

2) PCRおよび塩基配列の解析領域は、*iap* 遺伝子領域内とし、分離株間で多型を示す687bp (SI3A、SI3b) をターゲットにして解析した(図1)。各菌株から抽出した染色体DNAを鋳型とし、そのPCR・増幅DNA断片について制限酵素切断解析法による各菌株の分類を行った。

3) 塩基配列の解析は、*iap* 遺伝子内の810bp (SI4A、SI4B) をターゲットとし、蛍光標識Dye primer (SI4AD、SI4BD) を用いて、その407bpについてサイクルシーケンシング法で塩基配列を決定した。解析では、EGD1/2a 標準株を基準に比較した。

○倫理面での配慮：ヒト・リステリア症由来の各分離菌株については、すでに、東京大学医学研究所・移植外科(銘形和彦助手、現職・メデカルクリニック中目黒・院長)および久留米大学・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. 食肉とヒト由来血清型1/2a株における *iap* 遺伝子の構造解析

購入地域と経時的分離による食肉汚染事例およびヒト・リステリア症由来の分離菌株について、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：各分離 *L.m.* 1/2a 株の染色体DNAについて、制限酵素での切断パターンを各菌株間で比較した。制限酵素切断解析では、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。その成績を図2 (Pst I)、図3 (Ban III)、図4 (Xba I) に示した。

ヒト・リステリア症由来の株間での解析では、同一症例HM1とHM2株が同一で、症例の異なる12H株とは異なるパターンを示した。また、ヒト・リステリア症由来の同一症例HM1とHM2株と事例Aの豚肉由来株(11P1)および鶏肉由来株(80C1)間で同一の泳動パターンが観察された。同様に、髄膜炎・症例由来の12H株は、異なる店舗(事例D、H)で分離された鶏肉由来の2株(186C1、188C3)と同一のパターンを示し

た。その結果を図5、図6に示した。

また、食肉由来株間では同一店舗、異なる店舗由来株(事例A店：76P2、78P5、89C5株、B店：183P1株、G店：312B1株、およびA、B、C、E店：104P5、213C1、221C1、268C1株)間で同一の泳動パターンが得られた。その結果を図7、図8に示した。

以上の解析により、ヒト・リステリア症の感染様式に地域常在汚染と汚染食肉の関連性が示唆された。

2) 塩基配列の構造特性では、解析領域における各分離菌株の全塩基配列を決定した(図9)。この解析において、各分離株間における異なる点変異、挿入と欠損および反復配列の反復数の局在を明らかにした。また、各分離株間において、*iap* 遺伝子内の多型領域における点変異と挿入・欠損のゲノム構造の特性では、0~9点の点変異、6塩基の挿入(AATACA)および6塩基(ACA AAT)を一単位とする反復数1~5回の反復配列構造の局在で、これらにより9群に分類することが可能であった(図10、図11)。

以上の成績を表3にまとめた。これにより、地域常在汚染菌株のゲノム構造の特性を明らかにし、9群に分類した。また、ヒト・リステリア症の感染様式に地域常在汚染と汚染食肉の関与が示唆された。

2. 輸入食肉由来 *Listeria monocytogenes* 分離株における *iap* 遺伝子領域のゲノム構造の解析

汚染輸入食肉を介して国内の加工場や調理場などが汚染され、外国菌株が国内で常在性の汚染過程をとり食肉を含めた加工食品が二次汚染を起こすことが懸念される。従って、輸入食肉由来 *Listeria monocytogenes* (*L.m.*) 分離株(外国株)の特性を知ることは重要なことである。今回、これまでに、各国の汚染輸入食肉からの分離菌株について、*iap* 遺伝子内・多型領域のゲノム構造を解明し、株間の識別と地域(輸出国)特性について分子疫学的解析を試み、以下の結果を得た。

1) 食肉輸出国(カナダ、米国、デンマーク、アイルランド、中国、ブラジル)由来 *L.m.* 分離菌株の制限酵素による切断解析では、同一の食肉由来の株間および同一の血清型間において、異なる制限酵素切断パターンが観察され、

各国由来株のゲノム構造が異なることが示唆された(表4、図12、13)。

2) 各国由来15株でのゲノム構造の比較解析では、領域内に局在する点変異、欠損、挿入の部位と数および反復配列構造の反復単位と反復数が株間で異なり、そのゲノム構造の特性を明らかにした(図14)。

3) 同一検体から分離されたカナダ(CA)から輸入の豚肉由来の血清型1/2aの2株(351-8、351-12)および中国(CN)から輸入の鶏由来の血清型1/2bの2株(350-12、350-13)の解析では、制限酵素パターンが異なっていた。また、ゲノム構造の解析では、それぞれの各株間で異なる点変異、欠損、挿入、反復配列構造を有していた。このことから輸出国において、同一血清型の株による複合汚染が常在していることが示唆された(図12、15、16、17、表4)。

以上の結果から、汚染・輸入食肉由来L.m分離株の特性を明らかにした。今後、国内における汚染・食肉由来の分離菌株の特性と対比することにより、より詳細な汚染と感染の様式などの分子疫学的解析が可能になるものと考えられる。

D. 考察

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り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することが重要である。

1) L.mの感染により、ヒトでは髄膜炎や神経症状などを呈する。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、1/2b株である。従って、今回の研究で、本邦で分離された食肉由来の血清型1/2a株およびヒト・リステリア症で敗血症や髄膜炎を併発した患者由来の血清型1/2a株のゲノム構造の特性を明らかにし、その分子疫学的解析から、ヒト・リステリア症の感染に地域常在性の汚染食肉の関与が示唆される結果を得たことは、今後の汚染過程や感染様式の疫学的関連性を解析する上で意義がある。

2) 本邦における、L.m汚染分離株の分子疫学的解析により、汚染食肉の加工場と市販店舗との関連性、飼育場や加工場における常在性の汚染や複合汚染の局在を指摘してきた。一方で

は、汚染輸入食肉を介して国内の加工場や調理場などが汚染され、外国菌株が国内で常在性の汚染過程をとり食肉を含めた加工食品が第二次汚染を起こすことが懸念される。従って、輸入食肉由来L.m分離株(外国株)の特性を知ることが、食品を介してのヒトへの感染リスクを考察する上で重要なことである。今回、これまでに、各国の汚染輸入食肉から保税段階で分離した菌株について、iap遺伝子内・多型領域のゲノム構造を解明し、その株間の識別と地域(輸出国)の特性を明らかにしたことは、外国での常在性汚染の状況を知り得たことで意義がある。

E. 結論

食肉のL.m汚染の分子疫学的解析を実施するにあたり、地域性と経時的な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。今回の研究で以下の結果が得られた。

1) 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分離菌株で、特にヒトでの病原性と関連のある血清型1/2a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、ヒト・リステリア症の感染に地域常在性の汚染食肉の関与が示唆される結果を得た。

2) 2001年に輸入した食肉(保税段階)から各血清型のL.mを分離した。その輸出国、カナダ(4株)、米国(2株)、デンマーク(1株)、アイルランド(1株)、中国(6株)、ブラジル(1株)由来の分離菌株について分子疫学的比較解析を試み、各国での常在汚染および複合汚染の実態とその菌株のゲノム構造の特性を明らかにした。

F. 健康危険情報

本邦において、常在性汚染による食品の汚染の蔓延と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. *Listeria monocytogenes* の非貪食性細胞侵入能に関する基礎的研究。山田文也、植田富貴子、望月真理子、生嶋昌子、河橋幸恵、小笠

原邦敏、本藤良。感染症学雑誌76臨時増刊号 p.137 (第76回日本感染症学会総会学術講演抄録)。

2. *Listeria monocytogenes*汚染の分子疫学に関する基礎的研究(4)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。青田実生、菅又美穂、望月真理子、小笠原邦敏、山田文也、植田富貴子、本藤良。第133回日本獣医学会。2002.3.28~30。(講演要旨集p.129)

3. 輸入食肉由来 *Listeria monocytogenes* 株における*iap*遺伝子のゲノム構造の解析。小笠原邦敏、植田富貴子、落合由嗣、望月真理子、山田文也、青木秀夫、南俊作、本藤良。第134回日本獣医学会。2002.9.19~21。(講演要旨集 p.199)

4. リステリア脳幹脳炎と分離株のゲノム解析。中尾栄男、今泉登史宏、藤本浩、三浦夕美子、綾部光芳、庄司紘史、本藤良、植田富貴子。第7回日本神経感染症学会。2002.10.4~5 (学術集会・抄録集p.47)

5. Swift and definite serotyping for isolated *Listeria monocytogenes* strains. Fukiko UEDA, Miho SUGAMATA, Miki AOTA, Mariko MOCHIZUKI, Fumiya YAMADA and Ryo HONDO. Microbiologica 25, 165-171, 2002.

6. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* contamination in marketed Japanese meat. Fukiko UEDA, Reiko ANAHARA, Fumiya YAMADA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu OCHIAI and Ryo HONDO. Microbiologica (submitted).

7. Evaluation of the assay for cell invasion of *Listeria monocytogenes* using the cell lines of Caco-2 and Vero cells. Fumiya YAMADA, Kunitoshi OGASAWARA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu OCHIAI, Fukiko UEDA, Tetsutaro SATA and Ryo HONDO. Archive of Microbiology (submitted).

8. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes*, serovar 4b: Relation among the strains isolated from a patient and marketed Japanese meat. Fukiko UEDA, Miho SUGAMATA, Miki AOTA, Fumiya YAMADA, Kunitoshi OGASAWARA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu OCHIAI and Ryo HONDO. Food Protection (submitted).

9. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes*, serovar 1/2a: Relation among the strains isolated from a patient and marketed Japanese meat. Fukiko UEDA, Kyoko YUGAMI, Fumiya YAMADA, Kunitoshi OGASAWARA, Mariko MOCHIZUKI, Yoshitsugu OCHIAI and Ryo HONDO. Food Protection (submitted).

表1

材料と方法(1)

1. 材料

1) 市販食肉 (1996年6月～2000年6月)

1 都5県41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1/2aの17株

2) リステリア症のヒト由来

敗血髄膜炎患者(1996年)の動脈血と糞便、および髄膜炎患者(2002年)の髄液より分離した
血清型1/2aの3株

事例名	No.	肉の種類	検体採取日	分離菌株名
ヒト由来	1	血液	960318	L96 - HM 1
	2	糞便	960408	L96 - HM 2
	3	髄液	020000	L2K1 - 12H
A	4	豚肉	960624	L96 - 11P1
	5	豚肉	980210	L98 - 76P2
	6	豚肉	980211	L98 - 78P5
	7	豚肉	980417	L98-104P5
	8	鶏肉	980213	L98 - 80C1
B	9	鶏肉	980311	L98 - 89C5
	10	豚肉	990612	L99-183P1
	11	鶏肉	990620	L99-213C1

事例名	No.	肉の種類	検体採取日	分離菌株名
C	12	牛肉	990613	L99-173B3
	13	鶏肉	990620	L99-221C1
D	14	鶏肉	990613	L99-186C1
	15	鶏肉	000611	L2K-265C1
E	16	鶏肉	990620	L99-223C3
	17	鶏肉	000611	L2K-268C1
F	18	鶏肉	000619	L2K-307C1
	19	牛肉	000611	L2K-312B1
H	20	鶏肉	990614	L99-188C3

表2

輸入L.m株の血清型と由来

Exp. No	分離株名	血清型	肉種	国
1	351-8	1/2a	豚肉	CA:カナダ
2	351-12	1/2a		
3	343-10	1/2a	鶏肉	US:米国
4	343-11	1/2a		
5	334-12	1/2a	豚肉	DK:デンマーク
6	347-13	1/2a	豚肉	IE:アイルランド
7	350-14	1/2a	鶏肉	CN:中国
8	332-8	1/2b	牛肉	CA:カナダ
9	332-9	1/2b		
10	350-12	1/2b	鶏肉	CN:中国
11	350-13	1/2b		
12	350-10	3a		
13	350-8	3b		
14	350-11	3b		
15	346-10	4b	鶏肉	BR:ブラジル

図1

材料および方法 (2)

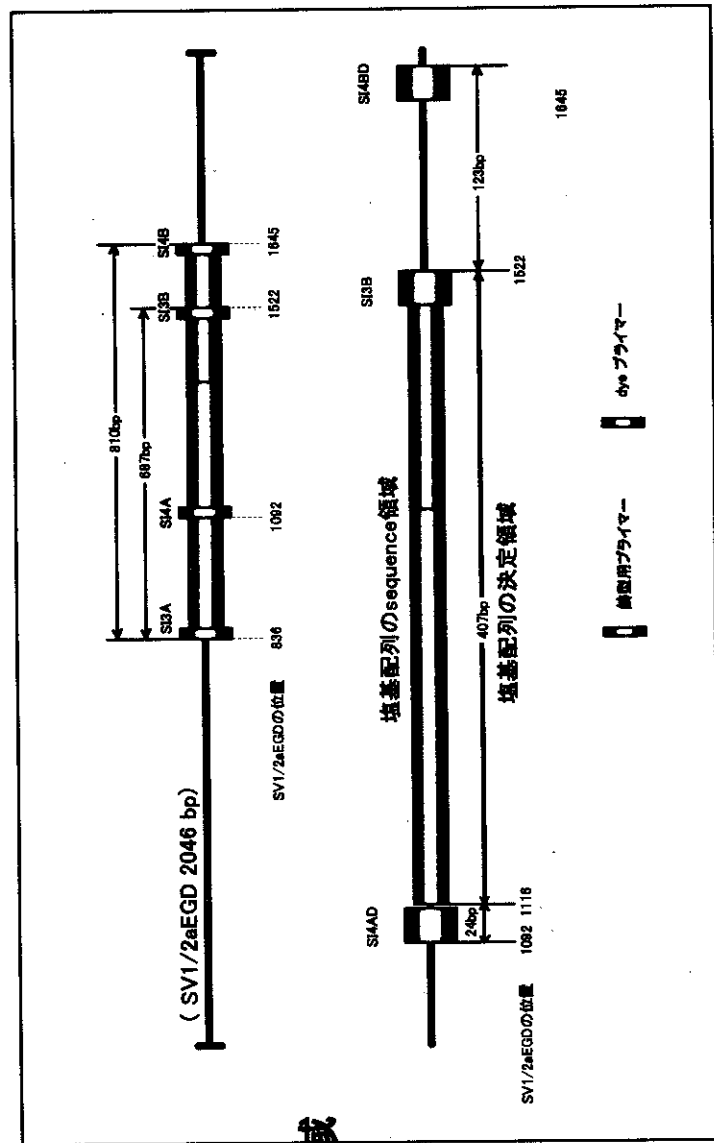
1. 分子疫学的解析

- 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

iap 遺伝子内の解析領域

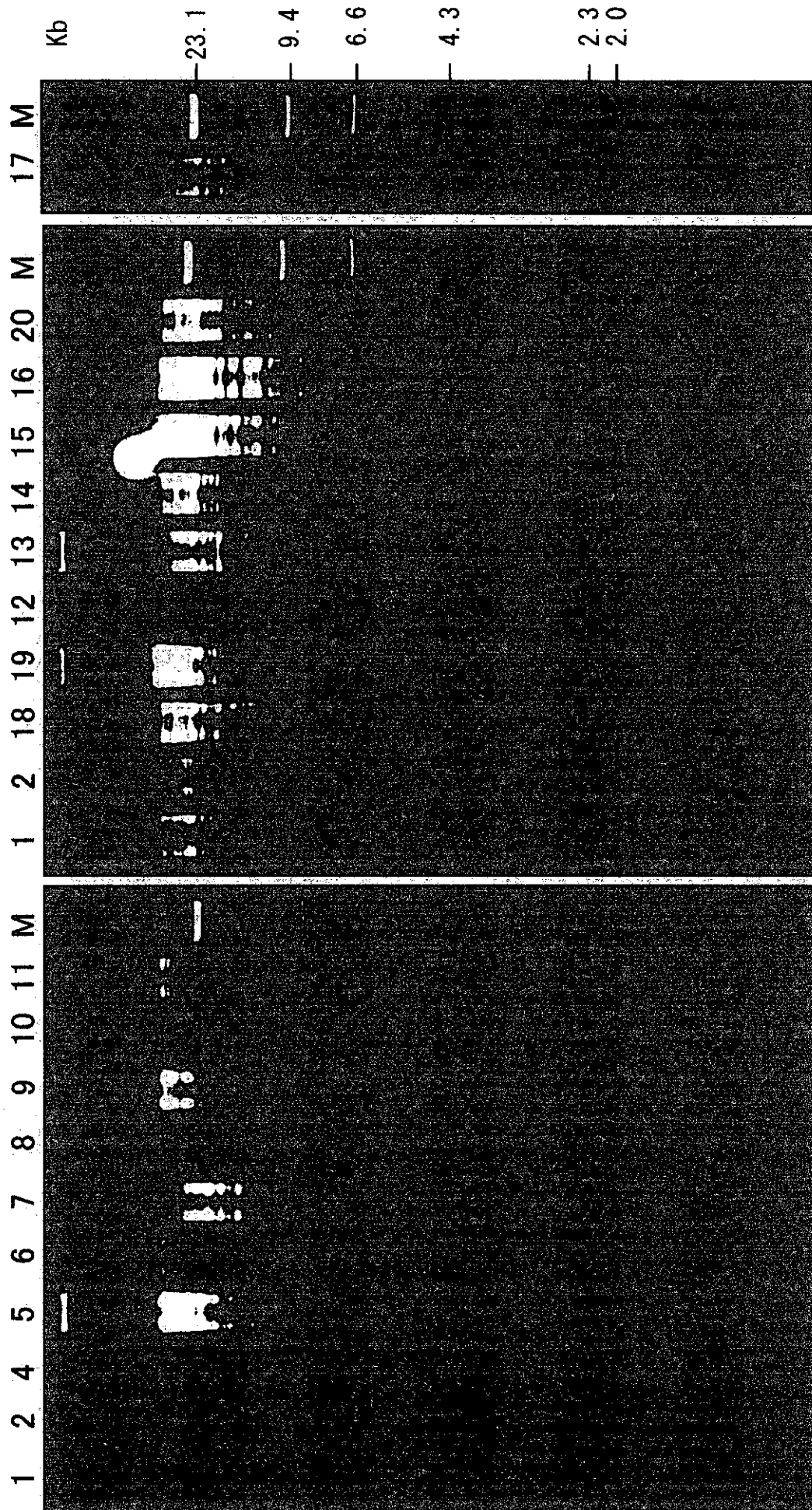


2) 塩基配列の決定法

- ① プライマー; SI4A と SI4B (鋳型用; 810bp)、SI3AD と SI4BD (dye primer; 687bp)
- ② *iap* 遺伝子内の 810bp を鋳型とし、dye primer を用いて 687bp 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。

図2

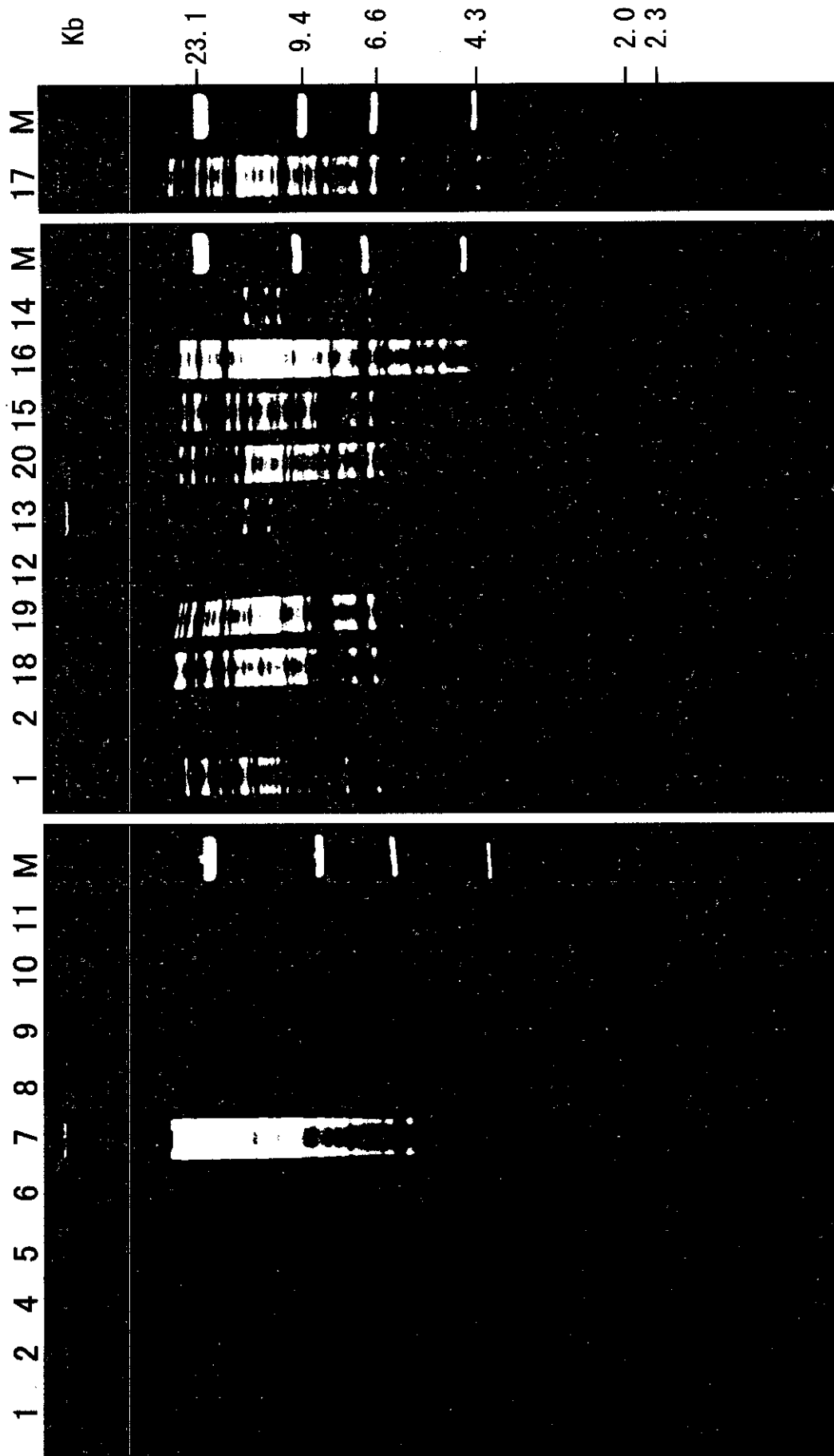
L.monocytogenes 1/2a株 染色体 DNA の制限酵素切断解析 (Pst I)



検体 1: L96-HM 1, 2: L96-HM 2, 4: L96-11P1, 5: L98-76P2, 6: L98-78P5, 7: L98-104P5, 8: L98-80C1,
9: L98-89C5, 10: L99-183P1, 11: L99-213C1, 12: L99-173B3, 13: L99-221C1, 14: L99-186C1,
15: L2K-265C1, 16: L99-223C3, 17: L2K-268C1, 18: L2K-307C1, 19: L2K-312B1, 20: L99-188C3

図3

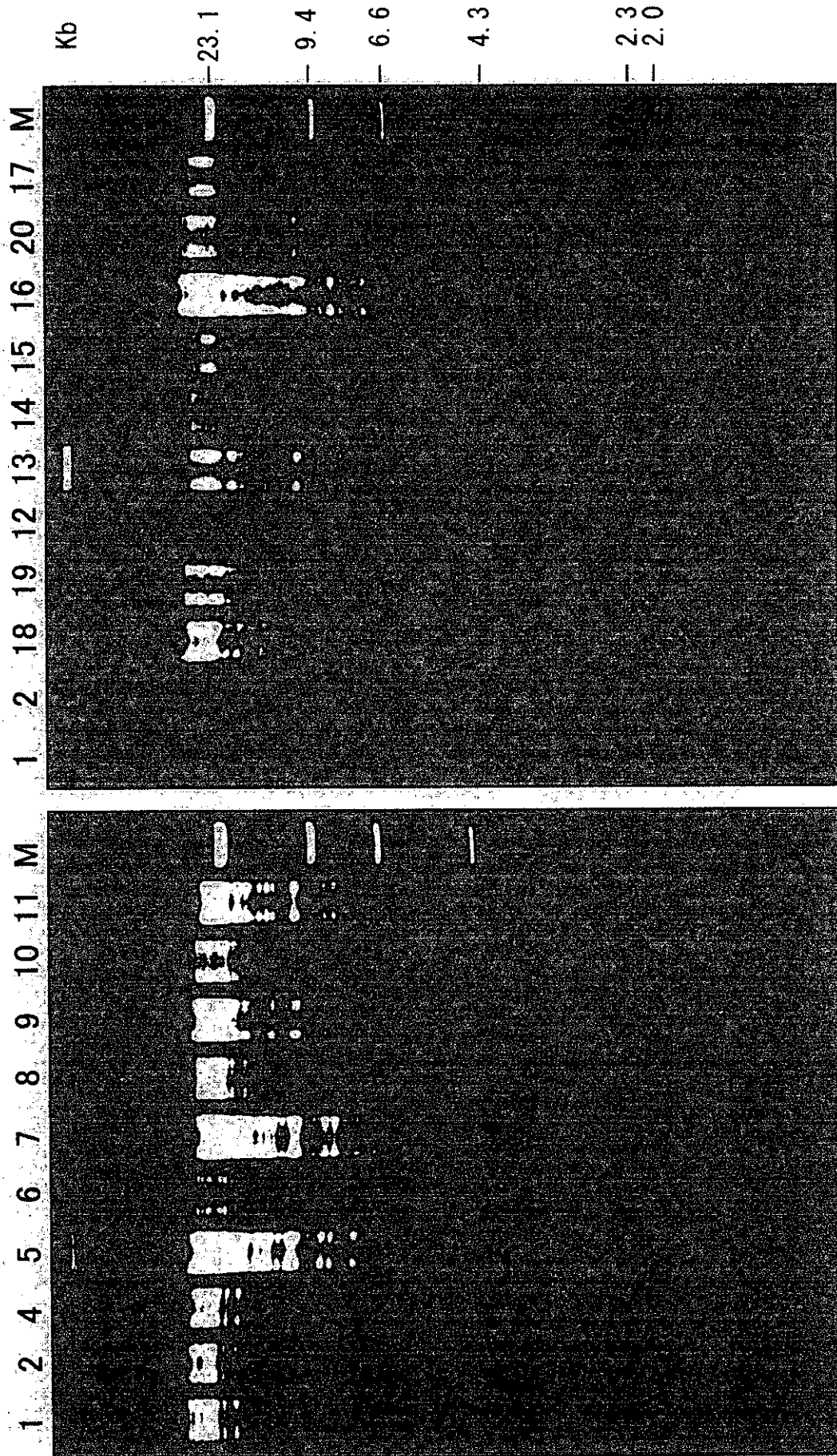
L.monocytogenes 1/2a株 染色体 DNA の制限酵素切断解析 (Ban III)



検体 1: L96-HM 1、2: L96-HM 2、4: L96-11P1、5: L98-76P2、6: L98-78P5、7: L98-104P5、8: L98-80C1、
9: L98-89C5、10: L99-183P1、11: L99-213C1、12: L99-173B3、13: L99-221C1、14: L99-186C1、
15: L2K-265C1、16: L99-223C3、17: L2K-268C1、18: L2K-307C1、19: L2K-312B1、20: L99-188C3

図4

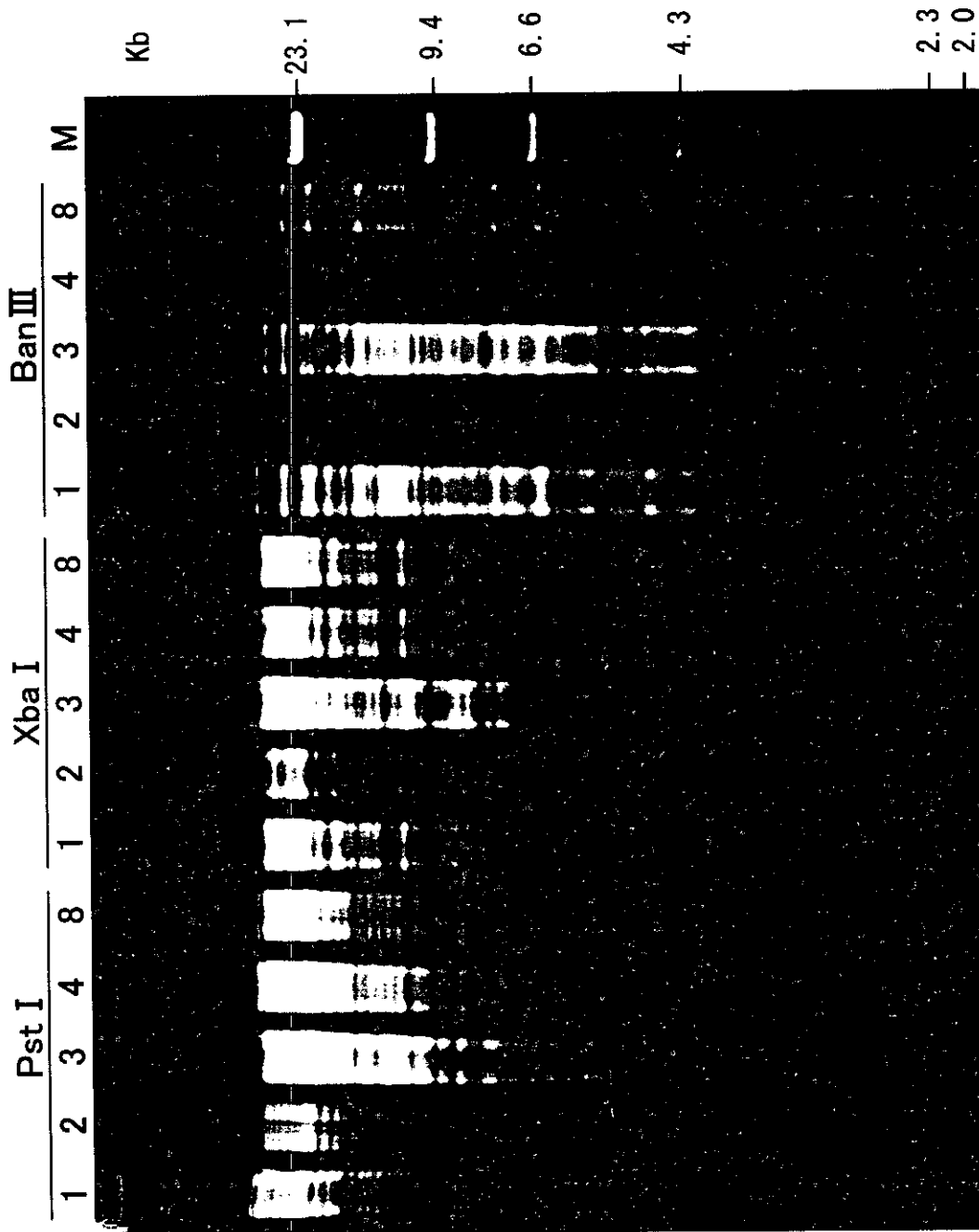
L.monocytogenes 1/2a株 染色体 DNA の制限酵素切断解析 (Xba I)



検体 1: L96-HM 1, 2: L96-HM 2, 4: L96-11P1, 5: L98-76P2, 6: L98-78P5, 7: L98-104P5, 8: L98-80C1, 9: L98-89C5, 10: L99-183P1, 11: L99-213C1, 12: L99-173B3, 13: L99-221C1, 14: L99-186C1, 15: L2K-265C1, 16: L99-223C3, 17: L2K-268C1, 18: L2K-307C1, 19: L2K-312B1, 20: L99-188C3

図5

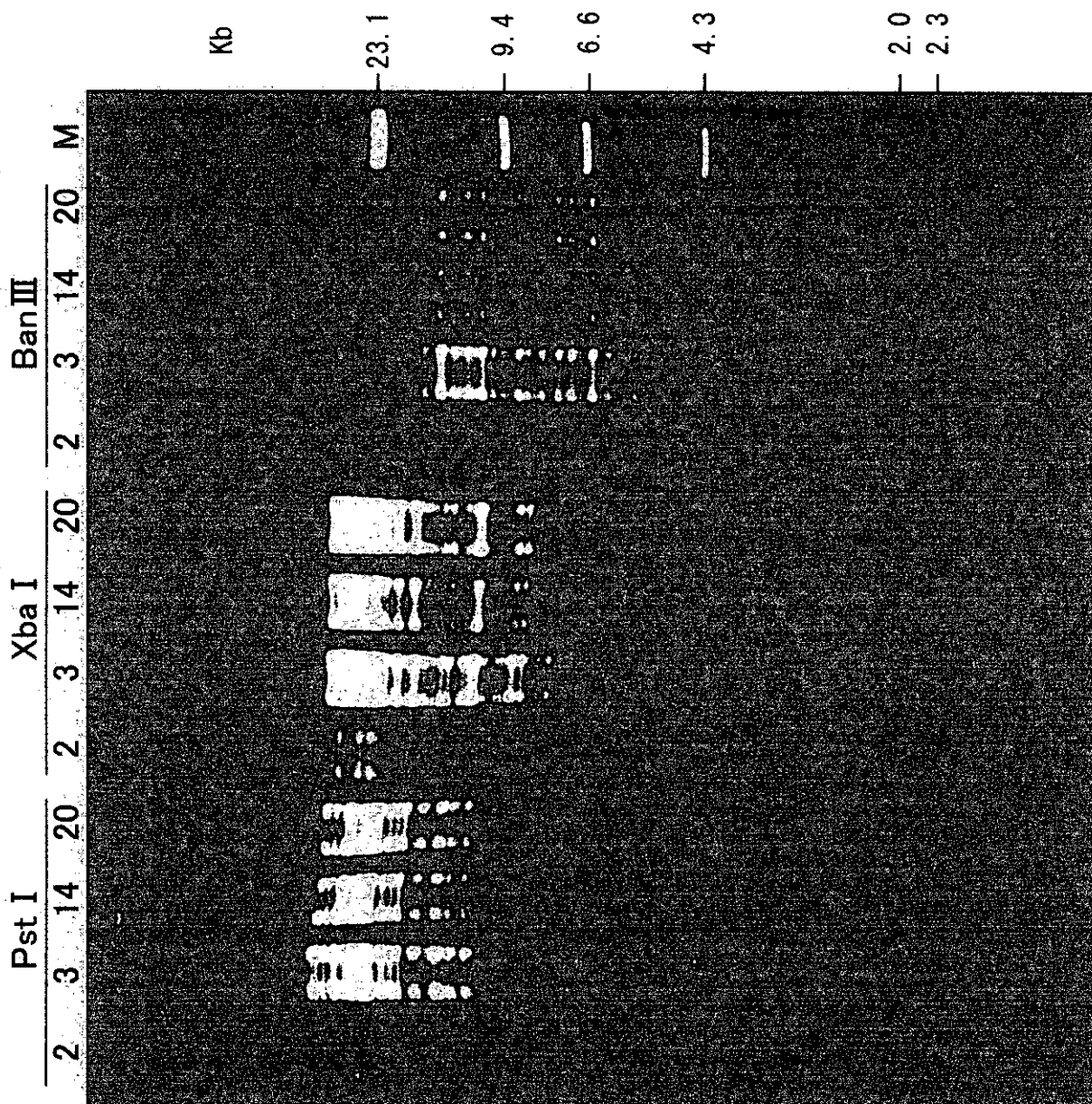
L. monocytogenes 1/2a株
染色体 DNA の
制限酵素切断解析 (1)



検体
1: HM1、2: HM2、3: L2K1 - 12H、
4: L96 - 11P1、8: L98 - 80C1、
M: マーカー

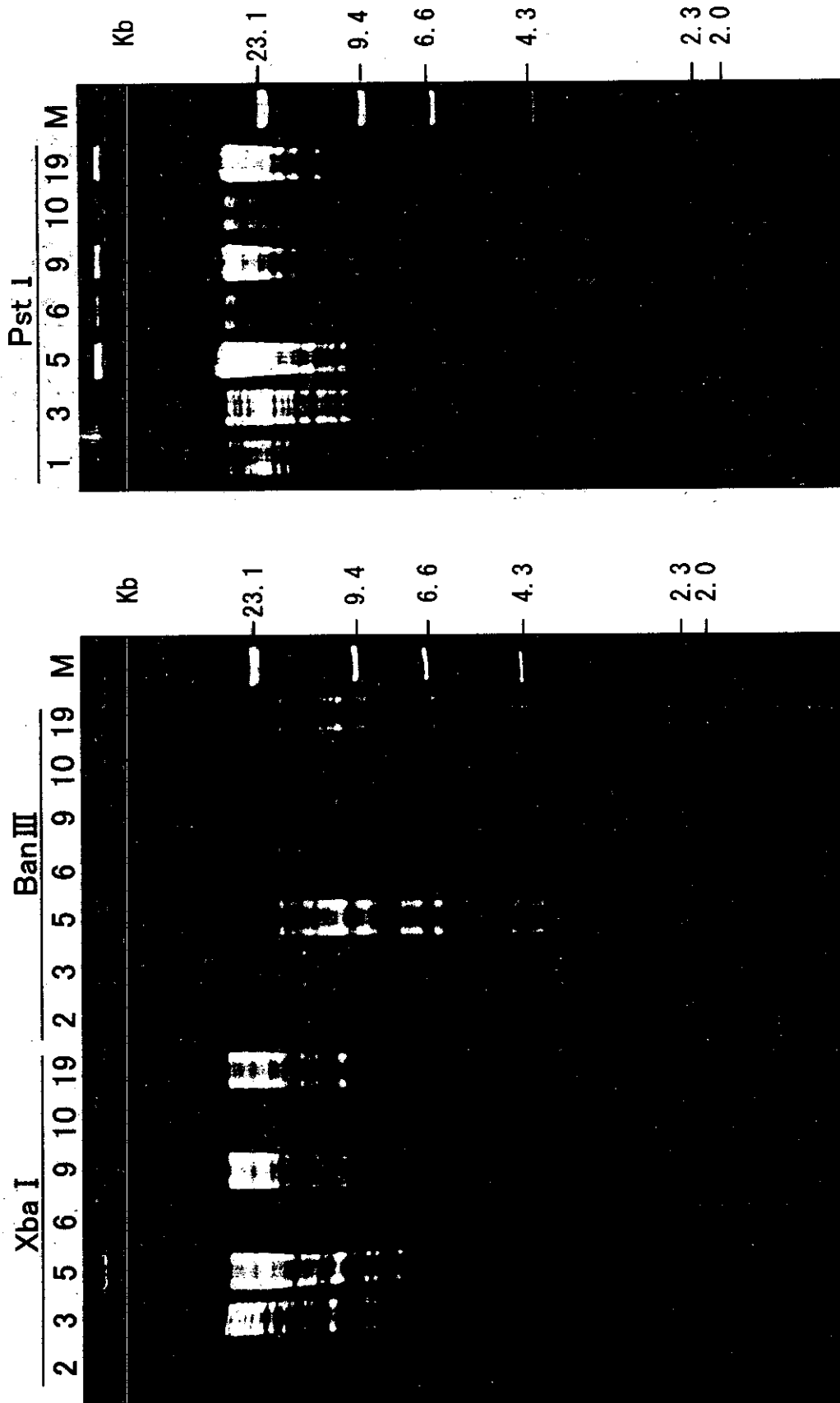
図6

L. monocytogenes 1/2a株
染色体 DNA の
制限酵素切断解析 (2)



検体
2: L96 - HM2、3: L2K1 - 12H、
14: L99-186C1、20: L99-188C3、
M: マーカー

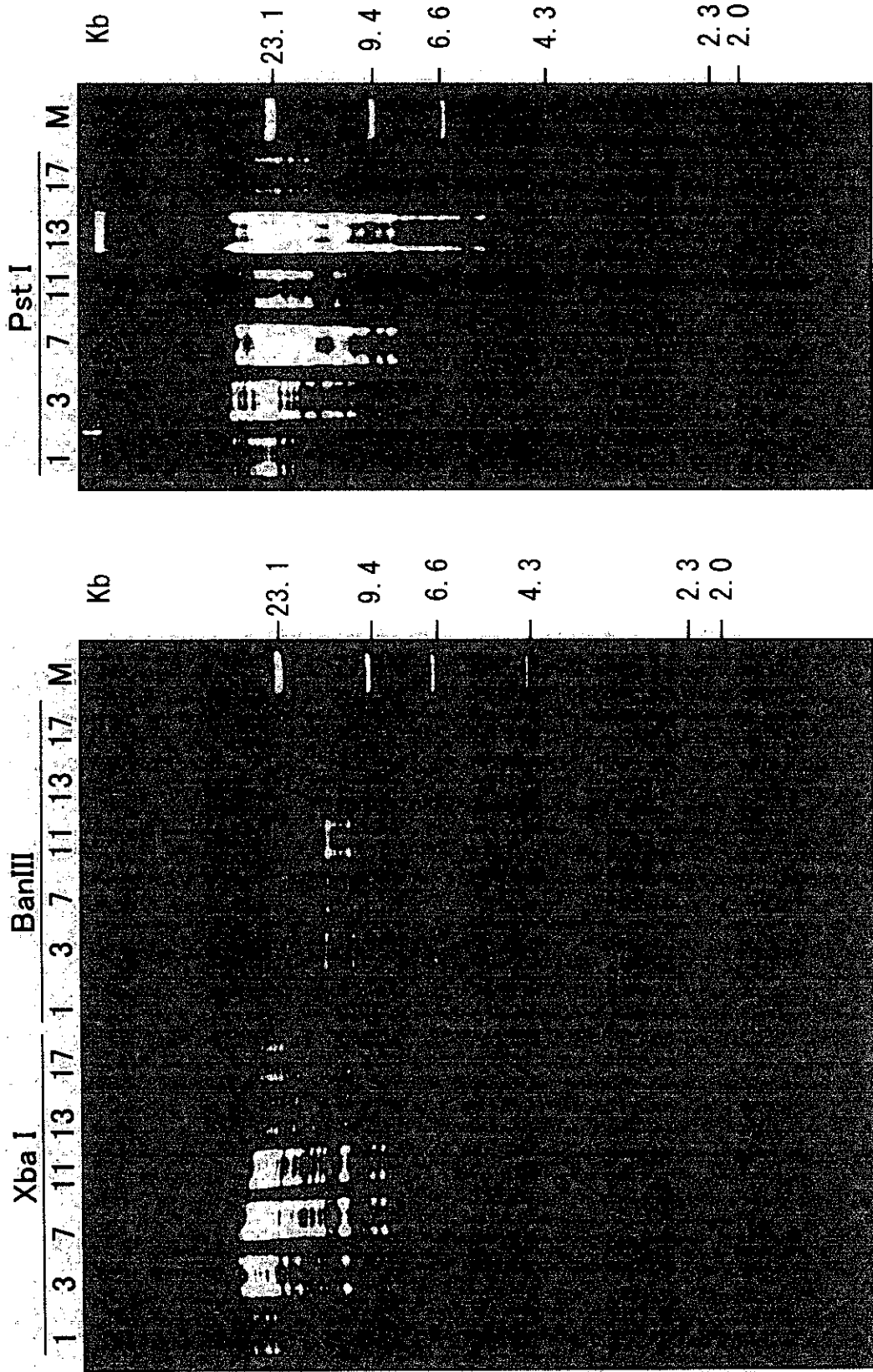
L. monocytogenes 1/2a株 染色体 DNA の制限酵素切断解析 (3)



検体 1:HM1、2:HM2、3:L2K1-12H、5:L98-76P2、6:L98-78P5、
9:L98-89C5、10:L99-183P1、19:L2K-312B1、M:マーカー

図8

L. monocytogenes 1/2a株 染色体 DNA の制限酵素切断解析 (4)



検体 1: HM2、3: L2K1-12H、7: L98-104P5、11: L99-213C1、
13: L99-221C1、17: L2K-268C1、M: マーカー

図10

iap 遺伝子内の多型領域における点変異と挿入・欠損

< EGD 1/2a の塩基配列と変異位置 >

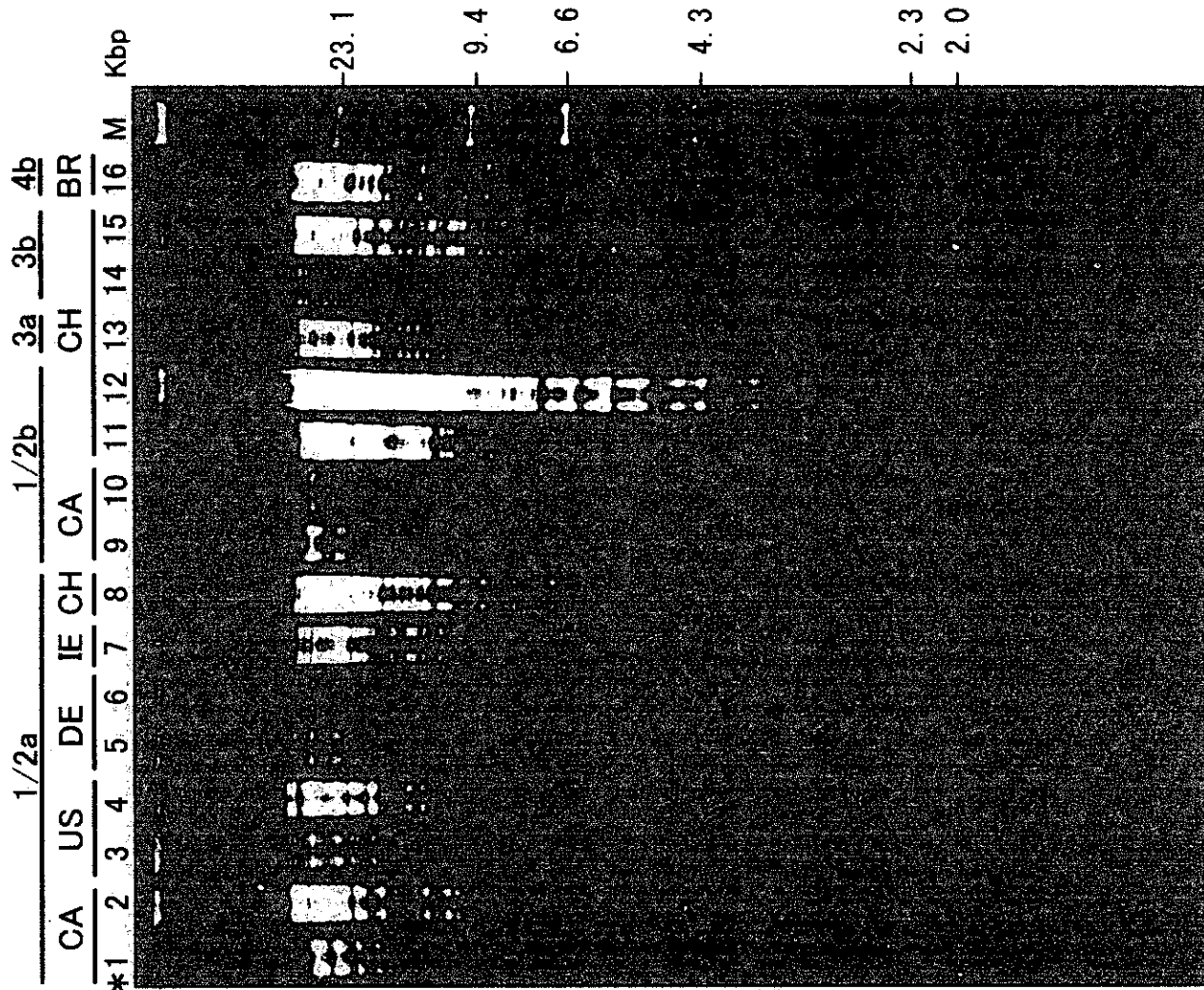
1116 ↓ T T A T G T C A T G G A A T A A T T T A T C T T C T T C T A T T T A T G T A G G T C A A A G C T T G C T A T T A
 1184 ↓ 1180 ↓ 1194 ↓ 1165 ↓ 1174 ↓
 A A C A A A C T G C T A A C A C A G C T A C T C C A A A A G C A G A A G T G A A A A C G G A A G C T C C A G C A G C T G
 1244 ↓ 1240 ↓ 1254 ↓ 1211 ↓ 1218 ↓ 1228 ↓
 A A A A A C A A G C A G C T C C A G T A G T T A A A G A A A A T A C T A A C A C A A A T A C T G C T A C T A C A G
 1308 ↓ 1268 ↓ 1273 ↓ 1279 ↓ 1283 ↓ 1342 ↓
 A G A A A A A A G A A A C A A C G C A A C A A C A A C A C C T A A A G C A G C A A C A G A A G C T G C A A
 1363 ↓ 1368 ↓ 1375 ↓ 1325 ↓ 1385 ↓
 A A C C A G C T C C A C C A T C T A C A A A C A C A A A T A A A
 1396 ↓ 1402 ↓ 1408 ↓ 1420 ↓
 A C A A A T A C A A C A C C A A A T A C A A A T A C A
 1438 ↓ 1453 ↓ 1459 ↓ 1471 ↓ 1480 ↓ 1489 ↓
 T A C A C C A T C T A A A A A T A C A A A C A C T A A T A C G G A A T A C A A A C T C
 1501 ↓ 1507 ↓ 1513 ↓ 1522 ↓
 A A A T A C G G A A T G C T A A T C A A G G T T C T

EGD 1/2a	1174	1220	1273	1309	1315	1447	1448	1513	計
1. 76, 78, 89, 183, 312	T	G	T	A	G	A	A	C	8
2. HM1, HM2, 11, 80	A	A	T	A	G	A	A	C	9
3. 265			T	A	T	A	A	C	3
4. 268			T	A	T	A	A	C	2
5. H12, 166, 188			T	A	T	A	A	C	1
6. 223			T	A	T	A	A	C	3
104			T	A	T	A	A	C	?
7. 213, 221, 307, 173			T	A	T	A	A	C	0

図12

輸入食肉由来 L. m
株間の異同識別

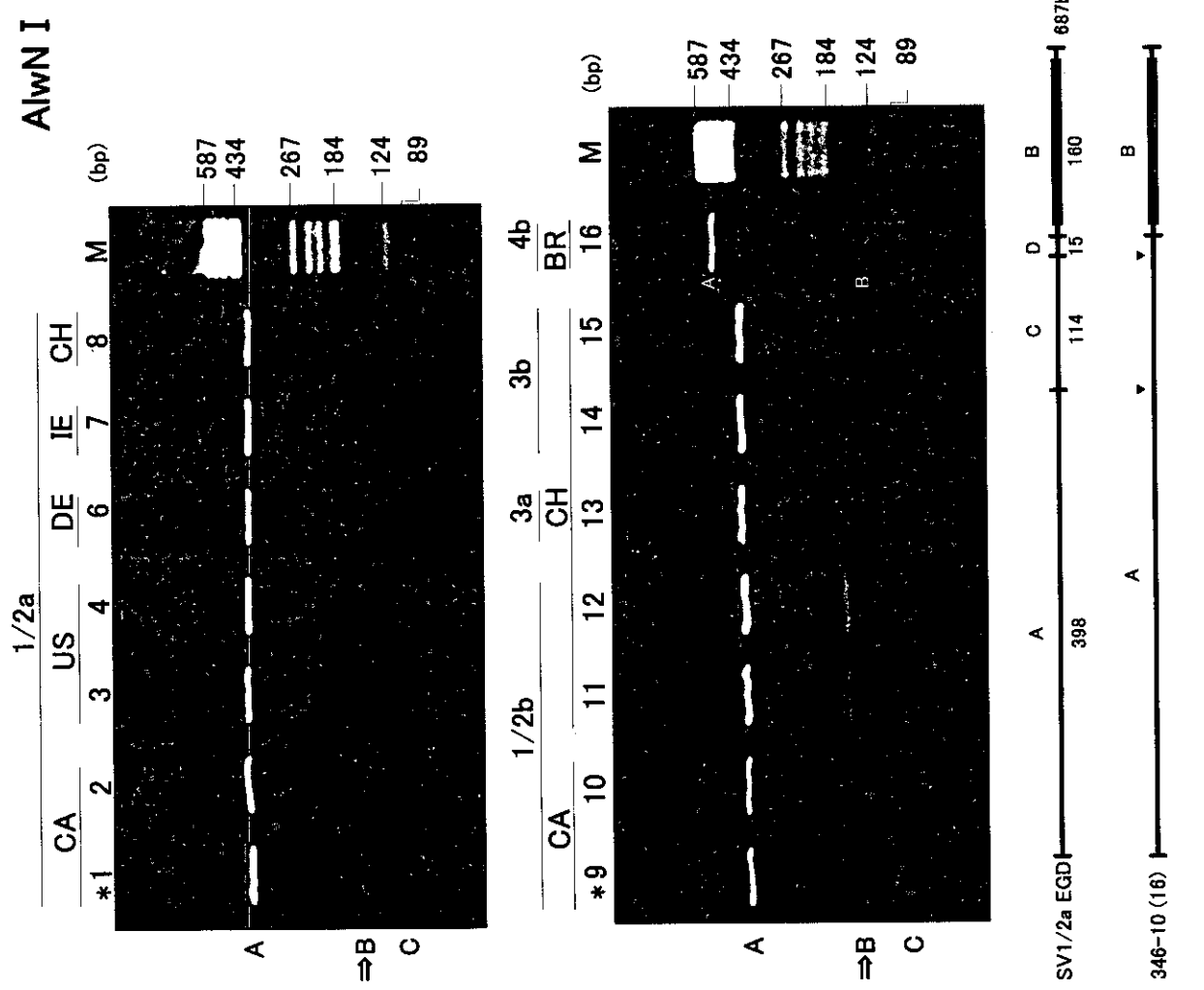
染色体DNAの
制限酵素切断解析 (PstI)



*分離株:
1: 351-8, 2: 351-12, 3: 343-10,
4: 343-11, 5: 334-11, 6: 334-12,
7: 347-13, 8: 350-14, 9: 332-8,
10: 332-9, 11: 350-12, 12: 350-13,
13: 350-10, 14: 350-8, 15: 350-11,
16: 346-10, M: サイズマーカ-

図13

L. m. iap 領域における
PCR産物の制限酵素切断解析



- *分離株: 1: 351-8, 2: 351-12,
3: 343-10, 4: 343-11,
6: 334-12, 7: 347-13,
8: 350-14, 9: 332-8,
10: 332-9, 11: 350-12,
12: 350-13, 13: 350-10,
14: 350-8, 15: 350-11,
16: 346-10,
M: サイズマーカ-

Primer: S13A, S13B (687bp)

L.m 各分離菌株の*iap* 遺伝子領域内の 407bp についての全塩基配列

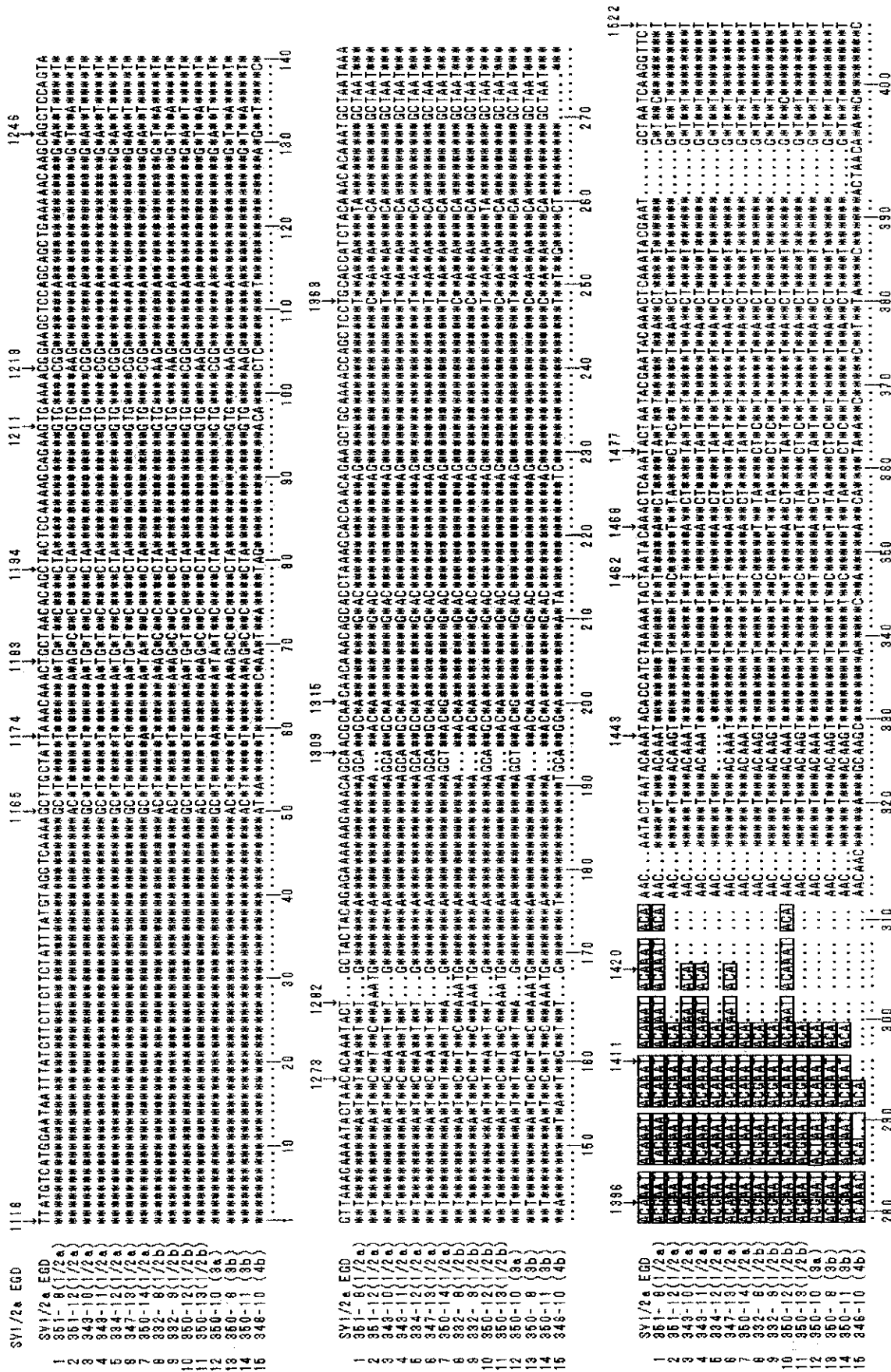


図15

各分離菌株の *iap* 遺伝子内の多型領域における点変異の局在

Strain/Position	1165	1168	1174	1181	1183	1186	1189	1195	1198	1199	1201	1213	1218	1220	1244	1249	1254	1258	1270	1273	1276	1279	1282	1306	1309	1313	1315	1325	1327			
SVI/2a EGD	G C T T A T G T C C T A G T G C G G A G A T T T A T C A T T A A A G C A G A																															
1 351-	T																															
2 851-12	A	A	C	A	C	A	A	T	A	T	A	A	T	C	A	T	T	C	A	T	A	T	A	T	C	A	A	T	A	A		
3 343-10																																
4 343-11																																
5 334-12																																
6 347-13																																
7 350-14	A	A	C	A	C	A	A	T	A	T	A	A	T	C	A	T	T	C	A	T	A	T	A	T	C	A	A	T	A	A		
8 332-	A	A	C	A	C	A	A	T	A	T	A	A	T	C	A	T	T	C	A	T	A	T	A	T	C	A	A	T	A	A		
9 832-	A	A	C	A	C	A	A	T	A	T	A	A	T	C	A	T	T	C	A	T	A	T	A	T	C	A	A	T	A	A		
10 950-12																																
11 350-13	A	A	C	A	C	A	A	T	A	T	A	A	T	C	A	T	T	C	A	T	A	T	A	T	C	A	A	T	A	A		
12 350-10	A	A	C	A	C	A	A	T	A	T	A	A	T	C	A	T	T	C	A	T	A	T	A	T	C	A	A	T	A	A		
13 350-	A	A	C	A	C	A	A	T	A	T	A	A	T	C	A	T	T	C	A	T	A	T	A	T	C	A	A	T	A	A		
14 950-11	A	A	C	A	C	A	A	T	A	T	A	A	T	C	A	T	T	C	A	T	A	T	A	T	C	A	A	T	A	A		
15 346-10	A	T	A	C	A	A	A	T	A	G	A	C	A	T	C	T	A	G	C	A	T	A	T	G	T	T	T	T	T	G	A	T

Strain/Position	1328	1342	1343	1363	1374	1386	1396	1402	1408	1435	1443	1453	1462	1471	1477	1480	1489	1495	1501	1510	1522								
SVI/2a EGD	C A G T A A C A A T A A T A A T T T T A C T T A T T A C T T G T T T																												
1 351-	T																												
2 851-12	C	C	G	G	G	G	G	G	G	C	T	T	A	C	T	C													
3 343-10																													
4 343-11																													
5 334-12																													
6 347-13																													
7 350-14																													
8 332-	C	C	G	G	G	G	G	G	G	C	T	T	A	C	T	C													
9 832-	C	C	G	G	G	G	G	G	G	C	T	T	A	C	T	C													
10 950-12																													
11 350-13	C	C	G	G	G	G	G	G	G	C	T	T	A	C	T	C													
12 350-10	C	C	G	G	G	G	G	G	G	C	T	T	A	C	T	C													
13 350-	C	C	G	G	G	G	G	G	G	C	T	T	A	C	T	C													
14 950-11	C	C	G	G	G	G	G	G	G	C	T	T	A	C	T	C													
15 346-10	A	T	C	T	G	T	C	A	G	G	C	A	C	A	A	C	C	T	T	A	C	A	A	C	C	C	C	C	C
Total	73																												
	C																												
	23																												
	0																												
	0																												
	1																												
	0																												
	9																												
	23																												
	23																												
	4																												
	23																												
	9																												
	23																												
	23																												
	55																												