

博士論文要旨

氏 名 長谷川 めぐみ ⑩

論文 題目	日本語	我が国の乳牛および肉牛におけるリステリア菌の分子疫学的研究
	英語	Molecular Epidemiological Study on <i>Listeria monocytogenes</i> in Bovine Colostrum and Black Beef Cattle in Japan

【目的】 *Listeria monocytogenes* (LM)は、ヒトを含む多くの動物に病原性を示し、患者由来株の血清型は、1/2a、1/2b、1/2c および 4b が主である。LM による食中毒は髄膜炎、敗血症、流産などを引き起こし、死亡率は約 30%である。アメリカでは、年間約 1,600 人がリステリア症に罹患し、約 255 人が死亡している。一方、我が国では、リステリア症の発生頻度についての統計はなく不明である。また、集団食中毒は、北海道におけるナチュラルチーズの 1 事例のみである。海外では乳および食肉製品が LM による食中毒の主な原因食品と推定されているが、分子疫学的研究は殆ど行われていない。このため、乳牛および肉牛における LM の汚染状況と分離株の分子疫学的性状を解析し、LM を制御するための基礎資料を提供する。

【方法】 北海道の 21 農場よりホルスタイン初乳 210 検体を採取した。北海道、中部および九州の 129 農場より黒毛和牛の新鮮糞便 1,738 検体を採取し、また、各地域の販売店より和牛肉 315 検体を購入した。各検体より LM を分離し、血清型別およびパルスフィールドゲル電気泳動法による遺伝子型別を行い、さらに、流行株 (EC) マーカー遺伝子の保有状況を解析した。初乳および黒毛和牛由来株は薬剤感受性試験を、黒毛和牛および和牛肉由来株はバイオフィーム産生能試験を行った。

【結果】 初乳の 7.6%から LM が分離された。血清型は 1/2b (55%) および 4b (45%) であった。黒毛和牛糞便の 6.0%が陽性であり、北海道、中部および九州の黒毛和牛の保菌率は、それぞれ 11.4、2.8 および 2.9%で、北海道の保菌率は他と比較して有意に高かった。また、血清型は 1/2b (40.5%) が最も多く、次いで、1/2a (36.9%)、4b (21.6%)、4ab (1.0%) の順であった。遺伝子型別の結果、北海道の分離株は遺伝子型が極めて多様で、1 農場から 9 種の遺伝子型の LM が分離された例もあった。市販和牛肉の 7.3% が陽

性であった。血清型は、1/2c (62.6%) が最も多く、次いで 4b (26.1%)、1/2a (11.3%) の順であった。EC マーカー遺伝子を保有する株が、初乳、黒毛和牛および牛肉より分離された。初乳および黒毛和牛由来株には、ヒト症例由来株と遺伝子型が一致する株もあった。初乳および黒毛和牛由来株は、12 種の薬剤に対して感受性であった。牛肉由来の 1/2c は、遺伝子型の多様性が低く、バイオフィーム形成能が高い傾向を示した。また、同じ店舗で 2 および 3 週間隔で購入した牛肉から、相同性の非常に高い遺伝子型の株が、継続して分離された例もあった。

【考察】血清型別および遺伝子型別の結果から、初乳、黒毛和牛および牛肉由来株は、ヒトにリステリア症を発症させる可能性が高いことが示された。北海道の黒毛和牛の保菌率が極めて高く、多様な遺伝子型が肉牛飼養環境に定着していると考えられる。このため、低温環境における LM に対する対策が重要である。EC マーカー遺伝子を保有する株が黒毛和牛および和牛肉から分離されたことは、腸管由来菌が牛肉を汚染し、リステリア症を発症させる可能性が高いことを示している。一方、黒毛和牛と和牛肉由来株の血清型分布が異なることから、腸管内容物以外の汚染源も考えられた。また、同一店舗より継続して相同性の高い LM 株が分離されたことは、和牛肉のスライス・包装工程で、継続汚染した可能性を強く示唆している。

【結論】本研究では、初乳中の LM による汚染状況を初めて明らかにし、安全な初乳製品を製造するための重要なデータを提供した。また、肉牛の LM に関する全国的な調査から、地域による汚染状況および分子疫学的性状の相違を明らかにし、衛生管理方法を策定するための極めて重要な資料を提供した。さらに、今回得られた遺伝子型のデータは、我が国の標準株として、他国由来株との比較を可能にし、食中毒発生の際には、汚染源を推定する極めて重要な資料となり得る。

Introduction

Listeria monocytogenes (LM) is the causative agent of listeriosis, which affects

both humans and animals. Serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b are responsible for most human listeriosis cases. Foodborne illnesses caused by LM cause meningitis, septicemia, and abortion. The mortality rate of listeriosis is approximately 30%. In the United States, human listeriosis affects approximately 1,600 individuals, causing 255 deaths each year. In Japan, no outbreaks of listeriosis have been reported, except for one case of foodborne listeriosis caused by consumption of natural cheese in Hokkaido. Milk and meat-related products have been suggested to be sources of foodborne listeriosis. However, only limited molecular epidemiological data are available in this regard. Therefore, the aim of this study was to determine the prevalence of LM and molecular characteristics of the isolates in dairy and beef cattle in order to provide basic data for the control of LM infection.

Materials and methods

Two hundred and ten samples of bovine colostrum were collected from 21 dairy cattle in Hokkaido; 1,738 samples of feces of healthy black beef cattle were collected from 129 farms in the following three areas: the northern (Hokkaido prefecture), central (Gifu and Mie prefectures), and southern (Oita, Miyazaki, and Kagoshima prefectures) areas. Furthermore, 315 samples of beef meat were collected from retail stores in three areas. LM was isolated from these samples. The LM isolates were serotyped, genotyped, and examined using epidemic clone (EC) markers and PCR. The isolates from bovine colostrum and black beef cattle were examined by antimicrobial susceptibility assays, and the isolates from black beef cattle and beef meat were examined for their ability to form biofilms.

Results

Of the bovine colostrum samples, 7.6% were positive for LM. Serotyping of 80 isolates identified the 1/2b (55%) and 4b (45%) serotypes. Of the black beef cattle fecal samples, 6.0% were positive for LM. The prevalence of LM among feces of black beef cattle for each area was as follows: northern, 11.4%; central, 2.8%; and southern, 2.9%. The prevalence data indicated that the isolation rate in the northern area was significantly higher than that in the central or southern area. Serotyping of the black beef cattle isolates identified 1/2b as the most prevalent serotype (40.5%), followed by 1/2a (36.9%), 4b (21.6%), and 4ab (1.0%). The isolates from the northern farms were genetically diverse compared to those from central and southern farms; nine genotypes were isolated from one farm in the northern area. Of the 315 beef meat samples, 7.3% were positive for LM. Serotyping of beef meat isolates identified 1/2c as the most

prevalent serotype (62.6%), followed by 4b (26.1%) and 1/2a (11.3%). The LM isolates possessing the EC marker were isolated from bovine colostrum, black beef cattle, and beef meat. Furthermore, some genotypes of the isolates from bovine colostrum and black beef cattle were identical to those of human clinical isolates. The isolates from bovine colostrum and black beef cattle were susceptible to 12 antimicrobial agents. The 1/2c isolates from beef meat showed low genetic diversity and had high biofilm-forming ability compared to the other isolates. In the case of the samples collected from one of the retail stores, the same genotype was consistently isolated at two and three week intervals.

Discussion

The results of serotyping and genotyping suggest that the isolates from bovine colostrum, black beef cattle, and beef meat may have high potential to cause human listeriosis. The high prevalence and genetic diversity of the LM isolates in the northern area suggests that LM persists in the environment of black beef cattle reared in that area. In the case of low-temperature environment, further effort is needed to reduce the contamination of pathogenic bacteria, such as LM, which can multiply at low temperatures. ECI strains were isolated from beef and beef cattle. Gut bacteria from beef cattle might be the contaminant source and can cause human listeriosis. Meanwhile, the serotype distribution of beef meat isolates differed from that of black beef cattle isolates, which suggests that there might be a contamination source of LM other than the intestinal content of black beef cattle. LM clones, of high genotypic similarity, were consistently isolated from the same retail store, suggesting that the beef meat was contaminated during the processes of slicing or packaging.

Conclusion

This novel study revealed the prevalence of LM in the bovine colostrum and provided crucial data that can be used to increase the safety of bovine colostrum products. Examination of LM isolates from beef cattle across Japan revealed a difference in prevalence and molecular characteristics among various areas and provided important data for hygienic management. Furthermore, genotyping data, which were obtained in this study, can be used in comparisons of data from other countries and could be critical for determining the source of foodborne listeriosis.