

201225049A-B

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～平成24年度 総合研究報告書

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 堀 田 明 豊

平成25 (2013) 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～平成24年度 総合研究報告書

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 堀 田 明 豊

平成25 (2013) 年 3 月

目次

I.	総合研究報告書	
1.	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 堀田明豊	1
II.	平成 24 年度総括研究報告書	
1.	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 堀田明豊	15
2.	研究成果の刊行に関する一覧表	45
3.	研究成果の刊行物・別刷	47

Ⅱ. 平成24年度総括研究報告書

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 野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は多種の動物に感染するが、本菌に対する感受性は動物種間で異なる。マウスおよびノウサギは野兎病菌に対し高感受性であるが、ラットは比較的耐性である。これまで野兎病菌の病原性解析はマウス感染実験にて進展してきた。しかしラットにおける野兎病の病状進行、宿主免疫応答の解析は進んでいない。また日本分離野兎病菌の病原性は不明な点が多い。本研究課題では保有野兎病菌全 51 株について性状解析を進め、新鮮分離の NVF1 株を含む 4 株が標準的な野兎病菌の病原性を有すことを明らかにした。本年度は引き続き各株の性状を解析するとともに、人工培地継代による NVF1 株の性状変化を解析した。また NVF1 株のラットに対する病原性を解析し、マウスとラットの野兎病菌感受性の相異を比較した。NVF1 株を近交系ラット (F344/NS1c および LEW/SsNS1c) およびクローズドコロニーラット (Slc:SD および Slc:Wistar) の 4 系統に 10^2 cfu 皮内接種したところ、いずれの個体も無症状であった。腹腔内接種では F344/NsSlc は 10^4 cfu 接種で全匹が致死的経過をとったが、Slc:SD ラットは 10^5 、 10^6 および 10^7 cfu 接種においても生残個体が認められ、ラット系統間の野兎病菌感受性相異が認められた。皮内および腹腔内接種生残ラットについて血清学的試験を試みたところ、ラットはマウスやヒトと異なり、野兎病菌蛋白質に対する IgG 抗体価が著しく上昇することが明らかになった。NVF1 株を Eugon チョコレート寒天培地で継代したところ、30 代で細胞内増殖性が、ゲンタマイシン感受性が、40 代継代で最小培地における増殖性が、120 代継代で菌の形態が変化することが明らかとなった。以上より NVF1 株のラット病原性が確認され、ラットとマウスの野兎病菌感染に対する免疫応答の相異が明らかになった。ラットは血清疫学調査に有用な動物種と考えられたが、ヒトの血清診断法とは異なり、野兎病菌蛋白質を標的にした抗体検出法が有効と考えられた。

研究協力者

藤田 修 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
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
Sharma Neekun 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
朴 天鎬 北里大学獣医学部病理学研究室

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) の起因菌である。野兎病は欧米では毎年 100 例以上の症例がある。日本では過去に東北地方や関東地方北部を主に 1,400 程の症例があるが近年では稀である。国内では近年、菌分離報告がなく、日本の野兎病菌の研究は進展していない。

野兎病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* で報告されている。 *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。

ヒトは野兎病菌に感染した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。

動物における野兎病の感染源はダニの吸血や汚染水の接種、感染個体への接触などと考えられている。野兎病菌に対する感受性は動物種により異なる。マウスやノウサギは感受性が高く本菌感染により致死的経過をとるが、他の動物種は比較的耐性で、症状を呈さない、または発症しても多くは回復する。その動物種間の感受性相異のメカニズムは不明である。

これまで野兎病菌の病原性メカニズムの解析は主にマウス感染実験にて進められて来た。しかしマウスは 10 個以下の菌の接種により斃死するため宿主の免疫応答の解析には不都合な点が多い。一方、マウス同様、実験動物として汎用されているラットは野兎病菌感染に対し比較的耐性である。その耐性メカニズムは不明だが、それぞれの感染動物より得た材料を解析することにより、その感受性相異のメカニズムの一端が解明できると思われる。

本研究課題の目的は、日本と海外分離野兎病菌の性状相異、動物種間の野兎病菌感受性相異の解明である。本研究の成果はバイオテロなどにより日本国内に海外の野兎病菌侵入時の対策に有用なデータとなるだろう。平成 23 年度には新規分離野兎病菌株である NVF1 株を含む日本国内分離 4 株がマウスに対し既報の海外の野兎病菌と同等の高い病原性を有すことを明らかにした。また保有株の多くが人工培地にお

ける連続継代により弱毒化変異している可能性を示唆した。平成 24 年度は NVF1 株継代菌の性状変化についてさらに解析した。また、野兎病菌をラットに感染させ、その宿主免疫応答についてマウス宿主免疫応答と比較解析した。

B. 研究方法

1. 供試野兎病菌株

主に 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分離された *F. tularensis* subsp. *holarctica* NVF1 株を供した。本株はマウスを 3.8 cfu 皮内接種にて斃死させる病原性を有することが確認されている。菌株は 1% (w/v) スキムミルク 10% (w/v) グリセロール溶液に懸濁し、 -80°C に保存した。

2. 供試血清

感染マウス血清は昨年度のマウス感染実験にて得た日本分離株 (Chiba, Ebina, Nikaido および Yama) 10^{0-3} cfu 腹腔内または皮内接種後回復したマウスの血清を供した。野兎病患者血清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にて承認済みの検体を用いた。

3. 野兎病菌の培養

8% (v/v) 綿羊脱繊維血を加えた Eugon 寒天培地 (BD) 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野兎病菌を塗布し、 37°C 下にて 2-3 日培養した。また菌数測定や薬剤感受性試験にはチョコレート (II) 寒天培地 (BD)、液体培地には Chamberlain's defined medium (CDM) (Chamberlain RE 1965) などを用いた。本菌は P3 レベルの病原体であるため国立感染症研究所戸山庁舎内の BSL3 または ABSL3 指定区域内で取り扱った。

4. 菌接着能試験

いくつかの野兎病菌株はバイオフィーム形成能を有することが報告されている。このためバイオフィーム形成能の簡易判定法であるマイクロプレート法にて保有菌株の接着能を検査し

た。OD600 値を目安に CDM broth 培養菌液を調整し、96 穴プレートに 100 μ l ずつ分注した。37、30、20 または 4°C にて 1-7 日放置後、生理食塩水 200 μ l にて各ウェルを 5 回洗浄した。風乾後、1%クリスタルバイオレット溶液 150 μ l にて 15 分間染色し、蒸留水にて 5 回洗浄した。風乾後、純エタノール 150 μ l を分注、色素を溶出させ、その OD595 値をプレートリーダーにて測定した。陽性対照にはバイオフィーム形成能が報告されている *Francisella novicida* U112 株を供試した。

5. 薬剤感受性試験

Eugon チョコレート寒天培地にて 48 時間培養した菌を CDM broth に懸濁し、OD600 1.2 に調整した。チョコレート (II) 寒天培地 (BD) に調整菌液を綿棒にて塗布し、15 分後に各薬剤の E test ストリップを載せた。大腸菌 (ATCC 25922) およびブドウ球菌 (ATCC 29513) を Quality control とし、培養 1 および 2 日目の各株の 10 薬剤 (アズトレオナム、ゲンタマイシン、エリスロマイシン、セフォタキシム、セフロキシム、ベンジルペニシリン、セファロチン、シプロフロキサシン、ドキシサイクリンおよびセフォキシチン) における阻止円を観察し、阻止円と交わる E test ストリップ上の数値を minimum inhibitory concentration (MIC) とした。

6. 各培地における増殖性比較

Eugon チョコレート寒天培地に 48 時間培養した野兎病菌を生理食塩水に懸濁し OD600 値 1.2 に調整した。調整した 10 倍段階希釈し、希釈溶液 5 μ l を各寒天培地にスポットした。寒天培地には Eugon チョコレート寒天培地、チョコレート (II) 寒天培地および CDM 培地を供試した。培養 3 日後に各継代菌のコロニーの有無を観察した。

7. 形態学的観察

Eugon チョコレート寒天培地に 47-48 時間培養後、走査型電子顕微鏡 (SEM, negative-stain) および透過型電子顕微鏡 (TEM, 超薄切片) にて観察した。SEM には 1% グルタルアルデヒド、TEM には 2.5% グルタルアルデヒド、1% パラフォルムアルデヒド含有 PBS にて固定した。

電子顕微鏡の操作および観察は国立感染症研究所感染病理部の片岡紀代先生に協力にて観察した。

8. 補体感受性試験

10²cfu/ml に調整した各継代菌溶液を等量の 50% (w/w) 無処理または非働化済モルモット血清含有生理食塩水と混合し、37°C に 90 分感作した。感作後、各混合液の cfu を測定した。

9. ラット感染実験

(1) 皮内接種

F344/Nslc (115.7-124.1g)、LEW/SsNSlc (160.6-167.5g)、Slc:Wistar (125.2-141.5g) および Slc:SD (136.3-145.2g) の 4 系統の 6 週齢雌のラットを各 4 匹供した。麻酔下にて腹部皮下に NVF1 株 860 cfu 含有生理食塩水 50 μ l 接種した。接種後 2 週目まで毎日体重測定し、25 日目に採血した。本実験は国立感染症研究所動物実験実施規定に従った。

(2) 腹腔内接種

NVF1 株の LD50 を 1 群 4 匹の F344/Nslc (82.8-94.4g) および Slc:SD (115.1-137.0g) ラット 5 週齢雌を用いて測定した。F344/Nslc には 10¹⁻⁴cfu、Slc:SD には 10³⁻⁷cfu/100 μ l 接種した。接種後 14 日まで体温をまた 21 日まで体重を測定した。体温は内耳より非接触式赤外線体温計サーモフォーカスプロ (Tecni Med, Vedano, Italy) にて測定した。体重から 20% 減少した個体は安楽殺した。斃死および安楽殺個体の一部からは採血、脾臓、肝臓、肺および腎臓を採材した。本実験は国立感染症研究所動物実験実施規定に従った。

(3) 細菌学的解析

採材した臓器を重量測定し、ビードビーター (Biospec 社) にて 20 秒 2 回の攪拌により 10% (w/v) PBS 乳剤を調整した。作製乳剤は 10 倍段階希釈し、各臓器中の野兎病菌数を測定した。

(4) 病理学的解析

採材した各臓器を10%フォルマリン緩衝液にて固定後、切片を作製、HE染色にて観察した。腹腔内接種ラット臓器については固定後の作業を札幌総合病理研究所に委託した。

(5) 血清学的検査

皮内接種ラット接種後 25 日および腹腔内接種ラット接種後 21 日生残個体の血清について微量凝集反応、酵素抗体法およびウエスタンブロット (WB) 法にて血清の抗体価および抗体の認識抗原を解析した。各血清は 56°C30 分にて非働化後、試験に供した。

i) 微量凝集反応

血清 10 μ l をマイクロプレートにて生理食塩水 40 μ l と混合し、2 倍段階にて 5 から 640 倍まで 25 μ l の希釈液を調整した。フォルマリン不活化野兔病菌 Yama 株 (OD560 値: 1) に 50 分の 1 量のサフラニン溶液を加え、各ウェルに 25 μ l ずつ加えた。混合後、20 秒間攪拌し、37°C にて 16 時間感作させた。感作後、マイクロプレートを白色板上に置き、各ウェルの凝集像の有無を観察し、各血清の凝集力価を決定した。

ii) 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) および WB

分離ゲルに 12.5 % e-pagel 18wells (ATTO, Kanagawa) を用いた。泳動抗原には野兔病菌 NVF1 株全菌体を生理食塩水に OD600 値 0.7 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 分間煮沸し供した。プロテナーゼ K 処理抗原は全菌体可溶性抗原に 5% 量のプロテナーゼ K 溶液 (20 mg/ml) を加え、56°C30 分反応、また新たに同量のプロテナーゼ K 溶液を加え、56°C2 時間反応させ、5 分間煮沸し調整した。調整抗原は泳動ゲルの各 well に 6 μ l 適用した。分子量マーカーとして WIDE-VIEW™ 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。

泳動終了後、分離した試料を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, 10% (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。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 次抗体として、ラット血清は 500 倍希釈、マウス血清および野兔病患者血清は 100 倍希釈し、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。2 次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ラット IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc)、抗ラット IgM 抗体 (Bethyl laboratories Inc)、抗マウス IgG (H+L) 抗体 (invitrogen) 抗マウス IgM 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc)、抗ヒト IgG 抗体 (ICN Pharmaceuticals, Inc.)、および抗ヒト IgM 抗体 (Zymed® laboratories) を 8,000 倍に希釈し用いた。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。反応は 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。

iii) 酵素抗体法 (ELISA)

フォルマリン不活化 NVF1 全菌体を重炭酸バッファーに 10 倍希釈し、96 ウェル ELISA プレート (microlon 高結合型: Greiner) の各ウェルに 100 μ l 分注、4°C に 18 時間おき抗原をコーティングした。PBST にて 3 回洗浄後、3% スキムミルク含有 PBST を 125 μ l / ウェル分注し、37°C 1 時間ブロッキングした。PBST にて 3 回洗浄後、検体および対照を 100 倍から 3,200 倍まで 1% スキムミルク PBST に 2 倍段階希釈し、50 μ l / ウェル分注し、37°C にて 1 時間反応させた。PBST にて 4 回洗浄後、HRP 標識抗ラット IgG 抗体、抗ラット IgM 抗体、抗マウス IgG (H+L) 抗体、抗マウス IgM 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc)、抗ヒト IgG 抗体 (ICN Pharmaceuticals, Inc.)、

および抗ヒトIgM抗体 (Zymed[®] laboratories) を1%スキムミルクPBSTに8,000倍に希釈し50 μ l/ウェル分注し、37°Cにて1時間反応させた。PBSTにて4回洗浄後、SureBlue (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) を100 μ l分注し、37°C30分発色させた後、1N HCl溶液にて発色を停止させ、プレートリーダー (BioRad iMark Microplate reader) にて吸光度450nmを測定した。

10. 培養細胞への野兔病菌感染

(1) 培養細胞

マウスマクロファージ様細胞 J774.1 (RCB0434, RIKEN Cell Bank) およびラット肺胞マクロファージ由来細胞 NR8383 (ATCC[®] CRL-2192[®]) を用いた。J774.1の培養は10% ウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum ; FBS) (Invitrogen) 加 RPMI1640 (Wako) を、NR8383の培養は15% FBS 加 Hams F12 (Wako) を培地とし、37°C、5% CO₂ 存在下で3-5日おきに継代培養した。感染実験用の細胞調整時は phorbol 12-myristate 13-acetate を最終濃度1 μ Mに調整し、24ウェルプレートに10⁵ cells/1 ml/ウェルに調整し、3日培養後、感染実験に用いた。

(2) 野兔病菌 NVF1 株の感染

Eugon チョコレート寒天培地にて48時間培養した菌を生理食塩水に懸濁した。調整菌液をRPMI1640またはHams F12にてmoi 100に調整し、24ウェルプレート1ウェルに200 μ lずつ接種した。37°Cにて1時間感作させた後、50 μ g/ml ゲンタマイシン含有RPMI1640にて2回洗浄し、10 μ g/ml ゲンタマイシン含有10%FBS-RPMI1640または15%FBS-HamsF12にて培養した。各接種菌液は10⁴⁻⁶希釈しcfuを測定した。

(3) 細胞の可溶化とcfu測定

野兔病菌接種細胞を一定時間培養後、培地を除去し2回洗浄した。各ウェルに1% (w/v) サポニンD.W. を100 μ l入れ、室温5分にて細胞を可溶化した後、900 μ lの生理食塩水を加え、1ml/wellとした。その10⁰および10²希釈または10¹および10³希釈液のcfuよりウェル中のcfuを算定した。

C. 研究結果

1. 保有菌株のバイオフィーム能解析

マイクロプレート法による菌接着能を判定した。陽性対照として供試した *F. novicida* U112 株に強い接着能が認められた。Kf Water#23 および Kf 71 株は U112 株と比較すると弱い接着能が認められた (図1)。これら2株の接着性は37°C一晩にて認められたが、4、20および30°Cの7日間の放置では認められなかった (図1、一部データ示さず)。また丸底プレートと比較して平底プレートに強く接着する傾向が認められた (データ示さず)。一方、他の供試株はいずれの条件においてもプレート接着能が認められなかった。

2. NVF1 株のラットへの病原性

(1) 皮内接種によるラットの症状

F344/Nslc、LEW/SsNSlc、Slc:Wistar および Slc:SD の4系統いずれのラットも接種後、体重減少など症状を認めず、25日間無症状のまま生残した (図2)。接種25日後、部分採血の後、10⁵cfuの菌を腹腔内に追加接種したが同様にいずれの個体も症状示さず生残した。組織像においても皮内接種個体の脾臓には菌の侵入形跡は認められなかった (図3-A、B)。また腹腔に追加接種した個体の脾臓にはマクロファージの集簇巣が認められた (図3-C、D)。

(2) 腹腔内接種時のラットのLD50

F344/Nslc ラットに10¹⁻⁴cfu、SlcSD ラットに10³⁻⁷cfuのNVF1株を接種した。ラットは経過の相異より次の4つに大きく分けられた。1) 無症状のまま生残する個体、2) 接種時より10%程の体重減少し斃死する個体、3) 体重減少の後、体重増加し生残する個体、4) 接種時より20%程体重減少し斃死する、または安楽殺処分される。各個体の内耳温度を測定したところ、両系統とも接種前は35.7-36.8°Cであった。接種後、多くの個体が発症前期、すなわち体重減少の初日から2日の間に37°C-39°Cの発熱を呈したが、その後は37°C以下を呈し、斃死または回復した (データ示さず)。

F344/Nslc ラットの10¹cfu接種群では1) およ

び4)が各1匹、2)が2匹であった。10²cfu 接種群では1)および2)が各1匹、4)が2匹であった。10³cfu 接種群では2)が3匹、3)が1匹であった。10⁴cfu 接種群では2)が3匹、4)が1匹であった(図4および5)。10⁴cfu 接種群は全匹斃死したが、それ以外の群では1匹ずつ生残した。体重減少は10¹、10²および10³cfu 接種3群が接種後3-4日目、10⁴接種群が接種後2日目に認められた。斃死個体は10¹cfu 接種群が接種後4-8日目、10²cfu 接種群が接種後4-10日目、10³接種群が接種後4日目、10⁴cfu 接種群が接種後3-6日目に認められた。21日生残個体のうち10³cfu 接種群の1匹は体重減少が認められたが、10¹および10²cfu 接種群の各1個体は体重減少認められず、21日後の剖検においても脾臓の腫大は認められなかった(データ示さず)。

Slc:SD ラットの10³cfu 接種群では3)が3匹、4)が2匹、10⁴cfu 接種群では3)が3匹、4)が1匹、10⁵、10⁶および10⁷cfu 接種3群では2)が3匹、3)が1匹であった。無症状の個体は認められなかった。体重減少は10³cfu 接種群が接種後3-4日目、10⁴および10⁵cfu 接種群が接種後2-4日目、10⁶接種群が接種後2日目、10⁷cfu 接種群が接種後1-3日目に認められた。斃死は10³cfu 接種群が接種後4-7日目、10⁴および10⁵cfu 接種群が接種後3-4日目、10⁶接種群が接種後3日目、10⁷cfu 接種群が接種後2-3日目に認められた(図4および5、一部示さず)。全接種群に斃死および生残個体が認められ、LD50の算定は不可であった。

(3) NVF1 株接種ラットの細菌学的解析

Slc:SD ラットの接種後21日生残個体および斃死個体各6匹の臓器中の菌量を測定した。10⁶接種群の斃死3個体および10⁷cfu 接種群の斃死3個体は接種後2-3日に斃死した。これら6個体の臓器1mg中の生菌数は脾臓、肝臓および肺で10⁷から10⁹cfu、腎臓10⁶から10⁸cfuであった。血液中の生菌数は1mlあたり10⁷から10¹⁰cfuであった。10³および10⁴cfu 接種群の各生残3個体の接種21日後の臓器100mg中の生菌数は脾臓で10²から10⁴cfu、肝臓1mg、血液1ml中のcfuは検出限界以下(50cfu以下)であった。肺および腎臓における生菌数は個体に

より大きく異なった(図6)。またF334/NsSlcの10¹および10²cfu 接種群の接種後21日まで無症状で生残した個体からは血液、脾臓、肝臓、肺および腎臓のいずれからも生菌は認められなかった(データ示さず)。

(4) NVF1 株接種ラットの組織病理像

一部の個体について脾臓、肝臓、肺および腎臓の組織像を観察した。

Slc:SDの10⁷cfu 接種斃死個体では脾臓に高度のリンパ球減少および壊死、辺縁帯の萎縮、赤脾随および白脾随の巣状壊死が認められた(図7-A、B)。肝臓に肝細胞の壊死、肝細胞内空胞形成、腎臓に軽度の尿細管拡張が認められたが(図8)、肺には著変認められなかった。Slc:SDの10⁷cfu 接種回復個体では脾臓に辺縁帯の萎縮(図7-C)、肝臓にグリソン鞘周囲の炎症細胞浸潤が認められたのみで他に著変は認められなかった(データ示さず)。

F344/NsSlcの10¹cfu 接種斃死個体ではSlc:SDの斃死個体同様の組織学的変化が認められた。10³cfu 接種回復個体では脾臓にリンパ球減少および辺縁帯の萎縮(図7-D)、肝臓にグリソン鞘周囲の炎症細胞浸潤、腎臓に尿細管拡張、超細管壊死および炎症細胞浸潤が認められた(図8)。これら感染個体のいずれも肺に著変を認めなかった。F334/NsSlcの10¹および10²cfu 接種群の接種後21日まで無症状で生残した個体からはいずれの臓器にも著変認められなかった(データ示さず)。

(5) NVF1 株接種ラットの血清学的検査

皮内接種後25日および腹腔内接種後21日生残個体から採血した血清の抗体価を測定した。いずれの血清検体もELISAにて陰性対照とした正常ラット血清と比較して有意にNVF1抗原に反応した。一方F344/NsSlcラットにて接種21日後まで無症状のまま生残した10¹および10²cfu 接種群各1個体の血清はいずれの検査方法においても陰性対照血清と同等の反応であった(表1に要約)。

3. 動物種間の野兔病菌感受性比較

(1) 細胞内増殖性

J774.1 (BALB/c マウス由来) と NR8383 (SD ラット由来) に NVF1 を感染させ、接種後 2 および 24 時間の cfu を比較した。菌を各細胞へ moi 4.5 および 375 にて接種した。いずれの moi、細胞においても菌は接種後 2 から 24 時間の間に 10 倍以上増殖し、接種細胞種間における差異は認められなかった (図 9)。

(2) 回復個体血清の反応

皮下接種ラットの接種後 25 日の血清および腹腔内接種ラットの接種後 21 日の血清計 23 検体の反応と野兔病菌感染マウス血清計 31 検体ならびに野兔病患者血清計 5 検体の反応を比較解析した。微量凝集反応ではマウス血清はいずれも凝集価が 10 倍未満であったが (データ示さず) ラット感染個体血清の多くは凝集価 10 倍以上であった (表 1)。マウスの血清の凝集価が低かったため、ELISA にて抗体価を測定したところ、マウスは IgM がラットは IgG の抗体価が高い傾向が認められた (図 10)。また WB にて NVF1 の全菌体抗原およびそのプロテナーゼ K 処理抗原に対する反応を観察した。ラット血清は 500 倍希釈で反応させたところ抗 IgG 抗体の反応が全菌体抗原の 17、19 および 43kDa のバンドに強く反応した。その反応は F344/NsSlc ラット血清が弱い傾向であった (図 11 および 12)。一方マウスおよびヒト血清は 100 倍希釈で反応させたところ、抗 IgG および IgM の両 2 次抗体が全菌体抗原およびプロテナーゼ K 処理抗原に LPS 様の梯子状バンドを呈したが、その反応は弱かった (図 13、一部省略)。

4. NVF1 株継代菌の性状変化

(1) 増殖性

継代菌の Eugon チョコレート、チョコレート (II) (BD) および CDM 寒天培地における増殖性を比較した。前 2 者に各継代は 10^7 倍希釈菌液からコロニーが認められたが、CDM 培地においては 3 および 30 継代菌のみが 10^1 および 10^2 希釈液でコロニー形成した (図 14)。40 および 50

代継代菌について同様の試験を行ったところ、これらの継代菌は CDM 培地に増殖しなかった (データ示さず)。

(2) 薬剤感受性

3、30、60、90 および 120 代継代菌は全てアズトレオナム、セフトキシム、セフロキシム、ベンジルペニシリン、セフォキシチンおよびセファロチンの E test ストリップ周囲に阻止円を形成しなかったため全継代菌がこれら 5 薬剤には抵抗性と判定した。一方、ゲンタマイシン、シプロフロキサシンおよびドキシサイクリン感受性は継代数増加とともに阻止円が増大した (データ示さず)。特にゲンタマイシンに対する感受性は大きく変化し、阻止円が示した E test ストリップの数値は 3 代継代菌が 0.5 であったのに対し、10 代継代菌が 0.19、20 代継代菌が 0.125、30 代以上の継代菌が 0.094 であった。他の薬剤に対する感受性の変化は 3 代と 30 代継代菌の間ではわずかで、阻止円と E test ストリップの接点の数値はシプロフロキサシンにて 0.016 と 0.012、ドキシサイクリンにて 1 と 0.75、エリスロマイシンではともに 1 であり、差は認められなかった (表 2)。

(3) 形態

走査型電子顕微鏡の 10,000 倍観察では継代菌間に大きな相異は認められなかった (図 15)。一方、透過型電子顕微鏡の 10,000 倍観察像では 120 代継代菌に不整形の菌が多く認められた。このため 3 代継代菌と 120 代継代菌について 60,000 倍にて観察したところ、120 代継代菌の大きさおよび外膜構造が異なることが認められた (図 16)。

(4) 補体感受性

各継代菌を無処理および非働化処理モルモット血清 25% 含有生理食塩水中で 37°C 90 分感作させた後、cfu を測定した。無処理および非働化処理モルモット血清と混合した菌液中 cfu は著しく異ならなかった。一方、対照とした LVS 株は元の 1000 分 1 以下 (測定限界以下) のコロ

ニー数に減少した（データ示さず）。

（5）グリセロール発酵能

3、30、60、90 および 120 代継代菌のグリセロール発酵能を検査した。培養 3 日目に観察したところ、グリセロール添加培地において 3 代継代菌は白色コロニーを形成した。一方 30、60、90 および 120 代継代菌は淡い緑黄色のコロニーとして増殖した。しかしいずれの継代菌も培地の変色は認められず、グリセロール発酵陽性の対照として供試した BH8859 株とは大きく異なっていた（データ示さず）。

D. 考察

本年度は前年度に引き続き保有野兎病菌株の性状および NVF1 株の Eugon チョコレート寒天培地継代菌の性状を解析した。また NVF1 株のラット病原性を解析し、野兎病菌感染に対するマウスとラットの免疫応答を比較解析した。

保有野兎病菌株について接着能を比較したところ、Kf Water#23 および Kf 71 の 2 株が弱い接着能を示した。これら 2 株とバイオフィルム形成陽性対照として供試した *F. novicida* U112 株は北米の水系関連由来株である。一方、他の株は動物、ヒトまたはダニ由来株である。このため接着能が環境中における菌の生存様式に関与する可能性が考えられた。また Kf Water#23 および Kf 71 株が 4、20 および 30°C の状態では接着性が認められなかったため、その生存性への関与は非常に限られた条件でのみ働く可能性が示唆された。今後、他の地域の環境由来野兎病菌についても接着能の有無を確認する必要がある。

野兎病菌は多数の野生動物に感染するが、その自然感染経路の 1 つとしてダニ吸血時の感染が想定される。このため皮内接種法にて自然感染を想定したラット感染実験を行った。供試した 4 系統のラットはいずれの個体も 10^2 cfu 皮内接種で著変を示さず生残した。接種後 25 日後の血清中に抗体が検出されたことより、全個体への感染は成立したと考えられた。このため供試 4 系統のラットはいずれもマウスと比較して

日本分離野兎病菌 NVF1 株抵抗性であると考えられた。またこれら皮内接種にて生残した個体に 10^5 cfu 腹腔内に追加接種したが、いずれの個体も著変を示さなかった（データ示さず）。これよりラットは少量の菌の侵入に対し速やかに免疫応答し、抵抗性を獲得すると思われた。以上より野外のラット類が日本の野兎病菌の自然感染で斃死する可能性は極めて低いと考えられた。

これまで野兎病菌のラット感染実験は多数報告されている。しかし供試ラットの記載は 1990 年以前では「white rat」と記載され、系統は明らかでない。ラット感染実験は近年もいくつか報告されている。多くは Fischer344 系統を使用しているが、購入先や個体差の違いなどから均一なデータはとれていない。本研究においても同じ接種群で斃死個体、回復個体や無症状の個体も認められた。このような野兎病菌感染実験におけるラット病態の個体差はこれまでも報告されている (Wu TH ら 2009)。このため、ラット感染実験はマウス感染実験と比較すると各接種群において均一なデータを得るのは難しいと思われた。

ラットは野兎病菌腹腔内接種にて致死的経過をとることが知られているが、その経過はラット系統、接種野兎病菌株により異なる。Raymond と Conlan (Raymond CR & Conlan JW 2009) は、Fischer344 ラットは subsp. *tularensis* または subsp. *holarctica* の 10^1 cfu 腹腔内接種で全て斃死するが、Sprague-Dawley ラットは subsp. *tularensis* 10^3 cfu 腹腔内接種では 50% 斃死、subsp. *holarctica* 10^5 cfu 腹腔内接種では全匹生残すると報告している。このため日本分離株で NVF1 の病原性の比較を目的に F344/NsSlc および Slc:SD ラットへ腹腔内接種し LD50 の算定を試みた。F344/NsSlc は 10^4 cfu 接種にて全 4 匹が斃死し、他接種群は各 1 匹ずつ生残した。しかし 10^1 および 10^2 cfu 接種群の生残個体は組織学的、細菌学的および血清学的検査において感染成立が認められなかった。これら 2 個体を除外すると 10^1 および 10^2 cfu 接種群も全匹斃死と考

えることができ、F344/Nslc ラットは腹腔内接種であれば 38 cfu 以下の菌にて斃死、LD50 は 38 cfu 以下となった。また Slc:SD は 10^5 、 10^6 および 10^7 cfu 各接種群において 1 匹ずつ、 10^3 および 10^4 cfu 接種群においては 3 匹ずつ回復、生残した。このことから、NVF1 の F344/NsSlc に対する LD50 は 10^1 cfu 以下、Slc:SD に対する LD50 は 10^{4-5} cfu となる可能性が示唆された。この結果を既報の *ssp. holarctica* のラット病原性と比較すると、NVF1 株の病原性はそれと同等またはそれ以上であるが、*ssp. tularensis* と比較すると弱いと考えられ、マウス皮内接種の接種後平均生残日数の比較と同じ考察がされた。

本研究では日本 SLC 株式会社の Fischer 系ラットである F344/NSlc および Sprague-Dawley 系ラットである Slc:SD、また皮内接種では Wistar 系ラットに由来する LEW/SsN Slc および Slc:Wistar を用いた。F344/NSlc および LEW/SsN Slc は近交系ラット、Slc:SD および Slc:Wistar はクローズドコロニーである。一般的に近交系はクローズドコロニーに比較し、ストレスに弱い事が知られている。皮内接種でこれら 4 系統のラットは無症状のまま生残したが、腹腔内接種においては F344/NSlc ラットは明らかに Slc:SD ラットと比較して野兎病菌感受性であった。この感受性相異は近交系とクローズドコロニーの系統の相異に関係する可能性がある。今後同様に LEW/SsN Slc および Slc:Wistar ラットへの感染実験により近交系とクローズドコロニー間の野兎病菌感受性を比較する必要がある。

腹腔内接種実験時にラットの内耳より非接触型赤外線体温計にて体温測定を試みた。多数の感染個体の感染初期、すなわち体重減少を示した初日から 2 日目の間に 37°C 以上の発熱が認められた。しかし多くが次の日に平常時の体温に戻り、斃死前より体温は 35.8°C 以下に低下し斃死した。以上のことからラットの野兎病において発熱を呈す時期は限られていると推察された。しかし内耳より非接触型赤外線体温計を用いた体温測定とチップ式の皮内温度測定、直

腸温度測定の違いは不明であるため、測定法について再検討する必要がある。

SD ラットの感染個体のうち斃死 6 および生残 6 個体の臓器中菌量を測定した。斃死個体臓器の菌量は過去得られた腹腔内接種マウスの斃死個体の臓器から得られた菌量のデータと相異なく脾臓および肝臓で多数の菌が認められた。また肺、腎臓および血液中にも多量の菌が認められた。このことから斃死したラットは野兎病菌接種時のマウス同様、敗血症、多臓器不全にて斃死したと考えられる。接種後 21 日生残個体の臓器においては肝臓以外の臓器から生菌が認められた。感染初期のこれら生残個体の臓器中の生菌数が不明であるが、接種後 7 日の血液中に生菌が認められた個体も認められたため、各臓器中に菌が侵入したと考えられる。しかし組織像では脾臓以外で著変認められなかったため、不明な点が多い。宿主の免疫により淘汰された可能性があるが、今後詳細を解析する必要がある。

マウスとラットへの感染実験により両動物種の間で野兎病菌 NVF1 株に対する感受性の相異が明らかになった。この感受性相異メカニズムの解明を目的に J774.1 (BALB/c マウス由来) と NR8383 (SD ラット由来) を用いた感染実験をした。しかし、これら培養細胞間では野兎病菌の感染性や細胞内増殖性の相異は認められなかった。次に各動物の腹腔由来マクロファージへの感染実験を計画したが、他の研究者により同様の実験にて両動物由来マクロファージにおいて野兎病菌の増殖性に相異無い事が報告されている (Ray HJ. 2010)。このことからマウスとラットの野兎病菌感受性相異の解析に細胞への感染実験は有効でないと考えられた。

ラット斃死個体における細菌学および組織学的解析結果から野兎病菌はラットにおいてもマウス同様、主に脾臓で増殖し病変を形成することが確認された。ラットへの皮内接種にて症状が認められなかった一因は野兎病菌が接種部位から脾臓へ到達し、ある菌量に増殖するまでにラット免疫応答により、菌が排除されたためと推察される。このため動物種間の感受

性相異の解明を目的にマウスとラット両動物の回復個体の血清反応を比較解析した。供試血清検体の由来個体への感染野兎病菌株は異なるが、MAにより感染ラット血清は感染マウス血清と比較して著しい凝集力価の上昇が認められた。ELISAではラットはIgG抗体価がIgM抗体価に対し高く、マウスはIgM抗体価がIgG抗体価に対し高かった(表1)。またWBにてラットは野兎病菌蛋白質に、マウスは野兎病菌LPSに対する反応が強かった(図11-13)。このことからラットは速やかな抗体産生を介して野兎病菌に抵抗する可能性が示唆された。最近、Craneら(Crane DD, 2013)は野兎病菌感染後、抗生物質投与により延命したマウスの免疫応答を解析し、B細胞の重要性を報告している。またYangら(Yang Y, 2012)も同様に野兎病菌感染初期免疫におけるB細胞の重要性について報告している。これまで野兎病菌感染に対しての液性免疫の関与は少ないとする報告も多数あるため、今後さらにこのマウスとラットの野兎病菌に対する抗体産生様式の相異のメカニズムについて解析する必要があるだろう。

ヒトの野兎病診断の多くは血清学的に行われている。血清診断の標準法は凝集反応だが、近年、野兎病菌のLPS抗原を利用したELISA法も適用されている。研究代表者所属の研究室においても、多種の動物から抗野兎病菌抗体検出のため、野兎病菌LPSを抗原とした競合ELISA法を開発した(Sharma N, 2012)。これは感染マウスおよび野兎病患者血清が有意に野兎病菌のLPSに反応したためであるが、それら以外に感染個体由来血清が得られなかった。野兎病菌LPSを抗原とした血清抗体検出法により、国内のツキノワグマおよびホンダタヌキに感染が疑われる個体が認められている(Hotta A, 2012)。これまでの手法では野兎病菌LPS以外の野兎病菌抗原に反応する血清は非特異的の反応とを考えていたが、本研究で得た感染ラット由来血清の反応から、ヒトにおける血清診断法が各種動物においても有効な手段ではないことが明らかになった。すなわち野兎病菌LPSを抗原とした血清診断では感染ラットの抗体価の測定はできないと考えられた。このことは今後の野生動物における野兎病の血清疫学調査において動物種ごとに検査手法を変える必要性

を示唆する。今後さらに多数の動物種において感染実験を進めることにより、各種動物ごとの適当な抗体検出法の設定ができると思われる。

前年度の研究にて多くの保有菌株が細胞内増殖性を欠くなど既報の野兎病菌性状と異なる性状を示した。その原因のひとつとして、長期の人工培地連続継代の影響が考えられた。このため新鮮分離株であるNVF1株をEugonチョコレート寒天培地で連続継代し、各継代菌の性状を確認したところ、30代継代菌に細胞内増殖性が認められなくなった。細胞内増殖性が減退する原因として菌の増殖能の減退や細胞内増殖試験にて細胞外の菌の殺菌に用いるゲンタマイシンに対する感受性の変化が考えられる。このため継代菌の増殖性および薬剤感受性を解析した。

Eugonチョコレート寒天は野兎病菌が増殖しやすい高栄養培地である。BD社のチョコレート(II)寒天培地は一般のGC寒天を基礎培地とし、野兎病菌培養に頻繁に使用されるIsoVital Xを含有する。このためEugonチョコレート寒天培地同様いずれの継代菌も両培地に増殖できると考えられる。一方CDM培地における増殖性はEugonチョコレート寒天培地継代30から40代の間に認められなくなった。CDM培地は野兎病菌発育に必要な最低限の栄養素で構成される最小発育培地である。CDM培地に継代菌が増殖不可となったことから、長期の高栄養培地における継代により菌の代謝経路の一部機能が減弱または欠落した可能性が考えられた。野兎病菌が細胞内とCDM培地で増殖するために必要な代謝経路が同一であるか不明だが、昨年度の研究においていくつかの野兎病菌株をJ774.1細胞培養用培地として用いる10%仔ウシ胎児血清含有RPMI1640に接種したところ、その増殖性はCDM液体培地と比較し低かった。このことから継代菌の細胞内増殖性の低下は培地に含まれる栄養素の相異に関与する可能性が示唆された。

継代菌の薬剤感受性を確認したところ、30代以上の継代菌はゲンタマイシン感受性が3代継代菌と比較して著しく高かった。ゲンタマイシ

ンはアミノグリコシド系の殺菌性抗生物質である。一般に好気性細菌の細胞膜の能動輸送系により吸収され、リボゾームに結合、蛋白質合成を阻害する。NVF1 継代菌の感受性が高くなったメカニズムは不明だが、細胞内増殖性試験において 30 代継代菌の増殖性が認められなくなった原因の 1 つとして、継代菌のゲンタマイシン感受性が高まり、見かけ上、増殖不可となった可能性がある。一方、ドキシサイクリン(テトラサイクリン系)、シプロフロキサシン(ニューキノロン系) およびエリスロマイシン(マクロライド系) に対する感受性の変化は 120 代継代菌においてもわずかであり、3 代継代株に無効であった他の薬剤は 120 代継代菌にも無効であった。これよりゲンタマイシン以外のこれら薬剤への野兎病菌の感受性が Eugon チョコレート寒天培地 120 代継代では大きく変わらないと考えられる。研究代表者は以前、日本分離野兎病菌にはセファロスポリン系薬剤に感受性の株が存在することを示したが、今回の結果は、それら株間の感受性の相異が継代による影響でない事を示唆する。今後、ゲンタマイシン以外のアミノグリコシド系薬剤に対する継代菌の感受性も同様に解析したい。

人工培地継代による細菌の薬剤感受性変化は多数の菌で報告されている。薬剤感受性が高くなる原因の 1 つとして、長期継代により外膜の厚みが減り、浸透圧など環境中における菌の耐久性が減じると考察されている。このため NVF1 株継代菌についても同様の変化が認められるか電子顕微鏡にて継代菌の形態を観察した。3 から 30 代継代菌の間では 10,000 倍拡大の SEM(図 15) および TEM (図 16) 像観察にて大きな相異を認めなかったが、120 代継代菌の TEM 像は他と異なった。その相異は 60,000 倍拡大観察像では明白で、外膜構造が 120 代継代菌では薄く、菌のサイズも大きくなっていった(図 15)。この変化は 30 代継代菌では認められなかったため、細胞内増殖性との関係は不明である。しかしこのような形態学的変化が人工培地で継代を重ねると認められることが明らかになったため、今後、電子顕微鏡観察像も継代した野

兎病菌の性状変化の指標になると思われる。

継代菌の補体感受性およびグリセロール発酵能には著しい変化は認められなかった。さらに継代を重ねることでこれら性状が変化する可能性があるが、Bandara らによると CDM 培地における培養により補体に感受性の野兎病菌株が抵抗性に変化するとされている (Bandara AB 2011)。本研究では NVF1 を Eugon チョコレート培地で継代を重ねたが、CDM 培地のような低栄養培地で継代した場合、変異少なく、増殖性の減退や薬剤感受性の変化が少ない可能性がある。今後、CDM 培地継代菌の増殖性などについて確認する必要があるだろう。

以上より多数の保有株が細胞内増殖性を示さなかった原因の 1 つとして、人工培地継代を重ねたことにより、各株の増殖性およびゲンタマイシン感受性が変化したためと考えられた。

E. 結論

ラット類はマウスと比較し日本の野兎病菌に抵抗性であり、自然感染では症状を呈さず生残すると考えられた。その感受性相異の一因はラットの速やかな免疫応答にある可能性が示唆された。野兎病菌感染によりラットは主に野兎病菌蛋白質に対する抗体を産生すると考えられ、抗野兎病菌 LPS 抗体を検出するヒトの野兎病血清診断法ではラット由来陽性検体の検出は困難と推察された。今後野生動物における野兎病の血清調査は各動物種に適した手法にて行う必要がある。多くの保有野兎病菌株に細胞内増殖性が認められなかった原因の一つとしてゲンタマイシン感受性の変化や低栄養培地における増殖性の欠失によると考えられた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Akitoyo Hotta, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Neekun Sharma, Kiyoshi Tanabayashi, Yoshie Yamamoto, Akio Yamada, Shigeru Morikawa (投

稿中) *In vitro* antibiotic Susceptibility of
Francisella tularensis isolates from Japan.
Japanese Journal of Infectious Diseases.

2. 学会発表

Akitoyo Hotta, Osamu Fujita, Neekun Sharma,
Akihiko Uda, Yoshie Yamamoto, Akio Yamada,
Shigeru Morikawa, Kiyoshi Tanabayashi,
Intracellular growth and virulence of newly
isolated *Francisella tularensis* in Japan.
7th International conference on
Tularemia(2012年9月 アメリカ コロラド).

H. 知的財産権の出願・登録

予定無し

表1 野兔病菌接種ラット動物由来血清の反応

系統	接種経路	接種菌量 (cfu)	採血日 接種後 日数	血清反応				
				MA 凝集価	ELISA		WB反応抗原	
					IgG	IgM	蛋白質	LPS
F344/NSlc	id	860	25	160	3200<	3200<	+	-
			25	40	3200<	3200<	+	-
			25	160	3200<	3200<	+	-
			25	80	3200<	3200<	+	-
	ip	38	21	<10	<100	<100	-	-
			21	<10	<100	<100	-	-
			21	20	200	400	+	+
Slc:SD	id	860	25	160	NT	NT	+	-
			25	20	1600	400	+	-
			25	<10	800	<100	+	+
			25	40	3200	400	+	-
	ip	1.4x10 ³	20	40	100	400	+	-
			21	80	1600	800	+	+
			21	80	800	800	+	-
			21	160	1600	800	+	-
			21	40	800	<100	+	+
		1.4x10 ⁴	21	20	800	<100	+	+
			21	80	1600	800	+	+
			21	80	1600	800	+	+
			21	80	1600	800	+	+
Slc:Wistar	id	860	25	160	3200<	3200<	+	+
			25	10	100	100	+	-
			25	80	3200<	3200<	+	+
			25	320	3200<	3200<	+	+
LEW/SsNSlc	id	860	25	<10	800	800	+	-
			25	10	1600	400	+	-

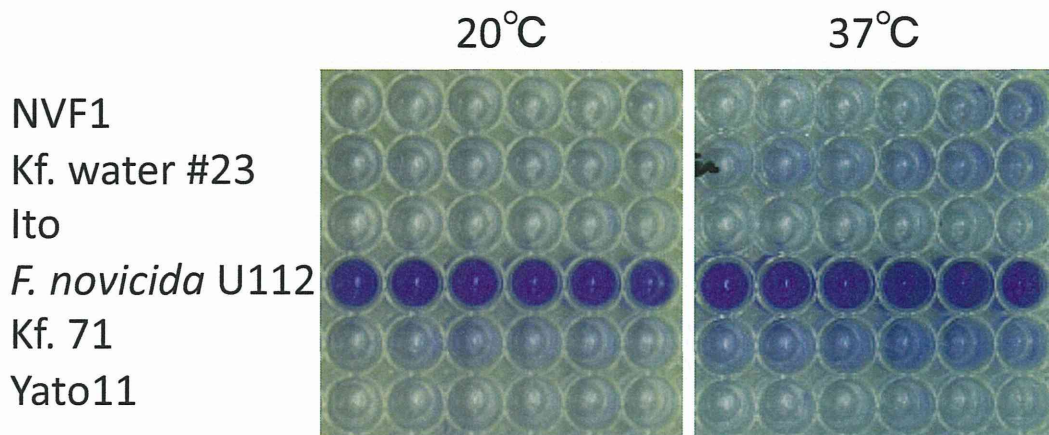
表2 NVF1継代菌の薬剤感受性

抗生物質	MIC(g/L)						
	P3	P11	P20	P30	P60	P90	P120
Aztreonam	R	NT	NT	R	R	R	R
Benzympenicillin	R	NT	NT	R	R	R	R
Cefoxitin	R	NT	NT	R	R	R	R
Cefotaxime	R	NT	NT	R	R	R	R
Cefroxime	R	NT	NT	R	R	R	R
Cephalothin	R	NT	NT	R	R	R	R
Ciprofloxacin	0.016	NT	NT	0.012	0.008	0.006	0.006
Doxycycline	1	NT	NT	0.75	0.75	0.50	0.38
Erythromycin	1	NT	NT	1	0.25	0.25	0.25
Gentamicin	1	0.19	0.125	0.094	0.094	0.094	0.094
Imipenem	R	NT	NT	NT	NT	NT	2

R: 阻止円認めず。

NT: 試験せず

A



B

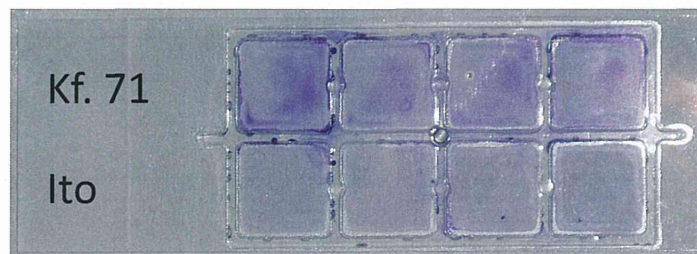


図1 野兎病菌のプレート接着能

(A) マイクロプレート接着能の判定 バイオフィルム形成能が報告されている *Francisella novicida* U112株を陽性対照として、マイクロプレート法にて保有野兎病菌各株のプレート接着能の有無を判定した。37°CにてKf. water #23およびKf. 71の2株にわずかなプレート接着能を認めたが、U112株と比較するとその接着性は極めて低いと考えられた。(B) プレート接着性が認められたKf.71株はスライドガラスにも接着性が認められた。

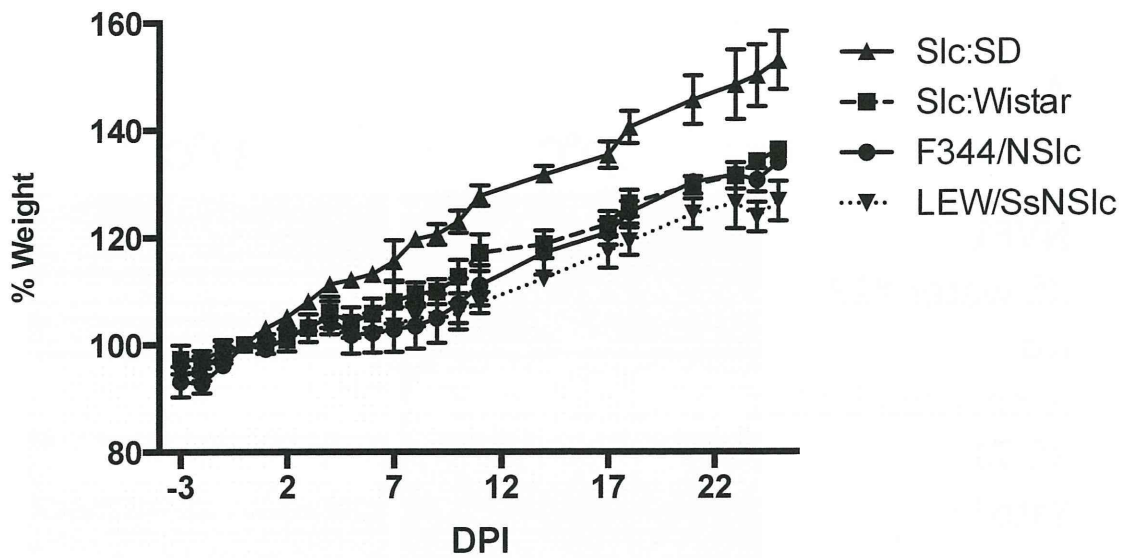


図2 野兎病菌皮内接種ラットの体重推移

4系統のラットに日本分離野兎病菌NVF1株を860cfu皮内接種した。いずれの個体も症状を呈さず25日間生育した。

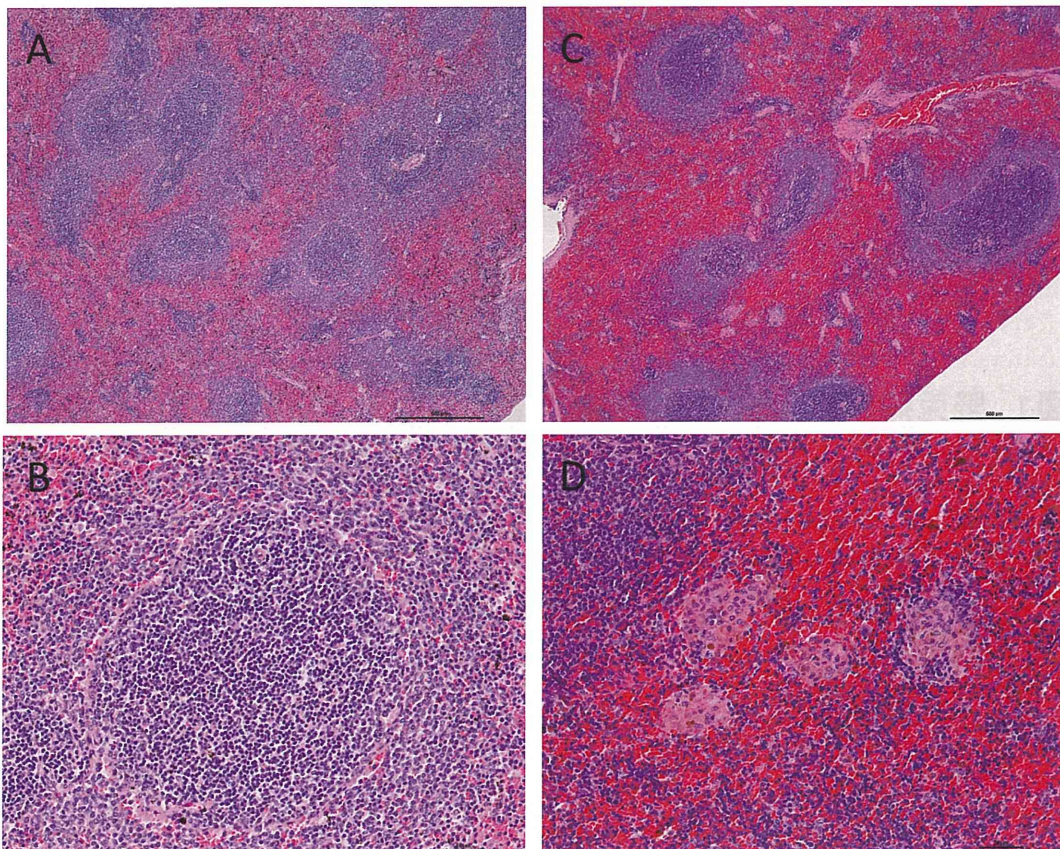


図3 NVF1皮内接種後のラット脾臓の組織像

皮内接種後のラットの脾臓の組織切片を観察したところ著変認められなかった(A 低倍、B 高倍)。皮内接種4週間後に 10^5 cfu腹腔内接種したが症状は認められず3週間生残した。組織学的には脾臓にマクロファージの集簇巣を認めた(C 低倍、D 高倍)