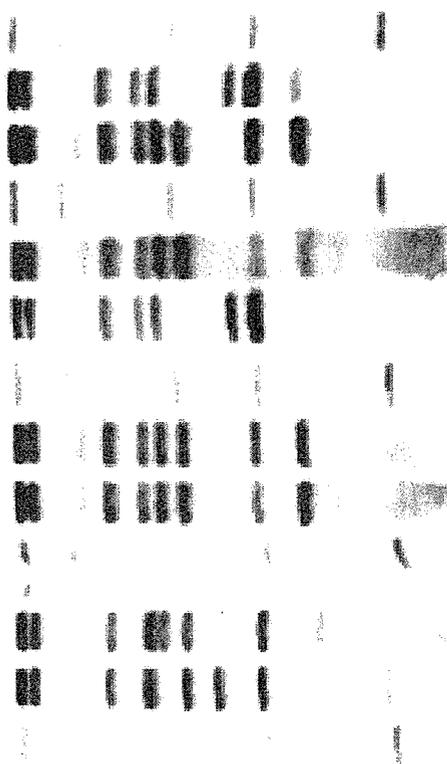


リボタイピング結果(2)菌株9-16

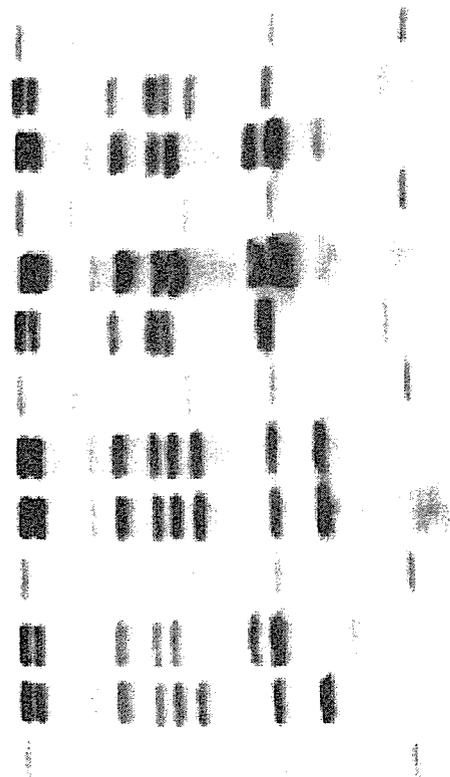
M 9 10 M11 12 M 13 14 M15 16 M



M: Marker

リボタイピング結果(3)菌株17-24

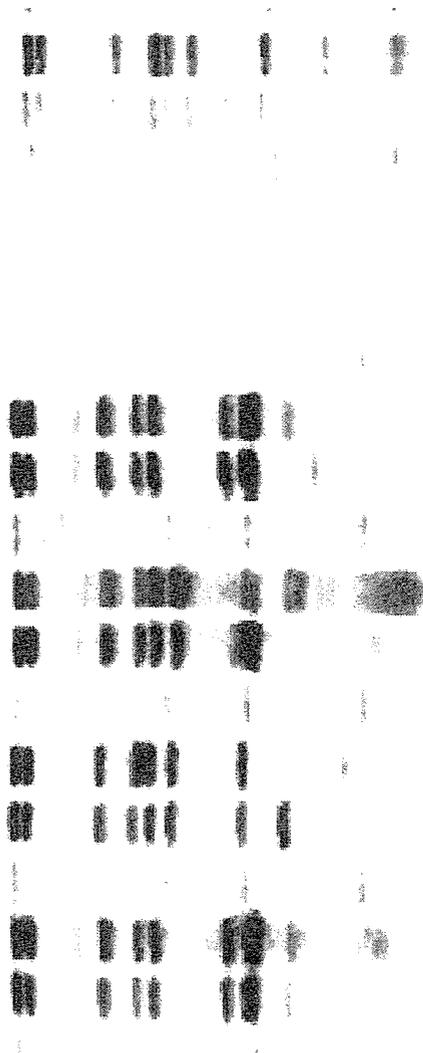
M17 18 M19 20 M 21 22 M23 24 M



M: Marker

リボタイピング結果(4)菌株25-33

M25 26M27 28 M29 30 M31 32 M M C 33



M: Marker, C: Control(EGD)

輸入食肉から分離された*Listeria monocytogenes*の分子進化学的解析

研究協力者 植田富貴子(日本獣医生命科学大学獣医公衆衛生学教室・教授)

落合 由嗣 (同上・助手)

本藤 良 (同上・名誉教授、同上・寄付講座)

庄司 紘史 (久留米大学医学部神経内科教授；

現在、国際医療福祉大学リハビリテーション学部教)

小笠原邦敏 (横浜検疫検査センター)

研究要旨

11ヶ国より輸入して保税中の食肉から、*L.monocytogenes*の分離を試みて汚染状況を検討した。この結果、総計93株の*L.monocytogenes*が分離され(輸入株)、血清疫学的解析から、*L.monocytogenes*による食肉汚染が起こっている当該国での常在汚染の可能性、および複数の血清型菌株による複合汚染の可能性を明らかにした。また、分離菌株の中から30株の*L.monocytogenes* を選択し、それらから抽出した染色体DNAの*iap*領域(407bp)についての塩基配列を決定して、本邦の環境・食肉・患者由来分離株由来(本邦株)のそれらと比較解析して分子進化学的位置づけを行った。輸入株30株は輸入国と血清型に対応して、EGD株とは異なる10型に分類された。この10型中の3型は、本邦株で作成した系統樹中で新しい枝を形成していたが、本邦株のみで作成した系統樹を大きく変化させることはなかった。従って、輸入株も本邦株と同様に分子進化学的にA、B、C群の3系統に大別可能な系統樹上に分類し得ることを明らかにした。また、この3系統に含まれる分離株の血清型の分布との関連を解析することにより、系統と血清型との強い関連性を明らかにした。

A. 研究目的

前年度は、これまでに集積した本邦分離株と1株の外国由来株の*iap*領域の塩基配列に基づいて系統樹解析を行い、分離株が分子進化学的にA、B、C群の3系統に大別される19型に分類され、C群が外国からの輸入株によって構成されている可能性を示した。本年度は、輸入食肉から分離されたその他の*L.monocytogenes* 分離株についての血清疫学的・分子疫学的解析を行うと共に、これまで当研究室で集積した*L. monocytogenes*についての成績と総合して考察を行った。

B. 研究方法

1) 使用した *L.monocytogenes* の由来
輸入食肉由来分離株(輸入株): 11ヶ国(タイ、ブラジル、ニュージーランド、米国、アイルランド、カナダ、オーストラリア、中国、デンマーク、フランス、メキシコ)より2000-2002年度に輸入して、保税中の無加工生肉(豚肉、牛肉、鶏肉)から分離した*L.monocytogenes* 分離株を使用した。輸入食肉からの*L.monocytogenes* の分離方法等、および分離株のうちブラジル鶏肉由来株1株の詳細な解析結果については平成17年度の本報告書に記載してある。

本邦食肉・環境・患者由来分離株(本邦

株):1988-2003年に食品、環境およびリストeria症患者から分離した436株から88株を選択して用いた。これらの由来と血清型、分離方法、血清型の決定方法等については、既報の報告書(厚労省科研費平成13年度~15年度総合研究報告書、厚労省科研費平成16~17年度総括・分担研究報告書)と論文(Saito et al., Microbiologica 21, 87-92, 1998; Ueda et al., Microbiologica 25, 165-171, 2002; Ueda et al. Int. J. Food Microbiol., 105(3), 455-462, 2005)に記載してある。(注:平成17年度厚生労働科学研究費補助金・細菌性食中毒の予防に関する研究・総括・分担研究報告書中に記入違いがあり、分離株490C1の血清型4b株は血清型1/2a株であったので本報告で訂正する。)

2) 塩基配列の決定と系統樹解析

それぞれの分離株から抽出した染色体DNAの*iap*領域の位置 1116-1522 (407bp)について、常法に従って (Saito et al., Microbiologica 21, 1998; Ueda et al., Int. J. Food Microbiol. 105(3), 2005)サイクルシーケンス法で塩基配列を決定した。決定した塩基配列は、*L.monocytogenes* EGD-e株 (EGD株;GenBank accession No. AL591824) を標準として、相当する位置の塩基配列と比較した。塩基配列の比較と系統樹解析には、配列情報解析コンピュータ・ソフトウェア DNAsis pro (Ver.2.00.000.002、Hitachi Software Japan, Tokyo, Japan) を用いた。

C. 成績と考察

1) *L.monocytogenes*の分離状況

本研究では先ず、食肉を継続的に我が国に輸出している諸外国のうちから11ヶ国を選択し、2000-2002年度の間に輸入された食肉(鶏肉、豚肉、牛肉、羊肉)より、無作為にサンプルを選択して *L.monocytogenes* の分離を試みた。2000年度、2001年度および2002

年度に検討した食肉数はそれぞれ、17、21および13サンプルで、*L.monocytogenes* が分離されたサンプル数はそれぞれ2、7および4サンプルであった(表1)。11ヶ国中5ヶ国、タイ、ニュージーランド、オーストラリア、フランスおよびメキシコの5ヶ国由来の食肉から本調査期間中に *L.monocytogenes* は分離されなかった。他の6ヶ国中、ブラジルとカナダを除く4ヶ国から輸入した食肉では2000-2002年度の3年間のうち、中国の鶏肉では全ての年度で、アイルランドの豚肉では2000と2001年度に、デンマークの豚肉では2001と2002年度に、および米国の鶏肉と牛肉からはそれぞれ2001と2002年度の複数年度にわたって *L.monocytogenes* が分離された。カナダからの輸入食肉では2001年度のみであったが、牛肉と豚肉の両方のサンプルから *L.monocytogenes* が分離された。

分離された93株中15株についてはまだ血清型が決定されていないが、決定された78株について、各血清型における分離株数の内訳を表2に示した。決定が終了した分離株には、血清型1/2a、1/2b、1/2c、3a、3bおよび4bの6血清型が含まれており、そのうちでは血清型1/2aが最も多く、次いで多いのが血清型1/2bであった。血清型4b株は、平成17年度に報告したブラジル由来株1株のみであった。YC-20は、2001年に中国から輸入された鶏肉であるが、この鶏肉からは血清型1/2a、1/2b、3a、3bの異なる4血清型の *L.monocytogenes* が分離され、検討した食肉中最多であった。また、YC-51(デンマークの豚肉)からも血清型1/2aと1/2cの異なる血清型の *L.monocytogenes* が分離された。その他の食肉からは、単一の血清型の *L.monocytogenes* の分離であった。血清型が決定された分離株の中から、全ての輸出国と血清型を網羅して系統樹解析を行うために30株を選択した(血清型:1/2a; 16株、1/2b; 6株、1/2c; 2株、3a; 1株、3b; 4株、4b; 1株;表

3)。この表に示した様に、アイルランドと米国では2年とも血清型1/2aの分離株のみであったのに対して、デンマークでは2001年度に血清型1/2aで2002年度には血清型1/2aと1/2cと分離株の血清型が増えていた。輸出国の積出港については表に記載していないが、これらはいずれも同一の積出港を経て輸入された食肉であった。中国の場合には *L.monocytogenes* が分離された食肉の積出港が2000年度と2001-2002年度では異なっており、前者の分離株では血清型1/2bのみであった。後者では2001年度には、前述したように4血清型1/2a、1/2b、3a、3bであったが、2002年度には血清型3bのみで分離株の血清型数は少なくなっていたものの、同一の血清型株は含まれていた。また、2001年度のカナダの牛肉と豚肉は、異なる積出港を經由して輸入された食肉であり、分離株の血清型もそれぞれ1/2bと1/2aで異なっていた。

以上の成績は、*L.monocytogenes*が継続して分離された当該国では常在汚染が起こっている可能性が高いこと、輸入食肉の中には異なる血清型株により複合汚染されているものがあることを示唆しており、輸出国の同一積出港を經由して輸入された食肉では同一の血清型の *L.monocytogenes* 株での汚染が認められる頻度が極めて高いことを示している。

2) 輸入食肉由来 *L.monocytogenes* 30株の分子進化学的解析

本邦株88株と輸入株1株(YC16C10)は、系統樹解析によりEGD株(第0枝)とは異なる19枝に分類されている。今回、検討した輸入食肉由来29株は*iap*領域407bpの塩基配列から9型に分類され、作成した系統樹上でも異なる9枝に分類された(図1; □で囲んだ株が輸入株)。これら9枝のうち7枝は17年度に報告した19枝中の第2、4、5、8、9、11、13枝と同じであった。これら同じであった7枝中の第5枝

および第13枝は、それぞれ血清型1/2aおよび血清型1/2aと1/2bで形成される枝であったが、今回それにそれぞれ血清型3aおよび血清型3bの分離株が加えられた。この第13枝ではカナダの牛肉・豚肉由来株(YC2B、YC21P)と中国の鶏肉(YC20C、YC36C、YC50C)由来株の混在が認められた。残りの5枝には、単一の輸出国の食肉分離菌株のみが含まれ、それらの血清型も日本株と同じものであった。9枝中残りの2枝に含まれる分離株は、これまでとは異なる新たな遺伝子型を持つもので、ここには米国、アイルランド、カナダおよび中国からの輸入食肉由来株が含まれていた。本研究ではこの新たな枝を第20、第21枝とした。第20枝には米国の鶏肉(2株)とアイルランドの豚肉(1株)由来の血清型1/2a株が混在していた。また、第21枝には第13枝と同様に、カナダの豚肉と中国の鶏肉由来の1株ずつが混在しており、それぞれ血清型1/2aと1/2bであった。カナダと中国および米国とアイルランドから輸入した食肉を汚染していた *L.monocytogenes* が、同じ遺伝子型に分類されたことの意味するところは今のところ不明であるが、少なくともこれらの分類が血清型とある程度関連していることは間違いなさそうである。

他方、我々は現在のところ全塩基配列がわかっているEGD-e株を標準株として使用しているが、この系統樹解析の成績から考えた場合、第10枝は進化段階においてこのEGD-eと同程度とは考えられるが別の分子進化の道を辿っている分離株である可能性が示唆される。これまでのところ、この型に含まれることがわかっている株は、リステリア症の患者由来12H株および鶏肉由来の186C1と188C3株の3株の日本株のみである。従って、株数とデータをさらに集積する必要はあろうが、この遺伝子型に属する分離株は日本の固有株であるかもしれない。

図2は、本研究で検討した30株の分子進化

学的分類の位置を無根系統樹上で示したものである。図中、○数字で示した枝に輸入食肉由来の分離株が含まれている。*L.monocytogenes*の無根系統樹はA、B、C群から形成されていることは既に報告している(Jpn.J.Infect.Dis., 58, 2005; Jpn.J.Infect.Dis., 59, 2006)が、輸入株が属する第19枝(17年度報告済みブラジル輸入株)と第13枝のみがそれぞれC群とB群に属しており、その他は本研究で新たに形成された20、21枝を含めて全てA群に属していた。従って以上の成績から今回検討した輸入食肉由来 *L.monocytogenes* を加えた場合でも、我が国の食肉・環境およびリステリア症の患者由来*L.monocytogenes*で作成した、分子進化学的にA、B、Cの3群からなる系統樹は変化しないことが明らかとなった。

3) 系統樹と血清型の関係

最後に、検討した*iap*領域407bpの塩基配列の遺伝子型(系統樹上の枝)別に、血清型別の分離株数とその割合(分布状況)を検討した。日本の食肉等由来株と外国の食肉由来株別(表4)では、A群に属する株数はそれぞれ28と20株であり、これらのうち血清型1/2a株がそれぞれ23株(82.1%)と16株(80.0%)で最も高い割合を占めていた。これに対して、B群に属する株数はそれぞれ58と10株で、それらのうち血清型1/2bがそれぞれ28株(48.3%)と5株(50%)で最も高い割合であった。このB群では血清型4bの日本株22株(37.9%)、血清型3bの外国株4株(40%)も第二の血清型として高い割合を占めていた。C群に属する株数は、日本株と外国株を合わせて3株であったが全て4bであった。日本株と外国株を統合して群ごとの比較を行ったものが表5(a)(b)で、群別、遺伝子型の分類ごとに血清型別でその株数と割合を示した。A群では血清型1/2a ≧ 1/2cの順で、B群では血清型4b > 1/2b > 1/2aの順で高い割合を占めていた。以上

の成績から、群ごとに包含される分離株の血清型分布が大きく異なっているのは明らかであり、血清型は分子進化学的な分類ともかなり強い関連を有しているものと考えられる。

D. 結論

2000-2002年度に11ヶ国から輸入して保税中の食肉から*L.monocytogenes*の分離を試みて、分離株についての分子進化学的位置づけを行った。

1. 11ヶ国中6ヶ国の食肉から総計93株の*L.monocytogenes*が分離された。分離菌株の血清学疫学的解析から、*L.monocytogenes*による食肉汚染が起こっている当該国においては常在汚染が起こっている可能性が高いこと、輸入食肉によっては複数の血清型菌株による複合汚染が起こっていることが示唆された。また、輸出国の同一積出港を經由して輸入された食肉では同一の血清型の*L.monocytogenes*による汚染が認められる頻度が極めて高いことも示された。

2. 分離された*L.monocytogenes*株から30株を選択して、それらの分子進化学的位置づけを行った。30株は日本の食肉等からの分離株と同様に、血清型とある程度関連した遺伝子型に分類され、今回検討した輸入食肉由来も、我が国の食肉・環境およびリステリア症の患者由来*L.monocytogenes*で作成した、分子進化学的にA、B、Cの3群からなる系統樹を変化させないことを明らかにした。

3. A、B、Cの3群に包含される分離株の血清型を解析した結果、それぞれの群に含まれる分離株の血清型分布が大きく異なっていることが明らかとなり、この成績から血清型と分子進化学的分類との強い関連性を明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

- 1) Fumiya Yamada, Fukiko Ueda, Yoshitsugu Ochiai, Mariko Mochizuki, Hiroshi Shoji, Kiyoko Ogawa-Goto, Tetsutaro Sata, Kunitoshi Ogasawara, Akikazu Fujima and Ryo Hondo. Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. *Journal of Microbiological Methods* 66(1), 96-103 (2006)
- 2) Mariko Mochizuki, Makoto Mori, Ryo Hondo and Fukiko Ueda. New Index for Evaluation of Cadmium Pollution in Birds and Mammals. *Journal of Environmental Monitoring* (a review) (in revise).
- 3) Chika Oya, Yoshitsugu Ochiai, Yojiro Taniuchi, Takashi Takano, Akikazu Fujima, Fukiko Ueda, Ryo Hondo and Yasuhiro Yoshikawa. Unequal distribution of Herpes B Virus in the left and right trigeminal ganglia of cynomolgus macaques. *Journal of Clinical Microbiology* (in revise)
- 4) Akikazu Fujima, Yoshitsugu Ochiai, Aya Saito, Yuki Omori, Atsuya Noda, Yukumasa Kazuyama, Hiroshi Shoji, Kiyoshi Tanabayashi. Fukiko Ueda, Yasuhiro Yoshikawa and Ryo Hondo. Discrimination of antibody to herpes B virus from herpes simplex virus type 1 and 2 in human and macaque sera. *Journal of Clinical Microbiology* (submitted)
- 5) 植田富貴子、本藤良分担。光岡知足編集。菌株レベルの同定:シーケンスによる分離株間の分子疫学的解析。腸内細菌の分子生物学的実験法。pp48-53 (財)日本ビフィズス菌センター。2006。
- 6) 清家一生、福田雅史、小笠原邦敏、本藤良、植田富貴子。*Listeria monocytogenes* 汚染の分子疫学に関する基礎的研究、7. *Listeria monocytogenes* 輸入株における分子進化学的解析(2)。第142回日本獣

医学会学術集会、2006。

- 7) 大森優紀、落合由嗣、植田富貴子、本藤良、藤間昭勝、早坂郁夫、吉川泰弘。集団飼育チンパンジーにおける a-Herpesvirus 感染の血清疫学的研究。第142回日本獣医学会学術集会、2006。
- 8) 北村知也、鈴木知子、梶ヶ谷博、植田富貴子、本藤良、望月眞理子。野鳥の重金属汚染に関する疫学調査(8)、対馬のアビ類における重金属含有量。第142回日本獣医学会学術集会、2006。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1. 輸入食肉の詳細と *L.monocytogenes* の分離状況

2000年度輸入					2001年度輸入					2002年度輸入				
輸入日	輸出国	meat	cord	L.m	輸入日	輸出国	meat	cord	L.m	輸入日	輸出国	meat	cord	L.m
000401	TH	鶏肉	YC-33		010221	CA	牛肉	YC-2	○	020113	BR	鶏肉	YC-47	
000410	BR	鶏肉	YC-34		010221	DK	豚肉	YC-4	○	020125	CN	鶏肉	YC-50	○
000411	NZ	羊肉	YC-38		010224	CA	豚肉	YC-3		020216	US	牛肉	YC-43	
000417	US	鶏肉	YC-32		010224	US	豚肉	YC-5		020216	CN	鶏肉	YC-49	○
000508	US	牛肉	YC-28		010224	US	牛肉	YC-6		020218	US	牛肉	YC-39	○
000511	IE	豚肉	YC-35	○	010224	FR	豚肉	YC-11		020223	AU	牛肉	YC-45	
000515	US	豚肉	YC-26		010225	US	牛肉	YC-7		020319	DK	豚肉	YC-41	
000528	CA	牛肉	YC-24		010225	MX	豚肉	YC-10		020319	US	牛肉	YC-42	
000603	US	牛肉	YC-23		010226	US	牛肉	YC-1		020410	BR	鶏肉	YC-48	
000604	US	牛肉	YC-8		010226	US	牛肉	YC-9		020517	TH	鶏肉	YC-46	
000604	US	牛肉	YC-30		010226	AU	牛肉	YC-12		020518	DK	豚肉	YC-51	○
000610	US	牛肉	YC-27		010227	US	鶏肉	YC-13	○	020610	CA	牛肉	YC-40	
000614	AU	牛肉	YC-31		010301	TH	鶏肉	YC-14		020617	MX	豚肉	YC-44	
000715	CA	豚肉	YC-25		010301	BR	鶏肉	YC-15						
000717	AU	牛肉	YC-29		010301	BR	鶏肉	YC-16	○					
000802	CN	鶏肉	YC-37		010301	CN	鶏肉	YC-19						
000904	CN	鶏肉	YC-36	○	010301	CN	鶏肉	YC-20	○					
					010304	IE	豚肉	YC-17	○					
					010304	US	鶏肉	YC-18						
					010308	CA	豚肉	YC-21	○					
					010313	NZ	羊肉	YC-22						

L.m; ○印は、*L.monocytogenes* が分離された食肉を示す。

輸出国; TH; タイ、BR; ブラジル、NZ; ニュージーランド、US; 米国、IE; アイルランド、

CA; カナダ、AU; オーストラリア、CN; 中国、DK; デンマーク、FR; フランス、MX; メキシコ

表2. 各食肉で分離された*L.monocytogenes* の血清型別分離株数

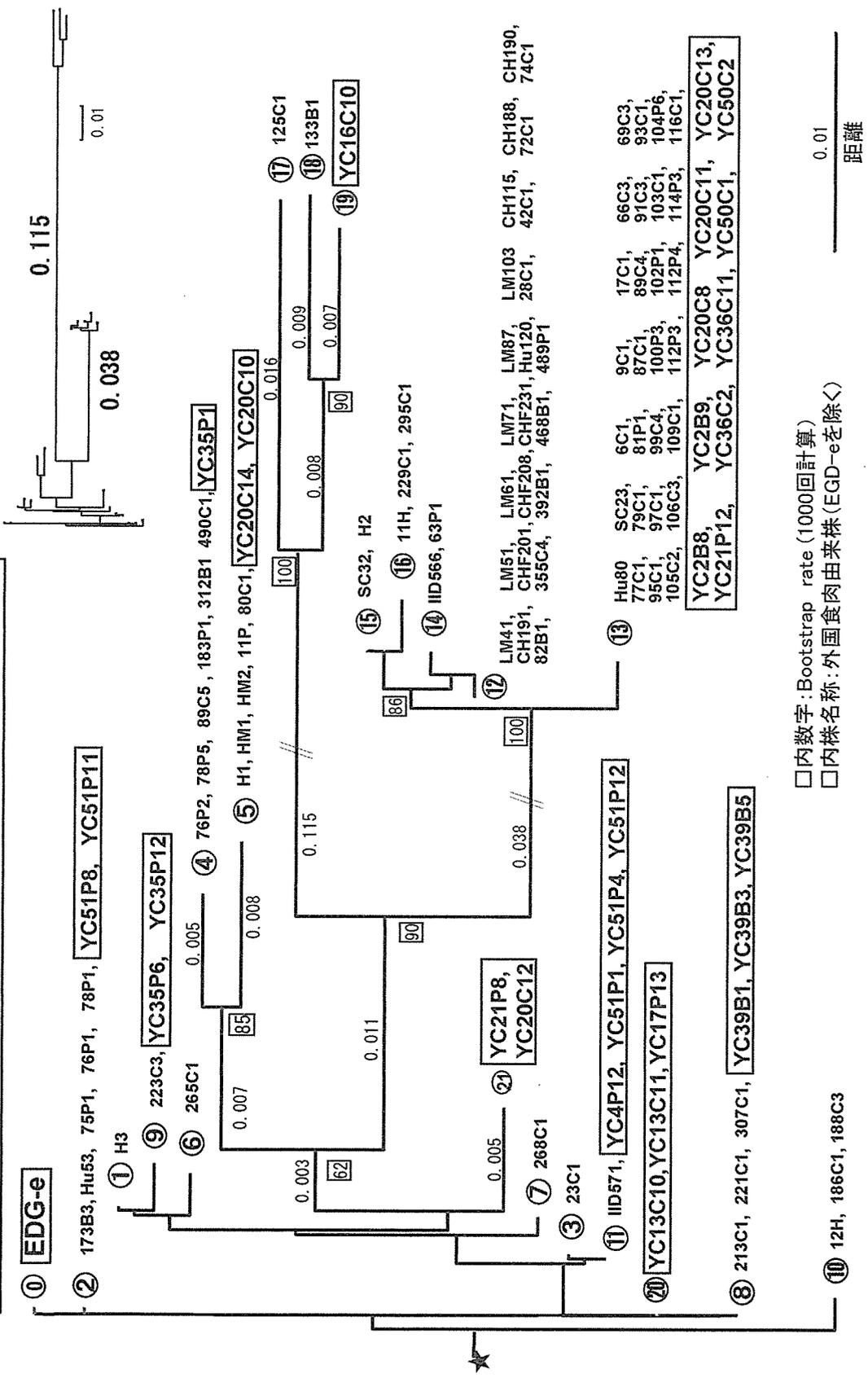
食肉	血清型										合計	
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	4b	未決定					
YC-2		14										14
YC-4	10											10
YC-13	4											4
YC-16						1						1
YC-17	1											1
YC-20	1	3		6	2		2					14
YC-21	3											3
YC-35	6											6
YC-36		3										3
YC-39	5											5
YC-49										13		13
YC-50					5							5
YC-51	9		5									14
合計	39	20	5	6	7	1	15					93

表3. 系統樹解析に使用した*L.monocytogenes* 分離株の由来と血清型

2000年度輸入				2001年度輸入				2002年度輸入					
国名	輸入日	株名	血清型	国名	輸入日	株名	血清型	国名	輸入日	株名	血清型		
IE	000511	YC35P1	1/2a	CA	010221	YC 2B8	1/2b	CN	020125	YC50C1	3b		
		YC35P6	1/2a			YC 2B9	1/2b			YC50C2	3b		
		YC35P12	1/2a			YC 4P12	1/2a			YC39B1	1/2a		
CN	000904	YC36C2	1/2b	US	010227	YC13C10	1/2a	US	020218	YC39B3	1/2a		
		YC36C11	1/2b			YC13C11	1/2a			YC39B5	1/2a		
				BR	010301	YC16C10	4b			YC51P1	1/2a		
						YC20C8	3b			YC51P4	1/2a		
				CN	010301	YC20C10	3a			YC51P8	1/2c		
						YC20C11	3b			DK	020518	YC51P11	1/2c
						YC20C12	1/2b			YC51P12		1/2a	
						YC20C13	1/2b						
						YC20C14	1/2a						
				IE	010304	YC17P13	1/2a						
				CA	010308	YC21P8	1/2a						
						YC21P12	1/2a						

輸出国; TH:タイ, BR:ブラジル, NZ:ニュージーランド, US:米国, IE:アイルランド,
CA:カナダ, AU:オーストラリア, CN:中国, DK:デンマーク, FR:フランス, MX:メキシコ

図1. 系統樹; 保税中の輸入食肉から分離された *L. monocytogenes* 株と日本株との関係 (1)



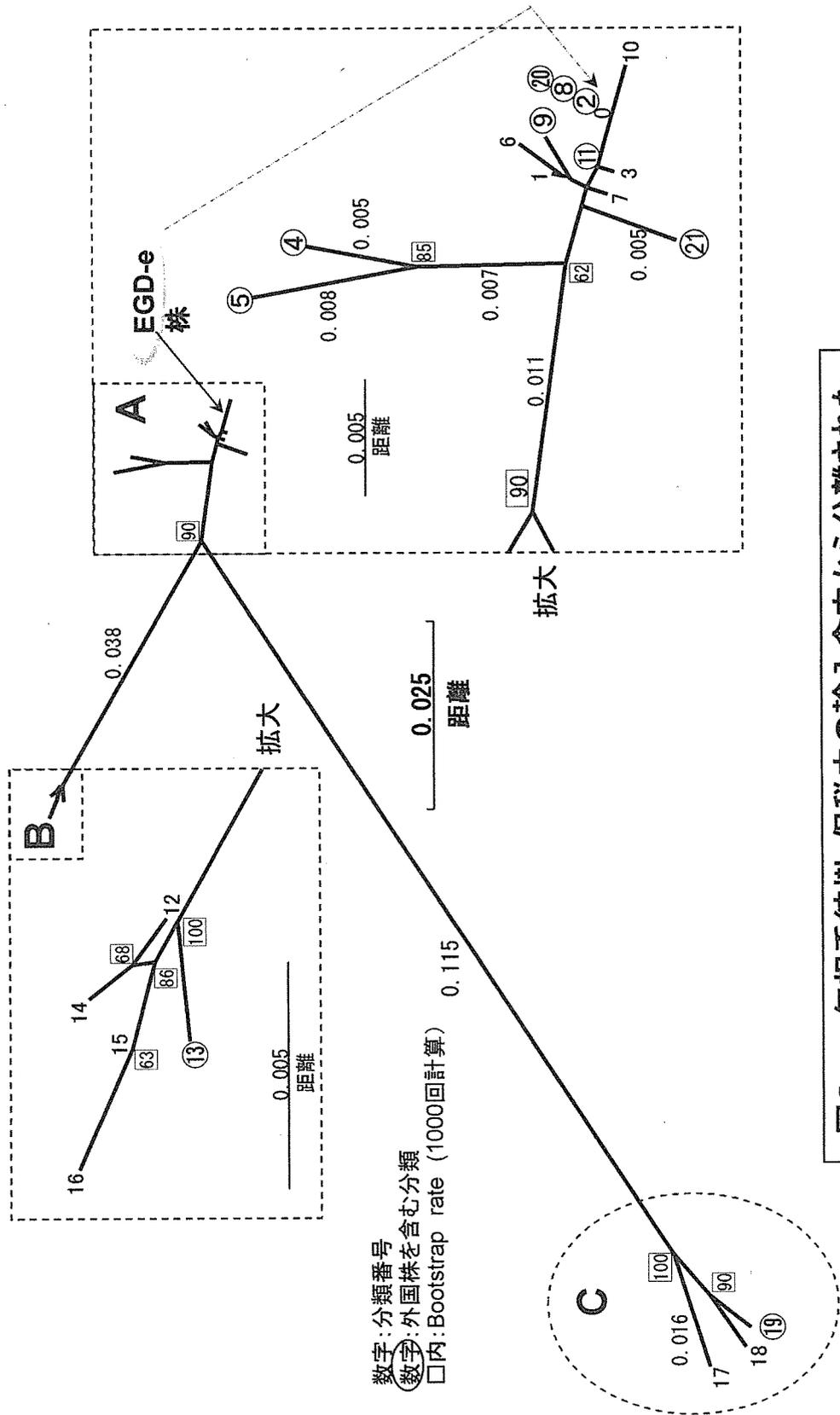


図2. 無根系統樹; 保税中の輸入食肉から分離された *L. monocytogenes* 株と日本株との関係 (2)

表4. 系統樹上における分類ごとの血清型別株数

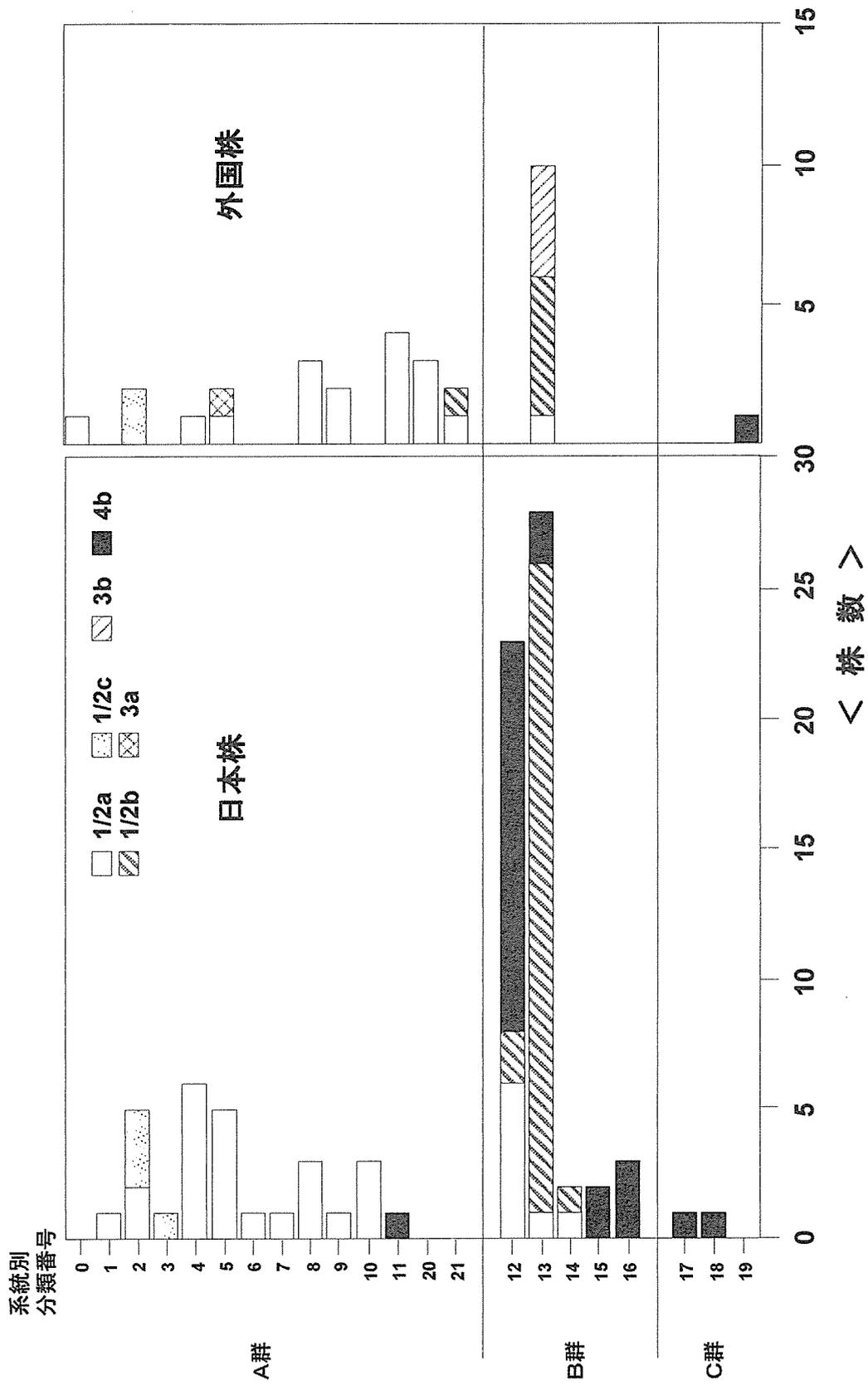


表5. 無根系統樹上の各群における血清型別株数の分布

