

食鳥処理施設材料から継続して分離されたりステリア及びその
パルスフィールドゲル電気泳動による型別

Listeria monocytogenes isolated continuously from poultry processing plant
and their molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

狩屋英明, 大畠律子, 中嶋 洋 (細菌科)
Hideaki Kariya, Ritsuko Ohata, Hiroshi Nakajima

【調査研究】

食鳥処理施設材料から継続して分離されたリステリア及びその パルスフィールドゲル電気泳動による型別

Listeria monocytogenes isolated continuously from poultry processing plant
and their molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

狩屋英明, 大島律子, 中嶋 洋 (細菌科)
Hideaki Kariya, Ritsuko Ohata, Hiroshi Nakajima

要 旨

平成17年6月～11月に食鳥処理施設で各種材料からリステリアの分離を試みたところ、拭き取り等36検体中6検体から *Listeria monocytogenes* を検出した。*Listeria monocytogenes* は6月に3検体, 7月に1検体, 11月に2検体から分離され, 全てが血清型1/2aであった。また, 分離株をパルスフィールドゲル電気泳動によりDNA型別した結果, 全てよく似た遺伝子型を示し, 約5ヶ月間に渡って類似した遺伝子型のリステリアが施設内を汚染していたことが示された。

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

[Keyword: *Listeria*, *L.monocytogenes*, PFGE]

1 はじめに

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。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で83人と推計され¹⁾, 症例数は少ないが, その発生頻度は欧米に比べても極端に低いものではないことが判ってきた²⁾。日本での調理用食肉からの *L.monocytogenes* 検出率は10～40%と高率で, 特に鶏肉の汚染が高いと言われている。そこで, 食鳥処理施設における加工途上の食肉, 機器の各種拭き取り材料等を採取してリステリア汚染の状況を調査し, 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17年6, 7, 11月に各1回, 拭き取り材料等計36検体を採取した。内訳は, 平成17年6月に, 拭き取り9検体(総排泄腔2, と体胸部1, 脱羽機1, シャックル1, 内臓受けスプーン1, 使用前まな板1, 内臓コンベア1,

冷却と体受け台1), もも肉2検体, 肝臓・心臓(数羽分)1検体, 腎臓(数羽分)1検体, 盲腸内容3検体の計16検体を, 平成17年7月には, 拭き取り7検体(まな板2枚の25cm²と全面約1800cm², コンベア3カ所), 腎臓(3羽分)3検体の計10検体を, 平成17年11月には, 拭き取り8検体(成鳥かご1, コンベア4, まな板2, 包丁1), 手袋1検体, 排水(約5ml)1検体の計10検体を採取した。

2.2 方法

拭き取りには専用のスポンジ付きサンプリングバッグ(Nasco WHIRL-PAK B01391)又は綿棒式キット(ふきふきチェックII 栄研器材(株))を用いた。リステリアの選択増菌培地は, Difco™ UVM Modified *Listeria* Enrichment Brothを使用し30℃48時間増菌した。又, Half Fraser *Listeria* selective enrichment Broth(MERCK)を使用し30℃24時間増菌し, さらにFraser *Listeria* selective enrichment Broth(MERCK)に0.1mlを添加し30℃24時間増菌した。分離培地にはPALCAM-*Listeria*-Selective agar(MERCK)を使用し30℃48時間培養した。又, CHROMagar™ *Listeria* 寒天平板(CHROMagar社:フランス)も使用し, 37℃48時

間培養した。一部の検体は、1/15M セレンセンのリン酸緩衝液(pH7.6)で乳剤とし、4℃で約3週間低温増菌を行い、さらに、Half Fraser Listeria selective enrichment Broth(MERCK)及び Fraser Listeria selective enrichment Broth(MERCK) で増菌後、PALCAM-Listeria-Selective agar (MERCK) 及び CHROMagar™ Listeria 寒天平板 (CHROMagar 社:フランス) により分離培養を行った。コロニーは、ブレインハートインフュージョン寒天培地 (BHI) で再分離した後、グラム陽性短桿菌、SIM確認培地での傘状発育 (25℃)、VP陽性、カタラーゼ試験陽性を確認した。さらに、beutin 培地 (自家製) 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、PCR法による *hlyA* 又は *iap* 遺伝子の確認を行い、同定した。また、汚染菌数はMPN3本法により算出した。

2.3 PCR法による *hlyA* 遺伝子の確認

Coorayらの方法³⁾を参考にして行った。BHIで増殖させた菌を、滅菌ミリQ水に浮遊させ100℃、10分間加熱後急冷し、8,000rpm、10分間遠心した。その上清をPCRに使用した。PCRはTakaRa PCR thermal cycler MP(TaKaRa Biomedicals)又はGene Amp PCR System 9700(Applied Biosystems)を使用して、熱変性94℃、1分間、アニーリング55℃、1分間、伸長反応72℃、1分間を30サイクル行った。

2.4 PCR法による *iap* 遺伝子の確認

Heinらの示した方法⁴⁾を参考にして、LIM2 (forward primer) プライマー、LIMRE (reverse primer) プライマーを用いて、*iap* 遺伝子上の *L.monocytogenes* 特有配列を検出することにより確認した。

2.5 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

Gravesら⁵⁾の方法に準じて行ったが、Lysis buffer 処理は52℃で3時間とし、処理後のプラグ洗浄は、4mM Pefabloc SC(AEBSF)で行った。制限酵素処理は、Asc I (New England Biolabs)を使用し、1プラグあたり25 unitsで 37℃、3時間反応させた。電気泳動は1% SeaKem Gold agarose(CAMBREX)ゲルで行った。使用機器はCHEF-DRⅢ (Bio-Rad)を使った。泳動の終わったゲルは、0.2~0.5 µg/ml の Ethidium bromide 水溶液で染色し、脱色を行い、紫外線下で写真撮影して、

Fingerprinting II (Bio-Rad) でバンドパターンを解析した。

3 結果

3.1 拭き取り材料等からの菌検出状況

図1, 2に示すとおり、コンベア、まな板、包丁、作業者手袋等の各種材料から *L. monocytogenes*, *Listeria innocua*(以下 *L.innocua* と略), *Listeria welshimeri* (以下 *L.welshimeri* と略) が検出された。使用中のまな板2枚の25cm²を綿棒で拭き取った後に、残り全面(約1800cm²)をスポンジで拭き取ったが、全面を拭き取ったものからのみ、それぞれ、*L.monocytogenes*, *L.welshimeri* が検出された。

3.2 *L.monocytogenes* の検出された検体の菌数

表1に示すとおり、腎臓、もも肉は <300MPN / 100g ~740MPN / 100g であった。また拭き取り材料では、まな板で <15MPN / 1800cm², 搬送コンベアで1.8 MPN/500cm² と菌数的には少なかった。また、手袋(作業中)では 14MPN / 個であった。*(L.welshimeri* は230MPN / 個)

表1 分離された *L.monocytogenes* の菌数

陽性検体	菌数
腎臓 (2回凍結融解)	740 MPN/100g
もも肉 (2回凍結融解)	360 MPN/100g
もも肉 (2回凍結融解)	<300 MPN/100g
まな板(No.2, 使用中) (5℃で1日間, 1回凍結融解)	<15 MPN/1800cm ²
コンベア(使用中)	1.8 MPN/500cm ²
手袋(作業中)	14 MPN/個 (<i>L.welshimeri</i> は 230MPN/個)

3.3 分離された *L.monocytogenes* の血清型

6つの材料から分離された *L.monocytogenes* 116株のうち分離陽性材料あたり6株以上の計66株を血清型別した。その結果、全て1/2aであった。

3.4 分離された *L.monocytogenes* の PFGE型別

各種材料から分離された *L.monocytogenes* 14株に

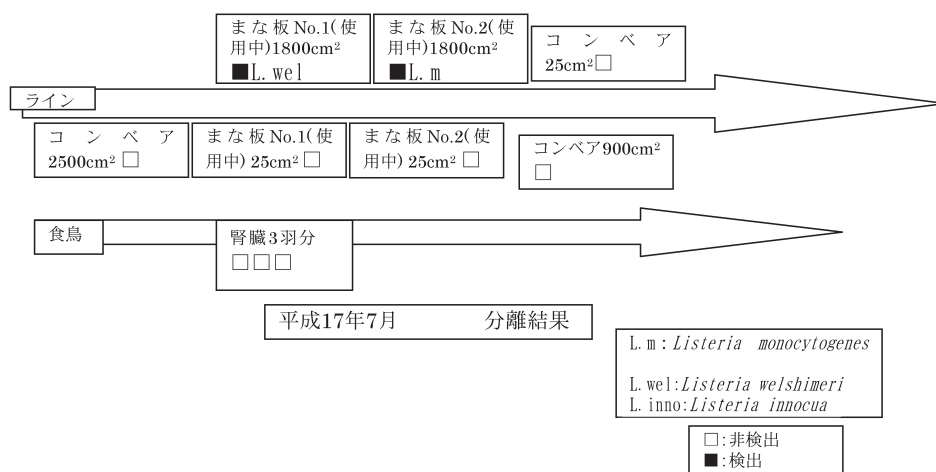
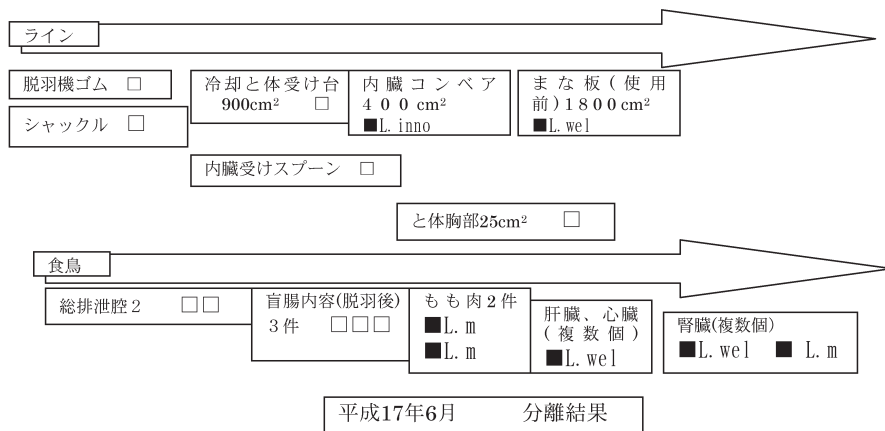


図1 平成17年6月及び平成17年7月のリステリア分離結果

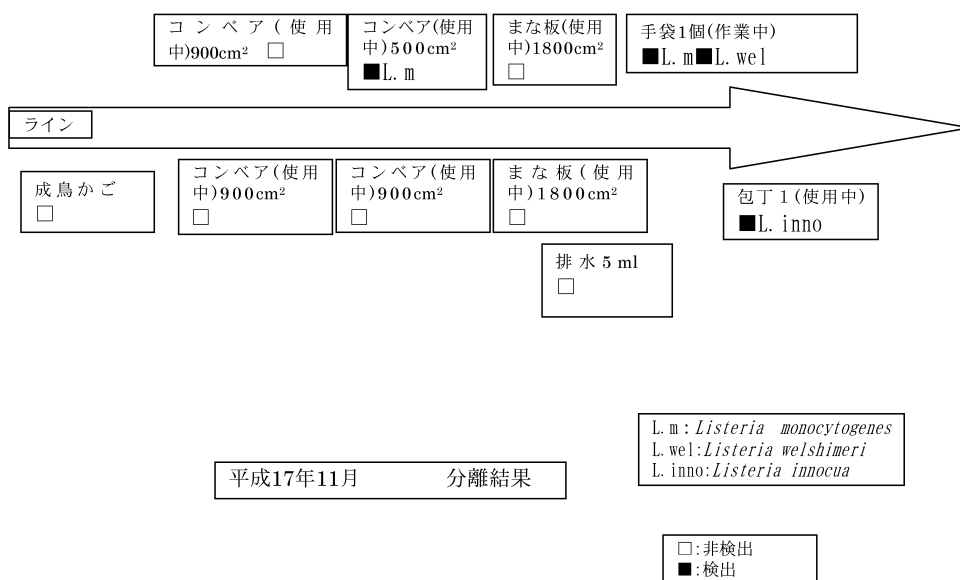


図2 平成17年11月のリステリア分離結果

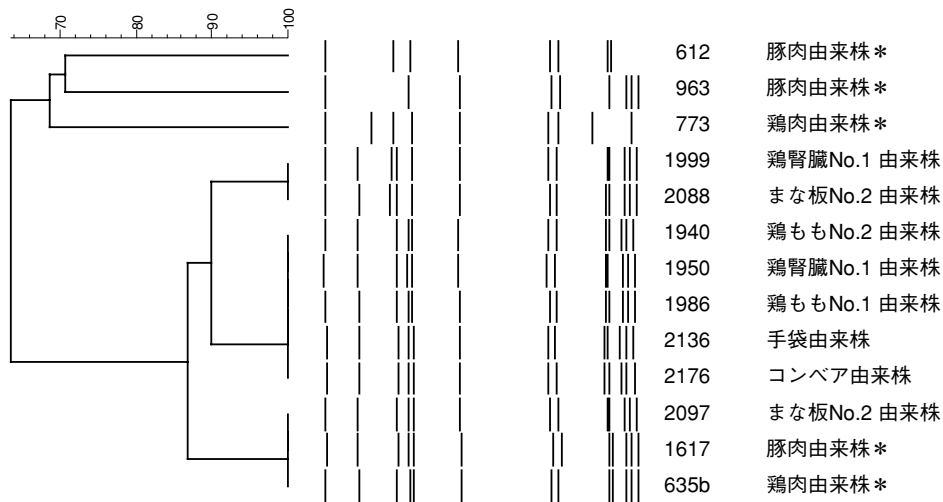


図3 PFGE 解析結果 (Asc I 使用)

*保存株

ついて、制限酵素 *Asc I* を用い、PFGEを行ったところ、図3に示すとおり、分離された株は、どの株も類似したバンドパターンを示した(図には8株を示した)。これらの株は、以前、鶏肉及び豚肉から分離した血清型 1/2aの保存株 (No.1617, No.635b) とも類似していた。しかし、保存していた5株中3株 (No.612, No.963, No.773) とはパターンが異なっていた。

4 考察

食鳥処理施設内の様々な拭き取り材料等から約5ヶ月間にわたり、PFGE型別でよく似た DNAパターンの *L. monocytogenes* が検出された。同様の事例は Lawrence ら⁶⁾ や Senczek ら⁷⁾ によって報告されており、Lawrence らは家禽肉工場を調査し、分離された *L. monocytogenes* 289株中184株(64%)が単一のRAPDタイプを示し、そのタイプの株は6ヶ月間の調査期間を通して常に検出されたと報告している。また加工を経るにつれて菌汚染が広がることも指摘している。Vogel ら⁸⁾ は冷薫鮭加工工場で、4年間以上同じRAPDタイプの株が検出された事例を報告している。今回の調査では、菌数測定の結果、まな板、コンベア等では非常に少ない菌数が検出された。このことは、菌数的には少ないが製品汚染が広がっていることを示すものと考えられる。分離された *L. monocytogenes* 血清型

1/2a株は制限酵素 *Asc I* を用いたPFGEにより、類似したバンドパターンを示したことから、遺伝子的によく似た株が、ある特定の工程を継続して汚染し、そこからさらに汚染が拡大している可能性もある。Vázquez-Boland ら⁹⁾ によれば *L. monocytogenes* の13種の血清型の内、人と動物のリステリア症例の90%以上を占める血清型は1/2a, 1/2b, 4bで、4bは人のリステリア症の50%以上の症例から分離されるという。今回の調査で、その3種の血清型のうちの1/2a株が分離されたことは食品衛生上重要な問題であり、同時に通常の衛生管理では汚染を排除できなかった可能性がある。このことについては、Vogel ら⁸⁾ も冷薫鮭加工工場で、通常の衛生管理では長期に生残する *L. monocytogenes* を排除できないことを指摘している。Autio ら¹⁰⁾ は、冷薫ニジマス加工工場での、*L. monocytogenes* 除去のため、スライサー部品、施設の壁などを蒸気等で徹底して消毒したところ、*L. monocytogenes* は機械、製品等からは検出されなくなったと報告し、熱い蒸気、熱い空気、熱水は魚加工工場の *L. monocytogenes* 除去に有効な手段だと報告している。したがって、今回調査した施設でも、製品と接触する機械部位を蒸気等により徹底して消毒することはリステリアの除去に効果的であると思われる。また、今後は、関係指導機関と連携して、より衛生的な食肉の生産に

つながるよう、さらに、調査研究を進める必要性があると考えられる。

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, 食品衛生研究, 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) 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
- 4) Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandl, E., Wagner, M.: Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay, Res. Microbiol., 152, 37-46(2001)
- 5) Graves, L.M., Swaminathan, B.: PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis, Int. J. Food. Microbiol., 65, 55-62, 2001
- 6) 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
- 7) Senczek, D., Stephan, R., Untermann, F.: Pulsed-Field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period, Int. J. Food Microbiol., 62(1-2), 155-159, 2000
- 8) Vogel, B.F., Huss, H.H., Ojeniyi, B., Ahrens, P., Gram, L.: Elucidation of *Listeria monocytogenes* Contamination Routes in Cold-Smoked Salmon Processing Plants Detected by DNA-Based Typing Methods, Appl. Environ. Microbiol., 67(6), 2586-2595, 2001
- 9) Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J.: *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants, Clin. Microbiol. Rev., 14(3), 584-640, 2001
- 10) Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjöberg, A-M., Aarnisalo, K., Björkroth, J., Mattila-Sandholm, T., Korkeala, H.: Sources of *Listeria monocytogenes* Contamination in a Cold-Smoked Rainbow Trout Processing Plant Detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing, Appl. Environ. Microbiol., 65(1), 150-155, 1999