

氏 名 (本籍)	吉 田 徹 也 (長 野 県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博乙第32号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年9月21日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 題 目	Epidemiological Study of <i>Listeria monocytogenes</i> in Japan
審 査 委 員	主査 岐阜大学 教授 平 井 克 哉 副査 帯広畜産大学 教授 品 川 森 一 副査 岩手大学 教授 品 川 邦 汎 副査 東京農工大学 教授 本 多 英 一 副査 岐阜大学 教授 源 宣 之

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

*L. monocytogenes* は古くからヒトおよび哺乳類・鳥類に病原性を示すことが知られている。1980年代以降乳製品や食肉製品などを介するリステリア症の集団発生が欧米を中心に続発し、本菌は重要な foodborne disease 起因菌の一つとして認識されている。一方、我が国においては、1958年以降年間20-60症例のヒトの散发例が報告されているが、感染源が特定されていない。本研究では、*L. monocytogenes* による生乳 (バルク乳) の汚染実態を把握し、その汚染源および経路を究明した。また、汚染源の特定された農場については効果的なバルク乳の衛生対策を実施した。さらに、国内分離菌株を用い、Random amplified polymorphic DNA (RAPD) フィンガープリンティングが分子疫学的調査に応用できるかを検討した。以下にその結果を要約した。

1. 長野県内の計943農場のバルク乳を5ヶ月間に収集し、*Listeria* の分離を試みたところ、*Listeria*は29農場 (3.1%) から検出され、検出率には地域差が認められた。*L. monocytogenes* は3農場 (0.3%) から検出され、分離3株のうち2株は血清型4b、残り1株は1/2aであった。

2. 県内で最も *Listeria* 検出率の高かった南部の56農場から12ヶ月間に9回にわたり継続してバルク乳を計504検体集め、*Listeria* の分離を行った。その結果、検出率は春に高く (14.3%)、秋に低い (4.8%) 傾向が認められた。また、56農場はその検出頻度によって3グループに分類できた。すなわち、グループ1の3農場はバルク乳から50%以上の頻度で、グループ2の14農場は低い頻度 (11.1~44.4%) で *Listeria* が検出された。グループ3の39農場は一度も *Listeria* が検出されなかった。

3. *L. monocytogenes* によるバルク乳汚染源および経路を明らかにするため、3農場の牛舎環境、牛体、糞便、餌、搾乳器具やバルクタンクなどから本菌の検出を試みた。グループ1の2農場 (Nos. 5 および 6 農場) の牛体、糞便および環境からは繰り返し *Listeria* が分離されたのに対し、グループ2の1農場 (No. 9 農場) からは糞便1検体のみが分離陽性であった。また、No. 5 農場のバルクタンクが本菌に汚染され、生乳の汚染源

であることを証明した。その衛生対策として、バルクタンクを繰り返しアルカリ洗剤で洗浄したところ、バルク乳中の本菌の菌数を劇的に減少させることができた。

4. RAPDフィンガープリンティングを疫学的に関連性のない *L. monocytogenes* 20株に応用した結果、18RAPD型に分けられ、その識別能を表す指標値は0.984の高値を示した。したがって、迅速、簡便で低コストなこの型別法は分子疫学的調査に有用であることが示された。

5. 農場 (No.5) のバルクタンク表面およびバルク乳由来 *L. monocytogenes* 7株を型別したところ、同一のRAPDパターンを示し、同一由来株が継続的にバルク乳を汚染していたことが遺伝子レベルで明らかになった。また、5農場 (Nos. 5、6、8、9および15) のバルク乳由来28株は、RAPD型別がすべて同じプロファイルを示したことから、同一クローン由来の本菌が狭い地域内の農場間に浸潤したと考えられた。

本研究は、我が国のバルク乳の *Listeria* による汚染状況を初めて明らかにすると共に、バルクタンクがバルク乳の *L. monocytogenes* による汚染源の一つであることを解明し、そしてその病原体の衛生対策についても言及した世界的にも貴重なデータである。これらの知見は、牛乳の安全性の向上および食品媒介リステリア症の予防戦略を策定するために有益な資料を提供した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

*L. monocytogenes*は古くからヒトおよび哺乳類・鳥類に病原性を示すことが知られている。1980年代以降乳製品や食肉製品などを介するリステリア症の集団発生が欧米を中心に続発し、本菌は重要なfoodborne disease起因菌の一つとして認識されている。一方、我が国においては、1958年以降年間20-60症例のヒトの散発例が報告されているが、感染源が特定されていない。本研究では、*L. monocytogenes*による生乳（バルク乳）の汚染実態を把握し、その汚染源および経路を究明した。また、汚染源の特定された農場については効果的なバルク乳の衛生対策を実施した。さらに、国内分離菌株を用い、Random amplified polymorphic DNA (RAPD)フィンガープリンティングが分子疫学的調査に応用できるかを検討した。以下にその結果を要約した。

1. 長野県内の計943農場のバルク乳を5ヶ月間に収集し *Listeria* の分離を試みたところ、*Listeria* は29農場 (3.1%) から検出され、検出率には地域差が認められた。*L. monocytogenes* は3農場 (0.3%) から検出され、分離3株のうち2株は血清型4b、残り1株は1/2aであった。

2. 県内で最も *Listeria* 検出率の高かった南部の56農場から12ヶ月間に9回にわたり継続してバルク乳を計504検体集め、*Listeria* の分離を行った。その結果、検出率は春に高く (14.3%)、秋に低い (4.8%) 傾向が認められた。また、56農場はその検出頻度によって3グループに分類できた。すなわち、グループ1の3農場はバルク乳から50%以上の頻度で、グループ2の14農場は低い頻度 (11.1~44.4%) で *Listeria* が検出された。グループ3の39農場は一度も *Listeria* が検出されなかった。

3. *L. monocytogenes*によるバルク乳汚染源および経路を明らかにするため、3農場の牛舎環境、牛体、糞便、餌、搾乳器具やバルクタンクなどから本菌の検出を試みた。グループ1の2農場（Nos.5および6農場）の牛体、糞便および環境からは繰り返し*Listeria*が分離されたのに対し、グループ2の1農場（No.9農場）からは糞便1検体のみが分離陽性であった。また、No.5農場のバルクタンクが本菌に汚染され、生乳の汚染源であることを証明した。その衛生対策として、バルクタンクを繰り返しアルカリ洗剤で洗浄したところ、バルク乳中の本菌の菌数を劇的に減少させることができた。

4. RAPDフィンガープリンティングを疫学的に関連性のない*L. monocytogenes*20株に応用した結果、18RAPD型に分けられ、その識別能を表す指標値は0.984の高値を示した。したがって、迅速、簡便で低コストなこの型別法は分子疫学的調査に有用であることが示された。

5. 農場（No.5）のバルクタンク表面およびバルク乳由来*L. monocytogenes*7株を型別したところ、同一のRAPDパターンを示し、同一由来株が継続的にバルク乳を汚染していたことが遺伝子レベルで明らかになった。また、5農場（Nos.5、6、8、9および15）のバルク乳由来28株は、RAPD型別がすべて同じプロファイルを示したことから、同一クローン由来の本菌が狭い地域内の農場間に浸潤したと考えられた。

本研究は、我が国のバルク乳の*Listeria*による汚染状況を初めて明らかにすると共に、バルクタンクがバルク乳の*L. monocytogenes*による汚染源の一つであることを解明し、そしてその病原体の衛生対策についても言及した世界的にも貴重なデータである。これらの知見は、牛乳の安全性の向上および食品媒介リステリア症の予防戦略を策定するために有益な資料を提供した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

## 基礎となる学術論文

1. Yoshida T, Sato M and Hirai K (1998) Prevalence of *Listeria* species in raw milk from farm bulk tanks in Nagano prefecture. *Journal of Veterinary Medical Science* 60: 311-314
2. Yoshida T, Kato Y, Sato M and Hirai K (1998) Sources and routes of contamination of raw milk with *Listeria monocytogenes* and its control. *Journal of Veterinary Medical Science* 60: 1165-1168

3. Yoshida T, Takeuchi M, Sato M and Hirai K (1999) Typing *Listeria monocytogenes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *Journal of Veterinary Medical Science* 61: 857-860

#### 既発表学術論文

1. Kikuta A, Furukawa N, Yoshida T, Fukushi H, Yamaguchi T, Hirai K (1991) Antigenic analysis of avian *Chlamydia psittaci* using monoclonal antibodies to the major outer membrane protein. *Journal of Veterinary Medical Science* 53: 385-389
2. Htwe K K, Yoshida T, Hayashi S, Miyake T, Amano K, Morita C, Yamaguchi T, Fukushi H and Hirai K (1993) Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 722-723
3. 月岡忠, 吉田徹也, 佐藤守俊 (1998) GC/MSによる穀類中のジフェンゾコートの定量. *食品衛生学雑誌* 39: 431-435
4. 石川雅章, 松田りえ子, 林譲, 四方田千佳子, 山口晶, 岩木和夫, 尾花裕孝, 佐藤守俊, 吉田徹也, 辻正彦 (1999) 高速液体クロマトグラフィー分析の精度と検出限界に関する共同実験. *分析化学* 48: 265-269