

第21回藤崎優次郎賞 受賞記念講演

豚丹毒菌のゲノム研究：新たな細菌病ワクチンと検査法の開発

下 地 善 弘（国立研究開発法人 農研機構・動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域）

Shimoji, Y. (2017). Genome analysis of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: development of novel bacterial vaccines and new diagnostic methods for the detection of the organism.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 70, 1-5.

キーワード：豚丹毒菌、ゲノム、進化と病原性、遺伝子型別、ワクチン

1. はじめに

豚丹毒は、グラム陽性細菌の一種、豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) の感染により起こる感染症である。この菌の歴史は非常に古く、1878年にドイツの Robert Koch により初めてマウスから分離され、その後、1885年にドイツの Friedrich Löffler により、豚丹毒の原因菌として同定されている。本菌の宿主域は極めて広く、鳥類やイルカなどの海棲哺乳類を含め、様々な動物種に感染し発症させることができる。産業的には豚の他、鶏、七面鳥での被害が大きく、わが国では、豚およびイノシシの本病は家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されている。豚における臨床症状は、敗血症として重篤な急性型、皮膚病変（蕁麻疹）の亜急性型、また、関節炎や心内膜炎を主徴とする慢性型に分けられる。本病は、と畜場法ではと殺及び解体禁止、全部廃棄の疾病であるため、予防対策が重要な疾病である。

本病に対しては有効なワクチンが早期に開発され、また、抗生剤による治療も効果的ではあるが未だに世界中で多く発生している。国内での本病の発生報告数は、1997～2007年頃までは毎年2,000頭以下で推移していたが2008年からは増加に転じており、近年は3,000～4,500頭の発生報告がある。

現在、著者の研究グループは豚丹毒菌を利用した新しいワクチンの開発研究の他、国内発生について分離菌の全ゲノム解析を基にした分子疫学解析を行っている。本稿では、本菌のゲノムが解読されて新たに得られた細菌学的

知見の他、ゲノム解析を基に我々の研究グループが開発した本菌の株レベルでの検出技術、また、著者らが開発した新しい豚丹毒生ワクチンについて紹介する。

2. ゲノムからみえる豚丹毒菌の進化と病原性

1) 進化

著者の研究グループは、2011年、豚丹毒菌のゲノム解読に初めて成功した⁴⁾。我々が解読した Fujisawa 株のゲノムのサイズは1,787,941bp であり、Firmicutes 門（グラム陽性の染色体DNAのGC含量が通常50mol%以下の細菌群）に属する細菌の中で最も小さく、細胞壁を欠くマイコプラズマのグループのゲノムサイズに近いことが明らかとなった⁴⁾（図1）。また、本菌ゲノムの細菌学的特徴として、本菌のゲノムはゲノム収縮に伴い、脂肪酸、ビタミン類、補酵素、アミノ酸（7種類のみが合成可能）等の栄養素の合成に関わる遺伝子の多くを進化の過程で失っており、豚丹毒菌はマイコプラズマと同様に栄養素のほとんどを宿主に依存する退行的進化をしていることが明らかとなった。以上

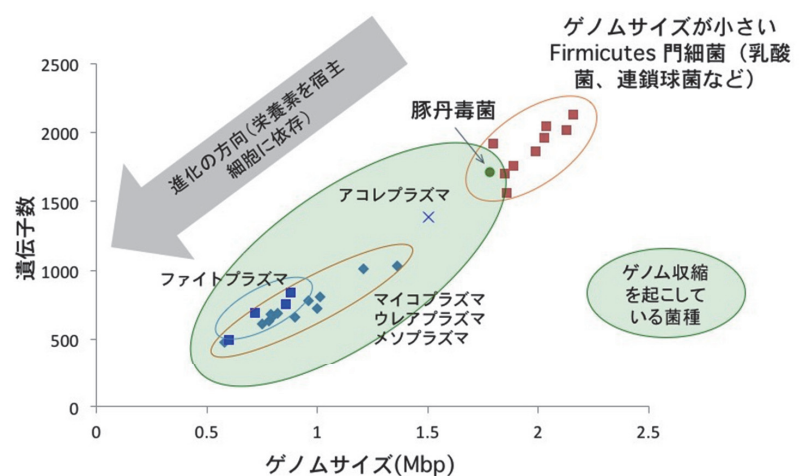


図1 ゲノムからみえる豚丹毒菌の進化：豚丹毒菌のゲノムサイズと他の菌種との比較

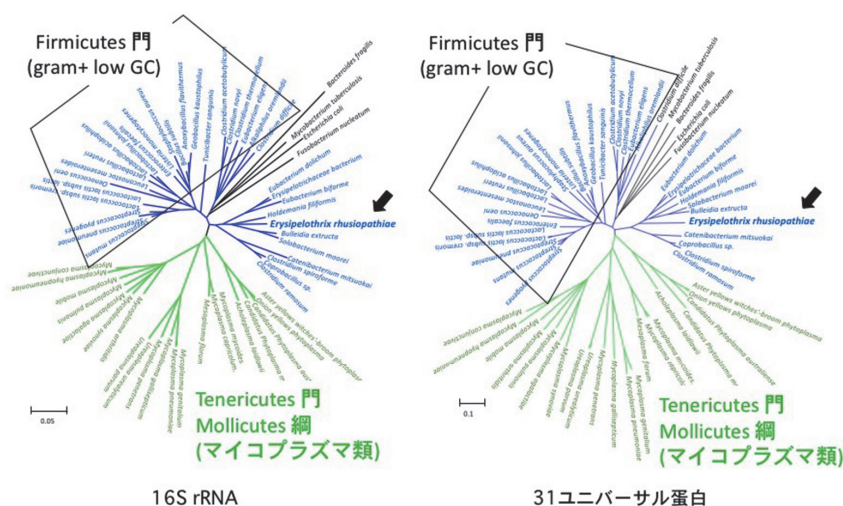


図2 豚丹毒菌の系統学的位置。現行の分類に従い、*Firmicutes* 門に属する細菌は青、*Mollicutes* 綱に属する細菌は緑、他（アウトグループ）は黒で示した。矢印は豚丹毒菌を示す。

のゲノム構造の類似性に加え、ゲノム配列に基づく分子系統学的解析からも、本菌はマイコプラズマ類に近縁であることが判明した⁴⁾ (図2)。また、豚丹毒菌はグラム陽性菌特有の細胞壁を完全に合成できないことも我々の研究で明らかになっている⁶⁾。このように、豚丹毒菌が *Firmicutes* 門に属する細菌と系統学的に離れた位置にありマイコプラズマに近縁であること、また、ゲノム構造が *Firmicutes* 門とマイコプラズマの両方の特徴を持つことは、マイコプラズマがグラム陽性菌から進化したとされる仮説³⁾ を考える上でも極めて興味深い。

2) 病原性

1994年、永らく不明であった豚丹毒菌の病原性の本体は莢膜であることが、著者らの研究で明らかとなった。本菌は、莢膜を保有することで食細胞に対して貪食抵抗性を示すばかりでなく、たとえマクロファージや好中球に取り込まれても細胞内で増殖することが可能になる。ゲノム解析と最新の核磁気共鳴 (NMR) 分光法を用いた構造解析から、本菌の莢膜多糖はフォスフォリコリン (PCho) によって分子修飾を受けていることが明らかとなり、PCho を発現できない変異株はマウスや豚に対して全く病原性を示さなくなることが新たに判明した⁶⁾。

また、本菌は食細胞内殺菌を回避するためのエスケープ機構として、食細胞内の殺菌物質である活性酸素から逃れるための抗酸化酵素遺伝子やファゴソーム等を構成する細胞膜を分解するためのフォスフォリ

パーゼ酵素遺伝子をそれぞれ9個ずつ持つことが明らかになった⁴⁾。このように、豚丹毒菌は食細胞内環境に適応する形で進化をする一方、他のグラム陽性の病原細菌と同様に、体内に侵入後感染を成立させるために重要と考えられている菌体表層の付着因子を多く発現する。これまで、本菌の重要な病原因子としてヒアルロニダーゼやノイラミニダーゼなどの菌体外酵素が報告されてきた。前者は組織への侵襲因子に、後者は菌の血管内皮細胞への侵入に関与すると考えられるが、ゲノム解析から、これらの酵素をコードする遺伝子は、それぞれ3及び2個存在することが判明した。このように、これらの重要病原遺伝子は進化の過程でゲノム上に重複して保存されてきたと考えられる。

3. 豚丹毒菌の遺伝子型別

1) PCR 法による国内流行株の簡易識別

世界中の様々な動物から分離された豚丹毒菌の大規模ゲノム解析から、本菌種は遺伝系統学的に多様性に富むことが判明している¹⁾。一方国内では、2008年以降、急性型及び亜急性型発生事例のほとんどから、ある特定の遺伝子型、すなわち、菌体表層抗原 SpaA タンパクの203番目のアミノ酸がメチオニントイプである血清型 1a の強毒株 (Met-203 SpaA タイプ株) が分離されている^{9),10)}。

著者らは、1990～2011年までに国内の急性型の豚丹毒発症豚から分離された血清型 1a 型の34株の全ゲノム配列を決定し、また、最近中国で全ゲノム配列が決定された2株について国内の株と比較した⁵⁾。その結

果、すべての国内株はクローナル (clonal) な集団であることが判明したが、その中でも2007年以降に流行している株は一つの集団を形成すること、また、それらは少なくとも九州と本州で別々に発生した後、さらにそれぞれの地域で流行したと思われる二つの亜集団に分類されることが判明した⁵⁾。興味深いことに、中国の1株は本州流行株と同じ亜集団に属することが判明したが、その疫学的な関連性は不明である。なお、現時点で国内での発生頭数増加の原因は不明であり、近年の流行株が2007年以前の株に比べて強毒化しているという知見も得られていない。

また、食肉衛生検査所等では、生ワクチン株に性状が類似した株が関節炎や心内膜炎罹患豚から分離されている。国内で使用される生ワクチンはアクリフラビン色素耐性の弱毒株 Koganei 65-0.15株 (血清型 1a) であるが、この株の形質マーカーとされるアクリフラビン色素耐性は継代により変化することから、関節炎病変部から分離される野外株の血清型がワクチン株と同じ1a型であった場合、この株が野生株であるか、ワクチン株であるかどうかの識別は困難となる。現在、細菌の種 (species) レベルでの同定はPCR法により簡単に行うことができるが、株 (strain) レベルでの同定は極めて困難であり、特に食肉検査所や家畜保健衛生所等の現場で行える手法は、皆無に等しい。

我々は、血清型 1a 型の野外分離株34株の全ゲノム塩基配列の多様性の中から、Koganei 65-0.15株のゲノム配列中のみで認められる塩基配列の違い、すなわち、一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) をPCR法により検出することで、本ワクチン株と野生株とを特異的かつ迅速に同定することができる技術を開発した⁷⁾。また、我々はさらに、同様の原理を用いて、2007年以降に流行している Met-203 SpaA タイプ株を検出できるPCR法を開発している。これまでの解析では、Met-203 SpaA タイプ株には1994年と2004年に分離された株が含まれることが判明していたが、この方法では2007年以降の流行株の集団のみを検出することが可能であり、さらに、2つの亜集団をも識別できる⁹⁾。

2) PCR 法による主要血清型の同定

豚丹毒菌は、細胞壁由来の耐熱性抗原と家兎血清を用いた寒天ゲル内沈降反応により、少なくとも1 (1a, 1b), 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21, 23型とその抗原を欠くN型に分類される (欠番の血清型番号は

近縁の別菌種)。豚丹毒罹患豚から分離される株の血清型は、そのほとんどが急性型に多い1型と慢性型に多い2型であり、その傾向は世界的に見ても同様である。現在、それらの血清型を決定する抗原は同定されておらず、またその病原学的役割も分かっていない。しかし、菌の病原性や本症の病理発生を理解する上で、その抗原の同定と機能を明らかにすることは重要である。また、野生動物における本病の発生報告では分離菌の血清型が同定されていないことが多く、臨床的に重要な1及び2型の血清型について抗血清を用いることなく同定できる技術を開発することは、自然環境下における本病の発生要因を調査する上でも必要となる。

現在、我々は、本菌の遺伝子機能のすべてを明らかにするために強毒株である Fujisawa 株 (血清型 1a) のゲノムに網羅的に変異を導入し、それに伴う表現形質変化の解析を行っている。これまでに、本株が持つ1,704個の遺伝子のうち700個以上の遺伝子について不活化したトランスポゾン変異株を作製した。そこで、血清型を決定する抗原を同定しその機能を解析するために、これらの変異株について寒天ゲル内沈降反応で抗1a型家兎血清との反応性を見たところ、複数の変異株で血清と反応しない変異株があることが判明した。遺伝子解析の結果、血清型 1a 型を決定している遺伝子群を同定することに成功し、現在では主要血清型である1a、1b、及び2型の判定はPCR法にて簡単に行えるようになった。

4. 新しいワクチンの開発

豚丹毒菌は豚に強い細胞性免疫を誘導する性質があることから、この菌の病原性を制御することができれば安全で効果の高い生ワクチンの開発が可能になる。我々は、前述の700株以上の遺伝子変異株ライブラリーについてマウス及び豚を用いてそれらの病原性をスクリーニング解析し、重要な病原遺伝子を同定することに成功した。同定された病原遺伝子、すなわち、CDP-グリセロールグリセロリン酸転移酵素遺伝子を欠損させた変異株 (以下、 $\Delta 432$ 株とする) は、豚丹毒菌に感受性が高い無菌豚に皮内接種してもまったく症状を起こさないほど安全性が高いことが判明した。また、ミルクと混合して豚に経口投与することで、現行の生ワクチン株と同等に血中抗体価を上昇させることも明らかとなっている。

現在、著者の研究グループは、一つのワクチンで複

数の感染症に対して効果を発揮するベクターワクチンの開発を行っている。これは、 $\Delta 432$ 株のように病気を起こさないように操作し安全性が確認された弱毒株に他の病原体の遺伝子を導入し、それを利用して病気をまとめて予防しようとするもので省力型ワクチンの開発を狙ったものである。2009年、著者らは、微生物化学研究所の大石英司博士との共同研究において、マイコプラズマのP97抗原を発現させた生ワクチン Ko-ganei 65-0.15株を用いて、豚丹毒と豚マイコプラズマ肺炎の両方に効果を示す経口投与型ワクチンの開発に成功している。本菌の“設計図”と言えるゲノムの解読が終了し、その情報を基に網羅的遺伝子機能の解析が進んでおり、さらに新しいワクチン開発への展開が可能になった。現在、著者らが行っている豚丹毒菌をプラットフォーム（基盤）としたベクターワクチン技術の開発研究が、将来、養豚衛生向上に貢献できることを期待したい。

5. おわりに

豚丹毒の発生は、畜産現場ばかりでなく自然環境下の野生動物においても問題となっている。昨年、カナダからアラスカ地方の寒帯地方から北極圏における広範な地域において、野生の偶蹄類動物の大量死の原因として本菌の関与が報告された²⁾。国内の急性型豚丹毒の発生の原因菌は遺伝学的に近縁であるが、興味深いことに、北米での大量死は、新しく出現したクロールナルな強毒株による感染死ではなく、気候変動等のストレスや他のファクターが原因の日和見感染症であることが分離菌のゲノム解析から明らかとなっている²⁾。本病発生の要因を明らかにするには分離菌の詳細な遺伝子解析が必要とされるが、著者らが開発した手法はその要因解析に大きく貢献できるものと考えている。

謝辞

今回、名誉ある日本豚病研究会藤崎優次郎賞の受賞に際し、ご推薦頂きました大石英司先生、細川みえ先生、選考委員の方々、豚病研究会役員に深謝いたします。本研究成果は、著者の現在の研究グループメンバー（小川洋介、白岩和真、江口正弘、西川明芳、野澤理恵子）をはじめ、これまでに直接研究に従事して頂いた仲間（施芳、槻尾麻奈絵、原田知享）と共同研究者、また、多くの職場関係者の支援により形となったものである。なお、一連の研究は農林水産省関連の予算により支援を受けた。この場を借りて謝意を表し

たい。

引用文献

- 1) Forde T, et al. (2016) Genomic analysis of the multi-host pathogen *Erysipelothrix rhusiopathiae* reveals extensive recombination as well as the existence of three generalist clades with wide geographic distribution. BMC Genomics, 17: 461.
- 2) Forde TL, et al. (2016) Bacterial Genomics Reveal the Complex Epidemiology of an Emerging Pathogen in Arctic and Boreal Ungulates. Front Microbiol, 7: 1759.
- 3) Maniloff J (2002) Phylogeny and Evolution. In: Razin S and Herrmann R, eds. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. p31-43, Springer, New York.
- 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) Ogawa Y, et al. (2017) Clonal lineages of *Erysipelothrix rhusiopathiae* responsible for acute swine erysipelas in Japan identified by using genome-wide single-nucleotide polymorphism analysis. Appl Environ Microbiol, 83: 11e00130-17
- 6) Shi F, et al. (2012) Capsular polysaccharide of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, and its modification with phosphorylcholine. Infect Immun, 80: 3993-4003.
- 7) Shiraiwa K, et al. (2015) Development of an SNP-based PCR assay for rapid differentiation of a Japanese live vaccine strain from field isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. J Microbiol Methods, 117: 11-13.
- 8) Shiraiwa K, et al. (2017) Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of clonal lineages of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serovar 1a strains currently circulating in Japan. J Vet Med Sci, in press.
- 9) To H, et al. (2012) Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from recent swine erysipelas outbreaks in Japan. J Vet Med Sci, 74: 949-953.

- 10) Uchiyama M, et al. (2014) Prevalence of Met-203 type spaA variant in *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates and the efficacy of swine erysipelas vaccines in Japan. *Biologicals*, 42: 109-113.