

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 内田 英里

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析法 (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry: MALDI-TOF MS) を用いた細菌同定法は、細菌を構成するタンパク質を質量分析法により測定し、得られた測定データを参照データベースと照合することで菌種を同定する方法で、従来法に比べ迅速、簡便で、ランニングコストが低い利点がある。獣医領域でも導入が進められているが、本手法の参照データベースはヒト病原細菌を中心に構築されており、動物の病原細菌における有用性や同定の正確性について不明な点が多い。ウマにおいては、監視伝染病の診断や、個体診療における病態把握および抗菌薬選択を目的として、病原細菌の迅速かつ正確な同定が求められる。このような背景から申請者は、MALDI-TOF MS を用いたウマ由来細菌の同定法の研究を行なった。

第1章では、MALDI-TOF MS を用いた市販の同定システム (MALDI Biotyper) を用いて、ウマおよびウマ環境から分離された細菌 3724 株の同定を行なった。その結果、MALDI-TOF MS を用いて菌種レベルで同定可能だった株は 86.2%、属レベルでは 8.3%、同定不可だった株は 5.5%であり、ヒト由来株や家畜由来株に関する過去の報告と遜色ないことから、MALDI-TOF MS はウマ由来細菌の同定に十分活用可能である、としている。一方、一部の細菌株では菌種レベルでの同定ができない株が多く、また菌種レベルで同定された株のうち 113 株では、複数の菌種が結果として提示され、課題も示されたとしている。

第2章では、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では菌種レベルでの同定ができなかった 515 株について 16S rRNA 系統解析を行い、これらの菌種の特徴を検討している。その結果、MALDI-TOF MS では同定ができないものの、16S rRNA 系統解析では菌種レベルでの同定が可能だった 273 株には、*Taylorella equigenitalis* (93 株) や *Rhodococcus equi* (41 株) が多く含まれていた。*T. equigenitalis* と *R. equi* は、それぞれ馬伝染

性子宮炎と子馬の敗血症の原因菌として、ウマにおいて重要な病原細菌であるが、MALDI-TOF MS の参照データベースにはウマ由来細菌の情報不足が見られたとしている。

第 3 章では、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法で複数の菌種が提示された株のうち、*Enterobacter* 属菌および *Actinobacillus* 属菌について追加検索を行なった。MALDI-TOF MS で *Enterobacter* 属菌と同定された 30 株について、多座配列解析 (multilocus sequence analysis: MLSA) 法を実施した結果、MALDI-TOF MS の同定結果と一致した株は 11 株中 7 株であった。MALDI-TOF MS で *Actinobacillus* 属菌と同定されたウマ由来株 51 株について、16S rRNA 系統解析、毒素遺伝子の検索および CAMP 試験を行い、菌種同定を行った結果、MALDI-TOF MS での同定結果と一致したものは 30 株にとどまった。このことから、ウマ由来 *Enterobacter* 属菌および *Actinobacillus* 属菌については、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法のみでは菌種同定が困難で、その原因として、菌種同士が遺伝的に近縁であること、参照データベースが不足していることが考えられた、としている。

第 4 章では、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法では菌種同定に至らず、第 2 章および第 3 章で追加検索を行なった 282 株を用いて、新規データベースを作成した。さらに、既存のデータベースでは同定ができなかったウマ由来株 92 株について、新規データベースを用いて同定した結果、同定株数の増加 (92 株中 16 株) および同定スコア平均値の上昇 (1.64 から 1.77) が認められた。これらの新規データベースは、ウマ由来細菌の同定精度向上に貢献する、としている。

本研究は、MALDI-TOF MS を用いた細菌同定法により、ウマ由来細菌の大部分が同定可能であることを示し、また同定が困難であった株の解析を踏まえ、新規で作成したウマ由来細菌のデータベースにより、本手法の改善を行ったもので、ウマ由来細菌の迅速かつ正確な菌種同定に寄与すると考えられた。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (獣医学) の学位請求論文として合格と認められる。