

氏名（本（国）籍）	鈴木 康 規（山梨県）
主指導教員氏名	岩手大学 教授 鎌 田 洋 一
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博甲第444号
学位授与年月日	平成27年9月24日
学位授与の要件	学位規則第3条第2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	黄色ブドウ球菌食中毒における分子疫学解析と可動性遺伝因子の特性に関する研究
審 査 委 員	主査 岩 手 大 学 教 授 村 上 賢 二 副査 帯広畜産大学 教 授 小 川 晴 子 副査 岩 手 大 学 教 授 鎌 田 洋 一 副査 東京農工大学 教 授 藤 川 浩 副査 岐 阜 大 学 教 授 杉 山 誠

学位論文の内容の要旨

ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) が原因の疾病の1種にブドウ球菌食中毒がある。この食中毒は、ブドウ球菌の人体内での感染・増殖が原因で症状が誘発されるのではなく、菌が食品中に産生するタンパク質性の毒素が症状発現物質になっている。菌の産生する毒素はブドウ球菌エンテロトキシン（Staphylococcal enterotoxin ; SE）と呼ばれる。ブドウ球菌食中毒は広く世界中で発生し、社会的関心の高い大規模な事例を起こし得る公衆衛生上重要な毒素型細菌性食中毒の一つである。近年、食中毒以外の疾病に関与する *S. aureus* に関して、遺伝学的特性に関する報告が数多くなされている。しかしながら食中毒事例由来 *S. aureus* の遺伝学的特性に関する報告は少ない。一方、SE 遺伝子そのものへの研究は充実しており、各種の分析がなされている。たとえば、新型毒素としての SE 様毒素（Staphylococcal enterotoxin-like toxin ; SEI）遺伝子の多くは、*S. aureus* pathogenicity island (SaPI) などの可移動性遺伝子上に存在することが知られている。可移動性遺伝因子は *S. aureus* の食中毒起病性の獲得に深く関与することが示されている。この事実は各種の可移動性遺伝因子を同定しその分子遺伝学的特性を解析することが、*S. aureus* の食中毒病原体としての起病性を考察する上で非常に有益であることを想起させる。本論文では、食中毒誘発性 *S. aureus* の遺伝学的特性を明らかにすること、また、食中毒発生に関与する可移動性遺伝因子の特性を明らかにすることを目的に、東京都で発生した食中毒 83 事例から分離された *S. aureus* 株を対象として、以下の項目を検討した。

第一章では、食中毒由来 *S. aureus* の遺伝学的特性を明らかにした。食中毒事例由来 *S. aureus* 株は、multilocus sequence typing (MLST)法により Clonal complex (CC) 81, CC8, CC6,

CC5, CC508, CC20, CC30 及び CC59 の 8 種類に分類された。CC8 に属する株 (CC8 株) は、全てコアグラゼⅢ型であった。また、全ての CC8 株は *sea* 遺伝子を保有し、本遺伝子が存在するプロファージを保有することが推測され、コアグラゼ型、SE/SEI 遺伝子型、SE/SEI 獲得に関連する可移動性遺伝因子の保有状況に関して特定の規則性が存在した。さらに、一部の CC8 株が *sed*, *selj* 及び *ser* 遺伝子を保有し、これらの遺伝子が存在するプラスミドを保有することが推測された。MLST 法に基づく食中毒事例由来 *S. aureus* 株の分子系統と SaPI の保有分布の間には、各 SaPI が単一の分子系統の株においてのみ保有が認められるという特徴的な関係性が存在した。以上の結果から、特定の CC 型、コアグラゼ型、SE/SEI 遺伝子型及び可移動性遺伝因子の保有型によって識別される遺伝学的特性を持つ *S. aureus* 株が、食中毒を誘発しやすいことが明らかとなった。食中毒事例以外から分離される *S. aureus* は上述の遺伝学的特性が食中毒由来株とは異なり、各疾病特異的な *S. aureus* の集団が存在することが推測される。

第二章では、食中毒事例由来 *S. aureus* 株において、SEs をコードする 4 種の新規 SaPI である SaPITokyo12413, SaPITokyo11212, SaPITokyo12571 及び SaPITokyo12381 を同定し、その食中毒起病性並びに伝播性に関する性状を検討した。新規 SaPI を保有する *S. aureus* 株は、既知の SEs 関連 SaPI を保有する株と比較して同等もしくは有意に多い SE 産生量を示した。SaPI の“複製”に関与する Rep タンパク質が持つ、複製開始点への結合活性とヘリカーゼ活性を解析した結果、SaPITokyo11212, SaPITokyo12571 及び SaPITokyo12381 は既知 SaPI と同様に両活性を保持していた。しかし SaPITokyo12413 では、SaPI を複製する能力を欠失していることが明らかとなった。この欠失が、SaPITokyo12413 の伝播能力の低下あるいは欠如の原因となっていると考えられた。以上の結果は、前者 3 種の SaPI は、食中毒起病性の獲得という分子遺伝学的特性を *S. aureus* に与える可能性があることを示唆した。

第三章では、食中毒事例由来 *S. aureus* 株が持つプラスミドの分子遺伝学的特性に関して新たな知見を得た。本研究で解析した食中毒事例由来 *S. aureus* 株が持つプラスミドは pIB485-like plasmid であり、それらの株の多くは、SEIJ 及び SER を産生していた。毒素産生が確認されたことは、pIB485-like plasmid の伝播が、食中毒の起病性に関与することを示唆する。同 plasmid を持つ *S. aureus* 株の一部は SED が検出されなかった。それらの株の pIB485-like plasmid 上には、SED 配列の C 末端部分の 80 アミノ酸残基が欠失した mutant SED (mSED) 配列が存在し、msed 遺伝子を発現していることが明らかとなった。しかしながら、抗体を用いての検討では mSED タンパク質は培養液中では検出されず、同変異タンパク質が菌体外に分泌されているかは明確にできず、mSED タンパク質の役割は不明だった。

以上、本研究によって、特定の CC 型、コアグラゼ型、SE/SEI 遺伝子型、可移動性遺伝因子の保有型で識別される遺伝学的特性を保有する *S. aureus* が、ブドウ球菌食中毒を誘発しやすいことが明らかになった。この所見は、今後食中毒事例由来株の分子疫学解析を行う際の基礎的な情報となり、食中毒起病性 *S. aureus* が常在する場所や食中毒発生時の汚染経路の特定に有用である。*S. aureus* 食中毒株は、多様な可移動性遺伝因子の伝播によって、食中毒起病性を獲得すると考えられた。これらの科学的情報を基にして、食品の製造、輸送、販売の各現場や保健所などの行政機関に対して注意喚起や汚染領域の清浄化などの

指導を行うことが、ブドウ球菌食中毒の防止に貢献すると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者は、可移動性遺伝因子に着目して、食中毒由来ブドウ球菌、分子遺伝学的特性を解析し、同菌食中毒を制御するに有効な科学的基盤を確立するため、各菌株のクローン解析、コアグラエゼ型別、同菌が持つエンテロトキシン (SE) 及びエンテロトキシン用毒素 (SEL) 遺伝子保有状況、プラスミド解析、プラスミド伝播に関する遺伝子解析を行った。

第一章では、multilocus sequence typing (MLST)法によりクローン解析を実施した。供試菌株の Clonal complex (CC) は8種に分類された。特定の CC は一定のコアグラエゼ型、毒素遺伝子、*Staphylococcus aureus* pathogenicity island (SaPI)を持つことが示された。食中毒事例由来 *S. aureus* 株の分子系統と SaPI の保有分布の間には、各 SaPI が単一の分子系統の株においてのみ保有が認められるという特徴的な関係性が存在した。特定の CC 型、コアグラエゼ型、SE/SEL 遺伝子型及び可移動性遺伝因子の保有型によって識別される遺伝学的特性を持つ *S. aureus* 株が、食中毒を誘発しやすいことを明らかにした。

第二章で申請者は、4 種の新規 SaPI, SaPITokyo12413, SaPITokyo11212, SaPITokyo12571 及び SaPITokyo12381 を同定した。SaPITokyo12413 を除き、3 種の SaPI を保有する *S. aureus* 株は、既知の SEs 関連 SaPI を保有する株と比較して同等もしくは有意に多い SE 産生量を示し、その食中毒起病性を示唆した。

第三章では、食中毒事例由来 *S. aureus* 株が持つプラスミドの分子遺伝学的特性が解析された。供試ブドウ球菌株は pIB485-like plasmid を保有し、多くは、SEIJ 及び SER を産生していた。毒素産生が確認されたことは、pIB485-like plasmid の伝播が、食中毒の起病性に関与することを示唆する。一方同プラスミドを保有しながら SED の産生が確認されなかった菌株が存在した。同菌株を解析したところ、*sed* 遺伝子に変異が生じ、C 末端部分の欠失があることが示された。同変異 *sed* 遺伝子は発現しているものの、タンパク質の存在は確認できず、変異 *sed* 遺伝子の食中毒起病性への意義は確認できなかった。

以上申請者の研究によって、ブドウ球菌の食中毒起病性に関して、特定のクローンの存在が確認され、また、新規の SaPI の同定がなされ、毒素遺伝子の、可動性遺伝因子の一つであるプラスミド伝播を介しての伝播に基づく食中毒起病性の解析がなされた。これらのことは、今後のブドウ球菌食中毒事例分離株の分子疫学解析への科学的基盤を強化し、ブドウ球菌食中毒の制御に貢献するものとして、非常に意義あることと認める。

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 : Molecular epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* isolates originating from food poisoning outbreaks that occurred in Tokyo, Japan

著 者 名 : Suzuki, Y., Omoe, K., Hu, D. L., Sato'o, Y., Ono, H. K., Monma, C., Arai, T., Konishi, N., Kato, R., Hirai, A., Nakama, A., Kai, A. and Kamata, Y.

学術雑誌名 : Microbiology and Immunology

巻・号・頁・発行年 : 58(10) : 570 - 580, 2014

- 2) 題 目: Identification and characterization of novel *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands encoding staphylococcal enterotoxins originating from staphylococcal food poisoning isolates
著 者 名: Suzuki, Y., Kubota, H., Sato'o, Y., Ono, H. K., Kato, R., Sadamasu K., Kai, A. and Kamata, Y.
学術雑誌名: Journal of Applied Microbiology
巻・号・頁・発行年: 118(6) : 1507 - 1520, 2015
- 3) 題 目: Detection of the staphylococcal enterotoxin D-like gene from staphylococcal food poisoning isolates over the last two decades in Tokyo
著 者 名: Suzuki, Y., Kobayashi, M., Matsushita, S., Uehara, S., Kato, R., Sato'o, Y., Ono, H. K., Sadamasu, K., Kai, A. and Kamata, Y.
学術雑誌名: The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年: In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目: Bone morphogenetic protein 4 accelerates the establishment of bovine trophoblastic cell lines
著 者 名: Suzuki, Y., Koshi, K., Imai, K., Takahashi, T., Kizaki, K. and Hashizume, K.
学術雑誌名: Reproduction
巻・号・頁・発行年: 142(5) : 733 - 743, 2011
- 2) 題 目: Bovine trophoblastic cell differentiation and binucleation involves enhanced endogenous retrovirus element expression
著 者 名: Koshi, K., Suzuki, Y., Nakaya, Y., Imai, K., Hosoe, M., Takahashi, T., Kizaki, K., Miyazawa, T. and Hashizume, K.
学術雑誌名: Reproductive Biology and Endocrinology
巻・号・頁・発行年: 10・・41, 2012