

【調査研究】

動物を含めた環境中及び食肉のリステリア汚染状況と迅速な菌種同定

狩屋英明, 大島律子, 中嶋 洋, 国富泰二* (細菌科)

*岡山赤十字病院第一小児科

要 旨

リステリアについて、動物の保菌状況と環境中及び調理用食肉の汚染状況を調査するとともに、人の便についても検査を行った。その結果、牛の保菌率 (0.26%) は、昨年の報告¹⁾に比較して約 1/5 に低下していたが、食肉の汚染率 (15.4%) は高く、食肉処理の過程での二次汚染の可能性が推測された。PCR-RFLP 法を用いて菌種同定を行い、*Listeria monocytogenes* と *Listeria innocua* を迅速に同定することができた。

[キーワード：リステリア, 食肉汚染, PCR-RFLP]

1. はじめに

Listeria monocytogenes (以下 *L. m* と略) は食中毒菌として知られており、人の髄膜炎、死産、敗血症等の起原菌であり、反芻獣にも脳炎、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 は、毎年米国内で約2,500例の感染例が発生し、そのうち約500人が死亡しているとそのホームページで報告している。通常は免疫抵抗力の未熟又は低下した人が感染し易い。日本におけるリステリア症は年間約80例と推定されており²⁾、欧米に比較してその症例数は少ない。今回、動物の保菌状況と環境中及び調理用食肉の汚染状況を調査するとともに、人の便からも検出を試みた。また、Paillard ら³⁾が報告した PCR 産物の制限酵素切断断片長多型により迅速な菌種同定を行った。

2. 材料及び方法

2.1 材 料

牛直腸内容物379検体、人糞便70検体、環境水3検体、調理用食肉26検体について検査を行った。

2.2 方 法

腸内容物、糞便は 1/15M PBS (pH7.6) で乳剤とし、4℃で3週間低温増菌を行い、さらに、UVM Modified *Listeria* Enrichment Broth (DIFCO) で30℃、48時間増菌後、PALCAM-*Listeria*-Selective agar (supplement 添加: MERCK) により30℃、48時間分離培養を行った。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25℃の傘状発育、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) での羊血液溶血活性、CHROMagar™ *Listeria* (CHROMagar Microbiology) 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、同定キット api *Listeria* (bioMérieux) を用いた生化学的性状試験、PCR 法による *hlyA* 遺伝子の確認を行い、同定した。調理用食肉は10g を使って UVM Modified *Listeria* Enrichment Broth (DIFCO) で10%乳剤を作成し、これを30℃、48時間増菌して上記と同様に検査した。また、Half Fraser Broth でも10%乳剤を作成し、30℃、24時間増菌して、その増菌液0.1ml 又は1ml を Fraser Broth に添加し30℃、24時間増菌した。分離培地として PALCAM-*Listeria*-Selective agar (supplement 添加: MERCK) 及び CHROMagar™ *Listeria* (CHROMagar Microbiology) を使用した。また、汚染菌数は MPN 3 本法により算出した。環境水は8,000rpm、20分間遠心しその沈査を、1/15M PBS (pH7.6) で乳剤とし、4℃で3週間低温増菌を行い、さらに、UVM Modified *Listeria* Enrichment Broth (DIFCO) で30℃、48時間増菌する方法と沈査を直接 UVM Modified *Listeria* Enrichment Broth (DIFCO) で増菌する方法の2通りの増菌方法を行った。

2.3 PCR 法による *hlyA* 遺伝子の確認

使用したプライマー⁴⁾は次のとおりである。

プライマー *hlyA1*

5'-ATTTTCCTTCACTGATTGC-3'

プライマー *hlyA2*

5'-CACTCAGCATTGATTTGCCA-3'

BHIで増殖させた菌を、5% Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol: Sigma Ultra) に溶かし、100°C、10分間加熱後急冷した溶液を PCR に使用した。また、一部の菌株は滅菌ミリQ水に菌を浮遊させ100°C、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 cyclor MP (TaKaRa Biomedicals) 又は Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を使用して、熱変性94°C、1分間、アニーリング55°C、1分間、伸長反応72°C、1分間を30サイクル行った。

2. 4 PFGE (パルスフィールドゲル電気泳動)

Gravesら⁵⁾の方法に準じて行ったが、Lysis buffer 処理は52°Cで3時間とし、処理後のプラグ洗浄は、4 mM 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25unitsで37°C、3時間反応させた。電気泳動は1% SeaKem Gold agarose (CAMBEX) ゲルで行った。使用機器はCHEF-DR IIIを使った。泳動の終わったゲルは、0.2~0.5µg/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、

表1. 牛、人、環境水からの *L.m**の検出状況

検体種類	検体数	陽性検体数	陽性率 (%)	血清型
牛直腸内容物	379	1	0.26	1/2a
人糞便	70	0	0.0	
環境水	3	0	0.0	

**L.m*: *Listeria monocytogenes*

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

2. 5 23SrRNA 遺伝子断片の制限酵素切断断片長多型による迅速な菌種同定

Paillardら³⁾が報告した方法にしたがって、PCRで23SrRNA 遺伝子断片 (S1, S2) を増幅させた後、*Xmn I*, *Cfo I*, *Alu I* (いずれも Promega 製) の制限酵素と各々37°C 2時間反応させ、切断断片を2%アガロースゲル又は1.5%DNAアガー (Marine BioProducts Inc.) ゲルで電気泳動し、0.2~0.5µg/mlのEthidium bromide水溶液で染色して菌種同定を行った。

3. 結 果

3. 1 動物、人、環境水からの *L.m* の検出状況

表1に示すとおり、動物では牛直腸内容物379検体中1検体 (0.26%) から *L.m* を検出した。人糞便70検体及び環境水3検体からは *L.m* は検出されなかった。

3. 2 調理用食肉からの *L.m* の検出状況

表2に示すとおり、調理用食肉 (牛肉、豚肉、鶏肉) 26検体中4検体 (15.4%) から *L.m* を検出し

表2. 調理用食肉からの *L.m**の検出状況

食肉種類	検体数	陽性数	陽性率 (%)	血清型 (検体数)
牛肉スライス	12	2	16.7	1/2c(2)
牛肉ミンチ	4	0	0.0	
豚肉スライス	7	1	14.3	1/2a
豚肉ミンチ	2	1	50.0	1/2c
鶏肉	1	0	0.0	
合計	26	4	15.4	

**L.m*: *Listeria monocytogenes*

表3 調理用食肉からのリステリア属菌の検出状況

食肉種類	検体数	陽性検体数					
		<i>L.m</i> *	<i>L.m+L.inno</i> **	<i>L.m+L.wel</i> ***	<i>L.inno</i>	<i>L.wel</i>	<i>L.inno+L.wel</i>
牛肉スライス	12	1	0	1	2	1	0
牛肉ミンチ	4	0	0	0	3	0	1
豚肉スライス	7	0	1	0	0	0	0
豚肉ミンチ	2	1	0	0	1	0	0
鶏肉	1	0	0	0	0	0	0
合計	26	2	1	1	6	1	1

L.m*: *Listeria monocytogenes* *L.inno*: *Listeria innocua* ****L.wel*: *Listeria welshimeri*

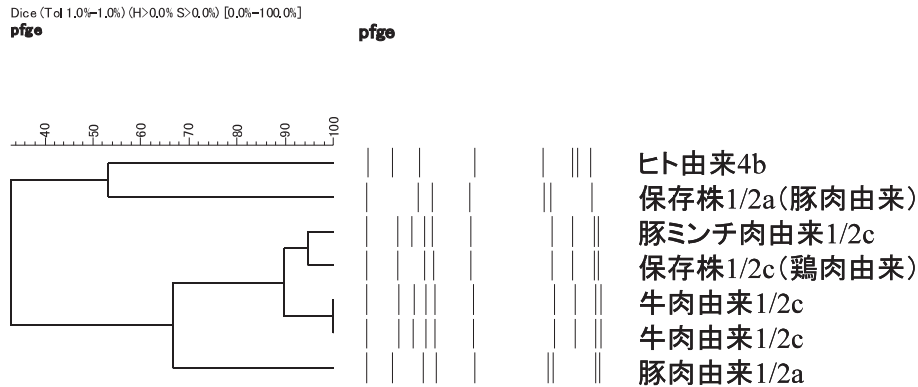


図1 食肉から検出された *Listeria monocytogenes* の PFGE 解析結果 (Asc I 使用)

た。分離された *L. m* の血清型は 1/2a が 1 検体、1/2c が 3 検体で、1/2c が多く検出された。食肉を凍結融解後に測定した菌数は、3つの陽性検体で、30 MPN/100g 未満であったが、豚ミンチ肉では 2400 MPN/100g であった。

3. 3 調理用食肉からのリステリア属菌の検出状況

表3に示すとおり、*L. innocua* が最も多く検出された。複数の菌種に汚染されている食肉も3検体あった。

3. 4 分離された *L. m* の PFGE 型別

調理用食肉から分離された *L. m* について、制限酵素 Asc I を用い、PFGE を行ったところ、図1に示すとおり、1/2c 株はどの株も類似したバンドパターンを示した。また、以前鶏肉から分離していた保存株 1/2c とも類似していた。豚肉から分離された 1/2a は、以前豚肉から分離していた保存株 1/2a とは異なっていた。

3. 5 23SrRNA 遺伝子断片の制限酵素切断断片長多型による迅速な菌種同定

当センターで以前牛直腸内容物から分離された *L. innocua* 及び *L. monocytogenes* を使用して PCR-RFLP を行ったところ、図2に示すとおり、Paillard らが報告したとおりのバンドが検出された。同定キットでは菌種同定までに18~24時間を要するが、これらの菌種について本法を用いれば8~10時間で同定可能であり、更に複数の制限酵素を同時に使用すれば約6時間で同定可能であり、迅速に同定することが出来た。

4. 考 察

食肉となる牛の保菌率は0.26%と低かった。この成

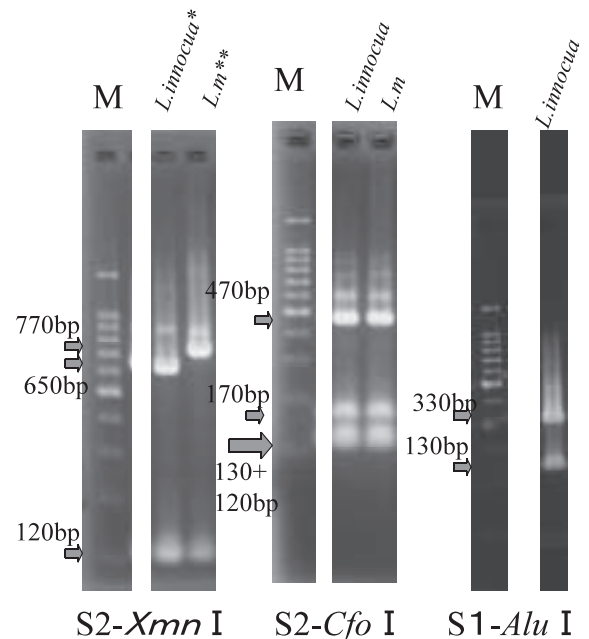


図2 食肉から検出された *L. m*** 及び *L. innocua** の 23SrRNA 遺伝子断片の PCR-RFLP による菌種同定 (制限酵素 *Xmn* I, *Cfo* I, *Alu* I 使用)

L. innocua* : *Listeria innocua* *L. m* : *Listeria monocytogenes*

績は、前報告の1.2%から更に5分の1程度に低下している。この原因については不明であるが、近年はラップサイレージが普及しており、より衛生的なサイレージが牛に給餌されていることも一要因ではないかと推測される。食肉の汚染率については、昨年報告の20.8%と同様に高く、15.4%であった。また、同一食肉から複数の菌種のリステリア属菌が検出されるものもあり、食肉加工施設での食肉相互の汚染あるいは設備、器具からの二次汚染の可能性が示唆された。*L. m* の菌数については、豚ミンチ肉の1検体で2400MPN/100gと比較的多かったが、国際食品微生物規格委員

会の提案している1g当たり100個未満の規格には適合すると推測される。*L. m*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報告がある⁶⁾。

1/2cは食品や食品工場環境からしばしば分離されるが、人の症例からはほとんど検出されていない⁷⁾。今回、分離された*L. m*の血清型は1/2a及び1/2cであった。また、前報告と同様に、比較的多く分離された1/2cは、人の集団食中毒事例からは分離されていないが、その病原性については不明であり、培養細胞、動物を使った実験等により明らかにすることが重要と考える。前報告では、ヒト糞便213検体中2検体から*L. m*が検出されたが¹⁾、今回のヒト糞便70検体からは全く検出されなかった。より多くの検体を検査すれば検出された可能性もあるが、その要因は不明である。我が国の人リステリア症は欧米に比較すると少ないと推測されているが、極端に少ないわけではないことが判ってきた⁸⁾。また、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、高濃度(100グラムあたり最大10¹⁰個程度)にリステリアに汚染されたチーズが感染源であることが判明した⁸⁾。また、国内で市販されている調理用食肉の*L. m*汚染率は10~40%であり、欧米とほぼ同程度と考察されている²⁾。本研究でも調理用食肉の15.4%が*L. m*に汚染されており、汚染菌数は少ないものの昨年報告と同様に高率に汚染されていることが判った。*L. innocua*及び*L. monocytogenes*について23SrRNA遺伝子断片のPCR-RFLPによる菌種同定を行ったが、*L. monocytogenes*では8時間程度で菌種判定可能であり、また2種類の酵素処理を同時に行えば、更に時間短縮可能であり、本手法の有効性が確認できた。また、本手法は、リステリア属であるか否かも確認できるので有用である。調理用食肉から分離された*L. m*の制限酵素Asc Iを用いたPFGEにより、1/2c株はどの株も類似したバンドパターンを示したが、疫学的情報が少なかったため、菌株間の関連性は不明である。一方、本来、血清型1/2cはPFGEによっては

遺伝学的に細かく分類できない可能性もあるので、今後、PFGE以外の型別法も検討していく必要があると考える。

文 献

- 1) 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
- 2) 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
- 3) Paillard, D., Dubois, V., Duran, R., Nathier, F., Guittet, C., Caumette, P., Quentin, C.: Rapid Identification of *Listeria* Species by Using Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 23S rRNA Gene Fragments, Appl. Environ. Microbiol., 69 (11), 6386-6392, 2003
- 4) 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
- 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) 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
- 7) Kathariou, S.: *Listeria monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective, J. Food. Prot., 65 (11), 1811-1829, 2002
- 8) 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