

## 次世代型豚丹毒ワクチンの将来展望

下地善弘、森 康行、宗田吉広、関崎 努、横溝祐一

(農林水産省家畜衛生試験場：〒305-0856 茨城県つくば市観音台3-1-1)

Shimoji, Y., Muneta, Y., Sekizaki, T. and Yokomizo, Y. (1998): Future prospects of next generation of *erysipelas* vaccine. *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 34: 8-11.

## 1. はじめに

豚丹毒はグラム陽性の豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) の感染によって起こる豚の伝染病で、急性型の敗血症や蕁麻疹、あるいは慢性型の関節炎や心内膜炎を引き起こす。また、この菌の宿主域は非常に広く、鳥類や水棲哺乳類を含む様々な動物に敗血症や関節炎などの疾病を引き起こす。ヒトでは類丹毒症と呼ばれる皮膚疾患のほか、まれに心内膜炎や敗血症を引き起こすことが知られており、人畜共通感染症の一つである。現在、豚丹毒ワクチンは生菌または死菌ワクチンが世界各国で広く実用化されている。生菌ワクチンは死菌ワクチンに比べて免疫持続期間が長く強固であり、一回の免疫で有効な感染防御能を誘導できる特徴がある。これまで、わが国ではアクリフラビン耐性弱毒株が生ワクチン株として用いられてきた。この株はアクリフラビンを添加した培地で継代することにより弱毒化させた変異株で、その弱毒化のメカニズムは不明である。これまでは、ある条件下で培養・継代して弱毒化させた変異株をワクチン株として用いる方法が生ワクチン株作出法の主流であり、このようにして作出されたワクチン株は疾病予防に大きな貢献してきた。しかしながら、これらの生菌ワクチンには必ず病原性の復帰という懸念すべき問題点があり、これが生菌ワクチンの克服すべき大きな課題であった。このため、これらの生ワクチンの開発には目的とする菌の病原性を分子レベルで解析し、病気を起こす役割を担っている遺伝子あるいは抗原を同定することが必要で、さらに、その遺伝子を不活化して病気を起こさない弱毒菌を作製する必要がある。また、使用される生ワクチン株は野外株と識別できることが望ましく、この場合目印となるマーカーが必要となってくる。

著者らは、これまで遺伝学的手法を用いて豚丹毒菌の病原因子の解析を行ってきた。その結果、本菌の強毒株は莢膜という物質を菌体表層に保有しており、そのことで白血球の認識から逃れ、さらに白血球に貪食されても細胞中で増殖することが本菌の病原性に深く関与することを初めて明らかにした<sup>1), 2)</sup>。また、その物質の生合成に関与する遺伝子を同定し、その遺伝子

を不活化して強毒株から弱毒変異株YS-1株を作製することに成功した。この株を使った感染防御試験の結果、この株は免疫したマウスや豚に感染防御能を与えることが明らかになった。YS-1株は遺伝子が変異しており、病原性が復帰する可能性がほとんど考えられないこと、また生ワクチンに必要な遺伝子マーカーを保有しており野外株との識別が容易であることから、生ワクチンの候補株として有力である。本稿では、豚丹毒の病原性に莢膜がどのように関わっているか概説する。また、莢膜欠損株YS-1株の生ワクチン株としての可能性について、これまでの著者らの研究成績について紹介するとともに豚丹毒ワクチンの将来展望について述べる。

## 2. トランスポゾンを使った病原因子の解析

トランスポゾンTn 916はテトラサイクリン耐性を持つ転移遺伝子で、異種細菌の染色体間を自由に移動することができる。このため、Tn 916がある細菌の染色体から別の細菌の染色体に移動すると、その細菌は新たにテトラサイクリン耐性の性質を示すようになるが、同じにTn 916が挿入した場所はその領域の遺伝子が破壊されるため、その菌は遺伝子変異菌となる。これらの変異菌は、Tn 916の挿入によって変異が起こった遺伝子以外はもとの菌と遺伝学的にまったく同じであること、また、破壊された遺伝子はTn 916を目印として比較的容易に見つけ出すことができることから病原因子の解析に非常に有用な道具になる。そこで、Tn 916を利用して豚丹毒菌の強毒株から弱毒変異株を作製し、その両菌株の性状を比較することでこの菌の病原因子の解析を行った。まず最初にTn 916を染色体上に保有する腸球菌CG 110株から豚丹毒菌強毒株のFujisawa-SmR株に接合伝達によりTn 916を転移させ、約6,000株の変異株を作製した。菌体の表層構造物が変化することで培地上のコロニー形態が変化することはよく知られており、その表層構造物の一つに莢膜がある。そこで、豚丹毒菌の病原因子が莢膜である可能性を考え、得られた変異株約6,000株の中から親株のFujisawa-SmR株と培地上のコロニー形態

が異なった数個の変異株を分離し、それらのマウスにおける病原性を解析した。実験の結果、コロニー形態が異なったこれらの変異株はいずれもマウスに対してまったく病原性がないことが判明した。さらに、変異株の一つ33H6株の染色体からTn 916が脱落してコロニー形態がもとに復帰した株(33H6-R株)は親株と同様にマウスに対して強い病原性を持つことも判明した。このことは、コロニー形態の変化は、ある遺伝子領域におけるTn 916の挿入が原因であること、また、33H6株においてTn 916が挿入して破壊された遺伝子はこの菌の病原性に関係する遺伝子であることを示している。さらに、電子顕微鏡を使った菌体表層の解析の結果から、親株と33H6-R株は菌体表層に厚い莢膜様の物質を保有している(図1)がコロニー形態が異なった変異株はいずれもその物質を欠失していることが確認された。

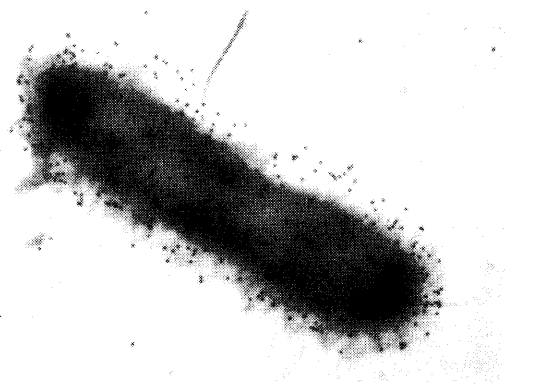


図1 金コロイド粒子標識法を用いた豚丹毒菌(Fujisawa-SmR株)の菌体表層に存在する莢膜の免疫電顕像

3. 無莢膜変異株の貪食抵抗能と食細胞内生残能  
莢膜は白血球の認識を逃れて貪食作用に抵抗する重要な病原因子である。そこで、弱毒化した変異株がこの性質を欠失しているかどうか確認するため、マウスの好中球(白血球の一種)を使って菌の貪食能試験を行った。その結果、正常血清存在下で親株と33H6-R株は強い貪食抵抗能を示したが弱毒変異株はいずれも貪食されることが判明した(図2)。この実験成績から、豚丹毒菌は莢膜を保有しておりそれによる貪食抵抗能がこの菌の病原性として重要であることが証明された。<sup>1)</sup>

ところで、本菌の病原性には食細胞(白血球)内生残能が示唆されてきた。そこで莢膜がこの性質に関与するかどうか確認するため、親株と無莢膜変異株とでマウスのマクロファージ(白血球の一種)内生残能を比較した。その結果、正常血清存在下で貪食された親株は貪食後3時間目には貪食直後の約2倍の細胞内生菌数を示し、この菌はマクロファージ内で増殖することが判明した。一方、貪食された無莢膜変異株はいずれも貪食直後からその細胞内生菌数は減少し続けて3時間目にはその数は有意に減少したことから、無莢膜変異株は細菌内で生残できないことが判明した。さらに、正常血清存在下における莢膜株のマクロファージ内生残機構の解析を行った。その結果、マクロファージに貪食された無莢膜変異株は食細胞の殺菌機構の一つである活性酸素を強く誘導して殺菌されるが、強毒株は活性酸素を誘導せずマクロファージによる殺菌から逃れることが明らかになった。<sup>2)</sup>このように、本菌の病原性の一つである食細胞内生残能にも莢膜が深く

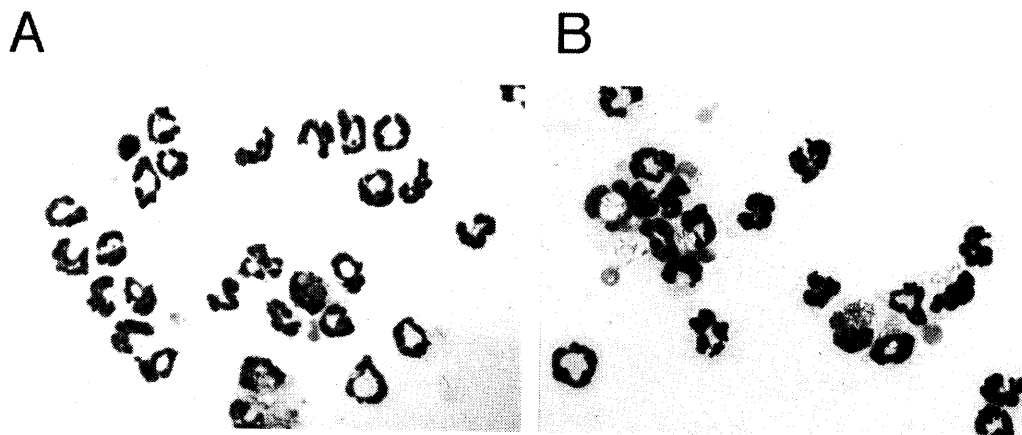


図2 マウス好中球による豚丹毒菌の貪食  
A: Fujisawa-SmR株; B: 33H6株  
Aでは貪食された菌はほとんど見られないが、Bでは多くの菌が貪食されている。

関与することが明らかになり、豚丹毒菌の病原因子として莢膜は非常に重要であることが判明した。

#### 4. 無莢膜変異株の生ワクチン株としての可能性

無莢膜変異株の生ワクチン株としての可能性を検討するため、Tn916の挿入により得られた無莢膜変異株の一つ33H6株を使ってマウスおよび無菌豚における免疫試験を行った。その結果、この株はマウスおよび無菌豚に対してまったく病原性を示さず、また強毒株の攻撃に対してもほぼ完璧な防御効果を示すことが判明した。Tn変異株である33H6株はTnが脱落する可能性があるためワクチン株としては使えない。そこで、新しいワクチン株を作製することを目的に、33H6株においてTn916の挿入により破壊された遺伝子を同定してクローニングし、その解析を行った。その結果、破壊された遺伝子は他の菌の莢膜の生合成に関係する糖転移酵素遺伝子と構造およびその塩基配列に類似する点が多く、その遺伝子もまた莢膜形成の過程において糖転移酵素として機能することが強く示唆された(未発表データ)。さらに、この遺伝子が変異し病原性が復帰することのない新しいワクチン候補株YS-1株を作製し、この菌の病原性と感染防御付与能をマウスを使って確認した。実験の結果、YS-1株はマウスに対して全く病原性を示さないが、免疫マウスには長期間にわたって強い感染防御能が持続することが明らかになった(表1)。<sup>3)</sup> また、YS-1株免疫マウスには免疫1週間後にリステリア菌などの異種菌に対しても感染防御能が見られるなど、細胞性免疫が誘導されることも明らかとなっている。SPF豚を用いて行っ

た感染防御能試験では、YS-1株免疫豚群は、現在日本で用いられている生ワクチン株の小金井株接種群や非免疫コントロール群よりも強毒株接種部位の発赤のサイズが有意に小さいことが示され、YS-1株の生ワクチン株としての有効性は実証されている(未発表データ)。また、YS-1株と野外株とを区別するため変異した遺伝子領域を基に設計したプライマーを用いてPCR法を行ったところ、この株は実験に使用した野外株すべての識別が可能であったことから、生ワクチン株に必要なマーカーがPCR法により簡単に検出できることが示された。このPCR法は著者が先に報告した豚丹毒菌の特異的検出法<sup>4)</sup>と組み合わせると、YS-1株の特異的検出法は極めて確実な方法になるであろう。

#### 5. 次世代型豚丹毒ワクチンの将来展望

豚丹毒に対するワクチンにはこれまでの生ワクチンの他に、新たに海外から輸入・販売される死菌ワクチンがある。生菌ワクチンの特徴として、死菌ワクチンに比べて免疫持続期間が長く強固であり、一回の免疫で有効な感染防御能を誘導できることがあげられる。しかしながら、感染防御に抗体が重要な役割をする豚丹毒のような感染症において母親から移行抗体を受け継いだ哺乳豚ではそのワクチン効果が見られない場合が多い。一方、死菌ワクチンにはその安全性や移行抗体を持った哺乳豚でも使用できることなど、生菌ワクチンにはない利点もあるが、一回の免疫で十分なワクチン効果を期待できないという欠点もある。このように、いずれのワクチンにもそれぞれ問題があり、両者

表1 豚丹毒菌YS-1株免疫マウスの感染防御能

免疫	攻撃時期 (免疫後)	免疫菌数	生存数 (試験数)
YS-1	21日	$2 \times 10^8$	10/10
		$2 \times 10^7$	10/10
		$2 \times 10^6$	10/10
		$2 \times 10^5$	10/10
		$2 \times 10^4$	10/10
コントロール			0/10
YS-1	2カ月	$2 \times 10^8$	7/7
コントロール			0/7
YS-1	3カ月	$2 \times 10^8$	7/7
コントロール			0/8

YS-1株を皮下免疫後に50%致死量の100倍量のFujisawa-SmR株で攻撃した。生存数は攻撃後4週間目の成績。

の利点のみを合わせ持った完璧なワクチンの開発は今後の研究課題である。

ところで、これまで欧米をサルモネラ菌などの遺伝子組換え弱毒菌をベクターとした多価ワクチンの開発研究が盛んに行われている。これは生ワクチン株の染色体DNAやプラスミドDNAに他の病原体の遺伝子を組み込み、このワクチン株に他の病原体の感染防御に重要な抗原を発現させて免疫するという方法で、一回のワクチン投与で複数の疾病に対し免疫することをねらったものである。この方法は、経済性が問題となる畜産分野におけるワクチン法としては非常に有望な方法であるが、これには安全かつ十分な感染防御を与えることのできる生ワクチン株の開発が必須である。この点、今回紹介した豚丹毒菌の無莢膜変異株YS-1株は動物に対して極めて安全であること、また、サルモネラ菌と同様に細胞性免疫を誘導できる菌であること、さらに、豚丹毒菌は経口投与型ワクチンとしても使用することが可能であることを考え合わせると、YS-1株は経口投与型の多価ワクチンベクターの候補株として魅力ある研究材料である。現在、著者はYS-1株の菌体表面に他の病原体の抗原を発現させるための研究を行っており、将来この株をワクチンベクターとして用いることを検討中である。

#### 参考資料

- 1) Shimoji, Y. et al. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. *Infect. Immun.* 62: 2806-2810 (1994)
- 2) Shimoji, Y. et al. Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. *Infect. Immun.* 64: 1789-1793 (1996)
- 3) Shimoji, Y. et al. Construction and vaccine potential of acapsular mutants of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: use of excision of Tn916 to inactivate a target gene. *Infect. Immun.* 66: 3250-3254 (1998)
- 4) Shimoji, Y. et al. Use of an enrichment broth cultivation-PCR combination assay for rapid diagnosis of swine erysipelas. *J. Clin. Microbiol.* 36:86-89 (1998)