

食肉及び牛直腸内容物から検出されたりステリアの生化学的性状と
病原遺伝子保有状況並びにその遺伝子系統解析

狩屋英明, 大畠律子, 中嶋 洋 (細菌科)

【調査研究】

食肉及び牛直腸内容物から検出されたリステリアの生化学的性状と病原遺伝子保有状況並びにその遺伝子系統解析

Biochemical Character, Prevalence of Pathogenic Gene and Genetic Lineages of *Listeria monocytogenes* Isolated from Meat and Rectum Contents of Bovine

狩屋英明, 大島律子, 中嶋 洋 (細菌科)

Hideaki Kariya, Ritsuko Ohata, Hiroshi Nakajima

要 旨

平成14年以降今までに分離されたリステリアについて、その病原遺伝子である *hlyA*, *prfA*, *plcA*, *plcB*, *mpl*, *actA*, *lmaA* 遺伝子の保有状況及び Wardらの示したマルチプレックスPCRによるLineage解析を行ったところ、ほとんどのリステリアはそれらの病原遺伝子を保持していた。また、Wardらの示したマルチプレックスPCR手法はLineage型別に有用であった。

[キーワード：リステリア, *L.monocytogenes*, Lineage]

[Key words : *Listeria*, *L.monocytogenes*, Lineage]

1 はじめに

細胞内寄生菌であるリステリア (*Listeria monocytogenes*, 以下 *L.m* と略) は、人に敗血症、髄膜脳炎、死産などを引き起こす病原細菌として認識されている。米国CDCは、毎年、米国内で2500例の重症化したリステリア症が発生し、500人が死亡していると推定している。欧米諸国ではリステリア症は稀に発生する感染症であるが、致死率は20%から30%と高いために、よく認知されている感染症である。ところが、日本ではリステリア症の発生は非常に稀であり、年間83例と推測されている¹⁾。近年、イギリスでは、高齢者がリステリアで敗血症になる症例が増加傾向にあり²⁾、今後、日本でも高齢者の増加に伴い、その発生の増大が危惧されている。リステリア症は食品媒介感染症であることが1980年代に判った。その感染源は、ソフトチーズ、食肉製品、冷薫魚介類など、加熱せずに食べる食品が多いことが判っている。食肉製品の汚染の由来は、その原料肉の処理工程汚染である可能性も報告されている³⁾。そこで、食肉における汚染状況を把握することが重要と考え、県内で流通している食肉を調査し、汚染度を把握することを目的として平成15年度と16年度に汚染調査を実施した。また、食肉処理される直前の牛の直腸内容物の汚染状況(牛

の保菌状況)を平成14年から調査している^{4) 5)}。今回、食肉及び食用牛の直腸内容物から分離されたリステリア菌の生化学的性状解析、血清型別、病原遺伝子の保有状況調査、病原遺伝子系統解析を行い、多少の知見を得たので報告する。

2 材料及び方法

2.1 材料

平成15年に食肉144検体、16年に食肉26検体の合計170検体の県内流通食肉から分離された38菌株と平成14年から平成18年度までに食用牛の直腸内容物から分離された15菌株を使用した。菌株はスキムミルク保存液で-80℃に保存されていた菌液を再分離して使用した。または、ドルセットの卵培地ニッスイ(日水製薬株)に4℃で保存されていた菌株を使用した。

2.2 *L.m*の生化学的性状試験

beutin培地(自家製、5%羊血液使用)による溶血性、CHROMagar™ *Listeria*寒天平板(CHROMagar社:フランス)でのハロー形成能、ラムノース、マンニット、キシロースの分解試験を行った。

2.3 *L.m*の血清型別

市販のリステリア型別用免疫血清(デンカ生研株)を

使用して型別した。ただし、H型別には25℃で一夜培養した菌液を2%ホルマリン加生食で死菌とした抗原を使用した。

2.4 病原遺伝子のPCR

*L.m*のDNA templateはBHI斜面培地に37℃で一夜培養した菌塊約1μlをデイスポーザブルの1μlエーゼで採り、100μlの滅菌ミリQ水に懸濁して、100℃10分間煮沸し、8,000rpm10分間遠心し、その上清を使った。

hlyA, *prfA*, *plcB*, *mpl*遺伝子のPCRはNishiboriらの方法⁶⁾に準じて行った。反応条件は、94℃3分間熱変性し、94℃1分間、55℃1分間、72℃1分間を30サイクル行い、さらに72℃7分間伸長反応を行った。

actA, *plcA*のPCRはJaradatらの方法⁷⁾により、94℃3分間熱変性し、94℃1分間、60℃2分間、72℃1分間を35サイクル行った。ただし、*actA* PCRでは63℃のアニーリング温度でも試験した。*ImaA* PCRはRobertsらの方法⁸⁾により、94℃5分間熱変性した後、94℃30秒間、56℃30秒間、72℃30秒間を30サイクル行い、さらに72℃5分間伸長反応を行った。

2.5 マルチプレックスPCRによる病

原遺伝子系統解析：ASO-PCR (allele-specific oligonucleotide multiplex PCR)

Wardらの方法⁹⁾に準じて、*prfA* virulence gene cluster (pVGC) sequencesからLineage (遺伝子系統)を特定するための3セットのプライマーを使用して、multiplex PCRを行った。94℃5分間熱変性した後に、94℃1分間、56℃1分間、72℃1分間を30サイクル行い、さらに72℃7分間伸長反応を行った。

3 結果

3.1 食肉、牛直腸内容物から検出された*L.m*の血清型別状況

表1に示すとおり、牛肉では、8株中7株が血清型1/2cであった。また、表2に示すとおり、牛の保菌状況でも1/2cが16株中7株と、多数分離された。しかも、平成14~15年度に集中して分離されており、それ以後は分離されなかった。人のリステリア症例の大部分を占める血清型である1/2a, 1/2b, 4bは豚肉・鶏肉から多く分離された。人症例にはまれな血清型である4e, 3aがそれぞれ牛肉、鶏肉から分離された。

3.2 *L.m*の生化学的性状及び病原遺伝子の保有状況

表3に示すとおり、検査したすべての株はCHROMagar™ Listeria寒天平板 (CHROMagar社：フランス)でのハ

表1 食肉の陽性率と血清型

食肉種類	検体数	<i>L.m</i> 陽性数	陽性率 (%)	血清型
牛肉スライス	48	6	12.5	1/2C (5), 4e (1)
牛肉ミンチ	17	2	11.8	1/2C (2)
豚肉スライス	41	9	22.0	1/2a (5), 1/2C (3), 4b (1)
豚肉ミンチ	10	4	40.0	1/2a (1), 1/2C (3)
鶏肉 1)	39	8	20.5	1/2a (4), 1/2b (2), 4b (3), 3a (1)
鶏肉ミンチ 2)	12	4	33.3	1/2b (3), 1/2C (1), 4b (2)
鶏・豚肉ミンチ	1	1	100.0	1/2C (1)
牛・豚肉ミンチ	1	0	0.0	
鶏キモ	1	0	0.0	
合計	170	34	20.0	

1) 1/2bと4bの同時検出1件
1/2aと3aの同時検出1件
2) 1/2bと4bの同時検出2件

表2 牛の*L.m*保菌状況

	検体数	<i>L.m</i> 陽性数 (%)	血清型				
			1/2a	1/2b	1/2c	4b	
平成14~15年度検査分 牛直腸内容物	981	12	1.22	3	0	7	2
平成16年度検査分 牛直腸内容物	379	1	0.26	1			
平成17年度検査分 牛直腸内容物	234	0	0				
平成18年度検査分 牛直腸内容物	207	3	1.45	1	n.t	2	

n.t:病原遺伝子PCR, Lineage型別は行っていない

表3 生化学的性状と病原遺伝子の保有状況

由来	検査株数	<i>hlyA</i>	<i>prfA</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>mpl</i>	<i>actA</i>	<i>ImaA</i>	溶血	phospholipase活性
牛直腸内容	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
豚肉	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
鶏肉 1)	16	16	16	16	16	16	16	16	14	16
牛肉 2)	8	8	8	8	8	8	8	7	8	8
鶏・豚ミンチ	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

数字は陽性株数を示す
1) 1/2a, 3aは溶血活性陰性
2) 1/2cは*ImaA* gene非検出

表4 *actA* PCRによる増幅産物の大きさの比較

由来	血清型					
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	4b	4e
牛直腸内容	L:4	S:1, L:1	L:7		S:2	
豚肉	S:5, L:1		L:6		S:1	
鶏肉	L:4	L:2, S:3	L:1	L:1	L:3, S:2	
牛肉			L:7			L:1
鶏・豚ミンチ			L:1			

数字は菌株数を示す
L:増幅産物(大)
S:増幅産物(小)

表5 血清型とLineage型

Lineage型	血清型						
	1/2a	1/2b	1/2c	3a	4b	4e	
1		5			6	1	食肉由来
		2			2		牛由来
2	4		7				牛由来
	10		15	1			食肉由来

数字は菌株数を示す

ロー形成能 (phospholipase 活性) を認めた。また、すべての株はラムノース分解陽性、マンニト分解陰性、キシロース分解陰性の性状を示し、通常の *L.m* 性状と一致した。また、同一の鶏肉から分離された 1/2a, 3a は *hlyA* 遺伝子はあるものの、羊溶血活性が認められなかった。この2株以外は羊溶血活性を認めた。また、牛肉一検体から分離された 1/2c は *lmaA* 遺伝子を認めなかった。その他の食肉由来37株と牛由来株15株はすべて、試験した7つの病原遺伝子を保有していた。

3.3 *actA* PCR

Jaradatらの方法⁷⁾によると、大きい増幅産物と小さい増幅産物が見られたと報告されており、表4及び図1に示すとおり、大小2つの産物が見られた。1/2a, 1/2b, 4bは2つの型に分かれたが、1/2cはすべて大きい増幅産物を認めた。

3.4 マルチプレックスPCRによる病原遺伝子系統解析 (Lineage鑑別)

表5及び図2に示すとおり、検査したすべての株は Lineage I 又は II 型に分類された。1/2b, 4b, 4eは

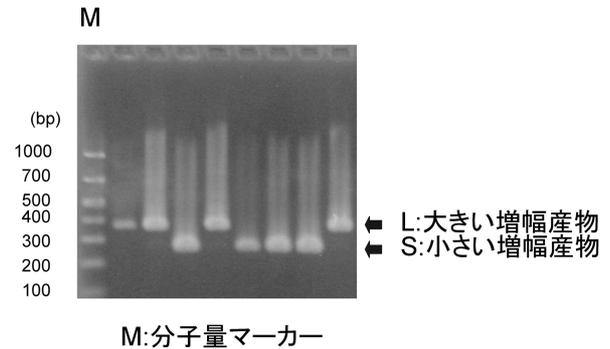


図1 *actA* PCRによる増幅産物の大きさの比較

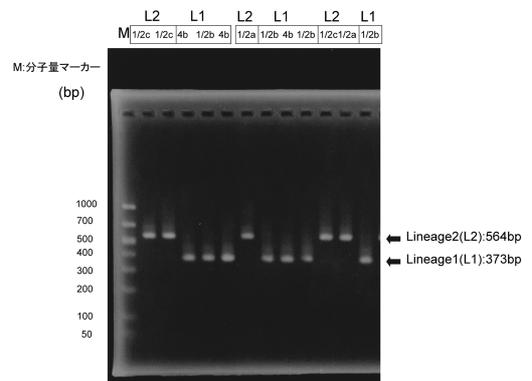


図2 Multiplex ASO-PCR for Lineage identification of *Listeria monocytogenes*

Lineage I に、1/2a, 1/2c, 3aは Lineage II 型に分類された。Lineage III 型 (277bp) はなかった。

4 考察

牛直腸内容物から血清型 1/2c が、他の血清型に比べて多く分離され、日本では牛の腸内容物から 1/2c が優位に分離されているという報告¹⁰⁾と同様であった。牛肉でも 1/2c が、8株中7株から検出されたことから、牛の直腸内容物による汚染の可能性が唆された。*L.m*は3つの Lineage に分類されることが判っているが¹¹⁾、Nadonら¹²⁾は、Lineage I は血清型 1/2b, 3b, 3c, 4b から構成され、また Lineage II は 1/2a, 1/2c, 3a から構成され、Lineage III は 4a, 4c から構成されることが示されている。また、Wardら⁹⁾は、血清型 1/2b, 4b, 4d, 4e が Lineage I に含まれ、また 1/2a, 1/2c, 3a, 3c は Lineage II に、4a, 4b, 4c は Lineage III に含まれることを示している。我々の結果では、鶏肉から分離された 3a は Lineage II に分類されて、両報告の結果と一致し、牛肉から分離された 4e は Lineage I に分類され、Wardら⁹⁾の報告と

一致した。Wardらの示した⁹⁾ ASO-PCR (allele-specific oligonucleotide multiplex PCR) による Lineage 鑑別は、血清型別ほど細分化はされないものの、すべての株を迅速かつ明瞭に型別することができて、疫学調査等に应用可能であると思われた。病原遺伝子の保有状況調査によって、同じ鶏肉に由来する血清型 1/2a と 3a は *hlyA* 遺伝子の保有を確認したが、ポイチン培地で溶血活性を示さなかった。また、牛肉(牛ミンチ肉)から分離された 1/2c も *lmaA* 遺伝子を欠いていた。Cooray ら¹³⁾ は *L.m* ATCC15313 株が リステリオリシン O 遺伝子を欠き、溶血活性も示さないことを報告しており、これらの株においては、病原性が低下している可能性が考えられた。Jaradat らの示した *actA* PCR⁷⁾ は 1/2a, 1/2b, 4b を各々、2つの型に分類可能であり、血清型別よりも迅速かつ詳細に型別でき、有用な方法であると思われた。

謝 辞

牛直腸内容物の検体収集にご協力いただいた岡山県食肉衛生検査所の関係各位に深謝いたします。

文 献

- 1) 五十君 静信：食品由来のリストERIA菌による健康被害，食品衛生研究，53(4)，19-23，2003
- 2) Gillespie, I.A., McLauchlin.J., Grant.K.A., Little.C.L., Mithani.V., Penman.C., Lane. C., Regan.M. : Changing Pattern of Human Listeriosis, England and Wales, 2001-2004, *Emerg.Infect.Dis.*, 12(9), 1361-1366, 2006
- 3) Lawrence, L.M., and Gilmour, A. : Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated from Poultry Products and from the Poultry-Processing Environment by Random Amplification of Polymorphic DNA and Multilocus Enzyme Electrophoresis, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(6), 2139-2144, 1995
- 4) 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トERIA汚染状況，岡山県環境保健センター年報，28，73-77，2004
- 5) 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食肉のリストERIA汚染状況と迅速な菌種同定，岡山県環境保健センター年報，29，85-88，2005
- 6) Nishibori.T., Cooray.K., Xiong.H., Kawamura.I., Fujita.M., Mitsuyama.M. : Correlation between the Presence of Virulence-Associated Genes as Determined by PCR and Actual Virulence to Mice in Various Strains of *Listeria* Spp, *Microbiol. Immunol.*, 39(5), 343-349, 1995
- 7) Jaradat.Z.W., Schutze.G.E., Bhunia.A.K. : Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes, *Int.J.Food.Microbiol.*, 76, 1-10, 2002
- 8) Roberts.A.,Nightingale.K., Jeffers.G., Fortes.E., Kongo.J.M., Wiedmann.M. : Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III, *Microbiology.*, 152, 685-693, 2006
- 9) Ward.T.J., Gorski.L., Borucki.M.K., Mandrell.R.E., Hutchins.J., Pupedis.K. : Intraspecific Phylogeny and Lineage Group Identification Based on the *prfA* Virulence Gene Cluster of *Listeria monocytogenes*, *J. Bacteriol.*, 186(15), 4994-5002, 2004
- 10) Okutani.A.,Okada.Y.,Yamamoto.S., Igimi.S. : Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan, *Int.J.Food.Microbiol.*, 93, 131-140, 2004
- 11) Wiedmann.M., Bruce.J.L., Keating.C., Johnson.A.E., McDonough.P.L., Batt.C.A.: Ribotypes and Virulence Gene Polymorphisms Suggest Three Distinct *Listeria monocytogenes* Lineages with Differences in Pathogenic Potential, *Infect.Immun.*, 65(7), 2707-2716, 1997
- 12) Nadon.C.A.,Woodward.D.L.,Young.C., Rodgers.F.G., Wiedmann.M. : Correlations between Molecular Subtyping and Serotyping of *Listeria monocytogenes*, *J.Clin. Microbiol.*, 39(7), 2704-2707, 2001
- 13) Cooray, K.J., Nishibori, T., Xiong, H., Matsuyama, T., Fujita, M., Mitsuyama, M. : Detection of Multiple Virulence-Associated Genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in Artificially Contaminated Milk Samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(8), 3023-3026, 1994