

審査の結果の要旨

氏名 白岩 和真

豚丹毒菌 *Erysipelothrix rhusiopathiae* は豚丹毒の起因菌であり、豚をはじめ、多くの哺乳類や鳥類などに疾病をもたらす。本症を発症した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、その理由は不明である。豚における臨床症状としては、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から、豚及びイノシシ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。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血清型 1a 型菌の分離が多くの県で報告されている。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) は、血清型が 1a 型でアクリフラビン色素耐性の標識マーカを持つ弱毒株を用いて作製されているが、アクリフラビン耐性及び弱毒化の機構は不明であり、この株を識別するための遺伝子マーカも存在しない。申請者は、国内における豚丹毒の発生要因解明を目的とし、Koganei 株及び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を開発した。また、この方法を用いて国内臨床分離株の遺伝子型を解析した。

第一章では、Koganei 株を確実に識別できる簡易 PCR 法の開発方法とその応用が述べられている。Koganei 株のドラフトゲノム配列の中から本株に特異的な一塩基多型 (SNP) を同定し、この SNP のうち 5 個を標的として、これらの SNP 配列を含む各 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が設計された。これらのプライマーセットを用いて野外で分離された豚丹毒菌が解析され、Koganei 株の DNA のみが増幅されたことから、本 PCR 法は国内臨床分離株について生ワクチン由来 Koganei 株と野生株とを識別する手法として利用できることが明らかとなった。さらに、東北から九州までの 8 地域、10 県の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 年間に関節炎あるいは心内膜炎を発症した豚から分離された豚丹毒菌 155 株を用いてより詳細な解析が行われた結果、101 株 (65.2%) は Koganei 株と同定された。このことより多くの慢性型症例において、Koganei 株はその原因菌であると結論づけられている。

第二章では、国内で急性型豚丹毒を発症した豚由来株 34 株と中国で分離された 2 株について全ゲノム解析が行われ、得たゲノムワイドな SNPs 情報を基に系統樹が作成された。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、このうち 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）を形成し、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ていた。中国分離株のうち 1 株は、本州分離株と同じ IVb-2 に属していた。以上の結果から、2007 年以降に国内で発生している急性型の豚丹毒は九州と本州でそれぞれに別個に発生した株によること、本州分離株は中国株と共通の祖先に由来することを明らかにしている。

第三章では、国内の豚丹毒菌臨床分離株から現在の流行株を検出し、さらに、亜集団と区別できるマルチプレックス PCR 法の開発が試みられている。IVb 株に共通する SNP 配列、九州型（IVb-1）または本州型（IVb-2）に特異的な SNP 配列を含む DNA 断片のみが増幅される 3 組のプライマーセットが設計された。これらのプライマーセットを用いて、国内臨床分離株及び血清型参照株（*E. tonsillarum*）を含む *Erysipelothrix* 属菌 127 株の遺伝子型が解析された。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、亜集団も区別された。一方、現在の国内流行株とは異なる集団に属する血清型 1a 型菌、および他の血清型菌及び他種の菌、計 91 株では DNA 断片の増幅が認められなかった。以上のことから、本 PCR 法は血清型の判定および全ゲノム解析を行わずに血清型 1a 型の国内流行株を検出することが可能であり、亜集団も識別できる簡易かつ高精度な遺伝学的解析法であると結論づけている。

以上のように、申請者が一連の研究により開発した解析法は、現在、生ワクチンに用いられている Koganei 株と国内流行株とを簡便に識別でき、全ゲノム解析の代替法として広く利用できると考えられ、特に家畜保健衛生所や食肉衛生検査所等の現場における疫学的解析に役立つと期待される。本研究の成果は、学術上応用上寄与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）の学位論文として価値あるものと認めた。