

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 玉村 雪乃

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 牛由来 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium
に関する分子疫学的研究

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）

副査教授 小岩 政照（生産動物内科学Ⅱ）

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。

なお、論文題目名について、当初は「牛由来 *Salmonella* Typhimurium に関する分子疫学的研究」であったが、正確な菌種名を使用すべきとの指摘により、「牛由来 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium に関する分子疫学的研究」に題目名を修正した。

研究の背景と目的

牛サルモネラ症は様々な血清型のサルモネラに起因する感染症であり、発症牛は下痢、肺炎、重症例では敗血症を呈し死亡する。北海道においては、以前は子牛を中心として発生が認められていたが、近年では成牛、特に搾乳牛における発生が多く、酪農現場で問題となっている。搾乳牛のサルモネラ症増加の一因として飼養環境の変化が挙げられているが、一方で分離される菌株の性状に変化があることも報告されており、分離菌株の詳細な解析が必要と考えられる。本研究では、北海道で分離された牛由来 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S.* Typhimurium) の遺伝学的性状とその変遷を明らかにすることを目的として、過去約30年間にわたって分離された菌株について分子疫学的手法を用いて解析した。さらに、一発生事例の疫学的調査を遺伝子型等の分子疫学解析結果を集積したデータベースを用いて実施し、その有用性について検証した。加えて、近年分離された主な流行型株が産生する毒素の性状や薬剤耐性因子に関する解析を実施した。

研究の成果

- 1) パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) により 545 株の *S.* Typhimurium を 9 つの遺伝子型 (I ~ IX) に分類し、搾乳牛のサルモネラ症が増加したとされる 1992 年以降に I 型、2002 年以降に VII 型が増加したことを明らかにした。I 型にはフェージ型 DT104 が含まれており、一方 VII 型は薬剤耐性病原性プラスミドを共通に保有していた。さらに代表株を Multi-locus variable number tandem repeats analysis (MLVA) により解析した結果、4 つの MLVA クラスター (A ~ D) が形成され、MLVA クラスター A は PFGE I 型、MLVA クラスター C は PFGE VII 型で構成されたことから、PFGE I 型および VII 型はそれぞれ遺伝学的に近縁な株で構成されることが明らかとなった。

- 2) 北海道内の一酪農場において発生した牛サルモネラ症の分子疫学調査を実施した。当該農場で分離された9株の *S. Typhimurium* を解析した結果、最後に分離された1株 (RG08-5株) を除き全株が同一の PFGE プロファイルおよび類似した MLVA プロファイルを示し、2種類のクローン由来株による流行が示唆された。
- 3) DT104が保有することが報告されている百日咳毒素様蛋白遺伝子 *artA/artB* (*artAB*) の *S. Typhimurium* における保有状況とその遺伝子産物の性状を解析した。PFGE I型菌の98%が当該遺伝子を保有しており、遺伝子産物である ArtA/ArtB (ArtAB) は百日咳毒素と同様にAユニット1つとBユニット5つで構成されることを明らかにした。精製した ArtAB をマウスの腹腔内に接種すると致死活性が認められ、ArtAB が *S. Typhimurium* における新たな病原因子である可能性が示唆された。
- 4) PFGE VII型菌が保有するプラスミドの構造を解析した。VII型菌が共通に保有する薬剤耐性病原性プラスミド pYT1、pYT2 の全塩基配列を決定した結果、*S. Typhimurium* の血清型特異的病原性プラスミドに、5薬剤に対する耐性遺伝子群を含む領域が挿入されて構成されることが明らかとなった。pYT2 ではさらに、プラスミド複製や維持に関わる遺伝子を含む領域が挿入されていた。以上の結果から、PFGE VII型菌の薬剤獲得機構の一端が明らかとなった。

研究の評価

本研究により、北海道のサルモネラ症から分離された株について遺伝子型における経年的変遷が確認された。さらに分子疫学的解析手法を用いることにより、異なる地域・農場あるいは年代で分離された菌株間の比較や、牛由来株と野生動物由来株との関連性を科学的に解析することが可能になることが検証され、新型菌の検出や、感染源、感染経路に関する解析が可能となることが明らかにされた。また、近年分離された牛由来 *S. Typhimurium* の病原性関連因子や薬剤耐性因子に関する特徴が明らかになった。これらの成果は、牛サルモネラ症の防疫対策に活用することが可能になるばかりでなく、牛サルモネラ症における発症機構の解明に役立つものと思われる。

以上のように、本論文は新知見に富み、今後のサルモネラ症の防疫対策に有用な情報を提示し、獣医学領域のみならず医学領域においてもその発展に大きく寄与する内容を有するものであることから、申請者 玉村雪乃氏は博士(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4名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2015年12月16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

副査 教授 小岩 政照