

Listeria monocytogenes のパルスフィールドゲル電気泳動法の改良

河合央博, 大島律子, 中嶋 洋 (細菌科)

【調査研究】

Listeria monocytogenes のパルスフィールドゲル電気泳動法の改良

Improved Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE) method for *Listeria monocytogenes*

河合央博, 大島律子, 中嶋 洋 (細菌科)

Hisahiro Kawai, Ritsuko Ohata, Hiroshi Nakajima

(Department of Bacteriology)

要 旨

Listeria monocytogenes のパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法について、アメリカの PulseNet が *Listeria monocytogenes* 用に示したプロトコル (section 5.3 August 2009) に準じて実施したところ、菌株によっては明瞭なバンドが得られないものがあった。そのため、国立感染症研究所が平成 15 年に示した腸管出血性大腸菌 O157 のためのプロトコルを参考に、PFGE 法の改良を行った。その結果、良好な結果が得られ、*Listeria monocytogenes* の PFGE 解析に有用な一つのプロトコルを構築できた。

[キーワード : *Listeria monocytogenes*, パルスフィールドゲル電気泳動, 疫学]

[Key words : *Listeria monocytogenes*, Pulsed-field Gel Electrophoresis, Epidemiology]

1 はじめに

Listeria monocytogenes (以下「*L.m.*」という。)は食中毒や、人の髄膜炎、死産、敗血症等の起原菌である他、主として反すう畜にも脳炎、死産等を引き起こす人畜共通感染症起原菌である。米国の CDC (Centers for Disease Control and Prevention) は、米国内でこの菌による感染症を毎年約 1,600 人が発症し、そのうち約 260 人が死亡しているとホームページで報告している。欧米では食品による集団事例が多数報告されているが、日本では平成 13 年にナチュラルチーズを原因とした北海道での集団事例 1 件以外この菌による事例は確認されていない。なお、日本におけるリステリア症発生報告数は年間 83 件と推定した報告¹⁾もある。*L.m.* は動物や土壌等の環境に広く常在しているため、食肉や乳製品、魚介類加工品などからの分離が報告¹⁾されており、当センターの調査でも食肉の平均 20% が汚染されていたことが判明しているが²⁾、食品からしばしば *L.m.* が分離される事実とリステリア症との因果関係は不明である。これらのことから、*L.m.* について感染源・感染経路の究明や感染症の発生予防に役立てることを目的として、食品の汚染状況や動物の保菌状況等の調査を継続して行っている。

その中で、食品や動物等から分離された *L.m.* 菌株に

ついて、パルスフィールドゲル電気泳動 (以下「PFGE」という。)法を使用し、分子疫学解析を行ったが、その際、アメリカの PulseNet が示したプロトコル (section 5.3 August 2009 以下「PulseNet 法」という。)に準じて実施した場合、菌株によってはスメアが生じるなど明瞭なバンドが得られないことを経験した。

一方、腸管出血性大腸菌 O157 の分子疫学解析に用いる PFGE 法では、平成 15 年に国立感染症研究所が示したプロトコル (以下「O157 感染研プロトコル」という。)に従って実施しているが、すべての菌株で非常に明瞭なバンドが得られている。

そこで、今回、O157 感染研プロトコルをベースに *L.m.* の PFGE プロトコルの改良を試み (以下「改良法」という。), PulseNet 法との比較検討を行ったので報告する。

2 方法

2.1 供試菌株及び菌液調整

供試菌株として、平成 23 年度から 24 年度の間に当センターで牛直腸便等から分離した *L.m.* 菌株 5 株 (No. 1~5, 血清型はすべて 1/2b) を用いた。菌液は、菌株を Brain Heart Infusion Agar (日水製薬) で 37°C, 18~20 時間培養した後、滅菌水に McFarland 5 程度になるように浮

遊し調整した。菌株5株についてそれぞれ菌液を調整し、同一菌液を用いて以下に示すPulseNet法及び改良法により処理を行った。

2.2 菌液処理

(1) PulseNet法

アメリカのPulseNetがホームページ上で公開した*L.m.*のPFGEプロトコル(section5.3 August2009)に準じて行った。菌液 200 μ lを用いてプラグを作製し、制限酵素処理等を行った。制限酵素は*Apa* I (TaKaRa)と*Asc* I (New England Biolabs)の2種類を用いた。また、酵素量は、*Apa* Iは45units/sample, *Asc* Iは40units/sampleとし、37 $^{\circ}$ C水浴中で3時間、ゆっくり振とうしながらインキュベートした。

(2) 改良法

改良法は、O157感染研プロトコルを参考にして試案した。この方法のフローチャートを図1に示す。菌液 200 μ lを1.5mlマイクロチューブに入れ、Lysozyme from chicken egg white (SIGMA)を用いて調整したリゾチーム液(20 mg/ml TE (pH8.0) 溶液)を10 μ l添加し、50 $^{\circ}$ C水浴中で15分間、ゆっくり振とうしながらインキュベート後、1% Seakem Gold Agarose 200 μ lと混和してプラグを作製した。ProK液(1 mg/ml Proteinase K (Roche), 1% N-lauroylsarcosine (SIGMA) 0.5MEDTA (pH8.0) 溶液)1mlを入れた13ml丸底遠心チューブ(ザルスタット)にプラグを入れ、50 $^{\circ}$ C水浴中で2時間、ゆっくり振とうしながらインキュベートした。プラグを泳動時用の大きさにカットし、1.5mlスリムチューブ(住友ベークライト)に入れ、4mMPefabloc SC [AEBSF] (Roche) TE (pH8.0) 溶液 500 μ lで2回洗浄(50 $^{\circ}$ C水浴中20分間、ゆっくり振とうしながらインキュベート)、TE (pH8.0) 1mlで1回洗浄(氷上20分間、ゆっくり振とうしながらインキュベート)、さらに制限酵素に添付されている10 \times buffer (*Apa* I : 10 \times Lbuffer, *Asc* I : NEbuffer4) から調製した1 \times buffer 200 μ lで1回洗浄(氷上20分間、ゆっくり振とうしながらインキュベート)後、制限酵素で処理した。制限酵素は*Apa* I (TaKaRa)と*Asc* I (New England Biolabs)の2種類を用いた。酵素量は*Apa* I, *Asc* Iともに30units/sampleとし、37 $^{\circ}$ C水浴中で3時間、ゆっくり振とうしながらインキュベートした。酵素処理後、0.5 \times TBE 400 μ lに入れ替え、電気泳動まで室温保管した。

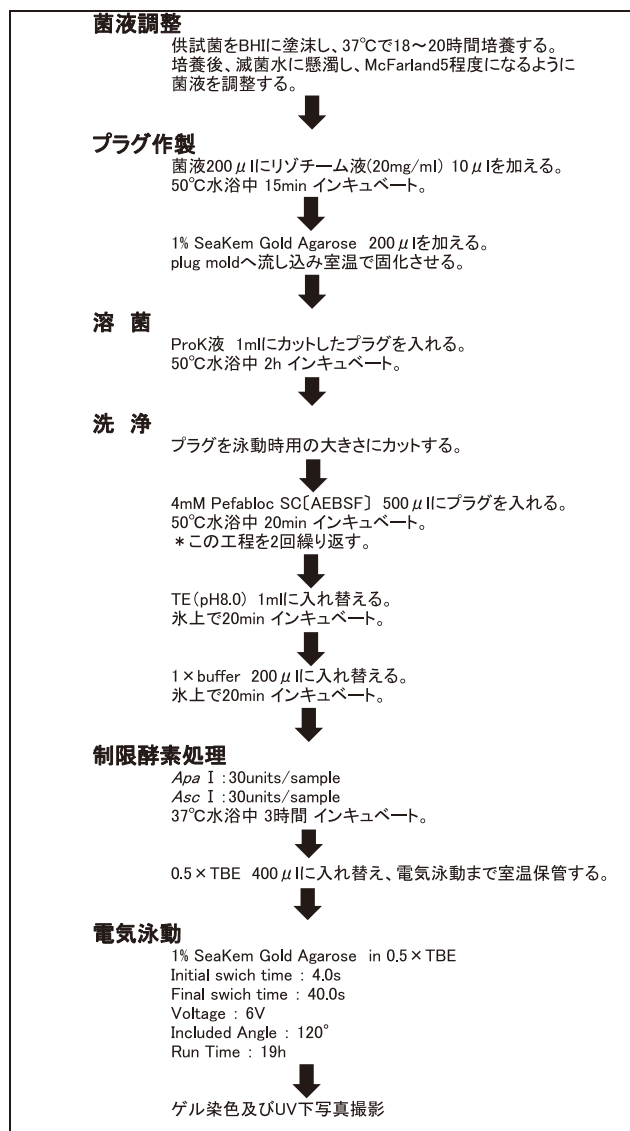


図1 改良法プロトコルフローチャート

2.3 電気泳動

電気泳動は、PulseNet法、改良法ともに以下に示す条件で行った。泳動後、0.2 ~ 0.5 μ g/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た。

使用機器：CHEF-DR III (BioRad)

緩衝液：0.5 \times TBE

アガロース：1% SeaKem Gold Agarose in 0.5 \times TBE

Voltage : 6V

Included Angle : 120 $^{\circ}$

Switch time : 4.0sec ~ 40.0sec

Run time : 19h

3 結果

供試菌株 5 株について、それぞれ PulseNet 法及び改良法により処理し電気泳動を行った。その際、電気泳動像を比較するため、菌株毎に 2 つの処理法を並べて泳動した。Apa I 処理の電気泳動像を図 2 に、Asc I 処理の電気泳動像を図 3 に示す。

全体的に PulseNet 法よりも改良法の方がバンドが濃く、明瞭な傾向が見られた。特に、Asc I ではその差が大きく見られた。また、菌株 No. 5 は、Apa I、Asc I とともに PulseNet 法ではバンドが非常に薄く、スミアになってバンドの一部が確認できなかった。

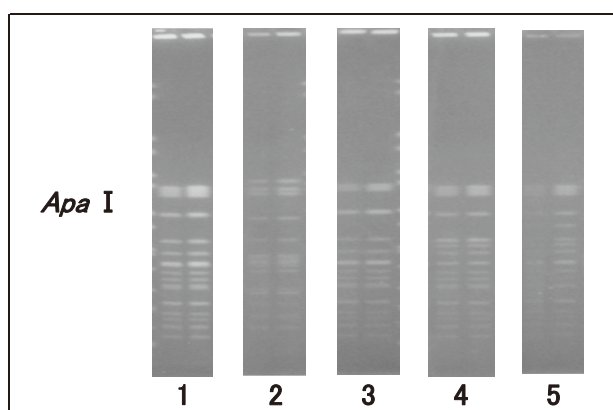


図 2 PulseNet 法と改良法の PFGE 電気泳動像の比較 (Apa I)
(左：PulseNet 法 右：改良法)

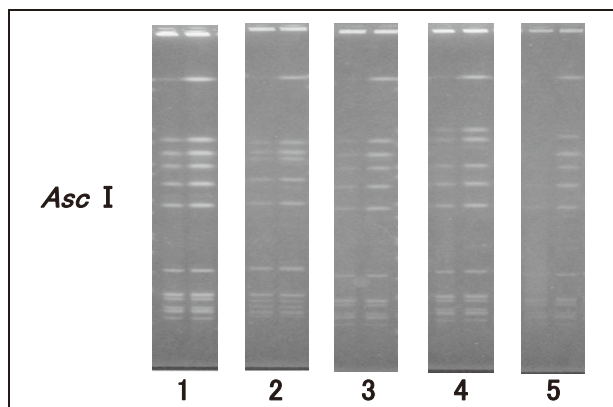


図 3 PulseNet 法と改良法の PFGE 電気泳動像の比較 (Asc I)
(左：PulseNet 法 右：改良法)

4 考察

今回、PulseNet 法と改良法の比較を行ったが、改良法の方がバンドが明瞭な傾向が見られた。PulseNet 法と改良法の主な違いは、① Proteinase K の使用量、② 洗浄方法、及び③ 制限酵素使用量であった。① Proteinase K の使用量は、若干ではあるが改良法の方が使用量は多く、溶菌が十分であったと思われる。② 洗浄方法は、

PulseNet 法では滅菌水及び TE (pH8.0) で洗浄を行うのに対し、改良法は Pefabloc SC [AEBSF] を用いることにより、Proteinase K の失活が完全に行われ、良好な結果が得られたものと考えられた。

また、③ 制限酵素使用量は、PulseNet 法では Apa I : 45units/sample, Asc I : 40units/sample, 改良法では Apa I : 30units/sample, Asc I : 30units/sample と、改良法は Apa I, Asc I とともに PulseNet 法に比べ少量であった。菌株 No. 1 ~ 4 について 2 つの方法のバンドパターンを比較したところ、同一バンドパターンであることが確認できたことから、改良法の酵素量で十分消化できることが示された。

一方、今回の供試菌株の中で、菌株 No. 5 は PulseNet 法ではバンドが非常に薄く、不明瞭であったが、改良法ではバンドが鮮明であった。当センターでは、実際に *L.m.* 菌株百数株について改良法により PFGE を行ったが³⁾、すべての菌株でおおむね良好な電気泳動像が得られたことから、改良法は PulseNet 法に比べより広範囲の菌株について解析可能な方法であることが示された。

これらのことから、改良法を用いた PFGE 法は、菌株間のバンドパターンの比較が容易となり、*L.m.* 感染症の感染源や感染経路の究明等に非常に役立つものであると考える。今回試案した改良法は、リゾチーム液の添加及び使用制限酵素の種類他は、O157 感染研プロトコルに示された試薬量等の条件を参考にしたものであるため、さらに条件の比較検討を行うことで、より *L.m.* に適した方法に改善されるものとする。

文 献

- 1) 五十君 静信：食品由来のリストéria菌による健康被害に関する研究，厚生労働科学研究費補助金 食品・化学物質安全総合研究事業 平成 14 年度 総括・分担研究報告書，2005
- 2) 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éria汚染状況，岡山県環境保健センター年報，28，73-77，2004
- 3) 河合央博，大島律子，仲 克巳，檜原幸二，中嶋 洋：牛由来検体等からのリストéria及びサルモネラの検出状況とパルスフィールドゲル電気泳動法を用いた *Listeria monocytogenes* の型別解析について，岡山県環境保健センター年報，37，83-88，2013