

## 審査の結果の要旨

氏名 新井 沙倉

平成28年1月8日東京大学において、主査および4名の審査員の前で、申請者が提出した論文内容についての発表を行い、質疑応答を経て、その内容を審査した。その結果は以下の通りである。

提出論文は、人獣共通感染症の病原体である豚レンサ球菌（学名 *Streptococcus suis*）による食肉汚染を防止するため、農場から食卓に至るまでの全てのフードチェーンを検査するための本菌の遺伝子検出法を開発し、その方法を用いて市販豚肉から豚レンサ球菌遺伝子を検出すること、検出された豚レンサ球菌を定量して、その危険度判定に有用な情報を得るための一連の研究過程を論じたものである。

豚レンサ球菌には、1~34 および 1/2 の 35 種類の血清型が報告されていた。しかし、近年、このうち 32 と 34 型が既報の *Streptococcus orisratti* であること、20、22、26 型が新菌種 *Streptococcus parasuis* に再分類されたこと、そして、33 型についても別菌種にすべきとの論文が発表された。従って、残る 29 の血清型だけを豚レンサ球菌(*S. suis*)と呼ぶべき状況にある。本論文の第1章では、この分類に関する再評価を踏まえた上で、豚レンサ球菌の 29 の血清型だけを検出するために、ゲノム上の *recN* 遺伝子を標的とする PCR 法 (*recN*PCR) を開発した。そして、その特異性と感度を既報の2つの PCR 法と比較したところ、既報の手法の一つでは分類再評価により豚レンサ球菌からは外れる菌種でも陽性となったが *recN*PCR では豚レンサ球菌のみを検出できた。また、もう一つの手法では、血清型によって感度が低くなるものもあったが、*recN*PCR では安定した感度を示し、開発した方法の優位性が示された。本法は、技術的には既に農場での疾病対策に応用されていることから、農場の清浄化を図る方法として高い利用価値が認められると考えられた。

第2章では、PCR 法よりもさらに感度と特異性に優れる LAMP 法を応用すべく、上述の豚レンサ球菌の分類再評価を踏まえて *recN* 遺伝子を標的とした LAMP<sub>SS</sub> を開発した。そして、上述と同様な特異性と1反応当たり 5.4 colony forming unit となるきわめて高い感度を確認した。この方法を用いて、市販

豚肉・豚内臓肉 966 検体について豚レンサ球菌の遺伝子検査を実施した。その結果、内臓肉ではいずれも 50%以上の陽性率を示し、豚肉でも 7~58%の陽性率を示した。検体中の総菌数と豚レンサ球菌検出率とに相関はなく、店舗による検出率の相違が著しく、店舗内で豚内臓肉に含まれる豚レンサ球菌が豚肉に二次汚染したものと推測された。LAMP<sub>SS</sub> 陽性検体については、ヒトに高い病原性を示す血清型 2 型特異的な既報の LAMP 法も実施し、そこでも陽性になった検体については、レプリカプレート法を取り入れた新しい手順で菌分離を行った。その結果、血清型 2 型を含む総計 149 株の豚レンサ球菌を分離した。血清型 2 型の分離株は、遺伝子型別の結果、過去にヒトの感染例がある ST28 であることが確認でき、市販の豚肉・内臓肉がヒトに危害を加える可能性のある菌に汚染されていることを明らかにした。

第 3 章では、豚レンサ球菌の正確な菌数測定が可能な定量的 real-time PCR (qPCR<sub>SS</sub>)を開発した。さらに生菌のみを検出する処理を加えて、検体中に含まれる豚レンサ球菌の推定生菌数を求めた。豚肉では、定量限界以下の生菌数しか検出されないものもあったが、内臓肉では肉汁 1ml 当たり 10,000 以上の豚レンサ球菌生菌を検出するものもあった。一方、凍結融解による影響では、4 回繰り返しても 1/4 の生菌が残った。これらの成績より、食肉加工中の内臓肉の処理過程で、豚肉への汚染の可能性があるとともに、加工作業者への感染にも注意する必要があることが示された。

以上の研究によって、農場から食肉加工工程において豚レンサ球菌による汚染を防止するための技術開発の推進に資する成果を得ることが出来た。これらの研究成果は、本論文が新たな研究分野を開拓したことを示すもので、今後の研究の更なる発展に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。