

図6 Asc 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6 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。

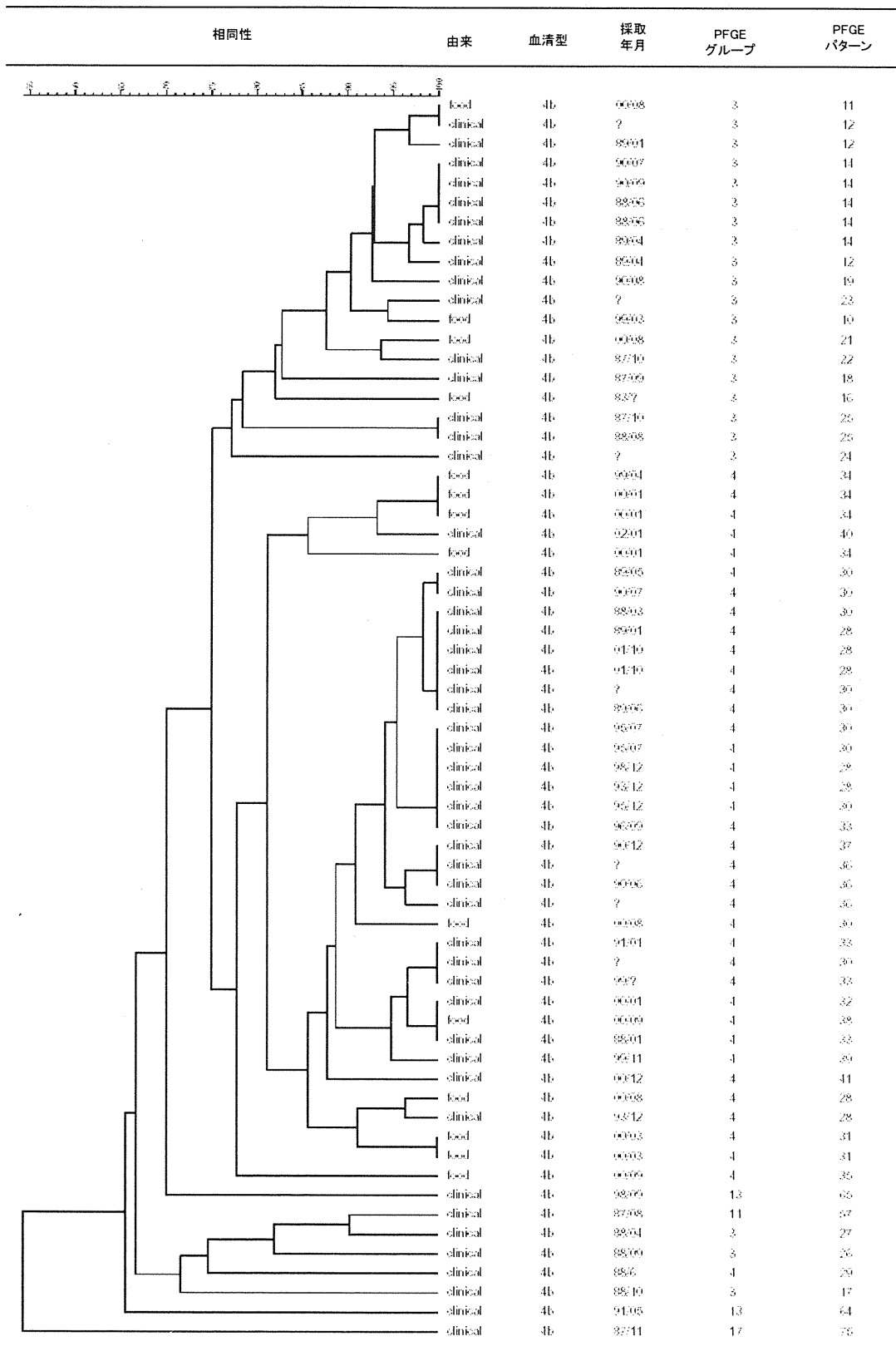


図7 *Apa*IによるPFGEパターンの解析(血清型4b)

- 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。

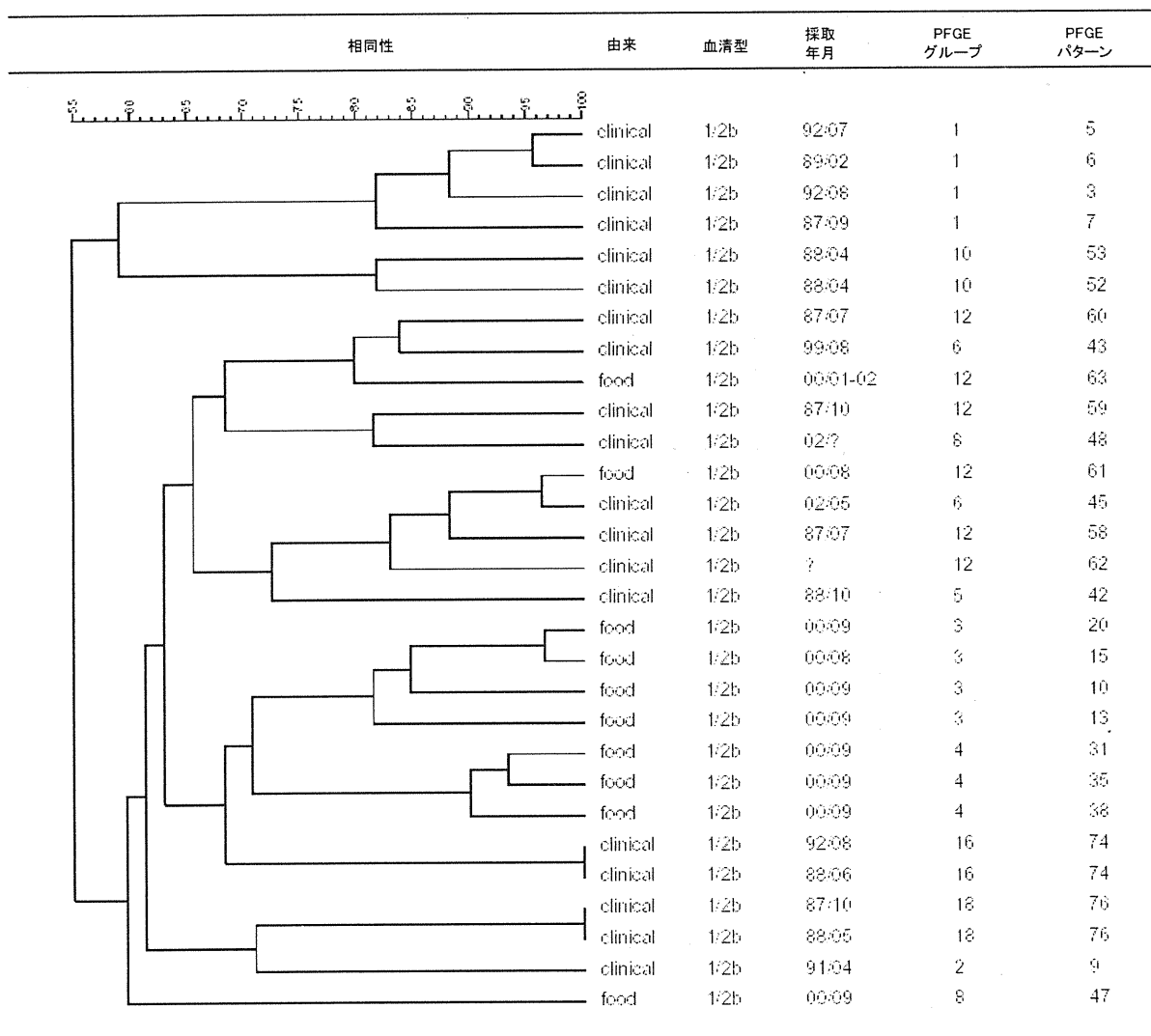


図8 *Apa*IによるPFGEパターンの解析(血清型1/2b)

- 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。

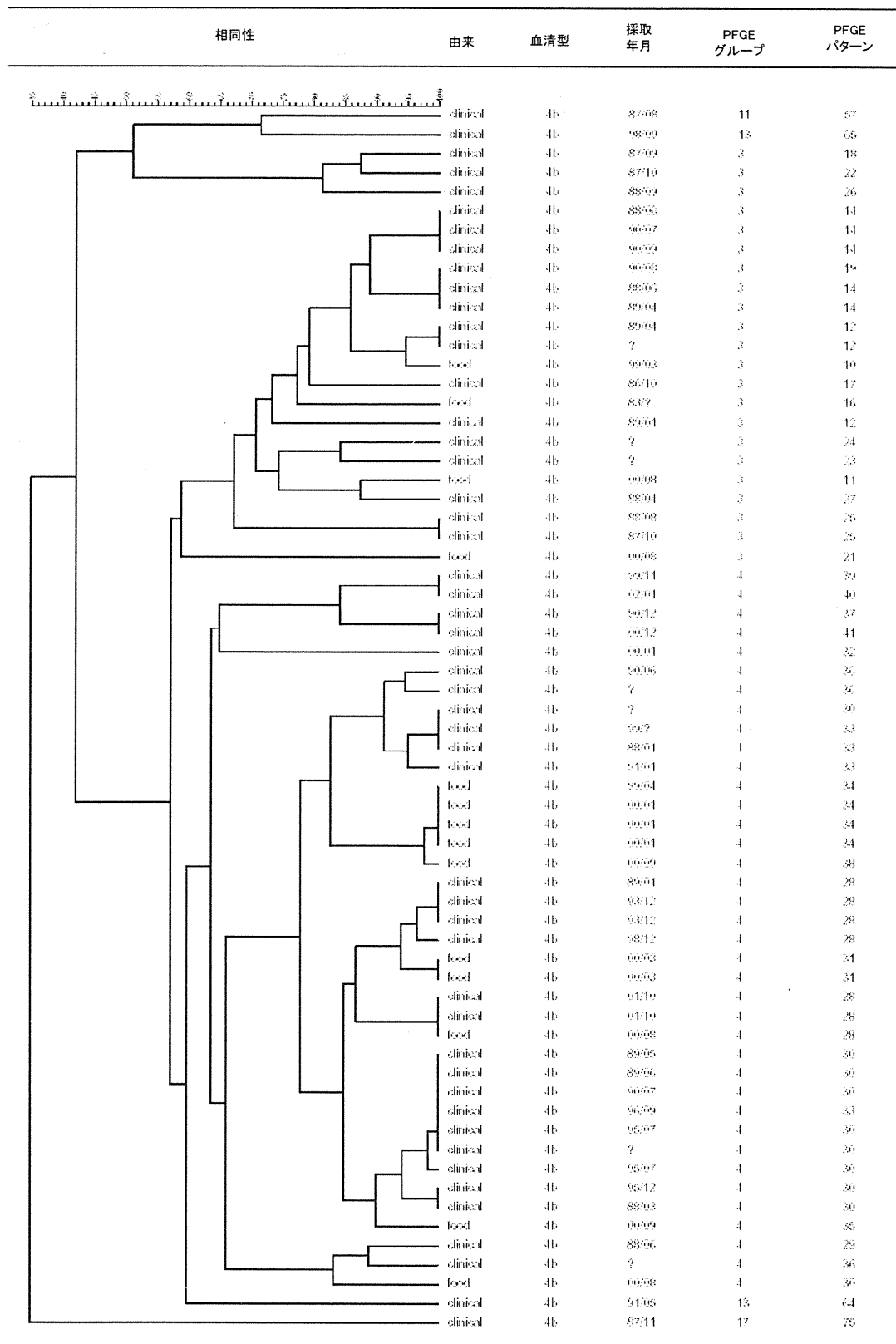


図9 Asc IによるPFGEパターンの解析 (血清型4b)

- 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。

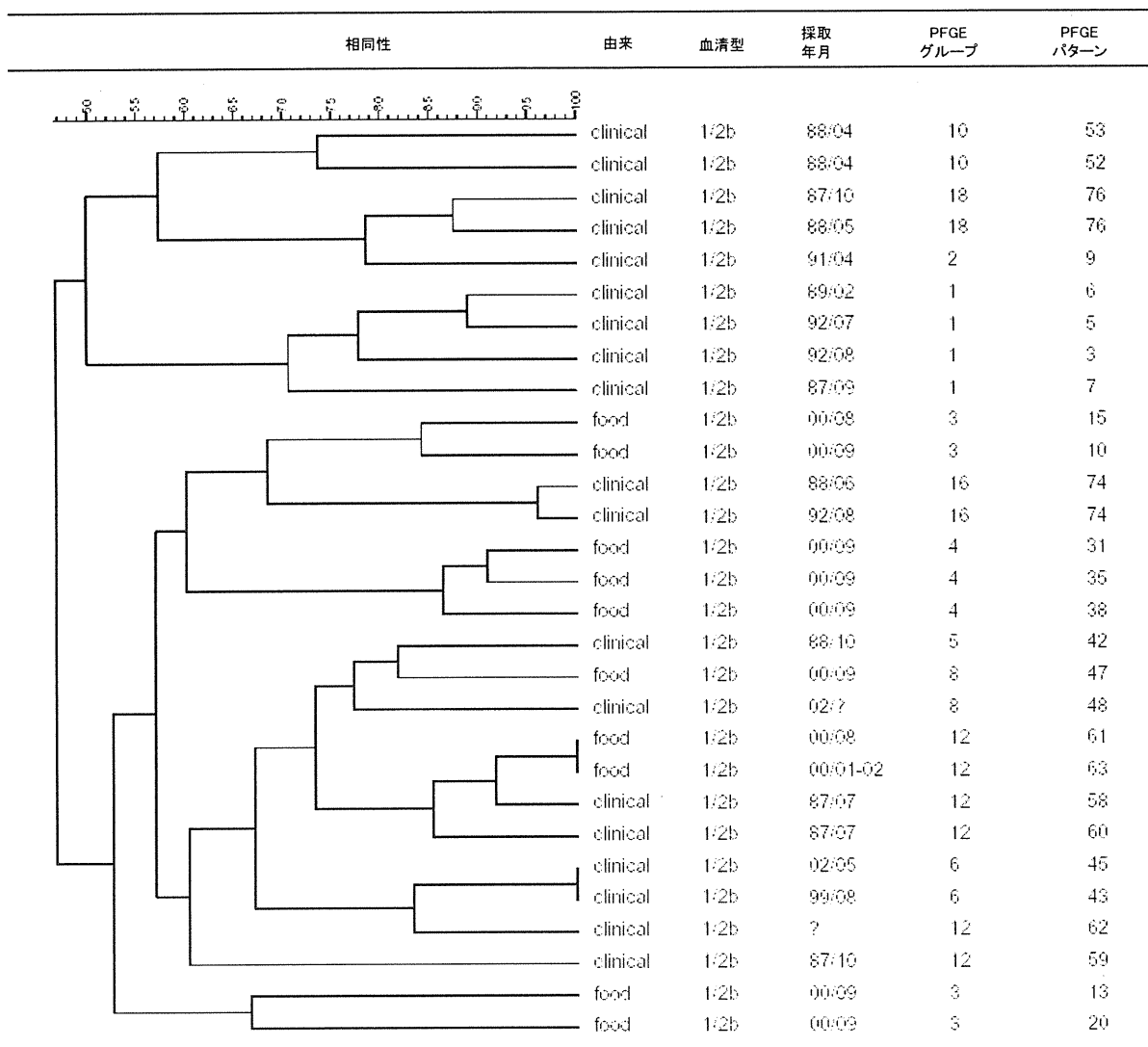


図10 *AscI*によるPFGEパターンの解析(血清型1/2b)

- 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。

厚生労働科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

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

協力研究者 岡田由美子、山本茂貴 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

協力研究者 広田雅光 財団法人日本冷凍食品検査協会

分担研究者 牧野壮一 帯広畜産大学

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

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てきた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発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 法及び Southern Dot Hybridization 法により行った。平成 13 年度には 12 種類の病原性に関連する遺伝子の PCR 反応条件の設定を行うとともに、主に標準株を用いた PCR 法による検索を行った。平成 14 年度に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、平成 13 年に条件検討を行った中で安定した成績を示した 10 種の遺伝子について PCR 陽性率を比較し、指標となりうる遺伝子を検討した。平成 15 年度には、遺伝子の保有状況を更に厳密に評価しうる Southern Dot Hybridization 法を用いて前年度と同様に患者由来株及び食品、動物等環境由来株をそれぞれ約 100 株用いた病原マーカー検索を行ったところ、6 種の遺伝子において患者由来株が環境由来株よりも有意に高い保有率を示し、それらが本菌の各菌株における病原性評価上大変重要な指標になる可能性が示された。また、特に臨床上重要となる血清型 4b において環境由来株で有意に保有率の低い病原因子関連遺伝子が複数示され、本菌の集団の中に人への感染リスクの低い菌株群が存在している可能性が示唆された。

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。特に我が国では臨床由来株のほぼ6割を血清型4b が占めている。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と思われる。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法及びSouthern Dot Hybridization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1.2ml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を用いて37℃で30分処理し、更に50℃で1時間proteinaseKとSDSを用いて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。エタノール沈殿により抽出したDNAは滅菌精製水500μlに溶解し、1μl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、表2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20μlとし、iCycler(BIO RAD)を用いて次の条件で行った。

Step1: 94℃ 2分

Step2: (94℃ 1分、48℃* 1分、72℃ 1分)を30サイクル

Step3: 72℃ 7分

* 但し *inlB* 及び *inlC* のみ、47℃で行った。

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. Southern Dot Hybridization法

各菌株から抽出したDNAは分光高度計(島津製作所)を用いて波長260nmにおける吸光度を測定することにより、その濃度

を算出した。各菌株のDNA 2 μ g は BIO-Dot(BIO RAD 社)のマニュアルにしたがい、NaOH 中で100℃10分間加熱することにより一本鎖に変性させた後に、positive charged nylon membrane (Ambion 社)に吸着させ、80℃30分 baking して固定させた。10種の病原因子関連遺伝子を検出するためのプローブは、PCR 法でもちいた各プライマー対とコントロール株である *L. monocytogenes* EGD 株を用いて行った PCR 産物 3 μ g をアガロースゲルより切り出して精製したものを、DIG Chemilluminescence Kit (Roche 社)のマニュアルに従い、ジゴキシゲニンでラベルして用いた。ナイロン膜とプローブのハイブリダイゼーションは42℃で20時間行い、その後の洗浄は室温5分を2回、68℃15分を2回行った。続いて化学発光の操作をした後にX線フィルムを感光させてハイブリダイゼーションが陽性か否かの判定を行った。

5. 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(7%)、1/2b が35株(35%)、1/2c が20株(20%)、3b が1株(1%)、4b が36株(36%)、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 86, 77 及び 88%)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 96, 98, 98, 94, 97, 97 及び 98%)みられた(表4)。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 *prfA* (PCR 陽性率は環境由来株で 92%, 患者由来株で 100%) 及び *inlA* (PCR 陽性率は環境由来株で 70%, 患者由来株で 84%)であった。また、比較的検体数が多い 1/2b と 4b について各由来間での結果を比較すると、血清型 1/2b では全ての遺伝子に於いて有意差は見られず、血清型 4b では *prfA*, *inlA* (それぞれ危険率 1%以下) 及び *iap* (危険率 5%以下) について患者由来株が環境由来株より有意に高い保有状況を示した(表5)。また、食品等環境由来株の由来別にみた PCR 陽性率では、鶏肉では血清型 1/2b, 4b とともに *inlA* で、豚肉では *prfA* で、患者由来株に比べ有意に低い陽性率を示しており、牛肉に於いては *prfA*, *hly*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *iap* 及び *opuCB* の6種の遺伝子で患者由来株よりも有意に陽性率が低かった。両血清型ともに、生ハム等の豚肉加工品の由来株ではほぼ全ての遺伝子について100%の陽性率を示していた(表6)。Southern Dot Hybridization 法での検索では、*prfA*, *hly*, *actA*, *plcB* が危険率 1%以下で、*mpl*, *clpC* が危険率 5%以下で患者由来株が環境由来株よりも有意に高い保有率を示した(表7)。更にこの結果を、検体数の多い血清型 1/2b と 4b について解析したところ、1/2b では *actA* のみで有意差が見られたが、4b では *opuCB* を除く9種の病原

遺伝子で患者由来株が環境由来株よりも有意に高い保有率を示した(表8)。特に *prfA*, *hly*, *actA*, *mpl*, *plcB*, *inlA* 及び *clpC* の7種の遺伝子で危険率1%以下の有意差が得られた。また、食品由来株を主なカテゴリー別に分類した結果でも、血清型4bに属する菌株で多くの遺伝子が患者由来株における保有率と異なる傾向を示した(表9)。さらにPCR法での結果と同様に、生ハム、ソーセージ等の豚肉加工品由来の菌株ではほぼ全ての遺伝子に於いて100%の保有率を示していた(表10)。

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うにあたり、初年度には本菌の代表的な病原因子関連遺伝子10種類を検出するPCRの反応条件の設定を行った。*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(PI-PLC)をコードしており、*hly* は細胞内寄生菌である本菌が宿主のマクロファージ細胞の殺菌機構であるリソソームからの脱出に必要な listeriolysinO をコードする遺伝子である。*actA* は脱出後の菌の隣接細胞への拡散に必要な actin tail を形成するための蛋白質をコードしている。*plcB* は phosphatidycholine specific phospholipase C(PC-PLC)を、*mpl* は metalloprotease をコードしており、両者とも宿主細胞の脂質膜の溶解に関与していると考えられている。*inlA* は本菌が細胞内に侵入する際に重要な分子である

internalinA をコードしており、*prfA* はこれらの病原遺伝子の調節因子である positive regulating factorA(PrfA)をコードする遺伝子である。*iap* はペプチドグリカンの分解酵素をコードしており、*inlB* 及び *inlC* は細胞内への侵入に関わると考えられている *internalinB* および *C* をコードしている。*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。*opuCB* は本菌が高食塩濃度や低温に暴露された際の生存機構である glycine betaine の貯留機構に関わる遺伝子であり、前述の各種病原因子関連遺伝子と同様に、その変異株が病原性の低下を示すことが明らかとなっている遺伝子である。初年度である平成13年度に標準株を用いてPCR法の条件設定をしたところ、*prfA*, *plcA*, *hly*, *actA*, *plcB*, *mpl*, *inlA*, *iap* *clpC* 及び *opuCB* の10種類の遺伝子においては安定した成績が得られたが、*inlB* 及び *inlC* については他のプライマーと同じ50℃のアニーリング条件ではバンドを検出できず、47℃に低下させても smear 状の電気泳動像を示すことが多く安定した成績は得られなかった。その為、次年度からはその2種を除く10種の病原因子関連遺伝子について解析を行った。14年度に行ったPCR法による検索では、患者由来株のみで陽性率が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。また、比較的検体数の多い血清型 1/2b 及び 4b についての個別の解析では、1/2b においては *clpC* のみ、4b においては *plcA*, *inlA*, *clpC* 及び *hly* の 4 種の遺伝子で患者由来株が環境由来株よりも有意に高い陽性率を示した。一方、平成 15 年に行った Southern Dot Hybridization 法の結果では、*plcA* 及び *mpl* が患者由来株で 100% の保有率を示した。由来別の解析では、*actA*, *plcB* について危険率 1% 以下で *prfA*, *hly*, *mpl*, 及び *clpC* について危険率 5% 以下で患者由来株が環境由来株よりも有意に高い保有率を示した。また、比較的検体数の多い血清型 1/2b 及び 4b についての個別の解析では、1/2b においては *actA* のみ、4b においては *prfA*, *plcA*, *hly*, *actA*, *plcB*, *mpl*, *inlA*, *iap* 及び *clpC* の 9 種の遺伝子で患者由来株が環境由来株よりも有意に高い率を示した。以上の結果を総括すると、PCR 法と Southern Dot Hybridization 法の両方で患者由来株が環境由来株よりも有意に高い保有率を示したのは、*clpC* だった。PCR 法はごく少量の DNA を数時間で大量に増幅することが可能であり、判定も短時間で行うことができるため簡易的な迅速法としては大変優れているが、増幅反応に使う短い一本鎖 DNA 断片であるプライマーに結合する菌側 DNA の塩基配列のわずかな変異で反応の進展が妨げられるため、塩基配列に多型性があると検出率が著しく低下するおそれがある。それに対し Southern Dot Hybridization 法は大量の DNA が必要である、操作が煩雑であり判定に数日を要する等のデメリットはあるものの、数百塩基のプロープを結合させて遺伝子を検出するた

め、ある程度の塩基配列の多型性があっても遺伝子の保有率を厳密に示しうる実験法である。これらの双方で有意差を示した *prfA* は本菌の強毒株検出マーカーとして有効に活用しうると考えられた。また、両方法とも血清型 4b で多くの遺伝子において患者由来株が環境由来株よりも有意に高い保有率を示しており、特に Southern Dot Hybridization 法では今回調査した遺伝子の大半で有意差が確認された。この結果から、4b 株の中にある程度の割合で人に病原性を示さない集団が存在している可能性が強く示された。環境由来株には複数の病原遺伝子を保有しない株が多く見られ、これらの株は本菌の病原性に最も重要と考えられている *plcA*, *prfA*, *hly*, *actA*, *plcB*, *mpl* の遺伝子クラスターの一部或いは全部が欠損しているか、今回のプロープで検出できない程度の大規模な塩基配列の多型性を示している可能性が考えられた。このような集団の存在を確認し、その判別法を確立することは人のリステリア症のリスクを正確に評価するために大変重要であると思われる。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、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、抗体を用いたウェ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。また、豚肉加工品由来株で豚肉由来株よりも数種の遺伝子が有意に高い保有率を示したことから、加熱、高食塩濃度への暴露など加工製品の製造工程により病原性の高い株が選

括的に生残する可能性も考えられ、今後これらの仮説を検証していくことにより食品媒介リステリア症のリスクの軽減させる方法を見いださうと思われた。

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法及びSouthern Dot Hybridization法により行ったところ、本菌の主要な病原因子の発現に不可欠な *prfA* 遺伝子で患者由来株における保有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。また、血清型4bの菌株の中に病原因子関連遺伝子を持たない、或いは塩基配列の多型によって遺伝子産物の活性が低下した、人への病原性が低い集団が存在している可能性が示唆された。

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, p. 1541-1547.

2. 学会発表

1) 岡田由美子、広田雅光、奥谷晶子、山本茂貴、五十君静信。環境及び臨床由来リステリア菌株における病原因子関連遺伝子の保有状況について。第24回日本食品微生物学会。2003年10月。岡山

2) 岡田由美子、牧野壮一、奥谷晶子、山本茂貴、五十君静信。*Listeria monocytogenes* の患者及び食品・環境由来株における主要病原因子関連遺伝子の保有状況。第77回日本細菌学会総会。2004年4月。大阪

表1. 供試菌株

由来	血清型	株数
患者	1/2a	7
	1/2b	21
	1/2c	2
	3a	1
	3b	2
	4b	65
	計	98
環境	1/2a	7
	1/2b	35
	1/2c	20
	3b	1
	4b	36
	型別不能	1
	計	100

Listerial virulence gene-specific primers and DNA probes used in this study.




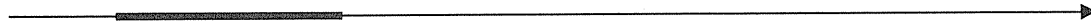
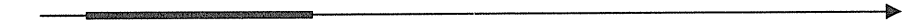



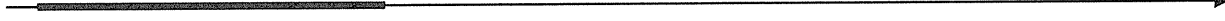

Target gene	primer sequences for PCR and making probes (5'-3')	size of probe(bp)	references
<i>prfA</i>	CAGCTGAGCTATGTGCGAT / ACCAATGGGATCCACAAG	467	Bubert et al.
		738	
<i>plcA</i>	TTCGGGGAATTCCATGATTAG / CACTACTCCCGGGACTGAG	392	Bubert et al.
		954	
<i>hly</i>	CGCGGATGAATTCGATAG / GTCATACCCGGGAAATCAATG	316	Bubert et al.
		1593	
<i>actA</i>	ACGGGACCAAGATACGAA / GCATGCTAGAATCTAAGTCAC	411	Bubert et al.
		1920	
<i>mpl</i>	TTGCCAGATTCCTGCGAA / GCGCCGGTTTCTACGTCCACTTG	428	Bubert et al.
		1533	
<i>plcB</i>	CCAGTAGGATCCACTGTATC / CTTATTTCCCGGGTTTTGCTAATG	419	Bubert et al.
		860	
<i>inlA</i>	GTGATATAACTCCACTTGGG / GGTTAAGTTCGCAAGTGAGC	425	Bubert et al.
		2403	
<i>iap</i>	CAAAGTGTAAACACAGCTACT / TTATACGCGACCGAAGCCAAC	660	Bubert et al.
		1449	
<i>clpC</i>	TAGGGCTTGTAAGAGAAG / CCACGATATTTTGTACTG	655	in this study
		2463	
<i>opuCB</i>	AACGAAGACTTATAAAGGGG / ATAATTACGATACGGTCTGC	606	in this study
		1194	

表3. 標準株を使った各遺伝子のPCR反応性

菌株	遺伝子	<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>opuCB</i>	<i>inlB</i>	<i>inlC</i>
国内標準株													
血清型 1/2a		-	+/-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+/-
1/2b		+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
1/2c		+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	Sm	Sm
3a		+	-	+	+	+/-	+	-	-	-	-	-	-
3b		+	+/-	+	+	+	-	-	-	-	-	Sm	Sm
3c		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
4a		+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+/-
4b		+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	Sm
4c		+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	Sm	Sm
4d		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	Sm
6a		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	Sm
5		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Sm
6		-	-	-	-	-	+	-	S	-	-	Sm	Sm
7		L	-	-	+	-	S	-	-	-	-	-	-
ドイツ標準株													
血清型 1/2a	<i>prfA</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
1/2b		-	+	+	+	Sm	Sm	Sm	+	Sm	Sm	Sm	Sm
1/2c		+/-	+	+	+	+	+	-	Sm	Sm	+	+	+
3a		+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
3b		+	+	L	+	+	+	+	+	+	-	+	+
3c		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
4a		+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	LS	S
4ab		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
4b		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+
4c		+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Sm
4d		+	L	L	L	+	+	+	+	+	+	+	+
4e		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7		+	L	-	-	+	+	+	+	+	+	+/-	+
EGD(血清型 1/2a)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. innocua</i>		-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	-	-	S	S
<i>L. ivanovii</i>		+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gray</i>		-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	+/-
<i>L. murray</i>		-	-	-	+/-	-	-	-	S	-	-	-	Sm
<i>L. welshmeri</i>		-	-	-	-	S	-	-	-	-	-	-	-

L: larger band, S: smaller band, Sm: smear

表4. 各遺伝子のPCR陽性率

由来	遺伝子	<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>opuCB</i>
環境由来(100株)		92 (92%)	86 (86%)	97 (97%)	97 (97%)	93 (93%)	98 (98%)	70 (70%)	96 (96%)	90 (90%)	97 (97%)
患者由来(98株)		98 (100%)	85 (87%)	98 (100%)	98 (100%)	94 (96%)	95 (97%)	82 (84%)	97 (99%)	84 (86%)	97 (99%)
合計(198株)		190 (96%)	171 (86%)	195 (98%)	195 (98%)	187 (94%)	193 (97%)	152 (77%)	193 (97%)	174 (88%)	194 (98%)

*: 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=0.0043 (*prfA*), p=0.0227 (*inlA*)

表 5. 血清型別にみた PCR 陽性菌株数 (PCR 陽性菌株数/総菌株数)

血清型・由来		遺伝子	<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>opuCB</i>
1/2b	環境由来		33/35	31/35	34/35	34/35	33/35	35/35	24/35	35/35	32/35	34/35
	患者由来		21/21	19/21	21/21	21/21	20/21	21/21	19/21	21/21	19/21	21/21
4b	環境由来		31/36*	29/36	34/36	34/36	31/36	34/36	24/36*	32/36*	29/36	34/36
	患者由来		65/65*	60/65	65/65	65/65	62/65	64/65	59/65*	64/65*	57/65	65/65

* : p=0.0021(*prfA*), 0.0024 (*inLA*), 0.0377 (*iap*)

表6 主なカテゴリー別に見たPCR法における各遺伝子の陽性検体数

血清型	由来	陽性検体数 / 総検体数									
		<i>prfA</i>	<i>plcA</i>	<i>hly</i>	<i>actA</i>	<i>mpl</i>	<i>plcB</i>	<i>inlA</i>	<i>iap</i>	<i>clpC</i>	<i>opuCB</i>
1 / 2 b	鶏肉	13/13	11/13	13/13	13/13	13/13	13/13	8/13*	13/13	12/13	13/13
	豚肉	2/3**	2/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	3/3	2/3	2/3**
	豚肉加工品	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	5/5
	魚介類・加工品	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	6/6	3/6*	6/6	6/6	6/6
	患者	21/21	19/21	21/21	21/21	21/21	20/21	19/21	21/21	19/21	21/21
4 b	鶏肉	8/8	7/8	8/8	8/8	8/8	8/8	5/8*	8/8	7/8	8/8
	豚肉	12/14**	11/14	14/14	13/14*	13/14	12/14	11/14	13/14	11/14	14/14
	豚肉加工品	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
	牛肉	4/7**	5/7	5/7**	6/7**	6/7	4/7**	2/7**	4/7**	5/7	5/7**
	患者	65/65	60/65	65/65	65/65	64/65	62/65	59/65	64/65	57/65	65/65

*、**：各血清型の患者由来株に比べ、有意に保有率が低い遺伝子 (*: 危険率5%以下、**: 危険率1%以下)

表7. 各遺伝子の Southern Dot Hybridization 陽性率

由来	遺伝子	<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>opuCB</i>
環境由来(100株)		77 (77%)	97 (97%)	92 (92%)	68 (68%)	71 (71%)	96 (96%)	80 (80%)	96 (96%)	88 (88%)	92 (92%)
患者由来 (98株)		91 (93%)	98 (100%)	98 (100%)	92 (94%)	89 (91%)	98 (100%)	88 (90%)	97 (99%)	94 (96%)	88 (90%)
合計 (198株)		168 (85%)	195 (98%)	190 (96%)	160 (81%)	160 (81%)	194 (98%)	168 (85%)	193 (97%)	182 (92%)	180 (91%)

* : 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=0.0019 (*prfA*), p=0.0043 (*hly*), p<0.0001 (*actA*), p=0.0004 (*plcB*), p=0.0455(*mpl*), p=0.041 (*clpC*)

表 8. 血清型別にみた Southern Dot hybridization 陽性率 (Southern Dot hybridization 陽性菌株数/総菌株数)

血清型・由来		遺伝子	<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>opuCB</i>
1/2b	環境由来		27/35	35/35	32/35	23/35*	26/35	35/35	30/35	35/35	31/35	32/35
	患者由来		20/21	21/21	21/21	20/21*	19/21	21/21	19/21	21/21	20/21	19/21
4b	環境由来		31/36*	33/36*	31/36*	17/36*	16/36*	32/36*	25/36*	32/36*	28/36*	31/36
	患者由来		60/65*	65/65*	65/65*	61/65*	60/65*	65/65*	61/65*	64/65*	63/65*	59/65

* : *p* value (serotype 1/2b) $p=0.0113$ (*actA*)

p value (serotype 4b) $p=0.0021$ (*prfA*), 0.0181 (*plcA*), 0.0021 (*hly*), <0.0001 (*actA*, *plcB*), 0.0061 (*mpl*), 0.001 (*inlA*), 0.0377 (*iap*), 0.002 (*clpC*)