

Table 3-1 ELISA titer for antigen with HPLC purified full length His-LLO

Positive serum		Negative serum	
titer		titer	number of samples
<64	Patient A 11/1	>512	8/13
<64	Patient A 11/27	256	2/13
2048	Patient B 7/2	128	1/13
8192	Patient B 7/3	64	2/13
8192	Patient B 7/11		
2048	Patient C 9/4		
4096	Patient C 10/1		

Table 3-2 ELISA titer for antigen with Ni-NTA purified truncated His-LLO

Positive serum		Negative serum	
titer		titer	number of samples
<64	Patient A 11/1	<64	2/91
<64	Patient A 11/27	64	78/91
64	Patient B 7/2	128	11/91
64	Patient B 7/3		
1024	Patient B 7/11		
64	Patient C 9/4		
256	Patient C 10/1		

Table 3-3 ELISA titer for antigen with HPLC purified truncated His-LLO

Positive serum		Negative serum	
titer		titer	number of samples
<64	Patient A 11/1	<64	5/8
<64	Patient A 11/27	64	3/8
128	Patient B 7/2		
128	Patient B 7/3		
2048	Patient B 7/11		
64	Patient C 9/4		
1024	Patient C 10/1		

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

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）

## 研究要旨

*Listeria monocytogenes* の感染により発生するリステリア症は、健康な成人で発生することは稀であるが、免疫力の弱い乳幼児や高齢者、白血病患者などでは髄膜炎や敗血症、脳膜炎など重篤な症状を引き起こすことがある。また、妊婦の感染では流産を起こしたり、胎児の敗血症を起こすことがある。リステリア症は、欧米では *L. monocytogenes* に汚染された食品を介して発生する場合があると認められているが、日本国内では食品が原因と確認された発症例がなく、国内で発生したリステリア症の感染ルートは明確にされていない。

*L. monocytogenes* は土壌や植物、家畜糞便などの環境中に広く見出され、食肉や乳加工品、魚介類加工品などの食品からも検出されることが報告されている。本研究班が平成 14 年度に実施した日本国内で流通する食品の汚染実態調査や文献調査の結果では、日本国内での *L. monocytogenes* による食品の汚染状況は、海外の状況に比較して大きな差は認められず、ほぼ同等のレベルであることが確認されている。したがって、日本国内でも食品の汚染を原因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。

そこで、食品由来およびリステリア症患者由来の *L. monocytogenes* 株を複数収集してパルスフィールド電気泳動（以下 PFGE）を実施し、疫学的マーカーとしての利用性を評価した。また、株の由来の違いや血清型の違いによる PFGE パターンの違いについても調べた。

PFGE のプラグ調製方法は、米国の Pulse Net で使用している方法を基本としてリステリア菌の培養方法に変更を加えた結果、安定して鮮明な PFGE 泳動像を得ることができた。

食品由来株 58 株、調理を主とした環境由来株 8 株、臨床由来株 81 株の計 147 株について制限酵素に *ApaI* と *AscI* を用いた PFGE を行い、各泳動パターンの目視識別によって分類を行った結果、76 パターンに分類され、類似パターンをグループとしてまとめると 18 グループに分類された。

これらのパターン分類の結果、株の由来と PFGE パターンの関連は認められず、食品由来株と臨床由来株が全く同じパターンを示す場合も認められた。

一方、血清型別に PFGE パターンの分布を見た場合には血清型別に特徴が認められた。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 PFGE の有効性が確認された。同じく臨床株で多く観察される血清型 4b では、ほとんどの株がわずかに 2 種類の PFGE グループに分類された。全く同じ PFGE パターンを示す株が複数並ぶケースも多く観察され、血清型 4b では *ApaI* と *AscI* の PFGE に他の疫学マ

一カーの併用が必要であると考えられた。食品由来株に多い血清型 1/2c は、多くの株で一または類似した PFGE パターンが観察され、疫学マーカーとしての有用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 PFGE パターンとの関連に明確な傾向を見出すことは出来なかった。

目視観察による分類に比較して、より客観的な分類方法としてコンピューターソフトウェアによる PFGE パターン分類も試みた。その結果、目視観察と同様に血清型による差が認められ、血清型 4b では同じパターンに複数株が分類されることが確認された。

以上の結果から臨床由来株として分離される頻度が高い血清型 4b では、制限酵素 *ApaI* と *AscI* による PFGE では十分な株間識別ができない可能性が示されたことから、他の疫学マーカーの併用を試みた。

リボプリンターを用いて 16S-rRNA 遺伝子の *EcoRI* 切断によるリボグループの比較を実施した結果、血清型レベルや PFGE グループよりは詳細な分類が可能であったが、PFGE パターンに比較すると大まかな分類となり、制限酵素 *ApaI* と *AscI* による PFGE での株間識別を補助する手段としては不十分な結果となった。

そこで制限酵素 *SmaI* を用いた PFGE を実施した。*SmaI* による切断では比較的小さな分子量の染色体断片が多数出現するために泳動パターンは *ApaI* や *AscI* に比較して鮮明ではないが、出現バンド数が多く、より詳細な分類が期待できる。*ApaI* と *AscI* による PFGE では識別できなかった株について *SmaI* による PFGE パターンを比較した結果、多数の株でパターンの違いが観察され、分類の細分化が可能となった。

協力研究者

青山 顕司（雪印乳業(株) 食品衛生研究所・  
主席研究員）

岡田由美子（国立医薬品食品衛生研究所・  
主任研究官）

丸山 務（(社) 日本食品衛生協会・理事長）

広く分布する菌であり、日本では未だその感染ルートが明確にされていないが、欧米では食品を介した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が考えられる。

これまでに国内で実施された市販食品の検査では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、本研究班において実施した調査の結果からは、国内で市販されている食品の *L. monocytogenes* の汚染率は欧米で報告されている食品の汚染率と比較して大きな差がないことが確認された。

一方、PFGE（パルスフィールド電気泳動）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

#### 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。健常成人が罹患する可能性は低いが、免疫力の弱い高齢者や免疫不全症状を伴う疾病を持つ者などでは致死率が高い感染症である。

土壌や植物体、家畜の糞便などの環境に

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と考えられる。*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による株間識別の方法を確立し、臨床株を中心に食品由来株や環境由来株なども含めて多数の*L. monocytogenes*についてPFGEパターンの比較を行って疫学マーカーとしての有用性を評価した。また、血清型や株の由来、採取年代とPFGEパターンの関連性についても比較検討した。

## B. 研究方法

### 1) 使用菌株

各分担研究者あるいは協力研究者から147株の*L. monocytogenes*菌株の提供を受けた。株の内訳は臨床由来株81株、食品由来株58株、調理環境を主とした環境由来株8株である。血清型の内訳は1/2a 13株、1/2b 29株、1/2c 29株、3a 3株、3b 2株、4b 64株、4e 4株、不明 3株であった。

### 2) 培地および培養条件

*L. monocytogenes*の培養は、培地としてBrain heart infusion (Difco) またはBrain heart 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℃、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の試料調製と泳動条件

### I) PFGEプラグの調製

- ① *L. monocytogenes*はBrain heart 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 heart infusionに種菌を1%接種し、30℃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0.4 mlのTEに再懸濁した。
- ③ 20 μlの懸濁液を980 μl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)×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 μlに60 μlのリゾチーム溶液(10mg/ml)を加えて37℃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 μl、プロテイナーゼK(2 mg/ml)100 μl、10% SDS 100 μlを混合して53℃に保温した。
- ⑥ リゾチーム処理を終えた菌懸濁液(300 μl)に保温しておいた⑤のアガロースミックス300 μlを添加混合してプラグモールド(日本バイオラッド・ラボラトリーズ株)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℃の恒温水槽中で2時間往復振とう(200 rpm)した。

### 〈溶菌溶液組成〉

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℃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℃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が製品に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℃、5~16時間)、*AscI* (37℃、3~16時間)、*SmaI* (25℃、16時間)

### III) P F G E 泳動条件

PFGE の泳動装置は、CHEF Mapper System(日本バイオラッド・ラボラトリーズ株)を用いた。

泳動条件は以下の通りとした。

緩衝液：×0.5 TBE

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。

コンピューターによるPFGEパターン解析は、ゲル解析用ソフトウェアFinger printing II ver3.0(日本バイオラッド・ラボラトリーズ株)を用い、系統樹解析はUPGMA法を用いた。

### 4) リボパターンの比較

リボプリンター(タカラバイオ株)を用いて *EcoRI* によるリボパターンを比較した。各検体はメーカーの指示通りに前処理を行ってからリボプリンターによる自動処理を行った。装置がリボパターンをCCDカメラで読み取って各パターンに自動的に割り当てるリボグループの比較を行った。

### 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

PFGE ではプラグ中に菌体を埋め込んでから溶菌するため、一旦プラグを調製した後は DNA 量を調節することができない。したがって、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、菌の培養条件が大きく関与する。米国 Pulse Net では、Brain heart 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、多検体を扱う場合には平板培地では菌体を掻き取る作業が煩雑であり、菌体濃度を揃えることも難しい。そこで、液体培地 (Brain heart infusion) による培養条件を検討した。

*L. monocytogenes* は 37℃での振とう培養で良好な増殖を示すが、同条件で一夜培養した場合には、吸光度測定による菌体濃度の調整を行っても検体ごとに 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たものと考えられたことから、培養時間を 3 時間から 5 時間程度に短縮することで安定した泳動像が得られた。しかしながら、プラグ調製の作業効率上は一夜培養 (16 時間程度) が望ましいことから Brain heart 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℃で一夜 (約 16 時間) 静置培養することで PFGE バンドの濃さが安定化し、PFGE パターンが再現性良く得られることが判明した。

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が、PFGE バンドが不鮮明な場合には 30℃で一夜静置培養した種菌を新しい Brain heart infusion 培地に O.D.550=0.3 となるように接種して 37℃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) 使用制限酵素の比較試験

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、制限酵素として *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 (48~480kb) 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 以下の領域に集中することが確認された。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拡散しやすい低分子量のバンドであることから、しばしば PFGE パターンが不鮮明となり、試料間の比較において *ApaI* や *AscI* よりも判断が難しい場合も多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 パターンの目視分類

前項の試験結果から制限酵素を *ApaI* と *AscI* に絞り、被検株 147 株についてこれら 2 酵素による PFGE パターンを株間で比較し

た。また、各 PFGE パターンに基づくグループ分けを実施した。

グループ分けは、それぞれの PFGE の泳動イメージをゲル上の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目視判断による画像の調整操作を行って対合せ、各検体のバンドパターンの比較を行った。

バンドパターンが完全に一致した場合は同一パターンとして分類し、細部は異なるがパターン全体として類似した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た。

図 1 に PFGE のパターン分類とグループ分類の例を示した。ApaI で切断した場合には試験した 147 株の *L. monocytogenes* が 55 パターン、13 グループに分類された。同様に AscI で切断した場合には、147 株が 59 パターン、9 グループに分類された。

ApaI 切断で分類した 13 グループと AscI 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。

また、ApaI の PFGE パターン 55 種と AscI 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 PFGE パターンに分類することができた。

## 2) PFGE パターン分類の解析

*L. monocytogenes* 147 株を ApaI と AscI の PFGE 泳動パターンで分類した 76 種類の PFGE パターンについて、他の因子との関連について解析を行った。

### ①食品由来株と臨床由来株の比較

図 2 に株の由来と PFGE パターンの関連性

を示した。縦軸に 76 種類の PFGE パターンをプロットし、横軸に 147 株のリステリア菌株（番号）をプロットした結果である。角型の枠線で囲まれたプロットは同一のグループを示しており、類似した PFGE パターンであることを意味している。

食品由来株は 11 グループ、30 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。全部で 18 に分類した PFGE グループの中で、8 グループにおいて食品由来株と臨床由来株が混在していた。さら PFGE パターン別に詳細に見た場合には 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。

この結果から食品由来株の PFGE パターンと臨床由来株の PFGE パターンには重なりがあり、株の由来によって PFGE パターンの分布が異なるものではないことが確認された。

### ②血清型と PFGE パターンの関連性

図 3 は血清型別に PFGE パターンおよび PFGE グループの分布を表した散布図である。この図に示した様に、血清型別に PFGE パターンや PFGE グループの分布にはそれぞれ特徴が認められる。

臨床株で多く認められる血清型 4b では、64 株と株数が多いにも関わらず、ほとんどの株（60 株）が 18 種類ある PFGE グループ中の僅か 2 つのグループ（グループ 3、グループ 4）に分類された。また、複数の株が全く同一の PFGE パターンを示すケースも多く認められた。

一方、臨床株で 4b に次いで多く認められる血清型 1/2b については、12 の PFGE グループに渡って分布しており、同一グループ内でも異なる PFGE パターンを示すものが

多かった。

28株中26株が食品または環境由来株であった血清型 1/2c については28株が僅か2つのグループに分類された。しかも PFGE パターンのレベルで見てもバリエーションが乏しく、19株が同じ PFGE パターンを示した。

血清型 1/2a、3a、3b、4e については、株数が少なく十分な評価が出来なかった。

### ③PFGE パターンの採取年代との関連

今回調査した147株の内、採取年月が不明の12株と海外で分離された Scott A 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。各株の採取年月と PFGE パターンの関係を図4に示した。

臨床由来株は1990年付近と2000年付近で採取されたものが多いことからその中間での推移を把握することは難しく、特に目立った傾向は認められない。しかしながら幾つかの PFGE パターンでは同一パターンの株が数年にわたって検出されていることがわかる。例えば、PFGE パターン 28番や30番のパターンを示す株は食品由来と臨床由来にまたがり1980年代後半から2000年以降にかけての長期間にわたり検出され続けている。また、PFGE パターン 14番の株は1988年から1990年にかけて4株が検出されているが、その後は検出されていない。

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かった。

### 3) ソフトウェアによる PFGE 分類

*Apal* と *AscI* による PFGE パターンを画像データとしてコンピューターに取り込み、ソフトウェア (Fingerprinting II) による

解析を実施して、その結果を目視による解析結果と比較した。解析結果から各検体の *Apal* による PFGE パターンの相互関係を樹形図として表したものが図5、*AscI* による PFGE パターンの相互関係を樹形図として表したものが図6である。

臨床株には血清型 4b が多くて 1/2c が少なく、食品では 1/2c が多く見られることから、それに伴う偏りはあるものの、目視による分類と同様に臨床株と食品株で PFGE の分布に特に偏りは認められなかった。

また、血清型別に分布を見た場合にも目視による分類とほぼ同様の結果となった。血清型 4b は互いに相同性が高く、樹形図の中でクラスターを形成していた。同様に 1/2c も相同性が高かった。一方 1/2b はクラスターを作ることが少なく、樹形図全体に分散していることがわかった。

このことを確認するために血清型別に樹形図を作成した。臨床上重要な血清型 4b と 1/2b の樹形図を図7 - 図10に示した。

樹形図での相同性が90%を超える株同士を同じグループとしてまとめてみると、*Apal* では血清型 4b の64株が20グループへと1/3以下に圧縮されたのに対し、血清型 1/2b の29株は23グループを形成した。同様に *AscI* では血清型 4b の64株が30グループと半減したのに対し、血清型 1/2b の29株は24グループを形成した。

以上の様にコンピューター・ソフトウェアによる解析結果はこれまでの目視分類による解析結果を裏付けるものであった。

### 4) リボプリンターによる分類

臨床株で多く認められる血清型は 4b と 1/2b であるが、前項に示した結果から 4b の株間識別には *Apal* と *AscI* による PFGE



だけでは充分ではなく、他の疫学マーカーを併用する必要があると考えられた。

そこで、リボプリンターによるリボグループの比較を試みた。制限酵素は *EcoRI* を用い、異なる PFGE パターンを示す臨床由来株 43 株について PFGE パターンとリボグループの比較を実施した。

結果を表 1 に示した。*ApaI* と *AscI* による PFGE グループの 3 番に分類された多くの株はリボグループの 246 S3 に分類され、同 PFGE グループの 4 番に分類された多くの株はリボグループの 246 S8 に分類された。この結果からリボパターンはある程度 PFGE との関連性を持つ可能性が示されたが、血清型 4b の多くがこの 2 種類のリボグループに分類されており、PFGE パターンに比較して詳細な分類を行うことはできないと判断した。

ただし、PFGE パターン 30 番に分類された株の中には異なるリボグループ (246 S8 と 250 S2) に分類された株があったことから、PFGE の分類結果を補うことができる場合もあると考えられる。

#### 5) *SmaI* の PFGE による補助分類

前項の試験で PFGE に用いる制限酵素の種類を検討した際に、*SmaI* による PFGE では *ApaI* や *AscI* による PFGE に比較して染色体 DNA 断片の分子量が小さくなる傾向があり、バンドが拡散してパターンが不鮮明になりやすい反面、バンドの本数が多いので株間の染色体構造の細部の差が出やすいことが把握できた。

そこで臨床株について *SmaI* の PFGE による分類を試みた。(表 2)

その結果、*SmaI* による PFGE グループは *ApaI* と *AscI* による PFGE グループと良く一

致した。また、PFGE パターンレベルで比較した場合には *ApaI* と *AscI* による分類を補ってさらに詳細な分類が可能であった。

#### D. 考察

国際的な疫学情報の交換を行う上では共通した手法を用いることが望ましいという考え方から、近年先進諸国で構築されつつある Pulse Net も国際間で手法の共通化が進められている。そこで、制限酵素として *ApaI* と *AscI* を用いた *L. monocytogenes* の PFGE については、米国の Pulse Net で用いられている手法を基本として検討を行った。

ただし、寒天平板で培養した菌体を掻きとって使用する原報通りの方法では多数の検体を扱う場合に作業性が悪いことから、液体培養を行った。Brain heart 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。過剰な生育とならない程度の適度な培養が必要と考えられる。147 株のほとんどの株ではこの方法で鮮明なバンドを得られたが、バンドが薄かったり不鮮明であったりした場合には、37℃ で 3 時間程度の振とう培養を行って対数増殖中期にある菌液を用いることで改善された。

PFGE のパターン解析は、当初はコンピューター用の解析ソフトウェアを保有していなかったことから目視による分類を行った。

コンピューター画面上でマーカーのバンド位置を目印として画像を調整して各 PFGE パターンを対合させた。同一パターンをまとめた上で、更に類似したバンドパターンを示すゲルの映像をグループとしてまとめる作業を行った。

*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は多

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。

PFGE パターンと株の由来の間には特定の規則性はなく、食品由来の株と臨床由来の株が同一あるいは類似の PFGE パターンを示す例が多く見出された。したがって、*L. monocytogenes* の株の由来によってそれぞれに特有の染色体構造が存在することはないものと考えられる。しかし、一方で臨床由来株では血清型 4b と 1/2b が多く認められるのは事実であり、また 1/2c 株は食品や環境由来株に多く認められている。今回の結果で PFGE パターン分布が血清型ごとに異なるという特徴が認められたことから、株の由来と血清型と PFGE パターンの間には緩やかな関連性があることもまた事実と考えられる。

血清型 1/2b は多くの PFGE グループに広く分布しており、血清型 4b では比較的狭い範囲に分布が限られていることが見出された。したがって、血清型 1/2b では PFGE は極めて有用な疫学マーカーとして活用可能と考えられる。一方、血清型 4b では今回の 64 株の中でも同じ PFGE パターンを示した株が複数存在しており、*ApaI* と *AscI* による PFGE のみでは疫学マーカーとしては不十分と考えられる。

血清型 4b で PFGE パターンの分布が狭い理由は明確でないが、一つの可能性として血清型 4b の遺伝子型が比較的狭い範囲の染色体構造に限られることが考えられる。血清型 1/2b に比較して 4b の方が比較的新しく発生した遺伝子型であるために PFGE の分布が狭いことも考えられる。

もう一つの可能性としては、ある限られ

た特定の PFGE パターンを持つ 4b 株が臨床的に多く分離される可能性である。これは 4b 株の特定の染色体構造を持つ株に強い病原性関連の遺伝子が分布するために臨床由来株として多く分離された可能性であるが、同じく臨床で多く分離される 1/2b では特定の PFGE パターンの偏りが認められないことから、染色体構造そのものが病原性に強く関わっていることはないものと考えられる。

以上の目視による PFGE 解析結果をより客観的なデータによって裏付ける目的でコンピューターソフトウェアを用いた PFGE パターン解析を実施した。コンピューターによる解析では、目視による解析では困難なパターン類似性の数値化が可能であり、供試菌全体の関連性を樹形図として見ることができる。

結果的に目視判断での PFGE パターンあるいは PFGE グループとしての分類はコンピューターによる分類と大きな差はなかった。目視による結果と同様に食品由来と臨床由来の *L. monocytogenes* の間で PFGE パターン分布に大きな差は認められず、樹形図では臨床株に混じって食品株が分布する様子が確認された。また、先に述べた臨床由来株の血清型 4b と 1/2b に見られる PFGE パターンの分布域の違いも確認された。

PFGE のパターン分布が狭いことが確認された血清型 4b 株は国内では臨床的に最も高い頻度で分離される血清型であることから、*ApaI* と *AscI* による PFGE を補う疫学マーカーの検討を行った。

リボパターンは 16S-rRNA の遺伝子配列に基づく分類であり、デュボン社が開発したリボプリンターという装置によってリボパターン（ゲル泳動像）を CCD カメラで取り

込み、マーカーに対して補正を行ったデジタル化したイメージデータとして得られる。装置は菌体から染色体を抽出して DNA を制限酵素で切断し、16S-rRNA のプローブを対合させて検出する操作を自動で行う。さらにデジタルイメージをデータベースと照合して自動解析を行い、一致するデータを同一のリボグループとして選択し、その菌名や試料情報などを出力することができる。

臨床株の中で PFGE の各パターンを代表する株を選び試験に供した。また同じ PFGE パターンを示した 4b 株については複数株を試験してリボグループが同一となるか異なるかを試験した。

その結果、リボグループによる分類では PFGE グループと同程度の株間識別は可能であるが、PFGE パターンほどの識別はできないことが明らかとなった。

リボグループは 16S-rRNA の遺伝子に基づく情報であり、PFGE は染色体全体から得られる情報であることから同じ遺伝子レベルの情報でもそれぞれ情報の質は異なる。したがって、PFGE パターンが同じでもリボグループが異なる例もあった (PFGE パターン 30 番がリボグループ 246 S8 と 250 S2 に分類された)。しかし、大きく見た場合には *ApaI* と *AscI* による PFGE グループ 3 とリボグループ 246 S3、同 PFGE グループ 4 とリボグループ 246 S8 が対応する結果となっており、2つの情報間に関連性が認められたことは興味深い。

*SmaI* による PFGE は *ApaI* や *AscI* と泳動条件が異なるため、同じゲル上で同時に泳動することはできない。また、低分子量域にバンドが多いため不鮮明となりやすい欠点がある。反面バンド数が多く、詳細な株間識別を行う上で有効な制限酵素である。

臨床株について *SmaI* による PFGE を試みた結果、*ApaI* と *AscI* による PFGE では分離できなかった株間でも識別が可能な例が複数見出された。したがって、特に血清型 4b において *ApaI* と *AscI* による PFGE で同一パターンとなった場合には、同じプラグを用いて *SmaI* による PFGE を実施することは有用な株識別手段であると考えられる。しかし、不鮮明なバンドも多いことから判別が難しい場合もあり、パルスネットのようなデータベースの構築には適していないと考えられる。

今後さらに使いやすくして株間識別力に優れた疫学マーカーの開発が期待される。

#### 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. 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ず、食品を汚染した *L. monocytogenes* が感染症の原因菌となる可能性を否定することはできなかった。
3. 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用であると考えられた。
4. 血清型 4b では、いくつかの特定の PFGE パターンが多く検出されており、由来や採取時期の異なる複数の検体が含まれていた。したがって他の疫学マーカーの併用が必要と考えられる。
5. 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。同血清型の株を試験する場合には他の疫学マーカーが必要である。

その他  
なし

6. PFGE パターンの目視分類によって得た以上の結果については、コンピューターソフトウェアを用いたPFGEパターン分類によっても同様の結果が確認された。
7. 臨床株についてリボプリンターを用いたリボパターン解析を行った。リボグループによる分類ではPFGEグループと同程度の株間識別は可能であったが、PFGEパターンほどの詳細な株間識別はできなかった。
8. 血清型 4b において *ApaI* と *AscI* によるPFGE で株間識別が困難な場合には、*SmaI* によるPFGEは疫学マーカーとして有用であった。

#### F. 健康危険情報

*L. monocytogenes* について食品由来株と臨床由来株のPFGEパターンの分布を比較した場合に、大きな違いは認められなかった。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

1. 青山顕司, 高橋千登勢, 奥谷晶子, 五十君静信, 山本茂貴, 丸山務. 食品および臨床由来 *Listeria monocytogenes* のパルスフィールド電気泳動解析, 第24回日本食品微生物学会学術総会, 2003.10.2-3 (講演要旨集 p59)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

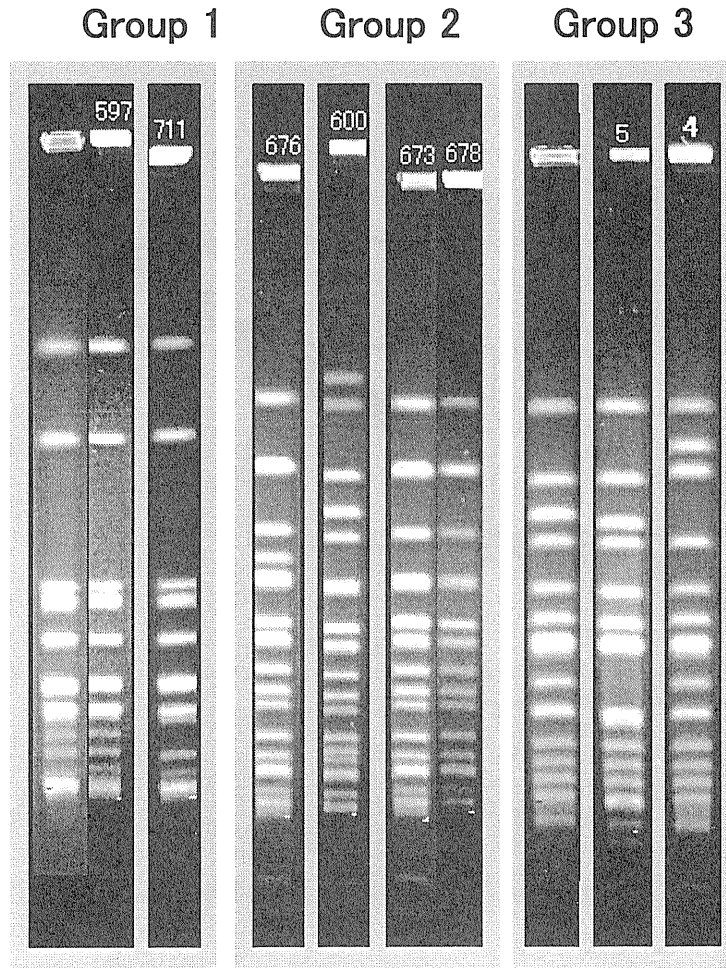
表1 *L. monocytogenes* 臨床株のPFGEグループ  
およびPFGEパターンとリボグループの関連

血清型	由来	採取年月日	PFGEグループおよびPFGEパターン						リボグループ
			Apal グループ	Apal パターン	Ascl グループ	Ascl パターン	Apal*Ascl グループ	Apal*Ascl パターン	
1/2a	臨床	不明	1	1a	5	5a	1	1	251 S2
1/2b	臨床	Aug-92	1	1a	5	5c	1	3	249 S3
1/2a	臨床	Nov-99	1	1a	5	5d	1	4	246 S2
1/2a	臨床	Apr-01	1	1b	5	5e	1	5	250 S5
1/2a	臨床	Apr-02	1	1a	5	5f	1	6	250 S6
1/2b	臨床	Sep-87	1	1a	5	5g	1	7	246 S2
1/2b	臨床	Apr-91	2	2a	7	7b	2	9	249 S2
4b	臨床	Jan-89	3	3a	3	3b	3	12	246 S3
4b	臨床	Jun-88	3	3b	3	3g	3	14	246 S3
4b	臨床	Jul-90	3	3b	3	3g	3	14	246 S3
4b	臨床	Oct-86	3	3d	3	3k	3	17	246 S3
4b	臨床	Sep-87	3	3e	3	3n	3	18	246 S3
4b	臨床	Aug-90	3	3f	3	3g	3	19	246 S3
4b	臨床	Oct-87	3	3i	3	3a	3	22	246 S3
4b	臨床	不明	3	3g	3	3f	3	24	246 S3
4b	臨床	Oct-87	3	3l	3	3i	3	25	246 S3
4b	臨床	Sep-88	3	3m	3	3c	3	26	246 S8
4b	臨床	Apr-88	3	3m	3	3d	3	27	247 S2
4b	臨床	Jan-89	4	4a	1	1d	4	28	246 S8
4b	臨床	Dec-98	4	4a	1	1d	4	28	246 S8
4b	臨床	Dec-93	4	4a	1	1d	4	28	246 S8
4b	臨床	Jun-88	4	4a	1	1e	4	29	246 S8
4b	臨床	Mar-88	4	4a	1	1i	4	30	246 S8
4b	臨床	Jul-95	4	4a	1	1i	4	30	246 S8
4b	臨床	Dec-95	4	4a	1	1i	4	30	250 S2
4b	臨床	Jan-00	4	4e	1	1a	4	32	250 S4
4b	臨床	Jan-88	4	4e	1	1b	4	33	246 S8
4b	臨床	Jan-91	4	4e	1	1b	4	33	246 S8
4b	臨床	Jun-90	4	4h	1	1f	4	36	248 S7
4b	臨床	Dec-90	4	4h	1	1g	4	37	246 S8
4b	臨床	Dec-00	4	4o	1	1g	4	41	246 S8
1/2b	臨床	Oct-88	4	4i	3	3l	5	42	246 S3
1/2b	臨床	May-02	4	4n	4	4e	6	45	246 S8
1/2a	臨床	不明	6	6a	8	8a	9	49	251 S4
1/2b	臨床	Apr-88	7	7a	2	2c	10	52	247 S3
4b	臨床	Aug-87	8	8i	3	3m	11	57	246 S1
1/2b	臨床	Jul-87	8	8a	4	4a	12	58	248 S2
1/2b	臨床	不明	8	8f	4	4c	12	62	251 S1
4b	臨床	May-91	8	8c	6	6d	13	64	249 S1
4b	臨床	Sep-98	8	8h	6	6b	13	65	246 S1
1/2b	臨床	Jun-88	11	11a	6	6c	16	74	246 S3
4b	臨床	Nov-87	12	12a	9	9a	17	75	246 S7
1/2b	臨床	Oct-87	13	13a	7	7c	18	76	246 S6

表2 *L.monocytogenes* 臨床株の *Sma* I のPFGEによる分類

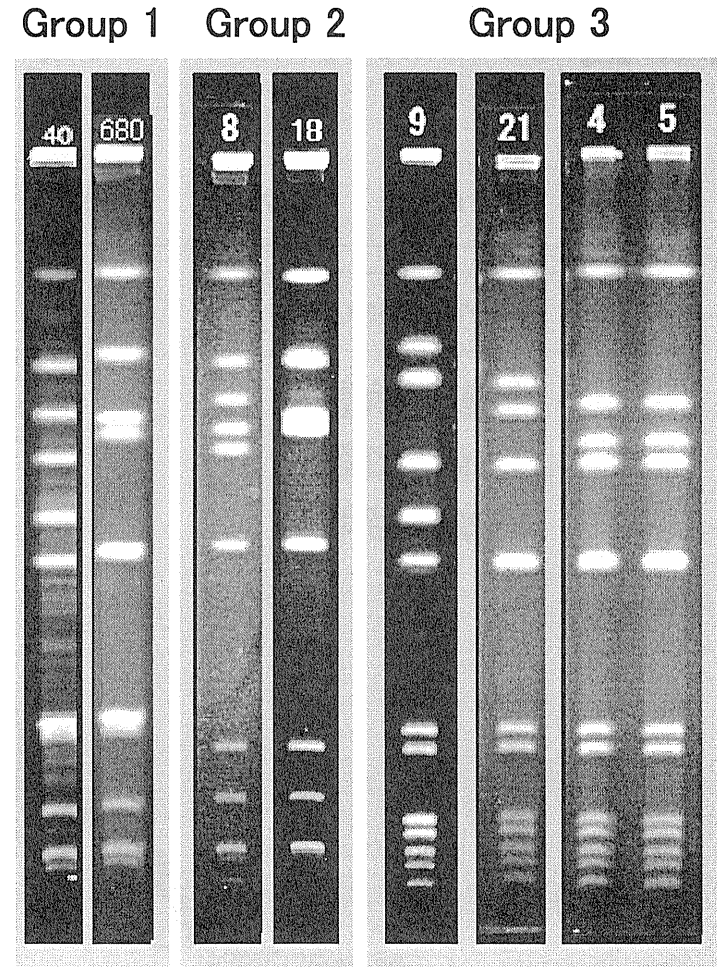
株番号	血清型	由来	採取年月日	Apal グループ	Apal パターン	Ascl グループ	Ascl パターン	Apal*Ascl グループ	Apal*Ascl パターン	SmaI グループ	SmaI パターン
I13	1/2a	臨床	不明	1	1a	5	5a	1	1	1	1a
I28	3a	臨床	Jun-93	1	1c	5	5b	1	2	1	1c
O707	1/2b	臨床	Aug-92	1	1a	5	5c	1	3	1	1a
N7	1/2a	臨床	Nov-99	1	1a	5	5d	1	4	1	1a
N20	1/2a	臨床	Apr-01	1	1b	5	5e	1	5	1	1b
O711	1/2b	臨床	Jul-92	1	1b	5	5e	1	5	1	1a
I1	1/2a	臨床	Apr-02	1	1a	5	5f	1	6	1	1a
I16	1/2?	臨床	Oct-02	1	1a	5	5f	1	6	1	1a
O636	1/2b	臨床	Feb-89	1	1a	5	5f	1	6	1	1a
O597	1/2b	臨床	Sep-87	1	1a	5	5g	1	7	1	1a
O692	1/2b	臨床	Apr-91	2	2a	7	7b	2	9	8	8a
O634	4b	臨床	Jan-89	3	3a	3	3b	3	12	2	2L
O638	4b	臨床	Apr-89	3	3a	3	3b	3	12	13	13a
I14	4b	臨床	不明	3	3a	3	3b	3	12	2	2d
O616	4b	臨床	Jun-88	3	3b	3	3g	3	14	2	2a
O673	4b	臨床	Jul-90	3	3b	3	3g	3	14	2	2e
O617	4b	臨床	Jun-88	3	3b	3	3g	3	14	2	2e
O639	4b	臨床	Apr-89	3	3b	3	3g	3	14	2	2e
O678	4b	臨床	Sep-90	3	3b	3	3g	3	14	2	2e
O627	4b	臨床	Oct-86	3	3d	3	3k	3	17	2	2b
O598	4b	臨床	Sep-87	3	3e	3	3n	3	18	2	2g
O676	4b	臨床	Aug-90	3	3f	3	3g	3	19	2	2f
O600	4b	臨床	Oct-87	3	3i	3	3a	3	22	2	2d
I24	4b	臨床	不明	3	3j	3	3b	3	23	2	2c
I15	4b	臨床	不明	3	3g	3	3f	3	24	2	2h
O601	4b	臨床	Oct-87	3	3l	3	3i	3	25	2	2m
O624	4b	臨床	Aug-88	3	3l	3	3i	3	25	2	2m
O625	4b	臨床	Sep-88	3	3m	3	3c	3	26	2	2i
O612	4b	臨床	Apr-88	3	3m	3	3d	3	27	2	2i
O633	4b	臨床	Jan-89	4	4a	1	1d	4	28	12	12a
I20	4b	臨床	Dec-98	4	4a	1	1d	4	28	3	3a
N1	4b	臨床	Dec-93	4	4a	1	1d	4	28	3	3c
N2	4b	臨床	Dec-93	4	4a	1	1d	4	28	3	3c
N21	4b	臨床	Oct-01	4	4a	1	1d	4	28	3	3b
N22	4b	臨床	Oct-01	4	4a	1	1d	4	28	3	3b
O619	4b	臨床	Jun-88	4	4a	1	1e	4	29	3	3d
O610	4b	臨床	Mar-88	4	4a	1	1i	4	30	3	3k
I2	4b	臨床	Jul-95	4	4a	1	1i	4	30	3	3i
N3	4b	臨床	Dec-95	4	4a	1	1i	4	30	3	3i
O640	4b	臨床	May-89	4	4a	1	1i	4	30	3	3i
O644	4b	臨床	Jun-89	4	4a	1	1i	4	30	3	3i
O674	4b	臨床	Jul-90	4	4a	1	1i	4	30	3	3L
I12	4b	臨床	不明	4	4a	1	1i	4	30	3	3k
I3	4b	臨床	Jul-95	4	4a	1	1i	4	30	3	3i
N5	4b	臨床	不明	4	4a	1	1i	4	30	3	3i
N8	4b	臨床	Jan-00	4	4e	1	1a	4	32	3	3j
O608	4b	臨床	Jan-88	4	4e	1	1b	4	33	3	3e
O682	4b	臨床	Jan-91	4	4e	1	1b	4	33	3	3e
N4	4b	臨床	Sep-96	4	4e	1	1b	4	33	3	3f
N6	4b	臨床	1999	4	4e	1	1b	4	33	3	3f
O680	4b	臨床	Jun-90	4	4h	1	1f	4	36	3	3h
I10	4b	臨床	不明	4	4h	1	1f	4	36	3	3g
I11	4b	臨床	不明	4	4h	1	1f	4	36	3	3g
I19	4b	臨床	Dec-90	4	4h	1	1g	4	37	4	4a
I23	4b	臨床	Nov-99	4	4l	1	1b	4	39	4	4b
I27	4b	臨床	Jan-02	4	4m	1	1b	4	40	4	4c
I22	4b	臨床	Dec-00	4	4o	1	1g	4	41	4	4d
O626	1/2b	臨床	Oct-88	4	4i	3	3l	5	42	6	6a
I26	1/2b	臨床	Aug-99	4	4b	4	4e	6	43	5	5e
I4	3b	臨床	May-98	4	4c	4	4f	6	44	5	5a
I5	3b	臨床	May-98	4	4c	4	4f	6	44	5	5a
I21	1/2b	臨床	May-02	4	4n	4	4e	6	45	5	5f
I25	1/2b	臨床	2002	5	5a	4	4j	8	48	6	6a
I18	1/2a	臨床	不明	6	6a	8	8a	9	49	11	11a
O613	1/2b	臨床	Apr-88	7	7a	2	2c	10	52	7	7a
O611	1/2b	臨床	Apr-88	7	7b	2	2b	10	53	7	7a
I7	1/2c	臨床	不明	7	7d	2	2d	10	55	7	7a
I8	1/2c	臨床	不明	7	7d	2	2d	10	55	7	7a
I17	1/2?	臨床	Dec-97	7	7e	2	2f	10	56	7	7b
O595	4b	臨床	Aug-87	8	8i	3	3m	11	57	5	5c
O630	1/2b	臨床	Jul-87	8	8a	4	4a	12	58	5	5b
O602	1/2b	臨床	Oct-87	8	8b	4	4d	12	59	5	5g
O594	1/2b	臨床	Jul-87	8	8d	4	4b	12	60	5	5d
I9	1/2b	臨床	不明	8	8f	4	4c	12	62	5	5h
O685	4b	臨床	May-91	8	8c	6	6d	13	64	14	14a
I6	4b	臨床	Sep-98	8	8h	6	6b	13	65	2	2k
O618	1/2b	臨床	Jun-88	11	11a	6	6c	16	74	2	2j
O708	1/2b	臨床	Aug-92	11	11a	6	6c	16	74	2	2j
O605	4b	臨床	Nov-87	12	12a	9	9a	17	75	10	10a
O603	1/2b	臨床	Oct-87	13	13a	7	7c	18	76	9	9a
O614	1/2b	臨床	May-88	13	13a	7	7c	18	76	9	9a

## Apa Iの分類例



55パターン 13グループ

## Asc Iの分類例



59パターン 9グループ

図1 PFGEのグループ分類例

Apa IとAsc Iの組み合わせにより76パターン、18グループに分類した

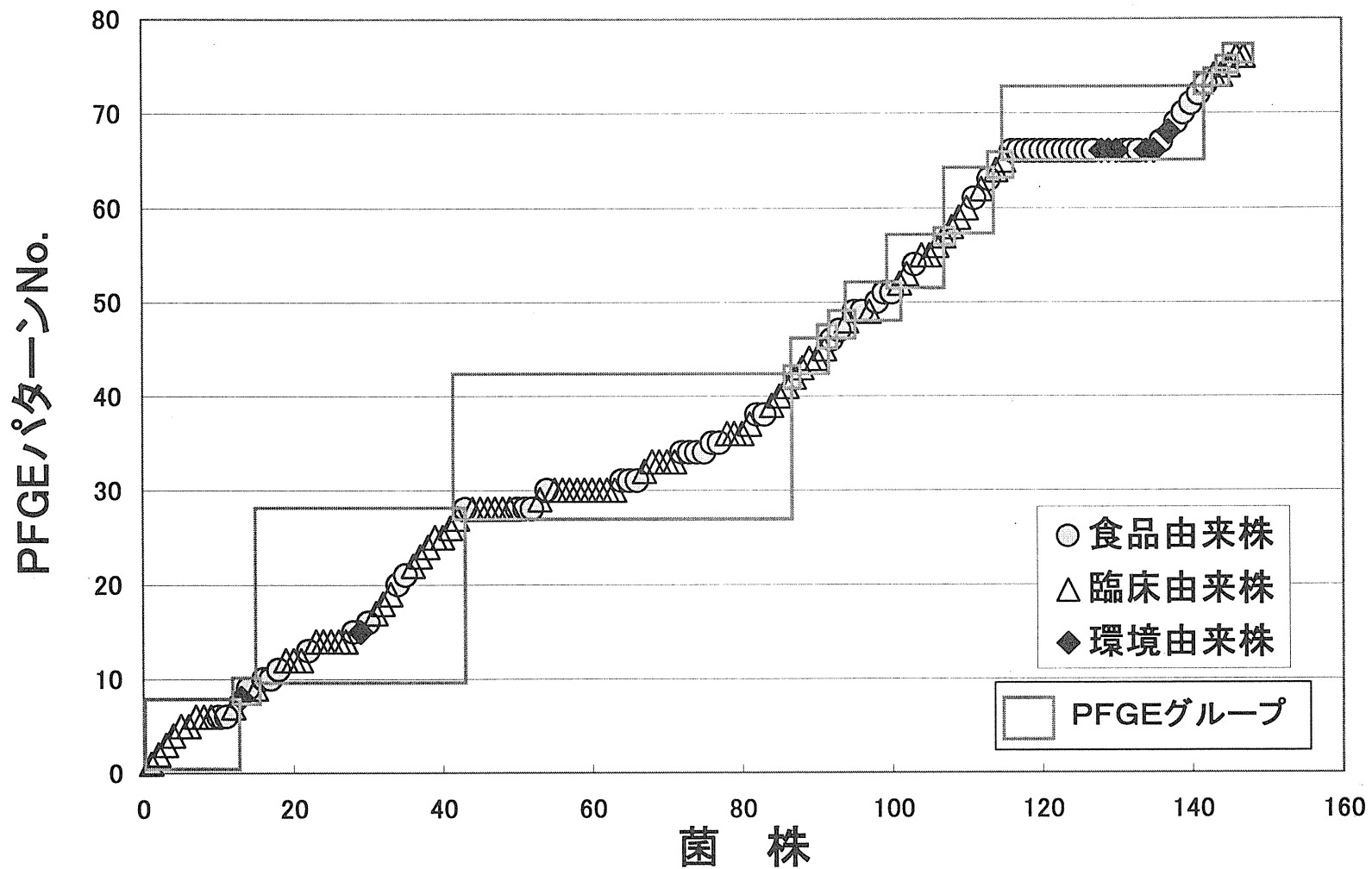


図2 *L. monocytogenes* の株の由来とPFGEパターンの関連性



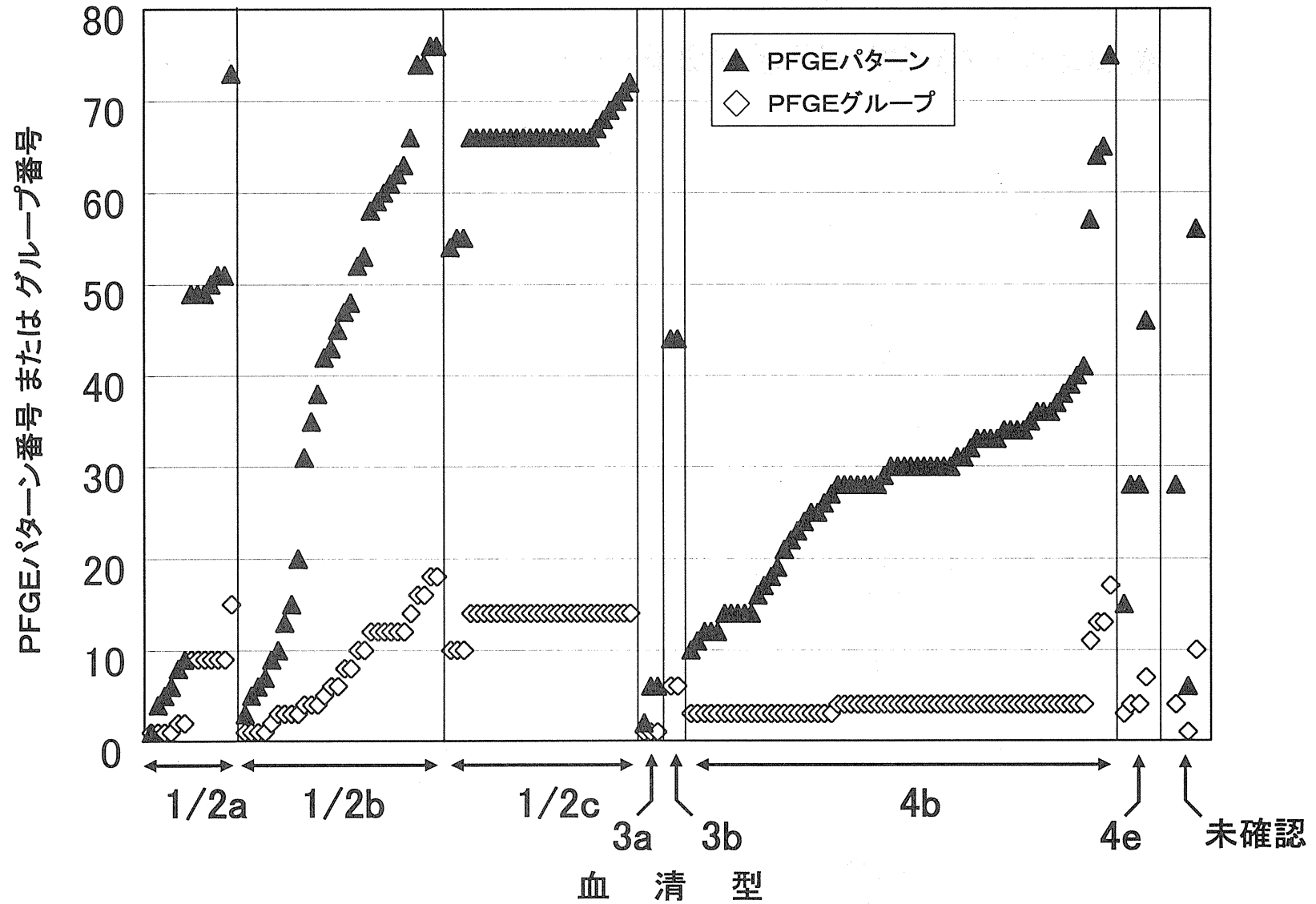


図3 *L. monocytogenes* の血清型別のPFGEパターンおよびPFGEグループの分布

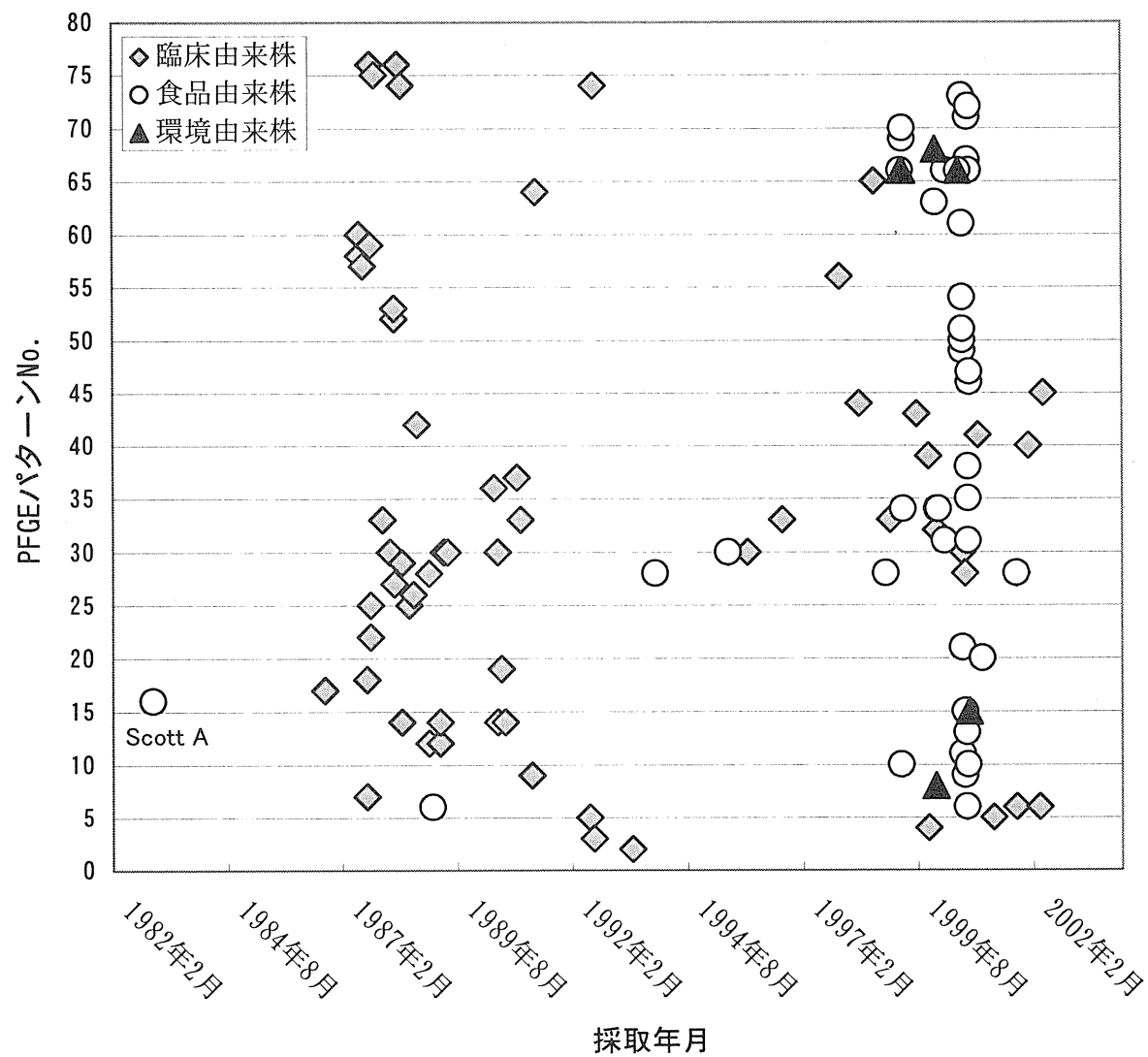


図4 *L. monocytogenes* 各株の採取年月とPFGEパターンの関連

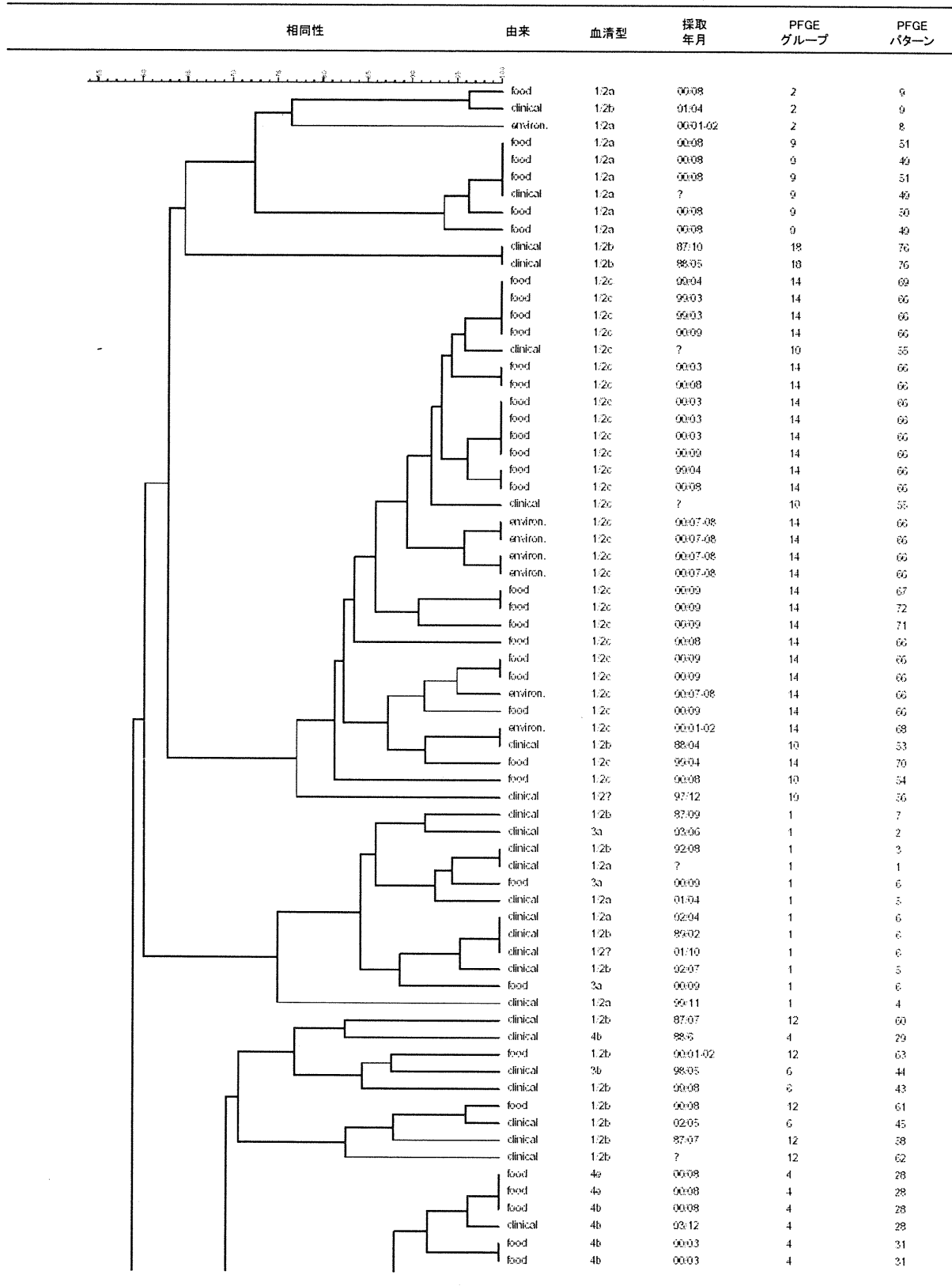


図5 *Apa* IによるPFGEパターンの解析(続く)

- 樹形図はコンピューターによる解析結果を示した。
- PFGEグループ番号およびPFGEパターン番号は目視で分類した場合の結果を示した。

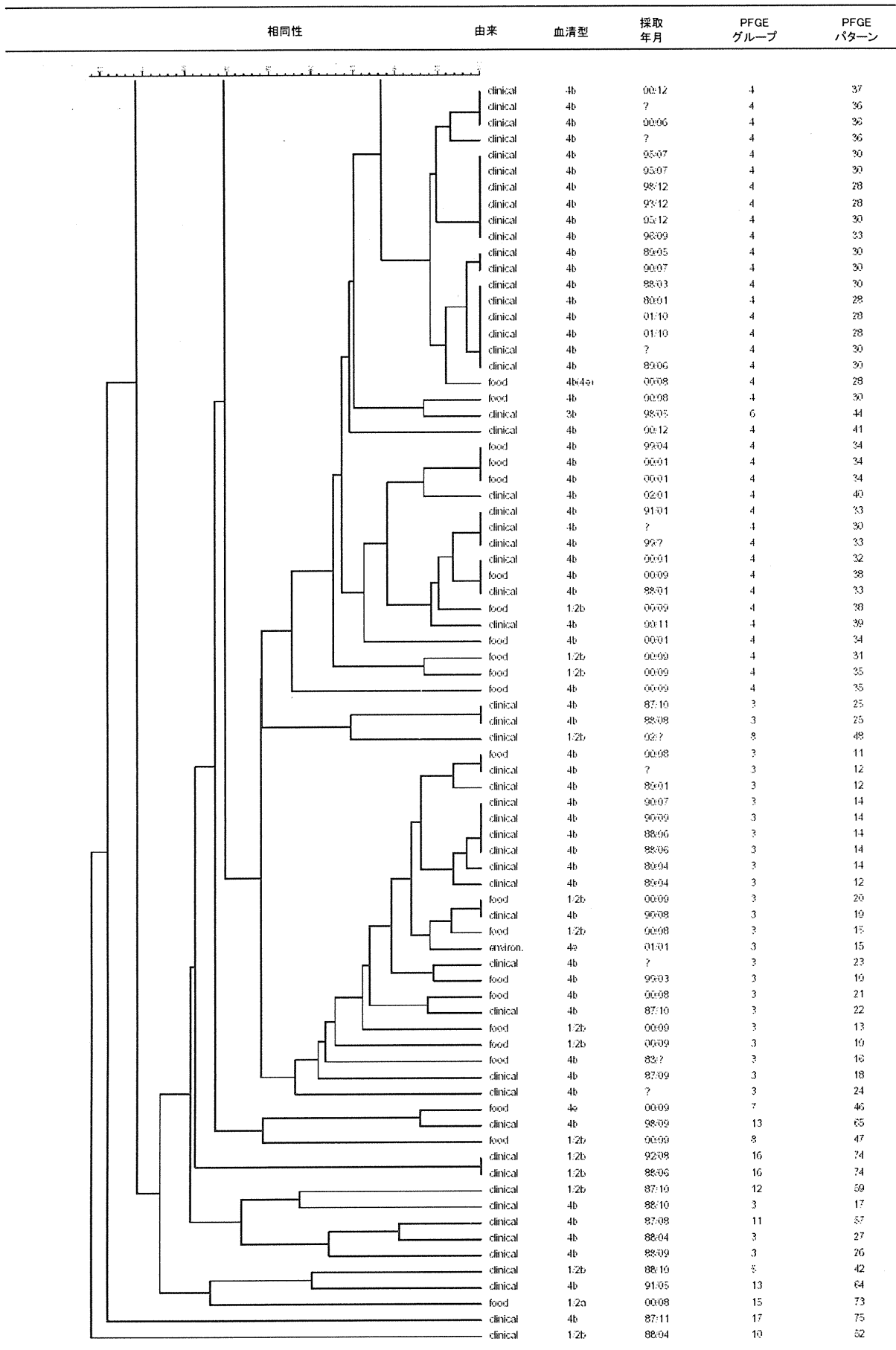


図5 続き

- 樹形図はコンピューターによる解析結果を示した。
- PFGEグループ番号およびPFGEパターン番号は目視で分類した場合の結果を示した。