

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 丹羽 秀和

*Campylobacter jejuni* および *C. coli* は、主要な食中毒細菌である。カンピロバクター感染症に対し、主にマクロライド系やキノロン系抗菌薬が使用されるが、近年これらの抗菌薬に耐性を示す *C. jejuni* および *C. coli* の増加が報告されている。

近年、薬剤耐性 *C. jejuni* および *C. coli* の検出に薬剤感受性試験に代わる新たな方法として、分子生物学的手法が試みられている。PCR and line probe assay (PCR-LiPA) は、メンブラン上に固定した複数のプローブにより PCR 産物中の特定の配列を特異的に検出する方法である。*C. jejuni* および *C. coli* のマクロライドやキノロンの耐性化は、主にそれぞれの標的部位をコードする遺伝子 23S rDNA、*gyrA* の点変異によることが報告されており、本論文ではこれらの変異を特異的に検出する方法として PCR-LiPA を用い、迅速耐性株検出法の開発を行った。

第 1 章では、マクロライド耐性株迅速検出用に 23S rDNA の変異を検出するプローブを設計して PCR-LiPA の開発を行った。プローブに相補的な DNA 断片を用いた検討では、PCR-LiPA により 23S rDNA の変異が検出可能であることが示された。野外株を用いた検討では、PCR-LiPA によりマクロライド耐性分離株のみに変異が検出され、その結果は direct sequencing の結果と一致し、本章で開発した PCR-LiPA によるマクロライド耐性株の迅速検出が可能であることが示された。

第 2 章では、第 1 章で開発した PCR-LiPA を改良し、マクロライド耐性株検出用プローブと *gyrA* の変異を検出する 2 組のキノロン耐性株検出用プローブを組合せ、マクロライドおよびキノロン耐性株の迅速検出法、Macrolide and quinolone line probe assay (MQ-LiPA) の開発を行った。プローブに相補的な DNA 断片を用いた検討では、MQ-LiPA により *C. jejuni*、*C. coli* の 23S rDNA、*gyrA* の変異の同時検出が可能であることが示された。野外株を用いた検討では、MQ-LiPA によりキノロン耐性株に *gyrA* の変異が、マクロライド耐性株では 23S rDNA の変異が検出され、変異の有無はそれぞれの耐性の有無と一致した。このことから MQ-LiPA によるマクロライドおよびキノロン耐性株の迅速同時検出が可能であることが示された。さらに *C. jejuni*、*C. coli* それぞれに用いるキノロン耐性株検出用プローブセットの特異性から、MQ-LiPA は *C. jejuni*、*C. coli* 間の識別法としての可能性が示された。

第 3 章では、神奈川県で分離されたヒト由来株、鶏肉由来株の *C. jejuni*、*C. coli* のナリジクス酸、オフロキサシン、エリスロマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン、ゲ

ンタマイシン、ホスホマイシンに対する薬剤感受性を検討し、これらの株を用いて MQ-LiPA の耐性菌検出の評価を行った。1990 年を境界にヒト由来株の 7 種の抗菌薬の薬剤感受性を比較した結果、1989 年以前にみられなかったキノロン耐性株が、1990 年以降明らかに増加していた。エリスロマイシンでは、1990 年以降著しく耐性率が減少したが、両期間での MIC の分布に大きな違いはなかった。ヒト由来株と鶏肉由来株の比較では、キノロンおよびアンピシリンの耐性率は鶏肉由来株がヒト由来株よりも高く、ホスホマイシン耐性株はヒト由来株のみでみられた。MQ-LiPA によりエリスロマイシン高度耐性株にはすべて 23S rDNA の変異が検出され、また、キノロン耐性株にはすべて *gyrA* の変異が検出された。

第 4 章では、MQ-LiPA の *C. jejuni*、*C. coli* 間の菌種の識別能を 3 組の *C. jejuni* または *C. coli* 特異的プライマーによる PCR 法とともに、広く用いられている馬尿酸分解試験と比較した。すべての株で MQ-LiPA、PCR 法の結果は一致したが、*C. jejuni* とされた一部の株は馬尿酸分解試験では *C. coli* と同定された。これらの株は 16S rDNA の塩基配列の相同性から *C. jejuni* と推定され、MQ-LiPA が高精度な識別能を持つことが示された。

以上、本論文は *C. jejuni*、*C. coli* におけるマクロライドおよびキノロン耐性株の迅速検出、さらに *C. jejuni* と *C. coli* の菌種の識別も可能とする MQ-LiPA を開発したことで、カンピロバクター感染症のより迅速かつ適切な治療が可能になると考える。これらの知見は、学術上、応用上貢献するところが大きい。よって審査員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。