

豚丹毒菌の病原性の解析および次世代型ワクチンの開発

下地善弘（農業技術研究機構 動物衛生研究所）

shimoji@affrc.go.jp

養豚業界に大きな経済的損害を与える伝染病の一つ、豚丹毒を引き起こす豚丹毒菌の病原性メカニズムの本体を解明した。また、遺伝子工学手法により本病に対する新しいワクチン候補株を作製し、この株を利用して豚丹毒のみならず豚の他の感染症を防御することのできる次世代型ワクチン技術を開発した。本研究の成果は豚の感染症の防除と畜産物の安全性の向上へ貢献することが期待できる。

1. はじめに

豚丹毒は豚丹毒菌というグラム陽性細菌が引き起こす全世界的に発生を見る疾病である。豚丹毒に罹患した豚は急性の敗血症を発症し、この場合、通常2, 3日で斃死することが多い。また、敗血症死を逃れた感染豚は慢性の心内膜炎や関節炎を発症し、それが原因となる発育不全を引き起こす。このように豚丹毒は養豚界に多大な損害を引き起こすことから、わが国では届け出伝染病に指定されている。また、この菌は人にも類丹毒と呼ばれる皮膚疾患の他、まれに心内膜炎や敗血症を引き起こし、公衆衛生学上も重要な菌である。

豚丹毒菌は120年以上も前に発見され、これまで国内外で多くの研究がなされてきた。しかしながら、最近までこの菌が動物に対してどのようなメカニズムで病気を引き起こすのか、また、病気を引き起こす菌側の因子、すなわち、菌の病原因子が何なのかはほとんどわかっていなかった。本稿ではこの菌の病原因子の本体をはじめ明らかにした著者らの研究成績を紹介するとともに、豚丹毒菌の遺伝子変異弱毒株を利用して開発した多価ベクターワクチン技術について紹介する。

2. トランスポゾン Tn916 による病原遺伝子の同定

トランスポゾンは薬剤耐性などの表現形質を持ち、異種細菌の染色体間を自由に移動することができる転移遺伝子である。この性質を利用して目的とする細菌の染色体上にトランスポゾンを挿入し、その挿入場所の構造を大きく変えることにより突然変異菌をつくることのできる。トランスポゾンによる突然変異株は、変異が起こった遺伝子以外はもとの親株と遺伝学的にまったく同じであり、また、トランスポゾンを目印として突然変異を起こした遺伝子を容易に同定できることから、細菌の病原遺伝子の解析に非常に有用である。そこで著者らはこれまでほとんど分かっていなかった豚丹毒菌の病原因子の解析に、トランスポゾン Tn916 を使った遺伝学的解析を取り入れることにした。

Tn916 は腸球菌 *Enterococcus faecalis* のある株で発見されたテトラサイクリン耐性遺伝子を保有するトランスポゾンで、接合伝達により目的の細菌の染色体に転移させることができる。そこで、この株と豚丹毒菌の強毒株 Fujisawa-SmR 株とを同じ寒天培地上で培養し、約1万個の遺伝子変異株を作製した。これらの変異株の中から親株とコロニー形態の異なる数株を選択してマウスに対する病原性を解析した結果、親株である Fujisawa-SmR 株は10数個 (CFU) の接種量ですべてのマウスを死亡させたのに対し、これらの変異株は 10^8 個の接種量でもマウスを死亡させることができなかった。Tn916の挿入により変異が起こった遺伝子のアミノ酸配列の相同性検索の解析から、この遺伝子の転写産物は糖転移酵素であることが予想され、また、電子顕微鏡による菌体表層構造物の観察と免疫学的解析から、これらの弱毒変異株では親株に認められる多糖体からなる莢膜様の構造物が欠失していることが判明した。マウス白血球の貪食に対する抵抗性を比較した解析では、親株の Fujisawa-SmR は白血球にほとんど貪食されなかったのに対し、弱毒変異株では効率よく貪食されるようになっていた。また、変異株の1つ (33H6株) から Tn916 が脱落した株 (33H6-R株) では毒力、莢膜様構造物、白血球に対する貪食抵抗性など、すべての表現形質が親株と同等であったことから、この菌の病原性として莢膜を保有することによる白血球に対する貪食抵抗性が重要であることが示された¹⁾。さらに重要なことに、親株および33H6-R株の強毒株は白血球内で増殖する細胞内寄生性を示すが、弱毒変異株はこの性質を失っていることが判明した²⁾。著者らは、この菌の食細胞内生残・増殖のメカニズムとして、莢膜を持つ強毒株は貪食される際に食細胞から活性酸素を誘導しないが、莢膜を失った弱毒変異株は大量の活性酸素を誘導し殺菌されることを発見した²⁾。病原細菌学では細胞内寄生細菌 (白血球内生残性を示す) および細胞外寄生細菌 (通常、白血球貪食抵抗性を示す) という分類があるように、これらの相反する病原性の両方

を示す細菌はほとんど知られていない。このように、豚丹毒菌が示す複雑な病原性はこの菌が莢膜を持つことが原因であることが明らかとなった⁶⁾。

また、Tn916 を使った他の実験では、病原細菌が生体内で組織を溶かし深部に進入するための侵襲因子 (Spreading factor) として重要と考えられるヒアルロニダーゼの病原性における役割を解析した。この実験で、ヒアルロニダーゼを産生しなくなった豚丹毒菌の変異株はマウスに対して親株と同等の病原性を示すことを明らかにし、ヒアルロニダーゼはこの菌の病原因子として重要ではないことを証明した⁸⁾。

3. PCR法による豚丹毒菌検出法の開発

豚丹毒菌はこれまで、細胞壁由来の耐熱性抗原を用いた血清反応 (寒天ゲル内沈降反応) により、22 の血清型とその抗原を欠く N 型の 23 型に分けられてきた。これらの血清型菌は形態学的・生化学的にも極めて似ていることから同一の菌と考えられ、これまで1菌属 (*Erysipelothrix*) 1菌種 (*rhusiopathiae*) として分類されてきた。しかしながら、最近の DNA - DNA 相同性試験を使った分類学的研究により、これまで報告されてきた血清型の菌は、*E. rhusiopathiae* と *E. tonsillarum* の少なくとも2菌種に分類されること、また、両菌種の基準株との相同性が低く、かつ、両者間の相同性も低い2つの血清型については、別の2つの新菌種に分類されることになった。さらに、この分類に基づき行われた疫学調査の研究や動物実験の成績から、豚や鶏に強い病原性を引き起こす菌は *E. rhusiopathiae* に限られていることが明らかになった。この事実は、これまで豚丹毒菌を1菌属 1菌種として考えてきた研究者のみならず、家畜保健衛生所や食肉検査所などの臨床現場でも混乱を引き起こし、両者の簡便な区別法の開発が求められていた。筆者らは、*E. rhusiopathiae* に属する血清型菌には莢膜の生合成に関与する遺伝子が存在するが、*E. tonsillarum* に属する血清型菌と新しい菌種に属する血清型菌にはこの遺伝子は存在しないことを見つけたし、この遺伝子の塩基配列を利用した PCR による豚丹毒菌の特異的検出法を開発した³⁾。これは、これまで生化学的手法や血清学的手法により鑑別が行われてきた豚丹毒菌の特異的同定を数時間で完了することができるため、短時間で大量のサンプルを処理しなければならない家畜保健衛生所や食肉検査所において非常に有用な方法となっている。

4. 莢膜遺伝子変異による弱毒 YS-1 株の作製

莢膜欠損変異株は生ワクチンとして有効かどうかを解析するため、トランスポゾン変異株の一つ 33H6 株の莢膜遺伝子に永久変異を導入して遺伝学的に病原性の安定した変異株の作製を試みた。Tn916 は転移する際にカップリング・シーケンス (Coupling sequence) と呼ばれるドナー菌由来の外來配列を付随して持ち込むことが知られている。すなわち、33H6 株は変異した遺伝子上に Tn916 と *E. faecalis* 由来カップリング・シーケンスの2種類の外來配列を持つが、Tn916 が脱落した 33H6-R 株ではそのカップリング・シーケンスも同時に脱落しており、変異した遺伝子の構造・機能が回復していた。しかしながら、Tn916 が脱落するという現象は、この変異株をあらたなドナー菌として Tn916 が他の菌に転移するということでもあり、この場合、*E. faecalis* 由来カップリング・シーケンスが変異株の染色体上に残り、代わりにトランスポゾンを隔てて反対側の変異株の配列があらたなカップリング・シーケンスとして Tn916 に付随して転移される可能性がある。すなわち、このような Tn916 脱落株では *E. faecalis* 由来カップリング・シーケンスがもとの配列と置き換わることになり、その遺伝子領域は永久変異をすることになる。著者らはこの性質を利用して、莢膜遺伝子内の配列 (AAACAA) が *E. faecalis* 由来のカップリング・シーケンス (GTATTA) に置換された病原遺伝子変異株 YS-1 株を分離することに成功した^{4,12)}。この YS-1 株を用いてワクチン試験を行った結果、この株はマウスや豚に対してまったく病原性を示さず、接種された動物では細胞性免疫を含む十分な防御効果が誘導されることが判明した⁴⁾。

5. YS-1 株をワクチンベクターとした豚マイコプラズマ肺炎ワクチン開発の試み

経済性が重要視される畜産業界では、より安価で安全性のすぐれたワクチンの開発が強く望まれる。そこで YS-1 株に他の病原体の抗原を発現させ、それをその病原体に対するワクチンとしても利用することが可能かどうかを検討した。養豚業界で最重要疾病の一つと考えられている豚マイコプラズマ肺炎の起因菌、マイコプラズマ・ハイオニューモニエが豚の気管支に付着する際に利用する P97 抗原遺伝子と、著者らがすでにクローニングに成功していた豚丹毒菌の菌体表層蛋白分子 SpaA.1³⁾ の遺伝子とを融合させ、このキメラ遺伝子の転写産物が SpaA.1-P97 のハイブリッド分子として菌体表層に発現する株を作製した^{7,13)}。この株を豚の鼻腔内に噴霧した後、豚丹毒菌の強毒株で実験的に感染させてワクチン効果を検定したところ、非免疫群のすべての豚は強毒株の感染により死亡したが、免疫群の豚はまったく発症しなかった⁷⁾。また、同様にこの株のマイコ

プラズマ肺炎に対するワクチン効果を検定したところ、非免疫豚群ではマイコプラズマ強毒株の感染により平均して約 15% の肺病変が形成されたのに対し、免疫群ではその割合は約 3% ($p<0.0001$) と有意に低下し、この株のマイコプラズマ肺炎に対するワクチンとしての有効性が示された⁹⁾。このように、YS-1 株は異種病原体の抗原を免疫系に有効に運搬することのできるワクチンベクターとして非常に優れていることが判明した。現在、このワクチン候補株は民間と共同で実用化試験が行われており、世界初の家畜用多価ベクターワクチンとしての実用化を期待している。

6. おわりに

今回開発した豚丹毒菌の多価ベクターワクチン株を免疫された豚では、菌体表面に発現させたマイコプラズマ抗原に対して特異的な細胞性免疫が誘導されることが実験的に証明されている。このことは、YS-1 株が細胞性免疫誘導型のワクチンベクターとして有用なことを示唆しており、今後はこの株を利用した種々の感染症に対するワクチン開発が期待できる。

謝辞

豚丹毒菌の莢膜の発見の糸口を与えて下さり、また、今日まで常に懇切なご指導と的確なご助言を頂きました動物衛生研究所の横溝祐一博士に感謝の意を表します。

引用文献および業績リスト

- 1) Shimoji Y, Y. Yokomizo, T. Sekizaki, Y. Mori and M. Kubo. 1994. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. *Infection and Immunity*. 62:2806-2810.
- 2) Shimoji Y, Y. Yokomizo and Y. Mori. 1996. Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. *Infection and Immunity*. 64:1789-1793.
- 3) Shimoji Y, Y. Mori, K. Hyakutake, T. Sekizaki and Y. Yokomizo. 1998. Use of an enrichment broth cultivation-PCR combination assay for rapid diagnosis of swine erysipelas. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:86-89.
- 4) Shimoji Y, Y. Mori, T. Sekizaki, T. Shibahara and Y. Yokomizo. 1998. Construction and vaccine potential of acapsular mutants of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: use of excision of Tn916 to inactivate a target gene. *Infection and immunity*. 66:3250-3254.
- 5) Shimoji Y, Y. Mori and V.A. Fischetti. 1999. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for protective immunity. *Infection and Immunity*. 67:1646-1651.
- 6) Shimoji Y. 2000. Review: Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. *Microbes and Infection*. 2:965-972.
- 7) Shimoji Y, E. Oishi, T. Kitajima, Y. Muneta, S. Shimizu and Y. Mori. 2002. *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1 as a live vaccine vehicle for heterologous protein expression and intranasal immunization of pigs. *Infection and Immunity*. 70:226-232.
- 8) Shimoji Y, H. Asato, T. Sekizaki, Y. Mori and Y. Yokomizo. 2002. Hyaluronidase is not essential for the lethality of *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection in mice. *Journal of Veterinary Medical Science*. 64:173-176.
- 9) Shimoji Y, E. Oishi, Y. Muneta, H. Nosaka and Y. Mori. 2002. Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. *Vaccine*. 印刷中
- 10) Shimoji Y. 2002. *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1: a live vaccine vehicle for mucosal delivery of recombinant proteins in pigs. In Vol. 6. *Recent Research Development in Microbiology*. Research Signpost, Kerala, India. 印刷中
- 11) Shimoji Y. 2003. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. In 3rd edition. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Iowa State University Press, Iowa. 印刷中
- 12) 特許「豚丹毒菌の莢膜欠損変異株 YS-1 株」特許第 2992980 号
- 13) 特許「マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗原を発現する豚丹毒菌および該菌による免疫化方法」
特願 2000-313694 (特許出願公開番号 特開 2002-119285)

Analyses of the pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and development of new generation vaccines

Yoshihiro Shimoji (National Agricultural Research Organization, National Institute of Animal Health)
shimoji@affrc.go.jp