

氏 名	いしだ ゆういち 石田 祐一
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	乙第 765 号
学位授与年月日	令和 元年 6 月 21 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 3 項該当
学 位 論 文 名	Salmonella Enteritidis (SE) 不活化ワクチンによる鶏腸管内 SE 定着軽減メカニズムの検討
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 加 藤 大 智 (委 員) 教授 國 田 智 教授 畠 山 修 司

論文内容の要旨

1 研究目的

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar Enteritidis (SE)は、主に鶏卵や鶏加工品を介してヒトに食中毒を引き起こす病原細菌である。そのため養鶏業界において鶏卵及び鶏加工品の SE 汚染防止はサルモネラ食中毒を予防するための優先課題である。世界的に様々な SE 汚染対策が講じられる中で、最も有効な手段の一つとして鶏用 SE 生ワクチンや SE 不活化ワクチンが開発され実用化されている。しかし、SE 不活化ワクチンに関して実際に使用されているワクチンの作用メカニズムには不明な点が多い。そこで本研究では、現在本邦で用いられている SE 不活化ワクチンの鶏腸管内 SE 定着軽減メカニズムを明らかにすることを目的とした。

2 研究方法

まず、SE 不活化ワクチンによる糞便中への SE 排出抑制効果を検討するために、5 週齢鶏に SE 不活化ワクチン接種後、その 4 週後に SE 生菌 $2.9 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$ CFU/mL を経口投与し、さらにその 6 日後に糞便中へ排出された SE 生菌数を測定した。

次に、SE 不活化ワクチンによる抗体誘導能を検討するために、22 週齢鶏へのワクチン接種 4 週後の血液、小腸粘液及び卵管粘液中の抗 SE-IgG 抗体価及び抗 SE-IgA 抗体価を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により測定した。

最後に、SE 不活化ワクチンによる SE 細胞付着抑制効果を検討した。ワクチン接種 4 週後に得られた血清及び小腸粘液を用いて、SE 菌体の上皮細胞由来 Vero 細胞への付着能を測定した。

3 研究成果

1) SE 不活化ワクチンによる排菌数の測定

ワクチン接種群では SE の糞便中排出菌数が $5.5 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^5$ CFU/g であり、ワクチン非接種群の $2.5 \times 10^5 \sim 3.2 \times 10^6$ CFU/g に対して少なかった ($p < 0.05$)。また、SE 不活化ワクチンの持続効果を検証するために、ワクチン接種 10 か月後に SE 生菌を投与したところ、ワクチン接種群の

排菌数は少なかった ($p < 0.05$)。

2) ワクチン接種の有無による鶏の抗 SE 抗体の比較

ワクチン接種群はワクチン非接種群と比較して抗 SE-IgG 抗体及び抗 SE-IgA 抗体を有意に産生していた ($p < 0.05$)。

3) 上皮細胞への SE 付着に対する免疫血清及び粘膜液の抑制効果

ワクチン接種した 22 週齢鶏の血清添加によって、Vero 細胞へ付着した SE 菌体数 (平均±標準偏差) がワクチン非接種群と比較して、Vero 細胞 1 個当たり 18.9 ± 13.9 個から 6.8 ± 7.4 個へ減少した。同様に、小腸粘液の場合、ワクチン非接種群の 11.5 ± 10.4 個からワクチン接種群の 6.5 ± 8.2 個へ減少した ($p < 0.05$)。

4 考察

本研究により、血清や小腸粘液と同様に、ワクチン接種鶏の卵管粘液に抗 SE-IgG 抗体と抗 SE-IgA 抗体が存在することが明らかになった。さらに、抗 SE-IgG 抗体と抗 SE-IgA 抗体を含有する小腸粘液によって Vero 細胞への SE 付着が抑制されたことから、SE 生菌がたとえ卵管に到達した場合であっても、卵管上皮細胞への SE 菌体付着の抑制効果があると推測される。つまり、SE 不活化ワクチン接種によって、卵管の汚染が原因で発生するインエッグ汚染の軽減効果も期待できると考えられる。

5 結論

本研究によって、SE 不活化ワクチンは抗 SE 抗体を誘導し、当該抗体が腸管上皮細胞への SE 付着を抑制することで SE の定着を阻害し、その結果、腸管からの SE 排出が減少することが SE 不活化ワクチンの作用メカニズムの 1 つである可能性が示唆された。本研究は今後有効なワクチン開発の重要な基盤となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文は、鶏サルモネラ症の予防に対して現在使用されている不活化ワクチンがどのようにして有効性を発揮しているのか、そのメカニズムを明らかにすることを試みたものである。

この研究において申請者は、ワクチン接種鶏においては、1) 腸管から糞便に排泄される SE 菌数が低減されること、2) 血液ならびに腸管および卵管粘液における抗 SE-IgA および IgG 抗体が増強されること、3) 血清および腸管粘液が菌体の上皮細胞への付着を抑制することを明らかにした。本研究を通して得られた成果は、鶏サルモネラ症不活化ワクチンの効果を検証する上で意義のある研究成果であると言え、博士の学位を授与するに相応しいものと評価できる。

なお、審査員からは学位論文に関して多くの修正事項の他、全体的な構成を修正するよう指摘があった。再提出された論文を審査員一同で検討し、さらに幾度かにわたって修正を指摘、デー

タおよび図の修正を行った後、それらが適切に修正されていることを確認した。

試問の結果の要旨

申請者は学位論文に沿った研究内容の発表を行った。発表内容は鶏サルモネラ症の現状や本ワクチンに関する背景などを理解しやすいように構成され、予定通りの時間で発表が行われた。

申請者の発表の後に、本研究が実施された背景や意義、現在使用されているワクチンの効果やその作用メカニズム、実験方法と結果の解釈などについて、予定時間を延長して活発な質疑応答が行われた。いくつかの質問に対して申請者の応答や根拠が不明確な部分も見受けられたが、全体としては適切に質問に答えており、有意義な質疑応答が行われたと考える。

論文審査および最終試験から、申請者が研究者としての知識と研究遂行能力を有すると評価し、審査員全員一致で最終試験に合格と判断した。