

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 堀田明豊	1
II.	平成 24 年度総括研究報告書	
1.	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 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

# I. 総合研究報告書

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）  
総合研究報告書

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*) は動物由来感染症、野兎病の起因菌である。海外の野兎病菌の一部は高い感染性を有し、バイオテロへの使用が危惧されている。日本分離株は海外分離株と異なる生物型に分類されているが、その病原性解析は進展していない。また野兎病菌に対する感受性は動物種間で異なるが、その相異のメカニズムは不明である。本研究課題では海外分離 15 株を含む保有 51 株の野兎病菌について解析を進め以下の成績を得た。

1. 保有野兎病菌 51 株は遺伝子性状の相異などから 6 グループに分けられた。
2. 近年分離の野兎病菌 2 株を含む日本分離 4 株が病原性を有すと考えられた。一方、全海外由来株を含む他 47 株の病原性に関わる性状は既報の野兎病菌と異なり変異弱毒化していると考えられた。
3. 新規分離野兎病菌株 (NVF1 株) を Eugon チョコレート寒天にて継代すると 10 代継代でゲンタマイシン感受性が変化し、30 代継代で細胞内増殖性が減退、40 代継代で野兎病菌最小培地上の増殖性が消失、120 代継代で形態学的に外膜構造が変化することが確認された。
4. ラットはマウスと比較して野兎病菌 NVF1 株に感受性が低いことが確認された。また野兎病菌蛋白質に対する強い IgG 抗体産生が速やか誘導されると考えられた。マウスへの感染で認められた抗体は野兎病菌リポ多糖体 (LPS) に対する抗体が主で反応性は弱かったため、これらの相異が動物種間の野兎病菌感受性相異の一因である可能性が示唆された。
5. 既報の海外由来野兎病菌病原性解析結果と比較すると日本分離株の病原性は海外の *subsp. holarctica* と同等と考えられた。

以上より、日本の野兎病菌に関するバイオテロ対策の進展には新たに海外の病原株の国内導入が必要と考えられた。動物種間の野兎病菌感受性相異については免疫応答の相異を中心に詳細を解析する必要がある。野兎病血清疫学調査にラットは有用な動物種であると考えられたが、LPS を抗原とした既存の野兎病血清診断法では感染ラットの抗体検出は困難と考えられ、各動物種に適した抗体測定法を整備する必要がある。これらのデータは国内のバイオテロ対策、動物由来感染症のリスク解析などに有用な情報となる。

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) の起原菌である。野兎病は北緯 30 度以北の世界各地で報告があり、欧米では毎年 100 例以上の症例が報告されている。ヒトは感染ノウサギやげっ歯類との接触、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。

ヒトの症状は急性発熱を主徴とする。リンパ節腫脹を伴う潰瘍リンパ節型、リンパ節型、扁桃リンパ節型、眼リンパ節型および鼻リンパ節型、また、リンパ節腫脹を伴わないチフス型、肺炎型、胃型に分類される。これら臨床型は菌の侵入部位の相異によるとされている。

哺乳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本菌感受性が高く、感染により致死の経過をとる。一方、ウシなど他の動物種は本菌に比較的抵抗性と考えられているが、まれに症状を呈し、死に至る例もある。これまでヒツジ、ウマ、イヌ、ネコ、プレーリードッグ、マスカラット、ノウサギやジリスなどの小動物の感染例や菌分離報告があり、クマやキツネ、タヌキ、ヤマネコなどで血清抗体陽性例が報告されている。

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ある。本菌は 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、病原性が強く、ヒトにおいて治療が無い場合、致死的となることもある。*ssp. holarctica* は北緯 30 度以北の北米、ユーラシアに広く分布し、病原性は比較的弱い。*ssp. mediasiatica* は中央アジアに分布し、感染例は動物のみである。*ssp. holarctica* はさらに分離地、生化学的性状の相異より 3 つの生物型、biovar I、II および *japonica* に分類される。日本国内分離株は全て biovar *japonica* と考えられているが詳細な解析はされていない。

野兎病菌は 2 種病原体で取扱いや移動は制限

されている。これは本菌の感染性が高いこと、適当なワクチンがないこと、環境中に広く分布することなどからバイオテロへの使用が危惧されているためによる。本菌の病原性研究は 2001 年のアメリカ炭疽事件以降に急激に進み始めた。しかし多くの研究は高病原性の *subsp. tularensis* の Schu またはワクチン株である *subsp. holarctica* の LVS を用いた研究で、*subsp. holarctica* 野生株の研究は進んでいない。特に日本分離野兎病菌株についての研究報告は無く、日本の野兎病の疫学、国内の野兎病菌の分布状況なども不明な点が多い。

野兎病の世界最古の記録は日本の江戸時代 (天保 8 年、西暦 1837 年) の藩医本間棗軒の記述とされている。その後、1924 年の大原八郎による症例報告から日本の野兎病研究は進展した。野兎病は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や菌分離はまれで、研究者も極めて少ないため、国内では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。ま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 年には秋田県で発見された斃死ノウサギから研究代表者所属研究室で菌が分離された。これにより野外株を用いた野兎病菌の病原性に関する研究準備が整った。

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および動物種間の野兎病菌感受性相異のメカニズムを明らかにすることである。本研究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。

## B. 研究方法

詳細は各研究年度の総括研究報告書に記載したため省略する。

国立感染症研究所獣医科学部にて保有する野兎病菌全 51 株を供試した (表 1)。糖発酵試験、薬剤感受性試験および各種遺伝子領域増幅 PCR により供試株を分類した。またアクリフラビン反応、補体感受性試験、免疫血清やモノク

ローナル抗体反応性、バイオフィーム形成能および細胞内増殖性を解析し、各株の病原性の有無を推定した。これらの解析より分類された各グループ代表株のマウス病原性を確認した。

マウス病原性が認められた野兎病菌株のうち、2009年分離の NVF1 株を皮内および腹腔内接種によるラット感染実験に供試した。感染個体より得られた試料を供し、マウスとラットの野兎病菌感受性相異について解析した。動物実験については全て国立感染症研究所

野兎病菌標準的な性状を示さなかった株が多数認められたため、NVF1 株を Eugon チョコレート寒天培地に 120 代まで継代し、継代菌の増殖性、薬剤感受性、形態、補体感受性およびグリセロール発酵能を比較解析した。

## C. 研究結果

### 1. 保有株の分類

野兎病菌保有 51 株 (表 1) についてグリセロール発酵能、エリスロマイシン感受性および RD 遺伝子領域を解析し、各株の亜種、生物型および遺伝子グループを同定した。生化学的性状から保有菌株は subsp. *tularensis* 3 株および subsp. *holarctica* の biovar I (41 株)、II (7 株) に分類された。さらに RD 遺伝子領域の相異から subsp. *tularensis* は 2 つの遺伝子グループに、subsp. *holarctica* の biovar I は 3 つの遺伝子グループに分けられた。日本分離株はグリセロール発酵能について弱陽性とされているが、BH8859、Schu および 38 の 3 株以外に明確にグリセロール発酵陽性反応は認められなかった。

### 2. 保有株の病原性に関わる性状の解析

保有 51 株についてアクリフラビン反応、補体抵抗性、抗原構造、病原性関連遺伝子の有無、バイオフィーム形成能および細胞内増殖性を解析した。アクリフラビン反応では 7 株が強陽性と判定された。補体試験では 6 株が感受性であった。抗リポ多糖体 (LPS) モノクローナル抗体との反応からは 3 株の LPS 構造が他と異なると考えられた。RD18 および 19 増幅 PCR の産

物のサイズより、4 株の遺伝子構成が LVS 株同様、病原株と異なることが明らかになった。これらの結果から保有 51 株中 7 株が一般的な野兎病菌と病原性が異なる可能性が示唆された。また菌接着能試験において北米水系由来の 2 株がバイオフィーム形成能を有す可能性が示唆された。J774.1 に野兎病菌を感染させ、接種 2 および 24 時間後の菌量より各株の細胞内増殖性を比較したところ、供試 42 株は細胞内高増殖性、低増殖性および非増殖性の 3 つのグループに大きく分けられた。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 (細胞内高増殖性)。8 株 (Aichi, Chiba, Ebina, Ito, Kokuchi, Naomatsu, Nikaido および Sasige) は 10 倍以上に増加することなく、10 分の 1 以下に減少することもなかった (細胞内低増殖性)。他 29 株は接種後 24 時間で cfu が 10 分の 1 以下に減少した (細胞内非増殖性) (表 1)。

### 3. 保有株のマウス病原性

病原性関連性状解析から病原株と考えられた一部の株のマウス病原性を確認した。Schu、38、BH8859、LVS、N9、N1915、C. M. V. 103、Kf. water#23、Kf. 71、GIEM-Miura および N335-64 を接種したマウスはいずれも症状を認めず、接種後 6 日まで体重増加し生残した。一方、Chiba、Ebina、Kato、KU-1、Nikaido、NVF1、Sami および Yama 接種マウスは体重減少し、多くは斃死したためマウス病原性を有すとした。これら病原性が確認された 8 株について、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 (図 1)。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生残期間が延長したのみで全個体が斃死した (図 1)。 $10^1$  cfu 接種時の

Kato (30cfu)、KU-1 (26cfu) および NVF1 (38cfu) 株接種マウスの平均生残日数はそれぞれ 7.9、7.6 および 7.5 日であった。

#### 4. NVF1 株のラット病原性

野兎病菌 NVF1 株のラットに対する病原性を確認した。本株は 3.8cfu 皮内接種にてマウスを 100% (8/8) 斃死させたが、ラットの体重がマウスと比較し、6 倍程の重たいこと、ラットがマウスと比較して野兎病菌に感受性が低いことなどから、接種菌量を  $10^2$ cfu とし、皮内接種した。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。接種 25 日後、部分採血の後、 $10^5$ cfu 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。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。

皮内接種で全接種群が生残したため、腹腔内接種を試みた。F344/Nslc ラットに  $10^{1-4}$ cfu、SlcSD ラットに  $10^{3-7}$ cfu 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。各系統の各接種群の体重変化を図 2 に示した (SlcSD ラットに  $10^6$ cfu 接種群のデータは省略する)。

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。

Slc:SD ラットについては接種後 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。臓器 1 グラム中の生菌数は脾臓、肝臓および肺で  $10^8$  から  $10^{10}$ cfu、腎臓  $10^7$  から  $10^9$ cfu であった。血液中の生菌数は 1ml あたり  $10^7$  か

ら  $10^{10}$ cfu であった。 $10^3$  および  $10^4$ cfu 接種群の 21 日生残 6 個体の臓器 1 グラム中の生菌数は脾臓で  $10^3$  から  $10^5$ cfu、肝臓 1 グラム、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  $10^1$  および  $10^2$ cfu 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)。これら無症状であった 2 個体は組織学的にも著変認められず、血清学的にも抗体価上昇が認められなかった。

#### 5. ラットとマウスの野兎病菌感受性相異に関する研究

マウスおよびラットのマクロファージ系細胞における NVF1 株の増殖性は大きく異ならなかった。

マウスおよびラット感染実験にて得られた材料を供し宿主免疫応答などについて比較解析した。野兎病菌腹腔内接種にて斃死したラット臓器中の菌数および組織像はこれまでのマウス実験で得られたデータと大きく異ならなかった。ラット感染実験では回復個体が認められたため回復期血清を多数得られた。このため接種菌株は異なるが、Yama、Chiba、Ebina および Nikaido 接種マウス回復個体由来血清とおよび NVF1 株接種ラット回復個体の接種後 21-25 日の血清反応を比較した。マウスは IgM 抗体価が、ラットは IgG 抗体価が高い傾向が認められた。またマウス血清では IgG および IgM の野兎病菌 LPS に対する反応が認められたが、ラット血清では野兎病菌の 17、19 および 43kDa の蛋白質と思われるバンドへの反応が強く認められ、IgM の反応は極めて弱かった (図 3 に要約)。

#### 6. 新鮮分離 NVF1 株の人工培地長期継代後の性状変化

保有野兎病菌株の多くは細胞内増殖性が低く、マウスに野兎病菌標準的な病原性を示さなかった。この原因として人工培地における連続継代の影響が考えられた。確認のため新鮮分離



NVF1 株を Eugon チョコレート寒天培地にて 120 代まで継代し、継代菌の性状変化を解析した。30 代継代菌は細胞内増殖性が減退した。ゲンタマイシン感受性は 10 から 30 代継代の間に高くなった。CDM 培地における増殖性は 40 代継代で消失した。120 代継代菌の形態は電子顕微鏡による観察で 3 代継代菌と比較してサイズと外膜構造が大きく変化していることが明らかになった (表 3 に結果を要約)。

#### D. 考察

野兎病菌の分類試験方法としてエリスロマイシン感受性試験およびグリセロール発酵性試験を行なった。エリスロマイシン感受性を E test にて検査したところ、C. M. V. 103、N9、N19、N503、N1915、RV および LVS の 7 株がエリスロマイシン耐性であったため、biovar II とした。BH8859、Schu および 38 の 3 株は北米分離株でグリセロール発酵能が認められたため *ssp. tularensis* と考えられた。他の株では明らかなグリセロール発酵は認められなかったため *spp. holarctica* とした。*ssp. holarctica* のうち、biovar *japonica* はグリセロール発酵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能を有することが報告されている。本試験では弱陽性と陰性の判別は困難であり、*ssp. holarctica* biovar *japonica* の同定はできなかった。このため近年、多用されている RD 遺伝子領域の PCR による分類を試みたところ、*ssp. holarctica* のうち Kf water#23、Kf71、N335-64、Tungliao、Aichi および Kokuchi が biovar I に属すと考えられた。また RD23 の PCR 増幅産物の分子量から、N335-64 は他の biovar I と異なり、スペインやフランスに分布する株と似た遺伝子構成であると考えられた (Dempsey MP 2007)。Aichi および Kokuchi の 2 株以外の日本分離 35 株は既報の日本分離株と同等の分子量の PCR 産物が増幅されたため biovar *japonica* と考えられた。RD3 および 6 の PCR 増幅産物の分子量から 38 は *ssp. tularensis* の A. II、BH8859 および Schu は *ssp. tularensis* の A. 1 genotype であるこ

とが確認された。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。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. 2008) と同様、他の日本分離株と異なったが、その原因は不明である。

アクリフラビン反応および補体感受性試験は野兎病菌株の病原性の指標になると報告されている。C. M. V. 103、Jap、LVS、N19、N503、RV および Tungliao の 7 株が両試験において一般的な病原性野兎病菌と異なり陽性反応を呈した。両試験の反応には本菌 LPS およびカプセル様物質などの糖鎖構造体の関与が示唆されている (Fujita H. et al.)。抗野兎病菌 LPS モノクローナル抗体の各株への反応が弱いことが確認された。アクリフラビン反応は菌液の処理や混入する培地成分によって反応が変化する可能性が示唆されているためアクリフラビン反応弱陽性であった 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た。

各株の病原性確認のスクリーニングを目的にマウス由来細胞 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、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。他の株は 10 倍以上の増加は認められず、既報の野兎病菌性状と大きく異なったことから、変異している可能性が考えられた。

保有株で分類された 6 グループの代表株の病原性確認のためマウスへ腹腔内接種したところ、供試海外由来株はすべてマウスに病原性を示さなかった。これらの株はいずれも細胞内非増殖性であったため、細胞内増殖性は野兎病菌の病原性指標として有用と考えられた。

マウスへの皮内接種は野兎病菌病原性比較に有用で、10-20cfu の菌の皮内接種後の平均生残日数は *ssp. tularensis* の A1a、Alb、A2 グループの株ではそれぞれ 6. 43、5. 79、6. 64 日、*ssp. holarctica* 株では 8. 43 日と報告さ

れている (Molins CR 2010)。本研究において  $10^2$ cfu 皮内接種した NVF1、KU-1 および Kato (それぞれ 38、26 および 30cfu 接種) 株の平均生残日数は 7.5、7.6 および 7.9 日であった。このことから日本分離株は海外の *ssp. holarctica* と同等以上の病原性を有すと考えられた。

マウス病原性が確認された NVF1 株についてラット病原性を解析した。 $10^2$ cfu 皮内接種ではいずれのラット系統も無症状であった。これよりラットがダニの媒介による野兔病菌感染にて発症し、斃死する可能性は低いと考えられた。

ラットは野兔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、接種野兔病菌株により異なる。このため NVF1 株を 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、細菌学のおよび血清学的検査にて感染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/NsSlc ラットでは腹腔内接種で 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。この結果を既報の結果と照合すると、NVF1 株は *ssp. holarctica* の病原性と同等以上、*ssp. tularensis* と比較すると弱いと考えられた。

ラット斃死個体における細菌学のおよび組織学的解析結果から野兔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兔病菌ある菌量に増殖するまでに免疫応答により、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兔病菌株は異なるが、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 にてラットは野兔病菌蛋白質に、マウスは野兔病菌 LPS に対する反応が強かった (図 10-12)。このことからラットは速やかな抗体産生を介して野兔病菌に抵抗する可能性が示唆された。最近、Crane ら (Crane DD, 2013) は野兔病菌感染後、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) も同様に野兔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。これまで野兔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兔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。

ヒトの野兔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、野兔病菌の LPS 抗原を利用した ELISA 法も適用されている。これまでの手法では野兔病菌 LPS 以外に反応する血清は非特異的反応の可能性を考えたが、本研究で得た感染ラット由来血清の反応から、野兔病菌 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兔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。

多くの保有菌株が細胞内増殖性を欠くなど既報の野兔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、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。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。

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 および TEM 観察像で大きな相異を認めなかった。

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

保有野兎病菌株が6つの遺伝子グループに分類できることが明らかになった。病原性を有す株は日本分離の subsp. *holarctica* biovar *japonica* の4株のみで、野兎病菌の亜種、生物型間の病原性比較解析は不可能であった。今後のバイオテロ対策の進展のため、海外から病原性を有す subsp. *tularensis* を入手する必要がある。

ラットは皮内接種では野兎病菌抵抗性と考えられた。マウスとラットの野兎病菌感受性相異の一因として 17、19 および 43-kDa 蛋白質に対する強い IgG 抗体産生誘導が考えられた。野兎病菌 LPS に対する抗体産生は弱く、既存の野兎病血清診断法では陽性検体の検出は困難と考えられた。ラットは血清疫学調査に有効な動物種であるが、動物種に適した新たな抗体検出法を確立する必要があるだろう。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 紙上発表

- 1) 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
- 2) Akitoyo Hotta, Osamu Fujita, Akihiko Uda, Neekun Sharma, Kiyoshi Tanabayashi, Yoshie Yamamoto, Akio Yamada, Shigeru Morikawa In vitro antibiotic Susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. (投稿中)

### 2. 学会発表

- 1) 培養細胞を用いた野兎病菌の病原性比較.

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)

- 2) 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・登録状況  
(予定を含む)

なし

表1 供試 *Francisella* 菌株

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 供試菌株の分類と病原性関連性状試験の結果の要約

株	分類	アクリフラビン	補体	抗LPS抗体	RD18と19	接着能	細胞内 増殖性	マウス 病原性
		反応	抵抗性	反応性	変異			
38	A II	-	-	+	-	-	NT	-
BH8859	A I	-	+	+	-	-	非	-
C.M.V.103	biovar II	++	+	-	+	NT	NT	-
Kf71	biovar I	+	+	+	-	+	非	-
Kf water#23	biovar I	-	+	+	-	+	非	-
LVS	biovar II	++	-	+	+	-	非	-
N 9	biovar II	-	+	+	-	-	非	-
N19	biovar II	++	-	-	-	NT	NT	NT
N335-64	biovar I RD23+	-	+	+	-	-	非	-
N 503	biovar II	++	+	-	+	NT	NT	NT
N 1915	biovar II	-	+	+	-	-	非	-
Tungliao	biovar I	++	-	-	+	-	非	NT
Schu	A I	+	+	+	-	-	非	-
RV	biovar II	++	-	-	+	-	NT	NT
Aichi	biovar I	-	+	+	-	-	低	-
Azumaya	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	-
Chiba	biovar japonica	-	+	+	-	-	低	+
Ebina	biovar japonica	-	+	+	-	-	低	+
GIEM Miura	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	-
Hashimoto	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Himizu	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Hitosu	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Ito	biovar japonica	-	+	+	-	-	低	NT
Jap	biovar japonica	-	-	+	+	-	非	NT
Kato	biovar japonica	-	+	+	-	-	高	++
Kawamata	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Kikuchi	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Kokuchi	biovar I	-	+	+	-	-	低	NT
KU-1	biovar japonica	-	+	+	-	-	高	++
Metomo	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Mitsuo	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Murayama	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Naomatsu	biovar japonica	-	+	+	-	-	低	NT
Nikaido	biovar japonica	-	+	+	-	-	低	+
NVF1	biovar japonica	-	+	+	-	-	高	++
Oniwa	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Ootake	biovar japonica	+	+	+	-	-	非	NT
Sami	biovar japonica	-	+	+	-	-	高	++
Sashige	biovar japonica	-	+	+	-	-	低	NT
Shinomura	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Suzushichi	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Takahashi	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Tateyama	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
TH	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
TI	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Tsuchiya	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Yato 11	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Yato 96	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Yato 107	biovar japonica	-	+	+	-	-	非	NT
Yama	biovar japonica	-	+	+	-	-	高	+

NT:試験せず

表3 Eugonチョコレート寒天培地継代NVF1継代菌の性状

性状	P3	P11	P20	P30	P60	P90	P120
細胞内増殖性	あり	あり	あり	なし	NT	NT	NT
Aztreonam	R	NT	NT	R	R	R	R
Benzylpenicillin	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
薬剤感受性 MIC(g/L)							
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	0.5	0.19	0.125	0.094	0.094	0.094	0.094
Imipenem	R	NT	NT	NT	NT	NT	2
CDM培地における増殖性	あり	あり	あり	あり	なし	なし	なし
形態学的変化	認めず	認めず	認めず	認めず	NT	NT	あり
補体感受性	なし	NT	NT	なし	なし	なし	なし
グリセロール発酵能	なし	NT	NT	なし	なし	なし	なし

NT: 試験せず

R: 阻止円認めず

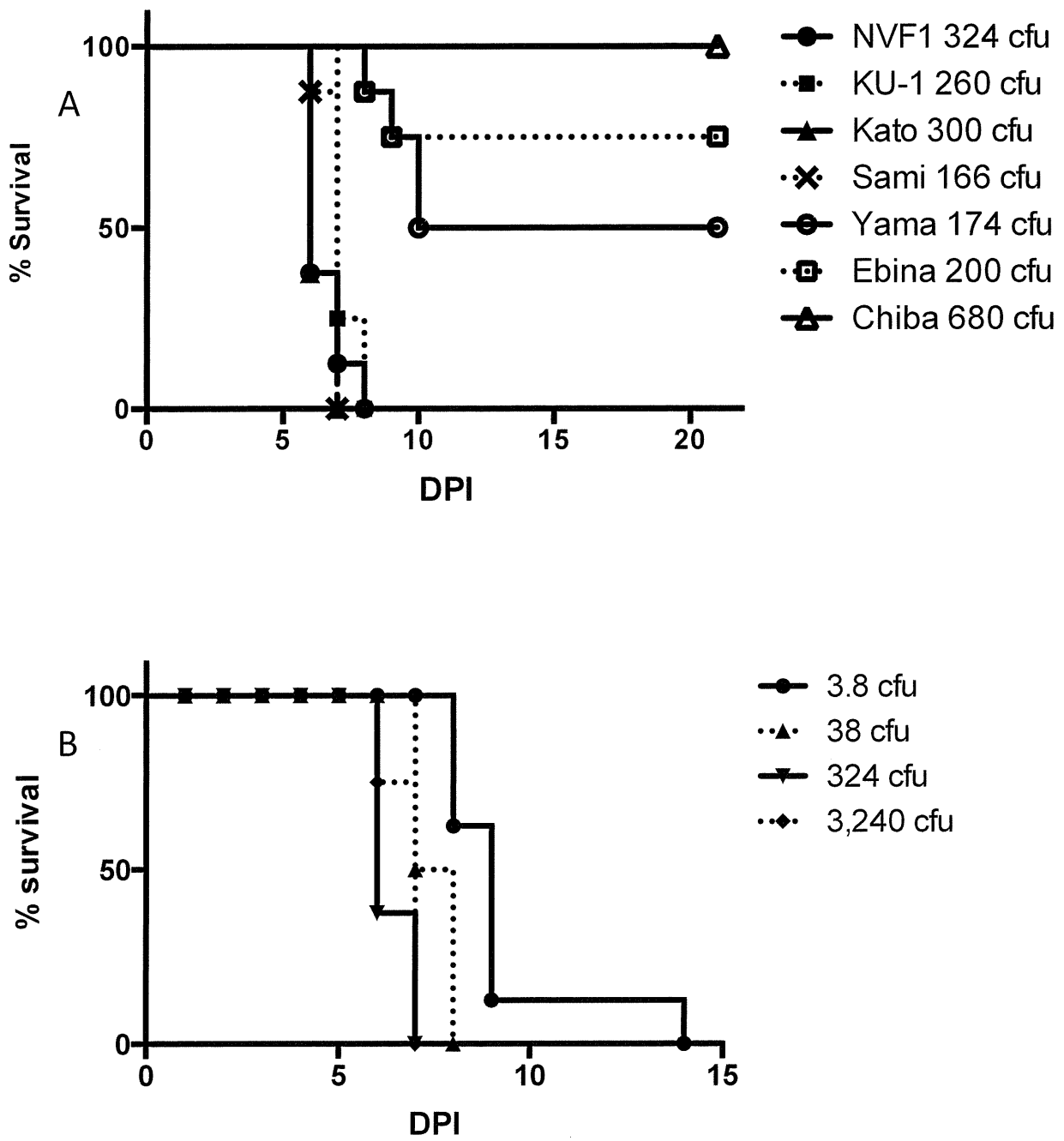


図1 日本分離野兎病菌皮内接種マウスの生残率

(A)マウス腹腔内接種にて病原性が確認された株のうち7株を $10^2$ cfu皮内接種した。  
 (B)新規分離株のNVF1株については接種菌量を4希釈試みた。



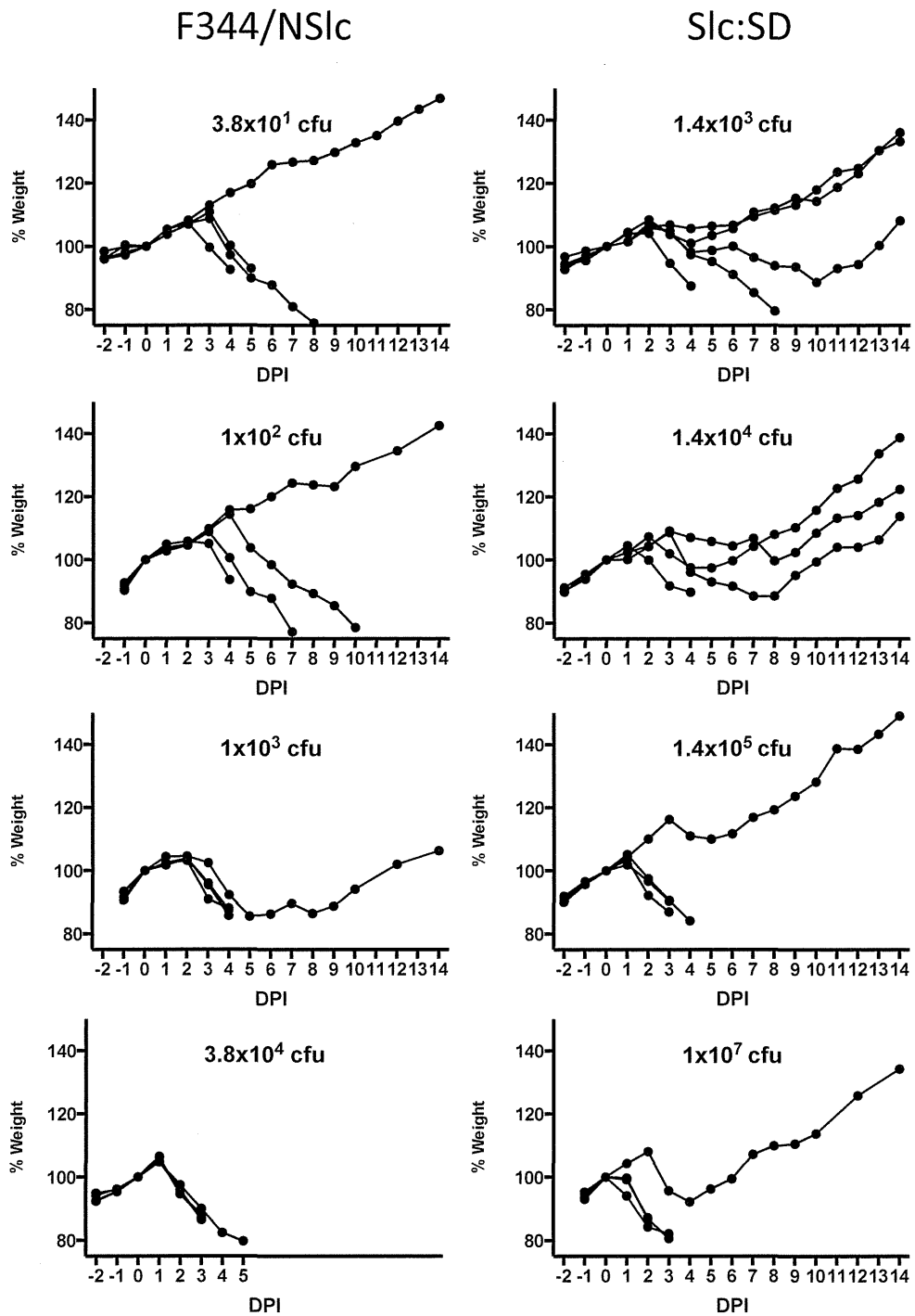


図2 腹腔内接種ラットの体重変化

F344/NSlcは $10^4$ cfu接種にて全4匹が5日以内に斃死したが、Slc:SDはいずれの接種群においても生残個体が認められた。

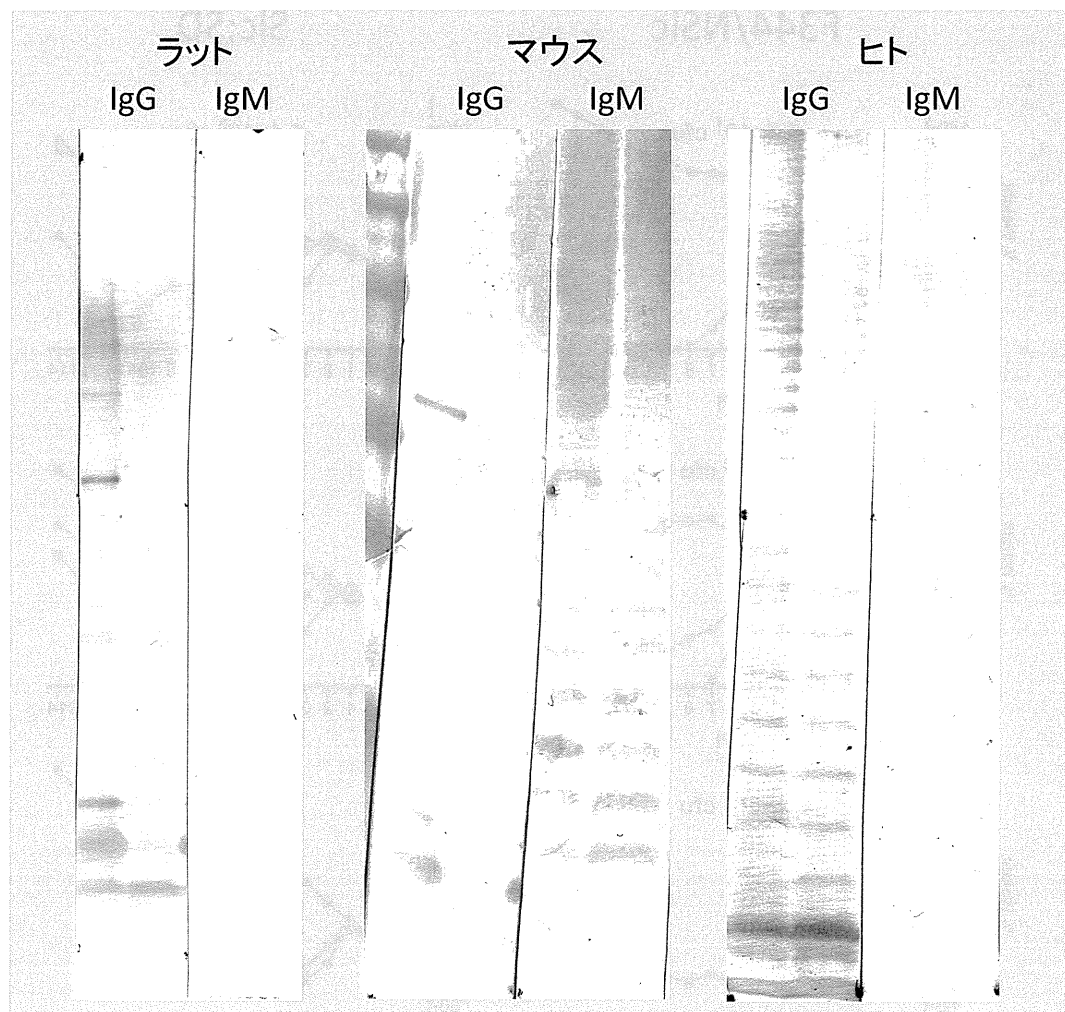


図3 野兎病菌感染ラット、マウスおよびヒト由来血清のWB反応像の一例

各シートにはNVF1株の全菌体可溶化抗原(左)およびプロテナーゼK処理抗原(右)を転写した。感染ラット血清は接種後25日、感染マウス血清は接種後21日、ヒト患者血清は発症後23日に採取した。ラット血清は500倍希釈、マウスおよびヒト血清は100倍希釈して反応させた。2次抗体には各種動物抗IgGおよびIgM抗体を使用し、血清中抗体の反応を検出した。ラット血清のIgMの反応は多くの検体で認められなかった。プロテナーゼK処理抗原への反応は弱く、全菌体可溶化抗原の17、19および43kDaのバンドに強い反応が認められ、感染マウスや野兎病患者血清の反応と異なった。

