

Goat intestinal contents	0/42	0	0/42	0	The National Meat Inspection Committee, 1991
Dog feces	6/611	1.0	0/71	0	Iida <i>et al.</i> , 1998 Inoue K <i>et al.</i> , 2000
Cat feces	1/44	2.3	0/43	0	Handa <i>et al.</i> , 1989 Inoue K <i>et al.</i> , 2000
Rat	0/9	0	1/9	11.1	Katayama <i>et al.</i> , 1991b
Rat intestinal contents	13/199	6.5	N.D.	N.D.	Iida <i>et al.</i> , 1998
Wild boar	0/17	0	1/17	5.9	Katayama <i>et al.</i> , 1991b
Raccoon dogs	4/108	3.7	40/108	37	Katayama <i>et al.</i> , 1991b
Fish intestine contents	3/16	19	1/16	6.3	Momose, 1991

<sup>a</sup> No Data.

Table 6

The proportion of *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. isolation for humans

	<i>L. monocytogenes</i> 汚染された検体数		<i>L. monocytogenes</i> 汚染率(%)		<i>Listeria</i> spp. 汚染率 (%)		References
	<i>L. monocytogenes</i> 汚染された検体数	<i>L. monocytogenes</i> 汚染された検体数	<i>L. monocytogenes</i> 汚染率(%)	<i>L. monocytogenes</i> 汚染率(%)	<i>Listeria</i> spp. 汚染率 (%)	<i>Listeria</i> spp. 汚染率 (%)	
Healthy human feces	38/2970	38/2970	1.3	1.3	N.D.	N.D.	Iida <i>et al.</i> , 1998
Feces of workers at slaughterhouses	4/265	4/265	1.5	1.5	N.D.	N.D.	Takagi R <i>et al.</i> , 1989
Swab of hands and fingers of workers	0/257	0/257	0	0	3/257	1.2	Ogawa <i>et al.</i> , 1992

<sup>a</sup> No Data.

Table 7

The proportion of *L. monocytogenes*, *Listeria* spp. isolation for environment

	<i>L. monocytogenes</i> に汚染された検体数		<i>L. monocytogenes</i> 汚染率(%)		<i>Listeria</i> spp. に汚染された検体数		<i>Listeria</i> spp. 汚染率(%)		References
	汚染された検体数	検体数	汚染率(%)	検体数	汚染率(%)	検体数	汚染率(%)		
Moorings for small animals	0/2		0	1/2	50		Momose, 1991		
Disassembling place for small animals	3/6		50	5/6	83		Momose, 1991		
Disassembling place for large animals	1/5		20	3/5	60		Momose, 1991		
Materials from clean rooms	5/74		6.8	4/74	5.4		Machida, 1993		
Utensils	1/399		0.3	4/395	1		Nakama <i>et al.</i> , 1993b Handa <i>et al.</i> , 1989 Ogawa <i>et al.</i> , 1992		
Skinner for swine	1/1		100	1/1	100		Masuyama, 1991		
Saw for swine	1/1		100	1/1	100		Masuyama, 1991		
Truck for transportation	1/33		3.0	0/33	0		Masuyama, 1991		
Food of chicken	0/27		0	N.D.	N.D.		Handa <i>et al.</i> , 1989		
Sludge	9/103		8.7	N.D. <sup>a</sup>	N.D.		Katayama <i>et al.</i> , 1990 Takeshi <i>et al.</i> , 1994		
Sewage	12/283		4.2	43/274	16		Handa <i>et al.</i> , 1989 Masuyama, 1991 Momose, 1991		
Silage	0/7		0	N.D.	N.D.		Ogawa <i>et al.</i> , 1992 Takeshi <i>et al.</i> , 1992 Takeshi <i>et al.</i> , 1994		

<sup>a</sup> No Data.

Table 8

The list of serotypes of *L. monocytogenes* from domestic foods and environment

	Serovar											References			
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	4a	4b	4c	4e	6a (4f)	other				
Meat															
Beef whole pieces	2		2				2							2	Ono <i>et al.</i> , 1993
Beef sliced	12	12	33	1			18			1				4	Handa <i>et al.</i> , 1989; Iida <i>et al.</i> , 1998
Beef minced	3	2	1											1	Inoue S <i>et al.</i> , 2000
Beef entrails	2	2	1				1								Kumon <i>et al.</i> , 1999; 2000
Pork whole pieces	1	7	4				1							2	Ono <i>et al.</i> , 1993; Yamanaka <i>et al.</i> , 1993
Pork sliced	11	16	42				6							1	Iida <i>et al.</i> , 1998
Pork minced	4	2	4			3	2			8				1	Handa <i>et al.</i> , 1989; Inoue S <i>et al.</i> , 2000
Minced beef-pork	7	8	9				6	1							Inoue S <i>et al.</i> , 2000; Kumon <i>et al.</i> , 1999
Pork entrails						3				3					Handa <i>et al.</i> , 1989
Chicken whole parts	6	3	2											2	Ono <i>et al.</i> , 1993; Yamanaka <i>et al.</i> , 1993
Chicken sliced	49	27	31				15							1	Iida <i>et al.</i> , 1998
Chicken minced	4	11					4								Inoue S <i>et al.</i> , 2000
Horseflesh sliced	5	5	4											1	Iida <i>et al.</i> , 1998
Ready-to-eat														3	Iida <i>et al.</i> , 1998; Inoue S <i>et al.</i> , 2000;
Fresh seafood	14	13	1		2		13								Kawasaki <i>et al.</i> , 1992; Masuda <i>et al.</i> , 1992
Processed seafood	7	5					1								Iida <i>et al.</i> , 1998
Smoked salmon	2	2												1	Inoue S <i>et al.</i> , 2000
Shred-type cheese		9													Nakama <i>et al.</i> , 1993b
<b>sub total</b>	<b>129</b>	<b>124</b>	<b>134</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>69</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>19</b>				

Environment	Sewage							1	Handa <i>et al.</i> , 1989		
	Materials from clean rooms	5							Nakama <i>et al.</i> , 1993b		
Feces	Healthy human feces	17	9	10				2	Iida <i>et al.</i> , 1998		
	Dog feces	1	1	2				2	Iida <i>et al.</i> , 1998; Inoue K <i>et al.</i> , 2000		
	Cat feces	1							Inoue K <i>et al.</i> , 2000		
	Swine feces						3		Handa <i>et al.</i> , 1989		
Animals	Cattle carcass surface	3	11	3				6	Iida <i>et al.</i> , 1998		
	Swine carcass surface	18	26	9				3	Iida <i>et al.</i> , 1998		
	Cattle intestinal contents	4	12	3		1		20	Iida <i>et al.</i> , 1998		
	Swine intestinal contents	11	15	1				14	Iida <i>et al.</i> , 1998		
	Rat intestinal contents	2	4	2				4	Iida <i>et al.</i> , 1998		
	<b>sub total</b>	<b>57</b>	<b>82</b>	<b>30</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>51</b>		
<b>Total</b>		<b>186</b>	<b>206</b>	<b>735</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>99</b>	<b>1</b>	<b>16</b>	<b>70</b>

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

（分担研究報告書）

リステリアにおける病原株の指標となるマーカー遺伝子の検索

主任研究者 五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部室長

研究協力者 岡田由美子 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部主任研究官

広田雅光 財団法人日本冷凍食品検査協会

研究要旨

リステリアは諸外国並びに我が国でも食品、自然界から広く分離されることが知られているが、本研究事業で明らかにされつつあるように我が国に於いては欧米諸国と比べ人のリステリア症発生が集団発生のみならず散发例も少ない傾向にある。また、従来から知られているように動物の腸管内や食品から主に分離される菌と、患者由来の菌株の血清型が異なる傾向にある。過去の研究においては動物実験でそれらの血清型間に病原性の差はみられていないが、人への感染リスクが環境分離株と患者由来株である程度異なる可能性がある。本研究ではリステリアの人へのリスクを正しく評価するための手法を開発するための基礎的研究として、強毒株の指標となりうるマーカーの検索をPCR法により行った。平成13年度には主に標準株を用いたが、今回は患者由来株及び食品、動物等環境由来株をそれぞれ約100株用いて行い、病原性に関連する10種の遺伝子のPCR陽性率を比較し、指標となりうる遺伝子を検討した。

A. 研究目的

リステリア症の原因菌 *Listeria monocytogenes* は動物の腸管内や河川水等自然界に広く分布しており、また、低温増殖能や高食塩濃度耐性能を持つことから食品の一次汚染とともに製造工程での二次汚染を防ぐことも困難である。本菌の血清型は12種類に分類されるが、食品や動物の腸管内等から分離される環境由来株の血清型が1/2cを中心に多岐にわたっているにもかかわらず、患者から分離される臨床由来株の血清型の9割以上が1/2a, 1/2b 或いは4bの3血清型に属していることが知られている。過去の研究では血清型間の病原性の違いは明らかになっておらず、また、同一血清型間でも病原性の異なる株の存在が知られている。従って本菌の人への感染リスクを正しく評価するには、食品からの分離率や汚染菌量のみならず、各菌株の病原性の有無或いは強弱を判定する必要がある。しかし現在のところ、

通常のマウスを用いた病原性評価では判定に数日を要するのみならず評価能力に限界があるため、簡便で迅速な評価法が必要とされている。本研究では本菌の病原性を高感度、簡便、迅速に評価するための指標となりうるマーカー遺伝子の検索を、患者由来株及び環境由来株各約100株を対象として、PCR法を用いて行った。

B. 研究方法

1. 菌株及び培地

使用菌株の一覧を表1に示す。すべての菌株は日本国内で分離されたものである。患者由来株は98株、食品等環境由来株は101株を用いた。患者及び環境由来株ともに分与元に於いて *L. monocytogenes* と同定されたものを用い、ブレインハートインフュージョン(BHI)寒天培地及び液体培地を使って培養した。血清型別のなされていない株については、リステリア型別用免疫血清（デンカ生研）を用いてその操作

法に従って型別を行った。菌株はすべて20%グリセロール入りBHI培地に浮遊後-80℃で保存した。

## 2. DNA抽出

各菌株は1.2 mlのBHI液体培地に接種し、37℃一夜浸透培養した後遠心分離して上清を取り除いて以下の操作によりDNAを抽出した。菌体はTris/EDTA/NaClバッファーに溶解後、lysozymeとN-acetylmuramidaseで処理し、更にproteinaseKとSDSで溶菌してからフェノール/クロロホルム処理を行ってタンパク質を除去した。抽出したDNAは滅菌精製水500 µlに溶解し、1 µlをPCR反応の検体として用いた。

## 3. PCR反応

PCR反応にはTAKARA Ex Taq (宝酒造)及びその付属バッファーと、平成13年度本研究報告書p.28に示したプライマーを用いた。プライマーは主に本菌の代表的な病原因子をコードする遺伝子の一部を増幅するものを選んだ。反応液量は20 µlとし、iCycler(BIO RAD)を用いて次の条件で行った。

Step1: 94℃ 2分

Step2: (94℃ 30秒、50℃ 30秒、72℃ 30秒)を30サイクル

Step3: 72℃ 7分

電気泳動は1%アガロースゲルを用いて行い、エチジウムブロマイドで染色後撮影して結果を判定した。

## 4. 統計処理

今回の研究で得られた実験データは集計後、StatView 4.0を用いて有意差検定の解析を行った。

## C. 研究結果

使用菌株の内訳は、患者由来株においては血清型1/2aに属するものが7株(7.1%)、1/2bが21株(21.4%)、1/2cが2株(2%)、3aが1株(1%)、3bが2株(2%)、4bが65株

(66.3%)であり、環境由来株では血清型1/2aに属するものが7株(6.9%)、1/2bが35株(34.7%)、1/2cが20株(19.8%)、3bが1株(1%)、4bが37株(36.6%)、型別不能株が1株(1%)であった(表1)。

PCR陰性株が多くみられた遺伝子は*plcA*, *inlA*及び*clpC*(各PCR陽性率は41.2, 70.4及び56.8%)であり、*prfA*, *hly*, *actA*, *plcB*, *mpl*, *iap*及び*opuCA*では陽性株が比較的多く(各PCR陽性率は89.5, 91, 95.5, 98, 92.5, 97.5及び95.5%)みられた(表2)。これらの内、由来によるPCR陽性率に有意差があったものは*plcA*(PCR陽性率は環境由来株で23.8%, 患者由来株で59.2%), *inlA*(PCR陽性率は環境由来株で62.4%, 患者由来株で78.6%)及び*clpC*(PCR陽性率は環境由来株で40%, 患者由来株で74.5%)であった。また、*plcA*のPCRでは各血清型で陰性株が多くみられるなど血清型に特異的なパターンは観察されなかったが、血清型1/2cにおいて*clpC*のPCR陽性率が他の血清型より低い傾向にあった(表3)。また、食品等環境由来株の由来別にみたPCR陽性率に大きな違いはなかった(表4)。

## D. 考察

*L. monocytogenes*の病原株の指標となるマーカー遺伝子の検出を目的として本研究を行ったが、患者由来株のみでPCR陽性率が100%となる遺伝子は見いだされなかった。また、PCR陽性率が高い遺伝子は患者及び環境由来株の両者で共通している傾向が見られた。しかし*plcA*, *inlA*及び*clpC*の3種の遺伝子について患者由来株におけるPCR陽性率が環境由来株に比べ有意に高い結果が得られた。*plcA*はリステリアが細胞内で殺菌機構から逃れるために重要な酵素であるphosphatidylinositol specific phospholipase Cをコードする遺伝子であり、*inlA*は腸管上皮等の細胞への侵入に

重要な分子 *internalin A* をコードしている。  
また、*clpC* は ClpC ATPase をコードしており、細胞内での増殖のみならず *rel* 等の遺伝子と同様に高食塩濃度耐性など本菌のストレス耐性に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。その為、これらの遺伝子の保有状況や塩基配列の変異、発現量の変化などが各菌株の病原性や増殖性の相違に大きく関わっている可能性は高いと思われる。今後これらの遺伝子及びその産物について、塩基配列の多型性の解析、ハイブリダイゼーションや抗体を用いたウエスタンブロッティング等への応用を行うことにより、精度の高い有用なリステリア菌株の病原性評価法を構築しうる可能性が示された。

#### E. 結論

人におけるリステリア症のリスクを正しく評価するため、*L. monocytogenes* の病原性の指標となりうるマーカー遺伝子の検索を、環境由来株及び患者由来株各約 100 株ずつを用いて PCR 法により行ったところ、*plcA*、*inlA* 及び *clpC* の 3 遺伝子で患者由来株における PCR 陽性率が環境由来株に比べ有意に高く、本菌の病原性の指標として活用できる可能性があることが示された。

#### F. 健康危機情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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.* 2002. vol. 68, 1541-1547.



表 1. 使用菌株

由来	血清型	株数
患者	1/2a	7
	1/2b	21
	1/2c	2
	3a	1
	3b	2
	4b	65
環境	1/2a	7
	1/2b	35
	1/2c	20
	3b	1
	4b	37
	型別不能	1

表2. 各遺伝子のPCR陽性率

由来	prfA	plcA*	hly	actA	plcB	mpl	inlA*	iap	clpC*	opuCA
環境由来(101株)	93 (92.1%)	24 (23.8%)	93 (92.1%)	98 (97.0%)	98 (97.0%)	93 (92.1%)	63 (62.4%)	97 (96.0%)	40 (40.0%)	97 (96%)
患者由来(98株)	85 (86.7%)	58 (59.2%)	88 (89.8%)	92 (93.9%)	97 (99.0%)	91 (92.9%)	77 (78.6%)	97 (99.0%)	73 (74.5%)	93 (94.9%)
合計 (199株)	178 (89.5%)	82 (41.2%)	181 (91.0%)	190 (95.5%)	195 (98.0%)	184 (92.5%)	140 (70.4%)	194 (97.5%)	113 (56.8%)	190 (95.5%)

\* : 患者由来株の陽性率が環境由来株に比べ有意に高かった遺伝子

P-value:  $p < 0.0001$ (*plcA*, *clpC*),  $p = 0.0135$  (*inlA*)

表3. 血清型別にみたPCR陽性菌株数 (PCR陽性菌株数/総菌株数)

	prfA	plcA	hly	actA	plcB	mpl	inlA	iap	clpC	opuCA
由来・血清型										
環境由来										
1/2a	7/7	6/7	7/7	7/7	7/7	7/7	4/7	7/7	6/7	7/7
1/2b	34/35	6/35*	35/35	35/35	35/35	35/35	25/35	35/35	8/35	35/35
1/2c	18/20	6/20	20/20	20/20	19/20	18/20	11/20	19/20	6/20	19/20
3b	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1
4b	32/37	6/37	25/37	34/37	35/37	31/37	22/37	34/37	18/37	34/37
型別不能	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
患者由来										
1/2a	7/7	3/7	7/7	7/7	6/7	5/7	2/7	7/7	4/7	7/7
1/2b	19/21	6/21	20/21	21/21	21/21	21/21	17/21	21/21	17/21	21/21
1/2c	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	1/2	2/2
3a	0/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1	0/1	1/1	1/1	1/1
3b	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	0/2	1/2
4b	55/65	47/65	57/65	59/65	65/65	60/65	56/65	64/65	50/65	61/65

\*網掛した数値は陽性率が50%以下のものを示す

表4. 環境由来株のカテゴリ一別にみたPCR陽性率 (%)

由来 (検体数)	<i>prfA</i>	<i>plcA</i>	<i>hly</i>	<i>actA</i>	<i>plcB</i>	<i>mpl</i>	<i>inlA</i>	<i>iap</i>	<i>clpC</i>	<i>opuCA</i>
鶏肉 (24)	100	12.5	100	100	95.8	100	50	100	41.7	100
豚肉及び加工品 (39)	89.7	38.5	92.3	97.4	97.4	92.3	66.7	94.9	51.3	100
牛肉 (14)	78.6	21.4	71.4	85.7	92.9	78.6	57.1	85.7	57.1	78.6
魚介類及び加工品 (8)	100	0	87.5	100	100	87.5	75	100	0	87.5
その他食品 (11)	90.9	9.1	100	100	100	100	72.7	100	18.2	100
その他環境 (5)	100	40	100	100	100	80	60	100	20	100

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究

*Listeria monocytogenes* のパルスフィールド電気泳動による疫学的解析について

分担研究者 山本 茂貴 （国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部長）

協力研究者 青山 顕司 （雪印乳業㈱ 食品衛生研究所・主席研究員）

丸山 務 （麻布大学環境保健学部・教授）

研究要旨

*Listeria monocytogenes* は、髄膜炎や敗血症、脳膜炎など重篤な症状を引き起こすリステリア感染症の原因菌として知られている。土壌などの環境に広く分布する菌であることから日本ではその感染ルートが明確にされていないが、欧米では食品に由来する感染が認められており、本邦でも食品を感染源としたリステリア症が発生している可能性は十分に考えられる。また、これまでに本邦で実施された市販食品の検査でも食肉製品や海産加工食品などから *L. monocytogenes* が検出されており、食品が感染源として疑われる結果が示されている。

そこで、食品由来のリステリア菌とリステリア症患者由来の *L. monocytogenes* について、疫学マーカーとしてパルスフィールド電気泳動（以下 PFGE）パターンを比較解析し、リステリア症の感染ルートを探る手段としての PFGE のパフォーマンスを評価した。

PFGE の試料調製方法は、米国の Pulse Net の方法を基本として菌の培養方法に変更を加えた結果、鮮明な PFGE パターンが安定して得られた。

食品または調理環境由来株 65 株、環境由来株 1 株、臨床由来株 81 株の計 147 株について制限酵素 *ApaI* と *AscI* の PFGE パターンを比較した結果、血清型別により PFGE の識別力に差が認められた。

臨床株に多い血清型 1/2b では試験したほとんどの株で PFGE のパターンが異なり、疫学マーカーとしての有効性が確認された。

一方、同じく臨床株で多く観察される血清型 4b では多くの株の PFGE パターンは主に 2 種類のグループに分類された。パターンの細部を比較した場合にはかなりバリエーションが見られるものの、幾種かのパターンでは複数株が全く同じ PFGE パターンを示す結果となった。したがって血清型 4b では、PFGE パターンは疫学マーカーとして有効ではあるが、他のマーカーの併用が必要であると考えられた。

血清型 1/2c は、そのほとんどが食品由来株であり臨床由来株はわずかであったが、多くの株で同じあるいは類似した PFGE パターンが観察され、PFGE パターンの疫学マーカーとしての有効性は低いと考えられた。

血清型 1/2a、3a、3b、4e については例数が少なく明確な傾向を見出すことは出来なかった。

食品由来株と臨床由来株の PFGE パターンを比較した場合には、同じ血清型、同じ PFGE パターンを示すものも複数認められ、PFGE パターンと株の由来の間に関連は認められなかったことから、食品がリステリア感染症の感染源となる可能性は否定できないものと考えられた。

#### A. 研究目的

*Listeria monocytogenes* は、髄膜炎や敗血症、脳膜炎など重篤な症状を引き起こすリステリア感染症の原因菌として知られている。土壌などの環境に広く分布する菌であることから日本ではその感染ルートが明確にされていないが、欧米では食品に由来する感染が認められており、本邦でも食品を感染源としたリステリア症が発生している可能性は十分に考えられる。また、これまでに本邦で実施された市販食品の検査でも食肉製品や海産加工食品などを中心に多数の検体で *L. monocytogenes* が検出されており、食品をリステリア感染症の感染源として疑わせる結果が得られている。

一方、パルスフィールド電気泳動（以下 PFGE）は、既に多くの病原性細菌において高い識別力を有する疫学マーカーとして技術的に確立され、日本でも公立の衛生研究施設や検査施設で一般的に使用されている。そのため設備も広く普及しており、*L. monocytogenes* でも PFGE の技術が確立されれば、その利用価値は高い。*L. monocytogenes* の PFGE についてはこれまでに多くの報文があるが、国内での基準となる方法は定められていない。

そこで、本研究では *L. monocytogenes* の PFGE による株間比較の方法を確立すると共に、食品由来の *L. monocytogenes* とリステリア感染症患者由来の *L. monocytogenes* について、PFGE パターンの比較解析を行い、

リステリア感染症の感染ルート究明のための疫学マーカーとしての PFGE の利用性を評価した。

#### B. 研究方法

##### 1) 菌株

各分担研究者あるいは協力研究者から表 1 に示す 147 株の *L. monocytogenes* 菌株の提供を受けた。各株の血清型については提供者による検査結果を記載した。

##### 2) 培地および培養条件

*L. monocytogenes* の培養は Brain hert infusion (Difco) または Brain hert infusion Agar (Difco) を用いた。

PFGE 用のプラグ調製時を除き培養温度は 37°C、液体培養時は振とうし、一夜培養（約 16 時間）を行った。プラグ調製時の培養条件は次項に記載した。

##### 3) PFGE の試料調製と泳動

###### I) PFGE プラグの調製

① *L. monocytogenes* は Brain hert infusion で培養したものを種菌に用いた。試験管(φ18 mm)中の 5 ml の Brain hert infusion に種菌を 1%接種し、30°C で 16 時間静置培養した。

② 3 ml の培養物を遠心分離して沈殿を回収し、TE (pH 8) に懸濁した。再度遠心分離して沈殿を洗浄した

- 後に 0.4 ml の TE に再懸濁した。
- ③ 20  $\mu$ l の懸濁液を 980  $\mu$ l の TE に混合してその吸光度 (550 nm) を測定した。X=吸光度 (O. D. 値)  $\times$  12.5 となる値 (X) を求め、TE で②の菌懸濁液を X 倍に希釈し、プラグ調製用の菌懸濁液とした。
- ④ ③の菌懸濁液 240  $\mu$ l に 60  $\mu$ l のリゾチーム溶液 (10mg/ml) を加えて 37°C で 10 分間静置した。
- ⑤ リゾチーム処理の間に予め溶解した 1.5% アガロース (SeaKemGold) 800  $\mu$ l、プロテインナーゼ K (2 mg/ml) 100  $\mu$ l、10% SDS 100  $\mu$ l を混合して 53°C に保温した。
- ⑥ リゾチーム処理を終えた菌懸濁液 (300  $\mu$ l) に保温しておいた⑤のアガロースミックス 300  $\mu$ l を添加混合してプラグモールド (BioRad) に分注し、固化させた。
- ⑦ 50 ml 容量のファルコンチューブに 4 ml の溶菌溶液を入れ、固化したプラグを浸漬して 53°C の恒温水槽中で 2 時間往復振とう (200 rpm) した。
- <溶菌溶液>
- |       |                            |
|-------|----------------------------|
| 75 ml | 蒸留水                        |
| 5 ml  | 1M Tris-HCl (pH8)          |
| 10 ml | 0.5M EDTA (pH8)            |
| 10 ml | 10% Sodiumlauryl sarcosine |
| 15 mg | Proteinase K               |
- ⑧ 50 ml ファルコンチューブに 53°C に加温した 15 ml の滅菌水を入れ、そこにプラグを入れて 53°C の恒温水槽中で 200 rpm で振とう (往復) し、10 分間洗浄した。

- ⑨ 温湯を交換して再度洗浄した。
- ⑩ 同様にして TE で 4 回洗浄した。ただし洗浄時間は各 15 分間行った。

#### II) 制限酵素切断

制限酵素は *ApaI* (タカラバイオ株)、*AscI* (New England Biolabs Inc)、*SmaI* (タカラバイオ株) を用いた。緩衝液はそれぞれのメーカーの添付のものを指示通りの濃度で用いた。プラグを含めて総容量を 300  $\mu$ l となるように酵素反応液を調製した。酵素の添加濃度と反応温度、反応時間は以下の通りとした。*ApaI* (200 U 30°C、5~16 時間)、*AscI* (37°C、3~16 時間)、*SmaI* (25°C、16 時間)

#### III) P F G E 泳動条件

PFGE の泳動装置は、CHEF Mapper System (BioRad Laboratories) を用いた。

泳動条件は以下の通りとした。

緩衝液 :  $\times$  0.5TBE

アガロース : SeakemGold Agarose 1%

Gradient : 6.0 V/cm

Angle : 120°

Ramping factor : Linear

Switch time : *ApaI* 4 sec-40 sec

*AscI* 4 sec-40 sec

*SmaI* 2.16 sec-11.15 sec

泳動時間 : *ApaI* 22 時間

*AscI* 22 時間

*SmaI* 27 時間

#### IV) P F G E のイメージ処理

泳動を終了した PFGE ゲルは UV トランスイルミネーター上でプリントグラフ (アト一株) により写真撮影を行い、得られたイメージは BMP ファイルとしてコンピューターの記録装置に保管した。

### C. 研究結果

## 1. PFGE の条件検討

*L. monocytogenes* の PFGE に関する報告は、数多く行われている。米国が進める Pulse Net (コンピューターネットワークによる全米から利用可能な食中毒細菌の PFGE データベース) では、Brosch らの報告を基にして条件検討を行い、迅速で再現性が高く比較しやすい PFGE 手法を確立している (Graves L.M., Swaminathan B., Int. J. Food Microbiol. 65 (2001) 55)。

そこで、米国 Pulse Net の手法を基本として PFGE の試料調製および電気泳動条件を検討した。

### 1) 培養条件

常に安定した PFGE パターンを得るには溶菌を安定化する必要がある、培養条件が大きく関与する。米国 Pulse Net では、Brain hart infusion Agar の平板上のコロニーを用いることで溶菌の安定化を図っている。しかし、多検体を扱うには液体培養の方が培地の準備が簡便で培養スペースも少なく、有利である。そこで、液体培地での培養を検討した。

*L. monocytogenes* の至適生育条件は 37°C での振とう培養であるが、同条件で一夜培養した場合には、吸光度によって菌体濃度を揃えても図 1 に示したように検体ごとに PFGE バンドの濃淡が大きく異なる結果となった。これは過度の培養により溶菌が阻害される場合があるためと考えられるが、作業効率上は一夜培養 (16 時間程度) が望ましい。

そこで、Brain hart infusion 培地で温度と振とう条件を変えて PFGE パターンの安定性を比較した結果、30°C で一夜静置培養することで PFGE バンドの濃さが安定化し、寒天平板上での培養と同等レベルで PFGE

パターンが再現性良く得られることが判明した。(図 2)

本研究に用いた 147 株のほとんどはこの培養方法で鮮明な PFGE パターンを得ることができた。しかし、稀にこの培養方法で明確な PFGE バンドが得られない場合があった。その場合には 30°C で一夜静置培養した種菌を新しい Brain hart infusion 培地に O.D. 550=0.3 となるように接種して 37°C の振とう培養を行い、対数増殖期中期まで培養 (3 時間程度) することでいずれも鮮明な PFGE パターンを得ることができた。

### 2) 制限酵素の選定

これまでに報告されている *L. monocytogenes* の PFGE に関する報文のほとんどは、*ApaI*、*AscI*、*SmaI* のうちのいずれかを単独もしくは組み合わせて使用している。そこで、これら 3 種類の制限酵素を用いて全 147 株の PFGE パターンを比較した。その結果、*ApaI* と *AscI* は、10-20 本程度のバンドが広い分子量域に分散しており、共通の条件で泳動可能であることが確認できた。一方 *SmaI* で切断した場合には 300kb 以下の領域に 25 本以上のバンドが現れ、その多くが 150kb 以下の領域に密に集中することが確認された。(図 3) そのため、*SmaI* は *ApaI* や *AscI* と同一条件では泳動できない。また、バンド数が多いうえに低分子量のバンドは拡散しやすいことから、パターンが鮮明でなく、異なる試料間の比較が難しいことが明らかとなった。

## 2. PFGE パターンの分類と比較

### 1) PFGE パターンの分類

被検株 147 株の PFGE パターンについて *ApaI* で切断した場合と *AscI* で切断した場合についてそれぞれ株間比較を行い、各



PFGE パターンのグループ分けを実施した。*Sma*I については PFGE バンドが不明瞭なものが多くあり、すべてのパターンを正確に比較することは困難なことからグループ分けは実施しなかった。

グループ分けは、それぞれの PFGE の泳動イメージをウェルとサイズマーカー (λDNA ラダー) の位置を目印としてコンピュータ上で画像を調節して対合させ、それぞれの検体のバンドパターン比較を行った。グループ分けは高分子側から低分子側まで全体のイメージを目視比較して類似するものを揃えるようにして実施したが、結果的には同じグループ内の検体では低分子側のバンドパターンが良く一致するものが多く見られ、比較的高分子側にバンドパターンのバリエーションが見られる傾向があった。

全体としてほぼ同じバンドパターンと見られるものを PFGE グループとしてまとめ、その中でバンドに違いのあるもの (バリエーション) を PFGE パターンとして分類した。

図 4 に *Apa*I のグループ分けとグループ内バリエーションを示した。*Apa*I で切断した場合には試験した 147 株の *L. monocytogenes* が 13 グループに分類され、全バリエーションを細分すると PFGE パターンは 55 種類に分類された。

図 5 には *Asc*I のグループ分けとグループ内バリエーションを示した。*Asc*I で切断した場合には、147 株が 9 グループに分類され、PFGE パターンは 59 種類に分類された。

*Apa*I 切断で分類した 13 グループと *Asc*I 切断で分類した 9 グループを組み合わせると全 147 株を PFGE グループに分類することができた (表 2)。

また、*Apa*I の PFGE パターン 55 種と *Asc*I

の PFGE パターン 59 種それぞれを組み合わせると全 147 株を分類した場合には、76 種類の組み合わせパターンに分類することができた (表 2)。

## 2) PFGE パターン分類結果の解析

*L. monocytogenes* 147 株を *Apa*I と *Asc*I の PFGE 泳動パターンで分類した 76 種類組み合わせについて、他の因子との関連について解析を行った。

### ①血清型と PFGE パターンの関連性

表 2 から、同じ血清型の中に異なる PFGE パターンが存在し、同じ PFGE パターンの中にも異なる血清型が含まれる場合が見られた。そこで、PFGE パターンを血清型別に整理してみた。(表 3)

血清型 1/2b については、*Apa*I と *Asc*I のグループを組み合わせると 18 種類のうちの 12 種類が含まれており、しかも同じグループ内でも多彩なバリエーションが見られることがわかる。また、食品由来株と臨床由来株が混在しているが、12 番のグループを除き同一グループ内での混在は見られなかった。

血清型 1/2a については 13 株と例数が少ないが、*Apa*I と *Asc*I の組み合わせグループで 4 種類に分類された。9 番のグループ内で 46 番の PFGE パターンが 3 株揃った以外は同一グループ内でもバリエーションがみられる。46 番の PFGE パターンでは食品由来株と臨床由来株の混在が認められた。

血清型 1/2c については 28 株が *Apa*I と *Asc*I の組み合わせグループでわずか 2 種類に分類された。しかもバリエーションに乏しく、66 番のパターンが 19 株も揃った。28 株中 26 株が食品由来株であった。

血清型 4b については、64 株と例数が多いにもかかわらず、*Apa*I と *Asc*I の組み合わせ

グループでほとんどの株が3番または4番の2つのグループに分類された。他にはグループ11番とグループ17番が1株ずつ、グループ13番が2株であり、これらを合わせてもわずか5種類のグループであった。グループ内のバリエーションは33パターンあったが、PFGEパターン12番、14番、28番、30番、33番、34番、36番などが3株から10株を含むクラスターを形成していた。PFGEパターン28番と30番において同じPFGEパターンの中に食品由来株と臨床由来株の混在が認められた。

血清型3a、3bと4eについてはそれぞれ3株、2株、4株と傾向を述べるには例数が少ないが、3a、3bではそれぞれ*ApaI*と*AscI*の組み合わせグループは1種類のみであった。

#### ②PFGEパターンの採取年代との関連

今回調査した147株の内、採取年月日が不明の12株と海外で分離されたScottA株を除く134株は1986年から2002年の16年間に採取されている(表4)。ただし、食品由来株に関しては、そのほとんどが1999年と2000年の2年間で採取されており経年推移を見ることはできないことから、臨床由来株のPFGEパターンの経年推移を調べてみた。

76種類のPFGEパターンのうち、クラスター形成が認められるパターンに属する株の採取年代は以下の通りであった。PFGEパターン30番は1988年-2002年、6番、12番と28番は1989年-2002年で採取されている。PFGEパターン別ではクラスターを形成している一群も年代別で見た場合には比較的分散しており、ある遺伝型(PFGEパターン)が特定の年代にブレイクしている訳ではないことが判明した。

#### ③食品由来株と臨床由来株の比較

食品由来株は13グループ、34パターンに分類され、臨床由来株は15グループ、49パターンに分類された。*ApaI*と*AscI*を組み合わせた18のPFGEグループ中の8グループで食品由来株と臨床由来株が混在していた。さらに詳細に分類したPFGEパターン別に見た場合には76パターン中の5パターンで両由来株の混在が認められた。

#### D. 考察

米国のPulse Netで*L. monocytogenes*のPFGEに用いられている手法は日本で採取した*L. monocytogenes*の検体に対しても有効であることが確認された。また、液体培養を行った場合でもBrain hert infusion培地中で30℃一夜静置培養を行うことで鮮明なPFGE泳動パターンを得ることができた。

*ApaI*のPFGEグループと*AscI*のPFGEグループはそれぞれ連動して変化する場合が多いが、どちらか一方のみが変化する組み合わせもあり、組み合わせることで識別可能なPFGEパターンの範囲を広げることができた。

*SmaI*もバンド数が多く、株間識別を行う上で有効な制限酵素であるが、泳動条件が前記2酵素と異なることから同じゲル上で同時に泳動することはできない。また*ApaI*と*AscI*に比較して低分子量域での比較になることからバンドが不鮮明になり易く、PFGEパターンをデータベース化して時間的、環境的に異なる結果を比較する場合には不都合を生じやすいと判断した。ただし、*ApaI*と*AscI*で識別できない場合に*SmaI*での比較を試みることは有効と考えられる。

*ApaI*や*AscI*のPFGEパターンを対合してグループ化してみると、主に低分子量域で

グループに共通なバンドパターンが見られ、高分子量域では共通なバンドが幾つかある中に何本かのバンドに差が認められる場合が多かった。これは、染色体断片の長さが長い（高分子側の DNA 断片）ほど塩基配列に変異が生じる確率が高いことによると考えられる。

分類した PFGE パターンを血清型別に整理した場合にまず目立つのは、1/2c であり、そのほとんどは食品由来株（肉またはその加工場）である。PFGE グループとしては 10 番、14 番の 2 グループのみからなり、PFGE パターンの 66 番が大きなクラスターを形成している。したがって、この血清型を示す株について疫学的な識別を行う場合は PFGE のみでは不十分である可能性が高くなるが、臨床株でこの血清型を示すものは稀である。

一方、臨床株で多く見られる血清型の 1/2b はバラエティーに富む PFGE パターンを示しており、食品由来、臨床由来を問わず特にクラスターのようなものは見られない。この血清型の場合には、疫学的な追跡調査において PFGE がかなり有効なツールになるものと考えられる。

血清型 1/2a の場合には例数が少なく、臨床株は 5 株しか含まれないために傾向を判断することは難しい。今回の調査の範囲では PFGE グループに偏りが見られたが、PFGE パターンとしてはバリエーションが見られた。

血清型 4b は臨床上重要な株であるが、今回の検体では食品からも多く分離されている。PFGE のグループとしては、ほとんどの株が 3 番と 4 番に分類されるという特徴が見られた。また、さらに詳細に PFGE パターンの分布を見た場合には、多くのバリエー

ションが観察されるものの、幾つかのパターンがクラスターとして存在していることが判明した。したがって、血清型 4b の株に対しても PFGE は有効な疫学マーカーとなり得るが、これらのクラスターを形成する PFGE パターンが観察された場合に株の同一性を述べるには、他の疫学マーカーを併用することが必要になると考えられる。

血清型 3a、3b、4e については例数が少なく傾向は述べられない。今後のデータ蓄積による調査が求められる。

PFGE パターンは、染色体 DNA 全体の構造を反映するものと考えられることができるが、血清型はエピトープを司る特定の遺伝子の多形を見るものと考えられることができる。染色体構造の分化と血清型の分化は独立して起こっていると考えられ、血清型と PFGE パターンは疫学マーカーとして相補い合う関係と考えられる。表 2 の結果から、実際に同じ血清型内に異なる PFGE パターンが存在し、同じ PFGE パターン中にも異なる血清型が存在することが確認できた。

しかし、臨床的に重要な血清型 1/2b と 4b を比較した場合に、血清型 4b では PFGE グループにかなりの偏りが見られた。この原因は分化が生じた時期の違いによるものと推測できる。すなわち、1/2b はより古くから存在していたために染色体構造が異なる多くの株に拡散しており、4b は比較的新しく出現したために幾つかの特定の染色体構造を持つ株に多く見られるのではないかと推定できる。

食品由来株と臨床由来株の PFGE グループを比較した場合には、血清型 1/2c の 14 番を除き構成株数の多いグループでは両者が混合して存在しており、株の由来と PFGE グループ間の関連性は認められなかった。

一方、PFGE パターンレベルで見た場合には、多くの場合 (71 パターン/76 パターン) で食品由来株と臨床由来株では別のパターンを示した。しかしながら、今回試験した株は食品由来株と臨床由来株が時間的、空間的に離れて採取されており、むしろ別の PFGE パターンを示して当然と考えられる。にもかかわらず少例ながら食品由来株と臨床由来株が同一血清型かつ同一 PFGE パターンを示すケース (PFGE パターン 28 番、30 番、49 番) も見られており、食品由来株がリステリア感染症の感染源になる可能性を否定することはできないものと判断される。

#### E. 結論

1. 米国の Pulse Net で用いられている手法を基本として、簡便迅速な PFGE 試料調製方法を確立した。平板培養の代わりに液体培養で再現性良く鮮明なバンドパターンが得られた。また、制限酵素は *ApaI* と *AscI* の組み合わせが有効であった。

2. PFGE パターンは、血清型 1/2b においてほぼ株ごとに異なるパターンが観察され、疫学マーカーとして有効であると考えられた。

2. 血清型 4b では、いくつかの特定の PFGE パターンにおいて由来や採取時期の異なる複数の検体が含まれていた。そのようなパターンが検出された場合には他の疫学マーカーの併用が必要である。

3. 血清型 1/2c 株では同じ PFGE パターンを示す食品由来株が多数認められた。同血清型を試験する場合には他の疫学マーカーが必要である。

3. 食品由来株と臨床由来株の比較では、それぞれの由来と PFGE グループの間に特

定の関連は認められなかった。また、食品由来株と臨床由来株が同一血清型かつ同一 PFGE パターンを示す場合も複数認められており、食品由来株がリステリア感染症の感染源になる可能性については否定できないものと判断した。

#### F. 健康危険情報

*L. monocytogenes* について食品由来株と臨床由来株を比較した場合に、PFGE パターンが全く同一である株が複数見出された。このことは、両者の大まかな染色体構造が同一であることを示すと考えられる。食品とリステリア感染症の関連性や *L. monocytogenes* の病原因子の詳細について更に調査が必要と考える。

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

その他

なし