

氏名	板野(中村)寛海		
学位の種類	博士(生活科学)		
学位記番号	第4877号		
学位授与年月日	平成18年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者		
学位論文名	細菌性食中毒の原因究明と汚染源探索への分子生物学的手法の適用に関する研究 <i>Clostridium perfringens</i> による食中毒の原因究明と水産加工品の <i>Listeria monocytogenes</i> 汚染源探索への分子生物学的手法の応用		
論文審査委員	主査教授	西川 禎一	副査教授 曾根良昭
	副査教授	小西 洋太郎	

### 論文内容の要旨

食中毒の原因究明には、原因となる病原体を患者と食品の双方から検出し、両者の関連性を科学的に実証することが不可欠である。本研究では、これまでに分子生物学的手法による疫学報告が少ない *Clostridium perfringens*(ウェルシュ菌)による食中毒事件の原因菌究明と、欧米では最も死亡者数の多い食品媒介感染症原因菌として注目されているにもかかわらず、わが国では注目されていなかった *Listeria monocytogenes*(リステリア)による食品の汚染状況とその汚染経路の解明に、分子生物学的手法の応用を試みた。

第1章では、ウェルシュ菌の型別にパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法の応用を試みた。これまで、ウェルシュ菌株間の異同を識別するには抗血清との反応性に基づく型別が用いられてきたが、PFGE法による遺伝子型別を行ったところ、血清型による分類とPFGE法による分類が相関した上に既存の抗血清では型別できない株をも分類できた。ウェルシュ菌の検出に増菌培養法を適用した場合、従来であれば、これらの分離菌株が原因菌であるか腸内常在菌に由来するのか識別できなかった。PFGE法を適用したところ、ウェルシュ菌を原因とする食中毒事例の場合には分離株が患者間で同一遺伝子型を示したことから、食中毒調査に増菌培養法を利用することが可能になった。

第2章では、PFGE法のみならず遺伝子増幅法(PCR法)を用いた種々の分子疫学的手法をリステリアによる食品汚染実態調査に適用した。水産加工品を調べ、分離株を型別したところ、同一製造元由来の製品から分離されるリステリアは、検体や検体採取日が異なる場合でも同一の血清型および遺伝子型を示す傾向が認められ、各施設特有の菌株により製品が汚染されているものと推察された。

第3章では、製品汚染率が特に高く、特定のリステリア菌株による長期的な施設汚染が疑われた一水産加工場について、同施設内のリステリア汚染状況を把握するとともに、施設内分離菌株と製品由来株間の異同を識別し、リステリアの汚染源および汚染経路の推察を試みた。その結果、製造機器、特にスライサーからのリステリアの検出時期が製品の汚染時期と一致していること、両者から分離された菌株の遺伝子型も重複していることが判明した。スライサーを中心に洗浄消毒などの衛生管理を指導したところ、製品の汚染もほとんど消失した。

第4章では、リステリアが同製造施設に定着した理由を調べるため、ステンレスやプラスチックおよびガラス表面への同菌の定着性とバイオフィーム形成能を調べた。その結果、施設から高頻度に分離され、製品汚染を継続してきた菌は高いバイオフィーム形成能を有することを明らかにし、食品製造施設の衛生管理には対象菌株の定着性を考慮する必要性を示唆した。

以上、ウェルシュ菌およびリステリアを対象として、その疫学解析における分子生物学的手法の有用性を検

討した。ウェルシュ菌の病因学的解析においては、PFGE 法を併用することで増菌培養による検査が可能になり、検出率を改善できることを世界で初めて明らかにした。リステリアについては水産加工品の汚染実態を調べ、その高い汚染状況を明らかにするとともに、汚染源および汚染経路の究明において分子生物学的手法による菌株識別が極めて有効であることを示し、調査結果に基づく指導により製品の汚染率を低減した。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、食品衛生学上の最重要課題である細菌性食中毒を研究対象とし、特に事件の原因究明と食品の汚染源探索を目的に最新の分子生物学的手法を取り入れることで、調査能力の飛躍的な改善を図ったものである。本論文は以下の4章から構成されている。

第1章では、学校給食など大型施設で食中毒事件を起こす傾向のあるウェルシュ菌の型別にパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法の応用を試みている。PFGE 法による DNA 型別とウェルシュ菌株間の異同を識別するために従来用いられてきた血清型別による分類を比較し、PFGE 法の識別能力の高さを明確に示した。そして、発病後の日時が経過したために患者便からの菌検出が困難であった1事例において、増菌培養法を適用し83名中54名から毒素産生性のウェルシュ菌を分離し、その75%が同じDNA型であることを根拠に、本事件をウェルシュ菌による食中毒と断定した。従前の定説を覆し、PFGE 法を併用すればウェルシュ菌の分離に増菌培養法の利用も可能となることを明らかにし、優れた実践的研究となっている。

第2章では、欧米において食中毒菌の中で最も多くの死者を出しているリステリアに注目している。分子疫学手法の有用性が明示されたウェルシュ菌の結果に鑑みて、PFGE 法のみならず遺伝子増幅法 (PCR 法) を用いた種々の分子疫学的手法をリステリアによる食品汚染実態調査に適用している。わが国では余り注目されてこなかったリステリアであるが、市販の ready-to-eat 水産加工品を調べ、スモークサーモン等の冷くん製品を中心に13%からリステリアを検出し、分離菌株がヒトへの病原性を有するタイプであることを明確に示している。さらに、PFGE 法などの分子生物学的手法により、食品を汚染している菌が各製造施設に特有であり、リステリア菌株の識別にもこれらの手法が有用であることを証明している。

第3章では、上記の調査を通じて製品汚染率が特に高く、特定のリステリア菌株による長期的な施設汚染が疑われた一水産加工場に立ち入り、同施設内のリステリア汚染状況を把握するとともに、分子生物学的手法を適用して施設内分離菌株と製品由来株間の異同を識別し、リステリアの汚染源および汚染経路を探った。その徹底的な施設内調査の結果、スライサーを製品の汚染場所と特定している。そして、調査結果に基づきスライサーの分解洗浄を指導することで、同施設の製品汚染率を急激に減少させている。また、施設から分離されたリステリアはDNA型別によって計13タイプに分類されたが、ほとんどの菌は3タイプに集中していたことから、これらの優勢種が同工場内に定着して衛生管理上の問題を起こしていることを明らかにしている。

第4章では、上記製造施設に定着したリステリアの特性を明らかにするため、これらの菌株が、ステンレスやプラスチックおよびガラス表面に付着する能力とバイオフィーム形成能を調べている。施設内から分離された77株のリステリアについてバイオフィーム形成能を調べた結果、施設から高頻度に分離され、製品汚染を継続してきたタイプの菌株はバイオフィーム形成能も高いことを見出し、食品製造施設の衛生管理には対象菌株の定着性をも考慮して除菌あるいは消毒方法を検討する必要があると論じている。

上記の成果は、食品衛生学の実践的分野で新たな知見を与え、食中毒調査に優れた成果をあげたものと評価できることから、博士 (生活科学) の学位に値する者と認定した。