar (base) (Merck, #111755) 69 g を溶解し, オートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌したものを基礎培地とした。滅菌後, 50 °C に冷ました基礎培地に, 1 バイアルを 1 ml の滅菌水で溶解した PALCAM *Listeria* selective supplement (Merck, #112122) を 2 バイアル加え, シャーレに分注して平板とした。

⑦EHA (Enhanced Hemolysis Agar) 寒天平板培地<sup>60)</sup>

純水 950ml に Tryptic soy blood agar base EH (BD Difco, #228300) 40 g, Lithium chloride (試薬特級) 5 g, 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucoside (SIGMA, #M3633) 50 mg をはかり入れ, 加温溶解後オートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌したものを基礎培地とした。滅菌後 40 °C 程度まで冷ました基礎培地に 1 バイアルを 1 ml の滅菌水で溶解した PALCAM *Listeria* selective supplement (Merck, #112122) を 2 バイアル, Sphingomyelinase (SIGMA, #S8633) 10 U, 綿羊血球液 (綿羊保存血 100 ml を遠沈, 上清を捨てた後 50 ml の滅菌生理食塩水に血球を再浮遊させたもの) を加え, シャーレに分注して平板とした。

⑧Oxford 寒天平板培地

純水 500 ml にオックスフォード基礎培地「ニッスイ」(ニッスイ, #05603) 32.8 g を溶解し, オートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌したものを基礎培地とした。滅菌後, 50 °C に冷ました基礎培地に, 1 バイアルを 5 ml の 70v/v%エタノールに溶解した *Listeria* Selective Supplement (Oxford formation) (OXOID, #SR140) 1 バイアルを加え, シャーレに分注して平板とした。

#### ⑨ヘッセの半流動培地

純水 1,000 ml にポリペプトン (微生物培養基用) (日本製薬) 10 g, 肉エキス ('LAB-LEMCO' Powder) (OXOID, #L29) 5 g, 塩化ナトリウム (試薬特級) 5 g, 寒天 (試薬一級) 2 g を溶解後, pH を 7.2~7.4 に調整して小試験管に分注し, オートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌した.

#### ⑩BHI 寒天平板培地

純水 1,000 ml に Brain Heart Infusion agar (BD Difco, #241830) 52 g を加温溶解後, オートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌し, シャーレに分注して平板とした.

#### ⑪BHI 半流動培地 (寒天濃度 0.2%)

純水 300 ml に Brain Heart Infusion (BD Difco, #237500) 11.1 g あるいはブレインハートインヒュージョンブイヨン「ニッスイ」(ニッスイ, #05508) 10.5 g, Bacto Agar (BD Difco, #214010) 0.6 g を加温溶解し, 小試験管に 3 ml ずつ分注し, オートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌した.

#### ⑫BHI ブイヨン培地

純水 300 ml に Brain Heart Infusion (BD Difco) 11.1 g あるいはブレインハートインヒュージョンブイヨン「ニッスイ」(ニッスイ) 10.5 g を加温溶解し, 小試験管に 2~3 ml ずつ分注してからオートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌した.

#### ⑬0.5%グルコース加普通寒天平板培地

純水 1,000 ml に普通寒天培地「ニッスイ」顆粒 (ニッスイ, #05514) 35 g, ブドウ糖 (無水) (試薬特級) 5 g を溶解後, オートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌し, シャーレに分注して平板とした.

#### ⑭糖分解試験用培地

##### *a. 糖分解試験用基礎培地*

純水 300 ml に Proteose peptone No.2 (BD Difco, #0121-17) 3 g, 肉エキス

(‘LAB-LEMCO’ Powder) (OXOID, #L29) 0.3 g, 塩化ナトリウム (試薬特級) 1.5 g を加温溶解した後に 0.2% ブロムクレゾールパープル溶液を 3 ml (10 ml/L) 加えてオートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌した。

*b. 10%糖液 (終濃度 0.5%)*

滅菌水 15 ml に, D(+)-キシロース (試薬特級), α-L(+)-ラムノース (試薬特級), D-マンニトール (マンニット) (試薬特級), α-メチル-D-マンノピラノシド (試薬特級) を各 1.5g 加え, 溶解した。

滅菌後の基礎培地に 10%糖液 15 ml をフィルター (ADVANTEC DISMIC-25, 0.2μm, Cellulose Nitrate 等) でろ過滅菌してから加え, 小試験管に 3 ml ずつ無菌的に分注して使用した。グルコース分解試験用培地は, 基礎培地にブドウ糖 (無水) (試薬特級) を 1.5 g (終濃度 0.5%) 加え, ダラム管を入れた小試験管に 3 ml ずつ分注してからオートクレーブした。(ラムノース, マンニットもグルコースと同様に作製してもよい。)

⑮ CAMP テスト用血液寒天培地

市販のものを使用した。すなわち, Trypticase Soy Agar II with 5% Sheep Blood (生培地, 日本ベクトンディッキンソン, #251239) あるいは CDC 嫌気性菌用ヒツジ血液寒天培地 (生培地, 同, #251733) のいずれかを使用した。

(3) 試薬

①滅菌水

蒸留水を 121 °C で 15 分間オートクレーブ後使用した。

②滅菌生理食塩水

純水 1,000 ml に塩化ナトリウム (試薬特級) 8.5 g を溶解し, 121 °C で 15 分間オートクレーブ後使用した。

③1%ホルマリン加滅菌生理食塩水

純水 500 ml に塩化ナトリウム (試薬特級) を 4.25 g を溶解し, オートクレーブ



で 121 °C, 15 分間滅菌して滅菌生理食塩水を作製した. 滅菌後, 50 °C 以下に冷ましてから 5 ml のホルマリン (試薬特級) を加えた.

#### ④0.5M EDTA (pH8.0)

第 1 章の 2. 材料と方法の (4) 試薬の項に従って調製した.

#### ⑤Lysis 溶液 (0.1 M EDTA, pH 8.0, 2 mg/ml deoxycholic acid, 1 mg/ml N-lauroylsarcosine, 1.5 mg/ml Lysozyme)

滅菌水で 0.5M EDTA (pH8.0) を 5 倍希釈し, 1 ml あたり 1 mg の N-lauroylsarcosine (SIGMA), 1 mg の Lysozyme (生化学工業), 2 mg の deoxycholic acid(SIGMA)を溶解した. 使用時に調製した.

#### ⑥20 mg/ml Proteinase K 溶液

第 1 章の 2.材料と方法 (4) の試薬の項に従って調製した.

#### ⑦EDTA-Sarcosyl-Proteinase K (ESP) 溶液

滅菌水で 0.5M EDTA (pH8.0) を 5 倍に, 20 mg/ml Proteinase K 溶液を 10 倍になるように希釈し, 1 ml あたり 5 mg の N-lauroylsarcosine (SIGMA)を溶解した. 使用時に調製した.

#### ⑧1.0%Low Melting agarose

第 1 章の 2.材料と方法の (4) 試薬の項に従って調製した.

#### ⑨1%PFC agarose

第 1 章の 2.材料と方法の (4) の試薬の項に従って調製した.

### (4) 食品からの *L. monocytogenes* の検出

#### ①増菌培養法

食品からの *L. monocytogenes* の検出方法の検討を行うため, 3 種類の増菌培地 (LEB 培地, UVM 培地, 1/2-Fraser 培地) を用いて 6 種類の培養法の検討を行

った。すなわち、無菌バッグに食品 50 g を無菌的に秤量し、0.1%ペプトン水で 2 倍希釈し、1 分間ストマッカー処理を行った。この 2 倍希釈サンプル 50 g を無菌バッグに採り、LEB 培地、UVM I 培地を注いで 500 g とした。残ったサンプルは等量 (50 g) の 20%グリセリン加 0.1%ペプトン水と混和して -20 °C で菌数測定用に保存した。これらを 30 °C で 24 時間培養後、PALCAM, Oxford および EHA 寒天平板培地に塗布し、35 °C で 48 時間培養を行った。LEB 培地はさらに 30 °C で 24 時間培養をおこなった。UVM I 培地は、培養液の 0.5 ml を 50 ml の UVM II 培地および 1/2-Fraser 培地に移植した。これらの二次増菌培地はさらに 30 °C で 24 時間培養をおこなった。培養後、LEB 培地、UVM I 培地およびエスクリンの分解により、黒色を呈した 1/2-Fraser 培地から、PALCAM, Oxford および EHA 寒天平板培地に塗布した。LEB 培地はさらに 30 °C で 5 日間培養を行い、培養後、PALCAM, Oxford および EHA 寒天平板培地に塗布した。

## ② *L. monocytogenes* の同定

PALCAM および Oxford 寒天平板上ではエスクリンの加水分解による黒色コロニーを、EHA 寒天平板上では溶血性および UV 照射下で蛍光を発するコロニーを *L. monocytogenes* と疑い、以下の方法で確認試験を行った。確認試験を行う前に *Listeria* 属に特徴的な運動性が観察されたヘッセの半流動培地から BHI 寒天平板に塗抹し、コロニーを単離した。シングルコロニーを BHI 半流動培地で 35 °C で 24 時間培養後、CAMP テストに供した。また、0.5%グルコース加普通寒天平板で増菌し、糖分解試験および血清型別試験を行った。血液寒天培地上で溶血性を示し、CAMP テスト陽性で、ラムノースおよび  $\alpha$ -メチル-D-マンノシドを分解し、キシロースおよびマンニット非分解であれば *Listeria monocytogenes* と同定した。

### a. 運動性の確認

*L. monocytogenes* が疑われるコロニーをヘッセの半流動培地に移植し、25 °C で 24~48 時間培養後、特徴的な運動性 (umbrella growth) の有無を観察した。

### b. グルコース利用能

グルコース添加ブイヨンに移植し、35 °C で 48 時間培養後 (最終 7 日後まで)、グルコースを利用し、ガス非産生であることを確認した。

### c. 糖分解試験

純培養であることを確認した *L. monocytogenes* を糖分解試験用培地に移植し、35 °C で 48 時間培養後（最終 7 日後まで）、グルコース、ラムノース、キシロース、マンニットおよび  $\alpha$ -メチル-D-マンノシドの各糖を利用した結果培地を黄変させたものを利用能陽性とした。

#### d. CAMP テスト

血液寒天培地上の中心に無菌的に  $\beta$ -Lysin-Reagent Disk (remel) を 1 枚おいた。ヘッセの半流動培地に発育した菌株を 10  $\mu$ l のディスポーザブルループでディスクから 2~3mm 離れた位置にディスクを中心に放射状に接種した。35 °C で 24~48 時間培養後、ディスクの周囲の  $\beta$  溶血帯が増強され、透明な帯が観察されれば CAMP テスト陽性と判定した。Positive Control として ATCC19115 菌株を用い、同時にテストを行った。

### (5) 血清型別試験

*L. monocytogenes* と同定された菌株はすべて血清型別試験を行った。血清型別試験には、O 抗原の型別と H 抗原の型別を行うために必要な抗血清が全て含まれている、市販のリステリア型別用免疫血清「生研」（デンカ生研、#214362）を使用し、O 抗原と H 抗原の組み合わせで血清型を決定した。

O 抗原の型別は以下の方法で行った。すなわち、0.5% グルコース加普通寒天培地に菌を塗抹して 35 °C で一晩培養した後、培地上に発育した生菌についてスライドグラス上で抗血清と混合し、凝集の有無を調べて O 抗原を決定した。型別用免疫血清のセットに含まれる O-I/II 群および O-V/VI 群のいずれの抗血清とも凝集が見られない場合、加熱死菌について生菌と同様にスライド凝集試験をおこなった。加熱死菌として、菌体を 100  $\mu$ l の滅菌生理食塩水に懸濁し、121 °C、15 分間オートクレーブを行った菌体を用いた。

H 抗原の型別は以下の方法で行った。すなわち、ヘッセの半流動培地に発育した菌を 2 ml の BHI ブイヨンに移植し、25 °C で一晩培養後、1%ホルマリン加滅菌生理食塩水を 2 ml を加え、ホルマリン固定した。ディスポーザブルのピペットを用いてホルマリン固定した菌液 1 ml をマイクロチューブに移し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。遠心後、上清をデカンテーションにより除去し、残った沈渣を抗原液とした。抗原液を型別用免疫血清のセットに含まれる H-AB 群、H-C および

H-D の各抗血清とスライドグラス上で混合して凝集の有無を調べ、H 抗原を決定した。

O 抗原では、加熱死菌を用いても凝集が見られない場合、H 抗原ではいずれの血清にも凝集が見られない場合を型別不能 (untypeable) とした。

#### (6) *L. monocytogenes* 菌数の計測

*L. monocytogenes* が検出された検体については、最確数 (Most Probable Number, MPN) 法により食品 25 g あたりの菌数の計測を行った。すなわち、20%グリセリン加 0.1%ペプトン水と混和して $-20^{\circ}\text{C}$ で保存しておいたサンプルを溶かした後、サンプルの 10, 1 および 0.1 ml (2.5, 0.25 および 0.025 g 相当量) をそれぞれ 3 本の増菌培地 (10 ml は 100 ml, 1 および 0.1 ml は 10 ml の培地) に接種した。増菌培地としては LEB 培地と UVMII および II 培地の 2 種類を使用した。LEB 培地は 7 日間培養を行った。培養後、それぞれの増菌培地から一白金耳を EHA 培地に塗抹し、 $35^{\circ}\text{C}$  で 48 時間培養後、第 2 章の 2.材料と方法の (4) 食品からの *L. monocytogenes* の検出の②に従って *L. monocytogenes* を同定した。

#### (7) PCR 法による *L. monocytogenes* の病原遺伝子 *prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *plcB* の検出

##### ① 鋳型 DNA の作製

DNA 抽出キットには市販の ISOPLANT (ニッポンジーン, 東京, #314-02731) あるいは ISOPLANT II (ニッポンジーン, #310-04151) を用い、以下の手順で鋳型 DNA を作製した。

- a. *L. monocytogenes* を 3 ml の BHI ブイヨンに接種し、 $37^{\circ}\text{C}$  で 24 時間培養した。
- b. 培養液 1 ml をマイクロチューブに移し、室温で 15,000 rpm で 2 分間 (ISOPLANT) あるいは 10,000 rpm で 5 分間 (ISOPLANT II) 遠心し、上清を吸引除去した。
- c. Solution I を 300  $\mu\text{l}$  加えてボルテックスミキサーで混和し、Solution II を 150  $\mu\text{l}$  加えてさらにボルテックスミキサーで混和し、水浴中で  $50^{\circ}\text{C}$ 、15 分間 (ISOPLANT) あるいは 10 分間 (ISOPLANT II) 反応させた。

- d. 反応終了後, Solution III を 150  $\mu$ l (ISOPLANT) あるいは Solution III-A を 100  $\mu$ l と Solution III-B を 120  $\mu$ l (ISOPLANT II) 加え, ボルテックスミキサーで混和した. その後, 氷上で 15 分間 (ISOPLANT) あるいは 10 分間 (ISOPLANT II) 放置した.
- e. 上記反応液を 12,000 rpm, 10 分間 4 °C で遠心を行った後, 先端をカットしたチップで上清 300  $\mu$ l を新しいマイクロチューブに移した.
- f. 600  $\mu$ l のエタノールを加えて転倒混和し 15,000 rpm で 5 分間室温で遠心を行って DNA を沈殿させ, 上清をデカンテーションで捨てた.
- g. 70%エタノールを 1 ml 加えて転倒混和し 10,000 rpm で 1 分間室温で遠心を行って沈渣を洗浄した.
- h. 沈渣を乾燥させた後, 100  $\mu$ l の滅菌水に溶解し, PCR の鋳型 DNA とした.

## ②プライマー

*L. monocytogenes* の病原遺伝子 *prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *plcB* を標的とする以下のプライマーセットを用いた<sup>61)</sup>.

Oligo name	Sequence	Length (mer)	Product size
<i>prfA</i> 1	5'-GGTAGCACAAAGCTCACGAG-3'	20.00	71 bp
<i>prfA</i> 2	5'-CCCAAGTAGCAGGACATGCTAA-3'	22.00	
<i>plcA</i> 1	5'-GGAAGTCCATGATTAGTATGTGCC-3'	22.00	91 bp
<i>plcA</i> 2	5'-GCGCAGCATTAACAACAAG-3'	22.00	
<i>hlyA</i> 1	5'-CACTCAGCATTGATTTAGCCA-3'	20.00	276 bp
<i>hlyA</i> 2	5'-ATTTCCCTTCACTGATTGC-3'	20.00	
<i>mpl</i> 1	5'-GGCTCATTTCACTATGACGG-3'	20.00	1473 bp
<i>mpl</i> 2	5'-GCTTCCAAGCTTCAGCAACT-3'	21.00	
<i>plcB</i> 1	5'-GCAAGTGTTCTAGTCTTCCGG-3'	22.00	795 bp
<i>plcB</i> 2	5'-ACCTGCCAAAGTTTGCTGTGA-3'	21.00	

### ③PCR 用試薬の調整

以下に従って PCR 用試薬を調整し, 22.5  $\mu\text{l}$  ずつ 4 本の PCR 用チューブに分注したのちに鋳型 DNA を 1 サンプルあたり 2.5  $\mu\text{l}$  ずつ加えた.

試薬	最終濃度	使用量
10 X Ex Taq Buffer		2.5 $\mu\text{l}$
dNTP mixture (2.5 mM each)	200 $\mu\text{M}$	2.0 $\mu\text{l}$
各プライマーセット (50 $\mu\text{M}$ )	各 1 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{l}$
<i>prfA1</i> および <i>prfA2</i>		
<i>plcA1</i> および <i>plcA2</i>		
<i>hlyA1</i> および <i>hlyA2</i>		
<i>mpl1</i> および <i>mpl2</i>		
<i>plcB1</i> および <i>plcB2</i>		
TaKaRa Ex Taq	0.5 U	0.1 $\mu\text{l}$
鋳型 DNA	2.5 $\mu\text{l}$	2.5 $\mu\text{l}$
滅菌水		17.4 $\mu\text{l}$
計		25 $\mu\text{l}$

### ④PCR 増幅条件

PCR には TaKaRa Thermal Cycler MP (宝酒造) を使用し, 以下に示す条件で増幅を行った.

94 °C 3 分	1 サイクル
94 °C 1 分+55 °C 1 分+72 °C 1 分	35 サイクル
72 °C 7 分	1 サイクル

### ⑤PCR 産物の解析

PCR 産物の解析は, ミューピッド (ADVANCE) によるアガロースゲル電気泳動を用いて行った. 泳動には NuSieve3:1Agarose (CAMBREX) を 3% の濃度で使用した. 泳動用バッファーは 1X TAE を使用した. 10  $\mu\text{l}$  の PCR 産物を 2  $\mu\text{l}$  のゲルローディングバッファーと混合し, ゲルの各ウェルにアプライし, 100 V で泳動を

行った. マーカーには 100 bp Ladder (NEB) を使用した. 泳動後のゲルを 0.5  $\mu$ l/ml のエチジウムブロマイド溶液に浸漬し, 20 分間染色後, 蒸留水でゲルを洗浄し, UV トランスイルミネーター (フナコシ) を用いて 254 nm の紫外線下で各サイズに DNA のバンドを確認したものを *cpe* 遺伝子保有と判定した.

## (8) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

### ①プラグの作製

BHI 寒天平板培地上に発育した *L. monocytogenes* のコロニーを 1  $\mu$ l のディスポーザブルループで 5 個かきとり, 100  $\mu$ l の滅菌水に懸濁した. 菌懸濁液に融解後あらかじめ 65°C に保温しておいた 300  $\mu$ l の 1.0% Low Melting Agarose を加えて緩やかに混和し, プラグモールドに分注してゲルを氷上で固化させた. プラグをモールドから抜き取り, 1 ml の Lysis 溶液で 37 °C, 24 時間インキュベート後, 1 ml の ESP 溶液に入れ換えて 50 °C で 48 時間インキュベートした. プラグは泳動を行うまで 4 °C で保管した.

### ②制限酵素処理

プラグをウェルの大きさに合わせて切断した後, 500  $\mu$ l の 4 mM Pefabloc SC に浸漬して 50 °C で 30 分間インキュベートした. 30 分後, 500  $\mu$ l の 4 mM Pefabloc SC に入れ換えてさらに 30 分間インキュベートを行った. 1 ml の TE Buffer に入れ換えて氷上で 30 分間処理後制限酵素用のバッファーでさらに 30 分間氷上で平衡化した後 10 U の *AscI* (NEB) および 100 U の *ApaI* (宝酒造) で 37 °C, 18~20 時間処理した.

### ③電気泳動

制限酵素処理後のプラグは 500  $\mu$ l の 0.5X TBE バッファー中においた. 電気泳動には Bio-Rad の CHEF-DRIII を使用し, 1%PFGE certified agarose, 0.5X TBE バッファーを用いた. バッファー温度 14 °C, アングル 120°, 6 V/cm でパルスタイム 4~40 秒, 22 時間泳動を行った. マーカーは, Bio-Rad の Lambda Ladder を使用した. 泳動後のゲルを 0.5  $\mu$ l/ml のエチジウムブロマイド溶液に浸漬して 30~60

分間染色後，蒸留水でゲルを洗浄し，UV トランスイルミネーター（フナコシ）を用いて 254 nm の紫外線下で DNA のバンドを確認し，写真撮影を行った。

#### ④ バンドパターンの解釈

PFGE 法によって得られたバンドパターンは，3 バンド以上異なる場合をそれぞれ異なるパターンとして任意に A~E と名づけた<sup>33)</sup>。PFGE 法の結果バンドパターンがスメア上になったものは UT (Untypeable, 型別不能) とした。

#### (9) PCR 法を応用した型別法

PCR を応用した型別法として arbitrarily primed PCR (AP-PCR), repetitive element palindromic PCR (REP-PCR) および enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) を行った<sup>62)</sup>。

#### (10) 有意差の検定

Ready-to-eat 水産加工品から *L. monocytogenes* を検出するために用いた 6 種類の増菌培養法については，フィッシャーの直接確率計算法を用いて有意差の検定を行った (Table 6)。



### 3. 結果

市販されている ready-to-eat 水産加工品を用いて *L. monocytogenes* 検出における 6 種類の増菌培養法の検討を行ったが、12 検体全てにおいて本菌を検出することができた増菌方法はなかった。LEB 培地で 1 日培養後における *L. monocytogenes* の検出率が有意に低かった ( $P < 0.05$ ) のを除くと、他の 5 種類の増菌方法に有意な差は認められなかった。しかしながら、LEB 培地で 7 日間培養する方法の *L. monocytogenes* 検出率が最もよかった。48 時間培養では、UVM I および II 培地の検出率が最もよかった (Table 6)。3 種類の分離平板培地、すなわち、PALCAM, Oxford および EHA 寒天平板培地の比較では、有意差はなかったものの、EHA 寒天平板が他の 2 種類の平板に比べて *L. monocytogenes* の分離に適していた (Table 7)。

6 種類の増菌培養法の組み合わせで、市販の ready-to-eat 水産加工品 95 検体中 12 検体 (13%) から *L. monocytogenes* が検出された。12 検体は全てスモークサーモン等の冷燻製品であった (Table 8)。また、12 検体中 9 検体が、6 月から 9 月にかけて採取された検体であった (Table 9)。MPN 法で食品中の *L. monocytogenes* 菌数の測定を行った結果、25 g あたり  $< 3.0$  から 1,100 であった。これらの中に、ヨーロッパの規制値である 1 g あたり 100 を超えるものはなかった (Table 9)。

*L. monocytogenes* が検出された 12 検体のうち 1 検体 (A 社のスモークサーモンマリネ用) で、複数の血清型 (1/2a と 3a が各 1 株ずつ) の菌株が分離された。分離された *L. monocytogenes* の血清型および病原遺伝子保有状況を Table 10 に示した。血清型は 1/2a が 8 株で最も多く、4b が各 2 株、次いで 3a が 1 株で型別不能 (UT) が 2 株あった。これらの菌株は全て 5 つの病原遺伝子を保有していた。菌株の型別の結果、13 株は制限酵素 *AscI* および *ApaI* を用いた PFGE 法、2 種類のプライマーを用いた AP-PCR, REP-PCR および ERIC-PCR のすべての方法で 5 パターンに分類された (Table 9, Fig. 3~4)。

A, B, C, D の 4 社において、複数の検体からリステリアが検出された。同一製造元由来の製品から分離されるリステリアは、検体や検体採取日が異なる場合でも同一の血清型および PFGE パターンを示す傾向が認められた。また、A 社由来の血清型 1/2a のリステリアと D および E 社由来の 1/2a のリステリアは異なる PFGE パターンを示した。

Table 6 Recovery of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat seafood by 6 procedures

No. of items	No. of positive samples	No. of positives in each enrichment broth <sup>a</sup>					
		UVM I	UVM II	1/2-Fraser	LEB Day1	LEB Day2	LEB Day7
95	12	8	10	9	2 <sup>b</sup>	8	11

<sup>a</sup> A 50 ml portion of the stomacher fluid was inoculated into 450 ml of each of University of Vermont broth (UVM) I and *Listeria* enrichment broth (LEB). These were incubated for 24 h at 30°C (UVM I and LEB Day1). The LEB was further incubated for 24h (LEB Day2) and for further five days (LEB Day7) at 30°C. UVM II and half strength Fraser broth (1/2-Fraser) were used as second enrichment broth. The 0.5 ml of UVM I was transferred to each of these secondary broths and also incubated for 24 h at 30°C. Each of the enrichment broths was streaked onto each of the three plating media, EHA, Oxford and PALCAM agar.

<sup>b</sup> Significantly fewer than the number of positives detected using the other enrichment methods ( $P < 0.05$ ).

Table 7 Comparison of selective agar media for isolation of *L. monocytogenes* from ready-to-eat seafood

Media	No. of <i>Listeria</i> -like colony positives	No. of <i>L. monocytogenes</i> positives
	No. of analysed enrichment broths or samples	No. of <i>Listeria</i> -like colony positives
EHA	79 / 576 (13.7%)	34 / 79 (43.0%)
Oxford	81 / 555 (14.6%)	32 / 81 (39.5%)
PALCAM	91 / 603 (15.1%)	32 / 91 (35.2%)

Table 8 Incidence of *L. monocytogenes* in ready-to-eat seafood products

Items	No. of samples	No. of positive samples (%)	Manufacturer (No. of positive samples)
Smoked salmon for marination	18	5 (27.8)	A(3), B(2)
Smoked salmon	36	4 (11.1)	A(1), C(2), D(1)
Smoked trout	12	3 (25.0)	A(2), D(1)
Dried salmon flakes	20	0	
Roast bonito	6	0	
Salted octopus	1	0	
Hot-smoked bonito	1	0	
Seasoned pollack roe	1	0	
Total	95	12	

Table 9 Prevalence and characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated from ready-to-eat seafood products

Manuf acturer	Incidence of positive samples	Food type <sup>a</sup>	Serotype	Date of isolation	MPN in 25g of sample		PFGE			PCR-based typing		
					UVMI+	LEB	AscI	Apal	AP-PCR type	REP type	ERIC type	
A	6/7	Smoked salmon for marination	1/2a	9/99	<3.0	9.1	C	C	III		3	3
		Smoked salmon	1/2a	10/99	93	460	C	C	III		3	3
		Smoked trout	1/2a	6/00	<3.0	29	C	C	III		3	3
		Smoked salmon for marination	1/2a	6/00	3.6	240	C	C	III		3	3
		Smoked trout	1/2a	9/00	23	43	C	C	III		3	3
		Smoked salmon for marination	3a <sup>a</sup>	9/00	460	1100	C	C	III		3	3
			1/2a <sup>a</sup>	9/00	460	1100	D	D	IV		4	4
B	2/22	Smoked salmon for marination	UT <sup>b</sup>	8/99	<3.0	3.0	E	E	V		5	5
		Smoked salmon for marination	UT <sup>b</sup>	9/99	<3.0	3.0	E	E	V		5	5
C	2/9	Smoked salmon	4b	10/99	<3.0	<3.0	A	A	I		1	1
		Smoked salmon	4b	1/00	<3.0	<3.0	A	A	I		1	1'
D	2/12	Smoked salmon	1/2a	8/99	<3.0	3.6	B	B	II		2	2
		Smoked trout	1/2a	9/99	<3.0	3.0	B	B	II		2	2

<sup>a</sup> Isolates from the same item.

<sup>b</sup> UT, untypeable

Table 10 Serotypes and possession of virulence gene *L. monocytogenes* strains

Serotype	No. of isolates	Possession of five virulence genes				
		<i>prfA</i>	<i>plcA</i>	<i>hlyA</i>	<i>mpl</i>	<i>plcB</i>
1/2a	8	+	+	+	+	+
4b	2	+	+	+	+	+
3a	1	+	+	+	+	+
UT	2	+	+	+	+	+

UT, untypeable



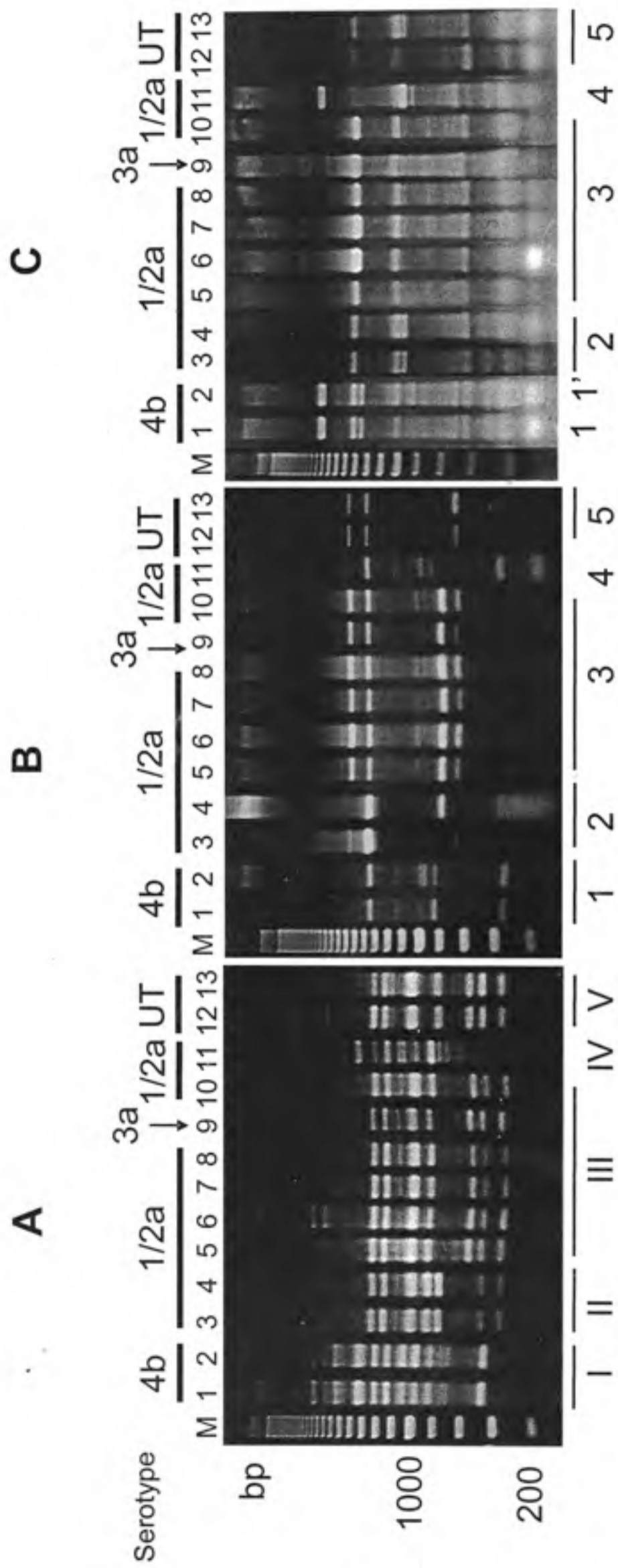


Figure 4. AP-PCR, REP-PCR, ERIC-PCR patterns and serotype of 13 *L. monocytogenes* strains isolated from cold-smoked fish. (A) AP-PCR type with primer PJ108. Lanes 1 and 2; AP-PCR type I and serotype 4b, lanes 3 and 4; AP-PCR type II and serotype 1/2a, lanes 5 to 8, and 10; AP-PCR type III and serotype 1/2a, lane 9; AP-PCR type III and serotype 3a, lane 11; AP-PCR type IV and serotype 1/2a, lanes 12 and 13; AP-PCR type V and serotype untypeable. (B) REP-PCR type. Lanes 1 and 2; REP-PCR type 1 and serotype 4b, lanes 3 and 4; REP-PCR type 2 and serotype 1/2a, lanes 5 to 8, and 10; REP-PCR type 3 and serotype 1/2a, lane 9; REP-PCR type 5 and serotype untypeable. (C) ERIC-PCR type. Lanes 1; ERIC-PCR type 1 and serotype 4b, Lanes 2; ERIC-PCR type 1' and serotype 4b, lanes 3 and 4; ERIC-PCR type 2 and serotype 1/2a, lanes 5 to 8, and 10; ERIC-PCR type 3 and serotype 1/2a, lane 9; ERIC-PCR type 3 and serotype 3a, lane 11; ERIC-PCR type 4 and serotype 1/2a, lanes 12 and 13; ERIC-PCR type 5 and serotype untypeable. Lane M; molecular marker of the 200 bp DNA ladder.



#### 4. 考察

ヒトのリステリア症は、95%以上が血清型 4b, 1/2a, 1/2b のリステリアによって引き起こされる<sup>44, 45, 46)</sup>。Ready-to-eat 水産加工品から分離されたリステリアの血清型は、13 株のうち 1/2a が 8 株、4b が 2 株あり、ヒトの臨床例に多い血清型が含まれていた。また、これら 13 株はいずれも、宿主細胞内で病原性を発揮するために必須の 5 種類の病原遺伝子を保有していたことから、これらの分離株はヒトに対する感染性を有していると考えられた (Table 10)。原ら<sup>63)</sup>は日本国内で販売されている ready-to-eat 水産加工品 35 品目 394 検体についてリステリア汚染状況を調べ、分離されたリステリアの血清型は 104 株のうち 44 株 (42.3%) が 1/2a で最も多かつたとしているが、我々の結果もこれと一致した。

日本国内において ready-to-eat 水産加工品を原因とするリステリア症の発生はこれまでに確認されていないが、諸外国ではスモークサーモン<sup>64, 65)</sup>、スモークした貝<sup>66)</sup>を原因とするリステリア症事例がすでに報告されている。今後、国内においても ready-to-eat 水産加工品を原因とするリステリア症の発生が懸念される。

分離されたリステリアの血清型は製造元毎に偏りが見られた (Table 9)。これらの菌株について PFGE 法および PCR 法による解析を行った結果、同一製造元由来で同一血清型のリステリアは、同一の PFGE パターンを示す傾向が認められた。A 社においては、検体や検体の採取時期が異なる場合でも同一の血清型と PFGE パターンを示す菌株が分離された。また、A および D 社の製品から分離された血清型 1/2a のリステリアの PFGE パターンは互いに異なっていた。PFGE 法により同一血清型の菌株間での異同を識別することが可能となり、製造元に特有の *L. monocytogenes* 菌株の存在が示唆された。

スモークサーモン製造施設において、同じ DNA パターンを示すリステリアが長期的に製造施設内から分離されることが知られている<sup>67)</sup>。このように製造施設に特有の菌株の存在は、食肉製品や乳製品の場合でも同様の傾向が見られ<sup>68, 69)</sup>、これらは persistent strain と呼ばれる。食品の製造施設内から特定のリステリア菌株が除去されにくい要因としては、菌株間で消毒剤に対する感受性<sup>70)</sup>やステンレス表面への付着性が異なる<sup>71)</sup>ことが考えられる。また、persistent strain は、nonpersistent strain に比べてバイオフィルム形成能が高いとの報告もある<sup>72)</sup>。A 社の製品から最も高頻度

に分離された血清型 1/2a で PFGE パターン C のリステリアはサンプルや採取時期の異なるサンプルから経年的に分離されていることから、これらのタイプの菌株は、当該施設の persistent strain となっている可能性があると考えられた。安全な製品を確保するためには、A 社の製造施設における本菌の汚染状況を明らかにし、製品への汚染経路について調べる必要があると思われる。

食品由来リステリア菌株の解析に PFGE 法を用いることにより、同一血清型のリステリア菌株間での異同の識別が可能となった。解析の結果、ready-to-eat 水産加工品は各製造施設に特有の *L. monocytogenes* 菌株によって製造工程中に長期的に汚染されている可能性があると考えられた。

## 小括

大阪市内で実際に販売されている ready-to-eat 水産加工品における *Listeria monocytogenes* の汚染状況を調べた結果、スモークサーモン等の冷燻製品から *L. monocytogenes* が比較的高率に検出された。分離された菌株に PFGE 法および PCR 法を応用した型別法を適用し、菌株間の異同を識別した結果、同一製造元で製造された製品は、サンプルやサンプルの採取時期が異なる場合でも同一の血清型および DNA パターンを示す菌株によって汚染される傾向が認められた。また、*L. monocytogenes* が検出された 12 検体のうち 9 検体が夏季から秋季に採取されたサンプルであったことから、各製造元に特有の菌株が存在し、これらの菌株が夏季に増殖して製品を汚染している可能性が示唆された。

## 第3章 スモークサーモン製造工場の *Listeria monocytogenes* 汚染状況と汚染源探索における分子生物学的手法の適用

### 1. 緒言

前章において、市販の水産加工品のうちスモークサーモン等の冷燻製品が実際に *L. monocytogenes* によって汚染されていることが明らかとなった。また、水産加工品から分離された *L. monocytogenes* の型別法として、PFGE 法および AP-PCR 法、REP-PCR 法、ERIC-PCR 法が有効であることがわかった。製品の汚染調査を通じて、製品汚染率が特に高く、特定の菌株による長期的な施設汚染が疑われる一水産加工場が認められたことから、本章では、同施設内の汚染状況を把握するために定期的に調査を行い、施設内から採取した原材料や環境などのサンプルから *L. monocytogenes* の分離を試みた。また、*L. monocytogenes* の型別に上記の分子生物学的手法を応用して、施設内分離菌株と製品由来株間の異同を識別し、*L. monocytogenes* 汚染源および汚染経路の推察に応用した。

### 2. 材料と方法

#### (1) 調査期間

スモークサーモン製造施設 A 社への立ち入り調査は、2002 年 8 月、9 月、11 月、12 月、2003 年 5 月~10 月、12 月、2004 年 1 月~3 月および 5 月の計 15 回行った。

#### (2) 培地

##### ①0.1%ペプトン水

第2章 2.材料と方法の (2) 培地の項と同様の方法で調製した。

##### ②20 (w/v)%グリセリン加 0.1%ペプトン水

第2章 2.材料と方法の (2) 培地の項と同様の方法で調製した。

### ③LEB 培地

第 2 章 2.材料と方法の (2) 培地の項と同様の方法で調製した.

### ④EHA (Enhanced Hemolysis Agar) 寒天平板培地<sup>60)</sup>

第 2 章 2.材料と方法の (2) 培地の項と同様の方法で調製した.

### ⑤クロモアガーリステリア寒天平板培地

純水 1,000 ml に CHROM agar *Listeria* base (関東化学, #72038) 51.5 g を溶解し, オートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌したものを基礎培地とした. 滅菌したコルベンに 9 g の CHROM agar *Listeria* supplement をはかり入れ, 滅菌水 40 ml を加え, 培地に添付されている専用のスターラーバーを火炎滅菌後投入して最低 30 分間高速で攪拌した. オートクレーブ後, 基礎培地を 48 °C まで冷ましてからサプリメントを加え, スターラーバーで約 1 分間攪拌後, シャーレに分注し, 平板とした.

### ⑥Oxford 寒天平板培地

第 2 章 2.材料と方法の (2) 培地の項と同様の方法で調製した.

### ⑦ヘッセの半流動培地

第 2 章 2.材料と方法の (2) 培地の項と同様の方法で調製した.

### ⑧BHI 寒天平板培地

第 2 章 2.材料と方法の (2) 培地の項と同様の方法で調製した.

### ⑨BHI 半流動培地 (寒天濃度 0.2%)

第 2 章 2.材料と方法の (2) 培地の項と同様の方法で調製した.

### ⑩BHI 培地

第 2 章 2.材料と方法の (2) 培地の項と同様の方法で調製した.

⑪0.5%グルコース加普通寒天平板培地

第2章2.材料と方法の(2)培地の項と同様の方法で調製した。

⑫糖分解試験用培地

第2章2.材料と方法の(2)培地の項と同様の方法で調製した。

⑬CAMPテスト用血液寒天培地

第2章2.材料と方法の(2)培地の項と同一のものを使用した。

(3) 試薬

①滅菌水

蒸留水を121℃で15分間オートクレーブ後使用した。

②滅菌生理食塩水

純水1,000 mlに塩化ナトリウム(試薬特級)8.5 gを溶解し、121℃で15分間オートクレーブ後使用した。

③1%ホルマリン加滅菌生理食塩水

第2章2.材料と方法の(3)試薬の項と同様の方法で調整した。

④0.5 M EDTA, pH8.0

第1章2.材料と方法の(4)試薬の項と同様の方法で調整した。

⑤Lysis 溶液

第2章2.材料と方法の(3)試薬の項と同様の方法で調整した。

⑥20 mg/ml Proteinase K ストック溶液

第2章2.材料と方法の(3)試薬の項と同様の方法で調整した。

## ⑦ESP 溶液

第2章 2.材料と方法の (3) 試薬の項と同様の方法で調整した。

### (4) 検体および検体採取法

#### ①ふきとり水

滅菌綿棒（ニッスイ，#06526）で同一箇所を2回ふきとり，それぞれを10 ml の0.1%ペプトン水に無菌的に投入した。

#### ②原材料（冷凍サーモンの皮），食品（スライス前の製品，最終製品），工程中の材料（工程中の原材料，中間生成物，サーモンの皮，エラ，下顎）およびサーモン端材

約100 gを無菌的に無菌カップあるいはビニール袋に採取した。

#### ③液体（床水，側溝水，踏み込み水など）

ディスポーザブル（栄研化学，#CD2000）の滅菌スポイトで吸い上げ，滅菌チューブ（50 mlの遠心チューブ）に採取した。

これらの検体は，保冷材とともにクーラーボックスに入れて持ち帰り，3時間以内に検査に供した。

#### ④工場内の配置および採取した検体

工場内は Fig. 5 のような配置となっており，15回の調査で採取した430検体はカテゴリー別に分類して Table 11-1~11-15 および Table 12 に示した。

### (5) *L. monocytogenes* 検出法

ふきとり水は，10 mlの0.1%ペプトン水2本を滅菌チューブに移してよく混和し，ここから10 mlを採取してふきとった2本の綿棒とともに100 mlのLEB培地に投入した。液体サンプルは，混和後10 mlをLEB培地に投入した。食品は，ストマッカーバッグに50 gを無菌的に秤量し，0.1%ペプトン水を加えて100 gと

した。1分間ストマッカー処理後、新しいバッグにここから50 gを秤量し、LEB培地を注いで500 gとした。LEB培地は30 °Cで7日間培養した。残ったサンプルは等量（ふきとり水は10 ml、食品は50 g）の20%グリセリン加0.1%ペプトン水と混和して-20 °Cで保存した。培養後、増菌培養液の一白金耳をとり、EHA寒天平板培地およびクロモアガーリステリア寒天平板培地に画線塗抹し、37 °Cで48時間培養した。培養後、クロモアガー上では周囲に白濁帯の見られる青色コロニー、EHA上では溶血性を示してUV下で蛍光を発するコロニーをヘッセの半流動培地およびOxford寒天平板培地に移植した。ヘッセの半流動培地は25 °C、Oxford寒天平板は35 °Cで24から48時間培養した。ヘッセの半流動培地上で*Listeria*属に特徴的なumbrella motilityが確認され、Oxford寒天平板上でエスクリン分解による黒色集落を形成したものを*L. monocytogenes*と疑い、第2章の2.材料と方法の(4)食品からの*L. monocytogenes*の検出に従って確認試験を行い、*L. monocytogenes*と同定した。

#### (6) 血清型別試験

*L. monocytogenes*と同定された菌株は、第2章2.材料と方法(5)血清型別試験の手順に従って、O抗原およびH抗原の型を決定し、これらの組み合わせで、血清型を決定した。

#### (7) 市販のキットによる*Listeria*属の検出

LEB培地で7日間培養後の菌液について、市販のキットで*Listeria*属の検出を行った。市販のキットには、VIP for *Listeria* (BIOCONTROL, Street Bellevue, WA, USA, #600120)あるいはリステリア迅速テストキット (OXOID. *Listeria* RAPID TEST) (関東化学, 東京, #FT405, 710405-5)を使用した。LEB培地で7日間培養後、増菌培養液1 mlをマイクロチューブに移し、VIP for *Listeria*は沸騰水中で5分間、リステリア迅速テストキットは水浴中で80 °C、20分間加熱後、サンプル滴下口にそれぞれ100 µlおよび135 µlを滴下した。陽性コントロールラインが出現するのを確認した後、テスト窓にも検出ラインが出現した場合を陽性と



判定した。

#### (8) 一般生菌数および大腸菌群数の測定

原材料および食品は 10 g を秤量し、システムダイリユーター (IUL, S. A. Barcelona, SPAIN) を使用して滅菌生理食塩水で 100 g としたものを 1 分間ストマッカー処理し、10 倍希釈液とし、10 倍希釈液 1 ml を 9 ml の滅菌生理食塩水に加えて 100 倍希釈液とした。10 倍および 100 倍希釈液 1 ml を各 2 枚のシャーレに分注した。ふきとり水については 100 cm<sup>2</sup>あたりの菌数を算出するため、10 x 10 cm のステンレス製のふきとりワク (GSI クレオス, 東京, #TT-020) を使用し、10 x 10 cm の区画を同一箇所について 2 本の滅菌綿棒を用いて拭き取り、それぞれ 10 ml の 0.1%ペプトン水に投入した。10 ml の 0.1%ペプトン水 2 本を 50 ml の遠心チューブを用いて一つにあわせてよく混和したものを試料とした。試料 1 ml を 9 ml の滅菌生理食塩水に加えて 10 倍希釈液とした。同様の方法で 10 倍段階希釈を行い、試料の希釈液とした。これらの希釈液 1 ml を各 2 枚のシャーレに分注し、一般生菌数および大腸菌群数の測定を行った。

一般生菌数の測定には標準寒天培地 (ニッスイ, #05618) を使用し、35 °C で 48 時間培養した。大腸菌群数の測定にはデゾキシコレート寒天培地 (ニッスイ #05636) を使用し、35 °C で 18~20 時間培養後、食品衛生検査指針に従って菌数を算出した。ふきとり水は 1 ml あたりの菌数を 20 倍したものを 100 cm<sup>2</sup>あたりの菌数とした。

#### (9) 分離菌株

2002 年 8 月から 2004 年 5 月の間に A 社において実施した 15 回の調査で分離、同定された 348 株の *L. monocytogenes* のうち、由来や血清型の異なる 77 株を選び、DNA 解析を行った (Table 13)。

#### (10) PCR 法による *Listeria* 属の確認および病原遺伝子 *hly* の検出

第 5 回目の調査 (2003.5.26) 以降分離された菌株については、*Listeria* 属の確

認のために 16S rRNA 遺伝子の保有の有無を調べた。同時に *hly* 遺伝子保有の有無を調べることにより、*L. monocytogenes* の確認も行った。第 1~4 回目に分離された *Listeria* 属の菌株は全て 16S rRNA 遺伝子の保有を確認し、同様に *L. monocytogenes* は全て 16SrRNA 遺伝子および *hly* 遺伝子を保有することを確認した。

### ①鋳型 DNA の作製

第 2 章 2. 材料と方法の (6) の①鋳型 DNA の作製の項に従って鋳型 DNA を作製した。

### ②プライマー

*Listeria* 属が保有する 16SrRNA 遺伝子および *L. monocytogenes* が保有する *hly* 遺伝子を標的とする以下のプライマーセットを用いた<sup>73)</sup>。

Oligo name	Sequence	Length (mer)	Product size
U1	5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'	18.00	938 bp
LI1	5'-CTCCATAAAGGTGACCCT-3'	18.00	
LM1	5'-CCTAAGACGCCAATCGAA-3'	18.00	702 bp
LM2	5'-AAGCGCTTGCAACTGCTC-3'	18.00	

### ③PCR 用試薬の調整

以下に従って PCR 用試薬を調整し、22.5  $\mu$ l ずつ 4 本の PCR 用チューブに分注したのちに鋳型 DNA を 1 サンプルあたり 2.5  $\mu$ l ずつ加えた。

試薬	最終濃度	使用量
10 X Ex Taq Buffer		2.5 $\mu$ l
dNTP mixture (2.5 mM each)	200 $\mu$ M	2.0 $\mu$ l
プライマーU1 および LI1 (各 50 $\mu$ M)	各 0.5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
プライマーLM1 および LM2 (各 50 $\mu$ M)	各 0.5 $\mu$ M	0.5 $\mu$ l
TaKaRa Ex Taq	0.5 U	0.1 $\mu$ l
鋳型 DNA		2.5 $\mu$ l
滅菌水		16.9 $\mu$ l
計		25 $\mu$ l

#### ④PCR 増幅条件

PCR には TaKaRa Thermal Cycler MP (宝酒造) を使用し、以下に示す条件で増幅を行った。

94 °C 5 分	1 サイクル
94 °C 1 分+52 °C 1 分+72 °C 1 分	30 サイクル
72 °C 5 分	1 サイクル

#### ⑤PCR 産物の解析

PCR 産物の解析は、ミューピッド (ADVANCE) によるアガロースゲル電気泳動を用いて行った。泳動には NuSieve3:1Agarose (CAMBREX) を 3% の濃度で使用した。泳動用バッファは 1 X TAE を使用した。5  $\mu$ l の PCR 産物を 1  $\mu$ l のゲルローディングバッファと混合し、ゲルの各ウェルにアプライし、100 V で泳動を行った。マーカーには 100 bp Ladder (NEB) を使用した。泳動後のゲルを 0.5  $\mu$ g/ml のエチジウムブロマイド溶液に浸漬し、20 分間染色後、蒸留水でゲルを洗浄し、UV トランスイルミネーター (フナコシ) を用いて 254 nm の紫外線下で各サイズに DNA のバンドを確認したものを遺伝子保有と判定した。

(11) PCR 法による *L. monocytogenes* の病原遺伝子 *prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *plcB* の検出

第2章2.材料と方法の(7)PCR法による *L. monocytogenes* の病原遺伝子 *prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *plcB* の検出に従って行った。

#### (12) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

第2章2.材料と方法の(8) Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) に従って PFGE 法を行った。PFGE 法によって得られたバンドパターンは、3バンド以上異なる場合をそれぞれ異なるパターンとして任意に C, D および F~J と名づけた<sup>33)</sup>。PFGE 法の結果バンドパターンがスメア上になったものは UT (Untypeable, 型別不能) とした。

#### (13) PCR を応用した型別法

第2章2.材料と方法の(9)PCR法を応用した型別法と同様に, arbitrarily primed PCR (AP-PCR), repetitive extragenic palindromic PCR (REP-PCR) および enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR (ERIC-PCR) を行った<sup>62)</sup>。

#### (14) 施設から分離された *L. monocytogenes* のスモークサーモンへの添加実験

##### ①使用菌株

添加実験に使用した *L. monocytogenes* は、工場内から分離された菌株のうち、分離頻度の高かったタイプ 1, 2 および 11 とその他のタイプとしてタイプ 3, 5, 6, 7, 9 および 10 を使用した。タイプ 1 として菌株 No. 4, タイプ 2 として No. 8, タイプ 11 として No. 19, タイプ 3, 5, 6, 7, 9 および 10 として、それぞれ菌株 No. 47, No. 6, No. 1, No. 11, No. 18, No. 7 を使用した (Table 13)。

##### ②使用したスモークサーモン端材

工場から採取した 10 検体のスモークサーモンを使用した。これら 10 検体について *Listeria* 属の検査を行った結果、7 検体からは *Listeria* 属が検出されなかったが、3 検体から *Listeria* 属が検出された。なお、この 3 検体から *L. monocytogenes*

は検出されなかった。これら 10 検体をあわせて A から E の 5 ロットを作製し、添加試験用のスモークサーモンとした。ロット A として、6、12 および 13 回目調査で採取したスモークサーモン端材（検体 No. 17, 13, 14）と 7 回目調査で採取したサラダ用トラウト（検体 No. 23）、ロット B として、7 回目調査で採取したスモークサーモン端材およびトラウトスライス（検体 No. 18 および 22）と 9 回目調査で採取したスモークサーモン端材（検体 No. 23）、ロット C として、5 回目調査で採取したスモークサーモン端材（検体 No. 15）、15 回目調査で採取したトラウト端材 A および B（検体 No. 17 および 18）をそれぞれロット D および E とした。これらのうち、ロット B のみが *Listeria* 属陽性であったが、これらは添加した *L. monocytogenes* の回収に影響を及ぼさないことを確認し、実験に供した。

### ③方法

接種菌株を BHI 寒天平板培地に塗布し、37 °C で一晩培養した。BHI 寒天平板上に発育した *L. monocytogenes* の 1 コロニーを TSBYE 培地に移植し、37 °C で 16~18 時間培養した。培養液を滅菌生理食塩水で  $10^5$  希釈し、 $10^5$  希釈液 1 ml をあらかじめ 35 g に小分けしておいたサーモンに接種した。2 分間ストマッカー処理後、5 g を新しいストマッカー袋に秤量し、滅菌生理食塩水を加えて 50 g とし、10 倍乳剤を作製した。1 分間ストマッカー処理後、100  $\mu$ l をとり、それぞれ 2 枚のクロモアガーリステリア寒天平板培地にコンラージ棒で塗抹し、37 °C で 24~48 時間培養後、*L. monocytogenes* の典型的なコロニーを計測した。これを 0 時間の菌数として測定した。残りのサーモンは、ストマッカー袋ごと滅菌カップ（栄研器材、#BA2000）に入れて、30 °C で培養した。2、4、8、24、48 時間後、0 時間と同じ手順で 10 倍乳剤を作製し、それぞれの時間における菌数を計測した。それぞれの時間ごとにクロモアガーリステリア寒天平板上から 1 コロニーを釣菌し、*L. monocytogenes* の性状を確認するとともに、O 抗原の血清型別試験を行い、接種菌株と一致することを確認した。

### (10) 有意差の検定

工場から採取した検体のカテゴリー別 *L. monocytogenes* 陽性率については、 $X^2$  検定あるいはフィッシャーの直接確率計算法を用いて有意差の検定を行った。

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit

Table 11-1 The 1st

No. 検体の分類<sup>1)</sup>

8.2

検体の名称

*L. monocytogenes*

血清型

*Listeria* spp.<sup>2)</sup>

一般生菌数

大腸菌群数

*L. monocytogenes* を分離した培地

*Listeria* spp. を分離した培地

ット

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般生菌数	大腸菌群数	<i>L. monocytogenes</i> を分離した培地	<i>Listeria</i> spp. を分離した培地	ット
	M	消 トラウト	-		-	3 x 1	< 10			-
	M	トラウト	-		-	1.4 x 10 <sup>4</sup>	1.0 x 10 <sup>2</sup>			-
	M	マイルドノール	-		-	NE <sup>3)</sup>	NE			-
4	M	ラッシング後のコンベア	-		-	NE	NE			±
	M	ラッシング後のサーモン表面	-		-	NE	NE			±
	M	ラッシング後のブラシ毛先	-		-	NE	NE			-
	M	塩つけ込みのコンテナ	-		-	NE	NE			-
	F	マリネスライス	1.72/	1/2a	-	2.2 x 10 <sup>3</sup>	4.5 x 10	CHROM r, EHA		+
	M	ふきとり 庫の床	-		-	NE	NE			-
	E	ふきとり スモーク室棚	-		-	NE	NE			±
11	M	ふきとり スモーク室	-		-	NE	NE			±
	E	ふきとり スモーク室	-		-	NE	NE			±
1	E	ふきとり スモーク室床	-		-	NE	NE			-
1	M	原材料 スライス用の原料	-		-	< 10 <sup>2</sup>	< 10			-
	M	その他 スライス前の剥皮	-		+	5.0 x 10 <sup>3</sup>	< 10		CHROMagar	-
	F	食品 フレッシュスライス	-		-	7.5 x 10 <sup>2</sup>	< 10			-
1	P	ふきとり スライスサー刃	12	1/2a	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+
	M	ふきとり フレッシュスライス台	-		-	NE	NE			-
	P	ふきとり 皮むき機	-		-	NE	NE			-
	P	ふきとり 紅鮭小身スライサー内側	12	3b	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+
21	P	ふきとり スライスサー内側	-		-	NE	NE			-
22	M	ふきとり スライス原料保管室コンテナ	-		-	NE	NE			±
23	E	ふきとり スライス 料保管室床	-		-	NE	NE			-
24	E	その他 スライス原料保管室前側溝水	-		-	NE	NE			-
	E	その他 スライス原料保管室前踏み込み水	-		-	NE	NE			-
26	M	ふきとり オニオンコンテナ	-		-	NE	NE			-
27	F	食品 小身	-		+	9.3 x 10 <sup>3</sup>	8.5 x 10		CHROMagar	+
28	M	ふきとり 空調吹出口	-		-	NE	NE			-
	M	ふきとり 紅鮭小身切出まな板	-		-	NE	NE			-
30	P	ふきとり 紅鮭小身スライサー刃	-		-	NE	NE			-
31	E	ふきとり 漬け込み室床	12	1/2b,3b	36	NE	NE	CHROM ar	CHROM r, E	+

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria* 属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined

4) ±, ラインが薄い

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit

11-2 2nd  
9.10

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般菌数	大腸菌群数	<i>L. monocytogenes</i> を分離した培地	<i>Listeria</i> spp. を分離した培地	市	ット
1	F	フッユスライス	<0.1	1/2b	-	NE	1.5 x 10 <sup>4</sup>				+
	M	ラッシンのコンベア	-		-	NE	NE				-
	M	ラッシンのラシ毛先	-		-	N	NE				-
		ラッシンのコンテナ	-		-	NE	NE				-
		サーモン 惣菜内 からのもの	<0.1	3a	0	3.8 x 10 <sup>4</sup>	2.0 x 10 <sup>4</sup>	CHR, EHA			+
	M	の肉	-		-	NE	NE				-
	E	の床	-		-	NE	NE				-
	M	スモーク	-		-	NE	NE				-
	E	スモーク	-		-	NE	NE				-
	E	スモーク 床	-		-	NE	NE				-
11	M	スライス用の原料	-		-	2.2 x 10 <sup>4</sup>	1.5 x 10 <sup>4</sup>				-
	F	マリネスライス	-		+	1.1 x 10 <sup>3</sup>	3.3 x 10 <sup>3</sup>		CHR		-
	P	皮むき機	-		-	NE	NE				-
	P	スライサー刃	-		-	NE	NE				-
	P	スライサー内刃	-		-	NE	NE				-
	M	スライス原料保管室コンテナ	-		-	NE	NE				-
1	E	スライ 保管床	-		-	NE	NE				-
	E	スライ 保管前割溝水	-		+	NE	NE		CHROM, E		+
	E	スライ 料保管室前割溝水	-		-	NE	NE				-
21	M	オニオンコンテナ	-		-	NE	NE				-
	M	小 切出まな板	-		-	NE	NE				-
	P	小 スライサー刃 No.1	-		-	NE	NE				-
24	P	小 スライサー内刃 (No.1)	-		-	NE	NE				-
	E	工 内入口 み込み水	-		-	NE	NE				-
	F	トラウト	-		-	4.5 x 10 <sup>3</sup>	1.1 x 10 <sup>3</sup>				-
	M	ミヨウバン液	-		-	NE	NE				± <sup>4)</sup>
	E	そ	-		+	NE	NE		CHRO, E		+
	M	そ	-		-	NE	NE				-
29	P	そ 止剤入り液	-		-	NE	NE				±
	P	スライサー刃 No.2	-		-	NE	NE				-
31	M	スライサー内刃 No.2	-		-	NE	NE				-
32	M	大型スライサーからのベルトコンベア	-		-	NE	NE				-
	M	漬け込み用塩粉体	-		-	NE	NE				-
33	E	漬け込み室	<12	1/2a	12	NE	NE	CHROM, r	CHRO, E		+

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria* 属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined

4) ±, ラインが薄い

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria spp.*, and result of commercial immunochromatographic kit  
 Table 11-4 The 4th Investigation (2002.12.11)

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の種類	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria spp.</i> <sup>2)</sup>	一般生菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	<i>L. monocytogenes</i> を 分離した培地	<i>Listeria spp.</i> を分 離した培地	市販キット	備考
1	E	ふきとり	漬け込み室床(消毒スチーム後)	16/100cm <sup>2</sup>	3b,3a	92/100cm <sup>2</sup>	1.2x10 <sup>5</sup> /100cm <sup>2</sup>	4.0x10 <sup>5</sup> /100cm <sup>2</sup>	CHROMagar, EHA	CHROMagar	+	血清型3aは MPN法でのみ
2	E	その他	原料準備室(仕込み室)床水	<12	1/2a	-	NE	NE	CHROMagar, EHA	CHROMagar, EHA	+	
3	M	原材料	解凍後消毒前紅ザケカマ	-	-	-	NE <sup>3)</sup>	<10			-	
4	M	原材料	解凍後消毒前紅ザケ下額	-	-	-	2.7x10 <sup>3</sup>	<10			-	
5	M	ふきとり	ブラッシング後のコンベア	-	-	-	NE	NE			-	
6	M	ふきとり	ブラッシング後のサーモン表面	-	-	-	NE	NE			-	
7	M	ふきとり	ブラッシングのブラシ毛先	-	-	-	NE	NE			-	
8	M	ふきとり	食塩漬け込みのコンテナ	-	-	-	NE	NE			-	
9	E	ふきとり	風乾燥の床	-	-	-	-	-			-	
10	M	原材料	スライス用の原料(紅鮭)	-	-	-	1.7x10 <sup>2</sup>	<10			-	
11	F	食品	フレッシュスライス(紅鮭)	-	-	-	1.6x10 <sup>2</sup>	<10			-	
12	F	食品	マリネスライス	-	-	-	1.9x10 <sup>2</sup>	1.5x10			-	
13	M	ふきとり	フレッシュスライス台	-	-	-	NE	NE			-	
14	P	ふきとり	スライサー刃	-	-	-	NE	NE			-	
15	P	ふきとり	スライサー内側	-	-	-	NE	NE			-	
16	E	ふきとり	スライス原料保管室床	-	-	-	NE	NE			-	
17	E	その他	スライス原料保管室前側溝水	-	-	-	NE	NE			-	
18	P	ふきとり	紅鮭小身スライサー刃(No.1)	-	-	-	NE	NE			-	
19	P	ふきとり	紅鮭小身スライサー内側(No.1)	-	-	-	NE	NE			-	
20	F	食品	最終製品(トラウト)	-	-	-	1.9x10 <sup>2</sup>	1.2x10 <sup>2</sup>			-	
21	P	ふきとり	スライサー刃(No.2)	-	-	-	NE	NE			-	
22	P	ふきとり	スライサー内側(No.2)	-	-	-	NE	NE			-	
23	M	ふきとり	大型スライサーからのベルトコンベア	-	-	-	NE	NE			-	
24	P	食品	サーモン端材(機械内部からのもの)	-	-	-	1.4x10 <sup>3</sup>	2.5x10 <sup>2</sup>			-	
25	M	原材料	トラウト消毒前カマ	-	-	-	1.3x10 <sup>2</sup>	<10			-	
26	M	原材料	紅鮭消毒前カマ	-	-	-	2.8x10 <sup>2</sup>	<10			-	

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria* 属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined



Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit  
 Table 11-5 The 5th investigation (2003.5.26)

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の種類	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般細菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	<i>L. monocytogenes</i> を 分離した培地	<i>Listeria</i> spp.を分 離した培地	市販キット	備考
1	M	原材料	解凍後消毒前紅鮭カマ	-		-	1.1x10 <sup>4</sup>	5.0x10			-	
2	M	ふぎとり	食塩漬け込みのコンテナ(裏)	-		-	NE	NE			-	
3	F	食品	フレッシュスライス(トラウト)	-		-	NE <sup>3)</sup>	<10			-	
4	F	食品	マリネスライス	-		-	1.4x10 <sup>4</sup>	1.1x10 <sup>4</sup>			-	
5	M	ふぎとり	フレッシュスライス台	-		-	NE	NE			-	
6	P	ふぎとり	皮剥き機	-		-	NE	NE			-	
7	P	ふぎとり	スライサー刃	-		+	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
8	P	ふぎとり	スライサー内側	-		-	NE	NE			-	
9	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー刃(No.1)	-		-	NE	NE			-	
10	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー内側(No.1)	-		-	NE	NE			-	
11	F	食品A	最終製品(トラウト)	-		-	4.8x10 <sup>3</sup>	1.3x10 <sup>3</sup>			-	
12	F	食品B	最終製品(トラウト)	-		-	2.5x10 <sup>3</sup>	6.2x10 <sup>2</sup>			-	
13	F	食品C	最終製品(トラウト)	-		-	5.5x10 <sup>3</sup>	2.9x10 <sup>3</sup>			-	
14	M	ふぎとり	大型スライサーからのベルトコンベア	-		-	NE	NE			-	
15	P	食品	サーモン端材(機械内部からのもの)	-		-	5.1x10 <sup>4</sup>	7.3x10 <sup>3</sup>			-	
16	M	原材料	トラウト消毒前カマ	-		+	3.6x10 <sup>2</sup>	<10	CHROMagar, EHA		± <sup>4)</sup>	
17	M	原材料	紅鮭消毒前カマ	-		-	1.3x10 <sup>4</sup>	4.1x10 <sup>2</sup>			-	
18	M	原材料	トラウト消毒前カマ	-		-	1.2x10 <sup>5</sup>	2.7x10 <sup>3</sup>			-	
19	M	原材料	トラウト消毒前カマ	-		-	2.8x10 <sup>2</sup>	<10			-	
20	M	原材料	トラウト消毒前カマ	-		-	2.4x10 <sup>3</sup>	2.5x10			-	
21	P	ふぎとり	割裁気(刃)	-		-	NE	NE			-	
22	M	その他	トラウト腹身(ト口部)	-		-	2.2x10 <sup>2</sup>	<10			-	
23	P	ふぎとり	大型スライサー切身排出部おさえ	-		-	NE	NE			-	
24	P	ふぎとり	大型スライサー材料押出装置	-		-	NE	NE			-	
25	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー刃(No.1)洗浄後	-		+	NE	NE	CHROMagar, EHA		±	
26	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー内側(No.1)洗浄後	-		+	NE	NE	CHROMagar, EHA		±	
27	M	ふぎとり	トラウト骨抜き作業台	-		-	NE	NE			-	
28	P	ふぎとり	大型スライサー分解後刃おさえネジ部	-		-	NE	NE			-	洗浄後
29	P	ふぎとり	大型スライサー分解後刃裏側	-		-	NE	NE			-	洗浄後
30	P	ふぎとり	大型スライサー分解後回転台継目	-		-	NE	NE			-	洗浄後
31	P	ふぎとり	大型スライサー分解後端材受部	-		-	NE	NE			-	洗浄後
32	P	ふぎとり	大型スライサー分解後切身排出部 おさえ隙間	-		-	NE	NE			-	洗浄後
33	P	ふぎとり	大型スライサー分解後切身排出部 おさえ隙間(サーモン接触部)	-		-	NE	NE			-	洗浄後
34	E	ふぎとり	漬け込み室床(洗浄前)	92/100cm <sup>2</sup>	1/2a,3a	+	7.2x10 <sup>5</sup> /100cm <sup>2</sup>	7.4x10 <sup>2</sup> /100cm <sup>2</sup>	CHROMagar	CHROMagar, EHA	+	
35	M	その他	スライサー前の剥皮	<0.12/g	1/2a	+	5.7x10 <sup>3</sup>	1.9x10 <sup>2</sup>	CHROMagar	CHROMagar, EHA	+	
36	E	その他	原料準備室(仕込み室)床水	<12	1/2a	+	NE	NE	CHROMagar	EHA	+	

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria* 属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined

4) ±, ラインが薄い

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit  
Table 11-6 The 6th

6.23

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般細菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/100cm <sup>2</sup> )	<i>L. monocytogenes</i> を 分離した培地	<i>Listeria</i> spp.を分 離した培地	市販キット
		ふきとり	け込み室床 洗浄前	92/100cm <sup>2</sup>	1/2a	+	6.4x10 <sup>4</sup> /100cm <sup>2</sup>	1.2x10 <sup>2</sup> /100cm	CHRO, EHA	CHROMagar,	+
	M	その他	スライスの剥皮 紅蛙)	<0.12/g	1/2a	-	1.0 x 10 <sup>4</sup>	1.3 x 10 <sup>3</sup>	CHROMagar, EHA	CHROMagar,	+
		その他	漬け込み室全室の床水	2.2x10 <sup>2</sup> /ml	1/2a,3a	+	NE <sup>3)</sup>	NE	CHROMagar, EHA	CHROMagar,	+
		そ	トラウト皮 下段から採取)	0.16/g	3b	+	9.6 x 10 <sup>4</sup>	5.5x10	CHRO r, EHA	CHRO r, EHA	+
	F	食品	マリネスライス	-	-	-	2.6 x 10 <sup>4</sup>	7.6 x 10 <sup>3</sup>	-	± <sup>4)</sup>	-
	P	ふきとり	皮剥き機	-	-	-	NE	NE	-	-	-
7	P	ふきとり	スライサー刃	-	-	-	NE	NE	-	-	-
	P	ふきとり	スライサー内側	-	-	-	NE	NE	-	-	-
	P	ふきとり	小身スライサー刃 (No.1)	-	-	-	NE	NE	-	-	-
	P	ふきとり	紅蛙小身スライサー内側 (No.1)	-	-	-	NE	NE	-	-	-
11	F	食品A	最終製品 (トラウト)	-	-	-	6.8 x 10 <sup>3</sup>	1.7 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-
1	F	食品B	最終製品 (トラウト)	-	-	-	3.8 x 10 <sup>3</sup>	7.1 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-
1	F	食品C	最終製品 (トラウト)	-	-	-	1.8 x 10 <sup>4</sup>	9.6 x 10 <sup>2</sup>	-	-	-
15	P	ふきとり	スライサー刃 (No.2)	-	-	-	NE	NE	-	-	-
	P	ふきとり	スライサー内側 (No.2)	-	-	-	NE	NE	-	-	-
	M	ふきとり	大型スライサーからのベルトコンベア	-	-	-	NE	NE	-	-	-
17	P	食品	サーモン端材 (機械内部からのもの)	-	-	-	2.8 x 10 <sup>4</sup>	6.6 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-
18	M	原材料	トラウト消毒前カマ	-	-	-	3.0 x 10 <sup>2</sup>	<10	-	-	-
	M	原材料	トラウト消毒前カマ	-	-	-	1.4 x 10 <sup>2</sup>	<10	-	CHROMagar	±
20	M	原材料	トラウト消毒前カマ	-	-	-	1.2 x 10 <sup>2</sup>	<10	-	-	-
21	M	原材料	トラウト消毒前カマ	-	-	-	5.6 x 10 <sup>5</sup>	8.6 x 10 <sup>3</sup>	-	-	-
22	E	その他	原料準備室 (仕込み室 床水	<0.6/ml	1/2a	-	NE	NE	CHROMagar	EHA	+

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria* 属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined

4) ±, ラインが薄い

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit  
 Table 11-7 The 7th investigation (2003.7.22)

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の種類	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般生菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	<i>L. monocytogenes</i> を 分離した培地	<i>Listeria</i> spp.を分 離した培地	市販キット	備考
1	E	ふぎとり	漬込み室床(洗浄前)	<12/100cm <sup>2</sup>	1/2a,3b	+	1.9x10 <sup>5</sup> /100cm <sup>2</sup>	2.6x10 <sup>3</sup> /100cm <sup>2</sup>	CHROMagar, EHA	CHROMagar, EHA	+	
2	E	ふぎとり	風乾庫の床	<12	3b	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
3	F	食品	フレッシュスライス	<0.12/g	1/2a	-	NE <sup>3)</sup>	8.0 x 10	CHROMagar, EHA		+	
4	M	その他	漬込み中のトラウト皮	0.6/g	1/2a,3b	-	5.5 x 10 <sup>3</sup>	2.0 x 10 <sup>2</sup>	CHROMagar, EHA		+	
5	E	ふぎとり	解凍室床	<12	1/2a	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
6	M	ふぎとり	ブラッシング後のコンベア	-		-	NE	NE			-	
7	M	ふぎとり	ブラッシング後の毛先	-		+	NE	NE			-	
8	E	ふぎとり	スモーク室床	-		-	NE	NE			-	
9	P	ふぎとり	皮むき機	-		-	NE	NE			-	
10	P	ふぎとり	スライサー刃	-		-	NE	NE			-	
11	P	ふぎとり	スライサー内側	-		-	NE	NE			-	
12	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー刃(No.1)	-		-	NE	NE			-	
13	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー内側(No.1)	-		-	NE	NE			-	
14	F	食品A	最終製品(トラウトマリネ)	-		+	1.6 x 10 <sup>4</sup>	5.6 x 10 <sup>3</sup>	CHROMagar, EHA	CHROMagar, EHA	+	
15	F	食品B	最終製品(トラウトマリネ)	-		-	4.8 x 10 <sup>4</sup>	3.2 x 10 <sup>4</sup>			-	
16	F	食品C	最終製品(トラウトマリネ)	-		-	1.4 x 10 <sup>4</sup>	5.2 x 10 <sup>3</sup>			-	
17	E	その他	原料準備室(仕込み室)床水	-		+	NE	NE	EHA		+	
18	P	食品	サーモン端材(機械内部からのもの)	-		+	2.0 x 10 <sup>5</sup>	5.3 x 10 <sup>4</sup>	CHROMagar, EHA	CHROMagar, EHA	+	
19	M	その他	スモーク後のトラウト皮	-		+	2.1 x 10 <sup>3</sup>	<10	CHROMagar, EHA	CHROMagar, EHA	+	
20	M	その他	スモーク後のトラウト皮	-		-	1.6 x 10 <sup>3</sup>	6.0 x 10			-	
21	M	その他	解凍後紅鮭ヒレ	-		-	4.7 x 10 <sup>4</sup>	1.1 x 10 <sup>3</sup>			-	
22	F	その他	トラウトスライス (No.1スライサー使用)	-		+	3.1 x 10 <sup>3</sup>	1.6 x 10 <sup>2</sup>	CHROMagar	CHROMagar	+	
23	F	食品	サラダ用トラウト	-		-	1.5 x 10 <sup>3</sup>	7.5x10			-	
24	E	その他	汚水室からの踏み込み水	-		-	NE	NE			-	
25	R	ふぎとり	冷凍サーモン納品時段ボール箱内側	-		-	NE	NE			-	

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria* 属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes*, and result of commercial immunochromatographic kit  
 Table 11-8 The 8th investigation (2003.8.18)

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の種類	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般生菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	<i>L. monocytogenes</i> を 分離した培地	<i>Listeria</i> spp.を分 離した培地	市販キット	備考
1	E	ふぎとり	漬込み室床	8.0/100cm <sup>2</sup>	1/2a	+	1.6x10 <sup>3</sup> /100cm <sup>2</sup>	<10	CHROMagar, EHA	EHA	+	200cm <sup>2</sup> を 拭いた
2	E	ふぎとり	固乾庫の床	16	1/2a	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
3	E	ふぎとり	スモーク室床	<12	1/2a	-	NE <sup>3)</sup>	NE	CHROMagar, EHA		+	
4	E	その他	原料準備室(仕込み室)床水	18.6/ml	1/2a	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
5	P	食品	サーモン端材(機械内部からのもの)	<0.12/g	1/2a	-	6.0 x 10 <sup>5</sup>	5.3 x 10 <sup>4</sup>	CHROMagar, EHA		+	
6	M	その他	紅鮭カマ(塩漬済)	<0.12/g	1/2a	-	1.3 x 10 <sup>5</sup>	4.5 x 10	CHROMagar, EHA		+	
7	P	その他	ブラッシングコンベアたまり水	0.8/ml	1/2a	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		± <sup>4)</sup>	
8	M	ふぎとり	ブラッシング後のコンベア	-		-	NE	NE			-	
9	M	ふぎとり	ブラッシング後のブラシ毛先	-		-	NE	NE			-	
10	M	その他	スライス前の剥皮	-		-	2.0 x 10 <sup>3</sup>	4.0x10			-	
11	F	食品	フレッシュスライス	-		-	1.8 x 10 <sup>2</sup>	1.5x10			-	
12	F	食品	マリネスライス	-		-	7.5 x 10 <sup>3</sup>	2.4 x 10 <sup>3</sup>			-	
13	P	ふぎとり	皮むぎ機	-		-	NE	NE			-	
14	P	ふぎとり	スライサー刃	-		-	NE	NE			-	
15	P	ふぎとり	スライサー内側	-		-	NE	NE			-	
16	F	食品	紅鮭小身	-		-	2.1 x 10 <sup>4</sup>	4.3 x 10 <sup>2</sup>			-	
17	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー刃(No.1)	-		-	NE	NE			-	
18	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー内側(No.1)	-		-	NE	NE			±	
19	F	食品A	最終製品(トラウトマリネ)	-		-	2.2 x 10 <sup>4</sup>	4.3 x 10 <sup>3</sup>			-	
20	F	食品B	最終製品(トラウトマリネ)	-		-	2.2 x 10 <sup>4</sup>	4.0 x 10 <sup>3</sup>			-	
21	F	食品C	最終製品(トラウトマリネ)	-		-	1.8 x 10 <sup>4</sup>	8.2 x 10 <sup>3</sup>			-	
22	E	ふぎとり	解凍庫床	-		-	NE	NE			-	
23	M	その他	トラウト漬込済風乾前の皮	-		-	5.5 x 10 <sup>3</sup>	2.1 x 10 <sup>2</sup>			+	
24	M	その他	トラウト漬込済風乾前の皮	-		+	3.2 x 10 <sup>4</sup>	1.6 x 10 <sup>4</sup>			+	
25	M	その他	スモーク後アルコール噴霧前の皮	-		+	1.2 x 10 <sup>3</sup>	3.3 x 10 <sup>2</sup>			-	
26	M	その他	トラウト(血合い部分端材)	-		-	4.8 x 10 <sup>4</sup>	8.1 x 10 <sup>2</sup>			-	
27	M	原材料	8/22採取トラウト皮2	<0.12/g	1/2a	-	NE	NE	CHROMagar, EHA	EHA	+	
28	M	原材料	8/22採取トラウト皮1	-		+	NE	NE			±	
29	M	原材料	8/22採取トラウト皮1	-		-	NE	NE			-	
30	M	原材料	8/22採取トラウト皮2	-		+	NE	NE			+	
31	M	原材料	8/22採取トラウト皮3	-		-	NE	NE			+	
32	M	原材料	8/22採取トラウト皮3	-		-	NE	NE			-	
33	M	原材料	8/22採取紅鮭皮1	-		-	NE	NE			-	
34	M	原材料	8/22採取紅鮭皮1	-		-	NE	NE			-	
35	M	原材料	8/22採取紅鮭皮2	-		-	NE	NE			-	
36	M	原材料	8/22採取紅鮭皮2	-		-	NE	NE			-	

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria* 属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined

4) ±, ラインが薄い

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit  
 Table 11-9 The 9th investigation (2003.9.26)

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の種類	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般細菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	<i>L. monocytogenes</i> を 分離した培地	<i>Listeria</i> spp.を分 離した培地	市販キット	備考
1	E	ふぎとり	風乾庫の床	36	1/2a	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
2	M	その他	スライス前の剥皮	<0.12/g	1/2b	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
3	P	ふぎとり	紅鮭小身スライス1刃 (No.1)	<12	1/2b	-	NE <sup>3)</sup>	NE	CHROMagar, EHA		+	
4	P	ふぎとり	紅鮭小身スライス1刃内側 (No.1)	<12	1/2b	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
5	P	その他	サーモン端材 (機械上部からのもの)	0.16/g	1/2a	-	8.2 x 10 <sup>4</sup>	1.2 x 10 <sup>3</sup>	CHROMagar, EHA		+	同じ数字は同じ魚体からの
6	M	その他	原材料トラウト1皮 (半身分)	<0.12/g	1/2a	-	2.6 x 10 <sup>3</sup>	5.7 x 10 <sup>2</sup>	CHROMagar, EHA		± <sup>4)</sup>	
7	E	ふぎとり	漬込み室床	-		-	1.1x10 <sup>5</sup> /100cm <sup>2</sup>	4.0x10 <sup>2</sup> /100cm <sup>2</sup>			-	
8	M	ふぎとり	スモーク室棚	-		-	NE	NE			-	
9	E	ふぎとり	スモーク室床	-		+	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
10	M	ふぎとり	フレッシュスライス台	-		-	NE	NE			-	まな板
11	P	ふぎとり	皮むき機	-		-	NE	NE			-	
12	P	ふぎとり	スライス1刃	-		-	NE	NE			-	
13	P	ふぎとり	スライス1刃内側	-		-	NE	NE			-	
14	E	ふぎとり	スライス原料保管室床	-		-	NE	NE			-	
15	F	食品A	最終製品 (トラウトマリネ)	-		+	1.5 x 10 <sup>3</sup>	2.3 x 10 <sup>2</sup>	CHROMagar, EHA		+	
16	F	食品B	最終製品 (トラウトマリネ)	-		+	7.8 x 10 <sup>3</sup>	9.2 x 10 <sup>2</sup>	CHROMagar, EHA		+	
17	F	食品C	最終製品 (トラウトマリネ)	-		-	1.2 x 10 <sup>5</sup>	9.9 x 10 <sup>3</sup>			-	
18	E	その他	原料準備室 (仕込み室) 床水	-		-	NE	NE			-	
19	M	その他	酸化防止剤入り液	-		+	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
20	P	ふぎとり	スライス1刃 (No.2)	-		-	NE	NE			-	
21	P	ふぎとり	スライス1刃内側 (No.2)	-		-	NE	NE			-	
22	M	ふぎとり	大型スライサーからのベルトコンベア	-		-	NE	NE			-	
23	P	その他	サーモン端材 (機械内部からのもの)	-		+	4.1 x 10 <sup>5</sup>	3.0 x 10 <sup>4</sup>	CHROMagar, EHA		+	
24	P	ふぎとり	スライサーカバーバックング	-		-	NE	NE			-	
25	P	ふぎとり	スライサー内側 (裏側)	-		-	NE	NE			-	
26	E	その他	漬込み室前室の床水	-		+	NE	NE	EHA		+	
27	M	ふぎとり	解体用まな板	-		-	NE	NE			-	作業前

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria* 属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined

4) ±, ラインが薄い

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit  
 Table 11-10 The 10th investigation (2003.10.29)

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の種類	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般細菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	<i>L. monocytogenes</i> を 分離した培地	<i>Listeria</i> spp.を分 離した培地	市販キット	備考
1	F	食品C	最終製品 (トラウトマリネ)	<0.12/g	3b,1/2a	-	2.8 x 10 <sup>2</sup>	1.0 x 10	CHROMagar, EHA		+	
2	P	その他	サーモン端材 (機械内部からのもの)	0.36/g	1/2a	-	3.0 x 10 <sup>4</sup>	5.2 x 10 <sup>3</sup>	CHROMagar, EHA		-	紅鮭の端材
3	M	ふぎとり	ブラッシング後のコンヘア	-		-	NE <sup>3)</sup>	NE			-	紅鮭処理中
4	M	ふぎとり	ブラッシング後のサーモン表面	-		-	NE	NE			-	紅鮭表面
5	E	ふぎとり	漬込み室床	60/100cm <sup>2</sup>	3a	+	2.6x10 <sup>5</sup> /100cm <sup>2</sup>	4.0x10 <sup>1</sup> /100cm <sup>2</sup>	EHA	CHROMagar, EHA	+	
6	E	ふぎとり	風乾庫の床	-		-	NE	NE			-	
7	P	ふぎとり	スライサー刃	-		-	NE	NE			-	紅鮭処理中
8	P	ふぎとり	スライサー内側	-		-	NE	NE			-	紅鮭処理中
9	E	ふぎとり	スライス原料保管室床	-		-	NE	NE			-	
10	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー刃 (No.1)	-		-	NE	NE			-	トラウト 処理中
11	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー内側 (No.1)	-		-	NE	NE			-	トラウト 処理中
12	F	食品A	最終製品 (トラウトマリネ)	-		+	2.5 x 10 <sup>2</sup>	1.5 x 10			-	
13	F	食品B	最終製品 (トラウトマリネ)	-		+	1.8 x 10 <sup>2</sup>	1.0 x 10			-	
14	E	その他	原料準備室 (仕込み室) 床水	-		+	NE	NE		CHROMagar, EHA	+	
15	R	その他	原材料トラウト1皮 (半身分)	-		+	5.0 x 10	<10		EHA	+	同じ数字は同 じ魚体からの
16	R	その他	原材料トラウト1皮 (半身分)	-		-	2.0 x 10 <sup>2</sup>	<10			-	
17	R	その他	原材料トラウト2皮 (半身分)	-		-	8.0 x 10	<10			-	
18	R	その他	原材料トラウト2皮 (半身分)	-		-	5.0 x 10	4.0 x 10			-	
19	R	その他	原材料トラウト3皮 (半身分)	-		-	1.0 x 10 <sup>2</sup>	<10			-	
20	R	その他	原材料トラウト3皮 (半身分)	-		-	2.4 x 10 <sup>2</sup>	<10			-	
21	R	その他	原材料トラウト4皮 (半身分)	-		-	2.2 x 10 <sup>2</sup>	6.5 x 10			+	
22	R	その他	原材料トラウト4皮 (半身分)	-		-	1.8 x 10 <sup>2</sup>	<10			-	
23	R	その他	原材料紅鮭1皮 (半身分)	-		-	1.5 x 10 <sup>3</sup>	<10			-	
24	R	その他	原材料紅鮭1皮 (半身分)	-		-	8.8 x 10 <sup>3</sup>	<10			-	
25	R	その他	原材料紅鮭2皮 (半身分)	-		-	2.5 x 10 <sup>3</sup>	<10			-	
26	R	その他	原材料紅鮭2皮 (半身分)	-		-	3.3 x 10 <sup>3</sup>	<10			-	
27	R	その他	原材料紅鮭3皮 (半身分)	-		-	5.6 x 10 <sup>3</sup>	<10			-	
28	R	その他	原材料紅鮭3皮 (半身分)	-		-	3.8 x 10 <sup>3</sup>	<10			-	
29	R	その他	原材料紅鮭4皮 (半身分)	-		-	2.2 x 10 <sup>5</sup>	<10		EHA	-	
30	R	その他	原材料紅鮭4皮 (半身分)	-		-	9.6 x 10 <sup>5</sup>	<10			-	

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria* 属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit  
 Table 11-11 The 11th investigation (2003.12.17)

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の種類	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般細菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	<i>L. monocytogenes</i> を 分離した培地	<i>Listeria</i> spp.を分 離した培地	市販キット	備考
1	E	その他	原料準備室 (仕込み室) 床水	1.8/ml	1/2a, 1/2b	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
2	P	ふざとり	スライサー刃 (No.2)	<12	1/2a	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	トラウト 切出中
3	E	ふざとり	風乾機の床	-		-	NE <sup>3)</sup>	NE			-	
4	P	ふざとり	スライサー刃	-		-	NE	NE			-	
5	P	ふざとり	スライサー内側	-		-	NE	NE			-	
6	P	ふざとり	紅鮭小身スライサー刃 (No.1)	-		-	NE	NE			-	トラウト 切出中
7	P	ふざとり	紅鮭小身スライサー内側 (No.1)	-		-	NE	NE			-	トラウト 切出中
8	F	食品A	最終製品 (トラウトマリネ)	-		-	9.6 x 10 <sup>2</sup>	9x10			-	
9	F	食品B	最終製品 (トラウトマリネ)	-		-	1.6 x 10 <sup>3</sup>	3.1 x 10 <sup>2</sup>			-	
10	F	食品C	最終製品 (トラウトマリネ)	-		-	1.6 x 10 <sup>2</sup>	<10			-	
11	M	その他	酸化防止剤入り液	-		-	NE	NE			-	
12	P	ふざとり	スライサー内側 (No.2)	-		-	NE	NE			-	トラウト 切出中
13	P	その他	サーモン器材 (機械内部からのもの)	-		-	1.1 x 10 <sup>4</sup>	2.3 x 10 <sup>2</sup>			-	
14	R	その他	原材料トラウト1皮 (半身分)	-		-	9.0 x 10	<10			-	
15	R	その他	原材料トラウト1皮 (半身分)	-		-	2.6 x 10 <sup>2</sup>	<10			-	
16	R	その他	原材料トラウト2皮 (半身分)	-		-	2.5 x 10	<10			-	
17	R	その他	原材料トラウト2皮 (半身分)	-		-	<10	<10			-	
18	R	その他	原材料トラウト3皮 (半身分)	-		-	<10	<10			-	
19	R	その他	原材料トラウト3皮 (半身分)	-		-	1.0x10	<10			-	
20	R	その他	原材料トラウト4皮 (半身分)	-		-	1.5x10	<10			-	
21	R	その他	原材料トラウト4皮 (半身分)	-		-	<10	<10			-	
22	R	その他	原材料トラウト5皮 (半身分)	-		-	1.5x10	<10			-	
23	R	その他	原材料トラウト5皮 (半身分)	-		-	2.5x10	<10			-	
24	E	ふざとり	漬込み室床	<12/100cm <sup>2</sup>	1/2a	+	4.8x10 <sup>3</sup> /100cm <sup>2</sup>	<20/100cm <sup>2</sup>	CHROMagar		+	

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria*属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit  
 Table 11-12 The 12th investigation (2004.1.28)

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の種類	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般生菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	<i>L. monocytogenes</i> を 分離した培地	<i>Listeria</i> spp.を分 離した培地	市販キット	備考
1	E	ふぎとり	漬込み室床	<12/100cm <sup>2</sup>	1/2a	-	1.3x10 <sup>5</sup> /100cm <sup>2</sup>	1.0 x 10 <sup>3</sup> /100cm <sup>2</sup>	CHROMagar, EHA		+	使用中
2	E	その他	原料準備室(仕込み室)床水	0.8/ml	1/2a, 1/2b	+	NE	NE	CHROMagar, EHA	EHA	+	漬込み後の ブラッシング
3	P	その他	ブラッシングゴコンベアたまり水	48/ml	1/2a	-	NE <sup>3)</sup>	NE	CHROMagar, EHA		+	
4	M	食品	風乾中トラウト	0.16/g	1/2a	-	2.9 x 10 <sup>3</sup>	<10	CHROMagar, EHA		+	
5	M	ふぎとり	ブラッシング後のサーモン表面	-		-	NE	NE			-	
6	M	ふぎとり	ブラッシング後のブラシ毛先	-		-	NE	NE			-	
7	E	ふぎとり	風乾庫の床	-		-	<40/100cm <sup>2</sup>	<40/100cm <sup>2</sup>			-	乾燥部を ふぎ取り
8	P	ふぎとり	スライサー刃	-		-	NE	NE			-	
9	P	ふぎとり	スライサー内側	-		-	NE	NE			-	
10	F	食品A	最終製品(トラウトマリネ)	-		-	5.0 x 10	<10			-	
11	F	食品B	最終製品(トラウトマリネ)	-		-	6.0 x 10	<10			-	
12	F	食品C	最終製品(トラウトマリネ)	-		-	1.0 x 10 <sup>2</sup>	<10			-	
13	M	その他	酸化防止剤入り液	-		-	NE	NE			-	
14	P	その他	サーモン器材(機械内部からのもの)	-		-	7.2 x 10 <sup>3</sup>	7.0 x 10			-	
15	R	その他	原材料紅蛙1皮(半身分)	-		-	1.6 x 10 <sup>4</sup>	4.5 x 10			-	
16	R	その他	原材料紅蛙1皮(半身分)	-		+	2.0 x 10 <sup>4</sup>	<10		EHA	-	
17	R	その他	原材料紅蛙2皮(半身分)	-		-	9.5x10	<10			-	
18	R	その他	原材料紅蛙2皮(半身分)	-		-	7.5x10	<10			-	
19	R	その他	原材料トラウト1皮(半身分)	-		-	<10	<10			-	
20	R	その他	原材料トラウト1皮(半身分)	-		-	<10	<10			-	
21	R	その他	原材料トラウト2皮(半身分)	-		-	<10	<10			-	
22	R	その他	原材料トラウト2皮(半身分)	-		-	<10	<10			-	
23	R	その他	原材料トラウト3皮(半身分)	-		-	<10	<10			-	
24	R	その他	原材料トラウト3皮(半身分)	-		-	<10	<10			-	
25	M	食品	風乾中トラウト	-		-	3.1 x 10 <sup>2</sup>	<10			-	
26	M	食品	スモーク中トラウト	-		-	6.9 x 10 <sup>3</sup>	<10			-	
27	M	食品	スモーク中トラウト	-		-	9.8 x 10 <sup>2</sup>	<10			-	

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria* 属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined



Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit  
 Table 11-13 The 13th investigation (2004.2.24)

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の種類	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般生菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	<i>L. monocytogenes</i> を分離 した培地	<i>Listeria</i> spp.を分 離した培地	市販キット	備考
1	M	ふぎとり	風乾菓の用	-		+	NE	NE		CHROMagar, EHA	+	
2	P	その他	漬込み後のブラッシングコンベア たまり水	15/ml	1/2a,3a	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
3	M	ふぎとり	漬込みのコンテナ	-		-	NE <sup>3)</sup>	NE			-	
4	E	ふぎとり	漬込み空床	< 12/100cm <sup>2</sup>	1/2a	+	1.2x10 <sup>3</sup> /100cm <sup>2</sup>	2.0 x 10 <sup>1</sup> /100cm <sup>2</sup>	CHROMagar, EHA	CHROMagar	+	
5	P	ふぎとり	スライサー刃	-		-	NE	NE			-	
6	P	ふぎとり	スライサー内側	-		-	NE	NE			-	
7	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー刃	-		-	NE	NE			-	
8	P	ふぎとり	紅鮭小身スライサー内側	-		-	NE	NE			-	
9	F	食品A	最終製品(トラウトマリネ)	-		+	3.0 x 10 <sup>2</sup>	5.0x10		CHROMagar, EHA	+	
10	F	食品B	最終製品(トラウトマリネ)	-		-	3.0 x 10 <sup>2</sup>	2.5x10			-	
11	F	食品C	最終製品(トラウトマリネ)	-		+	2.7 x 10 <sup>2</sup>	3.5x10		CHROMagar, EHA	+	
12	F	食品D	最終製品(トラウトマリネ)	-		+	4.1 x 10 <sup>2</sup>	3.5 x 10 <sup>2</sup>		CHROMagar, EHA	+	
13	F	食品E	最終製品(トラウトマリネ)	-		+	7.2 x 10 <sup>3</sup>	7.0 x 10		CHROMagar, EHA	+	
14	E	その他	原料準備空床水	30/ml	1/2a,1/2b	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
15	P	ふぎとり	スライサー刃(No.2)	-		-	NE	NE			-	
16	P	ふぎとり	スライサー内側(No.2)	-		-	NE	NE			-	
17	R	その他	原材料トラウト1皮(半身分)	-		-	< 10	< 10			-	
18	R	その他	原材料トラウト1皮(半身分)	-		-	< 10	< 10			-	
19	R	その他	原材料トラウト2皮(半身分)	-		-	4.0x10	< 10			-	
20	R	その他	原材料トラウト2皮(半身分)	-		-	1.0x10	< 10			-	
21	R	その他	原材料トラウト3皮(半身分)	-		-	3.5x10	< 10			-	
22	R	その他	原材料トラウト3皮(半身分)	-		-	1.0x10	< 10			-	
23	R	その他	原材料紅鮭1皮(半身分)	-		+	3.9 x 10 <sup>3</sup>	< 10		CHROMagar, EHA	+	
24	R	その他	原材料紅鮭1皮(半身分)	-		-	3.7 x 10 <sup>2</sup>	< 10			-	
25	R	その他	原材料紅鮭2皮(半身分)	-		-	1.6 x 10 <sup>3</sup>	< 10			-	
26	R	その他	原材料紅鮭2皮(半身分)	-		-	3.0 x 10 <sup>3</sup>	< 10			-	
27	P	ふぎとり	攪拌機	-		-	NE	NE			-	
28	P	その他	原料準備空ブラッシングコンベア たまり水	-		-	NE	NE			-	
29	P	ふぎとり	原料準備空ブラッシングコンベア下板	-		-	NE	NE			-	
30	P	ふぎとり	漬込み後のブラッシングコンベア パイオフィルム	-		+	NE	NE		CHROMagar	-	
31	M	その他	タマネギパウダー	-		-	< 10	< 10			-	
32	M	その他	ニンジンパウダー	-		-	1.0x10	< 10			-	

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria*属に*Listeria monocytogenes*は含まない

3) NE, Not examined

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit  
 Table 11-14 The 14th investigation (2004.3.29)

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の種類	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般生菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	<i>L. monocytogenes</i> を 分離した培地	<i>Listeria</i> spp.を分 離した培地	市販キット	備考
1	M	ふきとり	風乾庫の棚	<12	3b	-	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	トアウト風乾 開始前
2	E	その他	原料準備室床水	2.2x10 <sup>2</sup> /ml	1/2a, 1/2b	+	NE	NE	CHROMagar, EHA		+	
3	P	その他	漬込み後の水洗コンベアなまり水	<0.6/ml	1/2a, 1/2b	-	NE <sup>3)</sup>	NE	CHROMagar, EHA		+	
4	M	ふきとり	食塩漬込みのコンテナ	-		-	NE	NE		CHROMagar, EHA	-	
5	E	ふきとり	漬込み室床	-		+	1.1x10 <sup>5</sup> /100cm <sup>2</sup>	9.0x10 <sup>5</sup> /100cm <sup>2</sup>			+	
6	P	ふきとり	スライサー刃	-		-	NE	NE			-	
7	P	ふきとり	スライサー内側	-		-	NE	NE			-	
8	P	ふきとり	紅鮭小身スライサー刃 (No.1)	-		-	NE	NE			-	洗浄済 (1week前)
9	P	ふきとり	紅鮭小身スライサー内側 (No.1)	-		-	NE	NE			-	洗浄済 (1week前)
10	F	食品A	最終製品 (トアウトマリネ)	-		-	3.2x10 <sup>3</sup>	1.0 x 10			-	
11	F	食品B	最終製品 (トアウトマリネ)	-		-	1.2x10 <sup>3</sup>	1.0 x 10			-	
12	F	食品C	最終製品 (トアウトマリネ)	-		-	3.4x10 <sup>3</sup>	6.5x10			-	
13	F	食品D	最終製品 (トアウトマリネ)	-		-	1.2x10 <sup>3</sup>	1.5 x 10			-	
14	P	ふきとり	スライサー刃 (No.2)	-		-	NE	NE			-	作業中
15	P	ふきとり	スライサー内側 (No.2)	-		-	NE	NE			-	作業中
16	P	食品	サーモン端材	-		-	8.6x10 <sup>3</sup>	2.4x10 <sup>2</sup>			-	
17	P	ふきとり	三枚おろし機ベルト (皮側)	-		-	NE	NE			-	
18	P	ふきとり	三枚おろし機回転刃 (身側)	-		-	NE	NE			-	
19	M	その他	漬込み済出水 (紅鮭)	-		-	NE	NE			-	
20	M	原材料	漬込み済みの紅鮭 (ブラッシング前)	-		-	9.6x10 <sup>3</sup>	<10			-	3日終了
21	M	原材料	漬込み済みのトアウト (ブラッシング前)	-		-	7.5x10	<10			-	2日目
22	M	その他	漬込み済みのトアウト (滲出水)	-		-	NE	NE			-	
23	P	ふきとり	漬込み後の水洗コンベアブラシ	-		-	NE	NE			-	
24	M	原材料	漬込み後風乾前トアウト (ブラッシング後)	-		-	8.0x10	<10			-	3日終了
25	M	原材料	スモーク済トアウト	-		-	1.2x10 <sup>2</sup>	<10			-	

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria*属に*Listeria monocytogenes*は含まない

3) NE, Not examined

Aerobic plate count, coliform bacterial count, MPN of *Listeria monocytogenes*, detection of *L. monocytogenes* and *Listeria* spp., and result of commercial immunochromatographic kit  
 Table 11-15 The 15th investigation (2004.5.10)

No.	検体の分類 <sup>1)</sup>	検体の種類	検体の名称	<i>L. monocytogenes</i>	血清型	<i>Listeria</i> spp. <sup>2)</sup>	一般細菌数 (cfu/g)	大腸菌群数 (cfu/g)	<i>L. monocytogenes</i> を 分離した培地	<i>Listeria</i> spp.を分 離した培地	市販キット	備考
1	E	ふぎとり	漬込み室床	-		+	3.6x10 <sup>5</sup> /100cm <sup>2</sup>	1.8x10 <sup>4</sup> /100cm <sup>2</sup>		CHROMagar, EHA	+	
2	M	ふぎとり	国産庫の棚	-		-	NE	NE			-	
3	M	ふぎとり	スモーク室棚	-		-	NE <sup>3)</sup>	NE			-	
4	F	ふぎとり	マリネスライス	-		-	1.7x10 <sup>4</sup>	2.5x10 <sup>3</sup>			-	
5	P	ふぎとり	スライサー刃	-		-	NE	NE			-	
6	P	ふぎとり	スライサー内側	-		-	NE	NE			-	
7	F	食品	最終製品A(トラウトマリネ)	-		-	5.5x10 <sup>3</sup>	1.6x10 <sup>3</sup>			-	
8	F	食品	最終製品B(トラウトマリネ)	-		-	4.9x10 <sup>4</sup>	9.8x10 <sup>3</sup>			-	
9	F	食品	最終製品C(トラウトマリネ)	-		-	1.9x10 <sup>4</sup>	4.6x10 <sup>3</sup>			-	
10	F	食品	最終製品D(トラウトマリネ)	-		-	3.6x10 <sup>4</sup>	8.1x10 <sup>3</sup>			-	
11	E	その他	原料準備室床水	> 220/ml	1/2a, 1/2b, 3a, UT	+	NE	NE	EHA	CHROMagar, EHA	+	
12	P	その他	サーモン端材	-		+	8.6x10 <sup>6</sup>	5.0x10 <sup>5</sup>		EHA	-	
13	M	その他	漬込み後出水(トラウト)	-		-	NE	NE			-	
14	P	その他	漬込み後のブラッシングコンベア	1.4/ml	1/2a	+	NE	NE	CHROMagar, EHA	CHROMagar, EHA	+	たまり水 2日目
15	M	その他	漬込み中のトラウト	-		-	5.5x10 <sup>2</sup>	< 10			-	
16	M	その他	スモーク後のトラウト	-		-	3.4x10 <sup>2</sup>	< 10			-	
17	P	その他	トラウト端材A	-		-	5.0x10 <sup>4</sup>	1.8x10 <sup>4</sup>			-	
18	P	その他	トラウト端材B	-		-	3.5x10 <sup>4</sup>	4.1x10 <sup>3</sup>			-	

1) R; raw fish, M; materials during processing, P; processing equipment, E; environment, F; product

2) *Listeria* 属に *Listeria monocytogenes* は含まない

3) NE, Not examined





Sample category	No. of samples	Sample name	2002.8.2	2002.9.10	2002.11.6	2002.12.11	2003.5.26	2003.6.23	2003.7.22	2003.8.18	2003.9.26	2003.10.29	2003.12.17	2004.1.28	2004.2.24	2004.3.29	
Processing equipment Washing conveyor after brining	124	オニオンコンテナ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		食塩つけ込みのコンテナ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		スモーク室棚	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		スライス原料保管室コンテナ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		スライス用の原料	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		ブラッシング後のコンベア	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		ブラッシング後のサーモン表面	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		ブラッシングのブラシ毛先	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		フレッシュスライス台	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		紅鮭小身切出まな板	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		マイルドノール	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		空調吹出口	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		大型スライサーからのベルトコンベア	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		酸化防止剤入り液	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		漬け込み用塩粉体	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		ミヨウバン液	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		スライス用の原料(紅鮭)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		トラウト骨抜き作業台	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		トラウト腹身(ト口部)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		スモーク後のトラウト皮1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		スモーク後のトラウト皮2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		スモーク後アルコール噴霧前の皮	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		トラウト(血合い部分端材)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		解体用まな板	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		スモーク中トラウト1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		スモーク中トラウト2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		タマネギパウダー	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
		ニンジンパウダー	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
スモーク済トラウト	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
漬込み済みのトラウト(滲出水)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
漬込み滲出水(紅鮭)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○		
Product trimmings from slicing machines	16	ブラッシングコンベアたまり水	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		漬込み後のブラッシングコンベアバイオフィーム?	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		漬込み後の水洗コンベアたまり水	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		漬込み後の水洗コンベアブラシ	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
Slicing machine 2 =紅鮭小身No.1	28	サーモン端材(機械内部からのもの)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		サーモン端材(機械上部からのもの)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		トラウト端材A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
		トラウト端材B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

Sample category	No. of samples	Sample name	2002.8.2	2002.9.10	2002.11.6	2002.12.11	2003.5.26	2003.6.23	2003.7.22	2003.8.18	2003.9.26	2003.10.29	2003.12.17	2004.1.28	2004.2.24	2004.3.29	2004.5.10	
Slicing machine 1 =大型スライサー	44	スライサー内側 スライサー刃 スライサー内側(大)通常洗浄後 スライサー内側(大)洗浄液拭取後 スライサー刃(大)洗浄液拭取後 スライサー刃(大)通常洗浄後 大型スライサー切身排出部おさえ 大型スライサー材料押出装置 大型スライサー分解後回転継目 大型スライサー分解後切身排出部おさえ隙間 大型スライサー分解後切身排出部おさえ隙間 (サーモン接触部) 大型スライサー分解後刃裏側 大型スライサー分解後刃おさえネジ部 大型スライサー分解後端材受部 スライサー内側(裏側) スライサーカバーバックリング	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Slicing machine 3 =スライサーNo.2	16	スライサー内側(No.2) スライサー刃(No.2)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Others	13	皮むき機 割製気(刃) 攪拌機 原料準備室ブラッシングコンベア下板 原料準備室ブラッシングコンベアたまり水 三枚おろし機回転刃(身側) 三枚おろし機ベルト(皮側)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Environment	67	Floor(swab), brining room Floor(surface water), raw fish processing area Floor(swab), drying room Floor(swab), thawing room Floor surface water in front of the brining room Floor(swab), smoking room Others	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Others	19	スモーク室壁 スライス原料保管室前側溝水 スライス原料保管室前踏み込み水 スライス原料保管室床 工場内入口踏み込み水 仕込み室 汚水室からの踏み込み水	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Total	430		31	33	38	26	36	22	25	36	27	30	24	27	32	25	18	

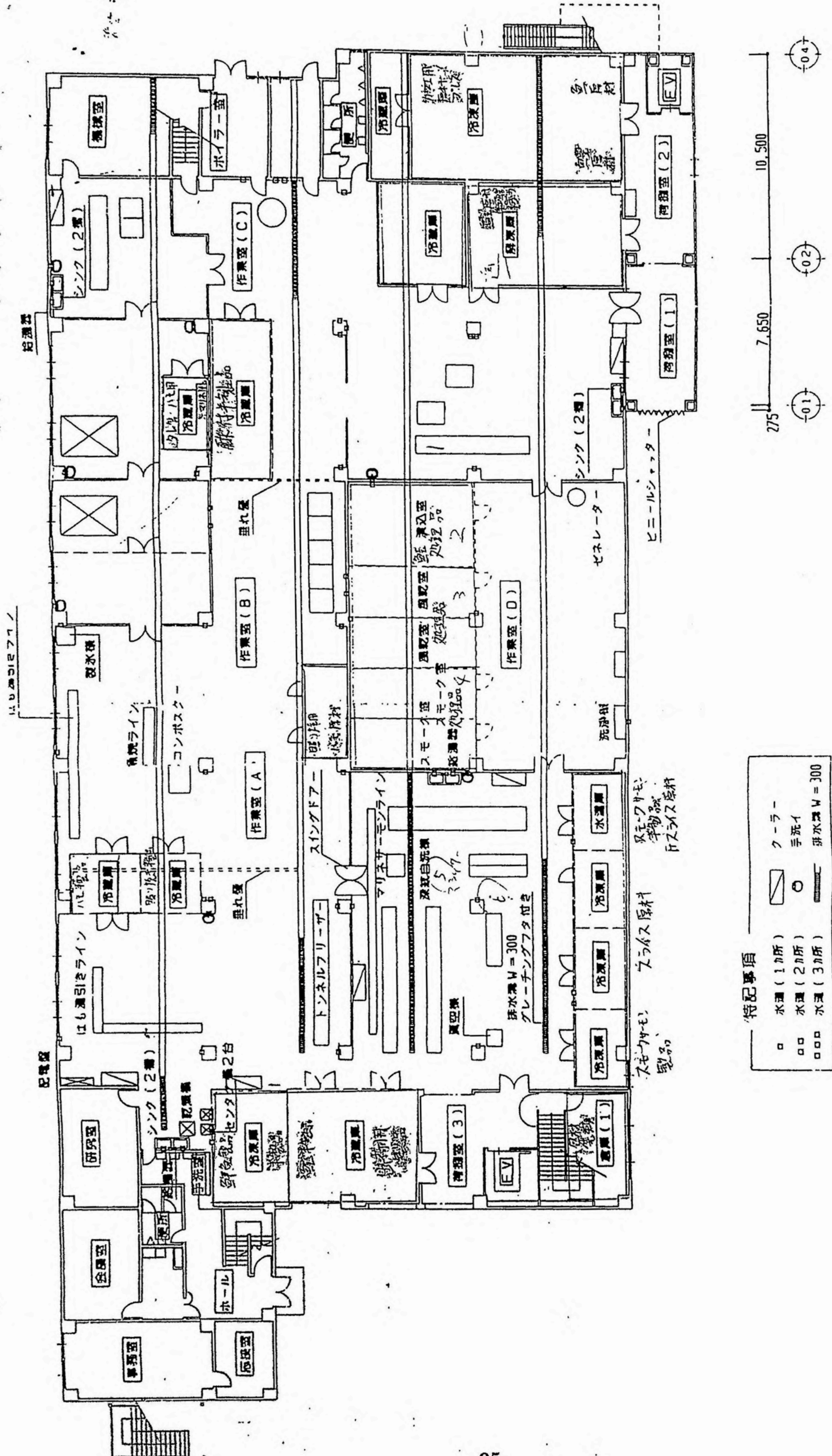


Figure 5 A sketch of cold-smoked fish processing line in the manufacturer A.



Table 13 *L. monocytogenes* strains isolated from cold-smoked fish processing plant

Strain No.	Sampling Date	Sample Name	Serotype
1	2002. 8. 2	Floor (swab), brining room	1/2b
2	2002. 8. 2	Floor (swab), brining room	3b
3	2002. 8. 2	Sliced salmon	1/2a
4	2002. 8. 2	Slicing machine 1	1/2a
5	2002. 8. 2	Slicing machine 2	3b
6	2002. 9. 10	Sliced salmon	1/2b
7	2002. 9. 10	Product trimmings from slicing machines	3a
8	2002. 9. 10	Floor (swab), brining room	1/2a
9	2002. 11. 6	Swab from raw salmon	1/2a
10	2002. 11. 6	Floor (swab), brining room	1/2a
11	2002. 11. 6	Floor (swab), brining room	1/2b
12	2002. 11. 6	Floor (swab), brining room	3b
13	2002. 12. 11	Floor (swab), brining room	3b
14	2002. 12. 11	Floor (swab), brining room	3a
15	2002. 12. 11	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2a
16	2003. 5. 26	Skins before slicing	1/2a
17	2003. 5. 26	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2a
18	2003. 5. 26	Floor (swab), brining room	3a
19	2003. 5. 26	Floor (swab), brining room	3b
20	2003. 5. 26	Floor (swab), brining room	1/2a
21	2003. 6. 23	Skins before slicing	1/2a
22	2003. 6. 23	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2a
23	2003. 6. 23	Floor (surface water), in front of the brining room	1/2a
24	2003. 6. 23	Floor (surface water), in front of the brining room	3a
25	2003. 6. 23	Skins before slicing	3b
26	2003. 6. 23	Floor (swab), brining room	1/2a
27	2003. 7. 22	Floor (swab), drying room	3b
28	2003. 7. 22	Sliced salmon	1/2a
29	2003. 7. 22	Skins from brining trout	3b
30	2003. 7. 22	Skins from brining trout	1/2a
31	2003. 7. 22	Floor (swab), thawing room	1/2a
32	2003. 7. 22	Floor (swab), brining room	1/2a
33	2003. 7. 22	Floor (swab), brining room	3b
34	2003. 8. 18	Floor (swab), drying room	1/2a
35	2003. 8. 18	Floor (swab), smoking room	1/2a
36	2003. 8. 18	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2a
37	2003. 8. 18	Product trimmings from slicing machines	1/2a
38	2003. 8. 18	Trimmings (law jar) from raw salmon	1/2a
39	2003. 8. 18	Washing conveyor after brining	1/2a
40	2003. 8. 18	Floor (swab), brining room	1/2a
41	2003. 8. 18	Trimmings (skin) from raw salmon	1/2a

Table 13 *L. monocytogenes* strains isolated from cold-smoked fish processing plant (continued)

Strain No.	Sampling Date	Sample Name	Serotype
42	2003. 9. 26	Floor (swab), drying room	1/2a
43	2003. 9. 26	Skins before slicing	1/2b
44	2003. 9. 26	Slicing machine 2	1/2b
45	2003. 9. 26	Slicing machine 2 (inside)	1/2b
46	2003. 9. 26	Product trimmings from slicing machines	1/2a
47	2003. 9. 26	Trimmings (skin) from raw salmon	1/2a
48	2003. 10. 29	Finifhed product	3b
49	2003. 10. 29	Finifhed product	1/2a
50	2003. 10. 29	Product trimmings from slicing machines	1/2a
51	2003. 10. 29	Product trimmings from slicing machines	3b
52	2003. 10. 29	Floor (swab), brining room	3a
53	2003. 12. 17	Floor (swab), brining room	1/2a
54	2003. 12. 17	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2a
55	2003. 12. 17	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2b
56	2003. 12. 17	Slicing machine 3	1/2a
57	2004. 1. 28	Floor (swab), brining room	1/2a
58	2004. 1. 28	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2b
59	2004. 1. 28	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2a
60	2004. 1. 28	Washing convayor after brining	1/2a
61	2004. 1. 28	Drying trout	1/2a
62	2004. 2. 24	Floor (swab), brining room	1/2a
63	2004. 2. 24	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2a
64	2004. 2. 24	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2b
65	2004. 2. 24	Washing convayor after brining	1/2a
66	2004. 2. 24	Washing convayor after brining	3a
67	2004. 3. 29	Drying shelf	3b
68	2004. 3. 29	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2b
69	2004. 3. 29	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2a
70	2004. 3. 29	Washing convayor after brining	1/2b
71	2004. 3. 29	Washing convayor after brining	1/2a
72	2004. 5. 10	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2b
73	2004. 5. 10	Washing convayor after brining	1/2a
74	2004. 5. 10	Floor (surface water), raw fish processing area	3a
75	2004. 5. 10	Floor (surface water), raw fish processing area	UT
76	2004. 5. 10	Floor (surface water), raw fish processing area	UT
77	2004. 5. 10	Floor (surface water), raw fish processing area	1/2a

### 3. 結果

15回の調査で430検体を工場内から採取し、*L. monocytogenes*の検索を行った結果、56検体(13.0%)から本菌が検出された。*L. monocytogenes*が検出された56検体の内容をTable 14に示した。菌数が最も高かったのは、原料準備室の床水で1 mlあたりのMPN値が220<となった。製品および工程中の材料における菌数は、1 gあたり<0.12から1.72であった。ふきとりの菌数は、1か所につき<12から36であった(Table 11-1~11-15)。

市販のキットによる*Listeria*属の検出状況をTable 11-1~11-15に示した。430検体のうち106検体が表中+あるいは±で示したように、陽性または疑陽性と判定された。培養法によって*Listeria*属が検出、分離されているにもかかわらず、市販のキットで陰性のものは7検体であった(Table 15)。培養法と比較すると、感度は92.6% (88/95)、特異性は94.6% (317/335)であった。培養法によって*L. monocytogenes*が検出された56検体のうち、キットで検出できなかったのは1検体にとどまった。

*L. monocytogenes*陽性検体の一般生菌数は、陰性検体に比べて高い傾向が認められたが、大腸菌群数にこの傾向は認められなかった(Fig. 6)。

工場内から採取したサンプルの調査月ごとの*L. monocytogenes*検出率をFig. 7に示した。*L. monocytogenes*の検出率は、夏季に高くなる傾向が認められた。430検体を、原材料(n=47)、工程中の材料(n=133)、製造機器(n=124)、環境(n=67)および製品(n=59)の5つのカテゴリーに分類し(Table 11-1~11-15, Table 12, Table 16)、それぞれのカテゴリー別の*L. monocytogenes*陽性率を調査月ごとにFig. 8に示した。また、12月から2月を冬、3月から5月を春、6月から8月を夏、9月から11月を秋として、カテゴリー別の*L. monocytogenes*陽性率を季節別にTable 16およびFig. 9に示した。*L. monocytogenes*は夏季から秋季に採取した製品から検出されたが、冬季から春季にかけて採取した製品からは検出されなかった。製造機器、特にスライサーからの*L. monocytogenes*の検出時期は製品と一致し、夏季から秋季に高い傾向を示した(夏から秋54検体中8検体、冬から春50検体中1検体; $P < 0.05$ ; Table 16)。また、輸入直後の原材料のサーモンの皮から*L. monocytogenes*は検出されなかった。

スライサーに残されたサーモン端材における本菌検出率は比較的高く25%であっ

た (16 検体中 4 検体, Table 14). また, 本製造施設において, スライス加工を行う部屋は外界と一枚のドアを隔てるのみであった (Fig. 5). すなわち, 夏場においては, 一日の作業が終了した後, 室内は *L. monocytogenes* が増殖するのに十分な温度まで上昇すると考えられる. そこで, 施設内から分離された *L. monocytogenes* 菌株を 360-690 cfu/g となるよう添加し, サーモン端材中での本菌の消長を調べた. その結果, *L. monocytogenes* は 24 時間で 6.3 から 7.6 log CFU/g に達した (Fig. 10).

*L. monocytogenes* が検出された 56 検体から 77 株が分離された. これらは, 2 血清型が 13 検体から, 3 血清型が 2 検体から, 5 血清型が 1 検体から分離された. 残りの 40 株は 40 検体から分離された. 77 株は血清型で 4 グループ (1/2a, 1/2b, 3a, 3b) に, *AscI* および *ApaI* による PFGE 法で 7 グループに, 2 種類のプライマーによる AP-PCR で 7 グループに, REP-PCR で 7 グループに, ERIC-PCR で 4 グループに分類された (Table 17). 77 株はタイプに偏りが見られ, 53 株 (68.8%) がタイプ 1, 2 および 11 であった (Table 17). 各工程におけるタイプの分布を Fig. 11 に示した. また, 施設内における分布を Fig. 12 に示した. タイプ 1, 2 および 11 は施設内から広く分離された. また, タイプ 1 および 11 は製品からも分離された (Table 14, Fig. 11~12). タイプ 1, 2 および 11 の検出率の季節変動を Fig. 13 に示した. タイプ 1 および 11 は, 製品およびスライサーからの検出が増える夏季から秋季にかけて, 採取したサンプルから高頻度で分離された. タイプ 2 は本工場内において優勢なタイプであったにもかかわらず, 製品から分離されなかった. タイプ 2 は冬季によく検出される一方で, タイプ 1 および 11 は夏季から秋季によく検出された.

Table 14 *Listeria monocytogenes*-positive samples and types found among strains

Sample categories	Samples	No. of samples	No. of positive samples (%)	Types found among strains
<b>Product</b>		59	4 (6.8)	
	Sliced salmon	19	3	Types 1, 5
	Final product	40	1	Types 1, 11
<b>Raw fish</b>		47	0 (0)	
<b>Materials during processing</b>		133	11 (8.3)	
	Skins before slicing	6	4	Types 1, 2, 5, 11
	Trimnings and swab from raw salmon	28	4	Types 1, 2, 3
	Skins from brining trout	7	1	Types 2, 11
	Drying trout	2	1	Type 2
	Drying shelf	6	1	Type 11
	Others (fish contact surfaces, unfinished products, etc.)	84	0	
<b>Processing equipment</b>		124	14 (11.3)	
	Washing conveyor after brining	7	5	Types 2, 8, 9
	Product trimmings from slicing machines	16	4	Types 1, 2, 10, 11
	Slicing machine 2	28	3	Types 5, 11
	Slicing machine 1	44	1	Type 1
	Slicing machine 3	16	1	Type 2
	Others (filleting machines, skinning machines, etc.)	13	0	
<b>Environment</b>		67	27 (40.3)	
	Floor (swab), brining room	15	12	Types 1, 2, 6, 7, 9, 11
	Floor (surface water), raw fish processing area	14	9	Types 1, 2, 3, 4, 5, 9, 12, 13
	Floor (swab), drying room	10	3	Type 1, 11
	Floor (swab), thawing room	2	1	Type 1
	Floor surface water before brining room	2	1	Types 1, 9
	Floor (swab), smoking room	5	1	Type 1
	Others (walls, drains, footbaths, etc)	19	0	
<b>Total</b>		430	56 (13.0)	

Table 15 Detection of *Listeria* spp. by culture method and commercial immunochromatographic kit

		Detection of commercial immunochromatographic kit		Total
		+ or ±	-	
Culture method	+	88 (55)	7 (1)	95 (56)
	-	18 (51)	317 (323)	335 (374)
Total		106	324	430

( ); No. of *Listeria monocytogenes* positive samples

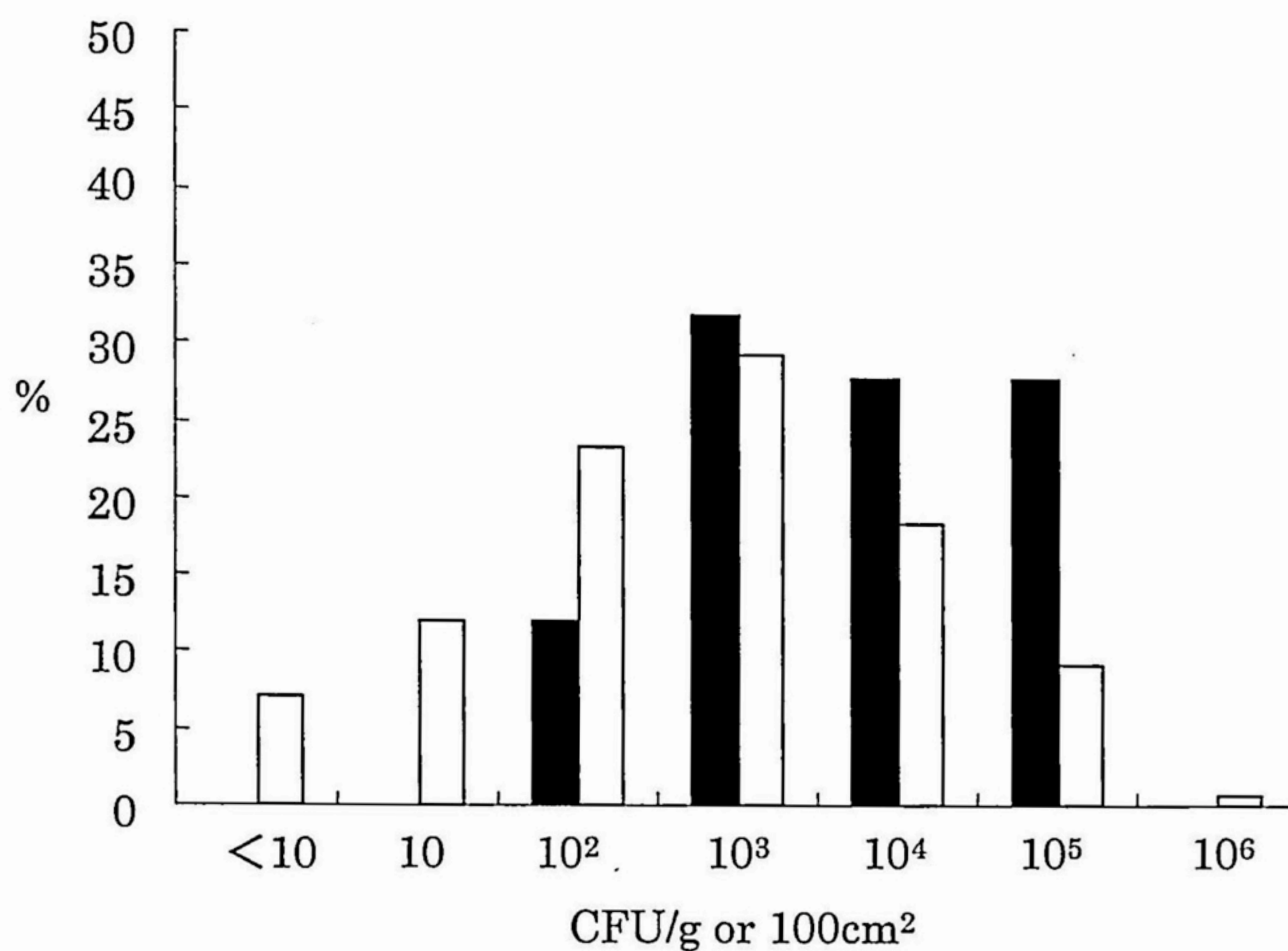
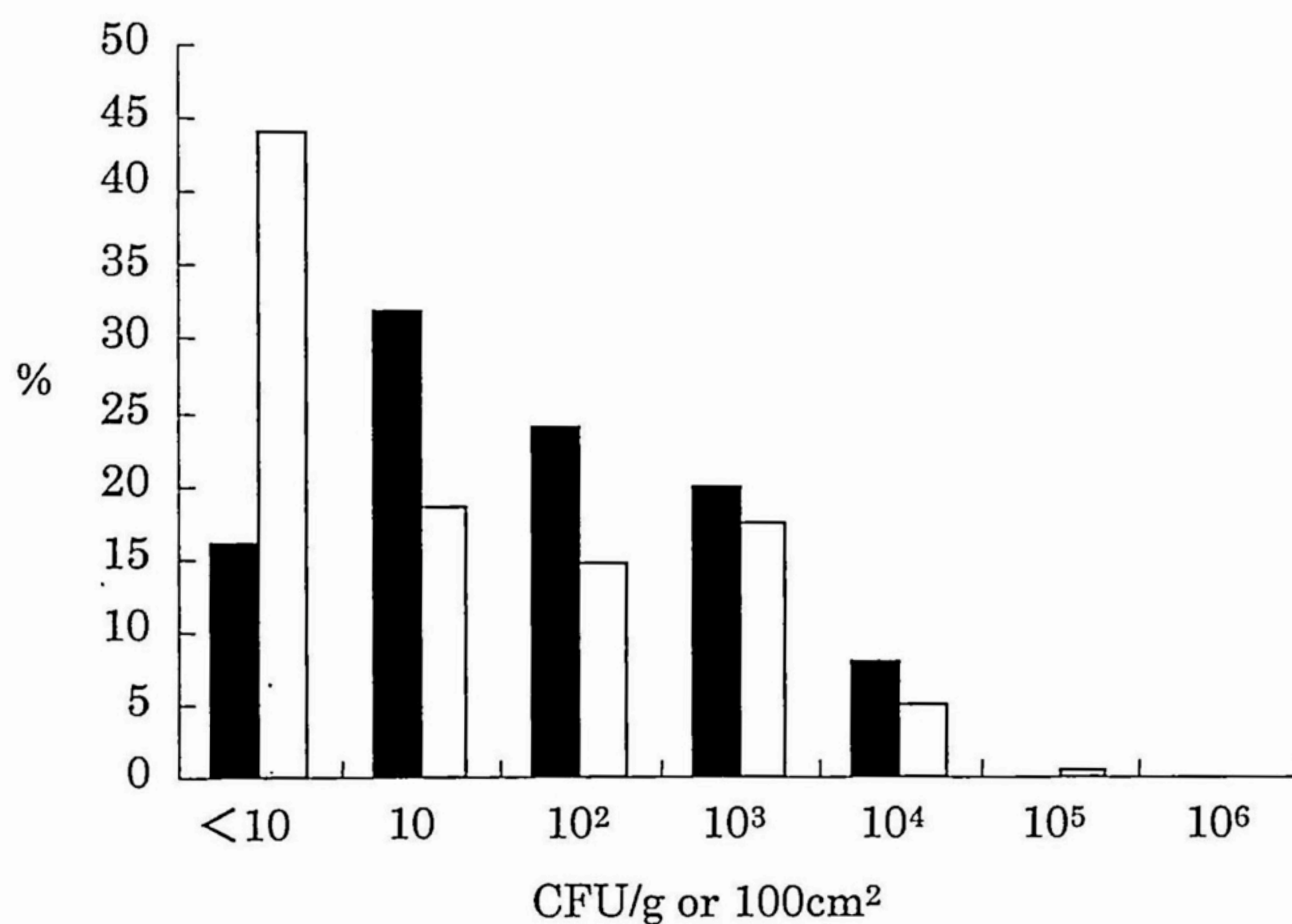
**A****B**

Figure 6. Distribution (%) of aerobic plate count and coliform count of *L. monocytogenes* positive samples and total of the enumerated samples. (A) Aerobic plate count of *L. monocytogenes* positive samples (black bar) and total of the enumerated samples (white bar). (B) Coliform count of *L. monocytogenes* positive samples (black bar) and total of the enumerated samples (white bar).

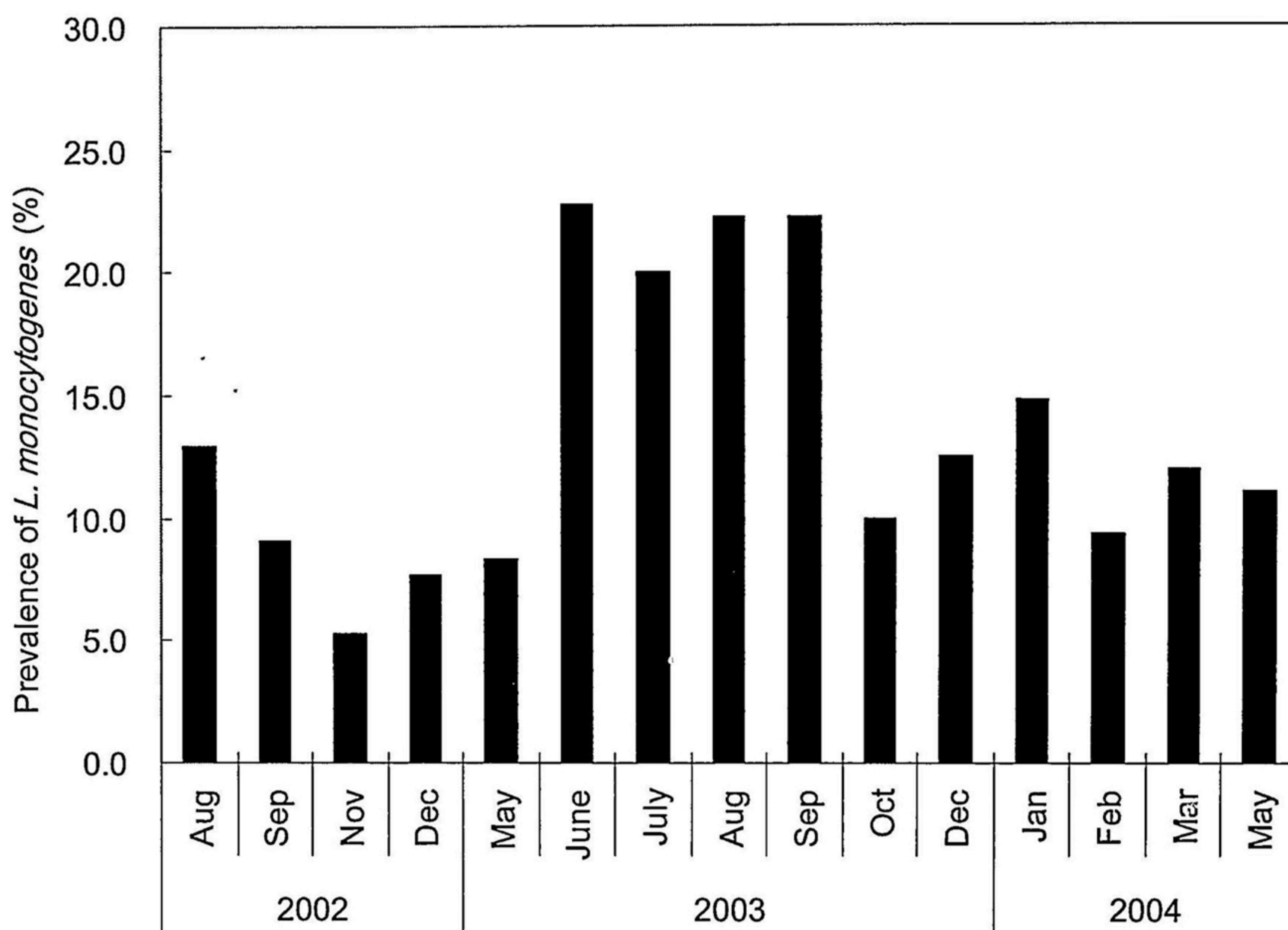


Figure 7 Prevalence of *L. monocytogenes* in cold-smoked fish processing plant among each investigation between 2002 and 2004.



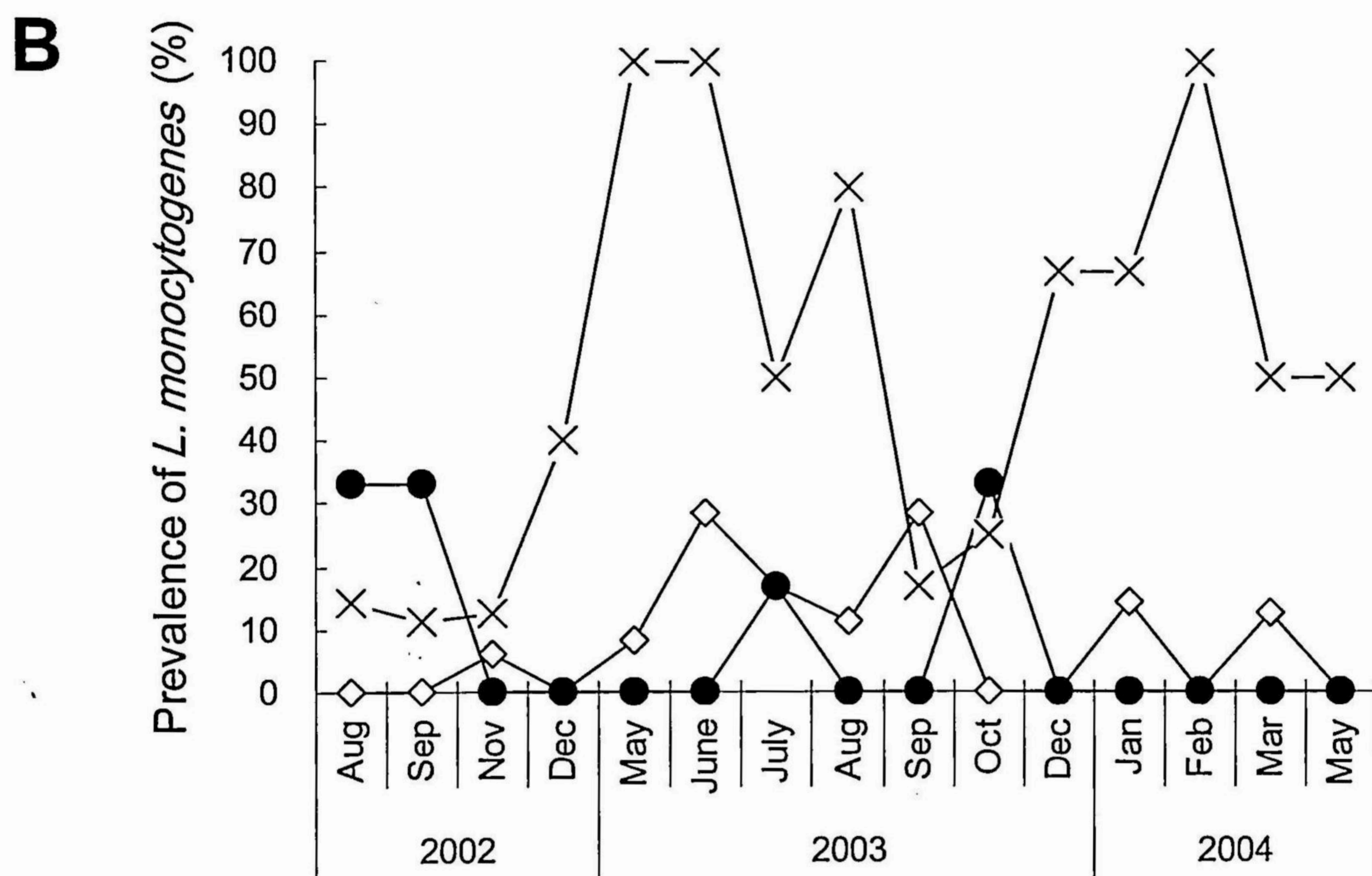
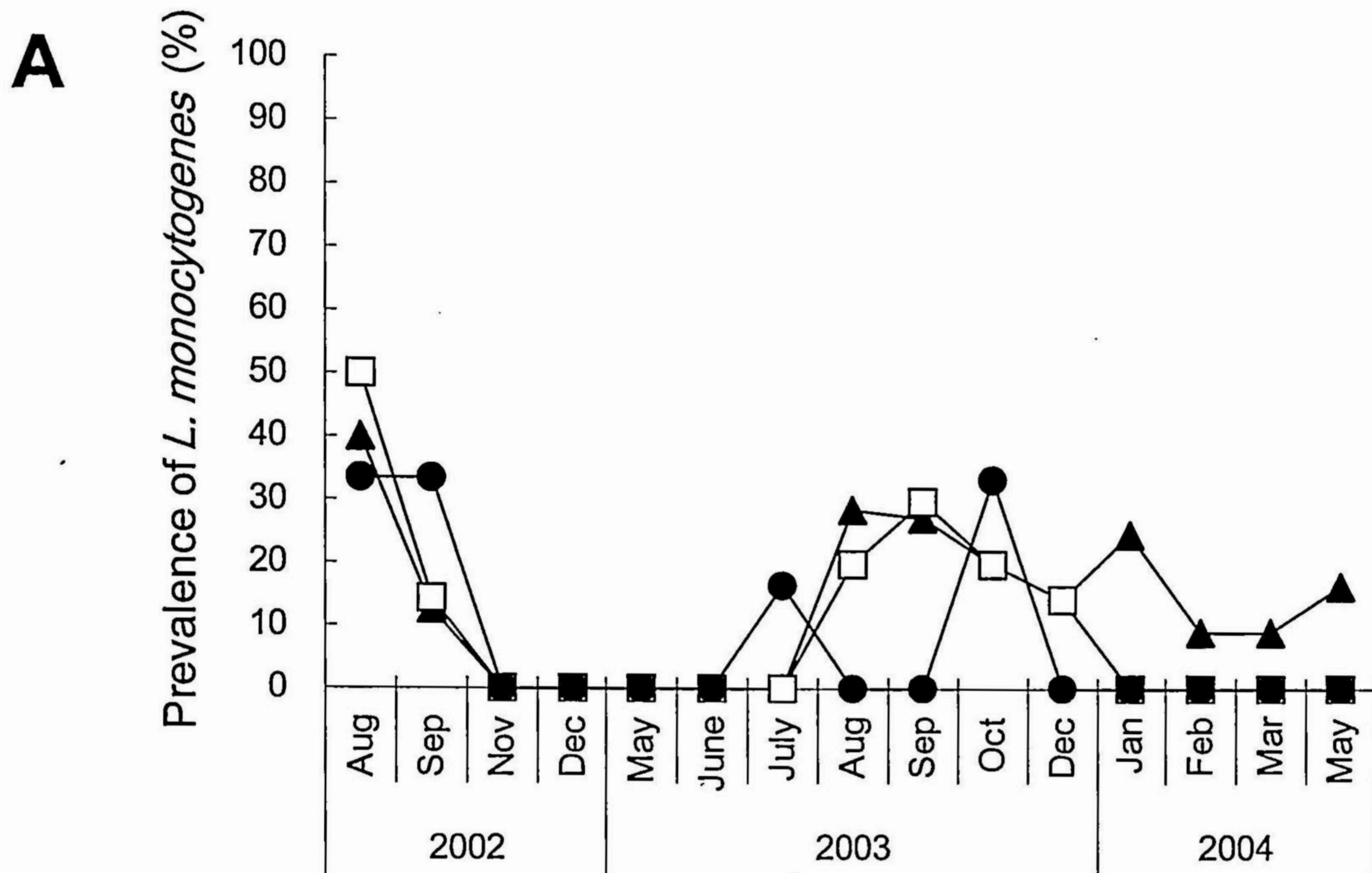


Figure 8 Prevalence of *L. monocytogenes* in each sample category among each investigation. The sample size of each category is indicated in Table 13. (A) Prevalence in all processing equipment (▲), in slicing machines only (◻), and in finished products (●). Among the different types of processing equipment, the prevalence of *L. monocytogenes* in the slicing machines was relatively high. (B) Prevalence in the environment (×), in materials during processing (◊), and in finished products (●). *L. monocytogenes* was not detected on raw fish samples.

Table 16 Sample categories and number of *Listeria monocytogenes*-positive samples

Time	Sample categories <sup>a</sup>	No. of samples	No. of positive samples (%)
Spring (May 2003, Mar 2004, May 2004)	Raw fish	0	0
	Materials during processing	25	2 (8.0)
	Processing equipment	34	2 (5.9)
	Slicing machine	27	0
Summer (Aug 2002, Jun 2003, Jul 2003, Aug 2003)	Environment	6	4 (66.7)
	Product	14	0
	Raw fish	1	0
	Materials during processing	47	5 (10.6)
Autumn (Sept 2002, Nov 2002, Sept 2003, Oct 2003)	Processing equipment	26	4 (15.4)
	Slicing machine	21	3 (14.3)
	Environment	21	11 (52.4)
	Product	19	2 (10.5)
Winter (Nov 2002, Nov 2003, Jan 2004, Feb 2004)	Raw fish	16	0
	Materials during processing	38	3 (7.9)
	Processing equipment	35	5 (14.3)
	Slicing machine	33	5 (15.2)
All 15 visits	Environment	27	4 (14.8)
	Product	12	2 (16.7)
	Raw fish	30	0
	Materials during processing	23	1 (4.3)
Total	Processing equipment	29	3 (10.3)
	Slicing machine	23	1 (4.3)
	Environment	13	8 (61.5)
	Product	14	0
All 15 visits	Raw fish	47	0
	Materials during processing	133	11 (8.3)
	Processing equipment	124	14 (11.3)
	Slicing machine	104	9 (8.7)
Total	Environment	67	27 (40.3)
	Product	59	4 (6.8)
Total		430	56 (13.0)

<sup>a</sup> Processing equipment includes slicing machines. Among the different types of processing equipment, the prevalence of *L. monocytogenes* in the slicing machines was relatively high.

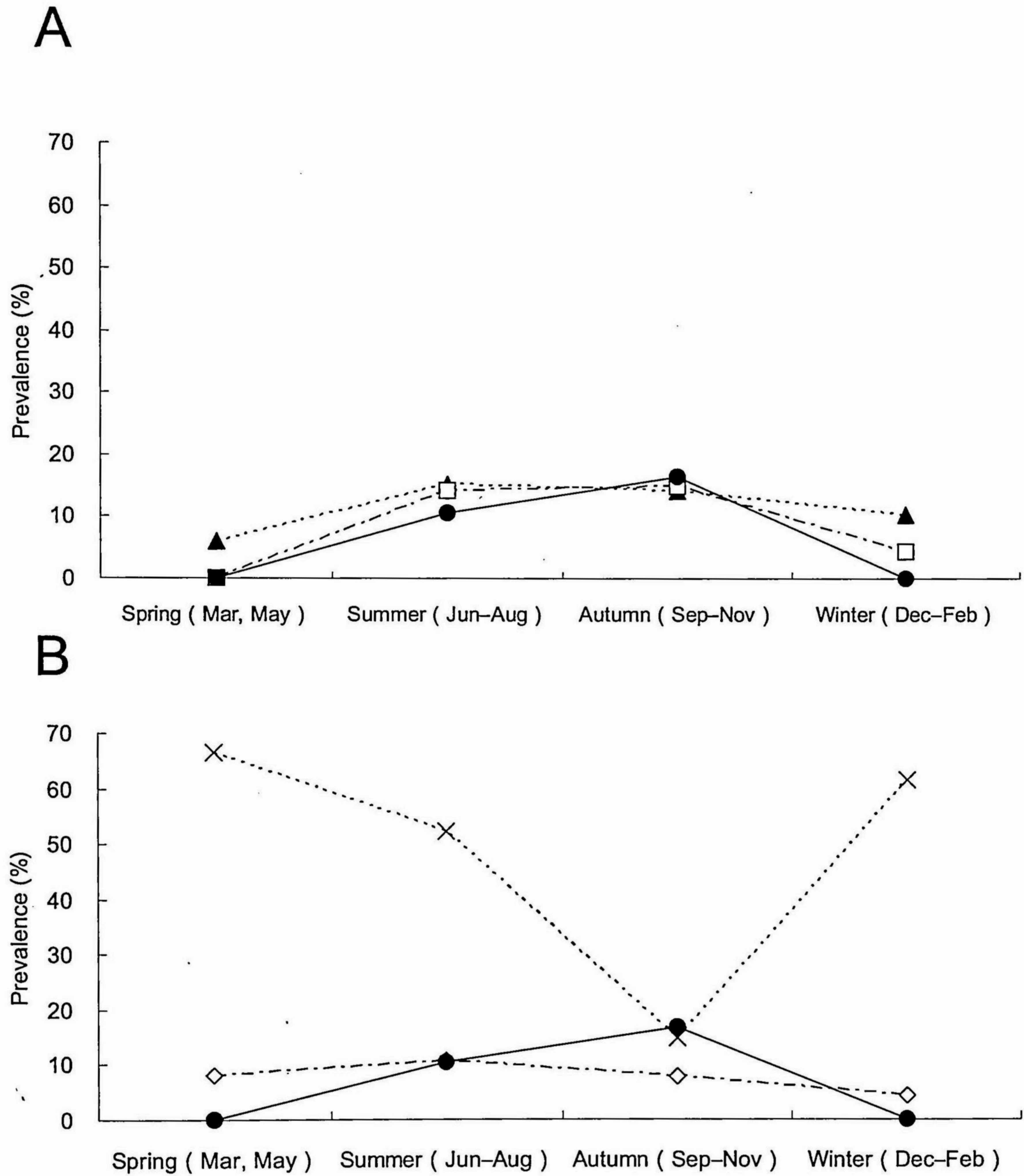


Figure 9 Seasonal prevalence of *Listeria monocytogenes* in each sample category. The sample size of each category is indicated in Table 13. (A) Prevalence in all processing equipment (▲), in slicing machines only (□), and in finished products (●). Among the different types of processing equipment, the prevalence of *L. monocytogenes* in the slicing machines was relatively high. (B) Prevalence in the environment (×), in materials during processing (◇), and in finished products (●). *L. monocytogenes* was not detected on raw fish samples.

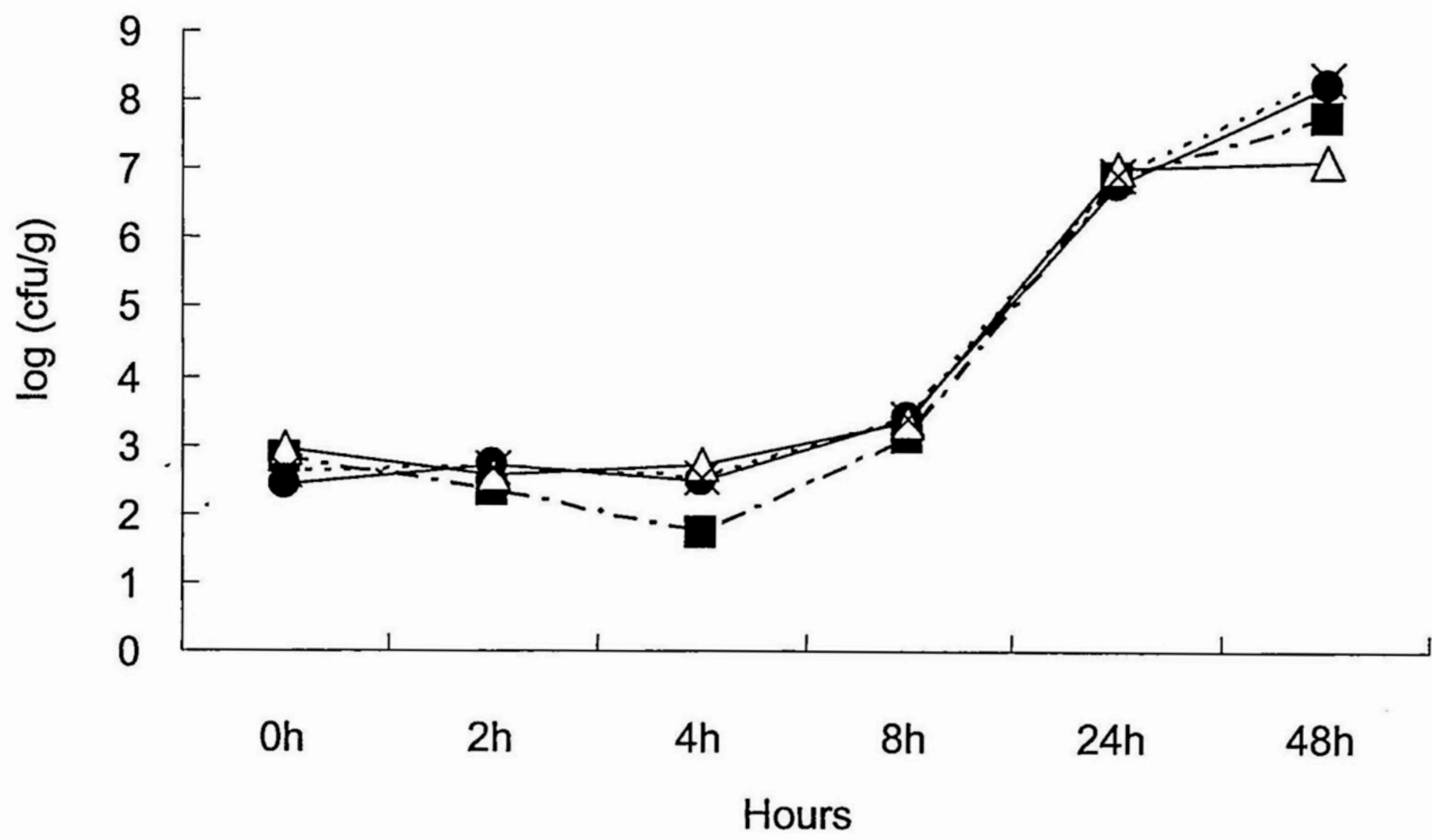


Figure 10 Growth of *Listeria monocytogenes* in *L. monocytogenes*-inoculated, salmon trimmings during 48 hours of incubation. ●; type 1 (strain No. 4), ■; type 2 (strain No. 8), Δ; type 11 (strain No. 19), ×; other types (strain No. 1, 6, 7, 11, 18, 47).

Table 17 Types of *Listeria monocytogenes* isolates

Type	Serotype	PFGE		PCR-based typing			No. of isolates
		<i>AscI</i>	<i>ApaI</i>	AP-PCR type <sup>b</sup>	REP type	ERIC type	
1	1/2a	C	C	III, iii	3	3	21
2	1/2a	G	G	VII, iii	7	7	20
3	1/2a	J	J	VIII, ix	9	7	2
4	1/2a	G	G	VII, iii	10	7	1
5	1/2b	D	D	IV, iv	4	4	9
6	1/2b	F	F	VI, vi	6	6	1
7	1/2b	I	I	VI, vii	6	6	1
8	1/2b	G	G	VII, iii	7	7	1
9	3a	G	G	VII, iii	7	7	6
10	3a	H	H	VII, viii	8	7	1
11	3b	F	F	VI, vi	6	6	12
12	UT <sup>a</sup>	G	G	VII, iii	7	7	1
13	UT	F	F	VI, vi	6	6	1

<sup>a</sup>UT, untypeable

<sup>b</sup>The large and small Roman numerals respectively indicate the types using the primers PJ118 and PJ108.

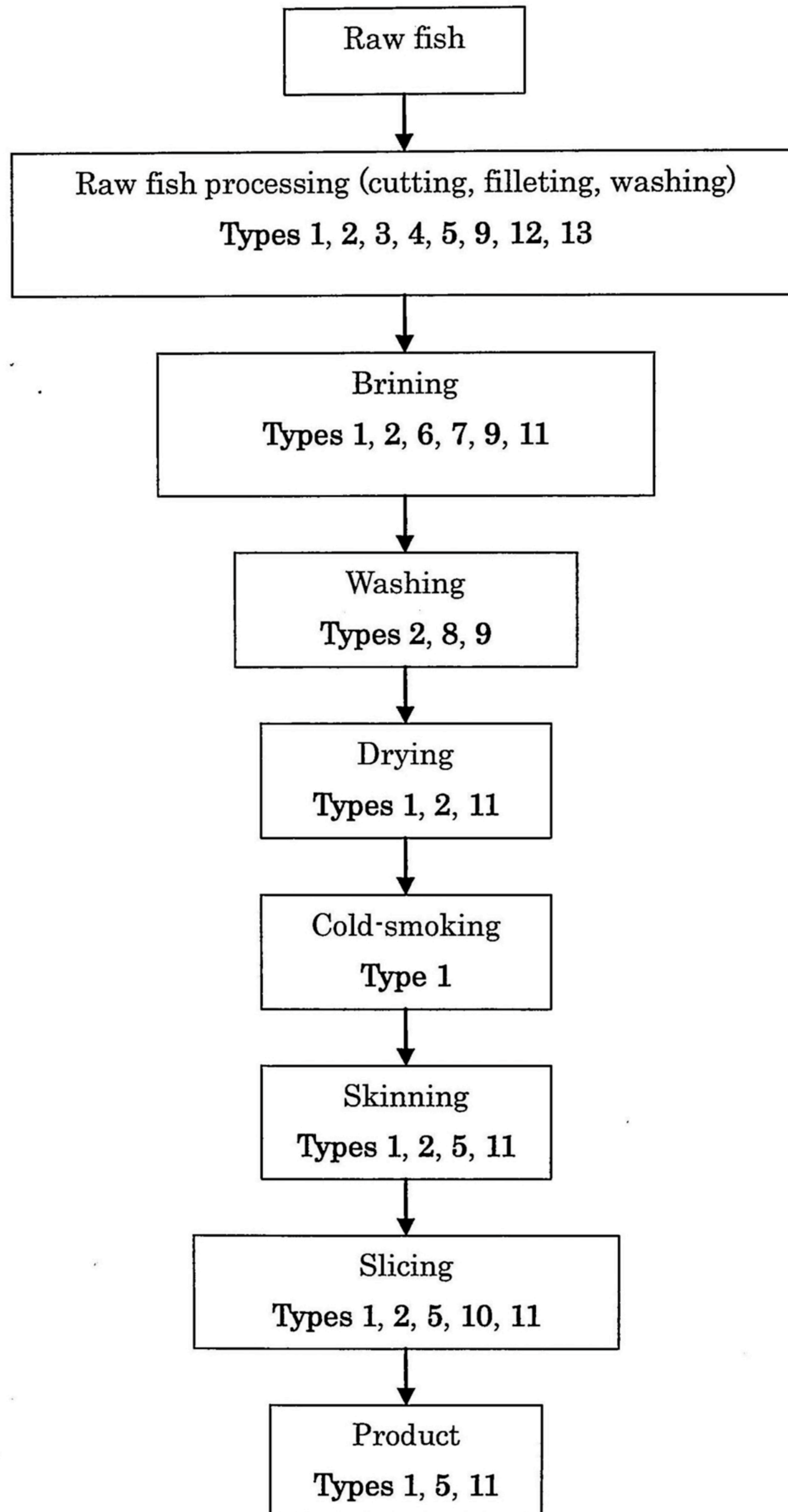


Figure 11 Types of *Listeria monocytogenes* isolates found at each processing step as determined by serotyping, PFGE (*AscI* and *Apal*), and three PCR-based typing methods (Table 14)

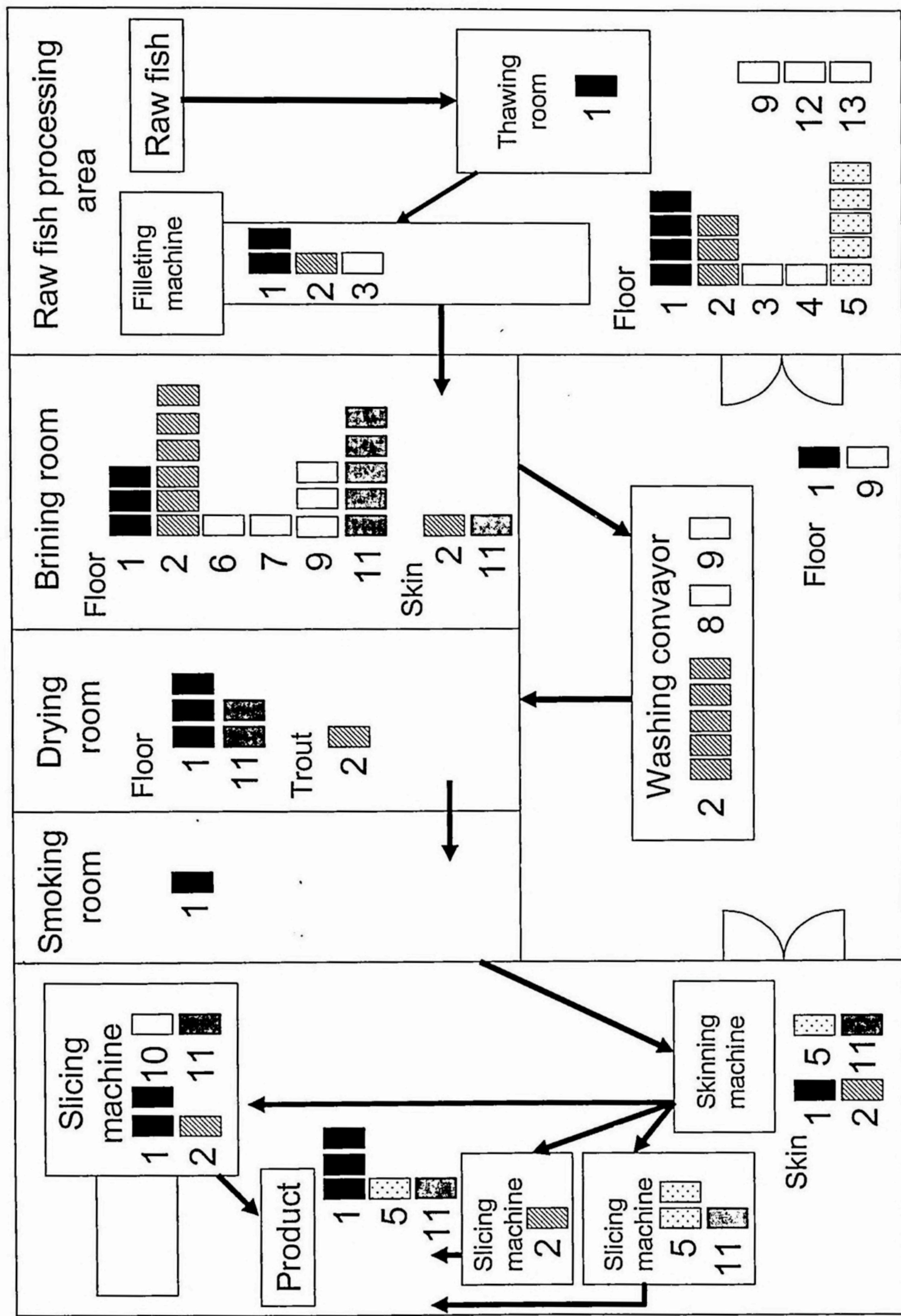


Figure 12 Distribution of types of 77 *Listeria monocytogenes* isolates in the plant. The number represents the type of *Listeria monocytogenes*. The number of the box indicate the number of the isolate in each type, that is, black box; type 1, hatched box; type 2, gray box; type 11, white box; other types of the isolates. Arrowhead represent a flow of the salmon from the raw fish to the final product.

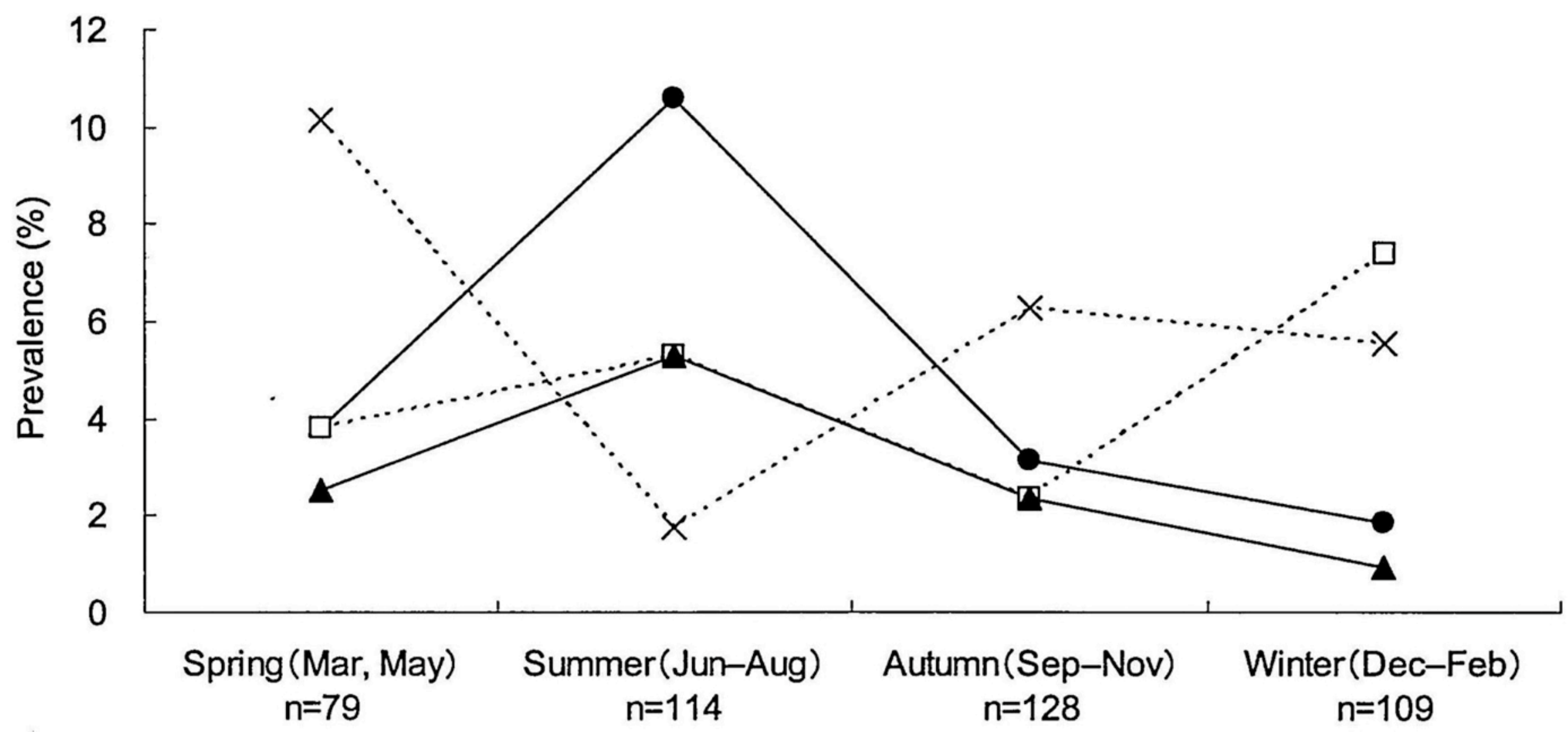


Figure 13 Seasonal prevalence (%) of types of *Listeria monocytogenes* isolates: type 1 (●), type 2 (□), type 11 (▲), and other types (×).



#### 4. 考察

1999~2000年にかけて Ready-to-eat 水産加工品の *L. monocytogenes* 汚染実態調査を行い、分離された菌株について解析を行った結果、各製造元には長期にわたって施設内に存在し、製品を汚染する特有の菌株が存在する可能性が示唆された。そこで、実際に製品からの本菌検出率が他の製造元に比べて顕著に高かった一水産加工施設 (A社) に立ち入り、*L. monocytogenes* の汚染源探索を試みた。その結果、施設内から採取した多くの検体から本菌が検出された。

施設から採取した検体を5つのカテゴリーに分類し、季節別に *L. monocytogenes* の検出率を比較したところ、これらのうち、製品および製造機器 (スライサー) からの検出率にのみ、季節性が認められた (Fig. 9)。製品から分離された *L. monocytogenes* のタイプと製造機器から分離された菌のタイプは一致した (Table 16, Fig. 11~12)。スライサー内部に残されたサーモン端材からの *L. monocytogenes* 検出率は比較的高かった (Table 14)。第1回目の調査の際に、スライサーの分解洗浄を行うよう指摘したところ、最終製品からの *L. monocytogenes* 検出率は85% (7検体中6検体) から2.5% (40検体中1検体) に低下した。これらのことから、製品はスライサー工程で汚染されている可能性が高いと思われた。Vogelら<sup>74)</sup>は、スモークサーモン (冷燻) の加工工程には、スライサーのような複雑な製造機器が存在し、洗浄しにくいことを指摘している。スライサーの洗浄しにくい場所 (ニッチ) に *L. monocytogenes* が存在し、夏季に増殖して製品を汚染している可能性があることから、スライサーの適正な洗浄、消毒を行うことが、製品の *L. monocytogenes* 汚染防止に役立つと考えられた。

15回の調査を通じて *L. monocytogenes* が検出された検体中の菌数 (MPN 値) は、床から採取した水以外では低く、本菌が増殖していると考えられる工場内のニッチを特定することができなかった。そこで、分離された菌株の解析に分子生物学的手法を適用し、製品への汚染源追究を試みた。

調査を通じて、特定の3タイプの *L. monocytogenes* (タイプ1, 2および11) の分離頻度が高かった。これらのタイプは工場内に広く分布しており (Fig. 12)、タイプ1と2が最も多く分離された (77株中それぞれ21および20株) (Table 17)。*L. monocytogenes* は、水産加工施設内で persistent strain として、除去されずに長期

にわたって存在することが報告されている<sup>67, 74, 75, 76, 77</sup>). タイプ1および2の菌株は、当該施設の persistent strain であると思われる。特に、タイプ1は、1999年に製品から分離されたタイプと一致するものであり、6年にわたって当該施設から分離された。

*L. monocytogenes* はステンレス表面に付着し、バイオフィルムを形成する<sup>78</sup>). また、Boruckiら<sup>72</sup>)は、persistent strain のバイオフィルム形成能が高いことを示している。今回分離頻度の高かったタイプの菌株は工場内、特にスライサー内でバイオフィルムを形成することにより長期にわたって工場内から除去されずに残り、夏季に増殖して製品を汚染していた可能性もある。これらの可能性について検討を行うため、*L. monocytogenes* 検出率の季節変動についても調べた。

製品の *L. monocytogenes* 汚染が顕著に高かった一水産加工施設について、1999年から継続的に製品および製造施設内における *L. monocytogenes* 汚染状況および汚染源について調べた。*L. monocytogenes* 陽性検体について菌数の測定を行ったが、施設内で *L. monocytogenes* が増殖しているニッチを特定することはできなかった。しかしながら、*L. monocytogenes* 検出率の季節変動および分離菌株に分子生物学的手法を用いた菌株の解析を適用し、これらを組み合わせて評価を行うことにより、製品の本菌汚染にはスライサーが関与していることが示された。スライサーの効果的な洗浄、消毒を行うことにより、最終製品からの *L. monocytogenes* 検出率は顕著に低下した。

今回 *L. monocytogenes* が陽性となった56検体のうち、市販のキットで55検体を検出することが可能であったことから、市販キットは増菌培養液からの *L. monocytogenes* の迅速なスクリーニングとして有用であった (Table 15)。また、*L. monocytogenes* 陽性検体は、陰性の検体に比べて一般生菌数が高い傾向が認められたが、大腸菌群数にこの傾向は見られなかったことから (Fig. 6)、スモークサーモン製造施設内における *L. monocytogenes* 汚染の指標として、一般生菌数の計測は有用であると考えられた。

## 5. 小括

製品の本菌汚染率が高かったスモークサーモン製造施設に入り、採取した検体から *L. monocytogenes* の検出を試みるとともに、分離菌株に分子生物学的手法を用いた解析を適用することにより、製品への汚染源および汚染経路の推察を行った。施設から分離される菌株のタイプは偏る傾向が認められ、特定のタイプ（タイプ 1, 2 および 11）が多かった。これらのタイプは施設内から広く分離された。施設から採取したサンプルを採取場所に基づいて 5 つのカテゴリーに分類し、各カテゴリーからの *L. monocytogenes* 検出率を季節別に比較したところ、製品からの *L. monocytogenes* 検出率は、夏季から秋季に高くなる傾向を示し、スライサーからの検出率もこれと一致し、季節性が認められた。他のカテゴリーのサンプルでは同様の傾向は認められなかった。また、製品の場合と同様、*L. monocytogenes* の型別法として有用であった分子生物学的手法を適用した結果、製品から分離された菌株のタイプとスライサーから分離された菌株のタイプは一致した。スライサーの洗浄および消毒を徹底することにより、製品の *L. monocytogenes* 汚染を低下させることが可能となったことから、製品汚染にはスライサーの関与が示唆された。

## 第4章 スモークサーモン製造施設から分離された *Listeria monocytogenes* のバイオフィルム形成について

### 1. 緒言

バイオフィルムとは、細菌が生物あるいは無生物の表面に付着し、自らが産生した Extracellular Polymeric Substance (EPS) と呼ばれる複合多糖類に囲まれて存在する集合体のことを指す。細菌は、バイオフィルムを形成することにより、単独で生息する場合に比べ、免疫機構や薬剤に対してより強い抵抗性を生体内で示すことから、臨床上問題視されている<sup>79)</sup>。また、食品の製造工場においては、バイオフィルムを形成した細菌が乾燥や紫外線、消毒剤に抵抗性を示して工場内に長期間存在し、食品の汚染源となる可能性がある。近年、様々な細菌がバイオフィルムを形成することが明らかとなっている。*Listeria monocytogenes* もこれらの細菌のうちの一つであり、実験室内でステンレスやプラスチック表面に付着し、バイオフィルムを形成することが確認されている<sup>78)</sup>。

乳製品、食肉加工品や水産加工品の製造施設から分離された *L. monocytogenes* について解析を行った結果、数年間にわたり、同じ DNA パターンを示す菌株が分離されることが報告されており、これらは persistent strain と呼ばれている<sup>67, 68, 69, 74, 75, 76, 77)</sup>。第2章では、実際に、スモークサーモンを中心とする水産加工品から分離された *L. monocytogenes* について解析を行い、これら菌株の血清型および DNA パターンは製造元毎に偏る傾向を示すことを明らかにした。さらに第3章では、スモークサーモン製造施設の調査を行い、分離された *L. monocytogenes* について同様に解析を行った結果、施設内から分離される *L. monocytogenes* は特定の DNA パターンを示す株が多く、これらの株が少なくとも6年にわたって当該施設および当該施設において製造された製品を汚染していた実態を明らかにした。以上の結果は、これらの *L. monocytogenes* が当該施設でバイオフィルムを形成し、persistent strain として長期間生息している可能性を示唆している。

本研究は、スモークサーモン製造施設から分離された *L. monocytogenes* 菌株を用いて実験室内でバイオフィルムを形成させるための条件検討およびバイオフィルム形成性を菌株間で比較し、persistent strain の特性をバイオフィルム形成能に基づい

て検討することを目的とした。実験室内でバイオフィルムを形成させることが可能となれば、バイオフィルム形成菌に対する消毒剤の効果を検討するための実験系としても有用である。

## 2. 材料と方法

### (1) 使用菌株

第3章の Table 13 に示した 77 株の *L. monocytogenes* 菌株を使用した。バイオフィルム形成条件の検討には、血清型の異なる菌株 No. 4, No. 18, No. 48, No. 64 あるいは No. 11 と ATCC19115 株を使用した。培地の検討および Modified Welshimer's Broth (MWB) 培地中での増殖試験には No. 4, No. 18, No. 48, No. 64 および ATCC19115 の 5 株を、培養温度の検討には、No. 4, No. 18, No. 11 と ATCC19115 の 5 株を使用した (Table 13)。

### (2) 培地

#### ①TSBYE 培地

純水 1,000 ml に *Listeria enrichment broth base* (OXOID, #CM862) 36.0 g を溶解して中試験管に 10 ml ずつ分注し、オートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌した。

#### ②TSB 培地

純水 1,000 ml に Trypticase Soy Broth (BD Difco, #211768) 30 g を溶解して中試験管に 10 ml ずつ分注し、オートクレーブで 121 °C, 15 分間滅菌した。

#### ③BHI 培地

第2章 2.材料と方法の (2). 培地の項と同様の方法で調製した。

#### ④BHI 寒天平板培地

第2章 2.材料と方法の (2) 培地の項と同様の方法で調製した。

⑤MWB 培地<sup>80)</sup>

以下のストック溶液を作製し、Salt A および Salt B 溶液以外は冷蔵保管した。

a. Salt A (10 X stock solution)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (試薬特級) 154.8 g と  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (試薬特級) 32.8 g を純水に溶解し、500 ml とした。

b. Salt B (100 X stock solution)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (試薬特級) 4.09 g を純水に溶解し、100 ml とした。

Salt A および Salt B 溶液は 121 °C で 15 分間オートクレーブ滅菌を行った。

c. 10 mg/ml アミノ酸 (100X stock solution)

滅菌水 40 ml に L- Leucine, L- Isoleucine, L- Valine, L- Methionine, L- Arginine を各 400 mg 溶解した。

d. クエン酸鉄溶液 (50X stock solution)

Ferric citrate (試薬特級) 131.7 mg を滅菌水 (60 °C) で溶解し、30 ml とした。

e. 0.05 mg/ml ビタミン溶液 (100X Vitamin stock solution)

リボフラビン (試薬特級) 1 mg は、1 規定の formic acid に溶解し、20 ml とした。ビオチン (試薬特級) 1 mg は、滅菌水 (60 °C) で溶解し、20 ml とした。

f. 0.1 mg/ml チアミン溶液 (100 X Vitamin stock solution)

チアミン (試薬特級) 2 mg を滅菌水に溶解し、20 ml とした。

g. 50 µg/ml チオクト酸溶液 (100 X Vitamin stock solution)

チオクト酸 (試薬特級) 1 mg を 1 ml の 70%エタノール溶液に溶解した後、19 ml の滅菌水で溶解した。

以上のストック溶液から、Salt A を 50 ml, Salt B を 5 ml, アミノ酸ストック溶液を各 5 ml, クエン酸鉄溶液を 10 ml, 0.05 mg/ml ビタミン溶液および 0.1 mg/ml チアミン溶液を各 5 ml, 50 µg/ml チオクト酸溶液を 50 µl をはかりとった。また、5 mg/ml の L-Cysteine 溶液を 10 ml (50 mg の L-Cysteine (試薬特級) を 10 ml の滅菌水で溶解), 30 mg/ml の L-Glutamine 溶液を 10 ml (300 mg の

L-Glutamine (試薬特級) 10 ml の滅菌水で溶解), 25 ml の 20% グルコース溶液 (グルコース (試薬特級) を 25 ml の滅菌水で溶解) を使用時に調製し, これらと 350 ml の滅菌水を 1 L のコルベンで混和した. 混和後, 0.22  $\mu\text{m}$  の GV Durapore Membrane (Millipore, Billerica, MA, USA) でろ過滅菌を行った. 使用まで冷蔵保管し, 3 ヶ月以内に使用した.

### (3) 試薬

#### ① 1% (0.1%) クリスタルバイオレット (CV) 水溶液

滅菌水 100 ml に, クリスタルバイオレット (Merck) を 1 g はかり入れ, 溶解した.

#### ② 70 あるいは 95% エタノール溶液

エタノール (99.5) (試薬特級) 70 あるいは 95 ml をはかり, 滅菌水を加えて 100 ml にした.

### (4) 使用したクーポン

クーポンは, ステンレス製 (1.5 cm x 1.5 cm x mm, SUS304 2B 仕上げ) のものとガラス製 (9 mm x 9 mm あるいは 18 mm x 18 mm のカバーガラス, いずれも厚さは 0.12 mm-0.17 mm) のものを使用した. クーポンは, 2% の中性洗剤 SCAT 20X-N (第一工業製薬, 京都) に一晩浸漬後, 水道水で 20 回, 純水で 3 回洗浄後室温で乾燥させた. 乾燥後, 180  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間乾熱滅菌を行い, 実験に供した. クーポン上の菌数を計測する場合には, 乾燥後油性マジックで表面に直径 1 cm の円を描いてから乾熱滅菌を行った.

### (5) マイクロプレートを用いたバイオフィルムの定量

ポリ塩化ビニル (PVC) 製の 96 穴プレート (BD Falcon, #353911) を用いて, *L. monocytogenes* にバイオフィルムを形成させるための条件検討を行った. プレ

ートは、あらかじめ各ウェルに 70%エタノール溶液 200  $\mu$ l を分注して消毒した後  
に乾燥させてから使用した。培地として、MWB 培地、BHI 培地および TSB 培地  
の 3 種類、培養温度として、MWB 培地を用いて 32  $^{\circ}$ C と 10  $^{\circ}$ C の検討を行った。

BHI 高層寒天培地で 4  $^{\circ}$ C に保存した菌株を 10 ml の TSBYE 培地に接種し、  
32  $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。培養後、100  $\mu$ l の TSBYE 培養液を 10 ml のバイオフ  
ィルム形成培地で希釈して混和後、100  $\mu$ l をプレートの各ウェルに接種し、32 $^{\circ}$ C  
で 40 時間培養を行った。32  $^{\circ}$ C では 0, 16, 24, 40, 48, 72 時間後に、10 $^{\circ}$ C で  
は 20, 40, 48, 72, 96, 192, 384 時間 (16 日間) 後に以下の方法でプレートの  
各ウェルに形成されたバイオフィルムの定量を行った。すなわち、培養後、滅菌  
水で 5 回洗浄して各ウェルの浮遊菌を除去し、プレートを 45 分間室温で乾燥させ  
た。乾燥後、各ウェルに 150  $\mu$ l の 1%CV 溶液を入れてプレートの底に形成された  
バイオフィルムを 45 分間染色した。滅菌水で 5 回洗浄して余分な 1%CV 溶液を  
洗い落とした後、200  $\mu$ l の 95%エタノールで CV を抽出した。100  $\mu$ l を新しいプ  
レートに移し、プレートリーダー、Labsystems Multiscan MS (サーモバイオア  
ナリシスジャパン, 東京) で 600 nm の値を読み、バイオフィルム量として定量し  
た。各菌株は 8 ウェルの平均値でバイオフィルム量を算出した。また 1 枚のプレ  
ートには 8 ウェルの培地のみをコントロールを置いた。データは 3 回実験を行っ  
た平均値をとり、バイオフィルム量とした。条件検討のための実験は、1 回ずつ行  
った。

#### (6) MWB 培地中での *L. monocytogenes* の増殖

培地の検討に使用した菌株と同じ No. 4, No. 18, No. 48, No. 64 と ATCC19115  
株を用いて、MWB 培地中での *L. monocytogenes* の増殖を調べた (Table 13)。  
すなわち、BHI 高層寒天培地で 4 $^{\circ}$ C に保存した菌株を 10 ml の TSBYE 培地に接  
種し、32  $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。培養後、100  $\mu$ l の TSBYE 培養液を 10 ml の  
MWB 培地で希釈して混和後、32 $^{\circ}$ C で培養を行った。0, 16, 24, 40, 48 時間後  
にインキュベータから取り出して 100  $\mu$ l を 900  $\mu$ l の滅菌生理食塩水で希釈後、100  
 $\mu$ l を 2 枚の BHI 寒天平板培地に塗布し、37  $^{\circ}$ C で 24~48 時間培養後、菌数を算出  
した。



## (7) クーポン上に形成されたバイオフィルムの定量

菌株 No. 4 および No. 18 を使用した (Table 13). すなわち, BHI 高層寒天培地で 4 °C に保存した菌株を 10 ml の TSBYE 培地に接種し, 32 °C で 24 時間培養した. 培養後, 100 µl の TSBYE 培養液を 10 ml の MWB 培地で希釈して混和後, 1 ml をポリプロピレン製チューブ (アシスト, 東京, #60.540S) に移し, 培地中に無菌的にガラスクーポン (9 mm x 9 mm) を沈めて 32 °C で 40 時間培養を行った. ステンレスクーポンは, 50 µl の TSBYE 培養液を, あらかじめ 50 ml の遠心チューブ (岩城硝子, #2345-050) に分注しておいた 5 ml の MWB 培地で希釈して混和後, 培地中にクーポンを無菌的に沈めて同様に培養を行った. 培養後, 滅菌水 1 ml (ステンレスは 5 ml) で 5 回洗浄して浮遊菌を除去した. 1 ml (ステンレスは 5 ml) の 0.1%CV 溶液を加えて室温で 45 分間染色後, 滅菌水 1 ml (ステンレスは 5 ml) で 5 回洗浄して余剰の染色液を除去した. クーポンをピンセットで細胞培養用 12 穴プレート (ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA, #76-053-05) に移し. 1 ml の 95%エタノールを加え, 30 分間振とうして CV を抽出した. クーポンを裏返してさらに 30 分間振とう後, 1 ml の OD<sub>600</sub> 値を GeneQuantPro (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) で測定し, クーポン当たりのバイオフィルム量とした.

## (8) クーポン表面に付着した *L. monocytogenes* 菌数の計測

type 1 の菌株として No. 4, type 11 の菌株として No. 48 の 2 株を使用し (Table 13), 以下の方法で菌数を計測した.

### ①スワブ法

BHI 高層寒天培地で 4 °C に保存した菌株を 10 ml の TSBYE 培地に接種し, 32 °C で 24 時間培養した. 培養後, 100 µl の TSBYE 培養液を 10 ml の MWB 培地で希釈して混和後, 100 µl を各クーポン上の直径 1 cm の円内に滴下し, クーポンを滅菌水 5 ml とともに滅菌シャーレ中に並べて, 周囲をパラフィルムでシールして 32

°C で 40 時間培養を行った。培養後、培養液を滅菌水 10 ml (流速 1 ml/sec) で洗い落とし、クーポン表面に残った *L. monocytogenes* を滅菌綿棒 (ニッスイ) で 100 回擦り取った。綿棒に付着した菌は 1 ml の滅菌生理食塩水中に懸濁し、希釈して 100  $\mu$ l を 2 枚の BHI 寒天平板培地に塗布し、37 °C で 24~48 時間培養後、単位面積当たりの菌数を算出した。

## ②ガラスビーズ法

BHI 高層寒天培地で 4 °C に保存した菌株を 10 ml の TSBYE 培地に接種し、32 °C で 24 時間培養した。培養後、100  $\mu$ l の TSBYE 培養液を 10 ml の MWB 培地で希釈して混和後、1 ml をポリプロピレン製チューブ (アシスト) に移し、培地中に無菌的にガラスクーポン (9 mm x 9 mm) を沈めて 32 °C で 40 時間培養を行った。ステンレスクーポンは、50  $\mu$ l の TSBYE 培養液をあらかじめ 50 ml の遠心チューブ (岩城硝子) に分注しておいた 5 ml の MWB 培地で希釈して混和後、培地中にクーポンを無菌的に沈めて同様に培養を行った。培養後、培養液を捨てて滅菌水 1 ml (ステンレスは 5 ml) を加えて 5 回洗浄後、滅菌水 1 ml (ステンレスは 5 ml) あたり 0.1 g (ステンレスは 0.5 g) のガラスビーズ (SIGMA, #G9268-250G) を無菌的に加え、ボルテックスミキサーで混和した。ガラスビーズは直径 450–600  $\mu$ m のものを滅菌水で 5 回洗浄、乾燥後実験に使用した。混和後、菌懸濁液を希釈して 100  $\mu$ l を 2 枚の BHI 寒天平板培地に塗布し、37 °C で 24~48 時間培養後、クーポン当たりの菌数を算出した。

## 3. 結果

血清型の異なる菌株を使用して、実験室内で *L. monocytogenes* にバイオフィルムを形成させるための条件の検討を行った。アルコールで抽出された CV の OD<sub>600</sub> 値を、形成されたバイオフィルム量として定量した。32 °C 培養において PVC 製のマイクロプレート上に形成されたバイオフィルム量を比較すると、BHI 培地および TSB 培地に比べて MWB 培地を用いた場合が最も多かった (Fig. 14)。また、MWB 培地を用いて培養温度が 32 °C および 10 °C の場合に形成されたバイオフィルム量を比較すると、10 °C に比べて 32 °C が多かった (Fig. 14)。また、いずれの血清型の *L.*

*monocytogenes* も、本培地中での増殖に差は認められず、40 時間後には 8.3-8.6 log CFU/ml に達した (Fig. 15).

施設内から分離された 77 株の *L. monocytogenes* について、PVC 製のマイクロプレート上に形成されたバイオフィルム量を測定した。条件検討の結果より、*L. monocytogenes* のバイオフィルム形成培地を MWB 培地、培養時間を 32 °C とし、40 時間後に形成されたバイオフィルム量について調べた。OD<sub>600</sub> 値は 0.017 から 0.662 の間を示し、菌株間でバイオフィルム形成に差が認められた。これらをタイプ別に Fig. 16 に示した。タイプ 1, 2, 3, 7 および 8 の菌株のバイオフィルム量が他のタイプに比べて高い傾向が認められた。

77 株のうち、マイクロプレート上でのバイオフィルム形成が最も高かった菌株 No. 4 と最も低かった No. 48 を用いて、ステンレスおよびガラスクーポン上でのバイオフィルム形成について調べた結果、マイクロプレートを用いた場合と同様の傾向が認められた (Fig. 17)。これらは、ステンレスでもガラスでも同様の傾向を示した。クーポン表面に付着した菌数をスワブ法およびガラスビーズ法で計測した。ステンレスはスワブ法、ガラスではガラスビーズ法を用いた場合の菌数が高かった (Fig. 18)。いずれの方法を用いた場合でも、これら 2 株の間に単位面積当たりの付着菌数の差は認められず、クーポンによる差も認められなかった (Fig. 18)。

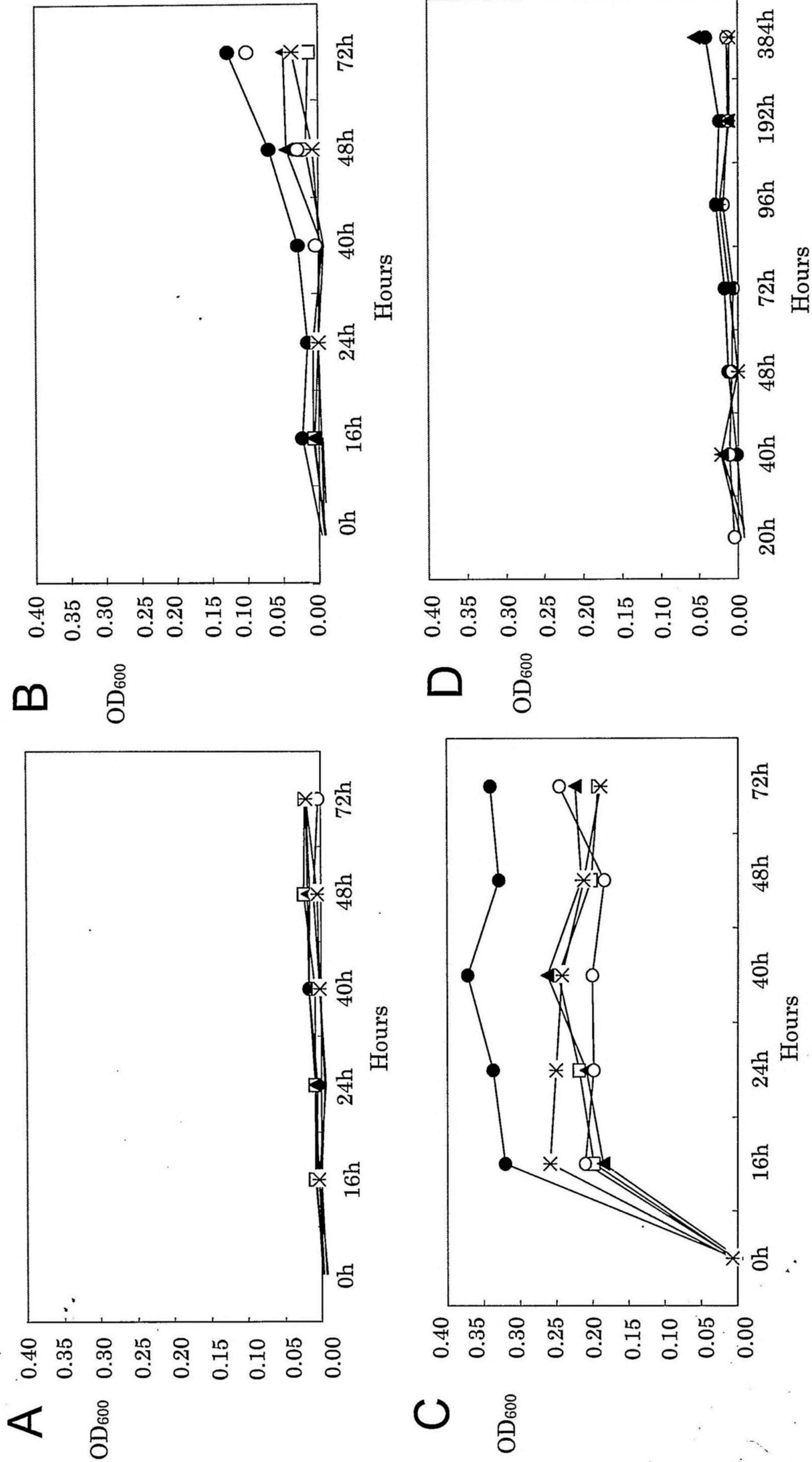


Figure 14 OD600 of *L. monocytogenes* based on a crystal violet destaining biofilm assay with three different medium (BHI, TSB, and MWB) at 32 °C, and biofilm at 10 °C using MWB medium. (A) BHI, (B) TSB, (C) MWB, (D) MWB at 10 °C. (A, B, C), ●; serotype 1/2a (strain No. 4), ○; serotype 3a (strain No. 18), □; serotype 3b (strain No. 48), ▲; serotype 1/2b (strain No. 64), \*; serotype 4b (ATCC19115), (D), ●; serotype 1/2a (strain No. 4), ○; serotype 3a (strain No. 18), ▲; serotype 3b (strain No. 11), \*; serotype 1/2b (strain No. 11), \*; serotype 4b (ATCC19115).

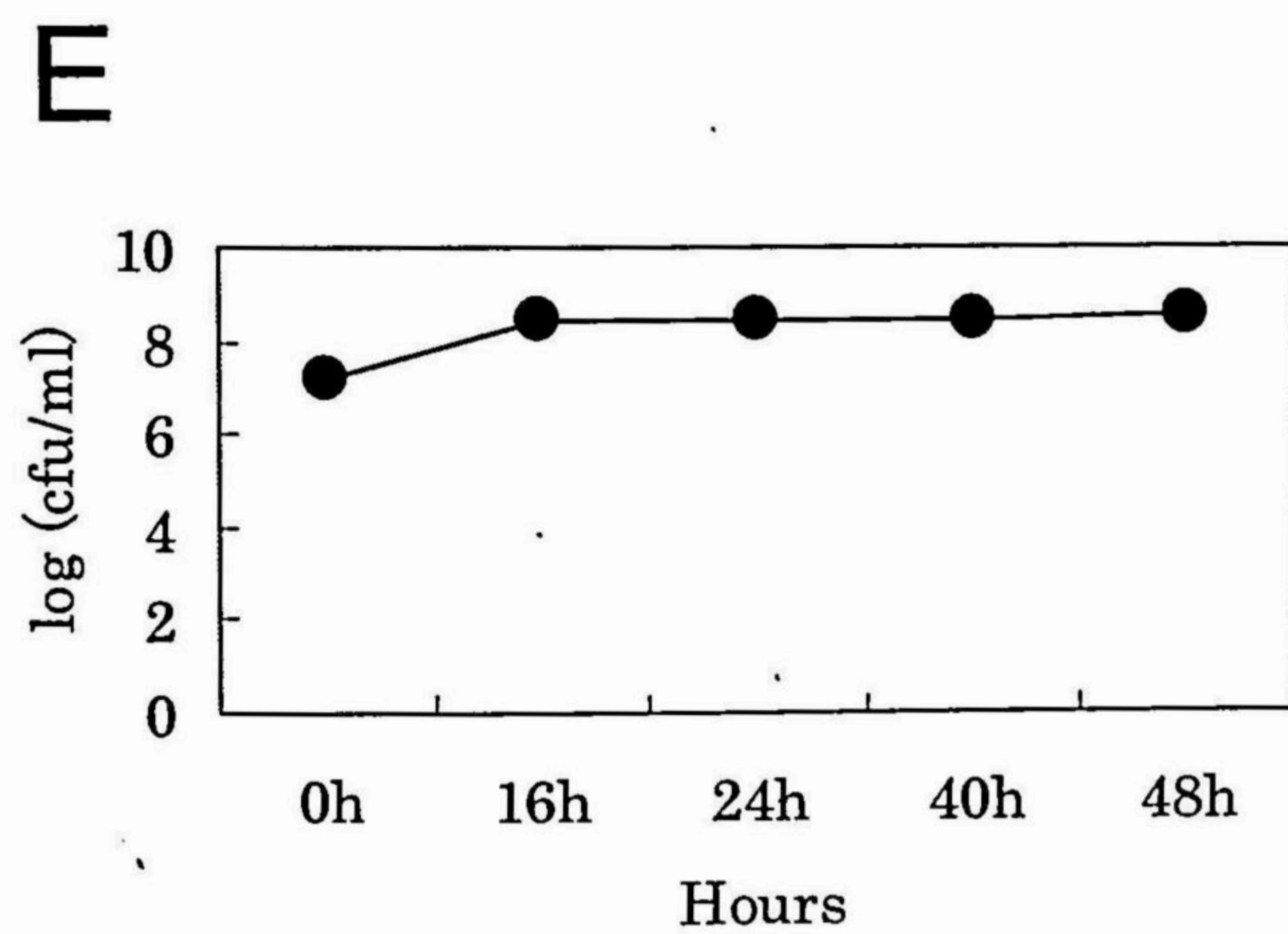
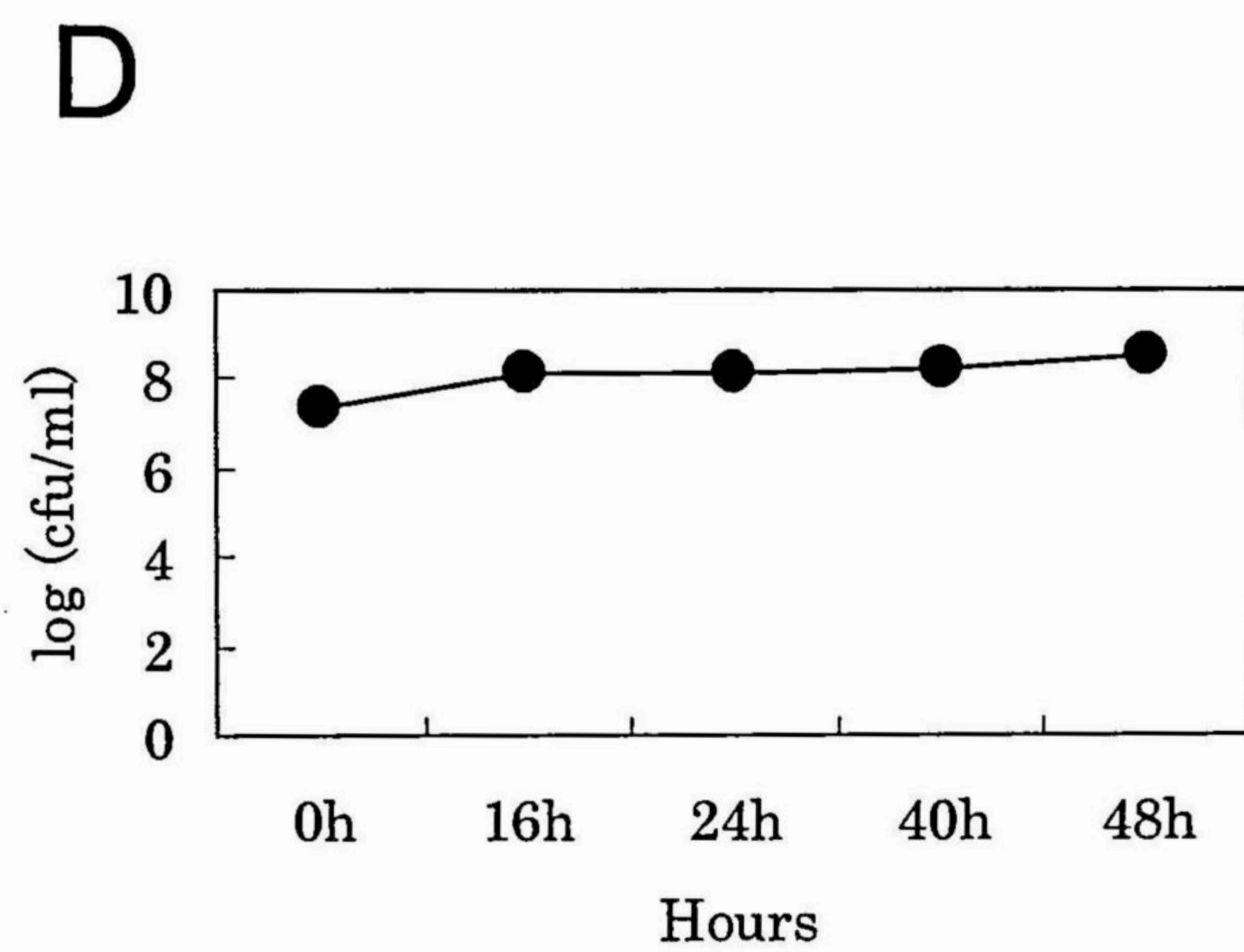
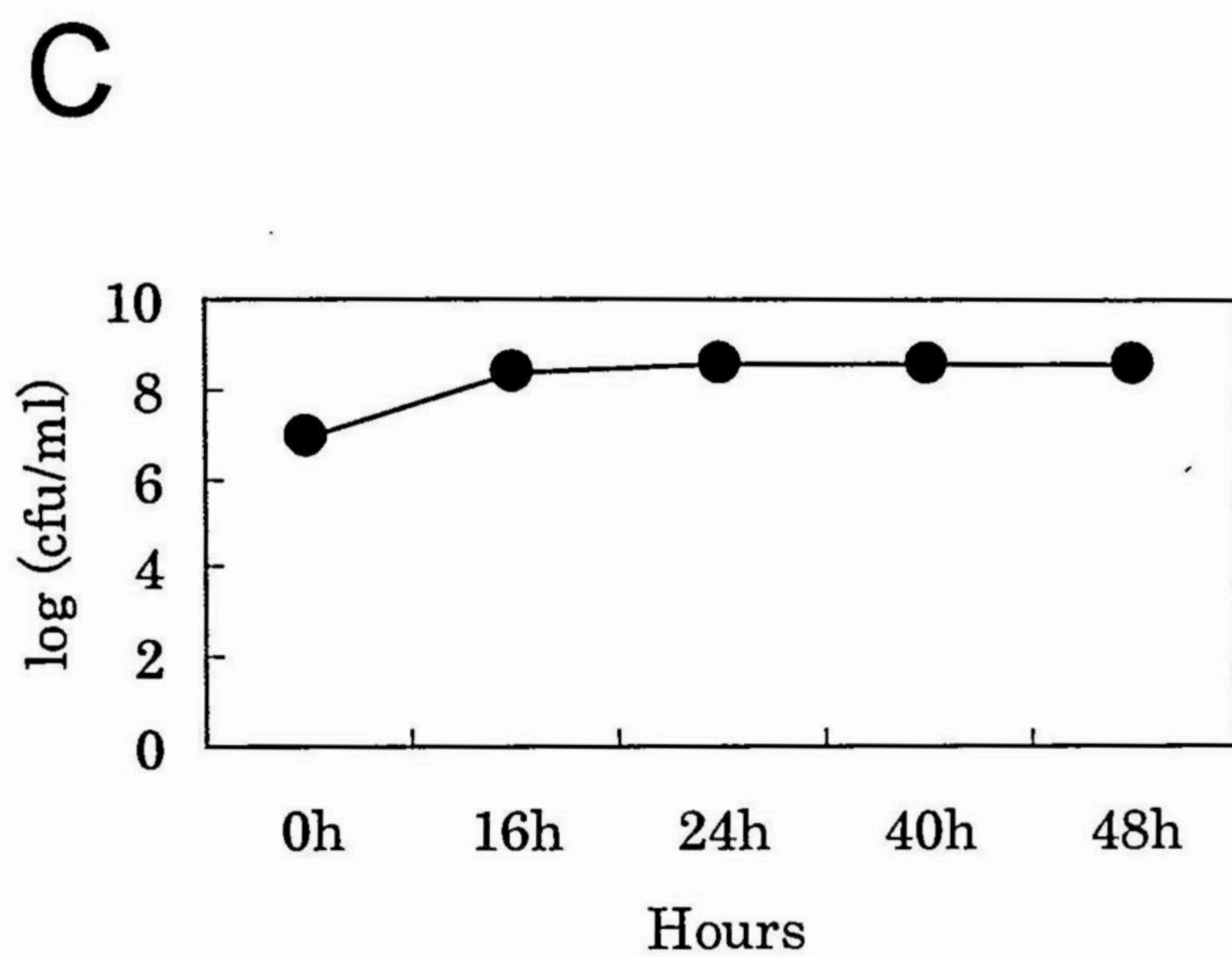
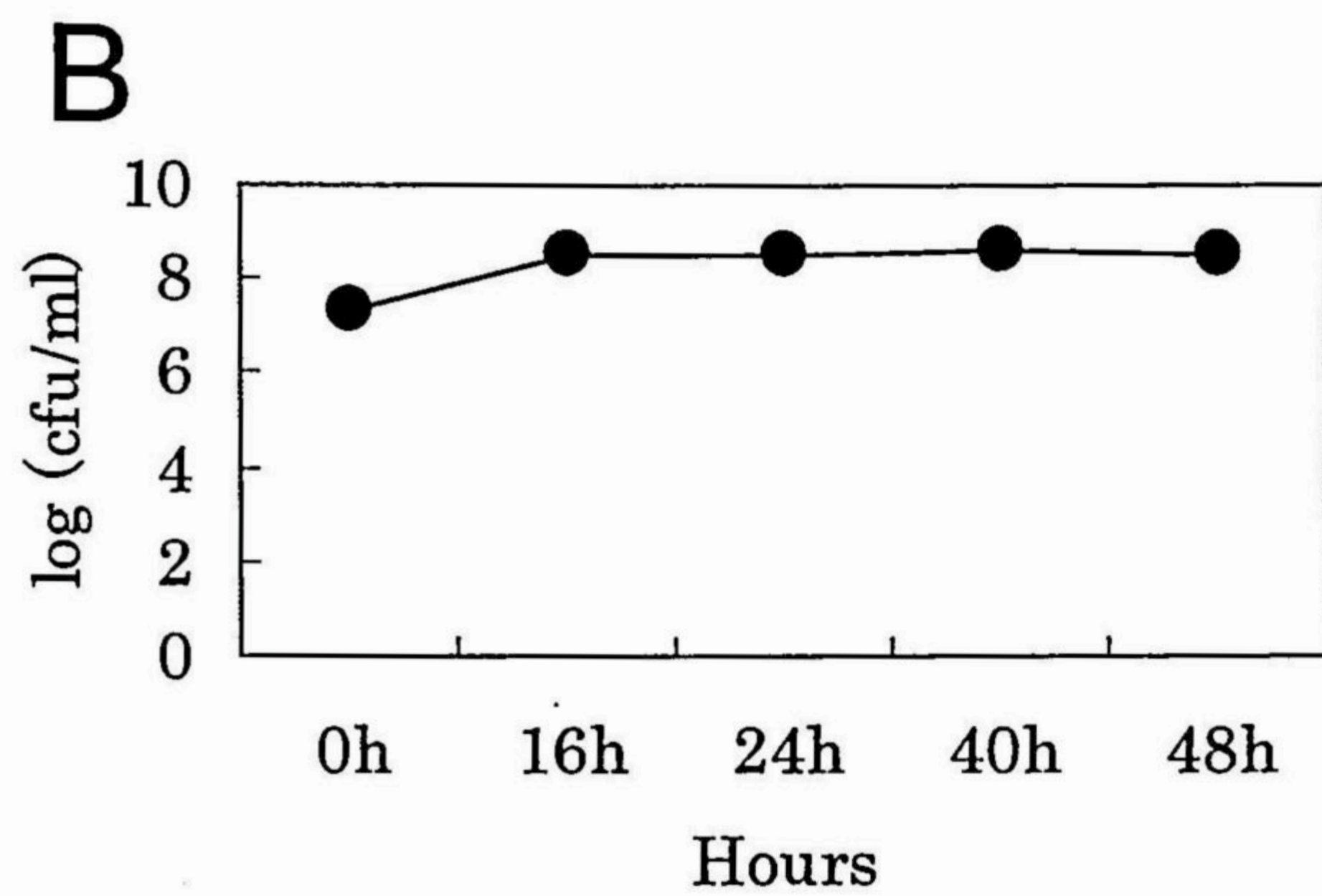
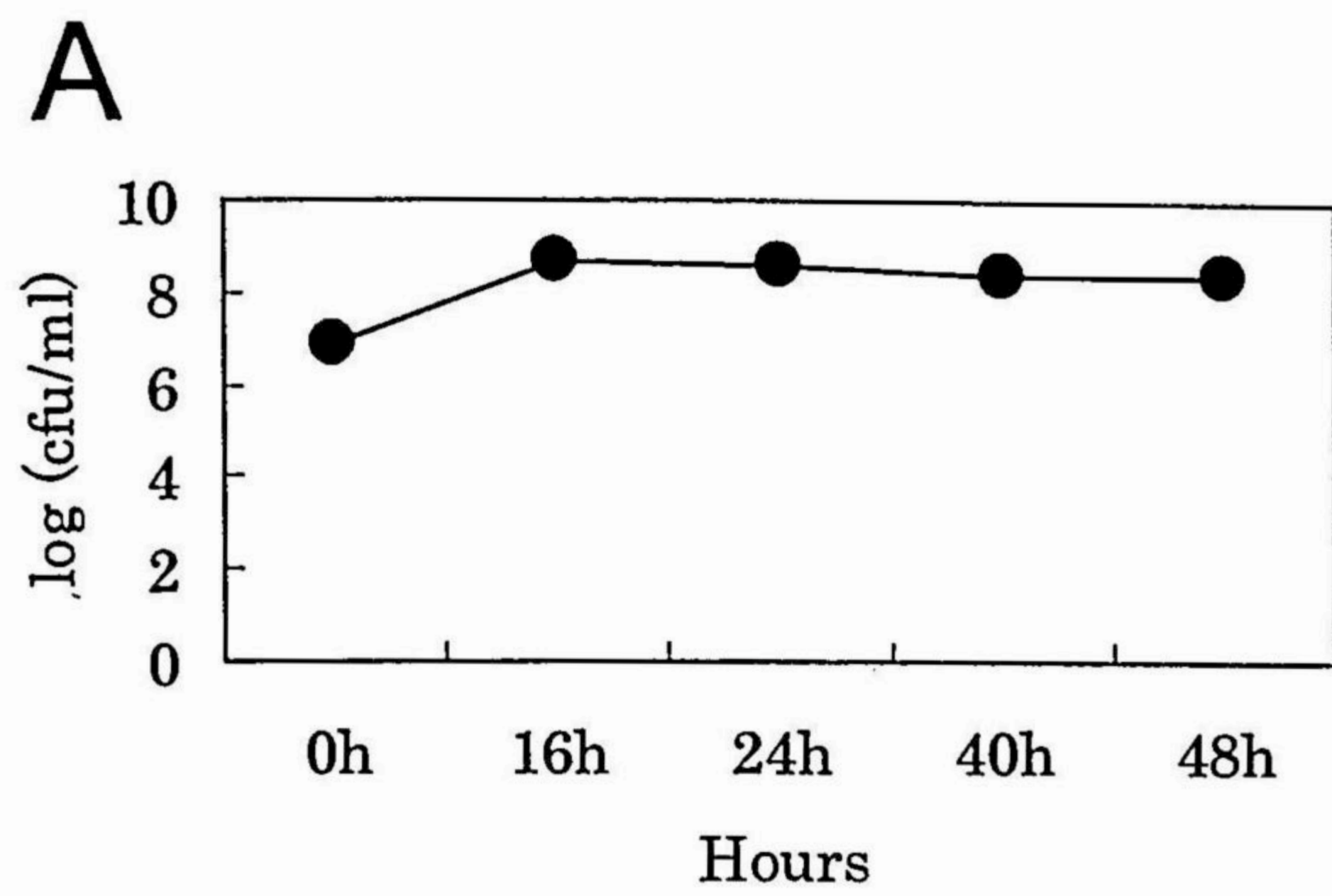


Figure 15 Growth of *L. monocytogenes* in MWB medium at 32 °C. (A) strain No. 4, (B) strain No. 18, (C) strain No. 48, (D) ATCC19115, (E) strain No. 64.

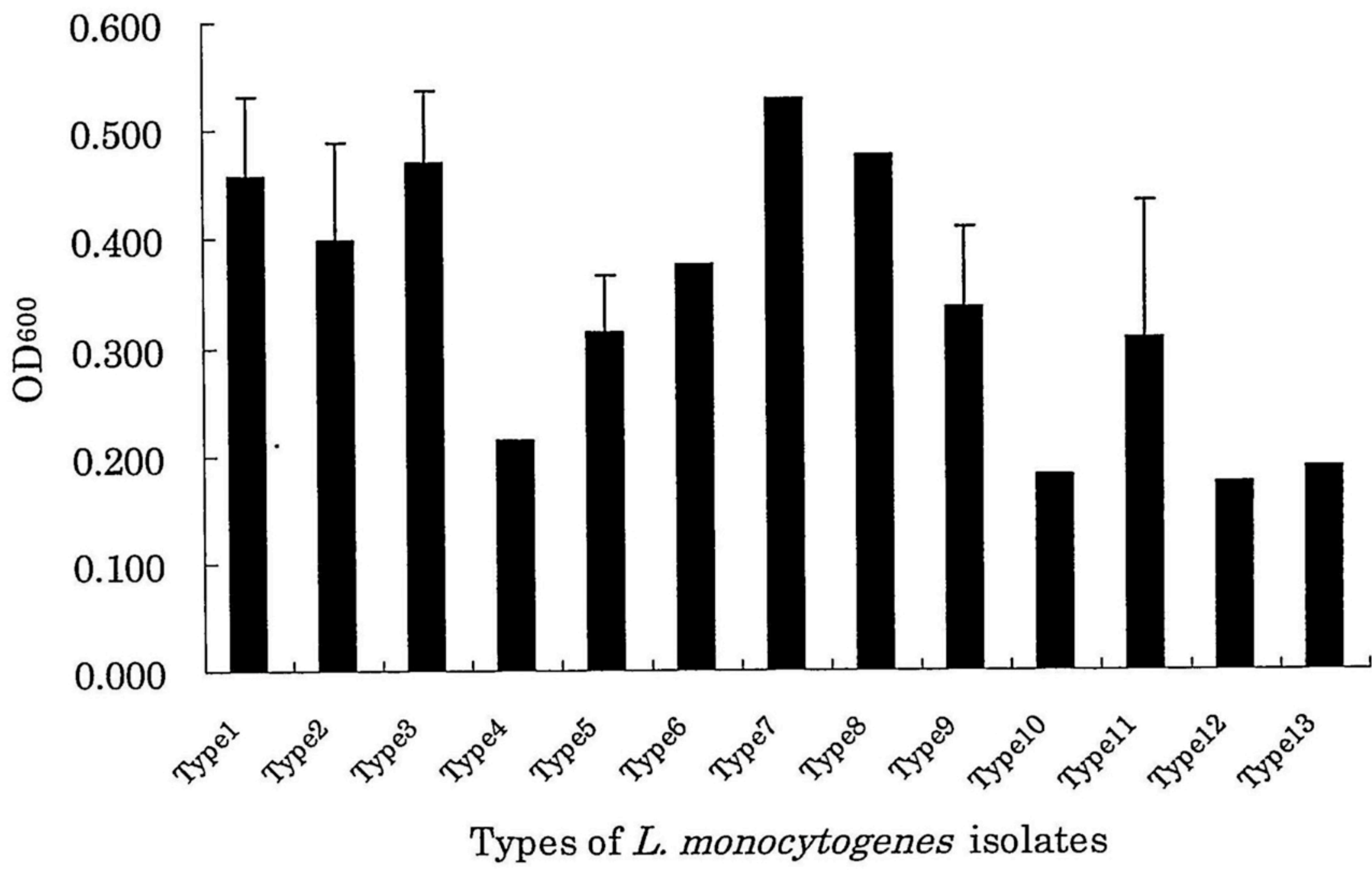
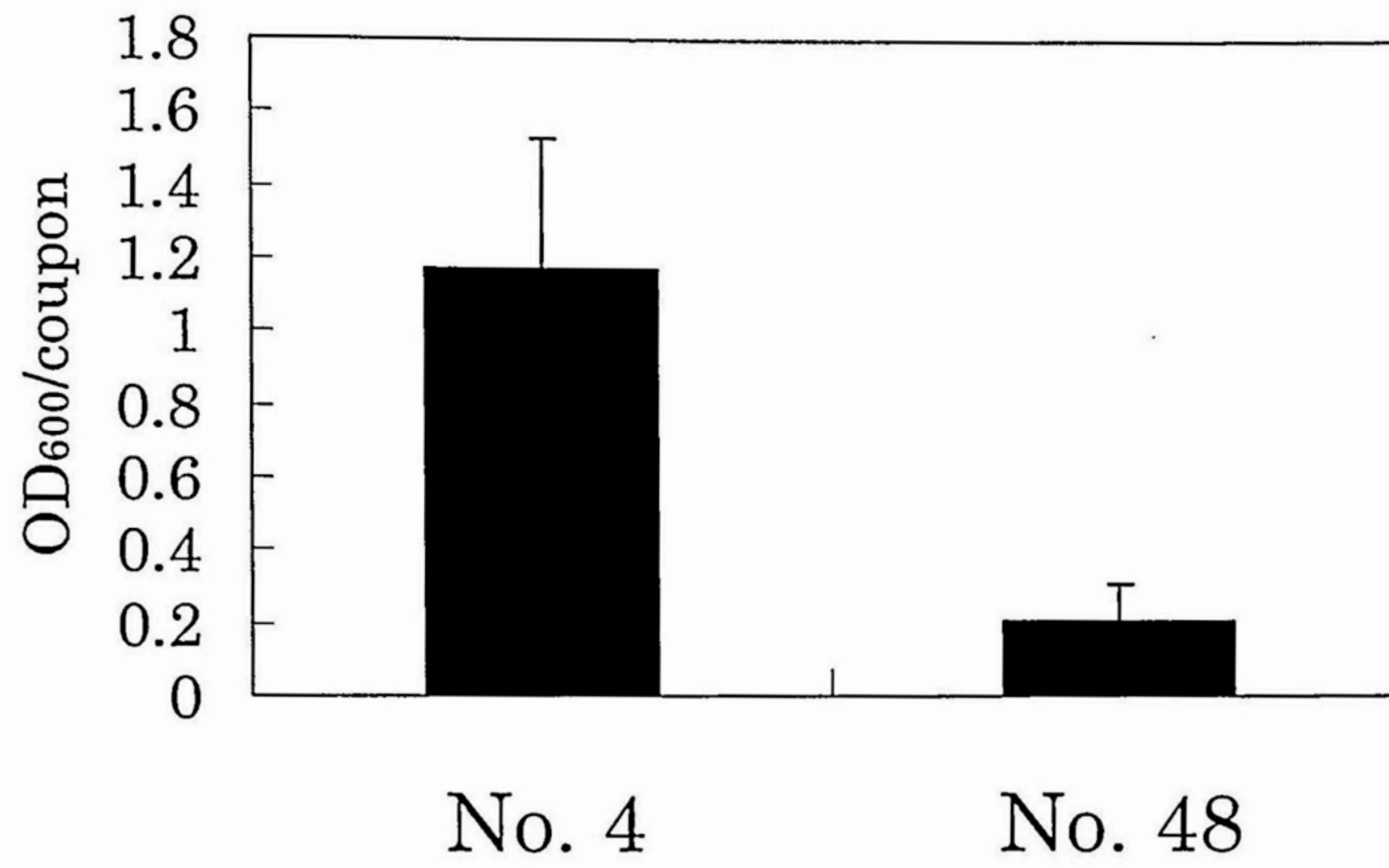


Figure 16 OD<sub>600</sub> of *L. monocytogenes* based on a crystal violet destaining biofilm assay.

A



B

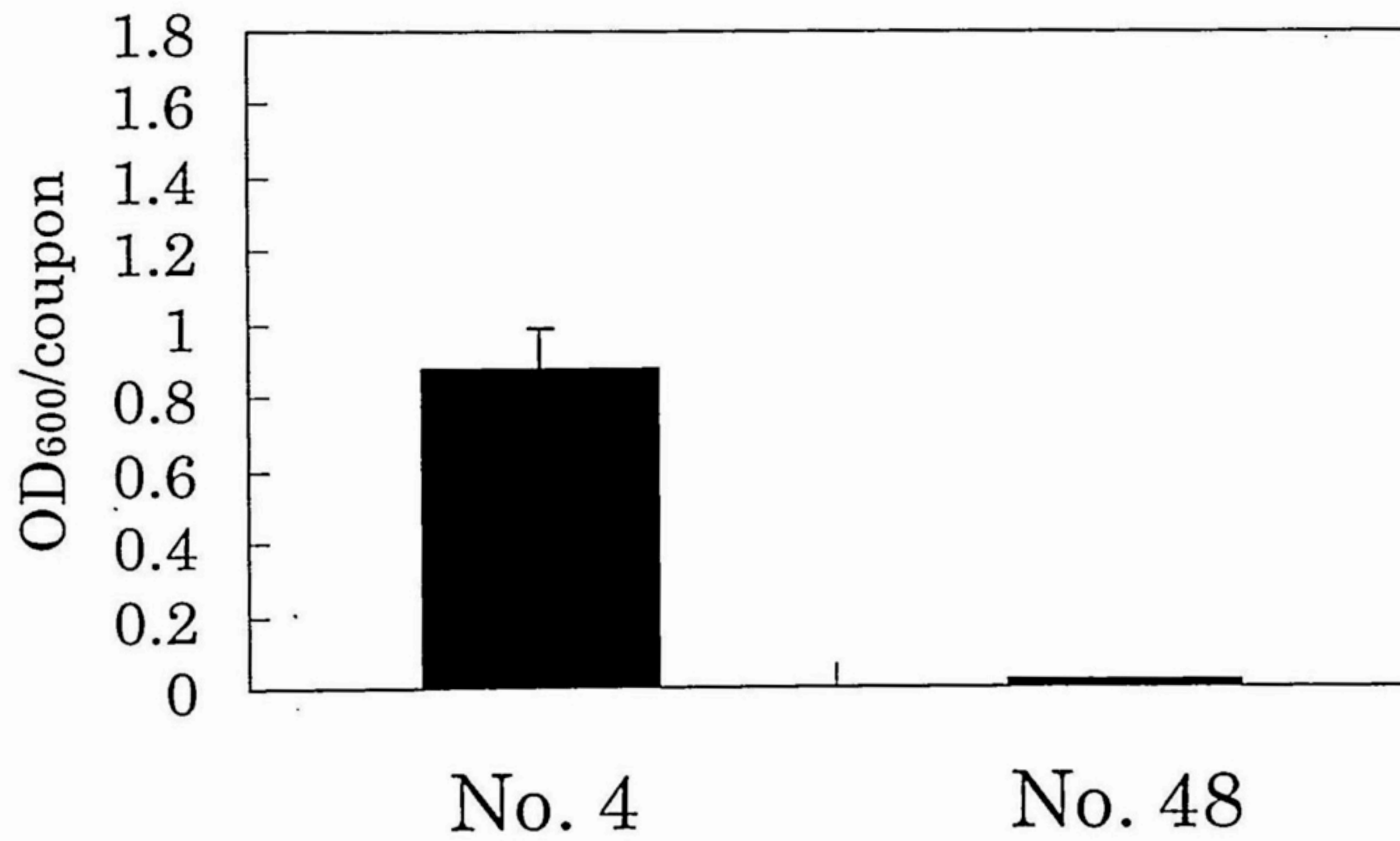


Figure 17 Biofilm quantities on stainless steel or glass coupon of *L. monocytogenes* strain No. 4 and No. 48 based on a crystal violet destaining biofilm assay. (A) Stainless steel coupon. (B) Glass coupon.

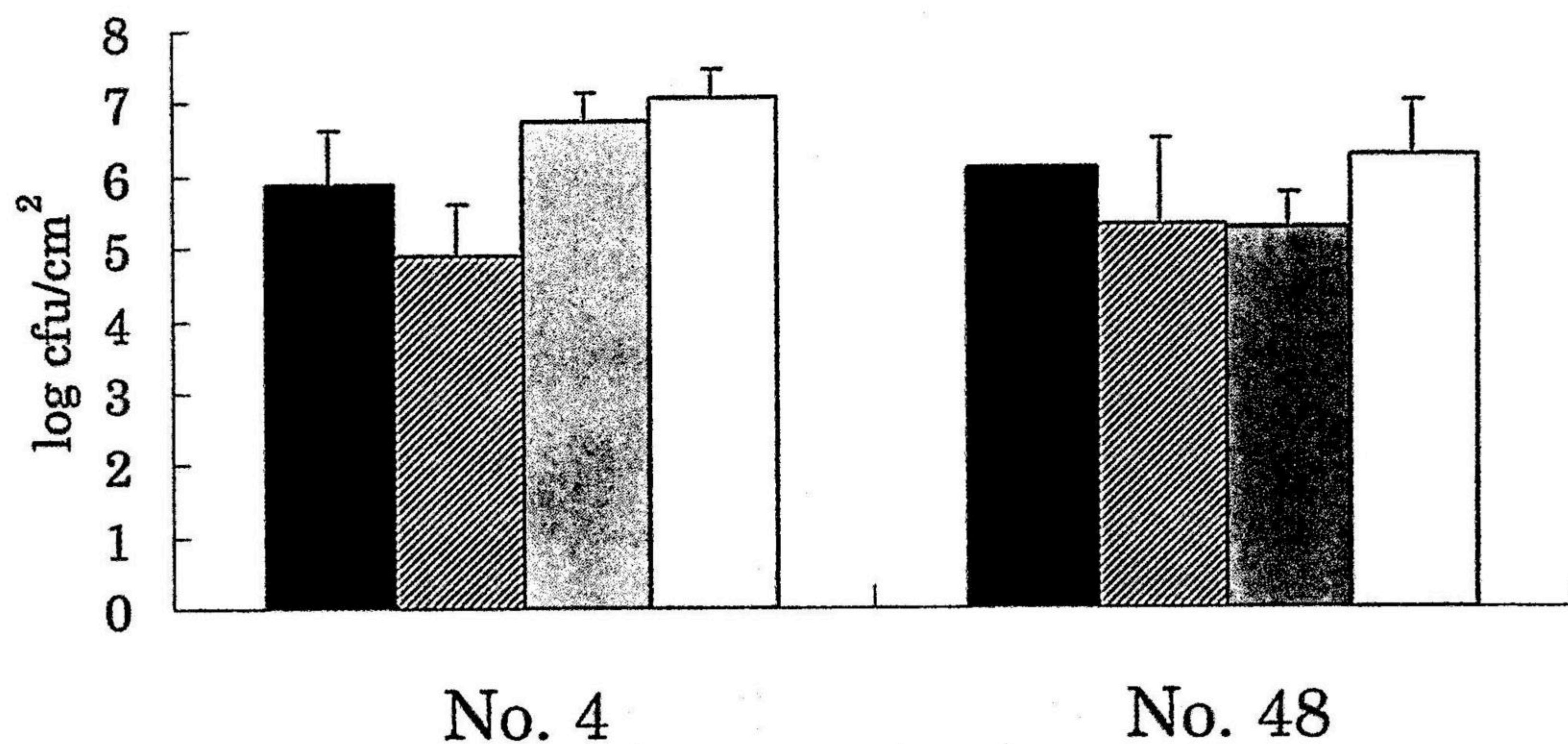


Figure 18 Sessile cell enumerations of *L. monocytogenes* strain No. 4 and No. 48 after two dislodging treatments on stainless steel and glass coupon. The black bar represents swab treatments on stainless steel coupon, the hatched bar represents glassbeads treatments on stainless steel coupon, the gray bar represents swab treatments on glass coupon, and the white bar represents glassbeads treatments on glass coupon.



#### 4. 考察

*L. monocytogenes* にバイオフィルムを形成させるための条件検討を行った結果、今回行った方法の中では、MWB 培地で 32 °C 培養後のバイオフィルム形成が最も良好であった。Djordjevic らは<sup>81)</sup>、MWB 培地を用いて 32 °C で培養したときの *L. monocytogenes* の増殖と形成されたバイオフィルム量との相関を調べ、20 時間後の菌数 (OD 値) とバイオフィルムの形成にはわずかに相関が見られるが、40 時間後では相関がなくなると報告していることから、バイオフィルム形成を調べるための培養時間を 40 時間とした。我々の結果でも抽出された OD 値で見ると、40 時間後に形成されたバイオフィルム量はプラトーに達したことから (Fig. 14, C)、培養時間は 40 時間で問題ないと思われた。

以上の条件で、スモークサーモン製造施設から分離された *L. monocytogenes* のバイオフィルム形成について調べた結果、PVC マイクロプレート上に形成されたバイオフィルムには、菌株間で差が見られた。タイプ別で比較すると、タイプ 1, 2, 3, 7 および 8 の菌株のバイオフィルム量が他のタイプに比べて高い傾向を示した。これらのうちタイプ 7 および 8 は 1 株ずつしか検出されていないが、タイプ 1 および 2 は、当該施設の persistent strain と考えられた菌株であり、特に、タイプ 1 は 1999 年から 2004 年まで 6 年間にわたって当該施設から分離されたことから、これらの株が高いバイオフィルム形成能を示したことは、その施設内定着性を考える上で興味深い。

実際の施設内環境を想定し、基材として PVC の代わりにステンレスおよびガラスクーポンを用いて形成されたバイオフィルム量を測定したが、マイクロプレートを用いた場合と同様の傾向を示した。ステンレスおよびガラスクーポン表面に付着した菌数を測定した結果、ステンレスにはスワブ法、ガラスにはガラスビーズ法を用いた場合の菌数が高い傾向を示したが、いずれの方法を用いた場合も、また、いずれのクーポン上でも単位面積当たりの菌数に大きな差は認められなかった。Lindsay ら<sup>82)</sup>も、ステンレス表面に付着した菌を剥がしとる方法の検討を行い、いずれの方法でも菌数に差は認められないと報告している。

抽出された CV 量で大きな差が認められた 2 菌株 (No. 4 および No. 48) の間で、クーポン表面に付着した菌数に差は認められなかったことから、菌体外に分泌される

EPS の産生量に株間で違いがあることが示唆された。菌株 No. 4 は、当該施設の *persistent strain* と考えられるタイプ 1 で、ステンレス製のスライサーの刃から分離された株であった。本菌株が、その高い EPS 産生能によってスライサーでバイオフィルムを形成し、除去されずに残っていた可能性も考えられ、菌の施設内定着と EPS 産生能の関連を示唆しており興味深い。今後は、物理的・化学的あるいは生物学的ストレスに対する *persistent strain* の耐性と EPS の関連をさらに探求する予定である。

## 5. 小括

*Listeria monocytogenes* のバイオフィルム形成条件の検討を行った結果、MWB 培地を用いて 32 °C で 40 時間培養したときに形成されるバイオフィルム量が最も多かった。この条件で、スモークサーモン製造施設由来の *L. monocytogenes* のバイオフィルム形成について調べたところ、菌株間で形成されるバイオフィルム量に差が認められた。タイプ別に比較すると、施設から高頻度に分離されるタイプの *L. monocytogenes* のバイオフィルム量は高い傾向が認められた。ステンレスおよびガラスクーポン表面に形成されるバイオフィルム量およびクーポン表面の付着菌数を調べたところ、バイオフィルム量には菌株間の差が認められたが、付着菌数に顕著な差が認められなかったことから、菌体外に分泌される複合多糖類の産生量に株間で違いがあることが示唆された。複合多糖類の産生量の多い *L. monocytogenes* は施設内から除去されにくい傾向があると考えられる。

## 総括

近年、食中毒の原因究明には、患者および食品から病原体を検出して分離・同定するのみならず、分離された菌株間の異同を識別するため、分子生物学的手法を用いた型別が行われるようになった。感染症あるいは食中毒の原因菌を型別する目的は、集団発生の有無の特定あるいは感染ルートや感染源の特定を行うためである。また、食品やその周囲の環境から分離される病原体の型別は、食品が媒介する疾病のリスク査定のために不可欠である。分子生物学的手法は、従来の表現型を利用した型別法に比べて、識別能力が優れていることはもとより、容易であること、多検体の処理が可能であること、コストが安いこと、正確性、といった利点を有している。このような分子生物学的手法によって、これまで以上に菌株間のより詳細な解析が可能となった。疫学調査に分子生物学的手法を応用する際には、使用者はまずこれらの手法を実際の事例に適用し、型別法の評価を行うことが求められる。分子生物学的手法を用いた型別法は、実際の事例に適用されることによって経験的に発展を遂げると考えられる。

本研究は、細菌性食中毒の原因菌である *Clostridium perfringens* および *Listeria monocytogenes* に注目して、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を主とした種々の分子生物学的手法を、実際の食中毒事例の原因究明や食品への汚染源の探索に適用した。その結果、以下のことが明らかとなり、これらの手法の有用性が示された。

第1章では、大阪市内で発生した実際の食中毒事例から分離された *C. perfringens* の型別に PFGE 法の応用を試みた。その結果、PFGE 法は *C. perfringens* 食中毒の疫学マーカーとして血清型別試験と同程度あるいはそれ以上の識別能を有することが明らかとなった。特に、本法は既存の型別血清に該当しない菌株の型別に有用であった。次に、増菌培養法と PFGE 法の併用の可能性について検討した。*C. perfringens* はヒトの腸内に常在することから、本菌を食中毒の原因微生物と断定するには、患者糞便中に正常範囲を逸脱した多数の本菌芽胞を検出することが前提とされる。しかしながら、発病後3日を過ぎると患者便中の芽胞数は急減するため、急性期の患者便が入手できなければ、*C. perfringens* による食中毒と判定することはこれまで困難であった。今回、疫学的に *C. perfringens* が食中毒の原因微生物として疑われながらも発病後の日時が経過したために患者便からの菌検出が困難であった1事例において、増

菌培養法を適用したところ 83 名中 54 名から毒素産生性の *C. perfringens* を分離できた。従来であれば、これら分離菌株が原因菌であるか常在菌であるか識別できなかったが、PFGE 法を適用したところ、これら分離株の 75% が同一型であることが明らかになり、本事件を *C. perfringens* による食中毒と判断する根拠を得ることができた。以上のように、PFGE 法は *C. perfringens* 食中毒の疫学解析に極めて有効な分子生物学的手法であり、従前の定説を覆し、PFGE 法を適用すれば本菌の分離に増菌培養法の利用も可能であることを明らかにした。

第 1 章で分子生物学的手法の有用性が示されたことから、第 2 章では、PFGE 法のみならず PCR 法を用いた種々の分子生物学的手法を *L. monocytogenes* による食品汚染実態調査に適用した。市販の ready-to-eat 水産加工品 95 検体を調べ、12 検体 (13%) から本菌が検出された。12 検体は全てスモークサーモン等の冷燻製品であった。また、12 検体中 9 検体が 6 月から 9 月に採取された検体であり、気温と汚染率の関係が示唆された。最確数法で食品中の *L. monocytogenes* 菌数を測定した結果、25 g あたり <3.0 から 1100 であり、ヨーロッパの規制値である 1 g あたり 100 を超えるものはなかった。しかしながら、分離株は 5 種類の病原遺伝子を全て保有しており、その血清型も 1/2a, 4b などヒトへの病原性を有するタイプであった。

分離株を PFGE 法と AP-PCR 法, REP-PCR 法, ERIC-PCR 法を用いて型別したところ、5 パターンに分類された。これらの遺伝子型は汚染品を製造していた各施設に特有であり、同一製造元由来の製品から分離されるリステリアは、検体や検体採取日が異なる場合でも同一の血清型および遺伝子型を示す傾向が認められた。一方、施設が異なる場合は分離株の血清型が同一であっても遺伝子型は各々異なっており、菌株の識別に有用と判断された。

以上の調査を通じ、製品汚染率が特に高く、特定のリステリア菌株による長期的な施設汚染が疑われる一水産加工場が認められた。そこで第 3 章では、同施設内のリステリア汚染状況を把握するとともに、リステリアの型別にも有効であった分子生物学的手法を応用して、施設内分離菌株と製品由来株間の異同を識別し、リステリアの汚染源および汚染経路の推察に応用した。15 回の調査で 430 検体を工場内から採取し、リステリアの検索を行った結果、56 検体 (13.0%) から本菌が検出された。施設内のリステリア検出率は、夏季に高くなる傾向が認められ、製品についても夏季から秋季に採取した製品からは検出されたが、冬季から春季の製品ではリステリアは検出され

なかった。製造機器，特にスライサーからのリステリアの検出時期は製品と一致し，夏季から秋季に高い傾向を示した。特にスライサーに残されたサーモン端材における本菌検出率は高く 25%に達しており，製品の汚染場所としてスライサーが強く示唆された。施設内から分離されたリステリア菌株をサーモン端材に添加した結果，リステリアは 24 時間で 6.3 から 7.6 log CFU/g に増殖できることが明らかになった。

56 検体から検出されたリステリア 77 株を型別したところ，計 13 タイプに分類された。そのうち 53 株 (68.8%) がタイプ 1, 2 および 11 に分類された。タイプ 1 および 11 は製品からも分離され，その検出率は夏季から秋季にかけて増加した。タイプ 2 は同工場内において優勢なタイプであったにもかかわらず，製品からは分離されず，冬季によく検出される傾向があった。以上の結果から，同施設には主にタイプ 1 および 11 のリステリアが定着し，夏季にスライサーを中心とする製造機器を汚染することで，製品を高率かつ継続的に汚染していたと推察された。スライサーを中心に洗浄消毒などの衛生管理を指導したところ，製品の汚染もほとんど消失した。

第 4 章では，タイプ 1 および 11 のリステリアが同製造施設に定着した理由を調べるため，そのステンレスやプラスチックおよびガラス表面への同菌の定着性とバイオフィーム形成能を調べた。施設内から分離された 77 株のリステリアについてバイオフィーム形成能を調べた結果，タイプ 1, 2, 3, 7 および 8 の菌株が産生するバイオフィーム量が高い傾向が認められた。施設から高頻度に分離され，製品汚染を継続してきたタイプ 1 および 2 はバイオフィーム形成能が高かったことから，食品製造施設の衛生管理には対象菌株の定着性をも考慮する必要があると考えられる。

以上，*C. perfringens* および *L. monocytogenes* を対象として，その疫学解析における分子生物学的手法の有用性を検討した。*C. perfringens* の病因学的解析においては，PFGE 法を併用することで増菌培養による検査が可能になり，検出率を改善できることを初めて明らかにした。*L. monocytogenes* については ready-to-eat 水産加工品の汚染実態を調べ，その高い汚染状況を明らかにするとともに，汚染源および汚染経路の究明において分子生物学的手法による菌株識別が極めて有効であることを示し，調査結果に基づく指導により製品の汚染率を低減できた。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始適切な御指導、御鞭撻を賜りました、大阪市立大学大学院生活科学研究科長寿社会総合科学講座の西川禎一教授に心より深謝致します。

本論文の作成にあたり、貴重な御助言をいただきました、大阪市立大学大学院生活科学研究科の曾根良昭教授、小西洋太郎教授に心より感謝致します。

大阪市立大学生活科学研究科食健康科学講座の畑中美穂氏、長尾美登理氏、越智桂子氏、得田佑香氏、園 歩美氏、小山知香氏をはじめとする講座の皆様には、*L. monocytogenes* の調査および研究において大変お世話になりました。心より感謝致します。

大阪市立環境科学研究所微生物保健課の小笠原準研究主任には、*C. perfringens* 食中毒の PFGE 解析で大変お世話になりました。ここに深謝致します。

東京都立衛生研究所（現東京都健康安全研究センター）の門間千枝先生には、*C. perfringens* 食中毒の血清型別試験で大変お世話になりました。心より感謝致します。

最後に、本研究の遂行にあたり、ご理解とご協力をいただいた大阪市立環境科学研究所微生物保健課の春木孝祐課長、石井當次課長をはじめとする課員の皆様に感謝致します。

## 参考文献

- 1) 本田武司: 4章 わが国では食中毒として扱われない食水媒介性腸管感染症. 食中毒学入門. pp. 97-117. 大阪大学出版会, 大阪 (1995).
- 2) 厚生省生活衛生局長: 食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行について. 平成11年12月28日, 生衛発第1836号. (1999)
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課. (2005) 平成16年食中毒発生状況. *食品衛生研究*. 55: 77-164.
- 4) 満田年男: 第13章 経口感染: 食中毒原因菌と PulseNet. 感染対策のための分子疫学入門. pp. 161-75. メディカ出版, 大阪 (2002).
- 5) Tsuji, H., and Hamada, K. (1999) Outbreak of salmonellosis caused by ingestion of cuttlefish chips contaminated by both *Salmonella* Chester and *Salmonella* Oranienburg. *Jpn. J. Infect. Dis.* 52: 138-9.
- 6) Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Tamura, K., and Watanabe, H. (1999) Detection of a multi-prefectural *E. coli* O157:H7 outbreak caused by contaminated Ikura-Sushi ingestion. *Jpn. J. Infect. Dis.* 52: 52-3.
- 7) 石川和彦, 林 賢一, 梅原成子, 山田和枝, 杉山信子, 児玉弘美, 橋本信代, 安田和彦. (2001) ビーフ角切りステーキを原因とした散在的集団食中毒事例-滋賀県. *病原微生物検出情報*. 22: 166-7.
- 8) 満田年男 (2002) 第1章 分子疫学的解析の基礎. 感染対策のための分子疫学入門. pp. 2-11. メディカ出版, 大阪 (2002).
- 9) 小林一寛: C 疫学マーカー 新訂食水系感染症と細菌性食中毒. 坂崎利一編, pp. 35-46. 中央法規出版, 東京 (2000).
- 10) Tenover, F. C., Arbeit, R., Archer, G., Biddle, J., Byrne, S., Goering, R., Hancock, G., Hebert, G. A., Hill, B., Hollis, R. (1994) Comparison of traditional and molecular methods of typing isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 32: 407-15.
- 11) Riley, L. W.: 2 Laboratory methods used for strain typing of pathogens: Conventional and molecular techniques *Molecular Epidemiology*. pp. 29-62. ASM Press, Washington, D. C. (2004)
- 12) Smith, H. R., Rowe, B., Adak, G. K., and Reilly, W. J.: Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* in the United Kingdom. *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. Kaper, J. B., and O'Brien, A. D. (ed.). pp. 49-58. ASM Press, Washington, D. C. (2004)



- 13) 満田年男 (2002) 第2章 細菌の各種型別法. 感染対策のための分子疫学入門. pp. 12-29. メディカ出版, 大阪 (2002).
- 14) Riley, L. W.: 3 Laboratory methods used for strain typing of pathogens: PCR-based strain-typing methods *Molecular Epidemiology*. pp. 63-89. ASM Press, Washington, D. C. (2004)
- 15) Holmberg, S. D., Wachsmuth, I. K., Hickman-Brenner, F. W., and Cohen, M. L. (1984) Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella* Typhimurium isolates from outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* **19**: 100-4.
- 16) Sambrook, J., and Russell, D. W.: Pulsed-field gel electrophoresis. *Molecular Cloning*. pp. 5.55-60. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. (2001)
- 17) 渡辺治雄, 寺嶋淳, 泉谷秀昌 (2002) パルスネットの構築: 細菌の DNA 解析に基づいた分子疫学的ネットワークシステム. *食品衛生研究*. **52**: 7-13.
- 18) 林哲也: ゲノム解読・ゲノム比較から見えてくる細菌の病原性と多様性. わかる実験医学シリーズ ウイルス・細菌と感染症がわかる. 吉開泰信編, pp. 107-13. 羊土社, 東京 (2003)
- 19) 植村興: 10 *Clostridium perfringens*. 新訂食水系感染症と細菌性食中毒. 坂崎利一編, pp. 396-412. 中央法規出版, 東京 (2000).
- 20) 櫻井純: 病原性細菌 イラストレイテッド微生物学. pp. 87-198. 南山堂, 東京 (1993)
- 21) 堀口安彦 (2002) 下痢原性細菌毒素の戦略-細菌毒素はいかにして腸管上皮細胞の選択的イオン透過性を破壊するか-. *医学のあゆみ*. **201**: 1227-32.
- 22) Brynestad, S., and Granum, P. E. (2002) *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int. J. Food Microbiol.* **74**: 195-202.
- 23) 植村興: 12 ウェルシュ菌. 食品衛生検査指針 (微生物編). 厚生労働省監修. pp. 297-306. 日本食品衛生協会, 東京 (2004)
- 24) 門間千枝, 柳川義勢 (2001) 感染症の話 ウェルシュ菌感染症. IDWR. [http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k01\\_g1/k01\\_07/k01\\_7.html](http://idsc.nih.go.jp/idwr/kansen/k01_g1/k01_07/k01_7.html)
- 25) 大阪市健康福祉局. (2005) 第4章食品衛生 第2節食中毒. 健康福祉統計集 (事業編). 206-11.
- 26) McClane, B. A.: *Clostridium perfringens*. *Food Microbiology Fundamentals and frontiers*. M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.). pp. 305-26. ASM Press, Washington, D. C. (1997)
- 27) 上野一恵監修 (1997) 微生物検査マニュアル-臨床嫌気性菌検査法'97-. *日本臨床微生物学雑誌*. **7**: S1-77-81.

- 28) 門間千枝, 柳川義勢, 楠 淳, 甲斐明美, 新垣正夫, 尾畑浩魅, 伊藤武, 太田建爾, 工藤泰雄 (1994) ヒトふん便から分離された耐熱性芽胞形成ウェルシュ菌の血清型とエンテロトキシン産生性について. *東京都立衛生研究所研究年報*. 45: 11-5.
- 29) 砂川紘之, 武士甲一, 亀山邦男, 安藤芳明 (1987) 健康人ふん便からのウェルシュ菌の検出と分離菌のエンテロトキシン産生性及びその芽胞の発芽性. *食品衛生学雑誌*. 28: 119-24.
- 30) 伊藤武 (1972) 耐熱性ウェルシュ菌の健康人における分布および血清学的型別とそれに起因する食中毒に関する研究. *東京都立衛生研究所研究年報*. 34: 7-39.
- 31) Saito, M. (1990) Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, foods, and the natural environment in Japan. *J. Food Prot.* 53: 115-8.
- 32) 伊藤武, 植村興, 坂井千三: 8 ウェルシュ菌 食中毒 II. 坂崎利一編. pp. 270-337. 中央法規出版, 東京 (1983)
- 33) Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., and Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-9.
- 34) 門間千枝 (1998) 新しいエンテロトキシンを産生すると推定されるウェルシュ菌による食中毒事例-東京都. *病原微生物検出情報*. 19: 228-9.
- 35) Ridell, J., Bjorkroth, J., Eisgruber, H., Schalch, B., Stolle, A., and Korkeala, H. (1998) Prevalence of the enterotoxin gene and clonality of *Clostridium perfringens* strains associated with food-poisoning outbreaks. *J. Food Prot.* 61: 240-3.
- 36) Maslanka, S. E., Kerr, J. G., Williams, G., Barbaree, J. M., Carson, L. A., Miller, J. M., and Swaminathan, B. (1999) Molecular subtyping of *Clostridium perfringens* by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2209-14.
- 37) Saito, M. (1991) Excretion of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens* in feces by patients during and after diarrhea. *Kansenshogaku Zasshi*. 65: 571-6.
- 38) Setlow, P., and Johnson, E. A.: Spores and their significance. *Food Microbiology Fundamentals and frontiers*. M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.). pp: 30-65. ASM Press, Washington, D. C. (1997)
- 39) Wada, A., Masuda, Y., Fukayama, M., Hatakeyama, T., Yanagawa, Y., Watanabe, H., and Inamatsu, T. (1996) Nosocomial diarrhoea in the elderly due to enterotoxigenic *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Immunol.* 40: 767-71.

- 40) 丸山務, 小久保彌太郎: 11 *Listeria monocytogenes*. 新訂食水系感染症と細菌性食中毒. 坂崎利一編, pp. 413-35. 中央法規出版, 東京 (2000).
- 41) 仲真晶子 (2000) 海外での食品媒介リステリア症とリステリア汚染防止対策の現状. *食品衛生学雑誌*. 41: J271-6.
- 42) Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S., and Igimi, S. (2004) Nationwide survey of human *Listeria monocytogenes* infection in Japan. *Epidemiol. Infect.* 132: 769-72.
- 43) Makino, S. I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S., and Igimi, S. (2005) An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 189-96.
- 44) Kathariou, S. (2002) *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food Prot.* 65: 1811-29.
- 45) Graves, L. M., Swaminathan, B., and Hunter, S. B.: Subtyping *Listeria monocytogenes*. *Listeria, listeriosis, and food safety*. E. T. Ryser, and E. H. Marth (ed.). pp. 279-97. Mercel Dekker, Inc. New York (1999)
- 46) Rocourt, J, and Cossart, P.: *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville (ed.). pp. 337-352. ASM Press, Washington, D. C. (1997)
- 47) National Center for Infectious Diseases. (2005) Listeriosis. CDC homepage. [http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis\\_g.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_g.htm)
- 48) Ryser, E. T.: Foodborne listeriosis. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. E. T. Ryser, and E. H. Marth (ed.). pp. 299-358. Mercel Dekker, Inc. New York (1999)
- 49) Dalton, C. B., Austin, C. C., Sobel, J., Hayes, P. S., Bibb, W. F., Graves, L. M., Swaminathan, B., Proctor, M. E., and Griffin, P. M. (1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* 336: 100-5.
- 50) Aureli, P., Fiorucci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., and Salmaso, S. (2000) An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.* 342: 1236-41.
- 51) 光山正雄 (2002) リステリアの宿主認識・細胞内動態と宿主サイトカイン応答. *細胞工学*. 21: 170-6.
- 52) Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, K. L., Brondum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V., and Reingold, A. L. (1985) Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.* 312: 404-7.
- 53) Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.

- W., Yonekura, M. L., Hayes, P., Weaver, R., and et al. (1988) Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N. Engl. J. Med.* **319**: 823-8.
- 54) Bula, C. J., Bille, J., and Glauser, M. P. (1995) An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clin. Infect. Dis.* **20**: 66-72.
- 55) Salvat, G., Toquin, M. T., Michel, Y., and Colin, P. (1995) Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. *Int. J. Food Microbiol.* **25**: 75-81.
- 56) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課長: ソフト及びセミソフト・タイプのナチュラル・チーズのリステリア菌汚染防止について. 昭和 63 年 2 月 2 日, 衛乳第 3 号. (1988).
- 57) Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M., and Tauxe, R. V. (1999) Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**: 607-25.
- 58) Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S., and Igimi, S. (2004) Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* **93**: 131-40.
- 59) Rocourt, J., Jacquet, C., and Reilly, A. (2000) Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. Food Microbiol.* **62**: 197-209.
- 60) Beumer, R. R., Te Giffel, M. C., and Cox, L. J. (1997) Optimization of haemolysis in enhanced haemolysis agar (EHA) – a selective medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* **24**: 421-5.
- 61) Nishibori, T., Cooray, K., Xiong, H., Kawamura, I., Fujita, M., and Mitsuyama, M. (1995) Correlation between the presence of virulence-associated genes as determined by PCR and actual virulence to mice in various strains of *Listeria* spp. *Microbiol. Immunol.* **39**: 343-9.
- 62) 得田佑香. (2005) スモークサーモン製造工場の *Listeria monocytogenes* 汚染状況と分離株の細菌学的特性について. pp. 4-42. (卒業論文).
- 63) Hara Y., Izumisawa M., Ishii K., Abe A., Ohashi E., and Maruyama T. (2003) Contamination of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat seafoods in Japan. *Jpn. J. Food Microbiol.* **20**: 63-7.
- 64) Ericsson, H., Eklow, A., Danielsson-Tham, M. L., Loncarevic, S., Mentzing, L. O., Persson, I., Unnerstad, H., and Tham, W. (1997) An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2904-7.
- 65) Miettinen, M. K., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Bjorkroth, K. J., and Korkeala, H. J. (1999) Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J.*

- Clin. Microbiol.* 37: 2358-60.
- 66) Brett, M. S., Short, P., and McLauchlin, J. (1998) A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* 43: 223-9.
  - 67) Dauphin, G., Ragimbeau, C., and Malle, P. (2001) Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 51-61.
  - 68) Lunden, J. M., Autio, T. J., Sjoberg, A. M., and Korkeala, H. J. (2003) Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *J. Food Prot.* 66: 2062-9.
  - 69) Miettinen, M. K., Bjorkroth, K. J., and Korkeala, H. J. (1999) Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 46: 187-92.
  - 70) Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., and Rorvik, L. M. (2000) Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 62: 57-63.
  - 71) Norwood, D. E., and Gilmour, A. (1999) Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *J. Appl. Microbiol.* 86: 576-82.
  - 72) Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., and Call, D. R. (2003) Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7336-42.
  - 73) Border, P. M., Howard, J. J., Plastow, G. S., and Siggins, K. W. (1990) Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 11: 158-62.
  - 74) Vogel, B. F., Huss, H. H., Ojeniyi, B., Ahrens, P., and Gram, L. (2001) Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2586-95.
  - 75) Hoffman, A. D., Gall, K. L., Norton, D. M., and Wiedmann, M. (2003) *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish. *J. Food Prot.* 66: 52-60.
  - 76) Lappi, V. R., Thimothe, J., Nightingale, K. K., Gall, K., Scott, V. N., and Wiedmann, M. (2004) Longitudinal studies on *Listeria* in smoked fish plants: impact of intervention strategies on contamination patterns. *J. Food Prot.* 67: 2500-14.
  - 77) Thimothe, J., Nightingale, K. K., Gall, K., Scott, V. N., and Wiedmann, M. (2004) Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. *J. Food Prot.*

67: 328-41.

- 78) Lou, Y., and Yousef, A. E.: Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors *Listeria*, listeriosis, and food safety. E. T. Ryser, and E. H. Marth (ed.). pp. 195-8. Mercel Dekker, Inc. New York (1999)
- 79) Donlan, R. M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 881-90.
- 80) Premaratne, R. J., Lin, W. J., and Johnson, E. A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3046-8.
- 81) Djordjevic, D., Wiedmann, M., and McLandsborough, L. A. (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2950-8.
- 82) Lindsay, D., and von Holy, A. (1997) Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiol.* 14: 383-90.

1. Nakamura, H., Ogasawara, J., Monma, C., Hase, A., Suzuki, H., Kai, A., Haruki, K., and Nishikawa, Y. (2003) Usefulness of a combination of pulsed-field gel electrophoresis and enrichment culture in laboratory investigation of a foodborne outbreak due to *Clostridium perfringens*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47: 471-5.
2. Nakamura, H., Hatanaka, M., Ochi, K., Nagao, M., Ogasawara, J., Hase, A., Kitase, T., Haruki, K., and Nishikawa, Y. (2004) *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 323-8.
3. Nakamura, H., Tokuda, Y., Sono, A., Koyama, T., Ogasawara, J., Hase, A., Haruki, K., and Nishikawa, Y. (2006) Molecular typing to trace *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish to a contamination source in a processing plant. *J. Food Prot.* (in press)

本論文に直接関係する報告書

1. 中村寛海, 小笠原準, 長谷 篤. (2002) 大阪市内で分離されたウェルシュ菌のパルスフィールド電気泳動法による解析. 平成 13 年度厚生科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 総括・分担研究報告書 パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) の標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究. 136-40.
2. 中村寛海, 小笠原準, 長谷 篤. (2003) ウェルシュ菌食中毒事例のパルスフィールド電気泳動法を用いた解析. 平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 総括・分担研究報告書 パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) の標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究. 169-74.
3. 中村寛海, 小笠原準, 長谷 篤. (2004) 市販のスモークサーモンから分離された *Listeria monocytogenes* のパルスフィールド電気泳動法を用いた解析. 平成 15 年度厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 総括・分担研究報告書 パルスフィールドゲル電気泳動法 (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE) の標準化及び画像診断を基盤とした分散型システムの有効性に関する研究. 105-10.
4. 中村寛海, 北瀬照代, 長谷 篤 (2004) 平成 15 年度大阪市健康福祉局生活衛生課特別調査研究報告書. 動物性加工食品のリステリア汚染調査.
5. 中村寛海, 北瀬照代, 長谷 篤 (2005) 平成 16 年度大阪市健康福祉局生活衛生課特別調査研究報告書. 動物性加工食品のリステリア汚染調査 水産加工品中でのリステリアの消長について.
6. 中村寛海. (2005) Ready-to-eat水産加工品から分離された *Listeria monocytogenes* (リステリア) の解析. 第11回「地域保健福祉研究助成」第13回「ボランティア活動助成」報告集. 財団法人大同生命厚生事業団. 86-91.