

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19380076

研究課題名（和文） 高病原性リステリア菌の迅速検出と制御に関する基礎研究

研究課題名（英文） Basic study on rapid detection and control of pathogenic
Listeria monocytogenes

研究代表者

宮本 敬久 (MIYAMOTO TAKAHISA)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：70190816

研究成果の概要：

Listeria monocytogenes (リステリア菌)は、食中毒細菌で、低温増殖性であることから今後、大規模な食中毒発生の懸念がある。本菌を迅速に検出し、効果的に制御する必要があるので、食品と環境から分離されたリステリア菌合計 192 株の遺伝子解析を行い、遺伝子型と病原性の強さとの関係を調べ、リアルタイム PCR を用いたサイクリングプローブ法により、病原性と推定される菌株を特異的および簡易迅速に検出する方法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2008年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：食品安全性

1. 研究開始当初の背景

リステリア属細菌は、動物や土壌などの環境中に広く常在しており、食肉や乳製品を中心に、魚の一夜干し、辛子明太子、野菜の浅漬、ネギトロ、生鮮野菜類など様々な食品から高頻度に検出されるが、低温増殖能や高食塩濃度耐性をもつため、食品の一次汚染はもちろん製造工程での二次汚染を防ぐことも困難である。食品が高濃度で本菌に汚染されていると、食品の低温保存中に増殖し、食中毒を引き起こす恐れがある。本菌に感染した場合、成人は抵抗力が強いため、無症状

感染や保菌状態となるが、新生児、高齢者および免疫不全者などのハイリスク群では多くのリステリア症の発症がみられ、重症化した場合の致命率は30%と極めて高く、子宮内で胎児が感染すると死産や早産の原因となる。全ての *L. monocytogenes* が病原性が高いわけでもなく、ヒトの感染症例から検出されるのは血清型として 1/2a、1/2b および 4b がほとんどである。これらの血清型の中でも、ヒトへの感染が心配される特に病原性の強い菌株検出・同定のための方法も現在、無い。食品の安全確保の目的でアメリカでは全

での食品に *L. monocytogenes* 陰性であることを課しているが、上記の理由から現実的ではなく、人に対する病原性の高い *L. monocytogenes* 菌株だけを検出できる簡易迅速な検査法の確立が強く望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、種々の食品および環境から分離される種々の血清型の *L. monocytogenes* および臨床由来の *L. monocytogenes* 菌株合計 200 株程度において、病原性に関係すると考えられている約 10 種の遺伝子のうちでも特に重要と考えられる 4 種の遺伝子（溶血毒 listeriolysin O の構造遺伝子である *hlyA*、細胞内の殺菌機構から逃れるために重要な酵素であるホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C をコードする *plcA*、細胞内への侵入に必要な internalin A 分子をコードする *inlA*、ストレス耐性に重要な役割を示す ClpC ATPase をコードしている *clpC*）の内部塩基配列を決定し、これらの配列を比較して、*L. monocytogenes* の進化系統学的解析を行い、病原因子獲得の過程を解明する。これをもとに病原性の強さには関係なく全ての *L. monocytogenes* を網羅的に検出できる検査法を開発する。逆に、臨床株に特異的な 1 塩基置換の有無を見だし、この 1 塩基置換を特異的に検出する検査法のためのプライマーセットおよびプローブ DNA を新たに設計し、これらを用いた「高病原性 *L. monocytogenes* 菌株の簡易迅速検出法」を開発する。

3. 研究の方法

(1) 菌株

種々の食品（鶏肉、豚肉、畜肉加工品、生乳、生鮮農産物、水産加工品など）から *L. monocytogenes* を分離した。また、地方衛生研究所、国立医薬品食品衛生研究所に依頼して分与を受けた。

(2) 塩基配列の決定

hlyA、*plcA*、*inlA* および *clpC* 遺伝子の内部塩基配列用のプライマーセットを、塩基配列既知の *L. monocytogenes* EDG-e 株（血清型 1/2a）および F2365 株（血清型 4b）で共通の配列部分をもとに設計し、各菌株から調製したゲノム DNA を鋳型として PCR を行い、これを生成し、塩基配列を常法により決定した。

(3) 塩基配列の解析と遺伝子型による分類

決定した塩基配列のアライメント解析により、遺伝子毎あるいは全遺伝子の結合配列をもとに菌株のグループ分けを行い、近隣結合法により系統樹を作製し、病原性との関連を調べた。Riboprinter® system を用いたりボタイピングによる分類も行った。

(4) 遺伝子転写量の比較

対数増殖期後期および定常期の菌株から mRNA を抽出し、逆転写後、特異プライマーを用いて、10 種の病原遺伝子 *actA*、*clpC*、*hlyA*、*iap*、*inlA*、*inlB*、*mpl*、*plcA*、*plcB* および *prfA* 遺伝子の転写量を測定した。

(5) 表現型の確認試験

病原遺伝子表現型の中でも特に重要であると思われる膜傷害活性に注目し、 β -溶血性、PI-PLC 活性および PC-PLC 活性をそれぞれの基質を添加した平板培養法で調べた。また、マウスマクロファージ株化細胞を用いて細胞内増殖性試験および細胞破壊試験を行い、病原性との関連を調べた。

(6) 高病原性株の特異的検出法の開発

塩基配列解析により、臨床株に特異的 1 塩基置換 (SNP) を見出し、サイクリングプローブ法による検出のためのプライマーセットおよびキメラプローブを設計し、反応条件を決定し、特異性などを検討した。

4. 研究成果

(1) リステリア菌の遺伝子解析

まず、*L. monocytogenes* 192 株（食品・環境由来 161 株、臨床由来 31 株）について、本菌の病原遺伝子の一部である *hlyA*、*plcA*、*inlA* および *clpC* 遺伝子の内部塩基配列を決定し、塩基置換に基づく分類を行った。その結果、各遺伝子ごとに決定した塩基配列を比較したところ、図 1 に示すように *hlyA* 遺伝子で 14 群、*plcA* 遺伝子で 30 群、*inlA* 遺伝子で 27 群、*clpC* 遺伝子で 17 群に各々分類された。それぞれの遺伝子において、臨床株は血清型ごとに特定のグループにまとまって分類される傾向が見られた。臨床 1/2a は *hlyA* 遺伝子のグループ 5、*plcA* 遺伝子のグループ 16 にまとまって分類された。臨床 1/2b は *inlA* のグループ 12、*clpC* 遺伝子のグループ 13 にまとまって分類された。臨床 4b は *clpC* 遺伝子のグループ 13 にまとまって分類された。また、4 遺伝子を組み合わせた MLST (multilocus sequence typing) では、図 2 に示すように 57 群に分類された。血清型 1/2a では、食品 1/2a 株は 17 群、臨床 1/2a は 8 群に分類された。食品 1/2a は特定のグループに集中して分類されることはなかったが、臨床 1/2a は 11 株中 4 株がグループ 45 にまとまって分類された。血清型 1/2b では、食品 1/2b 株は 11 群、臨床 1/2b は 5 群に分類された。食品 1/2b はグループ 4 および 13 にまとまって分類され、臨床 1/2b は特定のグループに集中して分類されることはなかった。血清型 4b では、食品 4b 株、臨床 4b とともに 7 群に分類され

た。食品 4b および臨床 4b はそのほとんどがグループ 22 および 24 に分類された。

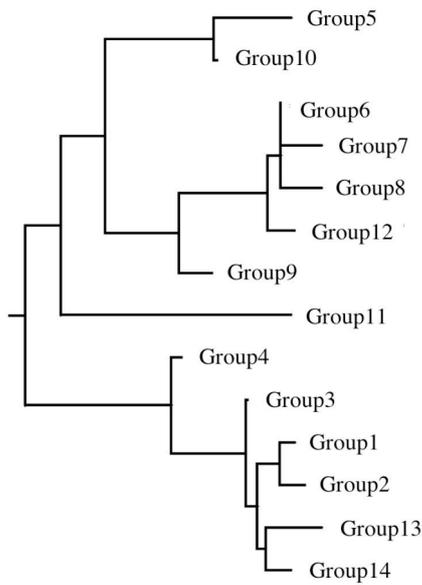


図 1. *hlyA* 遺伝子の塩基配列に基づくリステリア菌の系統樹

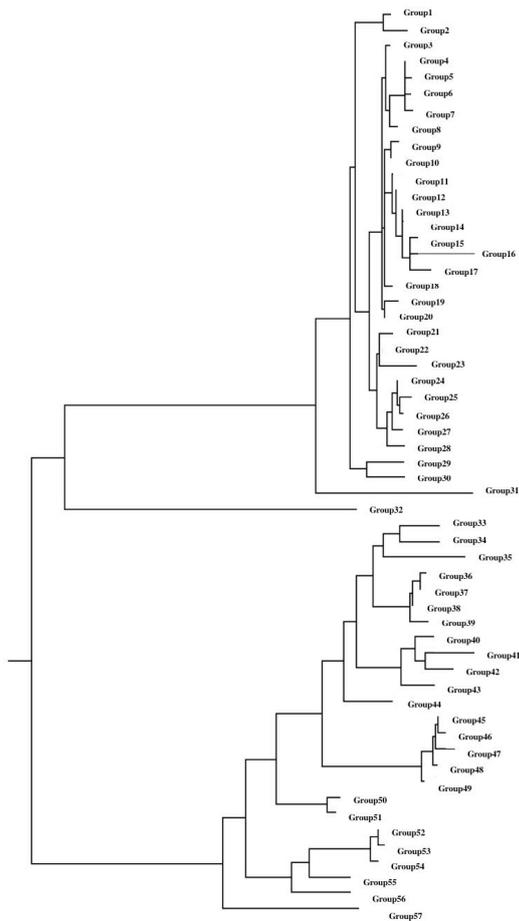


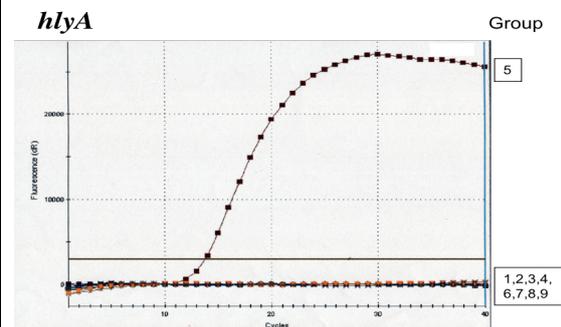
図 2. 4 遺伝子の MLST 分類に基づくリステリア菌の系統樹

(2) 高病原性株特異的検出のためのサイクリングプローブ法の開発

決定した塩基配列をもとに、臨床由来株に特異的な一塩基置換部位を検索した結果、臨床由来 1/2a 株は *hlyA* 遺伝子内に 1 ヶ所、臨床由来 1/2b および 4b 株は *clpC* 遺伝子内に 2 ヶ所の特異的な塩基置換部位を見出した。これらの一塩基置換を特異的に検出できるサイクリングプローブ法のためのプライマーセットおよびプローブ DNA を設計し、血清型ごとに臨床由来株と同様に病原性が高いと思われる菌株を特異的に検出・同定する方法を開発した。図 2 には、設計したプライマーセットによる *hlyA* 遺伝子検出結果を示す。

(3) リボタイプ分析

さらに詳細なサブタイピングを行うため、*L. monocytogenes* 180 株（食品由来 162 株、臨床由来 18 株）について、リボプリンターを用いてリボタイピングによる分類を行った結果、32 グループに分類された。特定のグループに臨床由来株が集中することはなかったが、4 遺伝子 (*hly-plcA-inlA-clpC*) の MLST による分類とは異なっており、これらを組み合わせると 73 グループにサブタイピングされ、疫学調査における菌株の追跡には有効と思われた。



hlyA F: 5'-CCTGAAGGTAACGAAATTG-3'

hlyA R: 5'-TGC GTTACCTGGCAAATAG-3'

hlyA プローブ:

5' (FAM) TT (G) GCTCATTTC (Eclipse) -3'

(陽性株)

食品株: 血清型 1/2a (8/24 株), 3a (1/2 株), 3c (1/1 株), 型別不能 (2/6 株)

臨床株: 血清型 1/2a (5/5 株)

図 3. *hlyA* 遺伝子内部 SNP 検出による臨床株血清型 1/2a 特異的リステリア菌検出用サイクリングプローブ法の概要とリアルタイム PCR 検出結果

(4) 分類群の病原遺伝子転写量の比較

病原遺伝子転写量と病原性との関連について検討するため、対数増殖期および定常期

初期における 10 種の病原遺伝子の転写量を比較した結果、臨床株の転写量が食品・環境由来株と比較して低くなっているパターンで、*clpC*、*hlyA*、*iap*、*inlA* および *inlB* 遺伝子が含まれた。菌株ごとに各遺伝子の転写量は異なり、遺伝子型および病原性との関連は認められなかった。臨床株の転写量と食品・環境由来株の転写量に顕著な差が見られないパターンで、*actA*、*mpl*、*plcA*、*plcB* および *prfA* が含まれた。

(5) 分類群の表現系の比較

表現型については、 β -溶血性および 2 種のホスホリパーゼ phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC)、phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) の活性を調べた。その結果、臨床由来株はほとんどが強い β -溶血性 (16 株) および PI-PLC 活性 (14 株) を示し、活性を全く示さないものはなかった。しかし、PC-PLC 活性は臨床由来株中 9 株は強かったが、残りの 9 株は弱いか、全くなかった。マウスのマクロファージ株化細胞を用いた細胞内増殖性および細胞破壊の有無を調べ他結果、全ての株でマウスマクロファージ細胞内での増殖性および細胞破壊が認められた。

以上の結果より、*L. monocytogenes* の臨床株では、溶血性や PI-PLC 活性が高い傾向にあり、臨床株と同じ遺伝子型の *L. monocytogenes* の同定は、サイクリングプローブ法による一塩基置換検出法が有効であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

K. HONJOH, K. FUJIHARA, T. HARAGUCHI, Y. ONO, H. KOBAYASHI, H. HIWAKI, H. KAMIKADO, Sung Sik JANG, Sangryeol RYU, and T. MIYAMOTO, Subtyping of *Listeria monocytogenes* based on nucleotide polymorphism in the *clpC*, *inlA*, *hlyA*, and *plcA* genes and rapid identification of *L. monocytogenes* genetically similar to clinical isolates, Food Science and Technology Research, Vol.14, 557-564(2008) 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

① Liu Pei, K. Fujihara, H. Mizue, K. Honjoh and T. Miyamoto, Studies on subtyping and pathogenicity of *listeria monocytogenes*, 14th World Congress of

Food Science & Technology, 2008 年 10 月 17日, Shanghai, China.

② Intraspecific lineage group identification of *Listeria monocytogenes* based on DNA sequences of some genes and rapid detection of *L. monocytogenes* genetically similar to clinical isolates, Takahisa Miyamoto, Kumiko Fujihara, Ken-ichi Honjoh, Hideaki Kamikado, Takashi Tanaka, Natural Resources, Food and Agriculture Panel, 36th Annual meeting, 2007 年 10 月 23日, Ibaraki, Japan.

③ *L. monocytogenes* の分類と制御に関する研究, 藤原久美子, 原口敬寛, 樋脇弘, 本城賢一, 宮本敬久, 日本農芸化学会中四国・西日本支部合同大会, 2007 年 9 月 14・15日, 山口市, 山口大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 敬久 (MIYAMOTO TAKAHISA)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 70190816

(2) 研究分担者

本城 賢一 (HONJOH KENOICHI)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号: 00264101

(3) 連携研究者

なし