

| | |
|---------|-------------------------------------|
| 氏名(本籍) | 森元 美紗子(東京都) |
| 学位の種類 | 博士(獣医学) |
| 学位記番号 | 乙第 443 号 |
| 学位授与年月日 | 令和 5 年 8 月 31 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 3 条第 3 項該当 |
| 学位論文題名 | 豚丹毒菌変異株の流行と病原性調査に関する研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 森 田 幸 雄 (副査) 長 井 誠 山 下 匡 |

論 文 内 容 の 要 旨

豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) はグラム陽性の桿菌である。豚に主たる病原性を示し、世界中の養豚業界において経済的損失を与える重要な人獣共通感染症であり、わが国では届出伝染病に指定されている。豚における豚丹毒の症状は主に 3 つに分類され、急性・亜急性・慢性症状がある。急性症状では敗血症による突然死、亜急性症状では発熱や食欲不振に加えて最も特徴的とされる蕁麻疹(ダイヤモンド・スキン)の出現、慢性症状では関節炎、リンパ節炎および心内膜炎などを引き起こし、その症状は多岐に渡る。疾病対策には他の疾病との類症鑑別が重要となる。豚丹毒菌の菌体表層に発現する Spa (Surface protective antigen) A タンパク質は、感染防御ならびに病原性に関わる抗原として、多くの研究が報告されている。

日本における豚丹毒菌の発生は 1970 年代に生ワクチンが普及してから減少しているものの、未だに年間 2000 頭前後の発生があり、養豚業界において決して無視できない疾病である。特に 2008 年から 2011 年にかけては血清型 1a の SpaA タンパク質の 203 位と 257 位のアミノ酸がそれぞれメチオニンとイソロイシンに変化した M203/I257-SpaA 変異株が新たな変異株として流行した。この他にも、少数ながら同じ血清型 1a における SpaA タンパク質の 203 位と 242 位のアミノ酸が、それぞれメチオニンとアラニンに置換した M203/A242-SpaA 変異株および 203 位のアミノ酸のみがメチオニンに置換した M203-SpaA 変異株も発見された。このように、これまで分離されてこなかった豚丹毒菌血清型 1a の SpaA 変異株の台頭が近年では見受けられている。

これらの背景をふまえ、本研究は 2008 年から 2011 年の調査で初めて見つかった豚丹毒菌 SpaA 変異株のその後の動向および 2012 年以降、我が国で流行している株の病原性について検討した。本研究は 3 章から構成される。野外サンプル調査、血清型別、SpaA 変異株と血清型別の細菌学的特性調査並

びにマウス及び豚での病原性調査、不活化ワクチンの豚丹毒菌 *SpaA* 変異株に対する豚での有効性を中心に検討し、以下のような成果を得た。

第一章：2012年から2019年に分離した豚丹毒菌株を中心に血清型、*SpaA* 遺伝子の表現型を調査し、*SpaA* 変異株の国内分離状況および、マウスにおける病原性を検討した。2012年から2019年に日本各地から集めた79株の豚丹毒菌の血清型、*SpaA* 遺伝子塩基配列の変異部分の解析およびLineage型別を行った。調査した79株のうち、59株が血清型1aに属しており、その59株のうち56株が2008年から2011年の調査で初めて見つかった株と同じ血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株であった。2012年以降も血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株の流行の継続が明らかとなった。さらには、血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株のLineage型別をすると、これまで主に九州地域（LineageIVb-1）と本州地域（LineageIVb-2）で分離した株が、2012年以降では日本全国に分布し、地域性が消失していることが確認できた。また、マウスを用いた病原性確認試験において血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株は血清型2aの株と比較して病原性が強いことが示唆された。一方、同じ血清型1aで病原性比較対照株である藤沢株とM203/I257-*SpaA* 変異株においては大きな病原性の違いはないことが明らかとなった。これらの結果より、わが国における2012年以降の豚丹毒菌の流行は豚丹毒菌の*SpaA* 遺伝子の塩基配列に新たな変異が挿入された株などによるものではなく、2008年から引き続いて血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株の地域性が混在し、流行が拡大していることが明らかとなった。また血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株はマウスを用いた病原性試験では藤沢株と同様な病原性を示す強毒株であることが判明した。

第二章：2012年以降の分離株から血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株を2株、血清型1b、2a株をそれぞれ1株ずつ選択した合計4株を、病原性比較対照株として広く用いられている血清型1aの藤沢株と*in vitro*の細菌学的特性および*in vivo*の病原性の違いを比較検討し、M203/I257-*SpaA* 変異株が国内で流行拡大を続ける原因を検索した。国内での分離数が少ない血清型2a株は血清型1a株と比較して*in vitro*での増殖性が低く、豚血管内皮細胞との細胞接着性が低く、マウスや豚における*in vivo*病原性も低いことが明らかとなった。豚を用いた動物試験では、病原性を臨床症状スコアで評価すると、血清型1a株と血清型2a株の間、血清型1a株と血清型1b株の間、さらには血清型1b株と血清型2a株の間においても病原性の臨床症状スコアに有意差が認められた。以上のことより、血清型1a株と1b株、2a株の間に病原性の違いを見出すことが出来た。さらに血清型1b株と血清型2a株は第一章より分離数が少ないことも踏まえると、我が国で分離数が最も多い血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株は藤沢株同様に、豚へも強い病原性をもち、我が国に広く浸潤していることを裏付ける結果となった。

第三章では豚丹毒菌不活化ワクチンの血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株に対する豚での有効性を検討した。豚を4頭ずつ4つの群に振り分け、群1と群3に豚丹毒菌不活化ワクチンSER-ME（スワインテクトSER-ME、日生研株式会社）を投与し、群2と群4を非接種対照群とした。接種菌として群1、2に病原性比較対照株である血清型1aの藤沢株を、群3、4に血清型1aのM203/I257-*SpaA*

変異株（2012年宮崎株）を用いた。非接種対照群である2つの群は菌接種後、臨床観察期間中に全頭が死亡した。一方でワクチンを投与した2つの群は臨床観察を示すことなく試験終了まで生存した。以上より、豚丹毒菌不活化ワクチンは豚で血清型1aのM203/I257-SpaA変異株に対しても従来株同等に有効であることを示した。従って、血清型1aのM203/I257-SpaA変異株の流行拡大の原因はワクチン投与後のブレイクスルー感染によるものではないことが示唆された。

以上の結果より、（1）血清型1aのM203/I257-SpaA変異株の流行拡大は現在も続いていること（2）最も流行している血清型1aのM203/I257-SpaA変異株はマウスや豚への病原性が強いこと（3）血清型1aのM203/I257-SpaA変異株の流行拡大の原因は豚での感染・防御試験によりワクチン投与後のブレイクスルー感染によるものではないことが明らかとなった。

豚丹毒菌は豚のみならず、家禽や多くの動物、自然環境から分離されている。今後は血清型1aのM203/I257-SpaA変異株が野生動物を含めた他の宿主や自然環境中に分布している可能性などを考慮し、広範囲な調査を続けることが、豚の豚丹毒の予防と制御に必要であると思われる。本研究で得られた一連の知見が今後の養豚業界における豚丹毒菌制御の一助になれば幸いである。

本研究は以下の論文に公表している。

第一章：Morimoto M, Kato A, Kojima H, Akaike Y, Nogami K, Sasakawa C, Nagai S, To H. Serovars and SpaA Types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Isolated from Pigs in Japan from 2012 to 2019. *Curr Microbiol.* 2021 Jan;78(1):55-66. doi: 10.1007/s00284-020-02254-2. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33145611.

第二章：Morimoto M, Kato A, Akaike Y, Nogami K, Ono H, Furusawa T, Kojima H, Sasakawa C. Comparative study of the phenotype and virulence of recent serovar 1a, 1b, and 2a isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Japan. *Vet Microbiol.* 2022 Jul;270:109458. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109458. Epub 2022 May 12. PMID: 35623133.

第三章：Morimoto M, Kato A, Nogami K, Akaike Y, Furusawa T, Kojima H, Sasakawa C. The Swine Erysipelas Vaccine SER-ME Effectively Protects Pigs against Challenge with the *Erysipelothrix rhusiopathiae* M203/I257 SpaA-Type Variant. *Vet Sci.* 2022 Jul 26;9(8):382. doi: 10.3390/vetsci9080382. PMID: 35893775; PMCID: PMC9332197.

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

豚丹毒は人獣共通感染症であり、家畜伝染病予防法の届出伝染病、と畜場法の全部廃棄項目の豚の疾病で、生ワクチン、不活化ワクチン接種を実施している今日でも、少なからず豚で発生しており、家畜衛生・公衆衛生上ともに問題となっている。本論文は3章および総括で構成されている。第一章では今日我が国で流行している豚丹毒菌の血清学的・遺伝子学的特徴やマウスへの病原性を調査、第二章では第一章で分離された豚丹毒菌の細菌学的な特徴やマウス、豚の病原性を調査、第三章では生ワクチン、不活化ワクチンの流行豚丹毒菌株の有効性を豚を用いた動物実験で確認しており、各々の章で、新たな知見を見出している。

第一章では2012年から2019年に日本各地から集めた79株の豚丹毒菌の血清型、*SpaA* 遺伝子塩基配列の変異部分の解析および地理的分布をみるため Lineage 型別を実施した。供試した79株のうち59株が血清型1aであり、その59株のうち56株が2008年から2011年の調査で初めて見つかった株と同じ「血清型1a、M203/I257-*SpaA* 変異株」で、2012年以降も本変異株が流行し、さらに地理的に日本全国に広がっていることを見出している。さらに、マウスを用いた病原性確認試験において血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株は病原性比較対照株である藤沢株（血清型1a）と同様に強いこと、同時期に分離された血清型2a株と比較して強い病原性あることを明らかにしている。

第二章では、「血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株」が国内で流行拡大を続ける原因を検索するため、今回分離した「血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株」、血清型1b株、2a株ならびに藤沢株を用いて *in vitro* の細菌学的特性・病原性の違いおよびマウス・豚への病原性試験実施した。血清型2a株は血清型1a株と比較して増殖性が低いこと、豚血管内皮細胞との細胞接着性が低いこと、マウスや豚における病原性も低いことが明らかとなった。我が国で分離数が最も多い「血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株」は藤沢株同様で、豚へも強い病原性をもち、我が国に広く浸潤していることを裏付ける結果を導いている。

第三章では現在市販している豚丹毒菌不活化ワクチンSER-ME（スワインテクトSER-ME、日生研株式会社）の「血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株」に対する豚での有効性を検討した。ワクチン非接種対照群は、本変異株接種、藤沢株接種後、臨床観察期間中に全頭が死亡した。一方、ワクチンを投与群は本変異株接種、藤沢株接種後も臨床観察を示すことなく試験終了まで生存した。市販されている豚丹毒菌不活化ワクチンは今日流行している「血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株」に対しても有効であり、血清型1aのM203/I257-*SpaA* 変異株の流行拡大の原因はワクチン投与後のブレイクスルー感染によるものではないことを証明した。

本研究の成果は、今日、我が国で流行している豚丹毒菌は遺伝子学的に従来と異なる変異株であること、その変異株は藤沢株と同様に豚に対して強い病原性があること、現在市販されている豚丹毒菌不活化ワク

チンは変異株についても有効であることを証明している。これらのことは家畜衛生上および食肉衛生上、有益な情報である。

本研究は以下の論文に公表している。

第一章：Morimoto M, Kato A, Kojima H, Akaike Y, Nogami K, Sasakawa C, Nagai S, To H. Serovars and SpaA Types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Isolated from Pigs in Japan from 2012 to 2019. *Curr Microbiol.* 2021 78(1):55-66.

第二章：Morimoto M, Kato A, Akaike Y, Nogami K, Ono H, Furusawa T, Kojima H, Sasakawa C. Comparative study of the phenotype and virulence of recent serovar 1a, 1b, and 2a isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Japan. *Vet Microbiol.* 2022 270:109458.

第三章：Morimoto M, Kato A, Nogami K, Akaike Y, Furusawa T, Kojima H, Sasakawa C. The Swine Erysipelas Vaccine SER-ME Effectively Protects Pigs against Challenge with the *Erysipelothrix rhusiopathiae* M203/I257 SpaA-Type Variant. *Vet Sci.* 2022 26;9(8):382.

2. 論文審査

1) テーマの立て方

現在流行している豚丹毒菌に着目し、遺伝子学的な解析と動物（豚、マウス）を用いた病原性試験、現在市販されているワクチンの有効性を実証している。どうして変異株が出現したかについては不明であるが、この変異株が流行を維持していることは得られた知見から考察している。本研究は、現在発生している家畜伝染病の原因菌の把握を明確に設定したテーマに基づき、行われた論文である。

2) 研究の背景

豚丹毒は養豚業界において経済的損失を与える重要な届出伝染病であり、人獣共通感染症でもある。また、今日でも、豚丹毒はと畜検査で散見される疾病である。このように養豚業界でかかえている問題について、解決策（ワクチンの有効性）を提示した論文である。問題提示だけでなく、解決策をも記述した本論文は獣医学的に評価できる。

3) 研究の方法

遺伝子学的な *in vitro* の実験だけでなく、実験動物等を用いた *in vivo* の実験を実施しその結果を公表している。豚を用いた試験は病原体管理上も難易な試験も実施し、結果を得ている。研究課題に対する的確な試験が実施されていると思われる。

4) 研究の結果

今日、流行している株は「血清型 1a、M203/I257-SpaA 変異株」であること、「血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株」は藤沢株同様に豚に強い病原性があること、市販「豚丹毒菌不活化ワクチン SER-ME（スワインテクト SER-ME、日生研株式会社）は「血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株」に対して豚で有効であることを見出している。本研究は、現在発生している問題について、その背景や解決策を見出してお

り、優れた結果を含む研究と判断する。

5) 考察と結論

豚丹毒菌の宿主域は広いことから、「血清型 1a、M203/I257-SpaA 変異株」の豚のみならず、家禽や多く野生動物、自然環境へ分布している可能性などを考慮し、広範囲な調査の必要性を示している。本研究は、第一章から第三章で得られた結果から正確な考察を導き出し、さらに、的確な結論や今後の課題を示していると思われる。

6) 参考論文

必要な参考文献が的確に引用されている。

3. 審査結果

本論文および学位論文発表会における質疑応答に対する返答から、家畜衛生分野における豚丹毒の重要性を的確に理解している。予備審査および実施の学位論文発表会においてのコメントに的確に対応し、学位論文が加筆・修正されている。

また、*in vitro*、*in vivo* の実験手技や実験を遂行するための専門知識を有することが認められた。本研究は家畜衛生学ならびに食肉衛生学上意義ある業績として高く評価できる。最終試験結果も良好であり、博士（獣医学）の学位の評価基準を満たしていると判断いたします。