

ヒト及び動物から分離されたリステリアの性状

狩屋英明, 中嶋 洋, 大畠律子, 仲 克巳*, 西村恵子**, 角南一貴**

下野玄英**, 奈良井 恒** (細菌科)

*くらしき作陽大学食文化学部栄養学科

**独立行政法人 国立病院機構 岡山医療センター

【調査研究】

ヒト及び動物から分離されたリステリアの性状

Biochemical Characterisation of *Listeria monocytogenes* Finded from Patients and Animals

狩屋英明, 中嶋 洋, 大島律子, 仲 克巳*, 西村恵子**, 角南一貴**
下野玄英**, 奈良井 恒** (細菌科)

Hideaki Kariya, Hiroshi Nakajima, Ritsuko Ohata, Katsumi Naka, Keiko Nishimura,
Kazutaka Sunami, Michihide Shimono and Hisashi Narai (Department of Bacteriology)

*くらしき作陽大学食文化学部栄養学科
**独立行政法人 国立病院機構 岡山医療センター

要 旨

リステリア症の患者4名及び動物11検体, 食肉26検体からリステリアを分離した。分離菌の薬剤感受性試験ではクリンダマイシン等に耐性を示す株はあったが, 多くの薬剤に感受性を示す株が多かった。*L. monocytogenes*の生化学的性状試験として, 活性炭入り卵黄加BHI寒天平板によるレシチナーゼ反応が有用であることが示された。

[キーワード: リステリア, 生化学的性状, PFGE, 患者, 動物]

[Key words : *Listeria*, Biochemical Characteristics, PFGE, Patients, Animals]

1 目的

Listeria monocytogenes(以下 *L. monocytogenes* と略)は食中毒や, 人の髄膜炎, 死産, 敗血症等の起因菌である他, 主として反芻畜にも脳炎, 死産等を引き起こす人畜共通感染症起因菌である。米国のCDCは, 米国内で毎年約2,500例の重症感染例が発生し, そのうち約500人が死亡していると報告している。五十君によると, 日本における重症化したリステリア症は年間83人と推計され¹⁾, 発生はまれであるが, 欧米に比べても極端に少ないものではないと報告されている。平成13年に北海道で発生した我が国で初めての食品媒介リステリア症の集団発生は, リステリアに汚染されたナチュラルチーズが感染源であることが判明した²⁾。国内でリステリア症の発生が少ない理由は不明であるが, 食肉の平均20%が汚染されていることが当センターの研究で判っている³⁾。今まで, 県内のリステリア症患者及び動物から分離されたリステリアの各種性状を調査した報告はない。そのため, ヒト由来株と動物, 食肉から分離された菌株の生化学的, 及び分子生物学的性状を比較したので報告する。また, 通常の卵黄寒天培地でレシチナーゼ活性を調べることは

いままで出来なかったが, Ermolaevaらは活性炭を卵黄加BHI寒天平板に添加することによって, その活性を測定することに成功した⁴⁾。今回, その活性炭入り卵黄加BHI寒天平板で試験を行なったので併せてその結果を報告する。

2 方法

供試菌株は平成18年8月, 髄膜炎の高齢者女性(岡山県内在住)の血液と髄液から分離された血清型1/2a, 平成20年1月, 髄膜炎と敗血症を呈した高齢者男性(岡山県外在住)から分離された血清型1/2b, 発熱を伴った胃腸炎を同時に発症した児童2人(家族: 県内在住)の下痢便由来血清型4bの2株の計4株の *L. monocytogenes* を使用した。パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)は制限酵素 Asc I で処理し, 比較株として, 平成12年から18年にかけて分離されたタヌキ, 犬, 牛, 豚肉及び鶏肉由来の血清型1/2aの20株, 血清型1/2bの8株, 血清型4bの9株を使用した(表1)。病原遺伝子のPCRは *mpl*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *hlyA*, *prfA* を対象に行なった。リステリアの卵黄レシチナーゼ活性の測定には,

0.5%活性炭入り5%卵黄加BHI寒天平板⁴⁾を使用し、動物及び食肉由来株1/2aの6株、1/2bの2株、4bの10株を調べた。薬剤感受性試験は、市販の感受性ディスク(センチ・ディスク：BD)を用いて行なった。使用した薬剤は、セフトジジム：CAZ30、セフォペラゾン：CFP75、セフォチアム：CFT30、セフメタゾール：CMZ30、モクサラクタム：MOX30、セフォタキシム：CTX30、セフォペラゾン・スルバクタム：75/30、セファゾリン：CZ30、ナリジクス酸：NA30、スルファメチゾール：TH25、クリンダマイシン：CC2、カナマイシン：K30、ペニシリン：P10、エリスロマイシン：E15、テトラサイクリン：Te30、ストレプトマイシン：S10、クロラムフェニコール：C30、ゲンタマイシン：GM10、パニペネム：PAN10で、KB法で実施した。

表1 各種性状試験に使用した菌株

菌株番号	血清型	由来	分離年月
2665	1/2a	患者	H18.8
612	1/2a	豚肉	H15.4
667	1/2a	鳥肉	H15.4
715	1/2a	豚肉	H15.4
773	1/2a	鳥肉	H15.5
828	1/2a	豚肉	H15.5
867	1/2a	豚肉	H15.5
963	1/2a	豚肉	H15.4
1027	1/2a	鳥肉	H15.6
635b	1/2a	鳥肉	H15.4
1617	1/2a	豚肉	H16.4
1940	1/2a	鳥肉	H17.6
1950	1/2a	鳥肉	H17.6
1986	1/2a	鳥肉	H17.6
1999	1/2a	鳥肉	H17.6
2087	1/2a	鳥肉	H17.7
284	1/2a	犬便	H13.5
473	1/2a	牛直腸内容	H14.11
481	1/2a	牛直腸内容	H14.11
973	1/2a	牛直腸内容	H15.5
1112	1/2a	牛直腸内容	H16.2
3086	1/2b	患者	H20.1
178	1/2b	タヌキ腸内容	H13.2
2287	1/2b	牛直腸内容	H18.3
2322	1/2b	牛直腸内容	H18.3
683	1/2b	鳥肉	H15.4
712	1/2b	鳥肉	H15.4
743	1/2b	鳥肉	H15.4
755	1/2b	鳥肉	H15.4
778	1/2b	鳥肉	H15.4
162	4b	タヌキ腸内容	H12.10
411	4b	児童患者	H14.8
420	4b	児童患者	H14.8
601	4b	豚肉	H15.5
684	4b	鳥肉	H15.4
673-1b	4b	鳥肉	H15.4
714	4b	鳥肉	H15.4
746	4b	鳥肉	H15.4
851	4b	鳥肉	H15.5
983	4b	牛直腸内容	H15.6
988	4b	牛直腸内容	H15.6

3 結果

PFGEでは、図1及び2に示すとおり、人由来株の血清型1/2a及び血清型1/2bは動物等由来の同じ血清型株とDNAパターンの類似したものは見られなかった。また図3及び4に示すとおり、児童2人から分離された血清型4bの2株は鶏肉由来株1株とDNAパターンが類似していた。PCRによる病原遺伝子の検査では、全ての病原遺伝

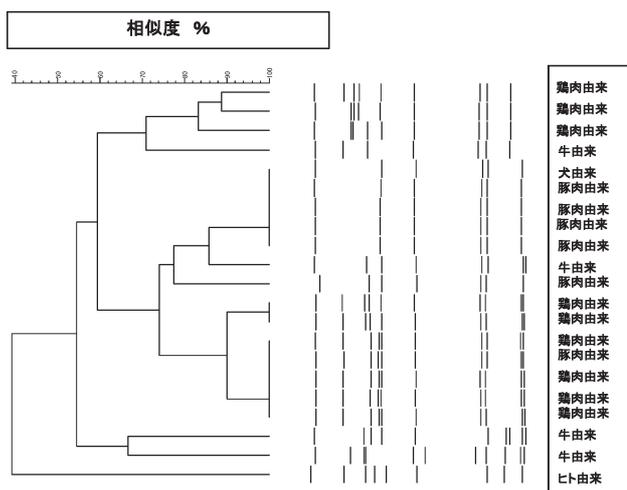


図1 血清型1/2aのPFGE比較解析 (Asc I)

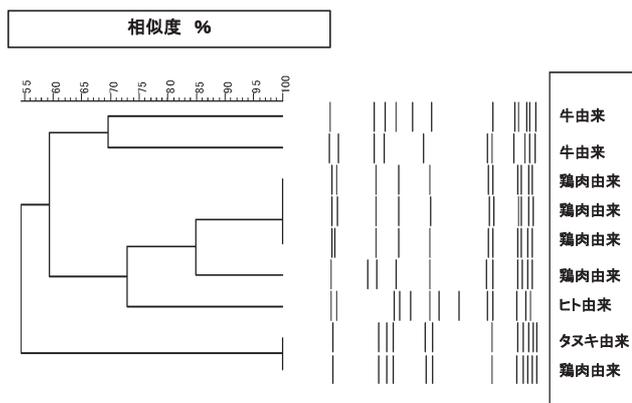


図2 血清型1/2bのPFGE比較解析 (Asc I)

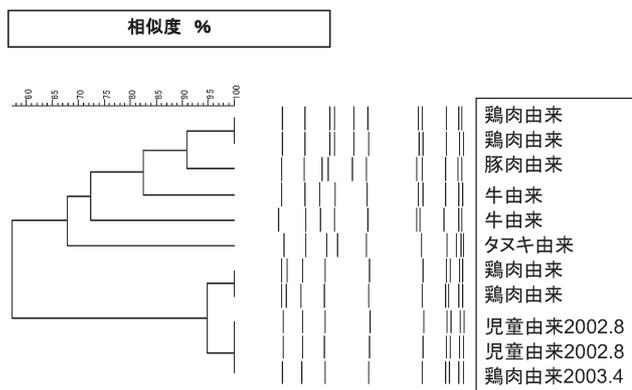


図3 血清型4bのPFGE比較解析 (Asc I)

子が全株で確認された。菌周囲の白濁環を示す卵黄レシチナーゼ活性は、由来による差はなく、血清型によって差が見られた。すなわち、1/2aは陽性又は強陽性であり、

血清型4bは人由来を含めすべての株が陰性又は弱陽性であった(表2)。薬剤感受性試験の結果を表3に示した。検査を行ったすべての株は、CAZ, MOX, CCに耐性、

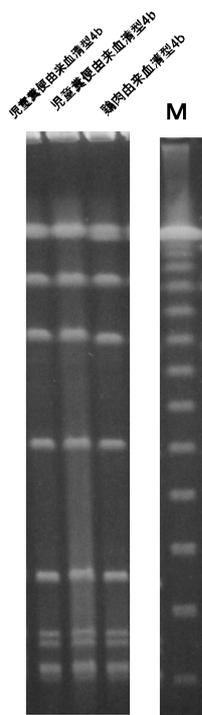


図4 児童及び鶏肉由来血清型4bのPFGE (Asc I使用)

表2 卵黄レシチナーゼ活性

菌株番号	血清型	由来	反応
2665	1/2a	患者	+
473	1/2a	牛直腸内容	+
481	1/2a	牛直腸内容	+
715	1/2a	豚肉	++
963	1/2a	豚肉	++
1940	1/2a	鳥肉	++
1999	1/2a	鳥肉	++
3086	1/2b	患者	+
712	1/2b	鳥肉	-
2287	1/2b	牛直腸内容	±
411	4b	患者	±
420	4b	患者	±
162	4b	タヌキ腸内容	±
601	4b	豚肉	-
684	4b	鳥肉	-
709	4b	鳥肉	±
714	4b	鳥肉	±
746	4b	鳥肉	-
851	4b	鳥肉	-
983	4b	牛直腸内容	-
988	4b	牛直腸内容	±
673-1b	4b	鳥肉	±

++:白濁環 \geq 2mm
 +:白濁環2mm \geq 1mm
 ±:白濁環 \leq 1mm
 -:白濁環ナシ

表3 ヒト及び食肉由来株の薬剤感受性

使用薬剤	ヒト由来1/2b	ヒト由来1/2a	鶏肉由来1/2a	児童由来4b	児童由来4b	鶏肉由来4b	鶏肉由来4b	鶏肉由来4b
セフェム系								
CZ30	S	S	S	S	S	S	S	S
CMZ30	S	S	S	S	S	S	S	S
CFT30	S	S	S	S	S	S	S	S
CAZ30	R	R	R	R	R	R	R	R
CFP75	S	S	S	I	I	I	S	S
75/30	S	S	S	I	I	I	S	S
CTX30	I	I	S	R	R	I	S	I
MOX30	R	R	R	R	R	R	R	R
タンパク合成阻害剤								
NA30	S-I	R	R	R	R	R	R	R
TH25	S	S	S	R	R	S	S	S
CC2	R	R	R	R	R	R	R	R
K30	S	S	S	S	S	S	S	S
E15	S	S	S	S	S	S	S	S
Te30	S	S	S	S	S	S	S	S
S10	S	S	S	S	S	S	S	S
C30	S	S	S	S	S	S	S	S
GM10	S	S	S	S	S	S	S	S
細胞壁合成阻害剤								
P10	S	S	S	S	S	S	S	S
PAN10	S	S	S	S	S	S	S	S

■:児童由来4bと鶏肉由来4bはPFGEではDNAパターンが似ていたが、薬剤感受性は一部異なる
 S: 感受性, R: 耐性

CTX, NA, THは一部あるいは多くの株が耐性であったが、これら以外の薬剤に対してin vitroでは、すべての株が感受性を示した。DNAパターンが一致した児童由来株と鶏肉由来株とはスルファメチゾール(TH)とセフトキシム(CTX)の薬剤感受性パターンが異なっていた。

4 考察

PFGEの結果、4株の人由来株のうち、同じ家族である児童由来の2株はDNAパターンが相互に似ており、同時に発症したことから何らかの同一食品が感染源ではないかと推測された。また、鶏肉由来株とも類似していたが、薬剤感受性パターンが多少異なっていたことから、食肉との関連性は見出せなかった。供試した株は、in vitroではクリンダマイシン等数種類の薬剤には耐性を示したが、その他多くの薬剤には感受性を示し、薬剤耐性化の進行は観察されなかった。レシチナーゼ活性は血清型によって程度が異なる傾向があり、今後、*L. monocyto-*

*genes*の一般的性状試験として利用できる可能性が示された。

文 献

- 1) 五十君静信:食品由来のリステリア菌による健康被害, 食品衛研究, 53(4), 19-23, 2003
- 2) 五十君静信:リステリア症の概況と対策, 月刊 フードケミカル, 21(5), 32-37, 2005
- 3) 狩屋英明, 大島律子, 中嶋 洋, 国富泰二:動物を含めた環境中及び調理用食肉のリステリア汚染状況, 岡山県環境保健センター年報, 28, 73-77, 2004
- 4) Ermolaeva,S., Karpova,T., Novella,S., Wagner,M., Scortti,M., Tartakovskii,L, Vazquez Boland, J.A.:A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal, Int.J.Food Microbiol., 82, 87-94, 2003