

氏名(本(国)籍)	佐藤 祐介(宮城県)		
主指導教員氏名	岩手大学 教授 山岸 則夫		
学位の種類	博士(獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第429号		
学位授与年月日	平成26年9月24日		
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	岩手大学		
学位論文題目	分子疫学的手法を用いた食中毒原性黄色ブドウ球菌の 遺伝学的解析		
審査委員	主査	岩手大学	教授 鎌田 洋一
	副査	帯広畜産大学	教授 小川 晴子
	副査	岩手大学	教授 山岸 則夫
	副査	東京農工大学	教授 藤川 浩
	副査	岐阜大学	教授 杉山 誠行
	副査	広島大学	教授 菅井 基行

学位論文の内容の要旨

ブドウ球菌食中毒は黄色ブドウ球菌が産生するブドウ球菌エンテロトキシン (SEs) によって引き起こされる食品内毒素型食中毒の一つである。従来、ブドウ球菌食中毒に関する研究は原因毒素 SEs/SEIs に関するものが主体であり、黄色ブドウ球菌自体の特性に関する知見は限られていた。一方、近年の分子遺伝学的研究の進展に伴い、黄色ブドウ球菌集団の中に各疾病に対応するクローンの存在が明らかになってきたが、食中毒に特異的なクローンの存在は不明であった。したがって、本学位論文では、ブドウ球菌食中毒の抑止に有用な科学的基盤の確立を目的として、新規分子遺伝学的手法の開発および食中毒原性クローンの同定とその特性解析を行った。

第1章では、食中毒分離株の分子疫学解析に応用可能な新規の genomic elements の解析法として、メチシリン感受性ならびにメチシリン耐性黄色ブドウ球菌を問わずほとんどの黄色ブドウ球菌が保有する *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPIs) を対象とした手法 (genomic elements-scanning 法) の確立を行った。本手法は SaPIs の他に食中毒の原因となる SEs 遺伝子が存在するフェージやトランスポゾン、enterotoxin gene cluster (*egc*) も含め合計9領域について、長鎖 DNA の正確な増幅が可能な long-accurate polymerase chain reaction (LA-PCR) を行うものであった。LA-PCR による genomic elements 全長の増幅を行うとともに、サザンハイブリダイゼーションやシークエンシング等の遺伝学的解析を行った。黄色ブドウ球菌の標準菌株 (N315 株ならびに MW2 株) では解析対象となる9領域の正確な増幅が確認され、臨床分離株10株を用いた解析でも標準株と同様にプロファイル解析が可能であった。また、本法によって7種の新規 SaPIs (SaPIivm10, SaPIishikawa11, SaPIivm60, SaPIj11, SaPIhhms2, SaPIino10, SaPIhirosaki4) が同定された。したがって、本章で確立した genomic elements-scanning 法は黄色ブドウ球菌の遺伝学的解析に応用可能と考えられた。

第2章では、食中毒原性クローンの探索を目的として、日本国内で分離された黄色ブドウ球菌 506 株（食中毒由来 42 株、ヒト鼻腔由来 329 株、ヒト感染症由来 85 株、環境由来 50 株）について genomic elements-scanning 法と各種遺伝学的解析法を組み合わせた特性解析を行った。コアグラージェ (Coa) 型別において、食中毒由来株の 70%以上が Coa VII 型に分類されたが、非食中毒由来株で Coa VII 型に分類された株の割合は 35%以下であった。SEs 型別において、食中毒由来株では *sea* や *seb* が 50%以上の陽性率を示したが、非食中毒由来株では 20%以下であった。Multi locus sequence typing において clonal complex 81 (CC81) に分類された株が食中毒由来株の過半数 (54.8%) を占めたが、非食中毒由来株では 3%以下であった。Genomic elements-scanning 法による解析では、CC81 には遺伝子型と genomic elements の保有状況の異なる 2 つのサブタイプが存在していた。サブタイプ 1 は Coa VII 型で、*sea* と *seb* の両方もしくは片方が陽性で、genomic elements として *seh* 関連トランスポゾン必ず保有し、一部の株は *sea* 関連ファージや *seb* 関連 SaPIs を保有していた。サブタイプ 2 は Coa VI 型で *sea* と *seb* 陰性で、genomic elements として *egc* を必ず保有し、1 株は *sec* 関連 SaPIs を保有していた。CC81 の中でも食中毒由来 CC81 は全てサブタイプ 1 であった。また、*sea* を保有する複数の CCs における SEA 産生量は、CC81 サブタイプ 1 で有意に高いことが判明した。したがって、CC81 サブタイプ 1 は SEA 産生量が高い食中毒原性クローンであることが示唆された。

本研究により、日本におけるブドウ球菌食中毒の原因となった食中毒原性クローンの一部が同定され、その遺伝学的背景と特性が明らかになった。これらの知見は食中毒事例分離株の疫学解析や食中毒抑止を行う際の科学的情報として重要であり、今後、食品や環境中に由来するブドウ球菌のクローン性、とくに食中毒原性クローンに焦点を当てた解析を行うことにより、食中毒汚染源の特定や、原因ブドウ球菌の付着経路の検証等が、迅速かつ的確に実行できるものと考えられた。

審査結果の要旨

申請者は、食品内毒素型食中毒の一つであるブドウ球菌食中毒の抑止に有用な科学的基盤を確立するために、新規分子遺伝学的手法の確立と食中毒原性クローンの特性解析を行った。

第1章では、食中毒分離株の分子疫学解析に有用な新規解析手法として、多くの黄色ブドウ球菌が保有する *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPIs) を標的とした genomic elements-scanning 法を確立した。本法は SaPIs の他に食中毒の原因となる SEs 遺伝子が存在するファージやトランスポゾン、enterotoxin gene cluster も含め合計 9 領域について長鎖 DNA の正確な増幅が可能な long-accurate polymerase chain reaction (LA-PCR) を行うものである。本法により、黄色ブドウ球菌の標準菌株では各領域の増幅が確認され、臨床分離株 10 株でも標準株と同様に解析可能であった。さらに、今回、7 種の新規 SaPIs も同定された。

第2章では、genomic elements-scanning 法と各種遺伝学的解析手法を組み合わせ、食中毒由来株と非食中毒由来株の特性解析を行った。コアグラージェ (Coa) 型別では、70%以上の食中毒由来株が Coa VII 型に分類されたが、非食中毒由来株で Coa VII 型は 35%以下であった。SEs/SEIs 型別では食中毒由来株におけるブドウ球菌エンテロトキシン遺伝子の陽性率は 50%以上であったが、非食中毒由来株の陽性率は 20%以下であった。Multi locus sequence typing では食中毒由来株の半数以上が clonal complex (CC) 81 であったが、非食中毒由来株では CC81 は 3%以下であった。これらに genomic elements-scanning 法の知

見を統合すると CC81 は 2 つに分類され、そのうち食中毒由来株 CC81 は Coa VII 型, *sea* と *seb* の片方もしくは両方が陽性, *seh* を必ず保有する遺伝学的に近縁なクローンであることが示された。

以上、本研究によって、ブドウ球菌食中毒を解析する新規分子遺伝学的手法が確立されたとともに、日本におけるブドウ球菌食中毒の原因となった食中毒原性クローンの一部が同定され、その遺伝学的背景と特徴が明らかになった。このことは、今後のブドウ球菌食中毒事例分離株の疫学解析や同菌食中毒を抑止するための科学的情報として極めて重要である。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands
著 者 名 : Sato, Y., Omoe, K., Ono, H. K., Nakane, A. and Hu, D. L.
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology
巻・号・頁・発行年 : 57 (2) : 91-99, 2013

- 2) 題 目 : Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan
著 者 名 : Sato, Y., Omoe, K., Naito, I., Ono, H. K., Nakane, A., Sugai, M., Yamagishi, N. and Hu, D. L.
学術雑誌名 : Journal of Clinical Microbiology
巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Development of electric rust preventive machining method system - safe water using for machining fluid: complete removal of bacteria (*Enterobacter aerogenes*) -
著 者 名 : Nishikawa, N., Omoe, K., Murakami, K., Sato, Y., Sawa, T., Hagihara, Y., Yoshihara, N., Okawai, H., Iyama, T., Mizuno, M. and Tsukamoto, S.
学術雑誌名 : International Journal of Precision Engineering and Manufacturing
巻・号・頁・発行年 : 14 (6) : 897-902, 2013