

表2. *L.monocytogenes* 検出成績

検体名	品目	検体数	陽性検体数(%)	
			<i>Listeira</i> 属	<i>L.monocytogenes</i>
鮮魚・刺身類(寿司ネタも含む)	17	129		
マグロ		53	7(13.2)	3(5.7)
サーモン		11	0	0
トラウト		24	0	0
サンマ		3	1(33.3)	0
アジ		4	0	0
イカ		23	0	0
甘エビ		1	0	0
その他*		10	0	0
貝類	4	20		
アサリ		3	0	0
ハマグリ		2	0	0
赤貝		2	0	0
ホタテ		13	0	0
加工品	14	245		
スモークサーモン		57	5(8.8)	2(3.5)
マグロのたたき		73	16(21.9)	10(13.7)
スジコ		23	4(17.4)	2(8.7)
明太子		19	6(31.6)	5(26.3)
タラコ		16	0	0
数の子		2	0	0
トビノコ		1	0	0
イカの塩辛		5	0	0
シラス(加熱)		5	0	0
エビ(加熱)		14	0	0
タコ(加熱)		16	1(6.3)	1(6.3)
コハダ(酢漬け)		4	0	0
もずく		5	0	0
ポイルホタテ		5	0	0
	35	394	40(10.2)	23(5.8)

表3.L.monocytogenes陽性検体の汚染菌量(定量試験を行なったもののみ)

検体No.	検体名	菌数
		MPN法または直接平板塗沫法(cfu/gに換算)
NT4	マグロのたたき	<0.3
NT11	マグロのたたき	<0.3
NT12	マグロのたたき	<0.3
NT13	マグロのたたき	<0.3
F17	マグロ(寿司ネタ)	<0.3
F22	マグロ(寿司ネタ)	<0.3
F40	マグロ(寿司ネタ)	<0.3
F25	マグロのたたき	0.7
F38	マグロのたたき	0.4
F31	スモークサーモン	4.3
O1	タコ(加熱)	1.5
S1	スモークサーモン	<0.3
81	スジコ	0.4
K7	スジコ	<0.3
100	マグロのたたき	<0.3
G11	明太子	<0.3
G15	明太子	0.4

表4.魚介類加工品から分離された*L.monocytogenes*の血清型(血清型別を行ったもののみ)

検体 No.	検体名	<i>L.monocytogenes</i>												
		血清型(%)												
		陽性菌株数												
		1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	4b	UT						
NT4	マグロのたたき	4												
NT11	マグロのたたき	1		3										
NT12	マグロのたたき	5												
NT13	マグロのたたき	2												
F25	マグロのたたき	5												
F38	マグロのたたき	2				1	1							2
F17	マグロ(寿司ネタ)	5												
F22	マグロ(寿司ネタ)	2												3
F40	マグロ(寿司ネタ)	6												
F10	明太子	7												
F31	スモークサーモン	1							1					
81	スジコ	4												16
K7	スジコ	19												19
100	マグロのたたき	7												
G11	明太子	5							5					
G15	明太子	1							1					
		104				44(42.3)	8(7.7)	3(2.9)	7(6.7)	1(1.0)	36(34.6)			5(4.8)

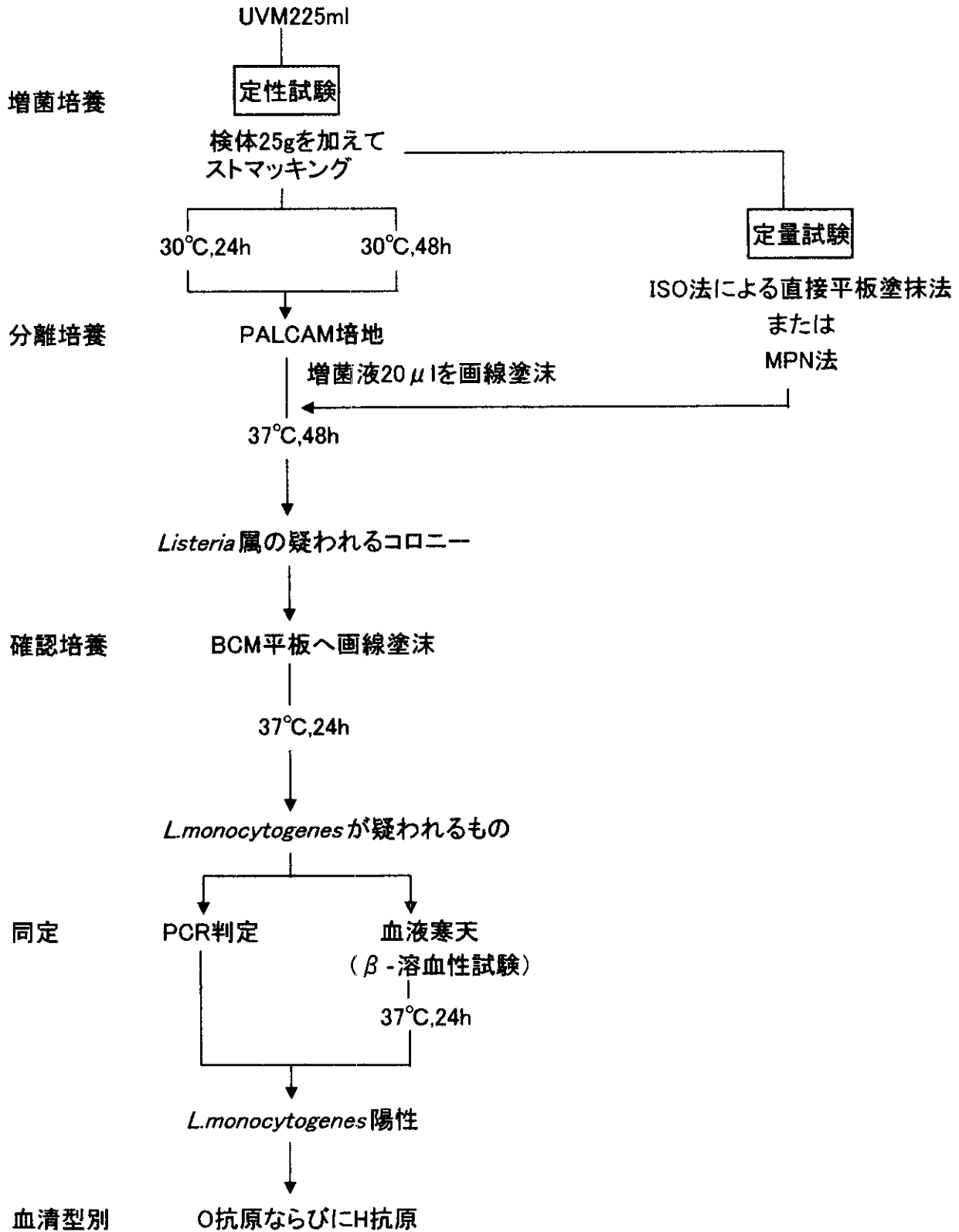


図1. *L.monocytogenes* 検出フローチャート

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

分子疫学的手法の検討及び標準化

分担研究者 牧野壮一

帯広畜産大学畜産学部家畜微生物学教室助教授

研究協力者 武士甲一

北海道立衛生研究所食品科学部主任研究員

研究協力者 岡田由美子

国立公衆衛生院衛生獣医学部主任研究員

研究要旨 人畜共通感染症の一つであるリステリア症は本来動物の感染症であり、その原因菌である *Listeria monocytogenes*（リステリア）は動物や土壌等の環境中に広く常在している。その結果、乳肉製品を中心に食品から高頻度に分離されてきた。一方、我国におけるヒトのリステリア症は 1958 年に始めて小児の髄膜炎として報告されてから、現在では、毎年 40-50 例の発生が認められている。しかし、我国におけるリステリア症の感染源や感染経路については不明で、欧米で報告されているような食品が感染源になった事例はほとんど報告されていない。胎児および新生児のリステリア症は母親からの垂直感染であろうと推定されているが、母親への感染源については不明である。食品が世界的に流通し、リステリアの低温増殖性といった特性から、本症が食品を介して国内でいつ集団発生しても不思議ではない。2001 年 3 月北海道でチーズからヒトへの感染事例が初めて報告されたことから、食品を汚染源とする散发事例は国内で既に発生している可能性は高い。そこで、我々の研究班では、日本で発生しているリステリア症の実態をアクティブサーベイランスにより掌握した上で、臨床分離菌株、環境分離株および食品由来株の詳細な検討により、感染源がどこにあるのかを明らかにすることを目的とする。これにより、我国におけるリステリア症が、欧米と同様に食品媒介感染症として位置付けられるのかを明らかにでき、重篤な症状と高い致死率を示すリステリア症の予防に重要な知見が得られることと思われる。加えて、食品を介した感染が明らかとされた場合は、行政上、リステリアを食品衛生上重要な汚染菌として取り扱う必要性を示すことが出来、これにより多くのリステリア症の発生を未然に防ぐことが出来る。同時に本研究で疫学的手法を標準化することにより、画一的な疫学データの解析が可能となり、ネットワークで情報交換が可能となり、衛生行政への貢献は計り知れないものと期待される。実際にリステリアはヒトよりも家畜を含めた環境中に常在しており、それが経口感染でヒトに伝播すると考えられている。しかし、リステリアの病原性の指標となる簡便な方法がないことから、環境中のリステリアのどの程度がヒトに危険なのか把握する手段がない。我々は今年度は遺伝学的に病原性を調べる指標について検討した。

また、北海道で起きたチーズを喫食したことによる胃腸炎症状患者における例も今後日本研究を進めるうえで重要な事例になるので、その概要も報告する。

A. 研究目的

人畜共通感染症の一つであるリステリア症は本来動物の感染症であり、その原因菌である *Listeria monocytogenes* (リステリア) は動物や土壌等の環境中に広く常在している。その結果、乳肉製品を中心に食品から高頻度に分離されてきた。一方、我国におけるヒトのリステリア症は 1958 年に始めて小児の髄膜炎として報告されてから、現在では、毎年 40-50 例の発生が認められている。しかし、我国におけるリステリア症の感染源や感染経路については不明で、欧米で報告されているような食品が感染源になった事例はほとんど報告されていない。胎児および新生児のリステリア症は母親からの垂直感染であろうと推定されているが、母親への感染源については不明である。食品が世界的に流通し、リステリアの低温増殖性といった特性から、本症が食品を介して国内でいつ集団発生しても不思議ではない。2001 年 3 月北海道でチーズからヒトへの感染事例が初めて報告されたことから、食品を汚染源とする散发事例は国内で既に発生している可能性は高い。そこで、我々の研究班では、日本で発生しているリステリア症の実態をアクティブサーベイランスにより掌握した上で、臨床分離菌株、環境分離株および食品由来株の詳細な検討により、感染源がどこにあるのかを明らかにすることを目的とする。これにより、我国におけるリステリア症が、欧米と同様に食品媒介感染症として位置付けられるのかを明らかにでき、重篤な症状と高い致死率を示す

リステリア症の予防に重要な知見が得られることと思われる。加えて、食品を介した感染が明らかとされた場合は、行政上、リステリアを食品衛生上重要な汚染菌として取り扱う必要性を示すことが出来、これにより多くのリステリア症の発生を未然に防ぐことが出来る。同時に本研究で疫学的手法を標準化することにより、画一的な疫学データの解析が可能となり、ネットワークで情報交換が可能となり、衛生行政への貢献は計り知れないものと期待される。

そこで本分担研究では、食品および環境由来リステリアがヒトにリステリア症を起こすのかという点に着目して、リステリアの動物や食品からリステリアを分離同定し、また各分担研究者が分離した菌株を用い、病原性のアッセイを行う。しかし、そのための統一的な方法が確立されていないので、まずその方法を確立することからはじめた。

また、国産ナチュラルチーズの約 9 割は北海道で生産されており、北海道立衛生研究所では平成 2 年度からナチュラルチーズを介したリステリア症の発生防止を目的として毎年モニタリング試験を行い、平成 11 年度までは試験品からは検出されなかった。しかし平成 12 年度のモニタリング試験において、供試 123 件中 1 件から本菌が検出された。このとき同一ロット品を喫食した 31 名のうち、胃腸炎症状を伴う風邪様を呈して受診したものが 19 名いたことが北海道庁の調査で判明した。

B. 研究方法

1. 菌株および培地

使用したリステリア菌株は表1に示した血清型の同定されている標準株33株と、健康家畜から分離された3株である。培地は選択培地としてパルカム培地を用い、リステリアの増殖にはBHIブロスもしくは寒天平板を使用した。培養は、37°Cで行った。ドイツの血清標準株はドイツで精製した全DNAをDr. A. Bubertより分与を受け、本研究に使用した。

2. DNAの精製

リステリアEGD株より定法に従い全DNAを分離し、PCRのコントロールに使用した。

3. PCR法とプライマー

サンプル処理は、各菌株をBHI寒天平板に塗布して37°C一夜培養し、その約2白金耳を滅菌蒸留水100 μ lに懸濁し、ボルテックス後10分間ボイルした。その後15000rpm、5分間遠心し、その上清4 μ lをPCRに用いた。PCR用の試薬はTAKARA Ex Taq及び付属バッファーを用い、反応液量を15 μ lとし、サーマルサイクラーを用いて次の条件で行った。

step1:94°C 2分

step2: (94°C 1分、50°C*1分、72°C 1分)を30サイクル

step3:72°C 7分

*但し、inlB及びinlCではアニーリングを47°Cで行った。

電気泳動は2%アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した。プライマーは、表2に示した病原性と関わりがあると報告された遺伝子を使用し、プライマーを設計した。

4. 試験品

試験品は、北海道内で生産されたナチュラルチーズ123件で、その内訳を表3に示す。

5. チーズからのリステリアの分離

国際酪農連盟の方法に基づき、試験品から25gをスオマフィルターに秤量し、225mlのEBブロスを加えてストマッキングした。これを37°Cで24~48時間増菌後、パルカム・リステリア選択寒天培地に培養し、リステリアの分離を試みた。

C. 研究結果

1. PCRによる各種リステリアの増幅パターンの比較

リステリアの病原因子として報告されている12種類の遺伝子を用いてPCRを行ったが、EGD株を用いての同定であり、この株では全てPCRが陽性であった。EGD株は血清型1/2aであり、4bと並んでヒトの感染事例から数多く分離されている血清型である。他の菌株は血清型の標準株として保存されている株で、そのPCRのパターンはまちまちであった。しかし、*L. monocytogenes*以外の血清型ではほとんど陽性が見られなかった。また、全体的に、ドイツ株の方が病原遺伝子を保有している株が多く、特に侵入能に関与する遺伝子である*inlA-C*遺伝子は国内保存株では検出できなかった。その他の病原因子も同様であった。さらに肉用に飼育されていた羊から分離されたリステリアでは、これらは血清型は1/2aと1/2bであったが、全ての遺伝子の増幅が確認できた。

2. チーズからのリステリアの分離

2000年3月に実施したモニタリング試験において、試験品123件のうちWash typeの1件から*L. monocytogenes* serovar 1/2bが検出された。このとき同一の工場生産され保存されていた製品および有症者から提供された未開封製品19件を検査し、そのうち15件からリステリアが検出され、うち14件から同一の血清型が分離された。これらの試験において、汚染菌量は最大 10^9 MPN/100gであった。

Elliotらによると殺菌乳に500 cfu/mlにリステリアを接種してCamembertを製造した場合、製造後24時間では菌数が5~10倍に増加し、熟成後18日には一旦菌数が減少するが、熟成18日以降は再び菌数が増え、熟成65日には最大 10^7 cfu/gに達したと報告した。このときチーズ表面の菌数は内部よりも10~100倍多く、Camembertにおける菌の増殖要因は、その最終pH(7.4)が菌の発育に好適であることによると考察し、Camembertの汚染調査を行う場合には熟成後25~30日の製品を対象とすることを推奨した。

D. 考察

1. PCRにより病原遺伝子を探索し、病原性の指標となるかどうかを調べた。しかし、標準株ではドイツ由来4e株以外完全にEGD株と同じパターンになる株はなかった。このことは病原因子はリステリア内で共通のものではないのか、それとも保存株が病原株に成りえないのか現時点では不明であった。

2. しかし、ヒツジ由来株はEGD株と同じであった。これらのデータからはEGD同様の病原性を有している可能性が強く示唆される。すなわち、これらの遺伝子の存在が病原株に共通のものである可能性もある。
3. *L. monocytogenes* 以外の血清型ではこれらの病原因子の検出は非常に低頻度であった。種々の報告からこれらの血清型では病気を起こさないであろうとされているので、それらの結果とあうデータであった。
4. わが国ではまだ食品媒介リステリア症は確認されていないが、最近の食生活の欧米化や冷蔵保存されたReady-to-eatの食品の普及に伴い、近い将来その発生が憂慮される。それに対してわが国でも早急にリスクアセスメントに基づいて国産食品についてはHACCPを導入した汚染防止対策を、また、輸入食品に対しては原材料を含めこれまで以上に検査体制を強化する必要があると考える。今後はナチュラルチーズのみならず、食肉製品、水産加工品、野菜類なども検査し、北海道での本症の発生を未然に防止したいと考える。

E. 結論

1. 今回は標準株で行ったが、既に報告済みの病原遺伝子ではリステリアの指標となることは確認出来なかった。しかし、病原菌を多く調べることによりこれらのことが明らかになり、PCRによる指標が可能になるかもしれない。次年度はもう少し多くの菌株を調べマーカーとして使用価値を調べる必要がある。

F. 健康危険情報
特に無い。

G. 研究発表

1. Y. Okada, S-I, Makino, T, Tobe, N, Okada, and S, Yamazaki. Cloning of *rel* from *Listeria monocytogenes* as an osmotolerance involvement gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: (2002 in press).

表 1. 使用菌株と PCR の結果

	prfA	plcA	hly	actA	mpl	plcB	inlA	iap	clpC	opuC	inlB	inlC
血清標準株 1a	-	*	+	+	+	-	-	-	-	-	-	*
血清標準株 1b	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
血清標準株 1c	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	Sm	Sm
血清標準株 3a	+	-	+	+	+	*	+	+	-	-	-	-
血清標準株 3b	+	*	+	+	-	+	-	-	-	-	Sm	Sm
血清標準株 3c	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
血清標準株 4a	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	*
血清標準株 4b	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	Sm
血清標準株 4c	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	Sm	Sm
血清標準株 4d	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Sm
血清標準株 6a	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Sm
血清標準株 5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Sm
血清標準株 6	-	-	-	-	+	-	-	S	-	-	Sm	Sm
血清標準株 7	L	-	-	+	S	-	-	-	-	-	-	-
L.innocua	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	S	S
L.ivanovii	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L.welshmeri	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-
L.murray	-	-	-	*	-	-	-	S	-	-	-	Sm
L.gray	-	-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	*
ドイツ 1a	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
ドイツ 1b	-	+	+	+	Sm	Sm	Sm	+	Sm	Sm	Sm	Sm
ドイツ 1c	*	+	+	+	+	+	-	Sm	Sm	+	+	+
ドイツ 3a	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
ドイツ 3b	+	+	L	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ドイツ 3c	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
ドイツ 4a	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	LS	S
ドイツ 4ab	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ドイツ 4b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+
ドイツ 4c	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Sm
ドイツ 4d	+	L	L	L	+	+	+	+	+	+	+	+
ドイツ 4e	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ドイツ 7	+	L	-	-	+	+	+	+	+	+	*	+
EGD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ヒツジ 由来株-1(1/2a)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ヒツジ 由来株-2(1/2b)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ヒツジ 由来株-3(1/2a)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*=+/-

L=larger band

S=smaller band

Sm=smear

表 2. プライマーとその配列

Name	sequence(5' -3')	fragment size(bp)	gene
prfA1/prfA2	CAGCTGAGCTATGTGCGAT ACCAATGGGATCCACAAG	467	<i>prfA</i>
CO1/CO2	TTCGGGGAATTCATGATTAG CACTACTCCCGGGACTGAG	392	<i>plcA</i>
CO3/CO4	CGCGGATGAATTCGATAG GTCATACCCGGGAAATCAATG	316	<i>hly</i>
actA1/actA2	ACGGGACCAAGATACGAA GCATGCTAGAATCTAAGTCAC	411	<i>actA</i>
mpl1/MSZ2	TTGCCAGATTCCTGCGAA GCGCCGGTTTCTACGTCCACTTG	428	<i>mpl</i>
CO5/CO6	CCAGTAGGATCCACTGTATC CTTATTTCCCGGGTTTGTCTAATG	419	<i>plcB</i>
SC1/CO8	GTGATATAACTCCACTTGGG GGTTAAGTTCGCAAGTGAGC	425	<i>inlA</i>
BKPN2/BBAM	AATAAGGTACCGGTCTACCAAGG CAAGCGAGATAAACAAGCACTTGG	301	<i>inlB</i>
InlC3/BBAM	AATTGGTTACAAAATGCAG CAAGCGAGATAAACAAGCACTTGG	420	<i>inlC</i>
MonoA/Lis1B	CAAAGTCTAACACAGCTACT TTATACGCGACCGAAGCCAAC	660	<i>iap</i>
clpCA1/clpCB1	TAGGGCTTGTAAGAGAAG CCACGATATTTGTACTG	645	<i>clpC</i>
opuCA1/opuCB1	AACGAAGACTTATAAAGGGG ATAATTACGATACGGTCTGC	608	<i>opuCA</i>

表 3 試験品の内訳と試験結果

Type	Cheese	2000年3月 (n=84)	2001年3月 (n=123)
Fresh	Cream	0/7	0/7
	Mozzarella	0/7	0/14
	Cottage	0/2	0/2
Washed	Wash		1/3
White mold ripened	Camembert	0/17	0/27
Blue mold ripened	Blue	0/4	0/4
Semi-hard/hard	Gouda	0/16	0/13
	Smoked	0/1	0/3
	Cheddar	0/3	0/4
	Gruyere		0/2
Others		0/27	0/44

Listeria monocytogenes 汚染の分子疫学に関する基礎的研究

分担研究者 本藤 良 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 教授
協力研究者 植田富貴子 日本獣医畜産大学獣医畜産学部 助教授

研究要旨：

1. 従来用いられている *Listeria monocytogenes* 分離菌株の血清型判別法を、カルチャープレートおよびマイクロプレートの併用で改良し、迅速と簡便化および抗血清の微量化への利点をもつ改良法 (Sahumy法) を開発した。
2. 食肉由来およびヒト由来の *Listeria monocytogenes* 分離株で、特にヒトでの病原性と関連性をもつ血清型4b株について分子疫学的解析を試み、*iap* 遺伝子領域内の多型領域のゲノム構造を明らかにした。その特性から、汚染鶏肉とヒト感染において疫学的関連性が示唆された。また、同一菌株による地域常在汚染の実態を明らかにした。

A. 研究目的

現在までに、市販食肉における *Listeria monocytogenes* (L.m) の汚染状況と本邦での地域常在性に関する分子疫学的解析を継続し、その解析法と有用性について明らかにしてきた (文献1, 2)。L.m の分子疫学的解析の基盤となるのは起因菌の分離と同定およびその血清型別である。それらの情報を基にして分子生物学的手法を併用することにより、さらに詳細な疫学的解析が可能となるものと考えている。従って、今回は以下の2題をテーマとして検討した。

1. L.mの分離株に関する血清型判別法について、迅速と簡便化および反応系の明瞭性と安定化の点で改良を図る。
2. 食肉由来およびヒト由来のL.m分離株で、特にヒトでの病原性と関連性をもつ血清型4b株について分子疫学的解析を試みる。

B. 研究方法

1. 血清型判別法の改良

本研究室で市販の豚肉、鶏肉、牛肉、および合挽肉から常法で分離した123株を用いて、各菌株をBHI (Difco) 培養液で37°C・18時間培養後に一定条件に調整してから実験に用いた。リステリア型別用免疫血清はキット (生研：電化生研) を用いて検討した。

2. 分子疫学的解析

- 1) 分離菌株は、購入地域と経時的分離の事例 (表1) で、鶏、豚、牛肉から分離された、血清型4bの8菌株とヒト髄膜炎患者の血液より分離した菌株を用いた。
- 2) 分子疫学的解析には、血清型4bの9菌株から常法により染色体DNAを抽出して、その染色体DNAとPCR産物の制限酵素による切断パターンの比較および塩基配列の解析に用いた。
- 3) PCRおよび塩基配列の解析領域 (図1) は、*iap*領域内・多型領域の687bp (SI3A, SI3B) を鋳型としたPCR・増幅DNA断片を制限酵素切断解析に用いた。塩基配列の解析には、*iap*遺伝子内の810bp (SI3A, SI4B) をターゲットとし、蛍光標識Dye primer (SI4AD, SI4BD) を用いて、その687bpをサイクルシーケンシング法で塩基配列を決定した。解析には、EGD1/2a標準株を基準に比較した。

○倫理面での配慮：ヒト髄膜炎患者の血液より分離した菌株については、すでに久留米大学・医学部・第一内科 (庄司紘史教授) で症例報告された菌株である。

C. 研究結果

1. L.mの分離株に関する血清型判別法の改良
 - 1) O抗原因子の決定に関する条件設定では、加熱処理菌の冷却条件と至適判定の凝集時間およびその凝集塊に与える影響について検討

した。その結果を表2に示した。オートクレーブによる加熱処理菌を80℃まで下げてから、氷冷、水冷および室温のいずれの条件下で冷却することにより、凝集塊の大きさと凝集までの時間についてのばらつきもなく、明瞭で安定した凝集像が観察された。

2) H抗原因子の運動性に関する選択条件の設定では、従来法で用いられていたクレーギー管の代わりにカルチャープレートを用いて、その迅速性と簡便化について検討した。その結果を図2に示した。前培養したL98-74C3とL98-82B1株を、0.2%および0.3%の寒天・BHI培地カルチャープレート・ウエルの中心部に接種して、25℃で培養した。その結果、運動性では寒天濃度0.3%よりも0.2%で大きく明瞭な層として観察された。また、運動性を示した最外層の菌を24時間ごとに継代培養することにより、その運動性は徐々に増強され、簡便・迅速に運動性の良い菌を選択することが可能であった。

3) H抗原因子の凝集反応による決定に関する条件設定では、従来法で用いられていた小試験管内凝集法を96ウエルのマイクロプレートに代えて、その簡便化を検討した。その結果を図3、4に示した。H抗原因子の運動性の検討で選択された最外層の菌をBHI培地で18時間培養した菌液と抗血清の割合を、各50と7.5 μ l一定としたBox testで、96ウエルの3種類のマイクロプレート、平底(Nunc. Co.)、U底(Sumitomo Co.)およびV底(Dynatech Co.)を用いて、菌数と各免疫血清の濃度条件を検討した。その結果、菌数と抗血清の希釈度に対応して、菌液では2.5 $\times 10^7$ /well、抗血清では2~16単位まで、1時間の反応時間で明瞭な凝集像を観察することが可能であった。この反応系では、用いた3種類のマイクロプレートで同様の結果が得られた。また、異なる血清型の菌株を用いての検討では血清型に対応して凝集像が観察され、その特異性が確認された。

2. 食肉とヒト由来血清型4b株における*iap* 遺伝子の比較解析

購入地域と経時的分離による食肉汚染事例およびヒト髄膜炎患者の血液より分離した菌株について、制限酵素切断解析による分離株の異同識別と*iap* 遺伝子内に局在する分離菌株間で多様性を示す領域の全塩基配列を決定して、その

ゲノム構造の特性を明らかにし、分子疫学的解析を試みた。

1) 制限酵素切断解析：L.m 4b株の染色体DNAについて、制限酵素Xba Iでの切断パターンを各菌株間で比較した成績を図5に示した。各事例ごとに異なる泳動パターンが見られ、ゲノム構造の異なる菌株の汚染が示唆された。また、事例Aの鶏肉と牛肉から経時的に分離されたA1とA2株および鶏肉から分離されたA3株、事例Cの鶏肉から分離されたC1株とヒト由来のH1株が同一パターンを示してた。制限酵素Pst IとBan IIIでも同様の結果が得られていることから、これらの菌株は同一菌株である可能性が示唆された。

2) PCR・制限酵素切断解析：各事例株における*iap*遺伝子領域内でのPCR・制限酵素切断解析の結果を図6に示した。事例株の内、B2とB3株以外の株では、全て切断点地図に対応した明瞭な3本のバンドが判別できた。その断片の内のB断片に微少ではあるが株間にサイズの違いによる差が認められ、切断点の欠損とは異なる反復配列の局在が示唆された。また、B2とB3株では、5本の切断断片が観察されることと切断点地図と対応しないことから、この多型領域内に反復配列構造の反復数以外に多くの点変異が局在することが示唆された。従って、この領域について塩基配列の解析を試みることにした。

3) 塩基配列の解析：*iap*遺伝子領域内407bpの各分離菌株における全塩基配列を図7に示した。この領域には、各分離菌株間で異なる点変異、挿入と欠損および反復配列構造が局在していた。各事例での9菌株のゲノム構造の比較では、その特性から、5群に分類された。また、疫学的関連性の示唆された、事例AのA1(28C1)とA2(82B1)株およびA3(295C1)、C1(229C1)株とヒト由来のH1(11H)株には各々同一のゲノム構造が局在し、その特性から同一株であることが示唆された。

4) 点変異・挿入・欠損の局在解析：多型領域での点変異と挿入・欠損の局在について、各群別で比較解析を試みた結果を図8に示した。点変異については、第1群、2群、3群で、それぞれ22,23,24箇所の点変異が局在していた。第4群の125C株では53箇所、第5群の133B株では54箇所の点変異が局在し、この点変異の相同性から大きく2群に分類された。また、挿入と欠損の局在についての解析でも、一定の方向性の

変異をとり、同様の結果が得られた。

A. 研究目的

5) 反復配列構造の特性解析：反復配列の特性を図9に示した。反復配列の構造は、基本的にACA AATの6塩基を1単位とし、ACAで終わる反復数に特徴がある。基準株のSV1/2aEGDでの反復構造と比較して、各分離菌株では、大きく3つのタイプに類別することができた。タイプ1とタイプ2は反復数が1回と2回で、共にAからGへの点変異が見られた。タイプ3はタイプ1、タイプ2と反復構造が異なり、後半部に3塩基の欠損が特徴であった。

以上の結果から、常在汚染株のゲノム構造の特性を解明し、同一株の地域局在性を明らかにした。また、地域の異なる鶏肉由来285C、229Cおよびヒト由来11H株の3分離株は、ゲノム構造と制限酵素切断解析により同一株であることと感染様式の疫学的関連性が示唆された。

D. 考察

1. L.m 汚染食品を介してヒトへの感染状況を解析するには、従来の疫学的手法に分子生物学的手法を併用した、いわゆる分子疫学的解析法による地域常在汚染菌株のゲノム構造の特性を明らかにして把握しておく必要がある。それには、できるだけ多くの菌株を分離し、その分離菌株の血清型が最も重要な基盤となるものと考えている。今回の研究において、従来用いられていた分離菌株の血清型判別法の改良を試み、カルチャープレートおよびマイクロプレートの併用による、迅速と簡便化および抗血清の微量化への条件を設定できたことは、今後の分子疫学的解析を進める上で意義あることと考える。

2. L.m の感染により、ヒトでは髄膜炎や神経症状などを併発する。また、食品を介した食中毒の集団発生も外国では多くの報告がなされている。その中で起因菌として最も多いのは、血清型4b株と1/2a株である。従って、今回の研究では、本邦で分離された食肉由来の血清型4b株とヒト髄膜炎患者由来の血清型4b株のゲノム構造の特性を明らかにし、分子疫学的解析を試みた。

地域的に異なる2カ所の店舗での汚染鶏肉由来の分離菌株とヒト髄膜炎患者の血液より分離

した菌株のゲノム構造が同一の特性で、同一の菌株と考えられた。その場合の感染経路は、汚染鶏肉あるいは加工場が汚染源で同一と考え、それが地域の異なる店舗で市販され、その鶏肉を介したヒトへの感染経路が推測される。また、事例Aの同一店舗の市販鶏肉と牛肉から約1年間の経時性で分離されたA1とA2株が同一菌株と考えられたことは、その市販食肉の加工場が同一であることから、その加工場の常在性の汚染が起きていることが推測される。地域性の常在汚染菌株のゲノム構造の特性を明らかにし、汚染状況を把握しておくことは、今後のヒトへのかんせん様式を解析する上で重要な意義をもつものと考えている。

E. 結論

1. 食肉のL.m 汚染の分子疫学的解析を実施するにあたり、地域性と経時的に汚染起因菌の分離とその血清型判定が最も重要な基礎となる。今回の研究で、従来用いられていた分離菌株の血清型判別法を、カルチャープレートおよびマイクロプレートの併用で改良し、迅速と簡便化および抗血清の微量化への利点をもつ改良法(Sahumy法)を開発した。

2. 地域性と経時的分離による疫学的関連性のある、食肉由来L.m 分離株で特にヒトでの病原性と関連のある血清型4b株とヒト由来の分離株について、iap 遺伝子領域内の多型領域のゲノム構造を明らかにした。その特性から、汚染鶏肉を介したヒトへの感染経路が示唆された。また、同一菌株による地域常在汚染の実状を明らかにした。

F. 健康危険情報

本邦において、リステリア症の散発的な発生が増加している傾向が伺われる。汚染した食肉等の食品を媒介したヒトへの感染防止対策に十分な配慮が必要かと考える。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito, A., Sawada, T., Ueda, F. and Hondo, R.: Classification of *Listeria monocytogenes* by PCR-restriction enzyme analysis in the two genes of *hlyA* and

- iap*. Microbiologica 21, 87-92, 1998.
- 2) Saito, A., Ueda, F., Sawada, T. and Hondo, R.: Characterization of *iap* gene in *Listeria monocytogenes* strains isolated in Japan. Microbiologica 23, 159-165, 2000.
- 3) Ueda, F., Sugamata, M., Aota, M., Mochizuki, M., Yamada, F. and Hondo, R.: Swift and definite serotyping for isolated *Listeria monocytogenes* strains. Microbiologica 25, (in print), 2002.

2. 学会発表

- 1) 菅又美穂、青田実生、望月眞理子、山田文也、植田富貴子、本藤良。市販食肉における *Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学（3. 血清型 4 b 株の汚染と分子疫学的解析）。第131回日本獣医学会、2001。
- 2) 小笠原邦敏、植田富貴子、望月眞理子、山田文也、青木英雄、南俊作、本藤良。*L. monocytogenes* 輸入株における疫学的解析。第132回日本獣医学会、2001。
- 3) 青田実生、菅又美穂、望月眞理子、小笠原邦敏、山田文也、植田富貴子、本藤良。*L. monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する研究（4）食肉とヒト由来血清型 4 b 株における *iap* 遺伝子の比較解析。第133回日本獣医学会、2002。
- 4) 山田文也、植田富貴子、望月眞理子、生嶋昌子、河橋幸恵、小笠原邦敏、本藤良。*Listeria monocytogenes* の非貪食性細胞侵入能に関する基礎的検討。第76回日本感染症学会総会、2002。

表1.

材料および方法

1. 材料

- 1) 市販食肉 (1996年6月～2000年6月)
 1 都5県43店舗より購入した豚肉 (108検体)、鶏肉 (149検体)、牛肉 (59検体)、
 合挽肉 (8検体) の合計324検体から分離した血清型4bの8株
- 2) リステリア症のヒト由来 (2000年9月)
 髄膜炎患者の血液より分離した血清型4bの1株

店舗	No.	検体採取日	肉の種類	分離菌株名	コード名	制限酵素* 切断パターン
事例 A	1	97.06.15	鶏肉	L97-28C1	A-1	▲
	2	98.02.22	牛肉	L98-82B1	A-2	▲
	3	00.06.19	鶏肉	L2K-295C1	A-3	●
事例 B	4	97.06.16	鶏肉	L97-42C1	B-1	
	5	98.06.29	鶏肉	L98-125C1	B-2	
事例 C	6	97.10.06	鶏肉	L99-229C1	C-1	●
	7	98.05.21	豚肉	L98-112P3	C-2	
	8	98.06.28	牛肉	L98-133B1	C-3	
ヒト	9	00.09.04	血液	L2K-11H	H-1	●

表2.

cooling condition	temp.		80°C	50°C	37°C
	strain				
ice cold	L98-82B1		43.5	45.0	
	L98-74C3		30.0	40.5	
water cooled	L98-82B1		45.0	50.0	
	L98-74C3		20.0	40.0	
room temp.	L98-82B1		39.5	59.0	32.5
	L98-74C3		35.5	77.5	37.5

(sec)

Effects of cooling condition on the agglutination of autoclaved bacterial broth. Each *L. monocytogenes* strain, L98-82B1 and L98-74C3 was removed from an autoclave at the above temperatures, and then cooled by the conditions listed at the left. Table represents the mean time (sec.) needed for the agglutination.

図 1.

L.m. *iap* 遺伝子内の解析領域

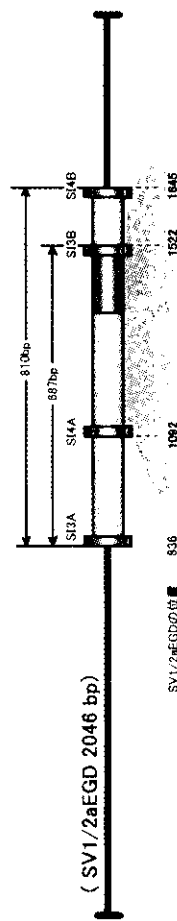
1. 分子疫学的解析

- 1) 食肉とヒト由来分離菌株から常法により染色体DNAの抽出
- 2) 染色体 DNA およびPCR増幅産物の制限酵素切断解析

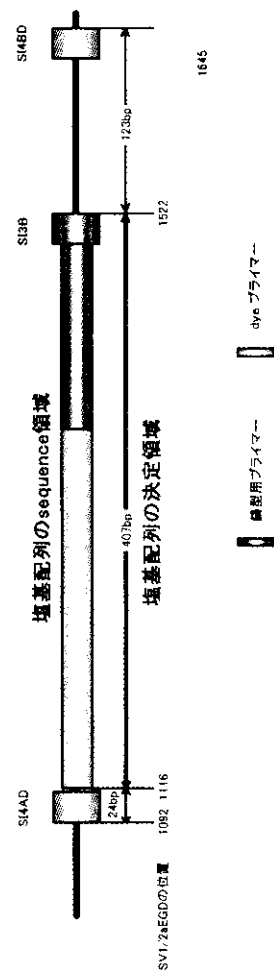
2. 塩基配列の解析

1) PCRおよび塩基配列の解析領域

(SV1/2aEGD 2046 bp)



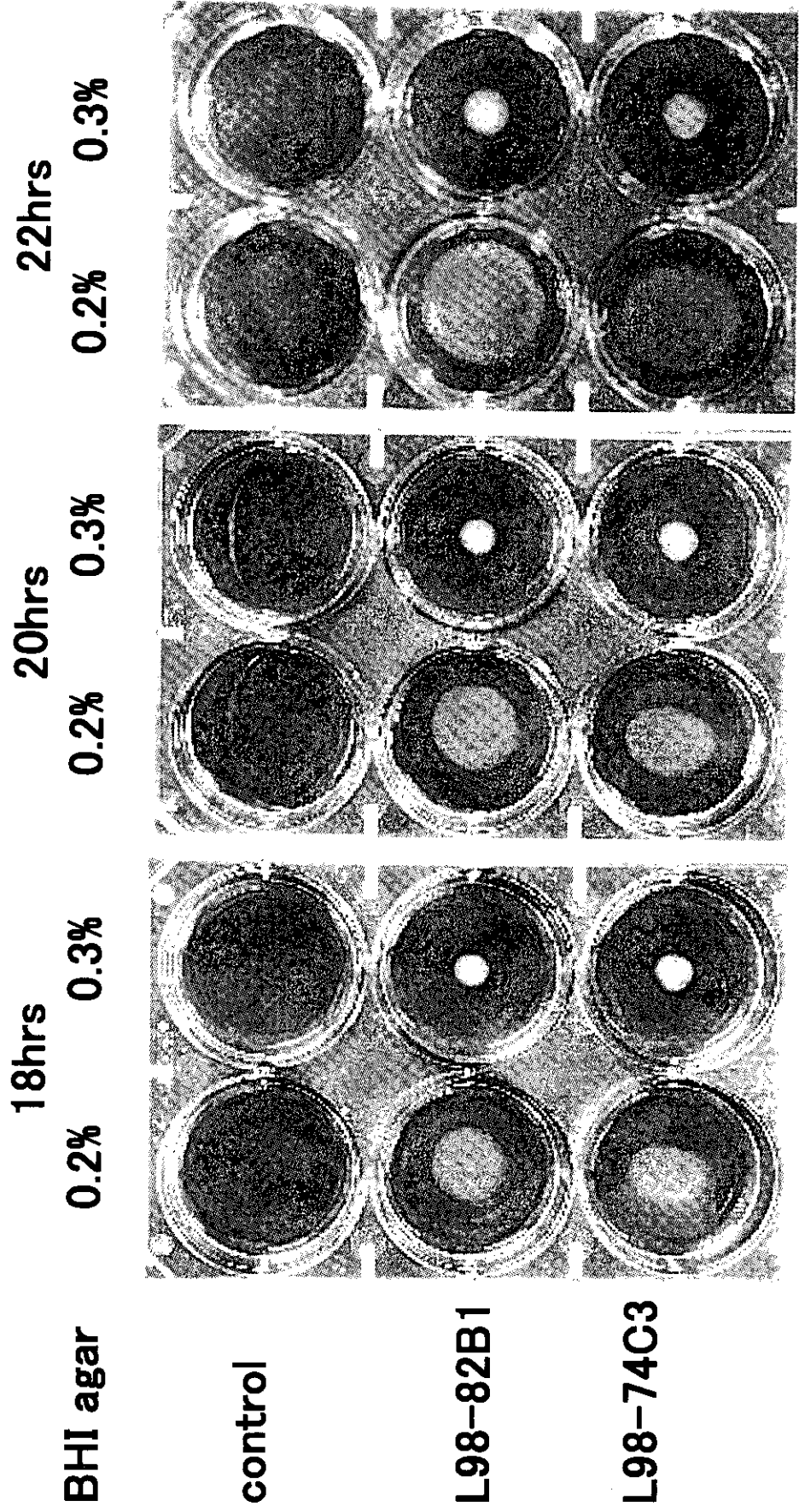
iap 遺伝子内の解析領域



2) 塩基配列の決定法

- ① プライマー; SI3A と SI4B (鑄型用; 810bp)、SI4AD と SI4BD (dye primer; 554 bp)
- ② *iap* 遺伝子内の 810bp を鑄型とし、dye primer を用いて 554 bp をサイクルシーケンシングし 407bp の塩基配列を決定して EGD 1/2a 標準株と比較解析した。

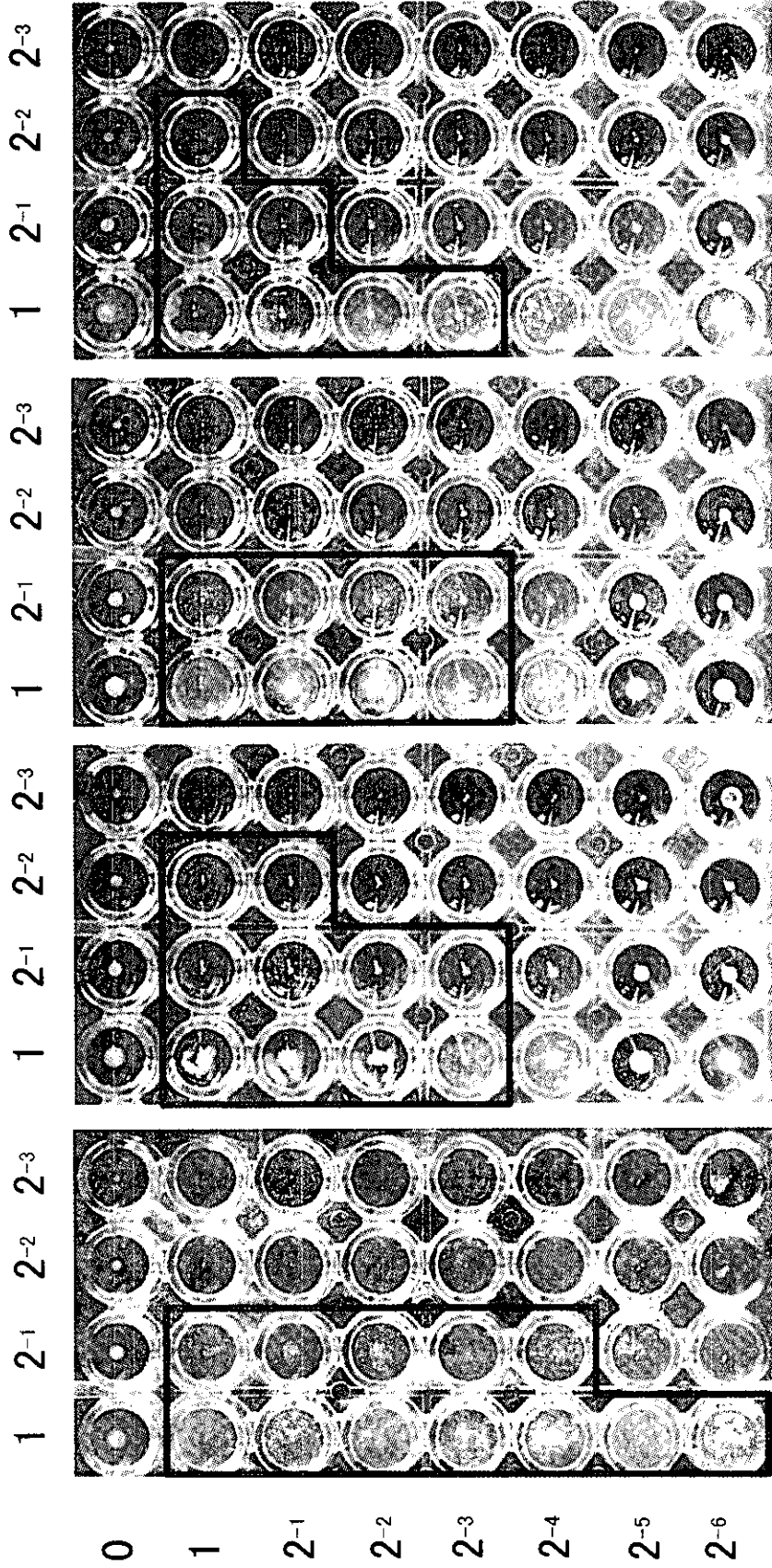
图 2.



Decision of flagella antigen using Sahumy method with culture plate.

3.

Dilution of bacterial solution



Typical results of box test with each diluted antiserum of AB, A, C and D (7.5 μ l) and bacterial broth (50 μ l) in V bottom shape microplate. Positive agglutinations were clearly observed in the indicated black box in each antiserum.