総 説

食品媒介リステリア症と 食品製造施設のリステリア汚染 —リステリアの施設定着株を取り巻く話題—

Foodborne Listeriosis and *Listeria monocytogenes* Contamination in the Food Processing Plants —Current Topics of *Listeria monocytogenes* Persistent Strains—

中 村 寛 海

(大阪市立環境科学研究所)

Hiromi NAKAMURA

(Department of Microbiology, Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences,
8-34 Tojo-cho, Tennoji-ku, Osaka 543-0026)

1. はじめに

Listeria monocytogenes (以下, リステリア) は, 古くから人畜共通感染症の原因菌として知られていたが, リステリア症に罹った動物に直接接触したヒト以外の症例はほとんどないと考えられていた⁶¹⁾. リステリア症が食品媒介であると認識されるようになったのは, 1981年にカナダのNova Scotiaで発生したコールスローサラダを原因食とする大規模な食品媒介リステリア症の集団発生事例以降である. この事例では, サラダの材料であるキャベツがリステリア症のヒツジの糞便に汚染されていた. 以後, 欧米において主にナチュラルチーズを原因食品とするリステリア症が相次いで発生し, リステリア症は食品媒介感染症であるとの認識が一般的になった.

リステリア属菌は通性嫌気性グラム陽性の短桿菌で芽胞および莢膜を有しない. 4, 5本の周毛性鞭毛によって運動性を示し, 半流動培地上ではumbrella growthと呼ばれる特徴的な傘状の発育を示す.

リステリア属菌に含まれる菌種はこれまで6菌種(*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*)であった. 2010年に新たに2菌種(*L. marthii*, *L. rocourtiae*)^{22, 42)}が追加され, その後, 2013年に1菌種(*L. weihenstephanensis*)⁴⁰⁾, 2014年3月に5菌種(*L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, and *L. grandensis*)¹²⁾, 10月にさらに2菌種(*L.*

booriae and *L. newyorkensis*)^{12, 80)}が追加されて現在は16菌種となっている.

リステリアは加熱に弱く, 70℃ 1分という通常の加熱処理で容易に死滅する. しかしながら, 増殖可能な温度域は-0.4~45℃, pH域は4.4~9.4と広く, 増殖可能な水分活性は0.92であり, これは食塩濃度として11.5%に相当する. 一般的な食中毒菌に比べて高い耐酸性, 耐塩性を有するとともに, 冷蔵庫内の温度で増殖することから, 一度食品を汚染すると制御が困難である^{29, 76)} (表1).

食品を介してリステリア症を引き起こすのは現在のところ*L. monocytogenes* 1菌種のみと考えられている. リステリア症の原因食品としては, Ready-to-eat (RTE) 食品と呼ばれる, そのままで喫食可能な加熱調理済み食品によるものが最も多い. RTE食品とはCodex委員会の作成したガイドラインによると, 「一般に, 生食用の食品の他, リステリア属菌の殺菌処理をさらに行うことなく飲食可能な形へと処理, 加工, 混合, 加熱またはその他の方法で調理されたすべての食品」と定義されている¹¹⁾.

リステリア症は日和見感染症であり, 健康な成人には

表1. *Listeria monocytogenes* の増殖条件^{29, 76)}

項目	最小値	至適	最大値
温度(℃)	-0.4	37	45
pH	4.4	7.0	9.4
水分活性	0.92	—	—

*1 〒543-0026 大阪市天王寺区東上町8-34

生菌を大量 (10^7 cfu 以上)⁷⁶⁾ に摂取した場合に胃腸炎症状を呈する程度である (非侵襲性リステリア症)。一方、妊婦、新生児、免疫抑制者、HIV 患者、高齢者など感受性の高いグループには少量の菌摂取で感染し、発症した場合の致死率が高い (侵襲性リステリア症)⁵⁰⁾。Scallan らは、米国では毎年 1,455 名が入院し、255 名 (15.9%) が死亡すると推計している⁷⁰⁾。リステリア症事例における汚染源の検討結果や食品由来株の解析結果から、本菌は原材料から持ち込まれるというよりはむしろ製造・加工工程で食品を汚染していると考えられている^{77, 81)}。

本稿では、国内外の食品媒介リステリア症事例 (散発事例も含む) と食品製造施設の施設定着株 (persistent strain) に着目し、最新の知見を紹介する。

2. 国内外のリステリア症発生動向

リステリア症は、主に先進国において散発あるいは集団事例が毎年のように発生している。発症までの潜伏期間が 1 週間から 2 カ月と長いことから¹⁶⁾、原因食品の同定が困難であるが、リステリア症の原因の 99% は食品が媒介していると報告されている⁷⁰⁾。

2000 年以降に発生した食品媒介リステリア症事例 (患者数 10 名以上) を表 2 にまとめた。1999 年以前については過去の総説⁵⁴⁾ を参照されたい。

わが国では 2001 年に発生したチーズによる 1 事例のみであるが⁴⁸⁾、欧米では 10 名以上の集団事例はほぼ毎年発生している。フランスではリステリア症の発生数は 1990~2000 年の人口 100 万人あたり 4.5 人から、2001~2003 年には 3.5 人に減少した。これは、食品媒介リステリア症集団事例の発生を受けて、食品業界がリステリア

制御対策を講じたためであろうと考えられている。しかしながら、2006 年には、リステリア症の集団事例が見られないにもかかわらず、再び人口 100 万人あたり 4.7 人に増加した。疫学調査の結果、妊婦や 60 歳未満の患者の増加は見られず、60 歳以上、特に 70 歳以上の患者が増加したが、その原因は不明としている²¹⁾。他のヨーロッパ各国でも同時期に同じような現象が見られ、イングランドとウェールズ地方¹⁸⁾、スペイン⁵³⁾、デンマーク³⁹⁾、ドイツにおいても妊婦のリステリア症は増加せず、高齢者と一部の免疫抑制者のリステリア症が増加しているが、フランスの例と同様、これらの原因はよくわかっていない。オーストラリアでも同様に 80 歳以上のリステリア症患者が増加している⁶⁶⁾。わが国でもリステリア症患者は 1 歳未満および 61 歳以上が約 64% を占めており、死亡例はすべて 60 歳以上であった⁶³⁾。

ヒトのリステリア症から検出される血清型の中では 4b, 1/2a, 1/2b が最も多く、90% 以上を占める^{36, 76)}。食品から検出される血清型は 1/2a, 1/2b, 1/2c が多い^{55, 76)}。2000 年以降の集団事例 (患者数 10 名以上) を見ると、原因菌の血清型が判明した事例のうちでは 1/2a によるものが最も多くなっている (表 2)。

3. リステリアの食品への汚染経路

リステリアは環境中に広く存在し、さまざまな食品および食品製造環境中から検出される⁵⁵⁾。2008 年のカナダのデリミートを原因とするリステリア症事例では、汚染した食品を提供した会社の調査により、患者と PFGE パターンが一致するリステリアが工場のスライサーから検出され、スライサーを介した汚染が疑われている³⁸⁾。

表 2. 食品媒介リステリア症の主な集団発生事例 (2000 年以降)*

年	月	発生国	患者数	死者数	%	原因食品	血清型
2000 年	5 月	アメリカ (New York など 10 州)	30	7	23.3	調理済み七面鳥 (デリターキーミート)	1/2a
2000-1 年	10 月	アメリカ (North Carolina)	12	5	41.7	メキシカンスタイルチーズ (ソフトタイプチーズ)	—
2001 年		アメリカ (Los Angeles)	16	0	0	加熱調理済み七面鳥 (スライス)	1/2a
2001 年		日本	38	0	0	ソフト、セミハードタイプチーズ	1/2b
2002 年		アメリカ (北東部の 8 州)	54	8	14.8	調理済み七面鳥	—
2002 年		カナダ (Quebec)	17	0	0	ソフト、セミハードタイプチーズ	—
2002 年		カナダ	47	—	—	チーズ (低温殺菌乳使用)	—
2002 年		カナダ	86	—	—	チーズ (低温殺菌乳使用)	—
2003 年		イギリス	17	0	0	バター	4b
2005 年		スイス	12	3	25	チーズなどの乳製品	1/2a
2006 年		チェコ	20-30	—	—	チーズ、ミックスサラダ	1/2b
2006-7 年		ドイツ	189	27	14.3	殺菌乳から製造した酸性カードチーズ	4b ほか
2008 年	8 月	カナダ	57	23	40.4	デリミート	1/2a
2009 年	8 月	オーストラリア・ドイツ・チェコ	34	8	23.5	酸チーズ	1/2a
2011 年	9 月	アメリカ (Colorado)	147	33	22.4	カンタローブメロン	1/2a, 1/2b
2012 年	9 月	アメリカ (California など 14 州)	22	4	18.2	ナチュラルチーズ (リコッタサラータチーズ)	—
2014 年	6 月	デンマーク	41	17	41.5	冷製肉 (Cold cuts)	—
2014 年	10 月	アメリカ (Arizona など 12 州)	35	7	20	キャラメルリング	—

—: データなし

* 患者数 10 名以上の事例

施設定着株の関与が示唆される事例を太字で示した。

表3. リステリアの施設定着株に関する調査¹⁶⁾

カテゴリー	食品製造施設の 種類	国名	製造 施設数	分離菌株数 (施設定着株数)*1	施設定着株を 定義付けするための サブタイピング法*2	施設定着株が 検出された期間	分離株の由来	報告年
乳・乳製品	牛乳 (酪農場)	北アイルランド	4; 3	62 (32); 16 (14)	MEE, PFGE, 血清型別	1-6 カ月	生乳	1994
	チーズ	スカンジナビア	1	10 (10)	PFGE, 血清型別	7 年	洗浄水, チーズ, 環境	1996
	アイスクリーム	フィンランド	1	41 (26)	PFGE, 血清型別	7 年	製造環境, 製造機器 (特に包装機器), アイスクリーム	1999
	ラテン式フレッシュ チーズ	アメリカ	3(1)	80 (20, 3)	リボタイピング, 病原遺伝子のアレル (<i>actA</i> , <i>hly</i>)	6 カ月	環境 (排水, 床), 食品が接する表面 (プラスチック製の接続チューブ, 調理台), 最終製品	2004
	チーズ	アイルランド	16	13 施設がリステリア汚染, うち 2施設で施設定着株が分離された (NA)*3	PFGE, 血清型別	6-20 カ月	チーズと製造環境	2011
水産加工品	サーモン (加工場および スモークハウス)	ノルウェー	1	82 (63)	MEE, 血清型別	8 カ月	製造環境, 加工途中の魚, 真空パックのスモークサーモン	1995
	魚	フィンランド	1	33 (19)	PFGE, 血清型別	14 カ月	塩漬け機, 皮むき機, スライサー; 包装室; 最終製品	1999
	サーモン (加工場および スモークハウス)	ノルウェー	3	50 (50), 23 (19), 23 (17)	MEE, REA	9-21 カ月	RTE水産品, 生鮮水産品, 製造環境, 海水, かもめ, 輸送ターミナル	2000
	スモークサーモン (冷くん)	フランス	1	95 (65)	PFGE, 血清型別	2 カ月	環境サンプル, 清掃・消毒後の環境, 加工途中のサーモン, 最終製品	2001
	スモークした魚	アメリカ	3	22 (8), 16 (4), 47 (23)	リボタイピング (自動)	4-6 カ月	環境サンプル, 加工途中のサンプル, 生の魚, 最終製品	2001
	スモークサーモン (冷くん)	デンマーク	2	263 (147), 58 (48)	RAPD, PFGE, AFLP	4 年; 5 カ月	食品接触表面, 製造環境, 最終製品	2001
	スモークした魚	アメリカ	1	NA (全株の うちの 32.1%)	リボタイピング (自動)	4 カ月	生の魚, 環境サンプル	2003
	魚	ポーランド	1	71 (5, 5, 24)	RAPD, PFGE	8-10 カ月	最終製品, サーモンフィレ, 真空パックのスモークサーモン	2003
	スモークした魚 (RTE)	アメリカ	4	88 (5, 16, 5, 25, 15), 24 (12, 2), 50 (32), 10 (0)	<i>EcoRI</i> ribotyping	2 年 (調査期間)	原材料, 食品接触表面, 従業員が接する表面, 食品に接触しない表面, 最終製品	2004
	皮むき調理済みエビ	アイスランド	2	106 (63), 66 (43)	PFGE, 血清型別	1 から 3 年以上	原材料, エビの殻, 清掃後および加工途中の輸送器および製造機器, 加工途中の床, 施設外の環境	2006
	スモークハウス (魚)	デンマーク	1	43 (25)	RAPD, AFLP	1 年半	原材料, 原材料取り扱い区域, スライスする区域, 最終製品	2006
	スモークサーモン (冷くん)	日本	1	77 (21, 20)	PFGE, RAPD, REP-PCR, ERIC-PCR, 血清型別	21 カ月 (6 年)	スライサー, 製造環境	2006
	貝	ニュージーランド	3	40 (29), 15 (11), 46 (36)	PFGE, 血清型別	6-10 カ月	貝加工環境, 生の貝, 最終製品	2011

表3. つづき

カテゴリー	食品製造施設の 種類	国名	製造 施設数	分離菌株数 (施設定着株数)*1	施設定着株を 定義付けするための サブタイピング法*2	施設定着株が 検出された期間	分離株の由来	報告年
食肉加工品	鶏肉	英国	1	289 (184, 35)	RAPD, MEE	5-6カ月	生の鶏肉, 原材料を取扱う環境, 調理済みの鶏肉を加工する環境	1995
	肉	ノルウェー	1	32 (15)	MEE, RFLP	4年	製造環境, スライサーからのゴミ, cold cuts (ハム・ソーセージなど薄切り冷製肉)	1996
	豚肉と殺場および 加工場	フランス	2	287 (186, 16)	RAPD, PFGE, PCR-REA, 血清 型別	1年	枝肉, カットした豚肉, 消毒後および消毒中のと 殺場, 消毒後および消毒中のカット室, 消毒後の 冷蔵庫	1999
	七面鳥	デンマーク	1	53 (32, 15)	PFGE	2カ月	生肉, 最終製品, と殺場の清掃および消毒におけ る重要管理点(CCP), それに引き続く加工途中のラ イン	2000
	肉	スイス	1	89 (43, 26)	PFGE	2年	生ハム製造ラインにおけるスライスおよび包装エ リアの機器および設備, スライスしない生ハムの 包装エリア, 食肉加工品	2000
	鶏肉; 豚肉	フランス	1; 1	502 (188%)	PFGE, 血清型別	9カ月; 3カ月	環境, 設備, 加工途中の食肉, 清掃処理後のさま ざまなエリア	2001
	肉	アメリカ	1	NA	PFGE, 血清型別	1年	細切機, 細切ラインおよび細切した製品	2002
	鶏肉 (加工品)		1	161 (NA)	actAのシーケンスに基づく イビング	1年	環境, 環境表面および原材料	2002
	牛肉, 豚肉および鶏肉	フィンランド	3; 1	18 (11), 92 (67); 307 (278), 179 (133)	PFGE, 血清型別	3カ月以上	環境, 製造機器および最終製品	2003
	ウシのと殺場	イタリア	1	7 (7)	PFGE	16カ月	削った肉, 枝肉のふきとり水, ナイフのふき取り 水	2003
	七面鳥	米国	2	5 (4), 13 (10)	PFGE	4-10カ月	生の製品, 環境	2005
	豚と殺場および 加工場	スペイン	1	161 (85, 29, 35)	PFGE, 血清型別	1年	環境, 肉の塊, 豚ひき肉製品	2008
	鶏肉 (加工品)	アメリカ	1	NA	actAのシーケンスに基づく イビング	1-15カ月	排水, 調理済み製品	2010
	発酵ソーセージ	ポルトガル	7	240 (127)	PFGE, 血清型別	10-32カ月	最終製品	2011
その他	チルド食品	英国	5	181 (NA)	リボタイピング	8-19カ月	特定でさず (製品と環境の両方)	2004
	チルド食品のビザ, パスタおよび RTE 食品	フィンランド	1	319 (174, 76, 23, 14, 4)	AFLP, 血清型別	22カ月から 8 年	原材料, 環境, 製造機器, 製品	2007

文献16を改変して引用。

*1 () 内は施設定着株数を示す, () 内の複数の数字は, 一工場に複数の施設定着株が存在することを示す。

*2 MEE, multilocus enzyme electrophoresis; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; REA, restriction enzyme analysis; RAPD, random amplification of polymorphic DNA; AFLP, amplified fragment length polymorphism; REP-PCR, repetitive extragenic palindromic elements PCR; ERIC-PCR, enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences PCR

*3 NA: データなし

表4. 食肉・食肉加工品のリステリア汚染状況

	食品群	検査数	陽性数 (%)	処理、 加工が進むと汚染率が増加
食肉	牛肉（枝肉）	13	0 (0)	
	牛肉（ブロック）	4231	217 (5.1)	
	牛肉ミンチ	66	13 (19.7)	
	牛肉スライス	426	107 (25.1)	
	豚肉	39	1 (2.6)	
	豚肉（ブロック）	4,421	355 (8.0)	
	豚肉ミンチ	114	24 (21.1)	
	豚肉スライス	438	137 (31.3)	
食肉加工品	鶏肉	405	67 (16.5)	
	鶏肉スライス	350	140 (40.0)	
	食肉製品	212	10 (4.7)	
	生ハム	30	1 (3.3)	
	非加熱食肉製品	30	1 (3.3)	

単位: 検体

また、2010年のアメリカのカンタロープメロンの事例では、メロンを収穫後選別する工場内が高度にリステリアで汚染されており、工場内でバイオフィルムを形成していた可能性が示唆されている⁴³⁾。さまざまな食品製造施設における汚染源調査の結果、リステリアが高頻度に検出されるのは、取扱う食品の種類を問わず、原材料よりもむしろダイサー（食肉などをさいの目に切断する機械）やスライサー、包装機等の最終工程で使用される機器である（表3）。食肉の場合、リステリア検出率を比較するとミンチ肉やスライス肉など、加工工程が進むに従ってリステリア汚染率は増加する傾向にあり、製造工程での食品汚染が示唆される（表4）。

4. Persistent strain（施設定着株）とは？

‘Persistent (persistence)’という単語は多くの意味を持つ言葉であり、ヒトの体内で長期間生存し続ける「持続感染(persistent infection)」がよく知られている。定着、‘persistent (persistence)’とは、食品や食品のマトリックスでの長期にわたる細菌の生残を指す。この現象は、しばしば実験室内での培養で見られ、典型的なものは増殖を伴わない。食肉製品^{20,30)}、チーズ^{41,51)}、スモークサーモン^{23,67)}、野菜⁵⁾などでリステリアが生残し続けるという報告がある。筆者らも、スモークサーモンに比べて、たらこや辛子明太子中でリステリアの顕著な増殖は認められないが、これらの水産加工品中でリステリアは4℃で5週間保管後も生残していることを確認している⁵⁸⁾。1994年頃から、乳・乳製品、水産加工品、食肉製品等の製造施設において、食品の種類を問わずリステリアにはpersistent strainと呼ばれる施設定着株が存在することが多くの報告で示されている¹⁶⁾（表3）。リステリアは施設内のあらゆる場所（床や排水などの環境、原材料、製造機器、食品接触表面、加工途中の食品など）から検出される。特に、リステリアが高頻度に検出される食品を製造する施設において、施設内のあらゆる

場所から本菌が検出される⁵⁷⁾。リステリアの除菌には加熱処理が有効であるが、リステリアが高頻度で検出される食品は、スモークサーモンや漬物のように製造施設内の温度を上げられない（熱湯を扱うことができない）状況で製造されているものが多い⁷⁶⁾。食品製造施設内では、低温で水分が多く、有機物の汚れが存在するところからリステリアは検出される³⁷⁾。

施設定着株とは、同一製造施設で製造された製品およびその製造環境から異なる日に同一のサブタイプ（表現型あるいは遺伝子型）を示すリステリアが繰り返し検出される現象と定義されている¹⁶⁾。そのため、サブタイピング法の識別解像度が低いと混乱を生じる原因となる。すなわち、リステリアの中で遺伝子型別による識別解像度が比較的低い血清型4bについては、施設定着株と判断するのが困難となる可能性が生じる。リステリアのうち一部の菌株のみが施設に定着することができると考えられている¹⁷⁾。施設定着のために必須の遺伝子やタンパク質などの同定が試みられているが、施設への定着のしやすさを明確に定義づけるための属性（特徴）や遺伝子はまだ特定されていない。

Carpantier & Carfは施設定着株という概念は曖昧であるとし、リステリアは細菌を除去しようとする環境ストレスや洗浄・消毒および物理的な力に抵抗できる特定の“ニッチ”でコロニーを形成しているに過ぎないとしている⁸⁾。本稿では、“ニッチ”を「日常の消毒処理後であっても食品製造施設内で微生物が存在できる、消毒処理が行き届かない場所」と定義する¹⁶⁾。このように現在のところはまだ施設に定着しやすい特異な性質を有するリステリアが存在するのかどうか結論は出ていない。

一方で、施設定着株が食品を介してリステリア症を引き起こしている可能性が示されており、次章でこのような施設定着株の関与が示唆されるリステリア症事例（散发例も含む）のいくつかを紹介する。

5. 施設定着株の関与が示唆される 食品媒介リステリア症

米国の食肉加工品製造施設におけるリステリア症

1988年に米国で発生した散発のリステリア症はテキサス州で製造されたターキーフランクが原因食品であった²⁾。12年後の2000年に同じく米国で11州にまたがって発生したデリターキーミートを原因とする事例（表2中太字で示す）は、原因食品が1988年のリステリア症と同じ施設で製造されていることがわかった⁶⁴⁾。ヒトおよび原因食品由来株をPFGE法やリボタイピング法で比較したところ、これらはすべて一致し、原因となるリステリアは12年間同じ製造施設に定着していた可能性が考えられた。1988年と2000年のヒトおよび原因食品由来株各1株ずつについてゲノム比較解析を行った結果、驚くべきことにこれらのゲノムは12年を経てもほとんど変化しておらず、プロフェージ2カ所のみの変異であった¹⁹⁾。当該製造施設のリステリアはゲノムを多様化させることも、他のリステリアに取って代わられることもなく長期間存在し続けたということになる。

国内で発生した国産ナチュラルチーズを原因とするリステリア症事例⁴⁸⁾

2001年にナチュラルチーズを原因とするわが国最初のリステリア症事例が発生した（表2中太字で示す）。チーズのリステリア汚染菌量は高く、患者の主症状は胃腸炎症状であり、死者はなかった。発端は国産のナチュラルチーズからリステリア（血清型1/2b）が検出されたことによる。同じ工場で生産されているチーズおよび製造環境の調査を実施した結果、チーズ19サンプル中15サンプル（最高で100 gあたり 4.6×10^9 MPN値）から同じ血清型1/2bのリステリアが検出された。製造施設の環境由来サンプル67のうち12サンプルからもリステリアが検出された。この期間中にチーズを喫食した33名中19名の糞便からチーズと同じ血清型1/2bのリステリアが検出された。当該チーズは殺菌乳を原料としていたことから、本事例は加工途中でチーズがリステリアに汚染されたことにより発生したと推察された。また、原因となるチーズは2001年の1月8日に製造されたが、同じ血清型を示すリステリアは5月にサンプリングした製造施設の環境からも多数分離されていることから、施設内に定着していた株が製造工程でチーズを汚染した可能性が考えられる。

フィンランドにおける水産加工品によるリステリア症の増加⁵⁹⁾

2010年にフィンランドでリステリア症が増加した。1995～2009年に発生したリステリア症は一年間に約36名（平均18～51名／年）であったが、2010年は一年間に71名で約2倍となった。分離菌株の中に特定のPFGEパターン（profile 96および62）を示すものがあり、profile 96は分離株のうち5分の1を占めていた。調査の

結果、profile 96を示すリステリアが検出された患者のうち2名が特定の水産加工品製造施設で作られたgravad（スカンジナビア料理の一種で、マリネ風にサーモンをスパイスや酢に漬ける調理法）サーモンを食べていることが判明した。profile 96を示すリステリアは2008および2009年にも本施設で製造された製品から検出されており、profile 96は定着株の可能性があると考えられた。profile 62が検出された患者は全員が特定の水産加工品製造施設で製造された真空包装のgravadサーモンを食べていることがわかった。患者宅に残されていた残品から検出されたリステリアはすべてprofile 62であり、患者由来株とPFGEパターンが一致した。

一方、2010年の食品由来リステリア菌株の解析を行った結果、分離菌株の半数（323株中162株）が特定の水産加工品製造施設（2施設）で製造された食品であることがわかった。製造施設の洗浄・消毒を徹底した結果、2011年にはprofile 96を示すリステリア症患者は1名の発生にとどまった。

以上のように、食品媒介リステリア症の中に施設定着株の関与が示唆される散発例や集団例が複数報告されている。次章でリステリアが施設に定着するために必要と考えられる主な要因について触れる。

6. リステリアの施設定着要因

バイオフィルム

リステリアは食品製造施設で使用されるさまざまな素材（ニトリルゴム、鋳鉄、ステンレス、ナイロン、テフロン、床のシーリング剤、ガラス）の表面に接着・増殖してバイオフィルムを形成する⁷²⁾。しかしながら、本菌が実際にバイオフィルムを形成しているところを電子顕微鏡などで決定的に捉えた報告はほとんど見られない。すなわち、表面に付着したリステリア菌数を計測したり、クリスタルバイオレットによる染色でバイオフィルム形成を評価するといった間接的な方法によるものが圧倒的に多い¹⁶⁾。これらはリステリア菌体の無生物表面への吸着度合い（adhere, attachment）の強さを示すものであり、遊離菌が表面に付着し、それに引き続く菌体外多糖類（extracellular polymeric substances; EPS）の産生を反映しているかどうかは不明である¹⁶⁾。

施設定着株のバイオフィルム形成について調べた報告はいくつか見られる。Norwood & Gilmour⁶²⁾は食品製造施設や農場から採取した施設定着株35株と非定着株24株についてクーボン状に小さく切断したステンレスへの接着度を調べた結果、25℃で24時間後に接着した菌数は施設定着株が高かったとしている。Lundenら⁴⁷⁾は施設定着株が比較的短時間（1～2時間）でステンレスに接着したのに対して、非定着株は同じかそれ以上に接着するために72時間を要したと報告している。Boruckiら⁷⁾は、塩化ビニル製のプレートを用いてクリスタルバイオレット染色でバイオフィルム量を測定した

結果、乳製品の製造施設のタンクから分離された施設定着株は同じタンクから分離された非定着株に比べて産生するバイオフィルム量が多かったとしている。また、塩化ビニルおよびステンレス上のリステリアを走査型電子顕微鏡で観察した結果、施設定着株は厚い三次元構造のバイオフィルムを形成していたのに対して、非定着株はまばらに付着するのみであったとしている。筆者らも施設定着株と非定着株を用いてこれらのバイオフィルムについて検討した結果、施設定着株は非定着株に比べて形成するバイオフィルムに含まれるEPS量が多いこと、また、バイオフィルム形成時には消毒剤（塩化ベンザルコニウム）に対して遊離状態に比べて約150倍の抵抗性を示すことを明らかにした⁵⁶⁾。

施設定着株と非定着株とでバイオフィルム形成に違いは見られないとする報告も多数ある^{13,24)}。Jensenら³¹⁾は臨床および食品由来リステリア8株といくつかの水産加工品製造施設から10年間にわたって分離された同一のRAPDタイプを示す4株を含む施設定着株10株を比較し、塩化ビニルへの付着に差は見られなかったと報告している。

血清型でバイオフィルム形成に違いが見られるという報告もあり、Norwood & Gilmour⁶²⁾ およびLundenら⁴⁷⁾は血清型1/2cのリステリアは他の血清型の菌株に比べて吸着しやすいと報告している。Boruckiら⁷⁾はlineageとバイオフィルム形成性に関連性が見られるとし、lineage II（血清型1/2aおよび1/2c）に属するリステリアはバイオフィルム形成性が高いとしている。一方、lineage Iに属する菌株（血清型4bおよび1/2b）がlineage IIやlineage III（血清型4a, 4bおよび4c）に比べてバイオフィルム形成能が高いとする報告もある¹³⁾。

多くの実験ではリステリア単独で培養することから、実際にバイオフィルムを形成している状況が実験室内では十分に再現できていないと考えられる。そこで、実際の状況に近づけるために、バックグラウンドフローラのリステリアのバイオフィルム形成に与える影響が調べられた。その結果、リステリア単独よりも*Pseudomonas fragi*や*Fravobacterium*属、*Bacillus*属の細菌と共培養したほうがリステリアバイオフィルムを分厚く、より安定させたとする報告もある^{9,69)}。

消毒剤耐性

消毒剤は、食品の製造施設で環境、製造機器、製造器具などを衛生的に保つために広範囲に使用される。ここで消毒剤とは、微生物に対して致死的に作用する化学物質と定義する。最もよく使用される消毒剤には、ハロゲン、過酸化水素、アルコール、アンハイドライド、アルデヒド、第4級アンモニウム塩、ビグアナイド（クロルヘキシジン）、ポリアミン（両性のものも含む）、イミダゾール、クレゾール（フェノール）等と抗菌性を持つ金属イオンが挙げられる⁷⁵⁾。施設定着株はしばしば施設内の清掃および消毒の後に分離される^{45,49,74)}。この中に

は、ただ単に施設内で消毒剤が行き届かない場所（ニッチ）にリステリアが存在しているだけのものも含まれるが、これも広義の定着株とする。

食品工場でよく使用される3種の消毒剤（次亜塩素酸、過酢酸、過酸化水素）に半致死的な濃度で長期間作用させても高濃度の消毒剤への抵抗性を増すということにはならないようである³⁵⁾。Aaseら¹⁾はノルウェーの水産加工場で塩化ベンザルコニウムに対して他の株に比べて高い抵抗性を示す定着株を見つけたが、これらの最小発育阻止濃度(MIC)は4から7 mg/ml（他の株は2 mg/ml）であり、米国FDAが推奨する食品工場内で使用できる最大のMIC (200 mg/L or ppm)⁷¹⁾を超えなかった。一般的によく使用される市販の消毒剤を用いて定着株の消毒剤耐性を調べた報告はあるが、定着株とMICの増大に関連はなさそうである^{14,27,34)}。Heirら²⁵⁾は、定着株を含む食品由来株、臨床由来株など112株のリステリアの塩化ベンザルコニウムに対するMICを調べたところ、17株で比較的高いMIC（4から8 mg/ml）を示したが、定着株との関連性はなかった。しかし、リステリアが塩化ベンザルコニウムに対する耐性遺伝子(*qacH*)を約5 kbのトランスポゾン(Tn6188)上に保有することが最近報告された⁵²⁾。施設定着株との関連性があるか今後の検討が待たれる

ストレス耐性

リステリアが食品の製造環境で受けるストレスのレベルはさまざまで、例えば、貧栄養状態、低pH、高浸透圧、熱ショック、また競合する他の細菌等、厳しい条件にさらされている。一般的に致死的でなく穏やかなストレスにさらされた細菌は、本来であれば致死的に作用するはずのストレスに適応し、違う種類のストレスに対しても抵抗性を増す²⁶⁾。たとえば、高浸透圧というストレス条件に適応したリステリアは、過酸化物質にも抵抗性を示す⁴⁾。酸に適応したリステリアは本来であれば致死となる酸の濃度に対して適応するだけでなく、過酸化水素やエタノール、低pHのみならず、熱に対しても抵抗性を増す^{44,65)}。リステリアは半致死的な条件への適応によって、種々の加工工程に抵抗性を示し、製造環境で生残する。半致死的な条件に対するストレス応答によって、遺伝子やタンパク質の発現は大きく変化する。他のグラム陽性菌と同様、リステリアもシグマ因子の一つである σ^B 因子(*sigB*遺伝子産物)が一般的なストレス応答タンパク質として同定されている⁶⁾。 σ^B 因子は種々の環境ストレスによって活性化され³⁾、浸透圧や界面活性剤によるストレス、酸や酸化ストレスや炭素源枯渇状況下でも生残可能となる^{10,15,33,68,82)}。ストレス下の発現タンパク質や転写遺伝子の解析から、リステリアにはストレスによって活性化する種々のタンパク質が同定されている（表5）。施設定着株のストレス応答についても調べられており、Lundenら⁴⁶⁾は、12の施設定着株(RAPD型による)を含む40株のリステリアを用いて酸

表5. リステリアのストレス応答を引き起こすあるいは活性化するタンパク質⁷³⁾

低温ショックタンパク質 (Cold shock proteins)	Fri, Ctc, GroEL, DnaK, Csp1-Csp4, CspA, CspD
熱ショックタンパク質 (Heat shock proteins)	Hsps, DnaK, GroES
塩ストレス誘導タンパク質 (Salt stress-induced proteins)	Ctc, DnaK, GbuA, AppA
酸ストレス応答タンパク質 (Acid stress response proteins)	ASP, GbuA, GroEL, ClpP
アルカリストレス応答タンパク質 (Alkaline stress response proteins)	DdlA, GroEL, DnaK
静水圧応答タンパク質 (Hydrostatic pressure response proteins)	Fri, GroES, PepF, PepT

文献73を改変

および熱への耐性を調べた結果、酸への耐性 (pH 2.4 で2時間) は施設定着株が非定着株に比べて高かったが、熱への耐性 (55℃で40分間) に有意差は認められなかったとしている。

その他

comK 挿入プロファージ

リステリアがさまざまな環境に適応している背景として、染色体上に存在する *comK* (major competence transcription factor) 遺伝子に挿入されているプロファージの関与が示唆されている⁷⁹⁾。 *comK* 挿入プロファージ保有株は非保有株に比べてさまざまな食品に高密度に付着 (バイオフィルムを形成) することから、本プロファージはリステリアが環境中のニッチに素早く適応し、定着するためのRAI (rapid adaptation island) となっていることが仮説として提案されている。

7. 施設定着株の病原性

リステリアに汚染された食品のリスク評価を行うにあたり、施設定着株の病原性について正しく理解することは重要である。Jensenら³²⁾はいくつかの水産品製造施設の環境由来で同じRAPDタイプを示す定着株について、1) Caco-2細胞 (ヒト大腸がん細胞) への接着、侵入、細胞内での増殖、2) 感染モデルとしてミバエ (*Drosophila melanogaster*)、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)、モルモットを用いた感染実験、3) 妊娠させたモルモットへの病原性を調べた。その結果、1) および2) についてはRAPDタイプに基づく定着株はヒトの臨床株に比べて病原性が低かった。一方、3) については定着株の1株で妊娠モルモットの栄養膜細胞バリアーを透過するものが見られた。施設定着株が特に高い病原性を有しているとはいえず、その病原性は臨床分離株に比べて低いようである。近年、InlA (リステリアの菌体表層に存在し、腸管上皮細胞への侵入にかかわるタンパク質で、ヒトへの感染に必須) をコードする遺伝子の変異がリステリアの病原性を低下させることが報告されている。すなわち、食品由来株は臨床分離株に比べて *inlA* 遺伝子に未成熟の終止コドン (prematured stop codon;

PMSC) を有していることが多く⁷⁸⁾、この変異により病原性が低下していると考えられる⁶⁰⁾。Holchらは特定のサブタイプ(RAPD 9)を示し、PMSCを保有するデンマークの魚加工施設の定着株が臨床株に比べてヒト胎盤の栄養膜への侵入性が低かったと報告している²⁸⁾。以上のように食品由来株と臨床由来株では病原性の違いが存在する可能性はあるが、決め手となる菌側の因子の特定はできていない。

最 後 に

食品媒介リステリア症は欧米を中心に毎年のように集団発生事例が報告され、多くの死者をみていることから、Codex および欧米などではRTE食品に対してリステリアの微生物規格が定められ、また食品における本菌の制御が行われている。国内でリステリア疾患者は年間約200名発生しているが⁷⁶⁾、これまでにわが国で食品由来が確認されたリステリア症は2001年の非侵襲性リステリア症1事例のみであり、他の事例では原因食品は不明である。食品を介した集団発生により死亡例のある腸管出血性大腸菌に比べるとリステリアの公衆衛生上の認知度は低い。そのため、わが国では腸管出血性大腸菌の検査は頻繁に実施するものの、食品および製造環境のリステリアまたはリステリア属菌検査を実施する食品取扱業者は欧米に比べて格段に少ない。今後、国際貿易の増大により、これまで以上に食品の輸出入が増えるに従って、食品中のリステリアの制御および検査のニーズは高まると予想される。また、今後、高齢化社会が進み、国内で重篤な食品媒介リステリア症の集団発生が懸念される。食品媒介リステリア症の発生を予防するためには、低温保存・流通で制御できない本菌の食品への汚染を防ぐこと、さらに仮に汚染されたとしても同菌の食品中での増殖を最小限に抑えることができる食品組成の設計が最重要課題であり、今後は食品製造施設でのリステリア汚染防除対策の必要性が高まるであろう。

謝 辞

本稿を作成するあたり、貴重なご意見をいただきました

た、大阪市立大学大学院生活科学研究科の西川禎一教授ならびに山口敬治客員研究員に感謝の意を表します。また、リステリアに関する貴重な資料を快く提供していただきました、山口大学共同獣医学部の豊福 肇教授、食品のリステリア検査に関して貴重な情報をご提供いただきましたサーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社の内山星生氏に深謝致します。

文 献

- 1) Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S. and Rorvik, L.M.: Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., **62**, 57-63 (2000).
- 2) Anonymous.: Listeriosis associated with consumption of turkey franks. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep., **38**, 267-268 (1989).
- 3) Becker, L. A., Cetin, M. S., Hutkins, R. W. and Benson, A. K.: Identification of the gene encoding the alternative sigma factor sigmaB from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. J. Bacteriol., **180**, 4547-4554 (1998).
- 4) Bergholz, T. M., Bowen, B., Wiedmann, M. and Boor, K. J.: *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and -independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection against other stresses. Appl. Environ. Microbiol., **78**, 2602-2612 (2012).
- 5) Beuchat, L. R. and Brackett, R. E.: Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 1367-1371 (1991).
- 6) Boor, K. J.: Bacterial stress responses: what doesn't kill them can make them stronger. PLoS Biol., **4**, e23 (2006).
- 7) Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F. and Call, D. R.: Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., **69**, 7336-7342 (2003).
- 8) Carpentier, B. and Cerf, O.: Review -Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int. J. Food Microbiol., **145**, 1-8 (2011).
- 9) Carpentier, B. and Chassaing, D.: Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. Int. J. Food Microbiol., **97**, 111-122 (2004).
- 10) Chae, M. S., Schraft, H., Truelstrup Hansen, L. and Mackereth, R.: Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. Food Microbiol., **23**, 250-259 (2006).
- 11) Codex Alimentarius Commission.: Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. Vol. CAC/GL 61 (2007).
- 12) den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., et al.: Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov., *L. aquatica* sp. nov., *L. cornelensis* sp. nov., *L. riparia* sp. nov., and *L. grandensis* sp. nov.) from agricultural and natural environments in the United States. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **64**, 1882-1889 (2014).
- 13) Djordjevic, D., Wiedmann, M. and McLandsborough, L. A.: Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol., **68**, 2950-2958 (2002).
- 14) Earnshaw, A. M. and Lawrence, L. M.: Sensitivity to commercial disinfectants, and the occurrence of plasmids within various *Listeria monocytogenes* genotypes isolated from poultry products and the poultry processing environment. J. Appl. Microbiol., **84**, 642-648 (1998).
- 15) Ferreira, A., O'Byrne, C. P. and Boor, K. J.: Role of sigma(B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., **67**, 4454-4457 (2001).
- 16) Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. and Stasiewicz, M.J.: *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. J. Food Prot., **77**, 150-70 (2014).
- 17) Fox, E. M., Leonard, N. and Jordan, K.: Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates. Appl. Environ. Microbiol., **77**, 6559-6569 (2011).
- 18) Gillespie, I. A., McLauchlin, J., Grant, K. A., Little, C. L., Mithani, V., et al.: Changing pattern of human listeriosis, England and Wales, 2001-2004. Emerg. Infect. Dis., **12**, 1361-1366 (2006).
- 19) Gilmour, M.W., Graham, M., Van Domselaar, G., Tyler, S., Kent, H., et al.: High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. BMC Genomics, **11**, 120 (2010).
- 20) Glass, K. A. and Doyle, M. P.: Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 1565-1569 (1989).
- 21) Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A. and de Valk, H.: Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. Emerg. Infect. Dis., **14**, 734-740 (2008).
- 22) Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., et al.: *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., **60**, 1280-1288 (2010).
- 23) Guyer, S. and Jemmi, T.: Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 1523-1527 (1991).
- 24) Harvey, J., Keenan, K. P. and Gilmour, A.: Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. Food Microbiol., **24**, 380-392 (2007).
- 25) Heir, E., Lindstedt, B. A., Rotterud, O. J., Vardund, T., Kapperud, G., et al.: Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. Int. J. Food Microbiol., **96**, 85-96 (2004).
- 26) Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D. and Gahan, C. G. M.:

- Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *Int. Dairy J.*, **12**, 273–283 (2002).
- 27) Holah, J. T., Taylor, J. H., Dawson, D. J. and Hall, K. E.: Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.*, 111S–120S (2002).
 - 28) Holch, A., Gottlieb, C. T., Larsen, M. H., Ingmer, H. and Gram, L.: Poor invasion of trophoblastic cells but normal plaque formation in fibroblastic cells despite actA deletion in a group of *Listeria monocytogenes* strains persisting in some food processing environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 3391–3397 (2010).
 - 29) ICMSF-International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ed.) “8 *Listeria monocytogenes*,” p. 141–182, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (1996).
 - 30) Ingham, S. C., Buege, D. R., Dropp, B. K. and Losinski, J. A.: Survival of *Listeria monocytogenes* during storage of ready-to-eat meat products processed by drying, fermentation, and/or smoking. *J. Food Prot.*, **67**, 2698–2702 (2004).
 - 31) Jensen, A., Larsen, M. H., Ingmer, H., Vogel, B. F. and Gram, L.: Sodium chloride enhances adherence and aggregation and strain variation influences invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. *J. Food Prot.*, **70**, 592–599 (2007).
 - 32) Jensen, A., Thomsen, L. E., Jorgensen, R. L., Larsen, M. H., Roldgaard, B. B., et al.: Processing plant persistent strains of *Listeria monocytogenes* appear to have a lower virulence potential than clinical strains in selected virulence models. *Int. J. Food Microbiol.*, **123**, 254–261 (2008).
 - 33) Kallipolitis, B. H. and Ingmer, H.: *Listeria monocytogenes* response regulators important for stress tolerance and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, **204**, 111–115 (2001).
 - 34) Kastbjerg, V. G. and Gram, L.: Model systems allowing quantification of sensitivity to disinfectants and comparison of disinfectant susceptibility of persistent and presumed nonpersistent *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.*, **106**, 1667–1681 (2009).
 - 35) Kastbjerg, V. G. and Gram, L.: Industrial disinfectants do not select for resistance in *Listeria monocytogenes* following long term exposure. *Int. J. Food Microbiol.*, **160**, 11–15 (2012).
 - 36) Kathariou, S.: *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food Prot.*, **65**, 1811–1829 (2002).
 - 37) Kornacki, J. L. and Gurtler, J. B.: Incidence and control of *Listeria* in food processing facilities, *Listeria*, listeriosis, and food safety, Third edition. Ryser, E. T. and Marth, E. H. (eds.), p. 681–766, CRC Press, Boca Raton (2007).
 - 38) 窪田邦宏, 天沼 宏, 田邊思帆里, 森川 馨: “そのまま喫食可能な(Ready-to-eat)” 食肉製品による *Listeria monocytogenes* アウトブレイク (カナダ, 2008年). 食品衛生研究, **61**, 23–29 (2011).
 - 39) Kvistholm Jensen, A., Ethelberg, S., Smith, B., Moller Nielsen, E., Larsson, J., et al.: Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*, **15** (2010).
 - 40) Lang Halter, E., Neuhaus, K. and Scherer, S.: *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **63**, 641–647 (2013).
 - 41) Larson, A. E., Johnson, E. A. and Nelson, J. H.: Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *J. Dairy Sci.*, **82**, 1860–1868 (1999).
 - 42) Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A., Le Fleche-Mateos, A., et al.: *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60**, 2210–2214 (2010).
 - 43) Lomonaco, S., Verghese, B., Gerner-Smidt, P., Tarr, C., Gladney, L., et al.: Novel epidemic clones of *Listeria monocytogenes*, United States, 2011. *Emerg. Infect. Dis.*, **19**, 147–150 (2013).
 - 44) Lou, Y. and Yousef, A. E.: Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. *J. Food Prot.*, **59**, 465–471 (1996).
 - 45) Lunden, J., Autio, T., Markkula, A., Hellstrom, S. and Korkeala, H.: Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.*, **82**, 265–272 (2003).
 - 46) Lunden, J., Tolvanen, R. and Korkeala, H.: Acid and heat tolerance of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* food plant strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, **46**, 276–280 (2008).
 - 47) Lunden, J. M., Miettinen, M. K., Autio, T. J. and Korkeala, H. J.: Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *J. Food Prot.*, **63**, 1204–1207 (2000).
 - 48) Makino, S. I., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S. and Igimi, S.: An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int. J. Food Microbiol.*, **104**, 189–196 (2005).
 - 49) Medrala, D., Dabrowski, W., Czekajlo-Kolodziej, U., Daczowska-Kozon, E., Koronkiewicz, A. and Augustynowicz, E.: Persistence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from products in a Polish fish-processing plant over a 1-year period. *Food Microbiology*, **20**, 715–724 (2003).
 - 50) 光山正雄: 8. リステリア症集団事例. 化学療法の領域, **28**, 92–100 (2012).
 - 51) Morgan, F., Bonnin, V., Mallereau, M. P. and Perrin, G.: Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. *Int. J. Food Microbiol.*, **64**, 217–221 (2001).
 - 52) Müller, A., Rychli, K., Zaiser, A., Wieser, C., Wagner, M. and Schmitz-Esser, S.: The *Listeria monocytogenes* transposon Tn6188 provides increased tolerance to various quaternary ammonium compounds and ethidium bromide. *FEMS Microbiol. Lett.*, **361**, 166–173 (2014).
 - 53) Munoz, P., Rojas, L., Bunsow, E., Saez, E., Sanchez-Cam-

- broner, L., et al.: Listeriosis: An emerging public health problem especially among the elderly. *J. Infect.*, **64**, 19–33 (2011).
- 54) 仲真晶子: 食品媒介リステリア症. 防菌防黴, **34**, 149–154 (2006).
 - 55) 仲真晶子: 11 *Listeria monocytogenes*. 食品由来感染症と食品微生物. 仲西寿男, 丸山 務監修, p. 401–421, 中央法規出版, 東京 (2009).
 - 56) Nakamura, H., Takakura, K., Sone, Y., Itano, Y. and Nishikawa, Y.: Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. *J. Food Prot.*, **76**, 1179–1186 (2013).
 - 57) Nakamura, H., Tokuda, Y., Sono, A., Koyama, T., Ogasawara, J., Hase, A., Haruki, K. and Nishikawa, Y.: Molecular typing to trace *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish to a contamination source in a processing plant. *J. Food Prot.*, **69**, 835–841 (2006).
 - 58) 中村寛海, 小笠原 準, 長谷 篤, 北瀬照代, 石井寛次: 水産加工品中での *Listeria monocytogenes* の消長. 大阪市立環境科学研究所報告, **68**, 1–11 (2006).
 - 59) Nakari, U. M., Rantala, L., Pihlajasaari, A., Toikkanen, S., Johansson, T., et al.: Investigation of increased listeriosis revealed two fishery production plants with persistent *Listeria* contamination in Finland in 2010. *Epidemiol. Infect.*, **142**, 2261–2269 (2014).
 - 60) Nightingale, K. K., Windham, K., Martin, K. E., Yeung, M. and Wiedmann, M.: Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8764–8772 (2005).
 - 61) Norton, D. M. and Braden, C. R.: Foodborne listeriosis: *Listeria*, listeriosis, and food safety, Third edition. Ryser, E. T., and Marth, E. H. (eds.), p. 305–356, CRC Press, Boca Raton (2007).
 - 62) Norwood, D. E. and Gilmour, A.: Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons. *J. Appl. Microbiol.*, **86**, 576–582 (1999).
 - 63) Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Nationwide survey of human *Listeria monocytogenes* infection in Japan. *Epidemiol. Infect.*, **132**, 769–772 (2004).
 - 64) Olsen, S. J., Patrick, M., Hunter, S. B., Reddy, V., Kornstein, L., et al.: Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. *Clin. Infect. Dis.*, **40**, 962–967 (2005).
 - 65) Phan-Thanh, L., Mahouin, F. and Alige, S.: Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 121–126 (2000).
 - 66) Popovic, I., Heron, B. and Covacin, C.: *Listeria*: an Australian perspective (2001–2010). *Foodborne Pathog. Dis.*, **11**, 425–432 (2014).
 - 67) Rorvik, L. M., Yndestad, M. and Skjerve, E.: Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, smoked salmon, during storage at 4 degrees C. *Int. J. Food Microbiol.*, **14**, 111–117 (1991).
 - 68) Ryan, E. M., Gahan, C. G. and Hill, C.: A significant role for Sigma B in the detergent stress response of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **46**, 148–154 (2008).
 - 69) Sashara, K. and Zottola, E. A.: Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *J. Food Prot.*, **56**, 1022–1028 (1993).
 - 70) Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L. and Griffin, P. M.: Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 7–15 (2011).
 - 71) Louie, W. and Reuschlein, D.: 8 Cleaning and disinfection in the bottled water industry. *Technology of bottled water*, third edition. Dege, N. (ed.), p. 223–266, Wiley-Blackwell Publishing, UK (2011).
 - 72) Shi, X. and Zhu, X.: Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, **20**, 407–413 (2009).
 - 73) Soni, K. A., Nannapaneni, A. R. and Tasara, T.: An overview of stress response proteomes in *Listeria monocytogenes* strains. *Agric. Food Anal. Bacteriol.*, **1**, 66–85 (2011).
 - 74) Soumet, C., Ragimbeau, C. and Maris, P.: Screening of benzalkonium chloride resistance in *Listeria monocytogenes* strains isolated during cold smoked fish production. *Lett. Appl. Microbiol.*, **41**, 291–296 (2005).
 - 75) Stanga, M.: 18 Disinfectants and sanitation technology. *Sanitation: cleaning and disinfection in the food industry*. p. 499–554, Wiley-VCH, Berlin (2010).
 - 76) 食品安全委員会: 微生物・ウイルス評価書 食品中のリステリア・モノサイトゲネス. (2013).
 - 77) Tompkin, R. B.: Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J. Food. Prot.*, **65**, 709–725 (2002).
 - 78) Van Stelten, A., Simpson, J. M., Ward, T. J. and Nightingale, K. K.: Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codon in *inlA* are common among *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods but not human listeriosis cases. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 2783–2790 (2010).
 - 79) Verghese, B., Lok, M., Wen, J., Alessandria, V., Chen, Y., Kathariou, S. and Knabel, S.: *comK* prophage junction fragments as markers for *Listeria monocytogenes* genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation, and persistence. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 3279–3292 (2011).
 - 80) Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M. and den Bakker, H.: *Listeria booriae* sp. nov., and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the United States. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, doi: 10.1099 (2014).
 - 81) Wesley, I. V.: Listeriosis in Animals: *Listeria*, listeriosis, and food safety, Third edition. Ryser, E. T. and Marth, E. H. (eds.), p. 55–84, CRC Press, Boca Raton (2007).
 - 82) Wiedmann, M., Arvik, T. J., Hurley, R. J. and Boor, K. J.: General stress transcription factor sigmaB and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, **180**, 3650–3656 (1998).