

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 平田 綾子

学 位 の 種 類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第4項に該当

学位論文の題目 わが国の豚由来 *Actinobacillus pleuropneumoniae* に関する疫学的研究

審 査 委 員

主査 教授 菊池 直哉（獣医細菌学）

副査 教授 田村 豊（食品衛生学）

副査 教授 永幡 肇（獣医衛生学）

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

細菌感染症において、治療には抗菌剤が、予防にはワクチンが応用されている。治療・予防を効果的に実施するためには原因菌の疫学情報が必須である。本研究では豚胸膜肺炎の原因菌である *Actinobacillus pleuropneumoniae* の血清型、薬剤感受性、遺伝子型などの疫学的解析を行った結果、本感染症の予防・治療のための有用な情報を得ることが出来た。

研究の背景と目的

Actinobacillus pleuropneumoniae (以下、*A. pleuropneumoniae*) は、豚胸膜肺炎の起因菌であり、現在、莢膜多糖体の抗原性により、15種類の血清型に分類される。豚胸膜肺炎の予防薬として、不活化ワクチンが市販されているが、これらの不活化ワクチンは血清型特異的で特定の血清型の発症予防を効能および効果として示している。また、発症豚に対する治療としては、抗菌剤の投与が一般的に行われており、当該疾病の発症予防や治療には、*A. pleuropneumoniae* の疫学情報が重要である。これら *A. pleuropneumoniae* の効果的な制御に必要とされる疫学情報を得るために、日本で分離された本菌の血清型、薬剤感受性、tet 遺伝子の検出、PFGE 解析、血清型別不能株 (以下、UT 株) の再血清型別及び性状解析を実施した。

研究の成果

第I章では1999年から2000年および2002年から2005年に分離された *A. pleuropneumoniae* の血清型を調査し、1986年から1987年に分離された株を含めて、血清型の推移を調べた。その結果、調査年を通して、血清型2型の分離が多く、次いで1型、5型が分離された。2003年および2004年においては、新しい血清型の15型株が分離された。また、2002年から2005年分離株は、1986年から1987年分離株と比較してUT株が有意に増加したことが明らかとなった。

第II章では1999年から2000年に分離された *A. pleuropneumoniae* について、21薬剤に対する感受性を測定すると共に、1986～87年分離株について、当時供試しなかった15薬剤を加え評価した。さらに2002年から2005年に分離された *A. pleuropneumoniae* についても10薬剤に対する感受性を測定しその推移を調べた。その結果、1999年から2000

年分離株は、1986年から1987年分離株と比べて、ペニシリン系薬剤、オキシテトラサイクリン、クロラムフェニコール系薬剤に対する耐性株の出現頻度が有意に ($p<0.01$) 増加していることが認められた。分離年に拘らずセフトオフル、フロルフェニコールおよびフルオロキノロン系薬剤に高い感受性を示したが、1999年から2000年分離株において、フルオロキノロン系薬剤に耐性を示す株が観察された。一方2002年から2005年分離株は1999年から2000年分離株のそれと比較してペニシリン系薬剤、OTC および TP の耐性率が有意に減少していたことが明らかとなった ($p<0.01$)。耐性率の変化については、2002年から2005年分離株はペニシリン系薬剤、OTC および TP に耐性傾向のある血清型1型株の分離率の減少が影響していると考えられた。

第Ⅲ章では、第Ⅱ章で *A. pleuropneumoniae* の OTC に対する耐性率が他の薬剤と比較して高かったことから、1986年から2005年に分離された OTC 耐性株について tet 遺伝子の検出と PFGE による分子疫学調査を行った。検出された tet 遺伝子は、tet(A)、tet(B)、tet(H)および tet(O)であったが、tet(B)遺伝子が最も多く、次いで tet(H)遺伝子が多く検出された。分離株の多い血清型2型と5型について PFGE 解析を行ったところ、主要な PFGE 型は2型および5型でそれぞれ20年間変化は認められなかった。2型および5型において、tet(B)遺伝子陽性株と陰性株では、PFGE 型が異なることが判明した。1999年から2000年分離株の OTC 耐性2型株は、他の分離年とは異なる PFGE 型が分布していたことが明らかになった。また、血清型5型株は、どの年代においても、OTC 単剤耐性が多く、保有している tet 遺伝子も tet(B)遺伝子のみであったので、クローナルな株の存在が推察されたが、PFGE により複数の PFGE 型の株が分布していることが判明した。

第Ⅳ章においては、近年増加している UT 株について、スライド凝集反応及びマルチプレックス PCR により再血清型別を行った。これらの方法により UT 株は血清型1型、2型及び15型に分類可能であった。寒天ゲル内沈降反応での血清型別不能の要因として、血清型1型株と15型株は、抗原抽出過程における加熱処理が血清型別抗原に影響していることが示唆された。一方血清型2型株は、加熱処理の影響を受けないことが示唆された。寒天ゲル内沈降反応で型別可能株と不能株の抗原性の違いと遺伝子型との関連性について検討するために、血清型2型と血清型15型を用いて PFGE を実施した。血清型2型の PFGE 型と再血清型別により2型となった株の優勢な PFGE 型は同一であり、抗原性の違いが PFGE 型に反映されないことが明らかとなった。

本研究により日本で伝播している血清型の多くは血清型1型、2型及び5型であり、これら血清型に対するワクチンは製造されている。したがって、流行している血清型に対するワクチンを使用することで、発症予防が可能であると考えられた。薬剤感受性の結果、*A. pleuropneumoniae* は、OTC に対しては、高い耐性率を示したが、胸膜肺炎の治療薬として承認されている FF、CTF 及びフルオロキノロン系薬剤に対して高い感受性を示したので、これら抗菌剤による治療が有効であると考えられた。遺伝子型の解析により、血清型2型および5型株は約20年間において優勢な PFGE 型には変化はなかったが、1999

年以降の株については優勢な PFGE 型とは異なる型を示す株が出現していることが確認された。寒天ゲル内沈降反応で UT 株をスライド凝集反応及びマルチプレックス PCR により再血清型別した結果、血清型 1 型、2 型及び 15 型に型別された。このことにより、従来の寒天ゲル内沈降反応では、型別不能株が存在することが判明した。

研究の評価

以上より、本研究により明らかとなった *A. pleuropneumoniae* の血清型、薬剤感受性及び遺伝子型の推移並びに抗原性の異なる株の存在の情報は、我が国の豚において、損耗が大きい呼吸器疾患の主要な位置を占める豚胸膜肺炎のワクチンによる防御や抗菌性物質による治療の一助になると考えられ、本研究は *A. pleuropneumoniae* 感染症の予防と治療に貢献するものと考えられる。

以上のことから、平田綾子氏は、博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員 3 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2016年6月15日

審査委員

主査	教授	菊池	直哉
副査	教授	田村	豊
副査	教授	永幡	肇

わが国の豚由来 *Actinobacillus*
pleuropneumoniae に関する疫学的研究

(論文要旨)

獣医細菌学

平田 綾子

学位論文要旨

わが国の豚由来 *Actinobacillus pleuropneumoniae* に関する疫学的研究

平田 綾子

Actinobacillus pleuropneumoniae (以下、*A. pleuropneumoniae*) は、豚胸膜肺炎の起因菌であり、現在、莢膜多糖体の抗原性により、15 種類の血清型に分類される。豚胸膜肺炎の予防薬として、不活化ワクチンが市販されているが、これらの不活化ワクチンは血清型特異的で特定の血清型の発症予防を効能および効果として示している。また、発症豚に対する治療としては、抗菌剤の投与が一般的に行われており、当該疾病の発症予防や治療には、*A. pleuropneumoniae* の疫学情報が重要である。これら *A. pleuropneumoniae* の効果的な制御に必要とされる疫学情報を得るために、日本で分離された本菌の血清型、薬剤感受性、*tet* 遺伝子の検出、PFGE 解析、血清型別不能株 (以下、UT 株) の再血清型別及び性状解析を実施した。

第 I 章では 1999 年から 2000 年および 2002 年から 2005 年に分離された *A. pleuropneumoniae* の血清型を調査し、1986 年から 1987 年に分離された株を含めて、血清型の推移を調べた。その結果、調査年を通して、血清型 2 型の分離が多く、次いで 1 型、5 型が分離された。2003 年および 2004 年においては、新しい血清型の 15 型株が分離された。また、2002 年から 2005 年分離株は、1986 年から 1987 年分離株と比較して UT 株が有意に増加したことが明らかとなった。

第 II 章では 1999 年から 2000 年に分離された *A. pleuropneumoniae* について、21 薬剤に対する感受性を測定すると共に、1986～87 年分離株について、当時供試しなかった 15 薬剤を加え評価した。さらに 2002 年から 2005 年に分離された *A. pleuropneumoniae* についても 10 薬剤に対する感受性を測定しその推移を調べた。その結果、1999 年から 2000 年分離株は、1986 年から 1987 年分離株と比べて、ペニシリン系薬剤、オキシテトラサイクリン、クロラムフェニコール系薬剤に対する耐性株の出現頻度が有意に

($p<0.01$ 、 χ^2 検定) 増加していることが認められた。分離年に拘わらずセフチオフル、フロルフェニコールおよびフルオロキノロン系薬剤に高い感受性を示したが、1999 年から 2000 年分離株において、フルオロキノロン系薬剤に耐性を示す株が観察された。一方 2002 年から 2005 年分離株は 1999 年から 2000 年分離株のそれと比較してペニシリン系薬剤、OTC および TP の耐性率が有意に減少していたことが明らかとなった ($p<0.01$)。耐性率の変化については、2002 年から 2005 年分離株はペニシリン系薬剤、OTC および TP に耐性傾向のある血清型 1 型株の分離率の減少が影響していると考えられた。

第Ⅲ章では、第Ⅱ章で *A. pleuropneumoniae* の OTC に対する耐性率が他の薬剤と比較して高かったことから、1986 年から 2005 年に分離された OTC 耐性株について *tet* 遺伝子の検出と PFGE による分子疫学調査を行った。検出された *tet* 遺伝子は、*tet*(A)、*tet*(B)、*tet*(H) および *tet*(O) であったが、*tet*(B) 遺伝子が最も多く、次いで *tet*(H) 遺伝子が多く検出された。分離株の多い血清型 2 型と 5 型について PFGE 解析を行ったところ、主要な PFGE 型は 2 型および 5 型でそれぞれ 20 年間変化は認められなかった。2 型および 5 型において、*tet*(B) 遺伝子陽性株と陰性株では、PFGE 型が異なることが判明した。1999 年から 2000 年分離株の OTC 耐性 2 型株は、他の分離年とは異なる PFGE 型が分布していたことが明らかになった。また、血清型 5 型株は、どの年代においても、OTC 単剤耐性が多く、保有している *tet* 遺伝子も *tet*(B) 遺伝子のみであったので、クローナルな株ではないかと考えられたが、PFGE により複数の PFGE 型の株が分布していることが判明した。

第Ⅳ章においては、近年増加している UT 株について、スライド凝集反応及びマルチプレックス PCR により再血清型別を行った。これらの方法により UT 株は血清型 1 型、2 型及び 15 型に分類可能であった。寒天ゲル内沈降反応での血清型別不能の要因として、血清型 1 型株と 15 型株は、抗原抽出過程における加熱処理が、血清型別抗原に影響していることが示唆された。一方血清型 2 型株は、加熱処理の影響を受けないことが示唆された。寒天ゲル内沈降反応で型別可能株と不能株の抗原性の違いと遺伝子型との関連性について検討するために、血清型 2 型と血清型 15 型を用いて PFGE を実施し

た。血清型 2 型の PFGE 型と再血清型別により 2 型となった株の優勢な PFGE 型は同一であり、抗原性の違いが PFGE 型に反映されないことが明らかとなった。

本研究により日本で伝播している血清型の多くは血清型 1 型、2 型及び 5 型であり、これら血清型に対するワクチンは市販されている。流行している血清型に対するワクチンを使用することで、発症予防が可能であると考えられた。薬剤感受性の結果、*A. pleuropneumoniae* は、OTC に対しては、高い耐性率を示したが、胸膜肺炎の治療薬として承認されている FF、CTF 及びフルオロキノロン系薬剤に対して高い感受性を示したので、これら抗菌剤による治療が有効であると考えられた。遺伝子型の解析により、血清型 2 型および 5 型株は約 20 年間に於いて優勢な PFGE 型には変化はなかったが、1999 年以降の株については優勢な PFGE 型とは異なる型を示す株が出現していることが確認された。寒天ゲル内沈降反応で UT 株をスライド凝集反応及びマルチプレックス PCR により再血清型別した結果、血清型 1 型、2 型及び 15 型に型別された。このことにより、従来の寒天ゲル内沈降反応では、型別出来ない株が存在することが判明した。

以上より、本研究により明らかとなった *A. pleuropneumoniae* の血清型、薬剤感受性及び遺伝子型の推移並びに抗原性の異なる株の存在の情報は、我が国の豚において、損耗が大きい呼吸器疾患の主要な位置を占める豚胸膜肺炎のワクチンによる防御や抗菌性物質による治療の一助になると考えられ、本研究は *A. pleuropneumoniae* 感染症の予防と治療に貢献しうるものと考えられる。