

犬由来の感染に関して、犬のバベシア症では、宮城県より *Babesia (B) gibsoni* が 3 例にのみ検出された。この結果と、既報告とを考え合わせると、東日本では、愛玩犬の内の特定犬種を中心に *B. gibsoni* の感染が存在していることが示唆された。

一方、*H. canis* については、東北地方では全例とも陰性であったことから、同原虫の北限が中部地方であるとの昨年度の調査結果を支持するものであった。

(2) フィラリア症

犬フィラリア症では、東北全県で検索した猟犬全体で約 30% に抗原が検出され、比較的高い陽性率であったが、以前の調査地における、ほぼ 30% 以上の陽性率とほぼ同等であった。東北地方の猟犬に関しても、フィラリアの予防という点に関しては問題があるが、これは猟犬が使役犬であること、蚊に咬まれる機会が多いことなどが考えられる。

犬糸状虫の寄生率が高い場所では、ヒトのフィラリア症の発生率が高いという報告があることを考慮すると、これらの地域では野生動物およびヒトに感染するリスクがあると考えられる。

E. 結論

1) 東北地方（福島県、宮城県、岩手県、青森県、秋田県、山形県）の猟犬につき、ジフテリア症、レプトスピラ症、ライム病、

トキソプラズマ症など重要人獣共通感染症についての抗体調査を実施したところ、ライム病、トキソプラズマで高い抗体陽性例が検出された。実際の患者の発生を含め、その原因とヒトに対する影響について再調査する必要がある。

2) 以上のことからヒトでの感染リスクを予想するうえで、前回の報告と同様に猟犬がこれらの感染症の疫学情報の収集に有用と思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表等

(1) 後藤みなみ, 濱野剛久, 水主川剛賢, 酒井洋樹, 高島康弘, 柳井徳磨, 今岡浩一, 川端寛樹, 山本明彦, 小泉信夫, 野上貞雄. 猟犬を指標とした野外感染症調査: 島嶼部, 半島部における調査. 第 18 回野生動物医学会大会. 2012 年 8 月. 十和田.

H. 知的財産権の出願登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 なし

2. 実用新登録 なし

3. その他 なし

Fig.1 2012年度の採血と測定

・東北6県の猟犬全
123頭より採血

● 測定方法

- ・レプトスピラ ELISA
- ・ライム病ボレリア ELISA
- ・リケッチア 間接蛍光抗体法
- ・ジフテリア 培養細胞法による
抗毒素価の測定
- ・トキソプラズマ ラテックス凝集反応
- ・バベシア 血液塗抹標本の観察、
PCR、DNAシーケンス

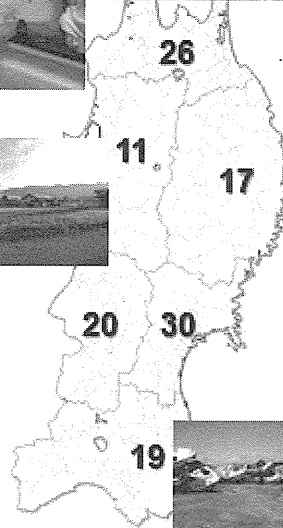


表1 2012東北各県猟犬の陽性率(1)

	抗トキソプラズマ抗体	野兔病 (<i>Francisella tularensis</i>)	ブルセラ抗体	ジフテリア 抗毒素抗体 (<i>Corynebacterium diphtheriae</i>)	破傷風 抗毒素 抗体
青森	3/26(11.5%)	—	—	—	—
岩手	3/17(17.6%)	—	—	—	—
秋田	1/11(9%)	—	—	—	—
宮城	6/30(20%)	—	—	—	—
山形	6/20(30%)	—	3/20(15%)	1/20 (5%)	—
福島	3/19(15.8%)	—	1/16(6.3%)	—	—

表2 2012東北各県猟犬の陽性率(2)

	レプトスピラ	ボレリア抗体	フィラリア抗原 (<i>Dirofilaria immitis</i>)	バベシア (<i>Babesia gibsoni</i>)
青森	3/25(12%)	10/25 (40%)	10/25(40%)	—
岩手	1/16(6.3%)	11/16 (68.8%)	5/17(29.4%)	—
秋田	0/11	5/11 (45.5%)	3/11(27.3%)	—
宮城	5/30(16.7%)	11/30 (36.8%)	12/30(40%)	3/30(10%)
山形	4/20(20%)	10/20 (50%)	3/20(15%)	—
福島	4/19(21.1%)	12/19 (63.2%)	5/19(26.3%)	—

表3 主要野外病原体の陽性率の過去調査との比較

2012年	抗トキソプラズマ抗体	抗レプトスピラ抗体	フィラリア抗原	ジフテリア抗毒素抗体	ボレリア ELISA/Western
青森(26)	11.5	12.0	40.0	0	40.0
岩手(17)	17.6	6.3	29.4	0	68.8
秋田(11)	9.0	0	17.6	0	45.5
宮城(30)	20.0	16.7	40.0	0	36.7
山形(20)	30.0	20.0	15.0	5.0	50.0
福島(19)	15.8	21.1	26.3	0	63.2
全東北(123)	18.0	14.0	31.1	0.8	48.4
島嶼11'(196)	35.8	10.8	41.8	6.8	12.6
中部10'(142)	19.7	ND	26.0	7.7	44.3
西日本各地 09'(155)	ND	7.8	ND	8.4	19.4 (検出率:%)

競合 ELISA 法による多様な動物種に適用可能な野兎病菌抗体測定法の開発

研究分担者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部第三室 室長
研究協力者 シヤルマ ニークン*、堀田明豊、宇田晶彦、藤田修、山本美江（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）、溝口俊夫（福島県鳥獣保護センター）、進藤順治、朴天鎬、小山田敏文、畑井仁、工藤上（北里大学獣医学部）

研究要旨 野兎病の起因病原体である野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は、非常に多くの動物種に感染するとされている。野生動物等の血清疫学調査では、多様な動物種に適応可能な抗体測定法が必要となることから、野兎病菌 LPS および抗 LPS モノクローナル抗体を抗原と標準抗体として各種動物由来血液検体に含まれる抗野兎病菌抗体による競合反応として測定する競合 ELISA (cELISA) を開発してきた。本研究では、野兎病患者血清について本 cELISA と間接 ELISA (iELISA) との相関性を検証するとともに、国内野生動物の血液 632 検体について cELISA および微量凝集反応 (MA) 法による野兎病菌抗体の検出を試みた。ヒト血清を cELISA と iELISA で調べた結果、本 cELISA 法は iELISA と高い相関を示してヒト血清抗体の測定が可能であった。また、野生動物血液検体を cELISA で調べた結果、ツキノワグマ(23/150)、ホンダタヌキ(3/21)抗体陽性が認められた。MA 法で検出されなかった検体にも cELISA 陽性検体が見いだされることから cELISA は MA 法より高感度で、動物種特異的標識二次抗体等を用いることなく野生動物の抗体測定に摘要できることから野生動物における野兎病の血清疫学調査のための手法として有用と考えられた。

A. 研究目的

野兎病菌は、代表的な動物由来感染症である野兎病の起因病原体である。本菌は、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ヒトに感染するとされている。日本での患者発生は近年まれであるが、これまでのヒトへの感染のほとんどがノウサギとの接触が原因となっている。しかしながら、本菌は非常に多数の動物種に感染が可能である事が知られており、各種動物での分布状況を調査解析し、本菌の生態系での維持様式やヒトへの感染リスクを評価するための基礎的情報を収集することは重要である。各種動物、特に野生動物における感染状況の調査では血清中の野兎病菌に対する抗体を検出する血清疫学調査は有効な手法と考えられる。このための抗体測定法としては、微量凝集反応 (MA) 法や ELISA 法などが用いられる。しかしながら、特に、野生動物から採取される検体においては、溶血していたり、少

量しか採取できないなどの困難さがある。また、通常の ELISA 法では酵素標識された動物種特異的イムノグロブリン抗体などが利用されるが、市販されている動物種は限られている。

本研究では、多様な種の動物における野兎病菌抗体を測定するための方法として競合 ELISA (cELISA) の開発をしてきた。本年度は、開発した cELISA の野兎病患者血清について iELISA との相関性を確認検証するとともに、国内各種野生動物の血液検体での野兎病菌抗体検出を試み、国内各種野生動物における野兎病の感染状況を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 野兎病菌抗体測定競合 ELISA (cELISA)
(1) 抗原および標準抗体：ELISA 用 96 穴プレートに固相化する野兎病菌の抗原は、chocolate agar II 培地 (Becton Dickinson 社) で培養した野兎病菌 NVF1 株より LPS

extraction kit (iNtRON Biotechnology 社) を用いてリポポリサッカライド(LPS)を精製して用いた。標準抗野兎病菌抗体は、LPS を認識するマウスモノクローナル抗体 (クローン M14B11) をビオチン標識 (T.K. Craft 社に委託) したものをを用いた。

(2) cELISA の反応：精製 LPS

(2.5µg/50µl/well) を 96 穴 ELISA プレートに加え 37°C で 16~18 時間保温し固相化した。PBST (0.1% Tween20 加 PBS) での洗浄後、3% スキムミルク加 PBST でブロッキングした。1% スキムミルク加 PBST で希釈した検体 50µl を加え 37°C、90 分間反応させ、PBST で洗浄後、ビオチン標識抗 LPS 抗体

(3.4mg/ml) 50µl を 37°C、60 分間反応させた。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンおよび SureBlue reserve TMB MicroWell Peroxidase Substrate (KPL 社) を反応させ、固相抗原と反応した標準 LPS 抗体を発色させた。1N 塩酸で反応停止後 450nm の吸光度を測定した。

(3) 反応阻止率の算出：検体中の野兎病菌 LPS 抗体による標準抗 LPS 抗体の反応の阻止率(% inhibition)は、検体希釈液だけを事前に反応させた時の標準抗 LPS 抗体の吸光度を 100% とし、検体を反応させた場合の吸光度の割合を、以下の計算式により算出した。

$$1 - \left(\frac{\text{OD sample} - \text{OD Background}}{\text{OD standard} - \text{OD Background}} \right) \times 100$$

カットオフ値の決定は、ROC と TG-ROC カーブ解析 (Stat Flex software) から行った。ヒト血清の使用については国立感染症研究所ヒトを対象とする医学研究倫理審査委員会承認されたものである。

2. 間接 ELISA (iELISA) によるヒト血清抗体測定

精製 LPS を 50µl を 96 穴 ELISA プレートに加え 37°C で 16~18 時間保温し固相化し、洗浄後 3% スキムミルク加 PBST でブロッキングした。1% スキムミルク加 PBST で希釈した (1:500) 検体 50µl を加え、37°C、60 分

間反応させた。洗浄後、1% スキムミルク加 PBST で希釈した (1:8000) ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト IgG (ICN Pharmaceuticals, Cappel) 50µl を加えた後、37°C、60 分間反応させた。発色反応と停止、吸光度の測定は cELISA と同様に行った。

3. 微量凝集反応 (MA)

生理食塩水で 2 倍段階希釈した血清 25µl と等量のホルマリン不活化野兎病菌菌体浮遊液を 96 穴 U 底プレートにて混和し、37°C で 18 時間保温し凝集の有無を判定した。抗体価は希釈倍数の逆数として表し 10 倍以上を陽性とした。

4. 各種野生動物由来血液検体の測定

収集または分与された国内野生動物由来血液のうち、主に、過去に野兎病の発生が多く報告されていた東北地方で捕獲された各種動物の検体 (表 1、ノウサギについては血清あるいは全血吸収ろ紙からの抽出液) 合計 632 検体の 100 倍希釈液について cELISA を行い、阻止率を算出した。カットオフ値の算出は、MA 陰性血液検体の cELISA での阻止率の平均値に 3 倍の標準偏差値を加えた値とし 40% 以上を陽性とした。なお、血清については MA 法でも抗体価を測定した。

C. 研究結果

1. cELISA を用いたヒト血清の測定

野兎と診断されたヒト血清と陰性血清を cELISA で測定しその阻止率を図 1a に示した。さらにこれらの測定結果を ROC と TG-ROC カーブ解析し ROC カーブと TG-ROC カーブを図 1b と 1c にそれぞれ示した。ROC カーブの下領域は 0.98559 と算出され患者血清と陰性血清の区別が確実にできることがよく反映されていた。また、感度 (specificity) と特異性 (specificity) の TG-ROC カーブからカットオフ値を 8.5% に設定することが可能で、その場合の感度と特異性はそれぞれ 97.0% と 100% であった。また、iELISA ではカットオフ値 OD0.61 の場合、感度 94.1%、特異性 98.0% と算出され、cELISA は iELISA での測定と同等にヒト抗体を測定できることがわかった。さらに cELISA と iELISA の相関性を解析したとこ

ろ $R^2=0.8$, $r=0.906762$ と非常に高い相関性があった (図 2)。なお、本 cELISA はブルセラ菌やエルシニア菌などの免疫ウサギ血清との非特異反応は無いことは前年度までに確認されている。

2. 各種野生動物由来血液検体の測定

国内の各種野生動物血液 632 検体について、cELISA で測定した。野生動物における野兎病菌に対する標準的な陽性および陰性血清の調製は困難であることから、カットオフ値の設定は MA 法で測定できた検体の cELISA での阻止率の平均値に 3 倍の標準偏差値を加えた値で 40% とした。cELISA での阻止率の分布 (検体数) は図 3 に示した。

今回測定した野生動物由来血液検体での測定結果を表 1 にまとめた。ツキノワグマについては 150 検体中 23 検体および 18 検体が cELISA および MA で陽性となった。MA 陽性の 18 検体はすべて cELISA でも陽性であった。また、タヌキにおいては 21 検体中 3 検体が cELISA 陽性となり、この内 2 検体は MA でも陽性であった。小型げっ歯類 (ハタネズミ、ヒメネズミ、アカネズミ) では 2 検体が cELISA 陽性 (1 検体は MA でも陽性) であった。

一方、日本での野兎病患者の主な感染源動物とされるノウサギ 142 検体に陽性検体は認められなかった。また、ラット、ニホンザル、ハクビシン、キツネでも陽性検体は検出されなかった。さら、7 種の猛禽類 53 検体にも抗体陽性検体は認められなかった。

D. 考察

動物由来感染症のサーベイランスやモニタリングの結果は感染症対策立案のための重要な情報となる。そのためには、的確な検査法での調査が必要である。特に、人獣共通感染症においては感染源動物における調査も重要となる。本研究では動物由来感染のうち野兎病のヒトを含め各種動物での調査に有用な抗体検査法の開発とヒト検体での検証とその応用を試みた。

野兎病の抗体検査は通常 MA 法により実施され、簡易な方法である一方、非特異反応の可能性があること、検出感度が低いこと、

溶血が著しい検体では利用しにくい等の問題がある。また、iELISA 法は、多検体処理が可能で感度もよい方法であるが、利用できる標識二次抗体に制限がある。これらの問題を解決する抗体検出法として cELISA の開発を行ってきた。

本年度は開発した cELISA で感染歴の有無が既知のヒト血清について、cELISA と iELISA を用いて測定し有用性を検証した。本 cELISA のカットオフ値は低い値に設定することができ、iELISA と同等の感度と特異性で測定することが可能であり、高い相関性を示した (図 2) ことから、ヒト検体測定に応用できると考えられる。

本 cELISA でノウサギ、ツキノワグマ、野鼠等の野生動物の血液検体 632 検体を測定したところ、ツキノワグマ、タヌキ、小型げっ歯類で合計 28 検体が 40% 以上の阻止率を示した。MA 法で 10 倍以上の抗体価を示した 21 検体はすべて cELISA でも陽性であることは MA 法よりも高感度に検出できる方法であることがわかった。cELISA 陽性 MA 陰性 7 検体について別途ウエスタンブロット法での反応を確認したところ 6 検体は野兎病菌 LPS との反応で見られるはしご状のバンドが検出されたが、マウス検体では反応が見られなかった。野生マウスのそれぞれの測定法での結果の違いの原因は不明であるが、非特異反応あるいは測定法ごとで、野生マウス血清中の抗体が異なる抗原エピトープにを認識している可能性があることが考えられる。

ツキノワグマとタヌキで陽性個体が認められたことは、野生動物における野兎病菌感染の歩哨動物として、今後の血清疫学調査研究に有用な対象動物となると考えられる。ドイツではキツネにおいて効率的に抗体を有していることが報告されており、本研究ではキツネの検体が少数であったことからさらに多数の検体について調査する必要があると思われる。本研究で新たな抗体測定を作出できたことやツキノワグマやタヌキに抗体陽性例が認められたことは、今後の野兎病菌の生態系での維持様式を解明するための研究やヒトへの感染リスク評価のための研究に重要な情報となる考えられる。

本研究に使用したヒト血清の使用に同意下さった皆様および動物検体の分与および収集に協力いただいた岩手大学青木美樹子先生、北海道大学荻和宏明先生、大日本猟友会および猟友会会員の皆様に感謝いたします。

E. 結論

野兎病菌抗体測定法として競合 ELISA を開発し、本方法がヒト血清抗体測定において iELISA 法と高い相関性を有して測定可能であることを検証することができた。また本方法で国内野生動物由来血液検体を測定した結果、ツキノワグマおよびタヌキに抗体陽性例が認められ自然界における野兎病菌の浸潤状況を調査するための歩哨動物となる可能性があることを明らかにできた。今後も本研究で開発された cELISA 法等の的確な抗体測定法を用いた野生動物における野兎病菌抗体保有状況の継続的な調査は野兎病のヒトへの感染リスク評価や野兎病菌の生態を明らかにするために重要と考えられる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. A. Hotta, K. Tanabayashi, Y. Yamamoto, O. Fujita, A.

Uda, T. Mizoguchi and A. Yamada Zoonoses and Public Health 59: 89-95. (2012)

Detection of *Francisella tularensis*-specific antibodies in patients with tularemia by a novel competitive enzyme-linked immunosorbent assay. N. Sharma, A. Hotta, Y. Yamamoto, O. Fujita, A. Uda, S. Morikawa, A. Yamada and K. Tanabayashi Clinical and Vaccine Immunology 20:9-16. (2013)

2. 学会発表

Seroprevalence of tularemia among various wild animals in Japan. N. Sharma, A. Hotta, K. Tanabayashi, Y. Yamamoto, O. Fujita, A. Uda, T. Mizoguchi, J. Shindo, C.-H. Park, N. Kudo, H. Hatai, T. Oyamada, S. Morikawa and A. Yamada. 7th International Conference on Tularemia, (2012年9月 コロラド)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

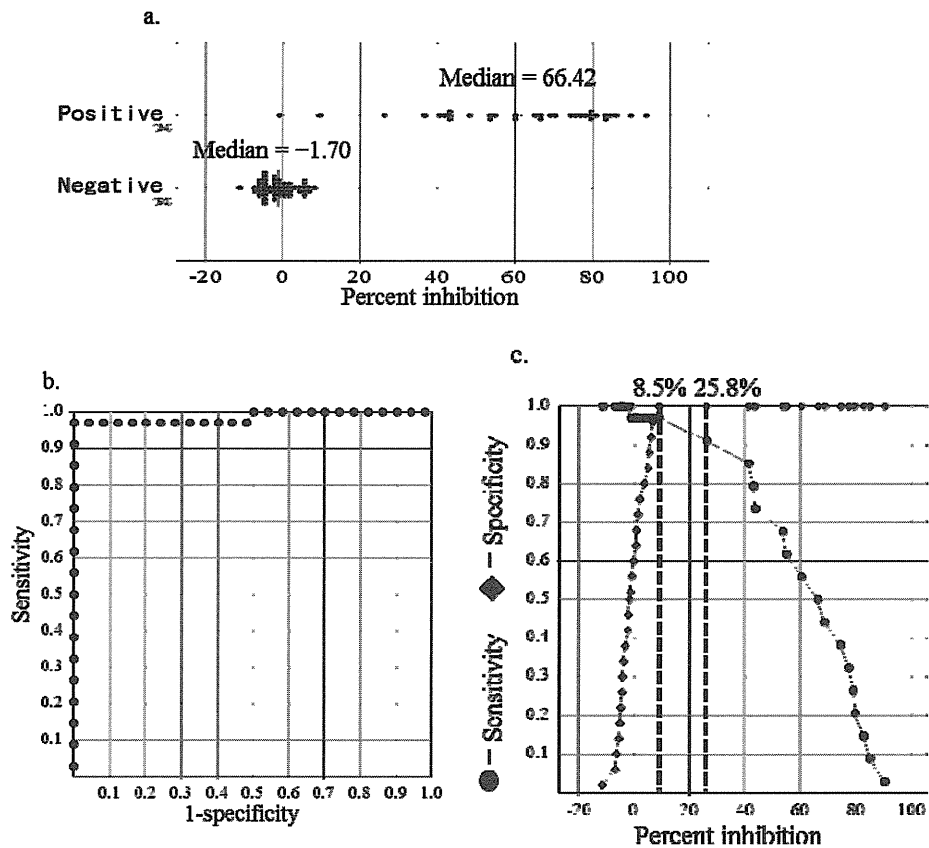


図 1. 競合 ELISA でのヒト血清抗体の野兔病菌 LPS 抗体反応阻止率の分布(a)と ROC (b) および TG-ROC (c) 解析

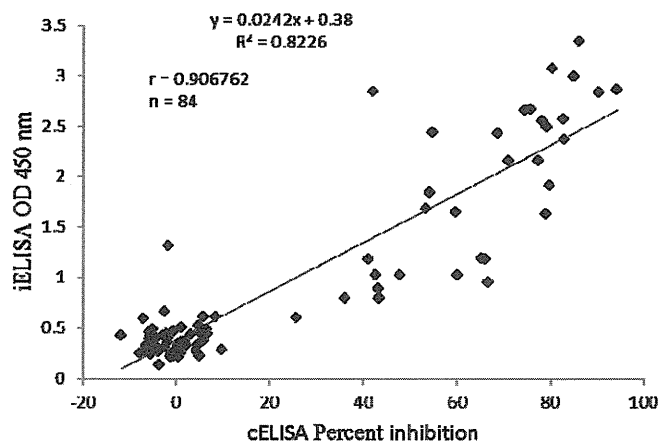


図 2. 野兔病菌抗体陽性および陰性ヒト血清の競合 ELISA と間接 ELISA 法での測定値の相関性

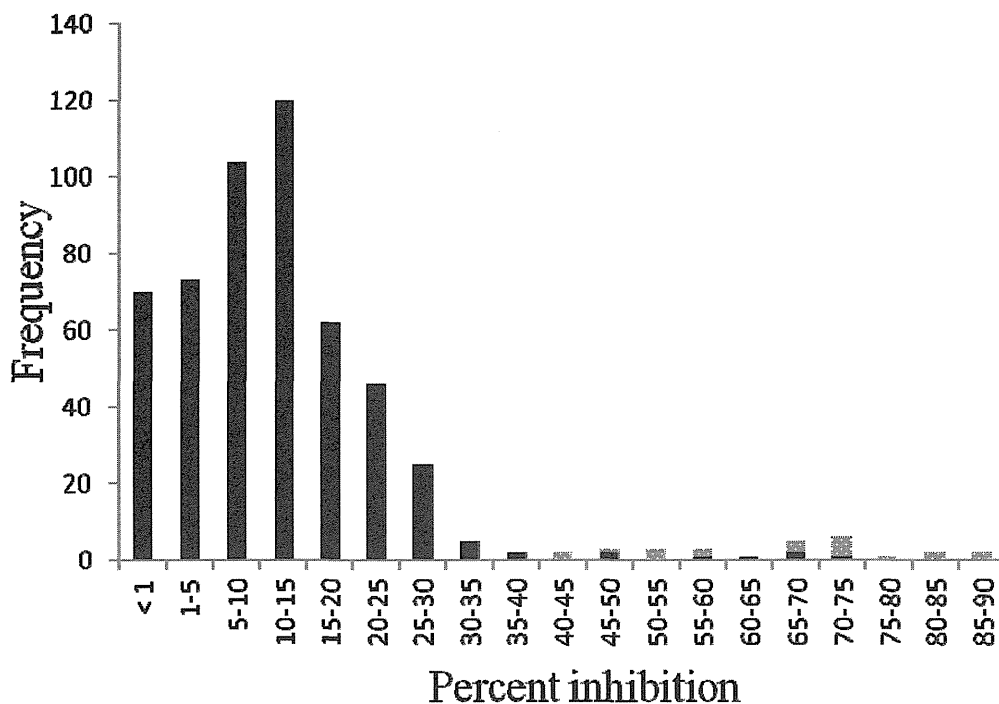


図 3. MA 陰性 (514 検体) および MA 陽性 (21 検体) の競合 ELISA での反応阻止率の分布

表 1. 各種野生動物由来血液検体の cELISA と MA 法による陽性数

野生動物種等	No. of samples	No. of positive	
		cELISA	MA
ノウサギ	142	0	0
ツキノワグマ	150	23	18
ニホンザル	26	0	0
ホンドタヌキ	21	3	2
ハクビシン	20	0	0
ホンドキツネ	3	0	0
小型げっ歯類 (アカネズミ、ハタネズミ、ヒメネズミ、トガリネズミ、ヒミズ)	120	2	1
ラット類 (クマネズミ、ドブネズミ)	97	0	0
猛禽類 (オジロワシ、ハヤブサ、トビ、ノスリ、サシバ、フクロウ、オオタカ)	53	0	0
合計	632	28	21

(検体は PBS にて 100 倍希釈)

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）
分担研究報告書

野兎病菌の病原性に関わる遺伝子の同定

研究分担者 棚林 清 国立感染症研究所獣医科学部第三室 室長
研究協力者 宇田晶彦、藤田修、堀田明豊（国立感染症研究所獣医科学部）
関塚剛史、黒田誠（国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター）

研究要旨 野兎病菌 (*Francisella tularensis*) はヒトに対して極めて高い感染性と致死性を有するグラム陰性桿菌である。本菌の感染および発症機序の解明は公衆衛生上極めて重要である。これまでに、*F. tularensis* subspecies *tularensis* SCHU 株由来の弱毒（マウス非致死性；SCHU P5）株および強毒性（マウス致死性；SCHU P9）株を作出し、この病原性の違いがゲノム塩基配列に依存すると考え両株の次世代シーケンス解析をおこなった。弱毒性および強毒製株の比較検討の結果、野兎病菌ゲノム 190 万塩基の中で 1 塩基の違いが見つかった。この 1 塩基の違いは *pdpC* 遺伝子の中央部分に存在し、強毒性株では正常 PdpC タンパク質を発現できるのに対し、弱毒性株では約半分の大きさの異常型 PdpC タンパク質しか発現できない事が明らかとなり、PdpC タンパク質が病原性に関与している可能性が示唆された。そこで、強毒性株の *pdpC* 遺伝子破壊株およびその破壊株にプラスミドで *pdpC* 遺伝子を相補した株（相補株）を新たに作出し、マウスを用いて病原性を評価した。その結果、*pdpC* 遺伝子破壊株は病原性を消失したが、その相補株は病原性が復帰していた。以上の結果より、野兎病菌 *pdpC* 遺伝子は極めて重要な病原性を規定する遺伝子であることが明らかとなった。

A. 研究目的

野兎病はグラム陰性桿菌の野兎病菌 (*Francisella tularensis*) の感染によって引き起こされる人獣共通感染症で、アメリカ、フィンランドおよびスウェーデンでは毎年 100 人程度の患者が発生し、時に数百人にのぼることも報告されている。野兎病は、近年の日本において 1999 年に 1 例、2008 年に 5 例と稀であるが、散発的な発生が報告されている。ヒトへの伝播経路は感染動物との接触、吸血性節足動物による経皮感

染、汚染食物または水を摂取することによる経口感染、汚染空気を吸引することによる経気道感染が主な感染経路とされている。野兎病菌の中でも病原性が強い *F. tularensis* subspecies *tularensis* では数個から数百個の菌数で感染が成立し、無治療の場合の致死率は 30%とされている。

強い感染力と高い致死率を示す *F. tularensis* subsp. *tularensis* の感染および発症機序を解明する事は公衆衛生上非常に重要である。そこで、本研究では弱毒 (SCHU P5) 株をマウスを用いて継代し強

毒 (SCHU P9) 株を作出した (図 1A)。全ゲノム解析の結果、両株のゲノム配列は *pdpC* 遺伝子中央部の 1 塩基の差異しか存在しないが (図 1B)、マウスに対する病原性は明らかに異なっていた。そこで本年度は、強毒性株の *pdpC* 遺伝子破壊株およびその破壊株にプラスミドで *pdpC* 遺伝子を相補した株 (相補株) を新たに作出し、マウスを用いて病原性の評価を行った。

B. 研究方法

1. 菌株

野兎病菌株は、chemically defined medium (CDM) で 2 日間培養した後に 10% グリセロール溶液に懸濁し、-80°C で保管した。これらの培養は、biosafety level (BSL) 3 で取り扱った。

2. 野兎病菌 *pdpC* 遺伝子破壊株の作出

pdpC 遺伝子破壊株は Targetron Gene Knockout System (シグマ社) および pKEK1140 プラスミド (Karl E. Klose 博士より分与。Appl Environ Microbiol. 2008; 74: 2619–2626) を用いて作出した。Targetron を用いて遺伝子破壊を行うにあたり、Targetron Design Site (<http://www.sigma-geosys.com/targetron/>) に *pdpC* 遺伝子の塩基配列をアップロードし、得られた 3 種類のプライマー (IBS、EBS1d、EBS2) および EBSUniversal プライマーを用いてキット付属の鋳型イントロンを増幅した。尚 pKEK1140 プラスミドにクローニングする為に、IBS プライマーの *HindIII* 制限酵素サイトを *XhoI* サイトに置換した。得られた PCR 産物を *BsrGI*

および *XhoI* 制限酵素で処理し、同処理を行った pKEK1140 に挿入した (図 2A)。このプラスミドは大腸菌 DH5 α 株で増幅後、NucleoBond PC 100 (MACHEREY-NAGEL 社) を用いて回収した。本プラスミドは温度感受性野兎病菌用 ori (Ft ori) をコードしているため、30°C では増殖可能だが、37°C で培養するとプラスミドは増幅できない事が知られている。回収したプラスミドで野兎病菌強毒 (SCHU P9) 株をエレクトロポレーションを用いて形質転換し、カナマイシンを含むユーゴンチョコレート寒天培地で 30°C 5 日間培養した後、得られたコロニーを抗生物質を含まないユーゴンチョコレート寒天培地で 37°C で培養した。更に、得られた *pdpC* 遺伝子破壊株を CDM で増菌し、10% グリセロールを含む CDM に置換し -80°C で保管した。

3. マクロファージ様細胞株 J774.1 細胞における増殖能の確認

マウス由来マクロファージ様細胞株 J774.1 (理研バイオリソースセンターより購入) を 1 nM phorbolmyristate acetate (PMA)、10% FBS、50 μ g/ml ペニシリン G を含む RPMI1640 培地で 2 日間刺激したのち、10% FBS、50 μ g/ml ペニシリン G を含む RPMI 1640 培地で更に 2 日間培養した。野兎病菌株は moi=10 で細胞に添加した後、遠心 (1,000xg、10 分間) し、37°C 5% CO₂ 存在下で 1 時間インキュベートした。マクロファージに取り込まれなかった細菌を除去するために、培地で 4 回洗浄後、50 μ g/ml ゲンタマイシンを含む RPMI1640 培地で 1 時間培養し、さらに培地で 4 回洗浄した。

洗浄した細胞は 10% FBS、50 µg/ml ペニシリン G を含む RPMI 1640 培地で 24 時間培養した。

4. 野兎病菌 *pdpC* 遺伝子破壊株の相補

pdpC 遺伝子破壊株の相補試験を行うために pNVU1-*pdpC* プラスミドを作出した (図 4A)。本プラスミドは、pOM5 プラスミドの大腸菌 ori (pMB1)、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (*camR*)、野兎病菌 ori (*repA*) を含む 3,953 bp の DNA 断片に、野兎病菌 *bfr* 遺伝子のプロモーター (344 bp) の直下に *pdpC* 遺伝子を全長 (pA9) または半分 (pA8) コードする DNA 断片 (3,987 bp) を挿入した。プラスミド DNA は大腸菌 DH5α 株で増幅後、NucleoBond PC 100 (MACHEREY-NAGEL 社) を用いて回収した。弱毒性 SCHU P5 株および *pdpC* 遺伝子破壊株は pNVU1-*pdpC* プラスミドを用いて形質転換を行い、得られたコロニーを CDM で培養し、10% グリセロールを含む CDM に置換後、-80°C で保管した。

5. CFU 測定

J774.1 細胞は、0.1% TritonX-100 を含む CDM で室温 1 分間処理した後、20 倍量の RPMI 1640 で即座に希釈した。このサンプル溶液の 10 倍段階希釈を作成し、ユーゴンチョコレート培地に接種し、37°C で 4-5 日間培養後、コロニーをカウントした。

6. マウスにおける病原性確認

7 週齢のマウス (C57BL/6J♀) は日本 SLC から購入した。これらのマウスに野兎病菌株を経鼻接種しその生残性を観察した。なお、マウス感染実験は国立感染症研究所動

物実験委員会の承認を受け ABSL3 で実施した。

C. 結果

強毒性 SCHU P9 由来 *pdpC* 遺伝子破壊株の作出

野兎病菌 *pdpC* 遺伝子が病原性に關与している可能性を検証する為、強毒性 SCHU P9 株由来の *pdpC* 遺伝子破壊株作出が必要とされた。ところが、野兎病菌 *F. tularensis* subsp. *tularensis* はホモロガスリコンビネーションが不可能との報告があったので、本研究では TargeTron システム (Sigma 社) と野兎病菌用 TargeTron 用プラスミド pKEK1140 を用いて野兎病菌 *pdpC* 遺伝子破壊を試みた。*pdpC* 遺伝子 (3,987 bp) を TargeTron Design Site (Sigma-Aldrich) にアップロードしたところ、イントロン挿入可能箇所の候補として 384|385, 538|539, 1119|1120, 2013|2014, 2806|2807 および 3245|3246 塩基の 6 か所が得られた。TargeTron システム付属説明書に従い、イントロンを含む PCR 産物を作製し、pKEK1140 プラスミドに挿入した (図 2A)。大腸菌 DH5α で増幅後、精製プラスミドを用いて強毒性野兎病菌 SCHUP9 株を形質転換し、カナマイシン耐性コロニーを得た。PCR でイントロン挿入の確認したところ、作成できた破壊株の *pdpC* の挿入部位は、538|539, 1119|1120, 2013|2014 だった (図 2B および C)。それぞれの *pdpC* 遺伝子破壊株を、538ins、1119ins、2013ins と命名した。

pdpC 遺伝子破壊株の病原性確認

得られた 3 系統の *pdpC* 遺伝子破壊株の病原性を評価する為に、マウス由来マクロファージ様細胞株 J774.1 細胞に $\text{moi}=10$ で接種し、接種後 2 および 26 時間目の CFU を測定した (図 3A)。強毒性 SCHU P9 株は弱毒性 SCHU P5 株と比較して 10 倍程度高い増殖を示した。一方、強毒性 SCHU P9 株から作出された *pdpC* 遺伝子破壊株のマクロファージ内増殖性は、弱毒性株と同程度またはそれ以下だった。

マウスに対する病原性を評価するために、 1×10^6 CFU の各菌株をマウスに経鼻接種した。この結果、強毒性 SCHU P9 株を接種したマウスは 5 日目に全て死亡したが、*pdpC* 遺伝子破壊株および弱毒性 SCHU P5 株を接種したマウスは 14 日間生残した (図 3B および C)。

以上の結果より、強毒性野兔病菌の *pdpC* 遺伝子を破壊すると病原性が消失することが明らかとなった。

pdpC 遺伝子破壊株の相補試験

pdpC 遺伝子破壊株の相補試験を行うために pNVU1-*pdpC* プラスミドを作出した (図 4A)。このプラスミドは、pOM5 プラスミドの大腸菌 ori (pMB1)、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (*camR*)、野兔病菌 ori (*repA*) を含む DNA 断片に、野兔病菌 *bfr* 遺伝子のプロモーターの直下に *pdpC* 遺伝子の全長 (pA9) または半分 (pA8) をコードする DNA 断片を挿入した。pNVU1-*pdpC* プラスミドを用いて、弱毒性 SCHU P5 株および *pdpC* 遺伝子破壊株を形質転換した。強毒性株、弱毒性株、*pdpC* 遺伝子破壊株、および相補株の J774.1 細胞における増殖性を観察した (図 4B)。この

結果、強毒性株はマクロファージ内で効率よく増殖できるのに対して、弱毒性株および *pdpC* 遺伝子破壊株は限定的だった。また、相補株の増殖は弱毒性株および *pdpC* 遺伝子破壊株より高く、*pdpC* 遺伝子を全長コード (pA9) した相補株は半分コード (pA8) した相補株より増殖性が約 2 倍高かった。

マウスに対する病原性を評価するために、 1×10^6 CFU の強毒性株、弱毒性株、*pdpC* 遺伝子破壊株、および相補株をマウスに経鼻接種した (図 4C および D)。この結果、弱毒性株および *pdpC* 遺伝子破壊株接種群のマウスは、臨床症状を示さず全て生残した。一方、強毒性株および相補株接種群のマウスは全て死亡した。以上の結果より弱毒性株や *pdpC* 遺伝子破壊株でも、機能的な *pdpC* 遺伝子を相補すれば病原性が復帰することが明らかとなった。

D. 考察

野兔病菌は非常に高い病原性と致死性を持つ細菌である。本研究では野兔病菌の病原因子を同定することを目的とし、ゲノム上でたった 1 塩基 (挿入・欠損) しか違いを持たない弱毒性 SCHU P5 株と強毒性 SCHU P9 株を作出した。この 1 塩基は野兔病菌の *pdpC* 遺伝子の中央部に位置し、弱毒性株では 1 塩基欠損によってフレームシフトが発生し、正常な大きさの PdpC タンパク質が生合成できないことが明らかとなった。そこで、強毒性株の *pdpC* 遺伝子破壊株と相補株を作出し、*pdpC* が病原性を規定する遺伝子であるか検証を試みた。この結果、強毒性株の *pdpC* 遺伝子を破壊した株は大きく病原性が低下した。更に、弱毒性株または *pdpC* 遺伝子破壊株を PdpC

タンパク質発現プラスミドで相補すると病原性の復帰が見られた。これらの結果は、野兎病菌の *pdpC* 遺伝子が本菌の病原性発現機構に強く関与していることを強く示唆している。

E. 結論

野兎病菌 *pdpC* 遺伝子は本菌の病原性発揮に非常に重要であることを証明した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

昨年度までの結果 ～まとめ～

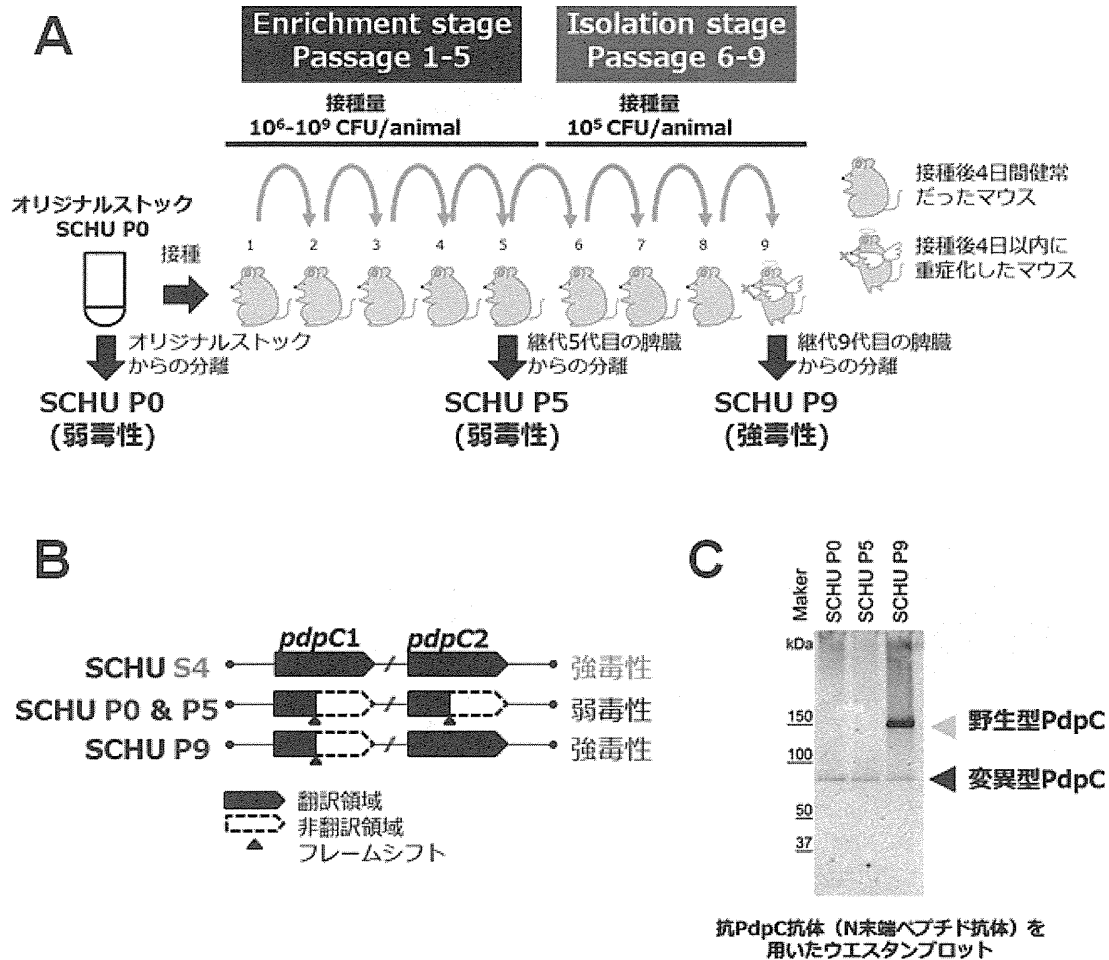


図1. 弱毒性SCHU P5株と強毒性SCHU P9株。

(A) *Francisella tularensis* は、ヒトや動物に野兔病を引き起こす細胞内寄生菌である。本菌は、マウスに対して極微量の菌体 (10 CFU) で感染が成立し、食食細胞内で増殖後、敗血症を誘発し、死亡させる事が知られている。しかし我々が保管していた本来強毒株である *F. tularensis* SCHU株は、 10^6 CFUをマウスに接種しても非致死的で弱毒化していた。この弱毒化したSCHU株をマウスで9代継代したところ病原性の増強が認められた。そこで、継代前ストック、継代5および9代目のマウス脾臓から、各々SCHU Passage 0 (P0)、P5およびP9株を分離した。(B) 弱毒株と強毒株の全ゲノム配列を次世代シーケンサーで解析した。この結果、弱毒株 (SCHU P0, P5) の *pdpC1* と *pdpC2* および強毒株 (SCHU P9) の *pdpC1* では、2045塩基目のAが欠損していた。(変異型)。一方、強毒株 (SCHU P9) *pdpC2* のみ全長がコードされていた。(C) ウエスタンブロット解析によって、強毒性SCHU P9株のみが野生型PdpCを産生できることが明らかとなった。

P9強毒株の*pdpC*遺伝子破壊株の作出 (538ins, 1119ins, 2013ins strains; TargetTron)

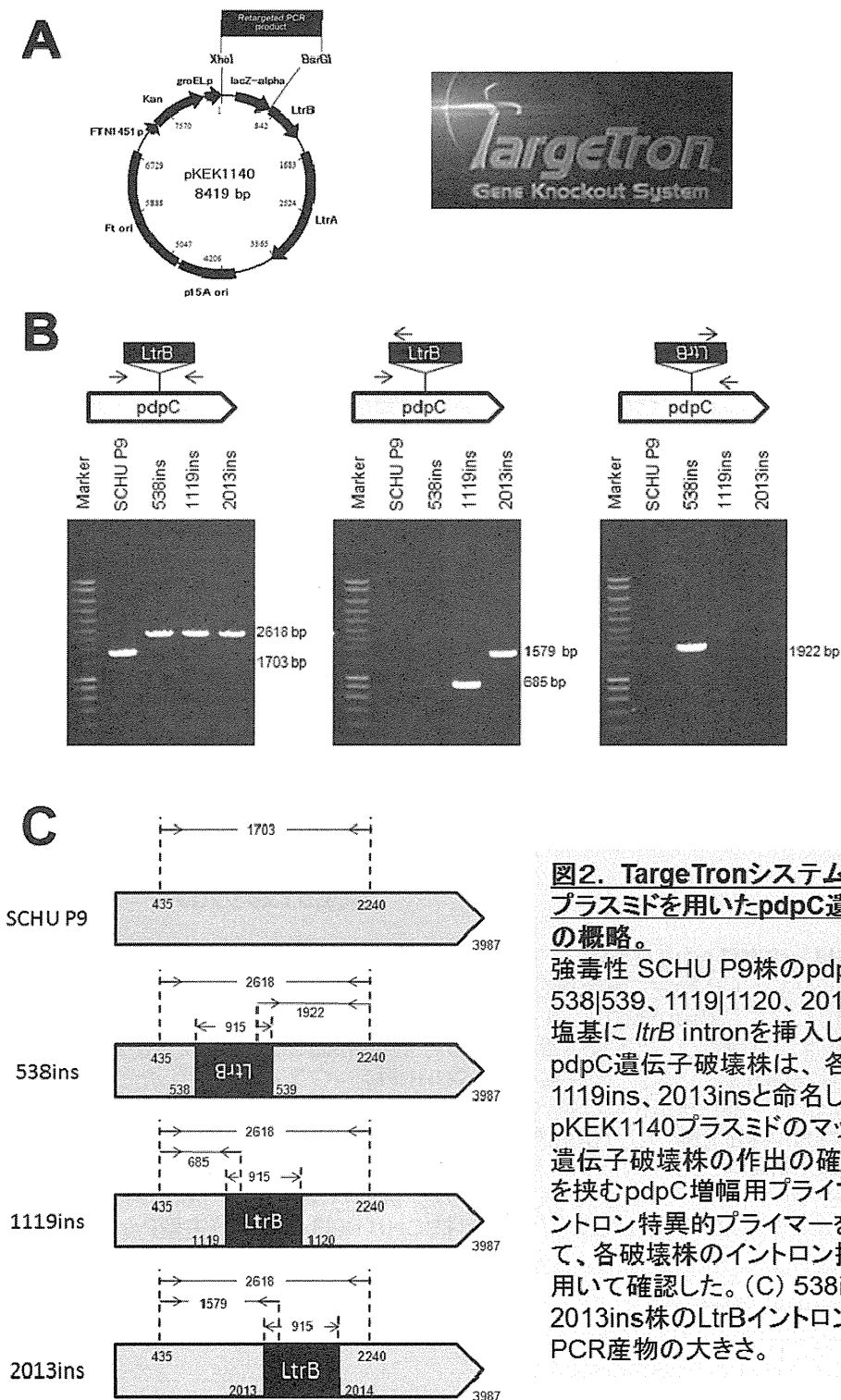


図2. TargetTronシステムとpKEK1140プラスミドを用いた*pdpC*遺伝子破壊株の概略。

強毒性 SCHU P9株の*pdpC*遺伝子の538|539、1119|1120、2013|2014番目の塩基に *ltrB* intronを挿入した。得られた*pdpC*遺伝子破壊株は、各々538ins、1119ins、2013insと命名した。(A) pKEK1140プラスミドのマップ。(B) *pdpC*遺伝子破壊株の作出の確認。イントロンを挟む*pdpC*増幅用プライマーおよびイントロン特異的プライマーを組み合わせ、各破壊株のイントロン挿入をPCRを用いて確認した。(C) 538ins、1119ins、2013ins株の*LtrB*イントロン挿入部位とPCR産物の大きさ。

P9強毒株のpdpC遺伝子破壊株のマクロファージ及びマウスに対する病原性

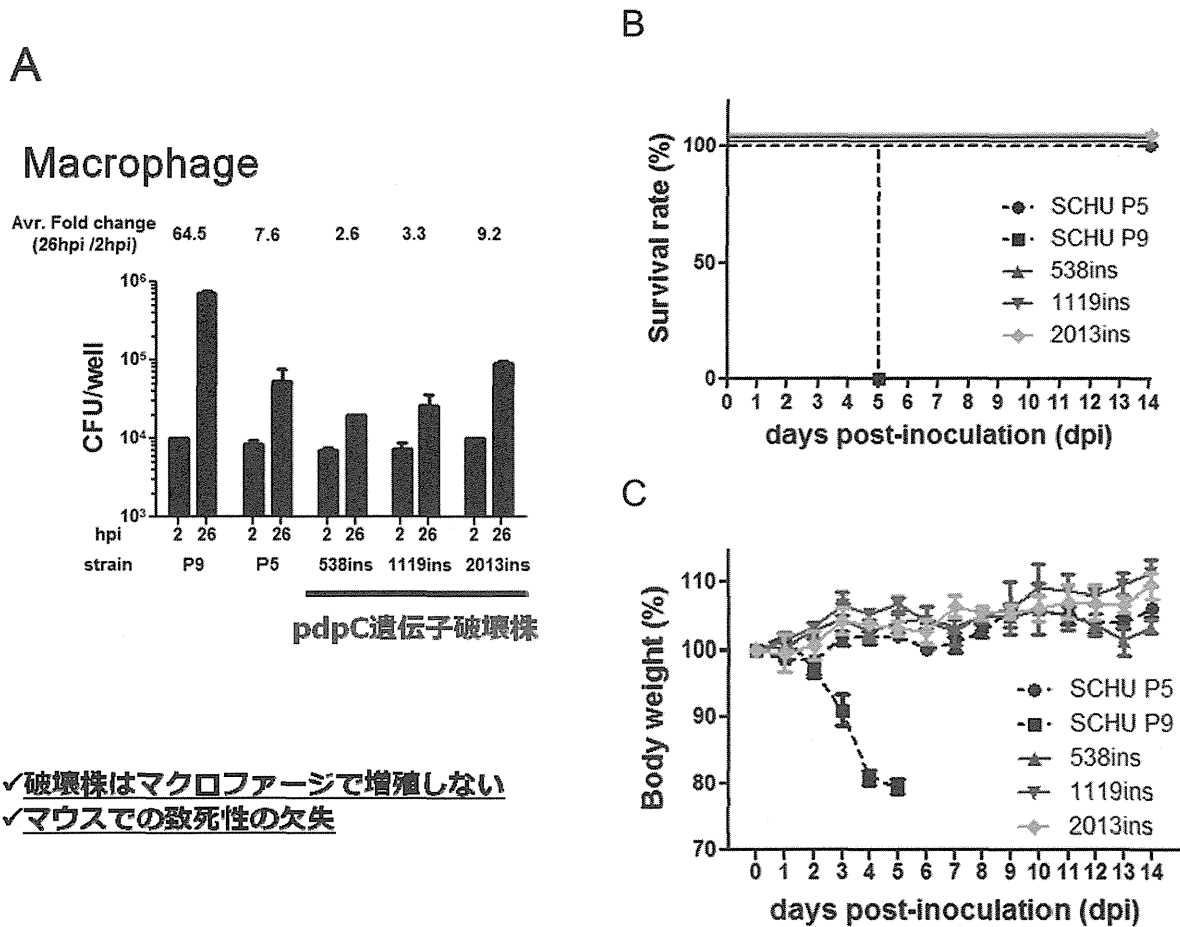


図3 pdpC遺伝子破壊(538ins、1119ins、2013ins)株の病原性確認。

(A) J774.1細胞に弱毒性 SCHU P5、強毒性 SHCU P9、および3種類のpdpC遺伝子破壊株をmoi=10でマクロファージ様細胞株に接種した。感染細胞は、接種後2時間および26時間目に0.1% Triton X-100を含むCDMで可溶化した後、CFUを測定した。(BおよびC) 1×10^6 CFUの弱毒性 SCHU P5、強毒性 SHCU P9、および3種類のpdpC遺伝子破壊株を各4匹のC57BL/6Jに経鼻接種した。接種後の生残数(B)および体重(C)は14日間観察した。

P5弱毒株およびpdpC遺伝子破壊株に PdpC発現プラスミドを導入

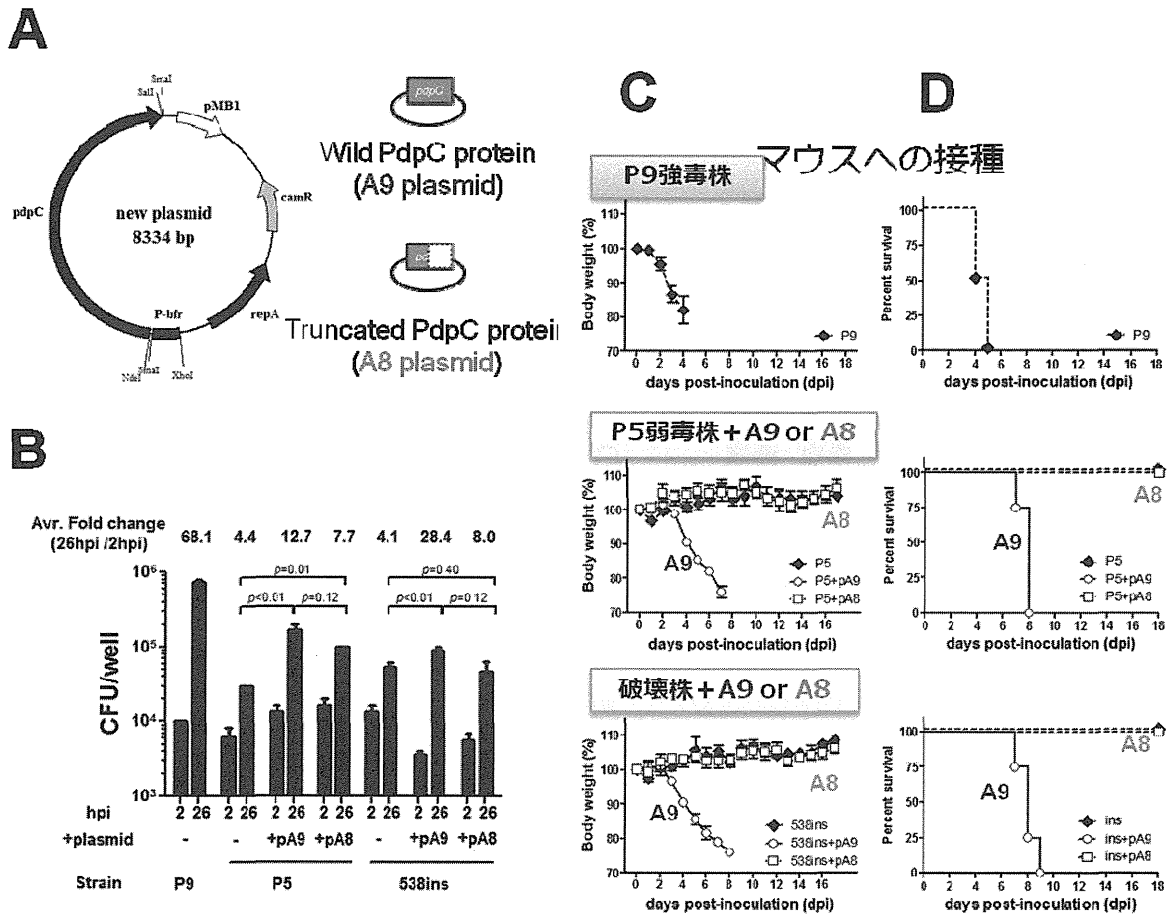


図4. pdpC遺伝子破壊株と相補株の病原性比較。(A) pdpC遺伝子を相補する為のプラスミドのマップ。(B) J774.1細胞に弱毒性 SCHU P5、強毒性 SCHU P9、pdpC遺伝子破壊株、および相補株をmoi=10でマクロファージ様細胞株に接種した。感染細胞は、接種後2時間および26時間目に0.1% Triton X-100を含むCDMで可溶化した後、CFUを測定した。(BおよびC) 1×10^6 CFUの強毒性 SCHU P9、pdpC遺伝子破壊株、および相補株を各4匹のC57BL/6Jに経鼻接種した。接種後の体重(C)および生残数(D)は18日間観察した。

エキノコックスに関する研究

研究分担者 森嶋康之（国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官）
研究協力者 杉山 広（国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官）
山崎 浩（国立感染症研究所 寄生動物部 第二室長）

要旨 エキノコックス症の感染源となるステージである成虫型へ発育分化を誘導した材料を用い、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析をおこなって、処理にもなると特徴的に発現する遺伝子群を同定した。

A. 研究目的

エキノコックス症は、エキノコックス属条虫の幼虫が寄生することによって引き起こされる人獣共通寄生虫症で、ヒトをはじめとする中間宿主動物に致死的な転帰をもたらす。一般的な条虫幼虫感染と異なる強い病原性は、本属条虫のみの特異的な幼虫形態として認められる原頭節の無性生殖能にあると考えられている。すなわち、中間宿主体内において原頭節は無性的に増殖することにより、がん類似の症状を引き起こす。ところが原頭節は、イヌをはじめとする終宿主動物に経口的に摂取された場合、同じ発育ステージである原頭節へ再分化するのではなく、次の発育ステージである成虫へと変化し、有性生殖を行って虫卵を産生し、これが中間宿主への感染源となる。

本研究は、このエキノコックスの原頭節が有する二方向性の分化能に焦点をあて、とくにそのヒトへの感染源となる成虫型発育への方向決定に関わる遺伝子群の同定を試みることを目的とする。

B. 研究方法

エキノコックス原頭節の成虫型への分化誘導は、昨年度報告の人工培養法にしたがっておこなった。すなわち、二次包虫症によって実験室内継

代中の実験動物（スナネズミ）由来の多包虫原頭節を定法にしたがって宿主組織から分離・精製後、1%ペプシン（pH2.0）（処理 I）、1%パンクレアチン・タウロコール酸ナトリウム（pH 8.0）（処理 II）、0.3%トリプシン（処理 III）を用いて連続的に処理し、次いで FBS 加培養液において 38°C-5% CO₂ 条件下で 1 日培養をおこなった。

上記培養により各処理ごとに採取した原頭節から mRNA を調整し、マイクロアレイ（アジレント社製、全搭載遺伝子約 15,000）を用いて、それぞれの遺伝子発現量の測定をおこなった。マイクロアレイによって抽出された変動遺伝子群の評価にあたっては、まず予備的にクラスター解析をおこない、各処理ごとの発現パターンと処理間の整合性の有無を確認した。次いで、各処理がエキノコックス原頭節の成虫型分化へ与えた影響を知るため、隣接する各処理間での遺伝子発現の変化を調べた。すなわち、分離・精製操作のみの未処理原頭節（NT）を出発点とし、以後処理 I 中（T1）、同処理後（T2）、処理 II 中（T3）、同処理後（T4）、処理 III 後（T5）、本培養開始 1 日後（T6）と、経時的サンプリングされた材料から得られた発現量の測定結果について、T1 対 NT（以後 S1 と呼称）から T6 対 T5（同 S6）までの組み合わせを作成し、そ

それぞれ2倍以上の発現差が認められる遺伝子について統計学的に有意 (t-test, $P < 0.001$) と判定された遺伝子を選別するとともに、qRT-PCRによる発現の確認をおこなった。

C. 結果

クラスター解析の結果、各種の処理によって変動した遺伝子群は、NT から T4 までのクラスターと T5 から T6 までのクラスターとに大別された。さらに前者はペプシン処理の違いとパンクレアチン・胆汁処理の違いによって分けられた。次いで隣接する処理間において見られる遺伝子群の変動に注目して統計学的検討をおこなったところ、発現量2倍以上で、かつ統計学的有意差が認められた遺伝子数 (と、そのうちqRT-PCRによって発現確認がなされた遺伝子数) は、S1: 上昇 34 (21)・下降 18 (12)、S2: 上昇 46 (32)・下降 2 (1)、S3: 上昇 98 (71)・下降 23 (9)、S4: 上昇 87 (66)・下降 21 (12)、S5: 上昇 101 (90)・下降 75 (39)、S6: 上昇 66 (49)・下降 58 (37) であった。

これらすべてにアノテーションがなされていなかったが、発現量が上昇した遺伝子群の上位についてみると、S1 から S2 では切断ポリアデニル化特異因子やヘリカーゼ、テトラスパニン、上皮成長因子、膜貫通受容体、トランスコロン、S3 から S4 では脂質ラフト関連たんぱくやジンクフィンガー、カドヘリン、細胞接着分子、S5 ではグルコースやアミノ酸の輸送に関連する遺伝子群の発現上昇がそれぞれ認められた。

D. 考察

すでに述べたように、エキノコックスの原頭節がもつ二方向性分化は、病原性の発揮を含め、

この寄生虫の生物学的特徴となっている。それにもかかわらず、いずれの方向へ分化したのかは、これまで形態学的な変化の観察にもとづいてのみ判断されるものであり、いつ分化が決定しているのか明らかでなかった。

今回、終宿主体内での発育を模した各種処理によって引き起こされる遺伝子発現の変化を観察した結果、S4 (処理 II) までは形態形成にかかわる遺伝子群に発現上昇が認められること、さらにそれ以降の S5 (処理 III) では、形態形成関連遺伝子に代わり、糖などの膜輸送関連の遺伝子に顕著な発現亢進が認められることから、S4 までに成虫型への分化方向が決定しているものと考えられた。

残念ながらエキノコックスのゲノムプロジェクトがいまだ進行中であるが、今後ゲノムアノテーションが早期に整備され、本研究で観察された個々の変動遺伝子間の関係が解明されることが望まれる。

E. 結論

成虫型へ分化誘導したエキノコックス原頭節についてマイクロアレイによる遺伝子発現量の変化を測定し、分化の決定がなされる時期を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし