

原 著

広島県内で分離された*Listeria monocytogenes*の分子疫学的検討

東久保 靖, 竹田 義弘, 小川 博美

Molecular Epidemiological Investigation of *Listeria monocytogenes* Isolates in Hiroshima Prefecture

YASUSHI TOUKUBO, YOSHIHIRO TAKEDA and HIROMI OGAWA

(Received Sep. 30, 2003)

Molecular epidemiological investigation of *Listeria monocytogenes* isolated from June 1998 to March 2003 in Hiroshima Prefecture was performed. In this investigation, the epidemiological marker of PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism), RAPD (random amplified polymorphic DNA), and PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) were evaluated to analyze the relativity of the isolates. As a result, PFGE was found to be the most discriminative method. As PCR-RFLP (*inlA* and *inlB*) and RAPD performed better than PFGE in regard to the simplicity and rapidity of the discriminatory, they were supposed to be valuable rapidly screening methods. Accordingly, by using three methods jointly, the rapid screening and particular discriminatory of respective strains were supposed to be valuable. The strains which showed an identical pattern by the three methods were estimated as the identical genotypes respectively. On the other hand, the same serotype strains isolated from same source showed several different patterns, suggesting the presence of various genotypes in Hiroshima Prefecture.

Key words: *Listeria monocytogenes*, PCR-RFLP, RAPD, PFGE.

緒 言

リステリア症は、古くから獣医学領域で知られていた人畜共通感染症の一つで、ヒト、動物などに髄膜炎、敗血症、流産などを起こすことが知られている[1-3]。従来、その感染ルートはほとんど解明されていなかったが、1980年代に入って欧米諸国で食品が感染源となったリステリア症が相次いで報告され、現在ではリステリア症は重要な食品媒介感染症の一つとして位置づけられている[1-3]。また、新生児、高齢者、妊婦および癌疾患、糖尿病、肝硬変など基礎疾患を持つ成人などのハイリスク・グループでは、他の食中毒、食品媒介感染症に比べて致死率の高い感染症である[1-3]。一方、本症の起因菌である*Listeria monocytogenes* (Lm) は、動物、食品および環境に広く分布し、低温でも発育できるという特性があることから、乳や食肉を主原料とした『調理済みのそのまま食べられる』(ready-to-eat) 冷蔵食品が原因食品となる可能性が高いと指摘されている[1, 2]。

わが国では、リステリア症の発生は欧米諸国と比較して少なく、年間20~25例程度が散発例として報告されているが、食品を介したリステリア症ははまだ報告されていない[2, 3]。今後、食品に起因するリステリア症の発生が懸念されることから、今回、県内の各種動物及び市

販食肉についてリステリア汚染状況を調査したところ、犬、鶏肉などからLmが分離された。ヒトの症例から分離されるLmの血清型は、1/2a, 1/2b, 4bで90%以上を占めるとの報告[2-4]があるが、今回の調査でもこれら血清型が分離された。そこで、分離されたLmについて分離菌株の関連性を検討するため、PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法、RAPD (random amplified polymorphic DNA) 法およびパルスフィールド・ゲル電気泳動 (PFGE) 法の各解析パターンによる分子疫学的検討を行ったので報告する。

材料および方法

1 供試菌株

1998年6月~2003年3月の間に県内で分離されたLm 9株 (血清型1/2a猫由来1株, 1/2a犬由来3株, 1/2b鶏肉由来2株, 1/2c豚枝肉由来1株, 4b犬由来1株, 4b鶏肉由来1株)、対照として当センター保存Lm 2株 (血清型1/2a 1株, 4d 1株) および*Listeria innocua* (Li) 1株の計12株を用いた。

2 リステリアの同定

常法[1]に従い、生化学的性状試験およびアピリステ

リア (ピオメリュー) によりリステリアの同定を行った。また、市販のリステリア免疫血清 (デンカ生研) を用いて、血清型別試験を行った。

3 PCR-RFLP (*inlA*, *inlB*) パターン

PCR-RFLPは、Unnerstadらの方法に準じた[5]。 *inlA*, *inlB* (internalin A, B) 遺伝子のPCRには、LIP32 (5'-AACGACAACATTTAGTGGAACCGTGACG-3')およびLIP23 (5'-ATTAGCTGCTTCGTCCAACCAATGAAAG-3')を使用した。増幅条件は、変性94°C, 1分30秒, アニリング50°C, 1分30秒, 伸長72°C, 6分で40サイクルとした。

得られたPCR産物を10U/sampleの *Alu I* で37°C, 3時間反応させ、切断されたPCR産物のRFLPパターンを電気泳動後、エチジウムブロマイド染色して観察した。

4 RAPDパターン

RAPD-PCRは、既報のとおり行った[6, 7]。ただし、プライマーには、Makinoらが報告したAP43 (5'-GTGGATGCGA-3'), Mazurierらが報告したHLWL84 (5'-TGACTGACGC-3')およびLawrenceらが使用したOPM-1 (5'-GTTGGTGGCT-3')を用いた[8-10]。なお、増幅条件はアニリング温度をHLWL84では35°C, OPM-1では30°Cとした。

5 PFGEパターン

PFGEは、既報のとおり行った[6, 7]。ただし、制限酵素には、Nakamaraが使用した *Asc I* および *Sma I* を用いた[11]。なお、 *Sma I* の反応温度は25°Cで行った。PFGE泳動条件は、1% PFCアガロースゲル, 0.5×TBE (14°C), 電圧6V/cm, パルス角度120°, *Asc I* ではスイッチタイム0.47秒~1分23.55秒, *Sma I* ではスイッチタイム0.47~44.69秒, 泳動時間20時間18分とした。

結 果

1 PCR-RFLP (*inlA*, *inlB*) パターン

PCR-RFLPパターンの結果は、Table 1およびFig. 1に示した。供試12株のうち *inlA*, *inlB* 遺伝子を保有しなかったL株を除く11株は、 *Alu I* で6種類のパターンに分類された。血清型1/2aの5株 (対照株を含む), 4bの2株は、2種類のパターンを示した。血清型1/2cは、1/2aの3株と同一パターンを示した。血清型1/2bの2株は、同一血清型の間では同一パターンを示した (Table 1およびFig. 1)。

2 RAPDパターン

RAPDパターンの結果は、Table 1およびFig. 2に示した。供試12株は、AP43およびHLWL84で7種類、OPM-1で6種類のパターンに分類された。血清型1/2aの5株は、AP43およびHLWL84で3種類のパターンを示した。そのうち、1/2a猫由来株 (菌株番号1) および1/2a犬由来株 (菌株番号4) と、1/2a犬由来株 (菌株番号3) および1/2a対照株 (菌株番号10) は、それぞれ同一パターンを示した。OPM-1では、血清型1/2aの5株は2種類のパターンを示した。血清型1/2cはプライマーによって多少の差が見られたが、1/2aの1~4株と同一パターンを示した。それら以外の血清型は、各プライマーとも血清型ごとに異なったパターンを示し、同一血清型の間では由来に関係なく同一パターンを示した (Table 1およびFig. 2)。

3 PFGEパターン

PFGEパターンの結果は、Table 1およびFig. 3に示した。供試12株は、 *Asc I* および *Sma I* で10種類のパターンに分類された。血清型1/2aの5株は、両制限酵素とも3種類のパターンを示した。そのうち、1/2a猫由来株 (菌株番号1) および1/2a犬由来株 (菌株番号4) と、1/2a犬由来株 (菌株番号3) および1/2a対照株 (菌株番号10) は、それぞれ同一パターンを示した。血清型1/2cは、両

Table 1. Epidemiological analysis results of *L. monocytogenes* isolates in Hiroshima prefecture.

Strain No.	Serotype (source)	PCR-RFLP (<i>Alu I</i>)	RAPD-PCR			PFGE	
			AP43	HLWL84	OPM-1	<i>Asc I</i>	<i>Sma I</i>
1	1/2a (cat)	Aa	1a	1a	1a	I	I
2	1/2a (dog)	Aa	1b	1b	1b	II	II
3	1/2a (dog)	Ab	1c	1c	1a	IIIa	IIIa
4	1/2a (dog)	Aa	1a	1a	1a	I	I
5	1/2b (chicken)	B	2a	2a	2a	IV	IVa
6	1/2b (chicken)	B	2a	2a	2a	V	IVb
7	1/2c (pork carcasses)	Aa	1c	1b	1a	IIIb	IIIb
8	4b (dog)	Ca	2b	2b	2b	VIa	IVc
9	4b (chicken)	Cb	2b	2b	2b	VIIb	IVd
10	1/2a (control)	Ab	1c	1c	1a	IIIa	IIIa
11	4d (control)	D	2c	2c	3	VII	V
12	<i>L. innocua</i>	—	3	3	4	VIII	VI

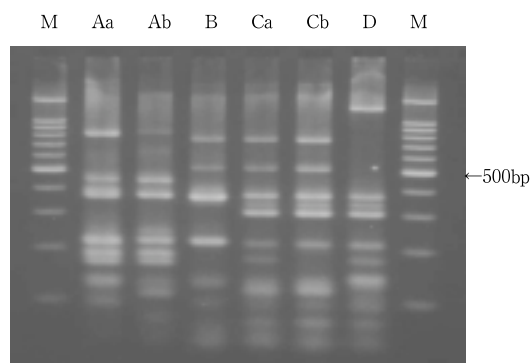


Fig. 1. PCR-RFLP (*inlA* and *inlB*) patterns (*Alu I*) of *L. monocytogenes* isolates in Hiroshima prefecture.

Lanes M, 100 Base-Pair Ladder marker. Lane Aa, strain No.1,2,4 and 7; Ab, strain No. 3 and 10; B, strain No. 5 and 6; Ca, strain No. 8; Cb, strain No. 9; D, strain No. 11.

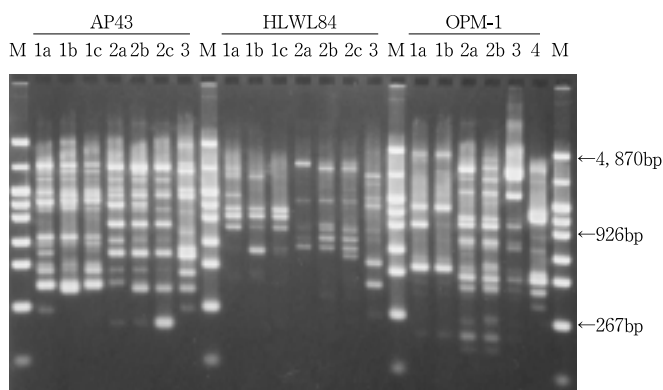


Fig. 2. RAPD patterns (AP43, HLWL84 and OPM-1) of *L. monocytogenes* isolates in Hiroshima prefecture.

Lanes M, pHY Marker. (AP43) Lane 1a, strain No. 1 and 4; 1b, strain No. 2; 1c, strain No. 3, 7 and 10; 2a, strain No. 5 and 6; 2b, strain No. 8 and 9; 2c, strain No. 11; 3, strain No. 12. (HLWL84) Lane 1a, strain No. 1 and 4; 1b, strain No. 2 and 7; 1c, strain No. 3 and 10; 2a, strain No. 5 and 6; 2b, strain No. 8 and 9; 2c, strain No. 11; 3, strain No. 12. (OPM-1) Lane 1a, strain No. 1, 3, 4, 7 and 10; 1b, strain No. 2; 2a, strain No. 5 and 6; 2b, strain No. 8 and 9; 3, strain No. 11; 4, strain No. 12.

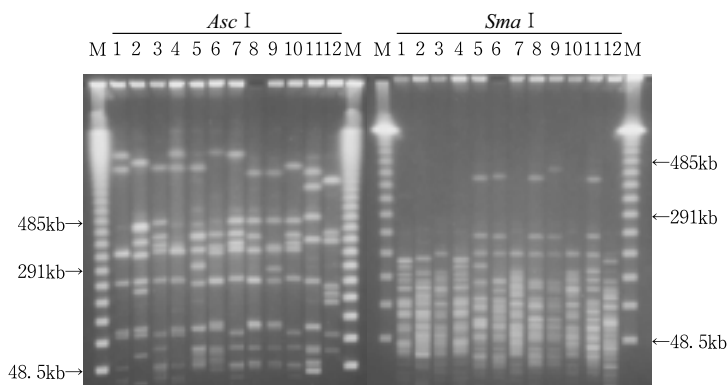


Fig. 3. PFGE patterns (*Asc I* and *Sma I*) of *L. monocytogenes* isolates in Hiroshima prefecture.

Lanes M, lambda ladder marker; 1, strain No. 1; 2, strain No. 2; 3, strain No. 3; 4, strain No. 4; 5, strain No. 5; 6, strain No. 6; 7, strain No. 7; 8, strain No. 8; 9, strain No. 9; 10, strain No. 10; 11, strain No. 11; 12, strain No. 12.

制限酵素とも1/2aと異なったパターンを示した。血清型1/2bおよび4bの各2株は、1～3バンド程度の相違ではあるが、同一血清型の間でも異なったパターンを示した (Table 1およびFig. 3)。

4 3法によるLm分離菌株の解析

3法による解析結果は、Table 1に示した。供試12株のうち、血清型1/2a猫由来株 (菌株番号1) および1/2a犬由来株 (菌株番号4) と、血清型1/2a犬由来株 (菌株番号3) および1/2a対照株 (菌株番号10) は、3法でそれぞれ同一パターンを示した。血清型1/2aは、RAPD法、PFGE法ではPCR-RFLP法より多くのパターンが認められた。血清型1/2bの2株はPFGE法のみ異なったパター

ンを示し、同様に1/2cもPFGE法のみ1/2aと異なったパターンを示した。血清型4bの2株は、PCR-RFLP法、PFGE法では異なったパターンを示し、RAPD法では同一パターンを示した (Table 1)。

考 察

リステリアの疫学的調査の手段としては、従来から血清型別、ファージ型別、薬剤感受性およびプラスミドパターンなどの疫学マーカーが用いられている [1, 4, 12, 13]。しかし、これら疫学マーカーは簡便で汎用されているが、いずれもリステリアの詳細な識別には有効なマーカーとはいえない。近年は、これら疫学マーカーに

加えて、一長一短はあるがPCR-RFLP法, RAPD法およびPFGE法などが、菌株間の識別能の高いマーカーとしてリステリアにも応用されている[1, 5, 10, 11, 13-19].

今回、これら疫学マーカーのうち、PCR-RFLP (*inlA*, *inlB*) 法およびRAPD法は、識別能に関してはPFGE法より低いと考えられた。しかし、PCR-RFLP法はRAPD法で識別できなかった血清型4bの識別がPFGE法と同様に可能であり、RAPD法はPCR-RFLP法よりも血清型1/2aの詳細な識別が可能であった。この結果は、PCR-RFLP法およびRAPD法がリステリアの疫学的解析に有用であるとの報告を追認するものであった[5, 10, 13-17]。両法ともPFGE法に比べ簡便性と迅速性で優れていることから、迅速でスクリーニング的な識別法としては有効であると考えられた。

一方、PFGE法はリステリアの分子疫学的解析に最も汎用されており、他の疫学マーカーと比べてもより高い識別能を有すると報告されている[11, 17-19]。今回の結果も、前2法で識別不能であった血清型1/2cが1/2aと異なったパターンを示し、また、血清型1/2b, 4bでは同一血清型の間でも異なったパターンを示したことから、比較検討した疫学マーカーの中では識別能が最も高いと考えられた。

これらの結果から、PFGE法はより精度の高い識別法として重要であるが、手技の煩雑さと迅速性、経済性に難点がある。従って、PCR-RFLP法, RAPD法とPFGE法の3法の併用が、分離菌株の関連性を検討するには有効と考えられた。すなわち、PCR-RFLP法, RAPD法により迅速でスクリーニング的な識別を行い、PFGE法によりその後の詳細な識別を行うことで、迅速、かつ、詳細な識別が可能となると考えられた。今回は供試菌株が少なかったことから、今後は供試菌株を増やして、PCR条件、制限酵素、プライマーなどの検討を行う必要があると考えられた。

今回の供試菌株のうち、3法でそれぞれ同一パターンであった血清型1/2a猫由来株(菌株番号1)および1/2a犬由来株(菌株番号4)と、血清型1/2a犬由来株(菌株番号3)および1/2a対照株(菌株番号10)は、それぞれ同一genotype(遺伝子型)であると推察された。さらに継続した調査は必要であるが、対照株と同一genotypeの分離菌株が確認されたことから、このgenotypeのLmが広く分布している可能性が示唆された。一方、血清型、分離動物種が同一の菌株であっても、それぞれ異なるgenotypeも認められた。これは、検体の採取時期、場所が異なっていたことが原因と考えられたが、県内のLmにはいくつかのgenotypeが存在していることも示唆された。

また、血清型1/2aはgenotypeが多様であるため、分子疫学的解析による識別が容易といわれている[1, 16].

今回、1/2aについては、3法で明確に識別することが可能であったことから、これらを追認するものであった。一方、血清型4bはgenotypeの多様性が乏しいため、1法だけの解析では識別が困難であるといわれている[1, 16]。今回、4bについては、PCR-RFLP法, PFGE法では1~2バンド程度の相違がみられ、遺伝的には近縁であると考えられたが、識別することは可能であった。さらに検討は必要であるが、PCR-RFLP法, PFGE法は血清型4bの識別にも有用であると考えられた。

わが国では、食品媒介リステリア症の集団事例はいまだ報告されていないが、チーズや食肉加工品などの輸入食品の増大、ready-to-eat食品の消費の拡大、ハイリスク・グループである高齢者や基礎疾患を持つ成人の増加などにより、食品に起因するリステリア症の発生が懸念されている。今後も、当センターでは、汚染源および汚染経路を解明するため、より幅広い県内のLm汚染実態の把握を行い、さらに、より多くの菌株を供試して菌株相互の関連性を解析する必要があると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、検体採取にご協力いただいた広島県および福山市の食肉衛生検査所および動物愛護センターの方々に深謝します。

文 献

- [1] 丸山務, 小久保彌太郎 (2000): 食水系感染症と細菌性食中毒(新訂), 413-435, 東京, 中央法規出版。
- [2] 小久保彌太郎 (1995): 臨床検査, 39(9), 1001-1007.
- [3] 奈良千春, 館田一博, 山口恵三 (2002): 臨床と微生物, 29(3), 285-290.
- [4] Schönberg, A., Bannerman, E., Courtieu, A. L., et al. (1996): Int. J. Food Microbiol., 32, 279-287.
- [5] Unnerstad, H., Nilsson, I., Ericsson, H., et al. (1999): Appl. Environ. Microbiol., 65, 2054-2056.
- [6] 東久保靖, 竹田義弘, 小川博美 (1999): 日獣会誌, 52, 189-193.
- [7] 東久保靖, 井上佳織, 竹田義弘他 (2001): 広島県保健環境センター研究報告, 9, 9-12.
- [8] Makino, S., Okada, Y., Maruyama, T., et al. (1994): J. Clin. Microbiol., 32, 65-69.
- [9] Mazurier, S., Giessen, A., Heuvelman, K., et al. (1992): Lett. Appl. Microbiol., 14, 260-262.
- [10] Lawrence, L. M., Harvey, J. and Gilmour, A. (1993): Appl. Environ. Microbiol., 59, 3117-3119.
- [11] Nakama, A., Matsuda, M., Itoh, T., et al. (1998): J.

- Vet. Med. Sci., 60, 749-752.
- [12] Loessner, M. J. and Busse, M. (1990): Appl. Environ. Microbiol., 56, 1912-1918.
- [13] Nocera, D., Bannerman, E., Rocourt, J., et al. (1990): J. Clin. Microbiol., 28, 2259-2263.
- [14] Ericsson, H., Stålhandske, P., Danielsson-tham, M. -L., et al. (1995): Appl. Environ. Microbiol., 61, 3872-3874.
- [15] Mereghetti, L., Lanotte, P., Savoye-Marczuk, V., et al. (2002) : Appl. Environ. Microbiol., 68, 2849-2857.
- [16] Czajka, J., Bsat, N., Piani, M., et al. (1993): Appl. Environ. Microbiol., 59, 304-308.
- [17] Fannesbech Vogel, B., Huss, H. H., Ojeniyi, B., et al. (2001): Appl. Environ. Microbiol., 67, 2586-2595.
- [18] Brosch, R., Chen, J. and Luchansky, J. B. (1994): Appl. Environ. Microbiol., 60, 2584-2592.
- [19] Waak, E., Tham, W. and Danielsson-tham, M. -L. (2002): Appl. Environ. Microbiol., 68, 3366-3370.