

201123061A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

野兎病菌亜種間の病原性相異および動物種間の  
野兎病感受性の相異に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 堀 田 明 豊

平成24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

野兎病菌亜種間の病原性相異および動物種間の  
野兎病感受性の相異に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 堀 田 明 豊

平成24 (2012) 年 3 月

## 目次

|  |    |
|--|----|
| I. 総括研究報告書<br>野兔病菌亜種間の病原性相異および動物種間の野兔病感受性の相異に関する研究<br>堀田明豊 | 1  |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表   | 33 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷   | 35 |

# I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
総括研究報告書

野兎病菌亜種間の病原性相異および動物種間の野兎病感受性の相異に関する研究

研究代表者 堀田 明豊 国立感染症研究所獣医科学部 主任研究官

研究要旨 動物由来感染症、野兎病の起因菌、*Francisella tularensis* はグラム陰性の通性細胞内寄生菌である。本菌は2種指定病原体で、感染性が高く、バイオテロへの使用が危惧されている。日本分離の *F. tularensis* 株は欧米由来の株と遺伝学的性状が異なるが、その詳細は明らかでない。国立感染症研究所には国内外で分離された多数の *F. tularensis* 株が保有されているが、その病原性解析はされていない。近年、国内の斃死ノウサギより新たに *F. tularensis* が2株分離された。このためこれら新鮮分離2株を含む保有51株の病原性比較を目的に各種性状を解析した。グリセロール発酵試験、エリスロマイシン感受性試験および遺伝子解析により保有株は5つの亜種および生物型に、また少なくとも6つの genotype に分けられることが明らかになった。またアクリフラビン反応、補体感受性試験、リポ多糖体に対する抗体の反応、RD18 および 19 の PCR 増幅産物の泳動像から7株は弱毒化していると考えられた。またマウス感染実験より各亜種の代表株である Schu および LVS の病原性は著しく弱毒化していると考えられた。弱毒化株を除いた43株について J774.1 細胞における細胞内増殖性を比較検証したところ、菌液接種後2と24時間の細胞内の菌量の増減から、細胞内非増殖性（30株）、低増殖性（8株）および高増殖性（5株）の3グループに分けられた。細胞内非増殖性であった10株をマウスに腹腔内接種したところ、全株がマウスに非致死性であった。細胞内低増殖性であった3株をマウス腹腔内接種したところ、マウスは体重減少や斃死し、病原性を示したが、皮内接種では非致死性であった。新規分離2株を含む細胞内高増殖性であった全5株は  $10^2$ cfu 皮内接種においても全8匹のマウスを斃死させた。新鮮分離の NVF1 株は極めて病原性が高かったが人工培地で継代したところ、その細胞内増殖性は継代20代で低増殖性、30代で非増殖性に変化した。細胞内非および低増殖性の株の病原性は既報の海外由来株の病原性解析の報告と大きく異なった。細胞内増殖性の測定は病原性指標になると考えられた。以上より、海外由来全15株を含む保有 *F. tularensis* 46株は弱毒化されていると考えられ、その原因は人工培地による継代の可能性が示唆された。このため本研究の目的である野兎病菌亜種間の病原性相異の解析は困難であると考えられた。今後、日本国内への *F. tularensis* 侵入、バイオテロ対策にむけ、新たに本菌病原株を海外の研究機関より輸入する必要がある。

研究協力者

Sharma Neekun

藤田 修 国立感染症研究所獣医科学部

国立感染症研究所獣医科学部

宇田晶彦 国立感染症研究所獣医科学部

岐阜大学大学院連合獣医研究科

山本美江 国立感染症研究所獣医科学部

棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部室長

## A. 研究目的

野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は動物由来感染症、野兎病 (4類感染症) の起原菌である。野兎病は欧米では毎年 100 例以上の症例報告がある。ヒトは感染ノウサギやげっ歯類との直接接触、ダニや蚊等の吸血性節足動物の媒介、汚染食物や水、汚染塵芥の吸入等により感染する。ヒトの症状は菌の侵入部位により様々であるが、多くは急性の発熱を伴う。動物は種により感受性が異なる。マウスやノウサギなどは感受性が高く本菌感染は致死的であるが、他の動物種は比較的耐性である。

*F. tularensis* は感染性が高いこと、適当なワクチンがないこと、環境中に広く分布することからバイオテロへの使用が危惧されている。2 種病原体で取扱や移動は制限されているため国内の研究者は極めて少ない。本菌は好気性通性細胞内寄生のグラム陰性小桿菌で、3 つの亜種、subspecies *tularensis*、*holarctica* および *mediasiatica* に分類される。ヒトへの感染は ssp. *tularensis* および *holarctica* が報告されている。ssp. *tularensis* は北米に分布し、病原性が強い。ssp. *holarctica* は北緯 30 度以北、特に北米、ユーラシアに分布し、病原性は比較的弱い。ssp. *mediasiatica* は中央アジアでのみ分離されていて、感染例は動物のみである。ssp. *holarctica* はさらに 3 つの生物型、biovar I、II および *japonica* に分類される。日本国内分離株は biovar *japonica* と考えられているが詳細な解析はされていない。また、これら亜種、生物型間の性状相異についての詳細な解析は進展していない。

日本国内における野兎病は江戸時代の記録が最古と考えられている。その後 1924 年の大原八郎による症例報告から野兎病研究は進展した。これまで東北地方を主に 1,400 程の症例がある。近年では野兎病症例はまれで、新たな株の分離報告もないため、国内における本菌の研究は進展していないが、2008 年に 9 年ぶりに野兎病症例が報告され、5 例の患者が診断された。それに伴い感染源のノウサギから菌が分離された。さらに 2009 年には研究代表者が所属

する研究室において秋田県で発見された斃死ノウサギから菌が分離された。これにより野外株を用い、*F. tularensis* の病原性に関する研究ができる材料が整ったため、本研究課題では新鮮分離株と既存の保存株の一般性状、遺伝子性状および病原性を比較解析した。

## B. 研究方法

### 1. 供試野兎病菌株

*Francisella tularensis* subsp. *tularensis* 3 株 (38, BH8859 および Schu)、*F. tularensis* subsp. *holarctica* 45 株 (Aichi, Azumaya, Chiba, C.M.V. 103, Ebina, GIEM Miura, Hashimoto, Himizu, Hitosu, Ito, Jap, Kato, Kawamata, Kf 71, Kf water #23, Kikuchi, Kokuchi, LVS, Metomo, Mitsuo, Murayama, Naomatsu, Nikaido, N9, N19, N335-64, N503, N1915, Oniwa, Ootake, RV, Sami, Sashige, Shinomura, Suzushichi, Takahashi, Tateyama, TI, TH, Tsuchiya, Tungliao, Yama, Yato11, Yato96 および Yato107) および *Francisella novicida* (U112) は大原研究所藤田博士より分与された。KU-1 株は北里大学獣医学部佐藤教授より分与された。NVF1 株は 2009 年に秋田県にかほ地方にて発見された斃死ノウサギより当研究室にて分離された株である (表 1)。これらの菌はすべて 1% (w/v) スキムミルク 10% (v/v) グリセロール溶液に懸濁し、 $-80^{\circ}\text{C}$  に保存した。

### 2. *F. tularensis* の培養

8% 綿羊脱繊血を加えた Eugon (BD) 寒天培地を加温し作製した Eugon チョコレート寒天培地に、超低温冷凍庫に保存の *F. tularensis* を塗布し、 $37^{\circ}\text{C}$  下にて 2~3 日培養した。本菌は P3 レベルの病原体であるため、ワクチン株である LVS 以外の株は全て国立感染症研究所戸山庁舎内の BSL3 施設で取り扱った。BSL3 施設からの菌体の搬出時は 10 分間の煮沸殺菌、または 0.5% フォルマリン生理食塩水 (大塚製薬) に懸濁し  $37^{\circ}\text{C}$  一晩おいて菌を不活化した。

### 3. アクリフラビン反応

*F. tularensis* 各株のフォルマリン不活化菌液 (OD600 値 1 に調整) と 0.1% (w/v) アクリフラビン溶液をスライドガラス上にて 20  $\mu$ l ずつ滴下混合し、各菌株の自家凝集性を確認した。混合後 1 分以内に凝集した場合を強陽性、1-3 分に凝集した場合を弱陽性とし、他を陰性と判定した。

#### 4. 補体抵抗性試験

新鮮モルモット血液を採血後、室温にて凝固させ、低速遠心にて血清を得た。血清は 1ml ずつ分注し、使用時まで -80°C に保管した。試験時は血清を融解させた後、500  $\mu$ l ずつ 2 本のチューブに分注、1 本を 56°C 30 分にて非働化、1 本を氷上にて保存した。それぞれの血清を Minimum Essential Medium Eagle (Sigma) にて 10% (v/v) に調整し、同量の *F. tularensis* 株菌液と混合し、37°C、90 分間ローテーター上にて転倒混和し感作させた。感作後、それぞれの試料を colony forming unit (cfu) 測定のため希釈し 37°C で 3 日培養した。未処理血清と混合した菌液の cfu が非働化血清と混合した菌液の cfu の 10% 未満であった株を補体感受性として判定した。

#### 5. *F. tularensis* の DNA 抽出

加熱処理 (94°C 10 分間) により不活化した *F. tularensis* から核酸抽出剤セパジーン (三光純薬株式会社) を用いて核酸を抽出した。その後、定法に従ってエタノール沈殿を行った。抽出核酸溶液は RNase にて 37°C にて 30 分処理後、セパジーンにて同様に DNA を抽出、精製した。すなわち、DNA 溶液に 1/10 容量の 3 M 酢酸ナトリウムおよび DNA 溶液同量のイソプロパノールを加え、均一に混和し、-30°C で 30 分静置した後、14,000  $\times g$  で 15 分間遠心し、上清を除去した。70% 冷エタノールを適量加え、14,000  $\times g$  で 5 分間遠心した後、上清を除去した。軽く風乾後、TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) を加え溶解し、DNA 溶液とした。DNA 溶液の濃度および純度は、分光光度計 (Nano drop, Amersham-Pharmacia, Tokyo) にて測定した。

#### 6. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) およびアガロースゲル電気泳動

野兎病菌の RD 遺伝子欠損領域 (RD1、3、6、7、16、18、19 および 23) および野兎病菌の病原性に関連すると報告されている 9 遺伝子 (*acrB*, *dnaK*, *igIC*, *katG*, *kdtA*, *mgIA*, *sspA*, *toIC* および *wbtI*) を標的にした PCR を行なった。PCR は反応液 20 ml 中に最終濃度 Blend Taq  $\text{\textcircled{R}}$  0.5 units、10 $\times$  Blend Taq buffer 2 ml、デオキシヌクレオシド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphate ; dNTP) 1.6 mM、各領域増幅用 forward プライマーおよび reverse プライマー (表 2) 0.5  $\mu$ M とした。増幅反応は、変性反応 94°C 30 秒、annealing 反応 54°C 30 秒、伸長反応 72°C 1 分を 30 サイクルおこなった。電気泳動は、1.2% (w/v) アガロース含有 TAE ゲルでおこない、泳動緩衝液には TAE を用いた。分子量マーカーには Gene Ladder Wide 2 (ニッポン・ジーン) を用いた。電気泳動により認められた増幅産物の分子量の相異から Svensson K (2005) らの報告に従い保有 *F. tularensis* 株の genotype を判別した。

7. ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE)  
分離ゲル 12.5 % e-pagel (ATTO, Kanagawa) を用いた。泳動抗原は全菌体を適量の生理食塩水に懸濁し、等量の 2 $\times$  サンプルバッファー (Bio-Rad) と混合後、5 分間煮沸した。分子量マーカーとして Precision Protein Standards (Bio-Rad, CA) または WIDE-VIEW<sup>TM</sup> Prestained Protein Size Maraker (Wako) を用いた。電気泳動は泳動用緩衝液 (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% SDS) を用い、ゲル 1 枚当り電流 18mA にて行った。

#### 8. ウエスタンブロット法

##### (1) 転写

試料を SDS-PAGE により展開後、直ちにポリアクリルアミドゲルから、Polyvinylidene fluoride (PVDF) (Immobilon P: Millipore) 膜へ転写した。PVDF 膜は用いる前に、純メタノールに浸した後、転写緩衝液 (100 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol) に 10 分間浸

して振盪させ、緩衝液になじませた。転写は AE8155 (ATTO) を用いて 20V で 45 分間通電した。

## (2) 抗体結合反応

抗原の PVDF 膜への転写終了後、PVDF 膜を 0.1% Tween 20 含有 PBS (PBST) で洗浄後、3% スキムミルク含有 PBST に浸し、ブロッキングした。1 次抗体 (*F. tularensis* 免疫マウス、*F. tularensis* 免疫ウサギ血清 または抗 LPS モノクローナル抗体 clone FB11 または M14B11) (2,000 倍希釈) を室温で 60 分あるいは 4°C で 18 時間反応させた後、PBST で 5 分間 3 回振盪洗浄した。次に、2 次抗体である HRP 標識抗マウス IgG またはウサギ IgG (ともに 8,000 倍希釈) を室温で 60 分反応させた後、再び PBST で 5 分間 3 回振盪洗浄した。3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride tablet (Wako) および過酸化水素水にて発色させ観察した。

## 9. グリセロール発酵試験

糖分解試験用培地 (組成を表 3 に示す) にグルコースまたはグリセロールを 1% (w/v) に調整した。各株菌液を接種し、37°C 3 日培養後の培地の色が青緑から黄色に変色したものをグリセロール発酵能陽性とした。対照としてグリセロールの代わりにグルコースを調整した培地に菌を培養し変色を観察した。

## 10. エリスロマイシン感受性試験

Etest により各株のエリスロマイシン感受性を比較した。各株を Eugon チョコレート寒天培地で培養後、改変 Mueller-Hinton broth にて 2 代継代し、1ml ずつ -80°C に保管した。試験時は再度、保管菌液を改変 Muller-Hinton 液体培地に 37°C 4 時間振盪培養後、培養液を滅菌綿棒にてチョコレート (II) 寒天培地 (BD) に塗布した。塗布 3-5 分後に E test ストリップを培地上に静置した。37°C、2 日培養後に阻止円が形成されない株をエリスロマイシン耐性とした。Quality Control として *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 を用いた。

## 11. 代表株のマウスへの病原性確認実験

*F. tularensis* 代表 4 株 (LVS、Schu、38 および Yama) ならびに *F. tularensis* の近似菌であ

る *F. novicida* 代表株 (U112) のマウスに対する病原性を確認した。BALB/c♂ の 6 週齢マウスに  $10^2$  cfu 腹腔内接種した。毎日定時に体重測定および症状の観察をした。接種時の体重より 5% 減少した個体を体重減少と判定し、20% 減少した個体については動物愛護の観点より安楽殺した。

## 12. 増殖曲線

Eugon チョコレート寒天培地に 2 日培養した *F. tularensis* を生理食塩水に懸濁し OD600 値 1.2 に調整した。調整した菌液 150  $\mu$ l を 3ml の Chamberlain's defined medium (CDM) (Chamberlain R.E. 1965)、改変 Mueller-Hinton broth (BD) (2% (v/v) IsoVital X [BD], 0.1% (w/v) グルコース, 0.025% ピロリン酸鉄) 培地 (Baker C.N. 1985) または 10% FBS 含有 RPMI1640 (Sigma) で 37°C、200rpm にて振盪培養した。培養 15 時間後まで OD 値を、また培養 12 時間後までの cfu を 3 時間毎に測定した。cfu 測定は試料 20  $\mu$ l を 180  $\mu$ l の生理食塩水に希釈し、10 倍段階希釈にて行った。

## 13. *in vitro* 感染実験

### (1) 培養細胞

マウスマクロファージ様 J774.1 (RCB0434, RIKEN Cell Bank) を用いた。培養は 10% ウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) (Invitrogen) 加 RPMI1640 (Sigma) を培地とし、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。継代培養は 3-5 日おきにした。感染実験用の細胞調整時には  $10^5$  cells/ml、phorbol 12-myristate 13-acetate を最終濃度 1  $\mu$ M に調整し、3 日培養後に感染実験に用いた。

### (2) *F. tularensis* の感染

Eugon チョコレート寒天培地に 2 日培養した *F. tularensis* を生理食塩水に懸濁し、OD600 値 1.2 ( $10^9$  cfu/ml 相当) に調整した。調整菌液を RPMI1640 にて 10 倍希釈し、24 ウェルプレート 1 穴に 100  $\mu$ l ずつ滴下し、37°C にて 5% CO<sub>2</sub> 存在下で 10 分毎にティルティングし、1 時間感作させた。その後、50  $\mu$ g/ml ゲンタマイシン含有 RPMI1640 にて 2 回洗浄後、10  $\mu$ g/ml ゲンタマイシン含有 10% FBS-RPMI1640 にて培養した。各接種菌液は  $10^{4-7}$  希釈し cfu を測定し、moi を



算定した。一部の株については感作を遠心吸着 (1,000 x g, 30 分) および、30 分の静置とし、強制的に感染させた。

#### (3) 細胞の可溶化と cfu 測定

野兔病菌接種後一定時間培養した細胞より培地を除去し、生理食塩水にて洗浄した。各ウェルに 1% (w/v) サポニン D.W. を 100  $\mu$ l 入れ、室温 5 分にて細胞を可溶化した後、900  $\mu$ l の生理食塩水を加え、1ml/well とした。その  $10^0$  および  $10^2$  希釈または  $10^1$  および  $10^3$  希釈液より cfu を算定した。

#### (4) 蛍光抗体法

細胞内増殖が認められた野兔病菌の増殖像の確認のためチェンバースライド上に J774.1 細胞を培養し、菌接種後、各時間の菌の分布を蛍光抗体法により観察した。培養細胞は PBS で 2 回洗浄し、4%パラフォルムアルデヒド含有 PBS にて 30 分浸漬し固定した。固定した細胞は PBS で 2 回洗浄後、10%ヤギ血清含有 PBS にて希釈した Alexa Fluor 350 標識 Yama 免疫ウサギ血清 (Molecular probes 社、Zenon Rabbit IgG Labeling Kit により標識) に 30 分反応させた。5 分 3 回 PBS で洗浄後、4%パラフォルムアルデヒド含有 PBS に 15 分浸漬し固定した。PBS で 2 回洗浄後、0.2%Triton X-100 含有 PBS にて J774.1 細胞を可溶化させた。5 分 3 回 PBS で洗浄後、10%ヤギ血清含有 PBS にて希釈した FITC 標識 Yama 免疫ウサギ血清を 30 分間反応させた。PBS で 2 回、DW で 1 回洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察した。細胞の対比染色にはエバンスブルーを用いた。

### 1.4. 代表株以外の株のマウス感染実験

#### (1) 病原性確認実験

各株の病原性の有無の確認のため、腹腔内接種にてマウス感染実験を行った。*F. tularensis* 13 株 (BH8859、Kf water#23、Kf 71、N9、N1915、C. M. V. 103、Chiba、Ebina、GIEMMiura、Kato、KU-1、Nikaido および NVF1)  $10^{1\sim3}$ cfu/100  $\mu$ l に調整した菌液を C57BL/6JmsSlc (日本 SLC) の 6 週齢マウスに腹腔より接種した。接種後、接種液は cfu 測定に供した。各群 3 匹のマウスを使用し、接種後 6 日目まで毎日体重測定、観察した。

#### (2) 病原性比較実験

長期間経過観察し、病原性比較することを目的に、菌をマウスに皮内接種した。接種前日に C57BL/6JmsSlc (日本 SLC) の 6 週齢マウスの背部の体毛を除毛クリームにて処理し、水で湿らせた脱脂綿にて拭き取った。注射部位を消毒用エタノールで消毒した後、各株を  $10^2$  および  $10^3$  cfu / 20  $\mu$ l に調整し、菌液を 8 匹ずつに接種した。接種後、毎日定時に体重測定し、21 日目まで観察した。

### C. 研究結果

#### 1. 分類に関する解析

##### 1-1. グリセロール発酵試験

*F. tularensis* ssp. *tularensis* はグリセロール発酵能を有すが、ssp. *holarctica* はない。しかし日本分離株は弱いグリセロール発酵能を有すとされ、一般性状による本菌の分類手法のひとつとして考えられている。このため保有株のグリセロール発酵試験を行った。培養 3 日後、38、BH8859 および Schu 株の培地の色調が青から黄に変色した。一方、他 48 株を塗布した培地では著しい変色は認められなかった (図 2)。対照のグルコースを入れた培地では全ての株が増殖し培地の青から黄への変色を認めた (表 4 に要約)。

##### 1-2. エリスロマイシン感受性試験

チョコレート (II) 寒天にて 2 日培養後の各株の発育阻止円と Etest ストリップの指示の交点より MIC を判定した。N9、N19、N503、N1915、C. M. V. 103、LVS および RV は Etest ストリップ周囲にも発育し、阻止円を形成しなかった。このためこれら 7 株はエリスロマイシン耐性と判定した。他 44 株の MIC は 0.125 から 2 であったため、エリスロマイシン感受性と判定した (表 4 に要約)。

##### 1-3. 分子生物学的手法による分類

各 PCR にて供試株の PCR 産物は電気泳動よりいくつかの異なる分子量の産物が増幅されたことが明らかになった (図 7 および 8)。RD1 の PCR では約 900、1,100、1,500bp のバンドが、RD7

の PCR では約 400、700、2,000bp のバンドが認められた。RD3 の PCR では約 600bp、RD6 の PCR では約 500bp のバンドが多数の株から増幅されたが RD3 では 38 に、RD6 では Schu および BH8859 にバンドが認められなかった。RD16 の PCR では Schu および BH8859 に約 600bp のバンドが認められ、他の株からは約 200bp のバンドが認められた。RD23 の PCR では、N335-64 から約 1.2kbp のバンドが認められたが他の株からは認められなかった。これらの結果は表 5 に要約する。

## 2. 病原性に関する解析

### 2-1. アクリフラビン反応試験

*F. tularensis* 海外由来の C. M. V. 103、LVS、N19、N503、RV および Tungliao 株、ならびに日本分離の Jap 株がアクリフラビン溶液と混合後、短時間で凝集像を呈した。このためこれらの 7 株を強陽性と判定した (図 1)。また Schu、Ootake はこれら 7 株と比較すると時間を要したが、凝集像が認められた。このため、これら 2 株を弱陽性と判定した。他 40 株は混合 3 分後も凝集像が認められなかったため、アクリフラビン反応陰性と判定した。(表 3)。

### 2-2. 補体抵抗性試験

56°C30 分による補体非働化処理と未処理血清と混合した菌液の cfu を比較した。LVS、N19、N503、C. M. V. 103、Tungliao および Jap 株の未処理血清混合菌液の cfu が非働化処理血清混合菌液の cfu の 10 倍未満であったため、それらの株は補体感受性と判定した。一方、他の株の cfu は未処理血清と非働化血清混合菌液の間で著しく異ならなかった。このためそれらの株は補体抵抗性と判定した (表 3)。

### 2-3. 免疫学的解析

*F. tularensis* 免疫血清および LPS 認識モノクローナル抗体の各株への反応をウエスタンブロットにて解析した。免疫血清の反応は株間で部分的にいくつか異なった。しかし亜種生物型間で共通に異なるような点は認められなかった。LPS 認識モノクローナル抗体の反応は RV、

N503 および Tungliao に対して極めて弱く、他の株で認められる様な LPS 特有のラダー状のバンドは認められなかった (一部の結果を図 4 に示す)。

### 2-4. 分子生物学的手法による変異株の探索

各株から RD18 および 19 に設定したプライマーにより得られた PCR 産物の分子量を比較した。弱毒化ワクチン株である LVS はこれらの PCR の増幅産物の泳動により約 500bp にバンドが認められた (図 9)。バンドが 500bp 付近に認められなかった株では RD18 で 2,000bp、RD19 で 1,000bp のバンドが認められた。

### 2-5. 病原性関連遺伝子の存在の確認

既報の *F. tularensis* の病原性に関与する 9 遺伝子 (*acrB*, *dnaK*, *iglC*, *katG*, *kdtA*, *mgIA*, *sspA*, *tolC*, および *wbtI*) を増幅する PCR により各株の遺伝子保有状況を確認した。各遺伝子を標的とした PCR の増幅産物を電気泳動したところ、供試全株にてそれぞれ想定される分子量のバンドが認められた (データ示さず)。

### 2-6. 各種各亜種代表株のマウス病原性

*F. tularensis* ssp. *tularensis*、ssp. *holarctica* および *F. novicida* の代表株である Schu、38、LVS および U112 株を接種したマウスは  $10^2$ cfu の腹腔内種で全く症状を示さず、接種 21 日後まで生残した。38、LVS および U112 株については  $10^4$  または  $10^6$ cfu を接種したが、同様にマウスに症状は認められず、生残した。Schu 接種マウスのうち  $10^6$ cfu 接種マウスは接種 2 日後に立毛、体重減少を認めたが斃死に至らなかった。日本分離の代表株である Yama 株  $10^0$ cfu 接種群は接種 3 日後に立毛、4 日後に著しい体重減少が認められ、5 から 6 日後に斃死した (表 6、図 14)。

### 2-7. 増殖曲線の作製

CDM および改変 Muller-Hinton 培地における NVF1、Chiba、Ebina、Himizu、Nikaido および Hitosu の 6 株の OD600 値および cfu を測定した。

cfu は両培地において全 6 株が培養 6 から 9 時間の間に急激に増加した。培養 9 から 12 時間の間では Chiba、Ebina および NVF1 はさらに増加したが、Himizu、Nikaido および Hitosu は減少した (図 5)。また Nikaido 株のみのデータであるため示さないが、10%FBS 含有 RPMI1640 を培地とした場合では培養 0 から 6 時間の間に急激な増加を認めた。

OD 値は CDM において培養 3 から 12 時間まで急激な上昇が認められ、培養 12 時間以降は緩やかな上昇が継続した。一方改変 Muller-Hinton 培地における OD 上昇は培養 12 時間まで緩やかであったが、12 から 15 時間まで急激に上昇した。10%FBS 含有 RPMI1640 では OD 値の急激な上昇は認められず、培養 25 時間後も 0.6 に至らなかった (図 6)。

#### 2-8. 細胞内増殖性

マウスに非病原性であることが確認されている LVS および病原性が確認されている Yama 株、また新鮮分離株の NVF1 株を J774.1 細胞に接種し、2、6、24 および 48 時間後に細胞内の菌数を測定した (図 10)。LVS の接種後 2 時間の cfu は多数認められたが、接種後 6 時間では減少し、接種後 24 時間では検出限界 (50cfu) 以下であった。一方、Yama および NVF1 は接種後 6 時間の cfu は接種後 2 時間と同等であったが結果に幅があり、再現性が乏しかった。接種後 24、48 時間の cfu は接種後 2 時間の cfu から 10 倍以上に増加した。以上の結果より菌液接種後 2 および 24 時間の cfu の比較により各株の細胞内増殖性を判定した。計 42 株の J774.1 細胞内増殖性を比較したところ、供試株は大きく 3 つのグループに分けられた。グループ 1 の 5 株 (Kato、KU-1、NVF1、Sami および Yama) は接種後 24 時間の菌数が接種後 2 時間の菌数より 10 倍以上増加したため、細胞内高増殖性とした。グループ 2 の 8 株 (Aichi、Chiba、Ito、Naomatsu、Nikaido、Ebina、Kokuchi および Sasige) は 10 倍以上に増加することなく、減少の結果も認められ再現性が乏しかったため、細胞内低増殖性とした。グループ 3 の他 29 株

は接種後 24 時間で cfu が減少したためグループ 3 の細胞内非増殖性とした。グループ 3 の株のうち、一部は接種後 2 時間の細胞中 cfu が検出限界 (50cfu) 以下であり算定不能であった。これらの株は複数回試験したがいずれも cfu が算定不可であった。このため 5 株について遠心吸着により強制的感染を試みた。この処理により接種後 2 時間の cfu を認められ、接種後 24 時間の cfu の減少を確認できた。

#### 2-9. マウス病原性確認実験

マウス病原性が確認されていない各亜種および生物型の各株のマウス病原性を確認した。BH8859、C.M.V.103、Kf.water#23、Kf.71、GIEM-Miura N9、N1915 および N335-64 を接種したマウスはいずれも症状が認められず、接種後 6 日まで体重増加した。一方、Chiba、Ebina、Kato、KU-1、Nikaido および NVF1 は体重減少し、多くは斃死した (表 7、図 14)。

#### 2-10. マウス病原性比較実験

腹腔内接種にて病原性が確認された株について病原性比較を試みた。NVF1 株を  $10^{0-3}$ 、Chiba、Kato および KU-1 を  $10^{1-2}$ 、Ebina、Sami および Yama を  $10^{2-3}$  cfu/20  $\mu$ l/匹に調整して皮下接種した。Chiba 株は  $10^2$  cfu 接種マウスの 1 匹が体重減少したが、他は無症状であった。Ebina 株  $10^2$  cfu 接種マウスは 7 匹が体重減少し、うち 1 匹が斃死した。Nikaido 株の  $10^2$  cfu 接種は 3 匹のみであったが全個体体重減少し、2 匹は回復、1 匹は低体重のまま接種後 20 日まで生残した。また Kato、KU-1、NVF1、Sami および Yama 株は概ねマウスに致死性であったが Yama 株  $10^2$  cfu 接種マウスは 7 匹が体重減少し、そのうち 4 匹が斃死、3 匹が回復した (表 8)。NVF1 株については cfu を 4 段階試験したが、 $10^0$  (3.8) cfu 接種においても平均寿命が延長したのみで全個体が斃死した。

#### D. 考察

*F. tularensis* はグラム陰性菌であり、人工培地による長期継代により弱毒化する。代表研

研究者が所属する研究室は計 51 の *F. tularensis* 株を保有するがその多くは 50 年程前に分離され、継代歴は不明である。このためこれら保有株は弱毒化している可能性がある。本研究ではこれら保有株について分類学的解析を進め、さらに病原性の指標となる性状解析を試みた。

アクリフラビン反応および補体感受性試験は *F. tularensis* の病原性の有無の判定に有効とされている。C. M. V. 103、Jap、LVS、N19、N503、RV および Tungliao の 7 株は両試験において一般的な病原性野兎病菌と異なる反応を呈した。アクリフラビン反応および補体感受性には LPS およびカプセル様物質 (capsule-like material) などの糖鎖構造体の関与が示唆されている (Fujita H. et al.). このため抗 *F. tularensis* LPS モノクローナル抗体の反応を確認したところ、これら 7 株に対する反応はいずれも弱かった (図 4)。これより抗 LPS 抗体の反応はその性状の判定に有用である可能性が示唆された。RV および LVS はロシア、アメリカでワクチン株として普及していた株である。これまで野兎病菌は LVS を含む株の全ゲノムが解読されていて、病原株との相異からいくつかの病原性に関する遺伝子領域 (RD18 および 19 など) が報告されている。このため RD18 および 19 の PCR により LVS 同様の変異が認められた株は病原性解析への供試は不相当と考えられた。アクリフラビン反応は菌液に処理や、混入する培地成分によって反応が変化する事が示唆されている。アクリフラビン反応にて弱陽性であった Schu、Ootake 株についてはこれらの影響による偽陽性であった可能性が考えられる。

*F. tularensis* の分類法としてエリスロマイシン感受性試験、グリセロール発酵性試験およびシトルリンウレイダーゼ試験が知られている。シトルリンウレイダーゼ試験は非常に煩雑で時間を要するため本研究課題においては行わなかった。グリセロール発酵試験の結果では *ssp. tularensis* の 3 株に強いグリセロール発酵能が認められた。他の株のグリセロール含有培地における発育は様々であり、*ssp. tularensis* の 3 株程の変色を呈す株は無かったため、

BH8859、Schu および 38 の 3 株以外の株はすべて *ssp. holarctica* と考えられた。*ssp. holarctica* のうち、biovar *japonica* はグリセロール発酵能弱陽性とされているが近年、海外の *ssp. holarctica* 株もグリセロール発酵性を示すと報告されている。本試験では弱陽性と陰性の判別は困難であったため、*ssp. holarctica* biovar *japonica* の同定はできなかった。エリスロマイシン耐性は *ssp. holarctica* biovar II の特徴として知られている。今回の結果では C. M. V. 103、N9、N19、N503、N1915、RV および LVS は耐性であったため、これらは biovar II に分類された。

以上の性状試験では *ssp. holarctica* の biovar I と *japonica* の判別は不能であり、保有株は *ssp. tularensis*、*ssp. holarctica* biovar I or *japonica* および *ssp. holarctica* biovar II の 3 つに分類されたのみであった。このため近年、多用されている RD の PCR による分類を試みた。RD1 および 7 の PCR 増幅産物の分子量の相異から *ssp. tularensis* と *ssp. holarctica* の biovar I、II および *japonica* の判別が、また RD3 および 6 の PCR 増幅産物の分子量の相異から *ssp. tularensis* の A. I および A. II が判別できることが報告されている (Molins-Schneekloth C. R. 2008)。これより当研究室が保有する *ssp. holarctica* のうち Kf water#23、Kf71、N335-64 および Tungliao ならびに日本分離株である Aichi および Kokuchi が biovar I に属すると考えられた。また RD23 の PCR 増幅産物の電気泳動像より N335-64 は他の biovar I とは異なり、スペインやフランスの分離株と似た遺伝子性状であると考えられた (Dempsey M.P. 2007)。Aichi および Kokuchi の 2 株以外の日本分離株からはこれらとは異なるサイズの増幅産物が認められた。これらは既報の日本分離株から増幅される PCR 産物と似た分子量であったため、これらの株は biovar *japonica* に分類されると考えられた。RD3 および 6 の PCR の結果から 38 は *ssp. tularensis* の A. II、BH8859 および Schu は *F. tularensis* *ssp. tularensis* の A. 1 genotype であることが

確認された (図)。以上より保有 51 株は 6 つの genotype に分類できることが明らかになった。エリスロマイシン耐性で biovar II に属すと考えられた 7 株 (C. M. V. 103、LVS、N9、N19、N503、N1915、RV) は遺伝子性状も他の株と異なった。エリスロマイシン感受性およびグリセロール発酵試験の結果と相関したことから、これら生化学的性状に関与する分子をコードする遺伝子が RD1 および 7 の領域に存在する可能性があるため、その詳細な解析は興味深い。日本分離の Aichi および Kokuchi の遺伝子性状は既報の MLVA 解析結果 (Fujita O. et al. 2008) と同様、他の日本分離株と異なり biovar I に近いと考えられた。しかしこれらの株の分離から現在に至るまでの経緯は不明であるため、今後、他の遺伝子性状についても詳細を解析する必要がある。

これまで *F. tularensis* 亜種間の抗原構造の相異は認められていない。今回 SDS-PAGE 後のウェスタンブロットによる免疫血清やモノクローナル抗体の反応からも subspecies や biovar 間で抗原構造が著しく異なる分子の存在は認められなかった (図 3 および 4)。しかし株間で異なる反応パターンが認められたため、その相異について今後詳細を解析したい。

*F. tularensis* の病原性関連遺伝子は多数報告されている。特に FPI (*Francisella* pathogenic island) には多数の病原性関連遺伝子が含まれている。本研究において *acrB*, *dnaK*, *iglC*, *katG*, *kdtA*, *mgIA*, *sspA*, *tolC*, および *wbtI* の 9 遺伝子を増幅する PCR を行ったが、これらの病原性関連遺伝子の欠落など著しく他と異なる株は認められなかった。しかし *F. tularensis* ゲノムには FPI がそれぞれの 2 つ存在する事が明らかであり、その一方の FPI で病原性関連遺伝子が欠落する株が存在する可能性があるため、今後詳細に解析を進める必要がある。

*F. tularensis* はマクロファージに貪食されると、ファゴソームがリソソームと融合する前に細胞質に移動して増殖する。このことから細胞内増殖能は本菌の病原性の重要な指標にな

ると考えられる。このため各株の病原性確認のスクリーニングの目的にマウス由来マクロファージ系細胞 J774.1 における細胞内増殖性を解析した。新鮮分離の 2 株 (KU-1 および NVF1)、Yama、Kato および Sami は接種後 2 から 24 時間後の間に cfu が 10 倍以上増加した。これよりこれらの株はマクロファージ内において完全に殺菌されることなく増殖できると考えられた。Aichi、Chiba、Ebina、Ito、Kokuchi、Naomatsu、Nikaido および Sashige の接種後 2 と 24 時間の cfu の差は様々で再現性に乏しかったが、10 倍以上の増加は認められなかった。その相異の原因として、これらの株のストックに病原株と非病原株が混在すること、接種用に回収した菌の培養状態の相異などが考えられる。しかしその性状は複数回試験し、毎回 10 倍以上増殖する高増殖性株、減少する非増殖性株とは明らかに異なった。非増殖性株には moi が他の株と同等であっても接種後 2 時間の cfu が認められない株が存在した。これらは遠心吸着処理によりコロニーが認められたため、他の株と比較して、細胞内への取り込まれる効率や細胞内における抵抗性などに相異があると考えられた。それらの性状相異も *F. tularensis* の病原性に関与する可能性がある。

多数の細胞内非増殖性株が認められた原因の 1 つとして人工培地における長期継代が考えられる。このため新鮮分離株である NVF1 を Eugon チョコレート寒天培地にて 40 代まで継代し、細胞内増殖性を確認したところ、20 代継代菌は接種後 2 時間で認められる細胞内 cfu が減少し、低増殖性に、30 および 40 代継代菌は非増殖性に变化した (図 13)。これより *F. tularensis* は人工培地による長期継代により細胞内増殖性が低下すると考えられた。

マウスは *F. tularensis* に感受性が高く、腹腔内接種では少数の菌量でも 7 日以内で体重減少、立毛、沈鬱と経過をたどり、斃死する。しかし本研究では多くの株の病原性を解析する必要があるため、細胞内増殖性が認められた株および各亜種および生物型の代表株のみをマウス病原性確認試験に供試した。供試した海外

由来株はすべてマウスに病原性を示さず、また日本分離株の標準株として報告されていた GIEM-Miura 株も病原性を示さなかった。これらの株はいずれも細胞内においても非増殖性であった。これより野兔病菌の細胞内増殖性の解析は *in vitro* 系の病原性解析法として有用であると考えられた。

マウスへの皮内接種は *F. tularensis* の病原性比較に有用と報告されている。このため本研究課題においても病原性が確認された株についてのマウス病原性を皮内接種にて比較した。細胞内高増殖性の 5 株の致死率は高かったが、細胞内低増殖性株は皮内接種ではマウスが体重減少を示すのみで病原性が低かった。これらの結果からも細胞内増殖性の比較がマウス病原性の推定に有効であると考えられた。また高増殖性株接種マウスの平均寿命、NVF1 株  $10^0$  (3.8) cfu 接種マウス全 8 匹の斃死などのデータと既報の海外の株の感染実験のデータから、日本分離株は海外の *F. tularensis* ssp. *holarctica* と同等の病原性を有すと考えられた。本研究において全海外由来株が弱毒化されていたと考えられたため、十分な比較解析はできないが、今後 *F. tularensis* に比較的抵抗性であるラットを用いて日本分離株の病原性について詳細を解析したい。

#### E. 結論

本研究所保有の *F. tularensis* 株は ssp. *tularensis* および ssp. *holarctica* の 2 亜種に属し、6 つの genotype に分類出来る事が明らかになった。海外由来の全 15 株および日本分離の 26 株は J774.1 細胞内における増殖が認められず、一般に供試される病原性 *F. tularensis* 株とは著しく性状が異なった。この原因として人工培地による 20 代以上の継代が考えられた。このため本研究課題の目的のひとつであった *F. tularensis* 亜種および生物型間の病原性の比較解析は困難であると考えられた。しかしマウス皮内接種実験により新鮮分離株の NVF1 は既報の海外由来の spp. *holarctica* 株と同等の病原性を有すと推察され、細胞内増殖性の測定が

本菌の病原性の有効な指標になると考えられた。今後その詳細な解析を進めるには海外の研究機関より病原性を有す ssp. *tularensis* および *holarctica* を分譲依頼、入手し、詳細な比較解析をする必要がある。特にバイオテロへ使用が危惧されている ssp. *tularensis* は本研究では全 3 株が非病原性であったため、早急に対策をとる必要がある。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Akitoyo Hotta, Kiyoshi Tanabayashi, Yoshie Yamamoto, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Toshio Mizoguchi, Akio Yamada (2012) Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. *Zoonoses and public Health* 59(2):p89-95 (印刷中)

##### 2. 学会発表

培養細胞を用いた野兔病菌の病原性比較. 堀田明豊、宇田晶彦、Sharma Neekun、藤田修、棚林清、山本美江、山田章雄 153 回日本獣医学会学術集会 (2012 年 3 月 大宮)

#### H. 知的財産権の出願・登録

予定無し

表1 供試*Francisella* 株

| No. | 株名           | 分離地    | 分離年  | 由来      | 分類(亜種)                      |
|-----|--------------|--------|------|---------|-----------------------------|
| 1   | 38           | アメリカ   | 1920 | ヒト リンパ節 | <i>tularensis</i>           |
| 2   | BH8859       | アメリカ   | 1958 | ウマ      | <i>tularensis</i>           |
| 3   | Schu         | アメリカ   | 1941 | ヒト 潰瘍   | <i>tularensis</i>           |
| 4   | C. M. V. 103 | オーストリア | 1960 | ヒト 眼粘膜  | <i>holarctica</i>           |
| 5   | Kf71         | アメリカ   | 1957 | マウス     | <i>holarctica</i>           |
| 6   | Kf water#23  | アメリカ   | 1957 | 水       | <i>holarctica</i>           |
| 7   | LVS          | ロシア    | 1961 | ロシア     | <i>holarctica</i>           |
| 8   | N 9          | ロシア    | 1948 | ハタネズミ   | <i>holarctica</i>           |
| 9   | N19          | ブルガリア  | 1963 | マスカラット  | <i>holarctica</i>           |
| 10  | N335-64      | イタリア   | 1964 | ノウサギ    | <i>holarctica</i>           |
| 11  | N 503        | ロシア    | 1949 | ダニ      | <i>holarctica</i>           |
| 12  | N 1915       | ウクライナ  | 1962 | ノウサギ    | <i>holarctica</i>           |
| 13  | Tungliao     | 中国     | 1957 | ジリス     | <i>holarctica</i>           |
| 14  | Schu         | アメリカ   | 1941 | ヒト 潰瘍   | <i>tularensis</i>           |
| 15  | RV           | ロシア    | 不明   | 分離株15   | <i>holarctica</i>           |
| 16  | Aichi        | 日本 秋田  | 1979 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 17  | Azumaya      | 日本 秋田  | 1981 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 18  | Chiba        | 日本 青森  | 1980 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 19  | Ebina        | 日本 宮城  | 1950 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 20  | GIEM Miura   | 日本 宮城  | 1975 | ヒト 潰瘍   | <i>holarctica</i>           |
| 21  | Hashimoto    | 日本 福島  | 1951 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 22  | Himizu       | 日本 福島  | 1983 | ヒミズ     | <i>holarctica</i>           |
| 23  | Hitosu       | 日本 福島  | 1983 | ヒト 潰瘍   | <i>holarctica</i>           |
| 24  | Ito          | 日本 福島  | 1984 | ヒト 潰瘍   | <i>holarctica</i>           |
| 25  | Jap          | 日本 福島  | 1926 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 26  | Kato         | 日本 山形  | 1989 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 27  | Kawamata     | 日本 岩手  | 1964 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 28  | Kikuchi      | 日本 福島  | 1982 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 29  | Kokuchi      | 日本 山形  | 1981 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 30  | KU-1         | 日本 青森  | 2008 | ノウサギ    | <i>holarctica</i>           |
| 31  | Metomo       | 日本 岩手  | 1960 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 32  | Mitsuo       | 日本 宮城  | 1983 | ヒト 潰瘍   | <i>holarctica</i>           |
| 33  | Murayama     | 日本 山形  | 1979 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 34  | Naomatsu     | 日本 秋田  | 1968 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 35  | Nikaido      | 日本 福島  | 1984 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 36  | NVF1         | 日本 秋田  | 2009 | ノウサギ    | <i>holarctica</i>           |
| 37  | Oniwa        | 日本 福島  | 1954 | ノウサギ    | <i>holarctica</i>           |
| 38  | Ootake       | 日本 宮城  | 1982 | ダニ      | <i>holarctica</i>           |
| 39  | Sami         | 日本 秋田  | 1980 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 40  | Sashige      | 日本 山形  | 1971 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 41  | Shinomura    | 日本 岩手  | 1974 | ヒト 潰瘍   | <i>holarctica</i>           |
| 42  | Suzushichi   | 日本 山形  | 1982 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 43  | Takahashi    | 日本 秋田  | 1978 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 44  | Tateyama     | 日本 青森  | 1978 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 45  | TH           | 日本 福島  | 1954 | ダニ      | <i>holarctica</i>           |
| 46  | TI           | 日本 福島  | 1954 | ダニ      | <i>holarctica</i>           |
| 47  | Tsuchiya     | 日本 福島  | 1958 | ヒト リンパ節 | <i>holarctica</i>           |
| 48  | Yato 11      | 日本 千葉  | 1952 | ノウサギ    | <i>holarctica</i>           |
| 49  | Yato 96      | 日本 秋田  | 1968 | ノウサギ    | <i>holarctica</i>           |
| 50  | Yato 107     | 日本 福島  | 1979 | ノウサギ    | <i>holarctica</i>           |
| 51  | Yama         | 日本 福島  | 1957 | ダニ      | <i>holarctica</i>           |
| 52  | U112         | アメリカ   | 1950 | 水       | <i>Francisella novicida</i> |

参照：大原年報37巻 (1994)

表2 使用プライマー

| プライマー   | 標的          | 配列(5' -3')                              | 塩基数<br>(bp) |
|---------|-------------|---|-------------|
| RD1-f   | RD1         | TTTATATAGGTAAATGTTTTACCTGTACCA          | 30          |
| RD1-r   |             | GCCGAGTTTGATGCTGAAAA                    | 20          |
| RD-3F   | RD3         | ATATATGGTGATGCTAAAGAC                   | 21          |
| RD-3R   |             | TCTATTGAGATCTAAATCTGC                   | 21          |
| RD-6F   | RD6         | TGACCTGAGCCAGAGGTAC                     | 20          |
| RD-6R   |             | ACTTGCCAGCCTAATAATTAC                   | 21          |
| RD7-F   | RD7         | CGATATGTTTTGCTATAGATAACCTTGAT           | 29          |
| RD7-R   |             | CACTTATCGTAGCCGCTAAACAT                 | 23          |
| RD16-F  | RD16        | AACAGAATTTAAAATATGATTGCTCAATA           | 29          |
| RD16-R  |             | GTTTGCCTCATCATTAACTGATATAGTA            | 28          |
| RD18-f  | RD18        | GCAAAATGCTGGCCAGTTAT                    | 20          |
| RD18-r  |             | TTGAGGTATCACCACGATAGTTTAT               | 25          |
| RD19-f  | RD19        | TGGCATATGGTAGAGATTGTTT                  | 22          |
| RD19-r  |             | TTGTGGTGAAGTTTGGCTTA                    | 20          |
| RD23-F  | RD23        | GTCTTGTTGAGCAAATGCC                     | 20          |
| RD23-R  |             | CGGAGCAGGCTTAAATAGTGA                   | 21          |
| acrB-F  | <i>acrB</i> | CCGAATTCATTACATACTTTACTAGAAGCCG         | 31          |
| acrB-R  |             | CCGAATTCAAATCCAGCCTTATCACGATC           | 30          |
| dnaK1   | <i>dnaK</i> | CCTAAAAATTTGGACAGACCATT                 | 24          |
| dnaK2   |             | CTTGAAAAGATTATAAATATGCCCATC             | 27          |
| iglC-f  | <i>iglC</i> | ATGAGTGAGATGATAACAAGACAACAGG            | 28          |
| iglC-r  |             | CTATGCAGCTGCAATATATCCTATTTTAGC          | 30          |
| katG-1  | <i>katG</i> | TGAGTATAGATGCAATAGATTTATTG              | 26          |
| katG-2  |             | ATATAATCACTTATAAGCCTTAACTT              | 26          |
| kdtA-f  | <i>kdtA</i> | CTAGCTCATATATATTCGAGC                   | 21          |
| kdtA-r  |             | TACGATATTGTTATACTGTTTTTCG               | 25          |
| mg1A-f  | <i>mg1A</i> | TTAAGCTCCTTTTGCTTTGATAGTTTTTATAAAGTTAGG | 39          |
| mg1A-r  |             | TTGCTTTTATACACAAAAAAGATGATATCTATAGCG    | 37          |
| sspA-f  | <i>sspA</i> | TTGATGAAAGTTACATTATATACAACGAAGTATTGTCC  | 38          |
| sspA-r  |             | TTATCTATGAGTTCTTAGAGTTTTGAGTAATGACTC    | 36          |
| TolC1-f | <i>tolC</i> | CTGTAACGCCGGCAAAAATA                    | 20          |
| TolC1-r |             | CGGTGGTTCAATTACAGCAA                    | 20          |
| wbtI-f  | <i>wbtI</i> | ATGAGTAAAGTAAATGTAACAAAACC              | 26          |
| wbtI-r  |             | TCATGAGGAAACCTCTTTGA                    | 20          |



表3 糖分解試験用の培地の調整方法

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1 Tryptone peptone                               | 10g                   |
| 2 Sodium chloride                                | 10g                   |
| 3 BactoTM Agar                                   | 15g                   |
| 4 0.1% (w/v) brom-thymol-blue                    | 25ml エタノールで溶解後DWで5倍希釈 |
| 5 D. W.  | upto 900ml            |
| オートクレーブ 121°C15分                                 |                       |
| 以下をオートクレーブ後に添加                                   |                       |
| 6 0.025% (w/v) Iron(III) Diphosphate, soluble    | 10ml 濾過滅菌             |
| 7 10% (w/v) L-cysteine hydrochloride monohydrate | 10ml 濾過滅菌             |
| 8 10% (w/v) Glycerol or Glucose                  | 10ml 濾過滅菌             |
| 9 10N NaOH                                       | 数滴 pH7.2に調整する         |
| 20mlずつシャーレに分注                                    |                       |

表4 一般性状試験の結果

| 株            | Acr<br>反応 | 補体<br>抵抗性 | 抗LPS-MAb<br>反応性 | エリスロマイシン<br>感受性 | グリセロール<br>発酵能 |
|--------------|-----------|-----------|-----------------|-----------------|---------------|
| 38           | -         | -         | +               | +               | +             |
| BH8859       | -         | +         | +               | +               | +             |
| C. M. V. 103 | ++        | +         | -               | -               | -             |
| Kf71         | +         | +         | +               | +               | -             |
| Kf water#23  | -         | +         | +               | +               | -             |
| LVS          | ++        | -         | +               | -               | -             |
| N 9          | -         | -         | +               | -               | -             |
| N19          | ++        | -         | -               | -               | -             |
| N335-64      | -         | +         | +               | +               | -             |
| N 503        | ++        | +         | -               | -               | -             |
| N 1915       | -         | +         | +               | -               | -             |
| Tungliao     | ++        | -         | -               | +               | -             |
| Schu         | +         | +         | +               | +               | +             |
| RV           | ++        | -         | -               | -               | -             |
| Aichi        | -         | +         | +               | +               | -             |
| Azumaya      | -         | +         | +               | +               | -             |
| Chiba        | -         | +         | +               | +               | -             |
| Ebina        | -         | +         | +               | +               | -             |
| GIEM Miura   | -         | +         | +               | +               | -             |
| Hashimoto    | -         | +         | +               | +               | -             |
| Himizu       | -         | +         | +               | +               | -             |
| Hitosu       | -         | +         | +               | +               | -             |
| Ito          | -         | +         | +               | +               | -             |
| Jap          | -         | -         | +               | +               | -             |
| Kato         | -         | +         | +               | +               | -             |
| Kawamata     | -         | +         | +               | +               | -             |
| Kikuchi      | -         | +         | +               | +               | -             |
| Kokuchi      | -         | +         | +               | +               | -             |
| KU-1         | -         | +         | +               | +               | -             |
| Metomo       | -         | +         | +               | +               | -             |
| Mitsuo       | -         | +         | +               | +               | -             |
| Murayama     | -         | +         | +               | +               | -             |
| Naomatsu     | -         | +         | +               | +               | -             |
| Nikaido      | -         | +         | +               | +               | -             |
| NVF1         | -         | +         | +               | +               | -             |
| Oniwa        | -         | +         | +               | +               | -             |
| Ootake       | +         | +         | +               | +               | -             |
| Sami         | -         | +         | +               | +               | -             |
| Sashige      | -         | +         | +               | +               | -             |
| Shinomura    | -         | +         | +               | +               | -             |
| Suzushichi   | -         | +         | +               | +               | -             |
| Takahashi    | -         | +         | +               | +               | -             |
| Tateyama     | -         | +         | +               | +               | -             |
| TH           | -         | +         | +               | +               | -             |
| TI           | -         | +         | +               | +               | -             |
| Tsuchiya     | -         | +         | +               | +               | -             |
| Yato 11      | -         | +         | +               | +               | -             |
| Yato 96      | -         | +         | +               | +               | -             |
| Yato 107     | -         | +         | +               | +               | -             |
| Yama         | -         | +         | +               | +               | -             |

表5 各PCR反応における供試野兔病菌の増幅産物のおおよそのサイズ(bp)

| 株            | 増幅領域  |     |     |       |      |       |       |       |
|--------------|-------|-----|-----|-------|------|-------|-------|-------|
|              | RD1   | RD3 | RD6 | RD7   | RD16 | RD23  | RD18  | RD19  |
| 38           | 1,500 | ND  | 500 | 2,000 | 200  | ND    | 2,000 | 1,000 |
| BH8859       | 1,500 | 700 | ND  | 2,000 | 600  | ND    | 2,000 | 1,000 |
| Schu         | 1,500 | 700 | ND  | 2,000 | 600  | ND    | 2,000 | 1,000 |
| C. M. V. 103 | 900   | 700 | 500 | 400   | 200  | 3,000 | 500   | 500   |
| Kf71         | 900   | 700 | 500 | 700   | 200  | 3,000 | NT    | 1,000 |
| Kf water#23  | 900   | 700 | 500 | 700   | 200  | 3,000 | 2,000 | 1,000 |
| LVS          | 900   | 700 | 500 | 400   | 200  | 3,000 | 500   | 500   |
| N 9          | 900   | 700 | 500 | 400   | 200  | 3,000 | 2,000 | 1,000 |
| N19          | 900   | 700 | 500 | 400   | 200  | 3,000 | 2,000 | 1,000 |
| N335-64      | 900   | 700 | 500 | 700   | 200  | 1,200 | NT    | 1,000 |
| N 503        | 900   | 700 | 500 | 400   | 200  | 3,000 | 500   | 1,000 |
| N 1915       | 900   | 700 | 500 | 400   | 200  | 3,000 | 2,000 | 1,000 |
| Tungliao     | 900   | 700 | 500 | 700   | 200  | 3,000 | 500   | 1,000 |
| RV           | 900   | 700 | 500 | 400   | 200  | 3,000 | 500   | 500   |
| Aichi        | 900   | 700 | 500 | 700   | 200  | 3,000 | NT    | 1,000 |
| Azumaya      | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | 1,000 |
| Chiba        | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | 1,000 |
| Ebina        | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | 1,000 |
| GIEM Miura   | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | 1,000 |
| Hashimoto    | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | 1,000 |
| Himizu       | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | 1,000 |
| Hitosu       | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | 1,000 |
| Ito          | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | 1,000 |
| Jap          | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | 2,000 | 500   |
| Kato         | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | 2,000 | 1,000 |
| Kawamata     | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Kikuchi      | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Kokuchi      | 900   | 700 | 500 | 700   | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| KU-1         | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | 2,000 | 1,000 |
| Metomo       | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Mitsuo       | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Murayama     | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Naomatsu     | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Nikaido      | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| NVF1         | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | 2,000 | 1,000 |
| Oniwa        | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Ootake       | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | 500   | NT    |
| Sami         | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Sashige      | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Shinomura    | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Suzushichi   | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Takahashi    | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Tateyama     | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| TH           | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| TI           | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Tsuchiya     | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Yato 11      | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Yato 96      | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Yato 107     | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |
| Yama         | 1,100 | 700 | 500 | 2,000 | 200  | 3,000 | NT    | NT    |

1.2%アガロースゲル電気泳動にて認められたバンドのおおよその分子量(bp)を示す。

表6 *Francisella* 属菌代表株のマウスに対する病原性（腹腔内接種）

| 株    | マウス<br>系統   | 接種菌数<br>(cfu) | 接種<br>個体数 | 観察期間<br>(日) | 症状発現接種後日数 |     |
|------|-------------|---------------|-----------|-------------|-----------|-----|
|      |             |               |           |             | 体重減少      | 斃死  |
| 38   | BALB/cCrSlc | 230           | 3         | 21          | -         | -   |
|      | BALB/cCrSlc | 23000         | 3         | 21          | -         | -   |
|      | BALB/cCrSlc | 2300000       | 3         | 21          | -         | -   |
| LVS  | BALB/cCrSlc | 800           | 3         | 21          | -         | -   |
|      | BALB/cCrSlc | 80000         | 3         | 21          | -         | -   |
|      | BALB/cCrSlc | 8000000       | 3         | 21          | -         | -   |
| Schu | BALB/cCrSlc | 0.45          | 3         | 21          | -         | -   |
|      | BALB/cCrSlc | 45            | 2         | 21          | -         | -   |
|      | BALB/cCrSlc | 620           | 2         | 21          | -         | -   |
|      | BALB/cCrSlc | 62000         | 2         | 21          | -         | -   |
|      | BALB/cCrSlc | 6200000       | 2         | 21          | 2         | -   |
| U112 | BALB/cCrSlc | 300           | 3         | 21          | -         | -   |
|      | BALB/cCrSlc | 30000         | 3         | 21          | -         | -   |
|      | BALB/cCrSlc | 3000000       | 3         | 21          | -         | -   |
| Yama | BALB/cCrSlc | 1.3           | 3         | 21          | 5         | 6-7 |
|      | BALB/cCrSlc | 130           | 3         | 6           | 4         | 5-6 |

体重減少：接種時の体重より5%減少した場合とした。

-：症状認められず