

## 論文の内容の要旨

論文題目 豚丹毒菌国内臨床分離株の遺伝学的解析

氏 名 白岩 和真

豚丹毒菌 *Erysipelothrix rhusiopathiae* は、通性嫌気性、グラム陽性、細胞内寄生性の桿菌で豚丹毒の起因菌である。本菌は自然界に広く分布し、ヒトを含む多くの哺乳類や鳥類などに疾病をもたらす。本菌の血清型は、細胞壁由来の耐熱性抗原と参考株に対する高度免疫家兎血清を用いた寒天ゲル内沈降反応によって、1 (1a、1b)、2、4、5、6、8、9、11、12、15、16、17、19、21、23 型とその抗原を欠く N 型に分類される。病豚から分離される菌の血清型の多くは 1 型と 2 型であり、特に、急性型の症例からは 1a 型、慢性型の症例からは 2 型の菌が多く分離されるが、その理由は分かっていない。本菌の最も重要なレセルボアである豚の臨床症状は多様で、急性敗血症、亜急性蕁麻疹、慢性関節炎及び心内膜炎がある。豚丹毒は、養豚産業に多大な損害を与えることが多く、豚及びイノシシでの本症は、家畜伝染病予防法において届出伝染病に指定されている。本病は依然として全国的に発生が多く、年間の届出件数は 2,000 頭前後であるが、2008 年以降は増加傾向にある。その要因として、ワクチン接種率の低下が考えられている。また、近年の急性型症例において、表層防御抗原 (SpaA) の 203 番目のアミノ酸がメチオニン、257 番目がイソロイシン (M203/I257-SpaA) という特徴を有する株の分離が多く、この特徴と病原性との関連は不明である。

一方、慢性型では、接種した生ワクチンに起因すると疑われる関節炎の発生が問題になっている。豚丹毒生ワクチン (Koganei 65-0.15 株、以下、Koganei 株と記す) は、血清型 1a 型のアクリフラビン色素耐性の標識マーカーを持つとされる弱毒株を用いて作製される。Koganei 株のアクリフラビン耐性及び弱毒化機構は不明であり、この株を識別するために利用できる遺伝子マーカーは存在しない。したがって、血清型 1a 型の場合、Koganei 株と野生株とを区別することは困難である。

本研究では、国内における豚丹毒の発生要因の解明を目的とし、Koganei 株をはじめ、国内で流行している株を簡便かつ特異的に識別する方法の開発を試みた。また、開発した方法を用いて、国内臨床分離株の遺伝子型を調べた。

第一章では、生ワクチンに用いている Koganei 株を確実に識別できる簡易 PCR 法の開発を試みた。まず、豚丹毒菌で唯一完全配列が報告されている Fujisawa 株との比較ゲノム解析によって、Koganei 株のドラフトゲノム配列中から Koganei 株に特異的な塩基置換を同定した。次に、同定された 76 個の塩基置換の中から、5 個の塩基置換を標的として、これらの塩基置換部位を含む各 DNA 断片のみが増幅されるように 5 組のプライマーセットを設計した。この 5 組のプライマーセットを用いて野外で分離された血清型 1a、1b、及び 2 型菌 55 株の遺伝子型を解析ところ、血清型 1a 型菌のうちこれまでの疫学情報から生ワクチン株であると推定された 15 株は、5 組すべてのプライマーセットで PCR 陽性であった。一方、Koganei 株とは遺伝子型が異なる血清型 1a 型菌 11 株及び血清型 1b 型菌 10 株、2 型菌 19 株では、DNA 断片の増幅が認められなかった。これらの結果から、プライマーの設計に利用した塩基置換は、SNP (Single Nucleotide polymorphism) として利用できることが判明し、本 PCR 法は、国内臨床分離株について生ワクチンに由来する株と野生株とを識別する手法として利用できると考えられた。

さらに、生ワクチンを使用している養豚場において 2014 年から 2016 年の 3 年間に東北から九州までの 8 地域、10 県で関節炎あるいは心内膜炎を発症した豚から分離された 155 株を用いて寒天ゲル内沈降反応により血清型を同定し、その後、開発した PCR 法により遺伝子型を調べた。その結果、血清型 1b または 2 型菌と判定された計 52 株では、DNA 断片の増幅が認められなかったが、血清型 1a 型と同定された 103 株のうち 101 株は 5 組すべてのプライマーセットで PCR 陽性を示したことから、これらの株は Koganei 株と同定された。また、これら 101 株を用いて、アクリフラビン色素耐性試験を実施した結果、97 株は耐性であったが、4 株は感受性であった。この結果から、野外で分離される Koganei 株にはアクリフラビン色素耐性を示さない株もあることが初めて明らかとなった。

第二章では、国内で急性型豚丹毒を発症した豚に由来する菌株について全ゲノム配列情報に基づく系統解析を行った。まず、1990 年から 2011 年の間に分離された血清型 1a 型菌 34 株と Fujisawa 株及び生ワクチン Koganei 株を用いてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を実施した。その結果、Koganei 株は臨床分離株とは異なる泳動パターンを示したが、臨床分離株間では菌株の分離年、分離地域及び泳動パターンとの間に関連性は認められなかった。このため、これらの国内臨床分離株と近年、中国で分離された 2 株を加えて全ゲノム解析を行い、

得られたゲノムワイドな塩基置換データを基に系統樹を作成した。その結果、国内で分離された34株は、Koganei株（クラスターIII）とは異なる3つの集団（I・II・IV）に属していたが、特に2007年以降に出現した株は、それ以前の分離株とは異なる集団（IVb）を形成することが判明した。また、これら近年の流行株はさらに九州分離株（IVb-1）と本州分離株（IVb-2）の2つの亜集団に分かれ、中国株のうち1株は、IVb-2に属することも明らかとなった。以上の結果から、2007年以降、国内で発生している急性型の本症は、九州と本州でそれぞれに発生した株によること、また、本州で急性型発症豚から分離された豚丹毒菌は、中国株と共通の祖先に由来することが考えられた。

第三章では、国内の豚丹毒菌臨床分離株について、現在の流行株を検出し、他の亜集団と区別できるマルチプレックスPCR法の開発を試みた。まず、IVbに属する株に共通する塩基置換、また、九州型と本州型のそれぞれに共通の塩基置換を標的とし、これらの塩基置換配列を含む遺伝子断片が増幅される3組のプライマーセットを設計した。そして、このプライマーセットを用いてPCRを行い、国内臨床分離株及び*E. tonsillarum*を含む血清型参考株等、*Erysipelothrix*属菌127株の遺伝子型を解析した。その結果、血清型1a型菌のうち現在の国内流行株である36株は複数のDNA断片が増幅され、亜集団が区別された。一方、現在の国内流行株とは遺伝子型が異なる血清型1a型菌16株及び他の血清型菌と他種の菌、計75株では遺伝子断片の増幅が認められなかったことから、本PCR法の特異性は100%であった。

本研究により、生ワクチンKoganei株を特異的に検出するPCR法が開発され、Koganei株と野生株とを迅速かつ簡便に識別することが可能になった。また、本PCR法を用いた遺伝子型解析の結果から、多くの慢性型豚丹毒の症例において、Koganei株がその原因菌となっていることが明らかとなった。一方、急性型の症例は、九州と本州でそれぞれ新しく出現した株によるものであることが示唆された。さらに、本研究で開発したマルチプレックスPCR法は、現在の国内流行株とその亜集団を簡単に識別できることから、全ゲノム解析の簡易代替法として、優れていると考えられた。本研究で得られた一連の知見は、家畜保健衛生所や食肉衛生検査所等での疫学的解析に役立つと期待される。