

論文審査の結果の要旨

報告番号	博(生)甲第180号	氏名	孟 飛
学位審査委員		主査	金井欣也
		副査	吉越一馬
		副査	長富 潔
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>孟 飛さんは平成14年7月に中国瀋陽建築大学都市工学部を卒業し、平成15年9月に大連水産学院大学院農業生物環境研究科に入学された。平成17年4月から1年間、大連水産学院と長崎大学との学術交流協定に基づく交換留学生として来日し、「魚病細菌の薬剤耐性に関する研究」に従事された。平成18年4月には長崎大学大学院生産科学研究科海洋生産科学専攻に入学され、上記研究を継続した。</p> <p>孟さんは、本研究科において、ヒラメレンサ球菌症の原因菌の一種 <i>Streptococcus parauberis</i> の薬剤耐性菌について研究され、平成20年12月に主論文「Study on Appearance and Mechanism of Drug Resistance in Pathogenic Strains of <i>Streptococcus parauberis</i> from Japanese Flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> (ヒラメ由来 <i>Streptococcus parauberis</i> における薬剤耐性菌の出現と耐性化機構に関する研究)」を完成させ、参考論文3編を添えて長崎大学生産科学研究科に博士(学術)の学位を申請した。</p> <p>長崎大学大学院生産科学研究科教授会は、平成20年12月17日の定例教授会において、予備審査委員会の審査結果に基づき、本論文を受理しても差し支えないと認め、学位審査委員を選定した。学位審査委員会は主査を中心に論文内容を慎重に審査し、公開論文発表会で発表させるとともに口頭による最終試験を行い、論文の審査および最終試験の結果を平成21年2月18日の研究科教授会に報告した。</p> <p><i>S. parauberis</i> を原因菌とするヒラメのレンサ球菌症は、西日本の養殖場において2002年頃より発生し始め、発生頻度の高い重要な疾病の一つとなっている。本論文では、2002年から2007年の間に分離された <i>S. parauberis</i> 株の血清型および各種抗菌剤に対する感受性を調べ、薬剤耐性株について耐性遺伝子の検出および耐性化のメカニズムの解明を行った。</p> <p>日本のヒラメ由来 <i>S. parauberis</i> では2種類の血清型が知られているが、研究に使用した64株はいずれかの血清型に属すること、および両血清型が西日本各地に分布することを明らかにした。また、薬剤感受性を調べた結果、オキシテトラサイクリン(OTC)、エリスロマイシン(EM)、アンピシリン(ABPC)、リンコマイシン(LCM)に耐性を示す菌株が見つかり、血清型I型44株中5株がOTC/EM高度耐性、II型20株すべてがOTC/EM中等度耐性であった。耐性遺伝子の検出を試みたところ、I型耐性株からはOTC耐性遺伝子 <i>tet(S)</i> と EM耐性遺伝子 <i>erm(B)</i> が、II型耐性株からはOTC耐性遺伝子 <i>tet(M)</i> が検出された。II型耐性株からは <i>tet(M)</i> のほかに伝達性のトランスポゾン Tn916 の構成要素である挿入酵素遺伝子 <i>int</i> および切出し酵素遺伝子 <i>xis</i> も同時に検出された。</p> <p>I型耐性株の耐性化メカニズムを明らかにするために、ゲノムDNAにおける耐性遺伝子の存在部位を調べたところ、<i>tet(S)</i> はプラスミドに、<i>erm(B)</i> は染色体DNAに検出された。プラスミドの伝達性を調べたところ伝達性が認められたことから、本プラスミドが伝達性プラスミドであることが判明した。<i>erm(B)</i> についてはその周辺のDNA塩基配列を調べた結果、<i>erm(B)</i> を含むDNA断片が他の複数の細菌で見ついている耐性プラスミドの部分配列と高い相同性を示したことから、他の細菌が持つプラスミドの一部が <i>S. parauberis</i> の染色体DNAに移行したものと推察した。</p>			

II型株からは *tet(M)*、*int* および *xis* 遺伝子が検出されたことから、Tn916 様の遺伝子構造の存在が疑われた。そこで、データベース上の Tn916 の塩基配列から設計したプライマーを用いて II 型株 DNA を鋳型として PCR を行った。その結果、Tn916 とほぼ同じサイズの PCR 産物が得られた。それをクローニングし、Tn916 に相当する部分の塩基配列を調べたところ、配列は Tn916 と 99%以上の相同性を示した。また、II 型株 20 株の Tn916 様配列について制限酵素切断パターンを調べた結果、2 つのパターンを検出した。Tn916 様配列の周辺の塩基配列を調べ、I 型株の同一位置の塩基配列と比較したところ、II 型株には Tn916 配列に隣接して ATCATA の 6 塩基配列が付加されていることが判明した。この 6 塩基配列は Tn916 が他の細菌から *S. parauberis* II 型株ゲノム DNA に入り込む際のカップリング配列と考えられた。すべての II 型株に Tn916 様配列が存在していることに関しては、Tn916 様配列を他の細菌から獲得した II 型株が、カップリング配列の影響で他の細菌への伝達頻度が極めて低かったために、Tn916 様配列を失うことなく各地に広まって病気を引き起こしているのではないかと考察している。

ヒラメの *S. parauberis* 感染症は新しい疾病であり、これまで *S. parauberis* の薬剤感受性に関する報告はなかった。本論文では、西日本に分布する *S. parauberis* の血清型および薬剤感受性を調べ、薬剤耐性菌が比較的多く検出されたこと、および耐性化のメカニズムとして伝達性プラスミドやトランスポゾンが関与していることを明らかにした。また、薬剤感受性と血清型との関連性も報告している。養殖現場では *S. parauberis* 感染症には薬が効きにくいと言われており、本研究によりその理由が解明されたと言える。さらに、本症の防除対策を立てる上での重要な知見を含んでいる。

以上のことから、本論文が魚病学ならびに養殖漁業の発展に大きく貢献するものであることを認め、博士（学術）の学位に値するものとして合格と判定した。