

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小林清美

Campylobacter 属菌（以下 C 属菌）と *Listeria* 属菌（以下 L 属菌）の細菌が食中毒を起こさせることが判明したのは比較的新しく、多くの不明な点や解決すべき問題が残されている。本論文 1 章では、C 属菌と L 属菌による鶏肉の汚染状況、2 章では、*L. monocytogenes* (Lm; 219 株)の塩化ベンザルコニウム (BC) 耐性の有無を検討し、3 章では鶏肉汚染と流通経路、飼養形態、HACCP（危険度分析による衛生管理）認証との関係について解析を行った。

1. 市販鶏肉を一般ブロイラー（一般）、銘柄鶏（銘柄）及び地鶏に区分して C 属菌と L 属菌による汚染の状況を検討した。2017 年 9 月から 2018 年 8 月の 1 年間に東京都内の 16 店舗より、鶏肉 90 検体を購入して C 属菌の分離を試みた。2017 年 12 月以降に購入した 13 店舗からの 65 検体では L 属菌の分離も試みた。常法に従って C 属菌と L 属菌を分離し、生化学的性状検査を行った。C 属菌では PCR 法により菌種を決定し、L 属菌では溶血試験から菌種を決定した。Lm では血清型も決定した。統計計算は二元配置分散分析で行った。

鶏肉は 16 店舗から購入したが、異なる加工場から鶏肉を搬入している店舗があったため、流通経路は 20 経路に分類された。地鶏と銘柄の産地及び種類は延べ 17 産地 22 種類であった。C 属菌は *C. jejuni* (Cj) 165 株、*C. coli* (Cc) 66 株が分離された。地鶏と銘柄では検体の 50%以上が Cj により汚染されていた。Cc による汚染は、一般で低い傾向が認められた。L 属菌は *L. innocua* (Li) 89 株、*L. gray* (Lg) 58 株、Lm 22 株、*L. welshmeri* (Lw) 6 株の合計 175 株が分離された。L 属菌の分離率は地鶏が 86%と最も高く、一般で低かった。菌種別では Li と Lg の汚染率が高く陽性検体の 83.7%では少なくともどちらか一方による汚染が確認された。また、一般の 1 検体は 3 菌種 (Li、Lm、Lw) に汚染されていた。Lm は 7 検体 (10.8%) から 22 株 (1/2a ; 11 株、1/2b ; 7 株、1/2c ; 4 株) が分離された。65 検体中 28 検体 (43%) から両属菌が分離され、その割合はどの区分も 40%程度で差は見られなかった (P>0.05)。菌種別

では Cj と Li による複合汚染が最も多かった。Lm が分離された 5 検体中 4 検体から Cj、残りの 1 検体から Cc が同時に分離されたが、Lm が Cj と Cc の両方と一緒に分離された検体は存在しなかった。L 属菌のみの汚染は C 属菌のみの 3 倍であった。C 属菌は 16 店舗中 13 店舗から購入した 57 検体から 232 株分離され、Cj の汚染がその大半を占めていたことは、これまでの報告と矛盾しなかった。鶏肉区分では一般が最も低い汚染率であった。鶏肉で血清型 1/2a の Lm が多く分離された成績は、我が国で発生しているリステリア症の感染経路を解明するための一助となるかもしれないと申請者は結論した。

2. 日本獣医生命科学大学獣医公衆衛生学研究室保有の Lm 保存株を用いて、BC 耐性のスクリーニング検査を実施、耐性株については薬剤感受性試験を行った。−80℃で保存されていた Lm547 株から、牛肉由来 17 株、牛豚合挽肉由来 5 株、豚肉由来 61 株、鶏肉由来 136 株の計 219 株を無作為に抽出して試験した。スクリーニング検査で BC 耐性を示した菌株及び陰性対照の EGD 株については、ディスク法及び微量液体希釈法で MIC(最小発育阻止濃度)を決定した。ディスク法で得られた直径は、平均値±標準誤差 (mm) で表し、スチューデントの *t* 検定により有意差を求めた。

本章で使用した保存 Lm 株は、199-6 年 6 月から 2018 年 8 月の期間に、1 都 5 県の 105 店舗から購入していた総計 820 検体由来の分離株であった。無作為に選んだ 219 株は、延べ 85 店舗から購入した食肉に由来した。スクリーニング試験では、EGD 株は 10 μ g/ml BC 含有 2%羊血液加ミューラーヒントン培地上で発育しなかったが、633C3 株、772C2 株、868C4 株の 3 株 (1.4%) で発育した。画線培養でも同様の成績が得られ、穿刺培養では β 溶血も観察された。ディスク法において EGD 株では BC 濃度 10² μ g/ml 以上で明瞭な阻止円が形成されたが、633C3 株、772C2 株、868C4 株では 10³ μ g/ml 以上で阻止円が観察され、いずれも濃度依存性であった。微量液体希釈法により EGD 株の MIC は 4 μ g/ml、633C3 株、772C2 株、868C4 株の MIC は 32 μ g/ml であった。また、824C3 株でも MIC は 8 μ g/ml となった。耐性株であったのはいずれも鶏肉由来の分離株で、633C3 株と 779C2 株は、それぞれ 2004 年と 2007 年に分離され、血清型はともに 1/2a であった。これに対して、2018 年に分離された 868C4 株

の血清型は 1/2b であった。633C3 株と 779C2 株を分離した鶏肉は、同一系列であるが店舗・加工場ともに異なっていた。868C4 株を分離した鶏肉は、779C2 株と 633C3 株の 2 株を分離した鶏肉を購入した店舗とは、全く異なる店舗から購入していた。

633C3 株、772C2 株及び 868C4 株の 3 株が BC 耐性株であったことから、BC 耐性 Lm が 2004 年には日本に出現していたことが示された。耐性菌の出現頻度は、1996 年-2007 年の 11 年間は 1.0%で、2017 年 12 月～2018 年 8 月の 9 か月間は 4.5%であったが、2018 年の 1 月に購入した鶏肉から申請者が分離した 824C3 株を入れると後者の出現頻度は 22 株中の 2 株 (9.1%) となり、海外で報告されている 10%に匹敵する出現率となった。流通経路の解析と出現率から BC 耐性 Lm が食品関連の相当範囲に分布していることが推察された。

3. 1 章で検討した食肉の由来を細区分して、地鶏及び銘柄の C 属菌及び L 属菌による汚染状況を HACCP との関係から解析した。HACCP に関する認証制度、地鶏及び銘柄に関する情報や関連法規など必要な情報は、各省庁のホームページ、各種データベースおよびインターネット、電話での直接の聞き取りにより取得した。

L 属菌を検討した流通経路（経路）が 16 経路、C 属菌を検討した経路が 20 経路に分類された。L 属菌では 2 検体以上購入した 13 経路のすべてで汚染が起こっており、特に、6 経路では購入したすべての検体から、また 1 経路では 85.7%の高い割合で L 属菌が分離されが、加工場により汚染率が大きく異なるものもあった。C 属菌も 2 検体以上購入した 15 経路中 13 経路で汚染が起こっており、3 経路では 100%の分離率、別の 3 経路でも 70%以上の高い分離率を示した。これらでは L 属菌の分離率も高かった。2 検体以上を購入した中で L 属菌を検討した地鶏及び銘柄 12 種のうちの 6 種が 100%、銘柄区分の 2 種が 80%の高率で L 属菌に汚染されており、陰性は 2 種だった。同様に 2 検体以上を購入して C 属菌を検討した地鶏と銘柄 17 種のうちの 9 種 (52.9%) が 100%の高率で汚染されており、L 属菌による汚染よりも若干高い割合であった。銘柄区分の 3 種では、すべての検体から L 属菌と C 属菌が分離され、地鶏の 2 種では L 属菌及び C 属菌の両方が 70%以上の汚染率であった。それぞれの経路

では、同種でありながら経路に特有な汚染が認められた。C 属菌及び L 属菌の分離率と認証取得との関係では、それ自体が認証を取得している店舗は無かったが、系列店等で認証取得している店舗や環境への取り組みを行っている店舗は C 属菌の分離率が低い傾向にあった。また、認証取得等の関係の有無に拘わらず、地鶏及び銘柄を取り扱う店舗では C 属菌の分離率が有意に高く、汚染率が低いグループでは無窓飼養のものが多かった。

L 属菌と C 属菌が複合汚染する確率が非常に高いことを示しており、L 属菌が環境細菌であり、C 属菌が鶏の腸管内に広く分布していることと矛盾しない。今回の成績では、流通経路に依存した典型的な汚染例が明らかになり、HACCP 認証取得等に関係していない経路の C 属菌の分離率は高い傾向にある。さらに、HACCP 認証取得等の関係の有無に拘わらず地鶏および銘柄を取り扱う経路では汚染率が高い。農水省による、地鶏農場はブロイラー農場より衛生対策が進んでいないという調査結果および本研究では無窓飼養であるものの汚染率が低い傾向にあったことから、これらの要因が銘柄及び地鶏の両属菌による汚染率の高さに反映されていると考えられた。

以上のように、1 章では市販鶏肉を一般、銘柄及び地鶏に区分して C 属菌と L 属菌の汚染状況を検討して複合汚染の実態を明らかにし、2 章では日本に BC に耐性をもつ Lm が遅くても 2004 年以降は存在していたこと、近年その出現率が上昇していることを、申請者が我が国で初めて明らかにした。さらに 3 章では 1 章で得られた成績をもとに流通経路に依存した汚染を明らかにし、特に、銘柄および地鶏の流通経路及び飼養中の衛生対策の遅れを示唆した。2021 年 6 月からは完全に HACCP が義務化される予定になっていることから、今後は、小規模の地鶏及び地鶏に近い銘柄鶏を扱う流通販売経路に目を向けて、HACCP による衛生管理を強化すべきであろうと申請者は考察した。

本論文は上記のように学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。