

氏名（本（国）籍）	Shaheem Elahi（アフガニスタン・イスラム共和国）
主指導教員氏名	東京農工大学 教授 藤 川 浩
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第543号
学位授与年月日	令和元年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4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	東京農工大学
学位論文題目	Enterotoxin Production and Growth of <i>Staphylococcus aureus</i> under Various Environmental Conditions (各種環境条件下における黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生と増殖)
審査委員	主査 東京農工大学 教授 水 谷 哲 也 副査 帯広畜産大学 教授 小 川 晴 子 副査 岩 手 大 学 教授 寺 嶋 淳 副査 東京農工大学 教授 藤 川 浩 副査 岐 阜 大 学 教授 福 士 秀 人

学位論文の内容の要旨

黄色ブドウ球菌による食中毒は嘔吐、嘔気、下痢などをその主症状とし、国内外でなおも大きな健康被害を与えている。本食中毒は本菌が産生するエンテロトキシンの摂取によって起こり、世界的に現在まで約 20 種の黄色ブドウ球菌エンテロトキシン(SE) およびその関連物質が知られている。その中でも A 型 (SEA) による事件は最も多い。これまで多くの研究者が各種の環境条件下における黄色ブドウ球菌の SE 産生性および増殖を検討してきたが、それらは十分に定量的な解析ではなかった。そこで、本論文では各種環境下における本菌の SEA 産生性と増殖の特徴を数学および統計モデルを使って定量的な解析を行なった。

本論文では第 1 に、SEA 産生黄色ブドウ球菌は各種温度下でどのような毒素産生および増殖挙動を示すかを検討した。すなわち、すでに研究報告のあった SEA 産生株 11658 を用いて各種温度の液体培地中での SEA 産生と増殖を振とうおよび静置培養で検討した。その結果、培養時間に沿った本毒素産生と増殖挙動は新ロジスチックモデルによくフィットし、シグモイド曲線で表わされた。毒素の産生速度、最大毒素産生量と最大菌数はいずれも振とう培養の方が高い値を示した。さらに、本菌株を SEA 産生の最適温度 (30° C) で振とうおよび静置培養し、細胞内の SEA 遺伝子発現量を時間に沿って累積すると、本毒素の遺伝子発現は毒素産生に時間的に先行することが明らかとなり、SEA の生成はワトソン・クリックによるセントラルドグマに従ったことが示された。

次に、SEA 産生株 5 株について各種温度 (22° C - 42° C) での最大毒素産生量を振とう培養で検討した。その結果、菌株によって毒素産生の最適温度は全て異なり、その産生量も菌株によってすべて異なることが示され、本菌の SEA 産生の多様性を明らかにした。

本論文では第2に、黄色ブドウ球菌が温度と食塩濃度に関してどのような領域で本毒素を産生し、あるいは増殖できるかを統計学モデルを使って検討した。すなわち、上記の5株から作成した混合菌液を各種の温度（10℃－40℃）と食塩濃度（0.5％－20％）下における液体培地中のSEA産生と増殖の有無をロジスティック回帰モデルを用いて検討した。なお、増殖の有無は培養後の菌数を初期菌数と比較し、毒素産生の有無は0.1 ng/ml以上の産生量で陽性とした。その結果、振とうおよび静置培養において混合試料の毒素産生との有無の領域を本モデルを使ってうまく表すことができた。増殖においても同様にうまく表すことができた。さらに、本モデルを用いて予測したSEA産生および増殖確率は実測値とよく一致した。また、食塩濃度と温度において増殖はするが、毒素を産生しない領域を本モデルで明示できた。ボツリヌス菌においても食品中のボツリヌス毒素産生を水分活性と水素イオン濃度で制御しているが、これと同様な知見が得られたと考えられる。

この混合液について、さらに各種の食塩濃度と温度に関して最大毒素産生量のパターンを振とうおよび静置培養において表し、静置培養では産生量が大きく抑制されたことを示した。一方、最大菌数においては両培養による大きな相違は認められなかった。

本論文で得られた各種環境条件下における黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生と増殖に関する研究結果は、本菌による食中毒事件を防ぐための基礎的で有益な情報を与えることができると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

現代日本において黄色ブドウ球菌による食中毒はその事件数は減少したが、なおも大きな健康被害を与えている。本食中毒は本菌が産生するエンテロトキシンの摂取によって起こり、世界的に現在まで約20種の黄色ブドウ球菌エンテロトキシン(SE) およびその関連物質が知られている。その中でもA型(SEA)による事件は最も多い。これまで多くの研究者が各種の環境条件下における黄色ブドウ球菌のSEA産生性および増殖を検討してきたが、それらは十分に定量的な解析ではなかった。そこで、申請者は各種環境下における本菌のSEA産生性と増殖の特徴を数学および統計モデルを使って定量的に解析した。

申請者は第1に、SEA産生黄色ブドウ球菌は各種温度下でどのような毒素産生および増殖挙動を示すかを検討した。すなわち、すでに研究報告のあったSEA産生株11658について、各種温度の液体培地中でのSEA産生と増殖を振とうおよび静置培養で検討した。その結果、培養時間に沿った本毒素産生と増殖挙動は新ロジスティックモデルによくフィットし、シグモイド曲線で表わされた。毒素の産生速度、最大毒素産生量と最大菌数はいずれも振とう培養の方が高い値を示した。さらに、本菌株をSEA産生の最適温度（30℃）で振とうおよび静置培養し、細胞内のSEA遺伝子発現量を時間に沿って累積すると、本毒素の遺伝子発現は毒素産生に時間的に先行することが明らかとなり、SEA生成はタンパク質生成に関するいわゆるセントラルドグマに従ったことが示された。

さらに、申請者はSEA産生株5株について各種温度（22℃－42℃）での最大毒素産生量を振とう培養で検討した。その結果、菌株によって毒素産生の最適温度は全て異なり、その産生量も菌株によってすべて異なることが示され、本菌のSEA産生の多様性を明らかにした。

申請者は第2に、黄色ブドウ球菌が温度と食塩濃度に関してどのような領域で本毒素を産生し、あるいは増殖できるかを統計学的に検討した。すなわち、上記の5株から作成した混合菌液を各種の温度（10℃－40℃）と食塩濃度（0.5％－20％）下における液体培地中のSEA産生と増殖の有無をロジスティック回帰モデルを用いて検討した。なお、増殖の有無は培養後の菌数を初期菌数と比較し、毒素産生の有無は0.1 ng/ml以上の産生量で陽性

とした。その結果、振とうおよび静置培養において混合試料の毒素産生との有無の領域を本モデルを使ってうまく表すことができた。増殖においても同様にうまく表すことができた。本モデルを用いて予測した SEA 産生および増殖確率は実測値とよく一致した。また、食塩濃度と温度において増殖はするが、毒素を産生しない領域を本モデルで明示できた。

さらに、この混合液について各種の食塩濃度と温度に関して最大毒素産生量のパターンを振とうおよび静置培養において表し、静置培養では産生量が大きく抑制されたことを示した。一方、最大菌数においては両培養による大きな相違は認められなかった。

申請者が本研究で得られた各種環境条件下における黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン産生と増殖に関する研究結果は本菌による食中毒事件を防ぐための基礎的で有益な情報を与えることができると考えられる。

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 : Characteristics of staphylococcal enterotoxin A production and growth of *Staphylococcus aureus* in shaking and stationary cultures
著 者 名 : Elahi, S., Tsuchiaka, S., Mizutani, T., and Fujikawa, H.
学術雑誌名 : Biocontrol Science
巻・号・頁・発行年 : 23(4):207-214, 2018

- 2) 題 目 : Comprehensive study of the boundaries of enterotoxin A production and growth of *Staphylococcus aureus* at various temperatures and salt concentrations
著 者 名 : Elahi, S. and Fujikawa, H.
学術雑誌名 : Journal of Food Science
巻・号・頁・発行年 : 84(1):121-126, 2019