

資料

新規豚丹毒生ワクチンと抗体検査法の開発について

西川 明 芳

(国立研究開発法人 農研機構 動物衛生研究部門 動物感染症研究領域 細菌グループ)

Nishikawa, S. (2025). Development of a novel live vaccine and ELISA for swine erysipelas.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 85, 8-12.

キーワード：豚丹毒、ゲノム収縮、プロリン合成遺伝子

1. はじめに

感染症対策において、ワクチン接種は最も効果的である。近年、分子生物学の発展により DNA ワクチンをはじめとした遺伝子工学的手法を駆使した新しいワクチン開発が可能になり、すでに畜産衛生分野にも導入されている¹⁾。しかしながら、家畜を対象とするワクチンは安全性や有効性に加えて経済性も大きく求められる。昔ながらの生ワクチンは製造コストが安価であり、通常は1回の接種で長期間持続する免疫を誘導できることから最も費用対効果の高いワクチンであると言える。現在のところ、生ワクチンの多くは宿主と異なる動物種やその細胞、化学物質存在下で継代を重ねゲノム上にランダムな変異を誘発し弱毒化されている。これらワクチンの多くは、詳細な弱毒化機構が不明であり、一部の生ワクチンでは病原性復帰のリスクがあるなど、安全面での問題が指摘されている²⁾。これらの問題点を克服した新規の生ワクチンを開発するためには、原因菌の病原遺伝子を同定し、それを除去あるいは変異を導入することで弱毒化させる必要があるが、病原遺伝子の同定には多大な労力を要する。

豚丹毒はグラム陽性の、非芽胞形成性、細胞内寄生細菌である豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*: Er) が豚やイノシシに経口あるいは創傷感染することで引き起こされる細菌感染症である。豚丹毒の臨床症状として、急性の敗血症型、亜急性の尋麻疹型、慢性の心内膜炎あるいは関節炎型がある。わが国では豚およびイノシシにおける本病が家畜伝染病予防法による届出伝染病に指定されている。また、と畜場法の定めにより、発見されればと殺・解体禁止、と殺後であればと体は全部廃棄となるため、養豚農家にとって経済的損失の大きい細菌感染症の一つである。本病は、1960年

代には、14,000-26,000頭の発生が報告された。これを受け、本疾病の対策として、1970年代に豚丹毒菌の強毒株をアクリフラビンと呼ばれる色素を含んだ Brain Heart Infusion-Tween80 (BHI-T80) 寒天培地で65回継代しゲノム上にランダムな変異が生じたことで弱毒化した株が作出された。同株は生ワクチンとして現在も使用され、一定の効果が認められているものの、その詳細な弱毒化機構は未解明のままである。また、SPF 豚等の豚丹毒高感受性豚へ接種する際には、慎重な対応が求められることが添付文書に記されている。こうした背景を踏まえ、当グループではより高い安全性を備えた新規生ワクチンの開発を目指し多岐にわたる研究を行ってきた。

豚丹毒菌の全ゲノム解析を行ったところ、本菌のゲノム上には1700以上の遺伝子が存在することが明らかとなった³⁾。しかしながら、これら遺伝子の中から病原性に関与する遺伝子を同定することは困難であった。豚丹毒菌をはじめとする細胞内寄生細菌の多くは生存に必要な栄養素の多くを宿主に依存しており、不要な栄養素の合成に関わる多くの遺伝子がゲノムから脱落する「ゲノム収縮」を起こしている。我々は、この「ゲノム収縮」と呼ばれる遺伝学的性質に着目し、ゲノムから脱落せずに保存されている栄養素の合成遺伝子は豚丹毒菌の生存や宿主への感染に特に重要な遺伝子であるという仮説の基、以下の実験を行った。

2. 豚丹毒菌の宿主細胞感染時におけるアミノ酸合成遺伝子の発現について

豚丹毒菌のゲノム解析の結果、本菌は7アミノ酸(アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、システイン、グリシン、プロリン)の合成に関わる遺伝子全てと、アルギニン合成遺伝子の一部を保持していることが明らかとなった。それらアミノ酸合成に関わる遺伝子は全部で14個であり、すなわち、その他の生存に

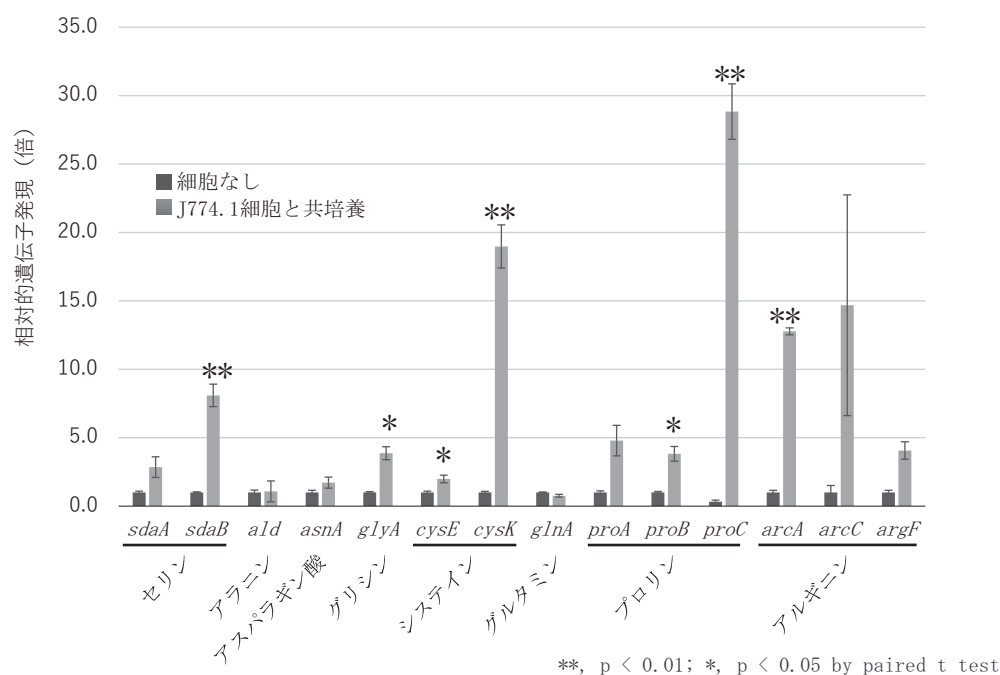


図1 豚丹毒菌の宿主細胞感染時におけるアミノ酸合成遺伝子の発現

必要なアミノ酸は宿主に依存していることが明らかになった³⁾。そこで、14の遺伝子について、菌がマウスのマクロファージ (J774A.1) に感染した際に発現しているかを quantitative RT-PCR (qRT-PCR) により解析した。その結果、セリン、グリシンおよびアルギニンの合成に関わる遺伝子各1遺伝子とシステインおよびプロリンの合成に関わる各2遺伝子の計7遺伝子の発現が有意に上昇しており、特にプロリン合成遺伝子の発現が最も高いことが明らかになった (図1)。そこ

で、プロリンの合成に関わる3遺伝子 (*proA*、*proB*、*proC*) の欠損株を作製し、以下の解析を行った。

3. プロリン合成遺伝子欠損株の作製とそれら欠損株のJ774A.1細胞及びマウス生体内における増殖
各プロリン合成遺伝子を欠損させた株 $\Delta proA$ 、 $\Delta proB$ 、 $\Delta proC$ 、*proA* と *proB* の2遺伝子欠損株 $\Delta proBA$ 、3遺伝子欠損株 $\Delta proBAC$ の計5株を作製した (図2)。これら遺伝子欠損株をJ774A.1細胞に感染させ、細胞内

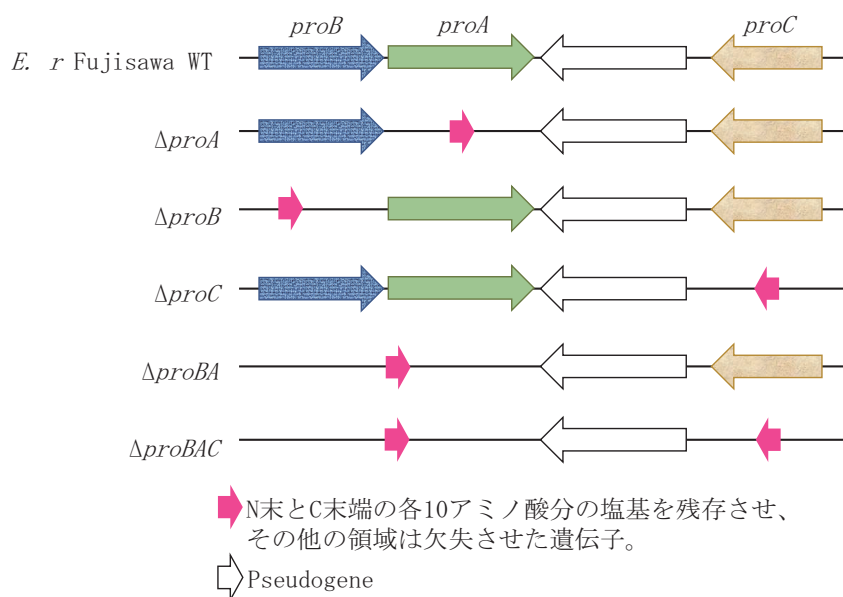


図2 プロリン合成遺伝子欠損株の作製

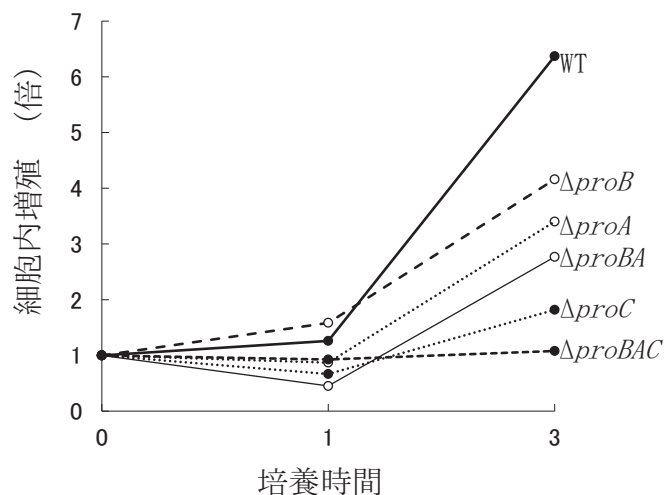


図3 プロリン合成遺伝子欠損株のJ774A.1細胞における増殖

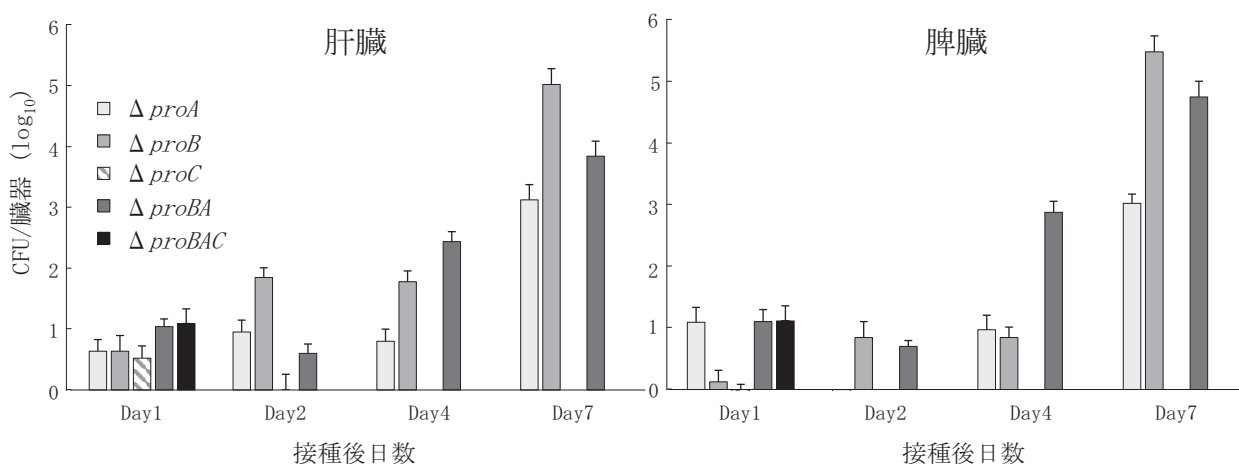


図4 プロリン合成遺伝子欠損株の作製のマウス生体内における増殖

での増殖能を調べたところ欠損株によってばらつきが見られたが、 $\Delta proC$ 株と $\Delta proBAC$ 株の増殖率が特に低下していた(図3)。プロリン合成遺伝子欠損株をそれぞれマウスに皮下接種し、接種後1、2、4、7日目に肝臓および脾臓から回収される菌数を測定した。その結果、 $\Delta proA$ 、 $\Delta proB$ 、 $\Delta proBA$ の3株は日数の経過とともに菌数が増加したが、 $\Delta proC$ 、 $\Delta proBAC$ を感染させたマウスでは接種2日目には菌が排除された(図4)。

4. プロリン合成遺伝子欠損株のマウスを用いた安全性及び防御試験

プロリン合成遺伝子欠損株の生ワクチン株としての安全性と防御能を検証するため、親株と各欠損株をマウス10匹に免疫した。その結果、 $\Delta proC$ 、 $\Delta proBAC$ 免疫マウスでは免疫後一切の臨床症状は見られなかった。

一方、 $\Delta proA$ 、 $\Delta proB$ 、 $\Delta proBA$ 免疫マウスでは免疫後8-11日目で被毛粗剛、食欲減退、結膜炎、関節炎などの症状を呈する個体が見られたものの全てのマウスが生存した。強毒株である Fujisawa 株を100 LD₅₀ である10³ cfu/匹で皮下接種し攻撃を行なった結果、全群全てのマウスが生存したが一部の $\Delta proC$ 免疫マウスで症状を呈する個体が見られた(表1)。

5. $\Delta proBAC$ 株の豚を用いた安全性及び防御試験

経口ワクチンは、その労力や動物福祉の観点において理想的なワクチン接種方法である。そこで、3、4のマウス試験の結果、安全性と防御能が最も高かった $\Delta proBAC$ 株を豚に経口投与し安全性と防御効果を評価した。一頭当たり10¹⁰ CFU/日になるよう菌液と人工乳を混合したものを二日間連続投与したが、豚に臨

表1 プロリン合成遺伝子欠損株のマウスを用いた安全性及び防御試験

群	免疫14日後の生存数	攻撃14日後の生存数
非免疫群	—	0/10
強毒株 (Fujisawa)	0/10	—
$\Delta proA$	10/10*	10/10
$\Delta proB$	10/10*	10/10
$\Delta proC$	10/10	10/10*
$\Delta proBA$	10/10*	10/10
$\Delta proBAC$	10/10	10/10

—: 該当なし、*: 一部のマウスで一時的に症状が見られた

床症状は認められず、体温も正常であった。投与後経時的に採血し、生菌発育凝集 (Growth Agglutination: GA) 試験により GA 抗体価が上昇していることを確認した。免疫から3週間後に強毒株を 10^8 CFU/頭で耳根部に皮下接種し攻撃を行った。攻撃後2週間観察したが、一切の症状を示すことなく防御した。安楽殺後、主要臓器 (扁桃、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、腸間膜リンパ節、関節液) 中に存在する豚丹毒菌数を計測し、PCR による解析を行った結果、臓器から分離され

たコロニーはすべて $\Delta proBAC$ 株であり、攻撃株は回収されなかった (表2)。また、1回免疫した場合も2回免疫時と同様に強毒株の攻撃を防御し、臓器から分離されたコロニーは全て免疫株であった (表3)。

6. 新規抗体検査法の開発について

一般的に、豚丹毒ワクチン未接種の農場において、豚丹毒菌に対する抗体価の高いブタが散見された場合、その農場は豚丹毒菌による高度な汚染が懸念される。

表2 $\Delta proBAC$ 株の豚を用いた安全性及び防御試験-2回免疫

Pig No.	臓器重量あたりの菌数 ($\log_{10}$ CFU/g) (攻撃株のコロニー数/検査したコロニー数)			
	扁桃	心臓	肺	腸間膜リンパ
1	6.71 (0/33)	—	—	—
2	6.67 (0/32)	—	—	—
3	6.08 (0/8)	—	—	—
4	6.65 (0/33)	—	—	—
5	6.30 (0/14)	2.65 (0/3)	—	—
6	7.44 (0/7)	4.27 (0/7)	2.96 (0/3)	—
7	6.55 (0/15)	—	—	—
8	6.96 (0/43)	3.39 (0/9)	—	—
9	6.80 (0/33)	—	—	3.11 (0/7)
10	5.02 (0/14)	—	—	—
11	5.31 (0/12)	—	—	—
12	6.86 (0/42)	3.01 (0/5)	—	—

血液、肝臓、腎臓、脾臓、肘膝関節液からは豚丹毒菌は検出されなかった

表3 $\Delta proBAC$ 株の豚を用いた安全性及び防御試験-1回免疫

Pig No.	臓器重量あたりの菌数 ($\log_{10}$ CFU/g) (攻撃株のコロニー数/検査したコロニー数)	
	扁桃	心臓
1	6.27 (0/10)	—
2	4.49 (0/14)	3.67 (0/21)
3	6.50 (0/12)	2.29 (0/1)
4	5.70 (0/12)	—
5	5.33 (0/7)	—
6	—	—
7	5.82 (0/28)	—
8	5.38 (0/14)	—
9	5.93 (0/41)	—
10	—	—
11	3.40 (0/12)	—

血液、肺、肝臓、腎臓、脾臓、腸間膜リンパ節、肘膝関節液からは菌は分離されなかった

その様な農場においては移行抗体の影響が少ない不活化ワクチンを使用して新たな感染を防止し、すでに感染しているブタについては治療を行う。一方、抗豚丹毒菌抗体価が低い農場においては移行抗体消失時期に免疫付与効果の高い生ワクチンを使用することで効率良く感染を予防することを目指す。したがって、各農場の状況に合わせた最適なワクチンの種類や接種時期、頻度を見極め、ワクチン接種による豚丹毒の予防効果を最大化するためには、家畜の抗豚丹毒菌抗体の保有状況を把握することが重要である。豚丹毒の抗体検査法として、上述の GA 試験があるが、判定のために生菌を培養する時間を要し、かつ無菌操作が必要なため手技も煩雑であるという難点がある。さらに、標準菌株として使用する Marienfelde 株は強毒株であり、人に感染する危険性があるため検査を逡巡する傾向もある。そこで、当グループでは安全で簡便かつ信頼できる豚丹毒菌の新規抗体検査 (ELISA) 法の開発を目指し、これまで蓄積してきたデータを元に抗原候補分子をコードする遺伝子を複数個選抜した。今後は、これらの遺伝子がコードするタンパク質を精製し候補抗原とし、豚丹毒菌弱毒株感染マウス血清を用いて ELISA を行い、候補抗原に対する抗体産生の有無や抗体価を比較検証する。さらに、野外分離株を用いた新規抗原候補タンパク質の発現状況の解析と、豚臨床血清を用いた実用性を検討し、新規の抗体検査法の開発を目指す。

7. おわりに

本研究では、豚丹毒に対する新規弱毒生ワクチンを効率的に開発するため、豚丹毒菌のゲノム収縮と呼ばれる遺伝的性質に着目して、菌の宿主への感染時に特異的に発現が上昇する遺伝子を同定した。豚丹毒菌の全ゲノム解析の結果、本菌が合成できるであろうアミノ酸はわずか7種類 (アラニン、アスパラギン、グルタミン、セリン、システイン、グリシン、プロリン) であり、アルギニン合成遺伝子はその一部を保持していることが明らかになった。本菌のアミノ酸生合成に関与する全14遺伝子の mRNA 発現レベルを調べた結果、宿主細胞を含まない培地での増殖時の発現レベルと比較して、7 遺伝子で有意な発現上昇が観察され、中でもプロリン合成遺伝子の発現が最も高かった。作製した5つのプロリン合成遺伝子欠損株の中で、 $\Delta proBAC$ 株はマウスを用いた試験においても最も安全性と防御能が高いことが示された。また、豚を用い

た試験において、経口投与により強毒株の攻撃に十分耐えうる免疫を付与できることが明らかとなった。

今回我々は、ゲノム収縮を起こした細菌が保持しているアミノ酸合成経路に着目することで病原遺伝子の同定に労する時間を大幅に削減する事ができた。本手法はゲノムが減少した細菌のみならず一部のアミノ酸合成経路を欠失している *Streptococcus* 属、*Bartonella* 属、*Clostridium* 属菌などの細菌に対する弱毒生ワクチン株の開発への応用も期待できる⁹⁾。また、新規の抗豚丹毒抗体検査法の開発に向けて、当グループが行った2つの網羅的解析の結果を利用し、新規 ELISA 抗原候補を選定した。今後はこれらの中から最適な抗原を探索する予定である。

本研究により、豚丹毒の予防における安全性の向上と制御の効率化に貢献したい。

8. 利益相反状態の有無

著者は開示すべき利益相反はない。

9. 謝辞

新規生ワクチンの開発については、農研機構の研究支援要員の雇用経費補助の助成を受けたものである。また、ELISA 抗原の探索については JSPS 科研費 24K23169 の助成を受けたものである。

10. 引用文献

- 1) Aida V, et al. (2021) Novel vaccine technologies in veterinary medicine: a herald to human medicine vaccines. *Front Vet Sci*, 8: 654289.
- 2) Meeusen EN, et al. (2007) Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev*, 20: 489-510.
- 3) Nishikawa S, et al. (2022) Rational design of live-attenuated vaccines against genome-reduced pathogens. *Microbiol Spectrum*, 10: 6
- 4) Ogawa Y, et al. (2011) The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *J Bacteriol*, 193: 2959-2971.
- 5) Yu X, et al. (2009) Amino acid biosynthesis deficiency in bacteria associated with human and animal hosts. *Infect Genet Evol*, 9: 514-517.