

属菌分離株について、遺伝子的、生物学的に詳細な解析を行った。また、得られたデータを元に、PCR による鑑別診断法を開発した。これらのデータや検査法は、今後の病原性解析、また臨床検査や感染源動物調査に有用と考えられる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表等

なし。

2. 学会発表等

(1) 入江由美, 山磨達郎, 須賀原亮, 鈴木道雄, 今岡浩一. 新菌種と思われる *Capnocytophaga* 属による敗血症の一例. 第 26 回日本臨床微生物学会総会, 東京, 2014 年 1 月

H. 知的所有権の取得状況

無し

表1. *Capnocytophaga*属菌の自然宿主、生化学的性状、病原性

菌種名	常在する宿主	カタラーゼ オキシダーゼ		病原性
<i>C. ochracea</i>				
<i>C. gingivalis</i>				
<i>C. sputigena</i>	ヒト	陰性		歯周病、時に心内膜炎など
<i>C. haemolytica</i>				
<i>C. granulosa</i>				
<i>C. leadbetteri</i>				
<i>C. canimorsus</i>	イヌ・ネコ	陽性		発症は稀だが重症化、敗血症時の致死率30% 主に咬傷部位の局所感染、稀に全身感染
<i>C. cynodegmi</i>				

表2. 新規*Capnocytophaga*感染症例のプロファイル

	発生年	年齢	性別	感染経路	主症状	転帰	菌分離	分離株
症例1	2011年	49歳	男性	ネコ搔傷	敗血症	回復	血液	HP40001
症例2	2014年	67歳	女性	ネコ咬傷	敗血症	回復	血液	HP20001
症例3	2014年	82歳	女性	イヌとの接触	敗血症	死亡	血液	HP33001

表3-1. 新規*Capnocytophaga*属菌のDNA塩基組成分析

	新規 <i>Capnocytophaga</i> 属菌		
	HP20001	HP33001	HP40001
DNA G+C含量(%)	34.9	35.3	35.3

表3-2. 新規*Capnocytophaga*属菌HP40001株に対する*C. canimorsus*基準株ATCC35979株および*C. cynodegmi*基準株ATCC49044株のDNA-DNAハイブリダイゼーション相同値(%)

固定側	プローブ(標識DNA)側		
	HP40001	ATCC35979	ATCC49044
新規 <i>Capnocytophaga</i> 属菌	HP40001	100	12
<i>C. canimorsus</i>	ATCC35979	14	100
<i>C. cynodegmi</i>	ATCC49044	12	100

表4-1. 新規*Capnocytophaga*属菌の16S rRNAおよびgyrB遺伝子シーケンスの相同値(%)

菌株名	<i>C. canimorsus</i> 基準株		<i>C. cynodegmi</i> 基準株		
	16S rRNA	gyrB	16S rRNA	gyrB	
症例1	HP40001	97.01	75.59	97.01	77.57
症例2	HP20001	96.94	75.54	96.94	77.57
症例3	HP33001	96.94	75.52	96.94	77.89

表4-2. 新規 *Capnocytophaga* 属菌3株間での16S rRNAおよびgyrB遺伝子塩基配列の相同値(%)

		16S rRNA		
		HP20001	HP33001	HP40001
gyrB	HP20001		99.7	99.7
	HP33001	99.6		99.5
	HP40001	99.6	99.4	

図 1-1. 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統樹 (NJ 法)

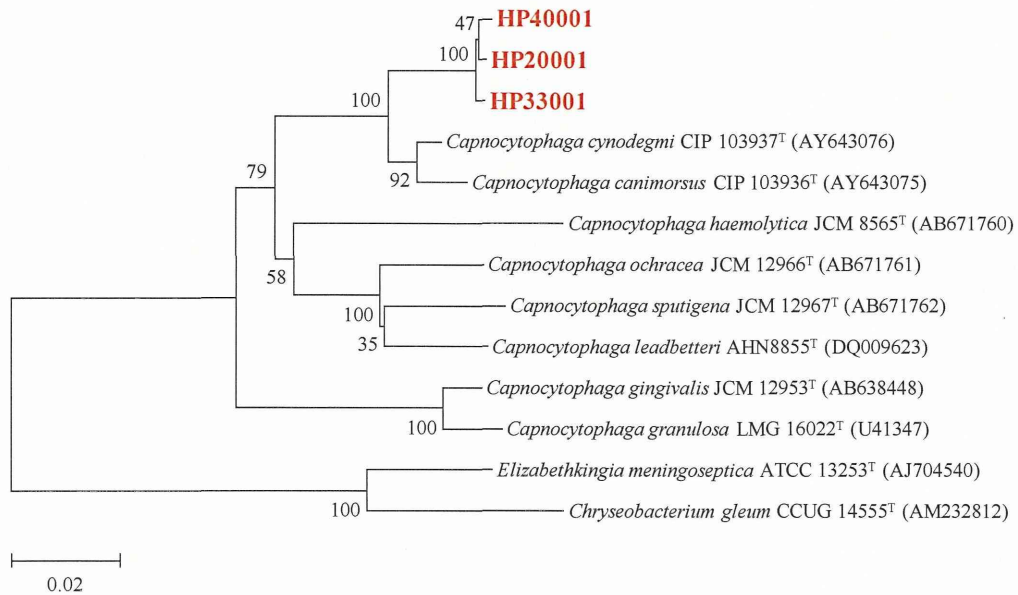


図 1-2. gyrB 遺伝子配列に基づく分子系統樹 (NJ 法)

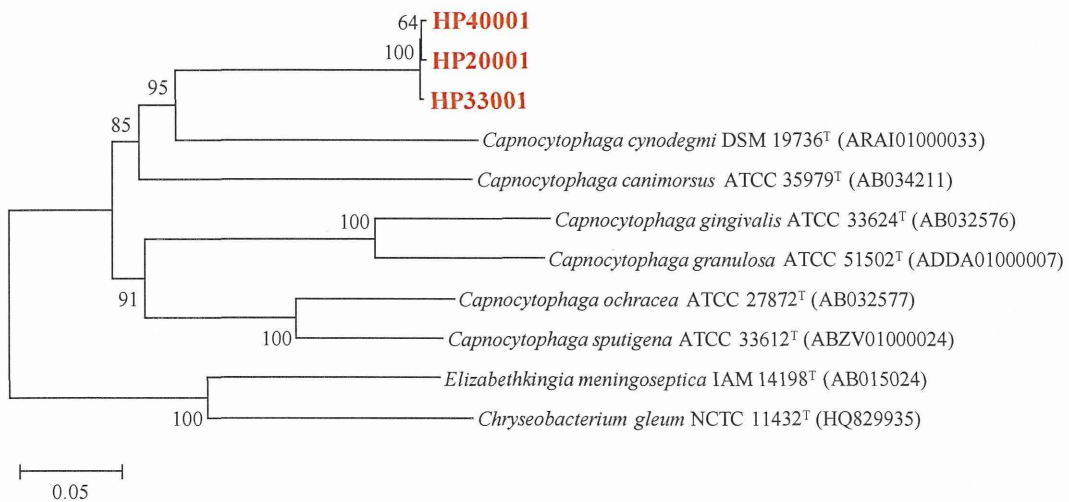


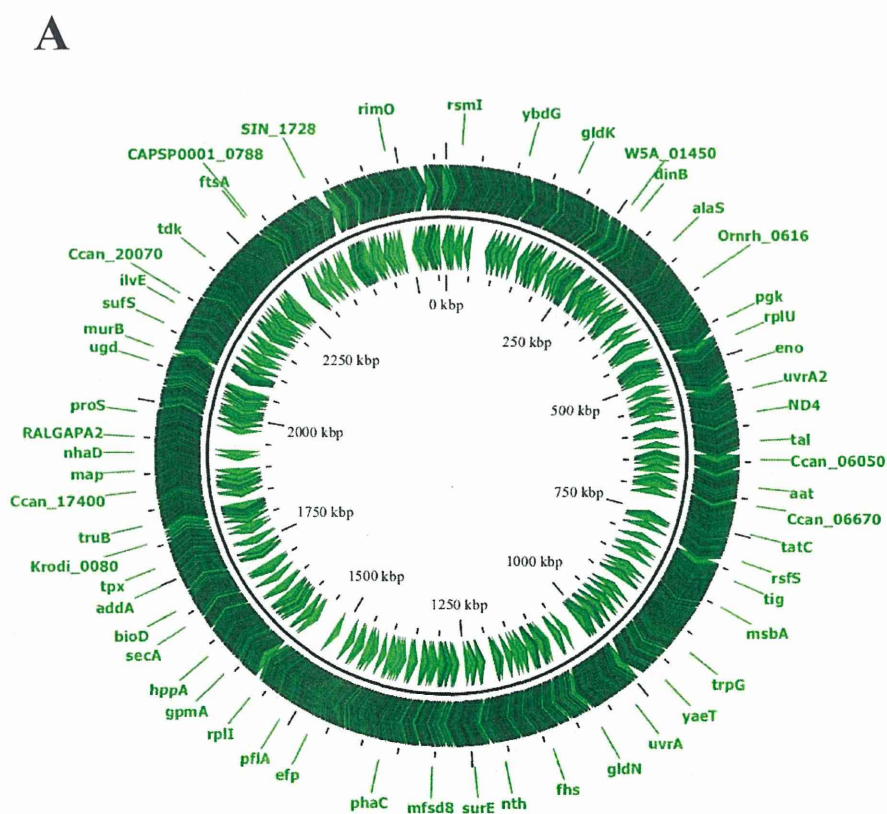
表5-1. 新規 *Capnocytophaga* 属菌ドラフトゲノムのプロフィール

	HP20001	HP33001	HP40001
コンティグ数	245	572	2,140
平均コンティグサイズ (bp)	10,967	4,831	1,054
全長 (bp)	2,687,034	2,763,210	2,255,296
N50 (bp)	18,545	7,291	1,696

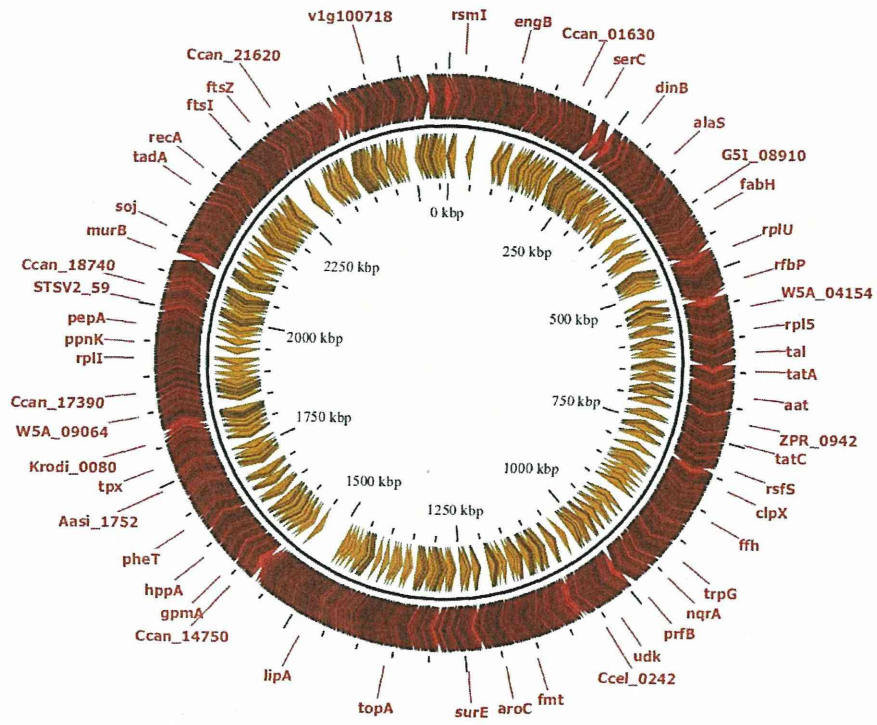
表5-2. 新規 *Capnocytophaga* 属菌3株のリファレンスゲノム *C. canimorsus* Cc5株 (GenBank: CP002113.1) に対するリードマッピング

表5-2. 新規 <i>Capnocytophaga</i>	新規 <i>Capnocytophaga</i> 属菌			<i>C. canimorsus</i>	<i>C. cynodegmi</i>
	HP20001	HP33001	HP40001	ATCC35979	ATCC49044
マッピングされたリード数	740,554	2,096,261	504,561	1,975,310	618,511
全リード数	3,549,646	8,890,360	2,905,932	3,242,056	2,781,738
リードのマッピング率 (%)	21	24	17	61	22

図 2-1. 新規 *Capnocytophaga* 属菌の遺伝子地図 (A: HP20001 株、B: HP33001 株、C: HP40001 株)



B



C

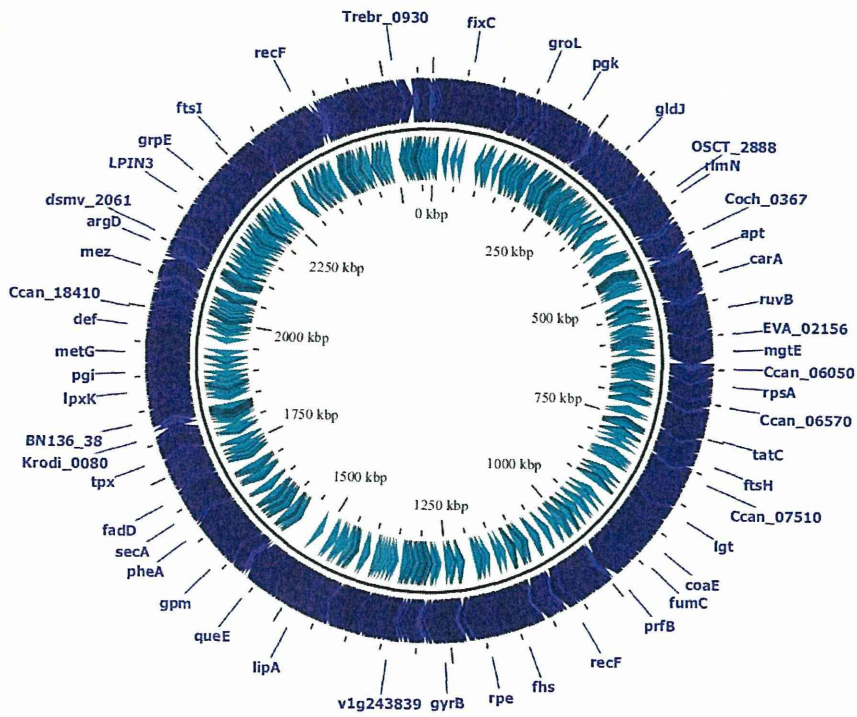
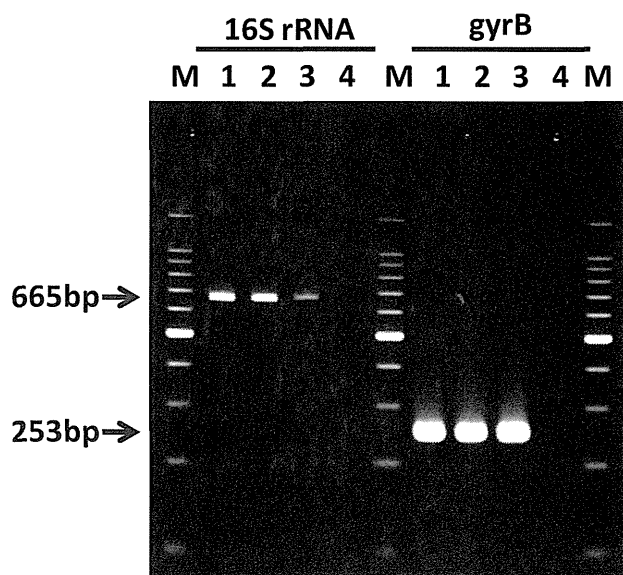


表6. 新規CapnocytophagaとCapnocytophaga属既知種の
生理・生化学的性状および化学的性状比較

	新規 <i>Capnocytophaga</i> 属菌		
	HP20001	HP33001	HP40001
25°Cでの生育	-	-	-
40°Cでの生育	+	+	+
好気条件下での生育	-	-	-
溶血性	-	-	-
インドール産生	-	-	-
ウレアーゼ活性	-	-	-
エスクリン加水分解	-	-	-
硝酸塩還元	-	-	-
オキシダーゼ反応	+	+	+
カタラーゼ反応	+	+	+
酸性フォスファターゼ	+	+	+
アルカリフォスファターゼ	+	+	+
γグルタミルアミノペプチダーゼ	+	+	+
ロイシンアリルアミダーゼ	+	+	+
バリンアリルアミダーゼ	+	+	+
シスチンアリルアミダーゼ	+	+	+
酸産生			
グルコース	-	-	-
マルトース	+	-	-
フルクトース	-	-	-
マンノース	-	-	-
マンニトール	-	-	-
トレハロース	-	-	-
サッカロース	-	-	-
ラクトース	-	-	-
キシロース	-	-	-
グリセリン	-	-	-
ラフィノース	-	-	-
ソルビトール	-	-	-
ラムノース	-	-	-

図 3-1 新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的遺伝子検出法 (PCR) -1



M: サイズマーカー

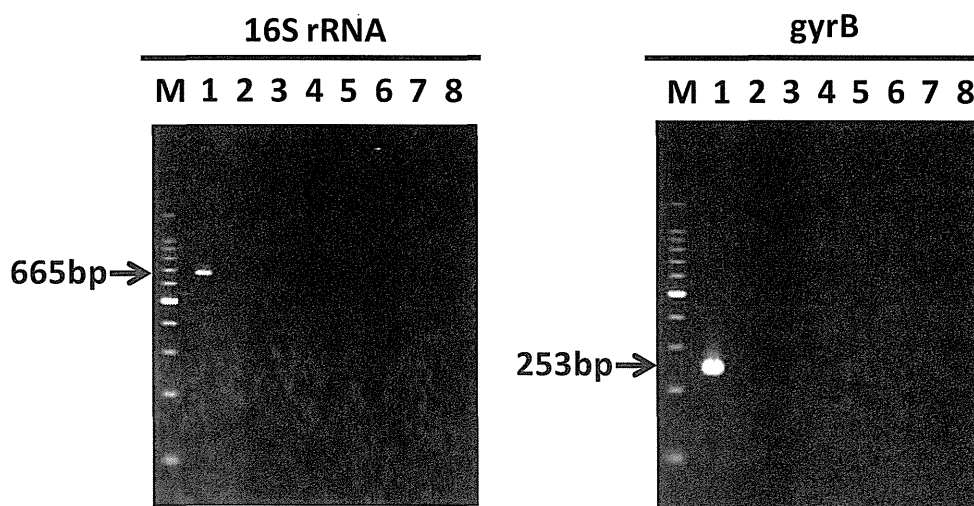
1: HP20001株

2: HP33001株

3: HP40001株

4: 蒸留水のみ

図 3-2 新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的遺伝子検出法 (PCR) -2



M: サイズマーカー

1: *Capnocytophaga* sp. nov.

2: *C. canimrosus*

3: *C. cynodegmi*

4: *C. ochracea*

5: *C. gingivalis*

6: *C. sputigena*

7: *C. haemolytica*

8: *C. granulosa*

別紙 3

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究

(H26-新興実用化—一般-019)

野兎病弱毒株の作出とワクチン効果

担当責任者： 宇田晶彦 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究協力者： 田徳雨、堀田明豊、朴ウンシル、森川茂 国立感染症研究所獣医科学部、

網康至 国立感染症研究所動物管理室、

永田典代、岩田奈緒子、鈴木忠樹 国立感染症研究所感染病理部

研究要旨：野兎病菌 (*Francisella tularensis*) はヒトや動物に対して非常に高い感染性と致死性を有する事から、生物兵器として使用される可能性が懸念されている。しかし日本において、野兎病菌のワクチン株は未だ選定されていない。そこで、マウスに対する病原性を消失している野兎病菌 *pdpC* 遺伝子破壊株 ($\Delta pdpC$ 株) がワクチンとして有効か否かを検証する事を目的とした。2頭のカニクイザル (*Macaca fascicularis*) に生食接種3週間後に野兎病菌強毒株 (SCHU P9 株) を接種したところ4日目に野兎病を発症し、7日目および11日目に重篤化した為に安楽殺を行った。一方、2頭のカニクイザルに生食接種3週間後に $\Delta pdpC$ 株を接種しても発症はしなかった。そこで、 $\Delta pdpC$ 株で免疫した3週間後に強毒株を接種したところ、2頭中1頭が非致死性の野兎病を発症したが、2頭共に3週間生残した。この結果から、カニクイザルにおいて $\Delta pdpC$ 株はワクチンとして有効である可能性が示唆された。また、C57BL/6J マウスについても同様の試験を行った。しかし $\Delta pdpC$ 株で免疫しても、強毒株接種後のマウス生存率は20%であった。マウスは野兎病菌に対して非常に感受性の高い動物として知られている事から、免疫回数や接種量等の検討が更に必要と考えられた。以上の結果から、野兎病菌 $\Delta pdpC$ 株はワクチンとして有効である可能性が示唆されたものの、更に検討を要する事が明らかとなった。

A. 研究目的：

野兎病菌 (*Francisella tularensis*) は非常に高い感染力と致死率を有するグラム陰性桿菌で、日本および諸外国においてバイオテロ対策上重要性の高い菌の一つとして分類されている。

野兎病菌に感染した野兎病患者は、米国および北欧において毎年100例以上の患者が報告されている。日本では終戦直後には毎年50例以上の患者が報告されていたが、最近10年では2008年に千葉県、青森県、和歌山県か

ら5例報告されたのが最後で、日本国内では近年では稀な感染症となっている。

野兎病菌感染防御に最も有効な手段はワクチン接種である事が知られており、旧ソ連では弱毒生ワクチン (RV 株)、米国の一部では実験室のバイオハザード対策として弱毒生ワクチン (LVS 株) が使用されている。しかし、これらの生ワクチン株は人工培地継代によって得られた弱毒株であることから病原性復帰が容易に起こり得ると指摘されており、実際にそれを疑う様な事例も発生している。

一方、日本では野兔病菌のワクチン株すら選定されていない。

これまでに我々は、野兔病菌の高い病原性の1つは pdpC 遺伝子に規定され、pdpC 遺伝子にイントロン (915bp) を挿入した遺伝子破壊株 (Δ pdpC 株) は、マウスに対する病原性を消失する事を明らかにしてきた。この Δ pdpC 株はイントロンが挿入されているため、病原性復帰の可能性が極めて低いと推測される。そこで、本申請では野兔病菌 Δ pdpC 株がワクチンとして有効か否かをカニクイザルとマウスを用いて検討する事を目的とした。

B. 研究方法：

野兔病菌株

野兔病菌強毒株 (SCHU P9) 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浮遊させ、 -80°C で保管した。野兔病菌 Δ pdpC (弱毒) 株は TargeTron Gene Knockout System (シグマ社) および pKEK1140 プラスミド (Appl Environ Microbiol. 2008; 74(9): 2619-2626.) を用いて作出した。この Δ pdpC 株も上記と同様に使用するまで -80°C にて保管した。これらの培養は、biosafety level (BSL) 3 で取り扱った。

カニクイザル

実験に使用した6頭のカニクイザルは国立感染症研究所実験用霊長類調整委員会から供給された。2頭のカニクイザルに 10^6 CFU/1 mL の野兔病菌 Δ pdpC 株を皮下接種にて免疫し、その3週間後に 1×10^6 CFU/1 mL の野兔病菌強毒株を経気道接種した (Animal No. B1 および B2)。対照として、4頭のカニクイザルに生理的食塩水を皮下接種した後、 1×10^6 CFU/1 mL の野兔病菌 Δ pdpC 株 (Animal No. A1 および A2) または強毒株 (Animal No. A3 および A4) を経気道接種した。カニクイザルの健康状態は6週間にわたって毎日観察した。カニクイザルの体重測定、直腸体温測定、および採血は免疫0、

2、4、7、10、14、21日目および菌接種2、4、7、10、14、17、21日目にケタラールによる麻酔下で実施した。採取した血液は多項目自動血球計算装置 vetscan (Abaxis 社) にて解析を行った。また、野兔病を発症して横臥したカニクイザルまたは生残したカニクイザルはキシラジン/ケタラール混合麻酔下で全採血を行い、安楽殺を行った。これらのカニクイザルを用いた感染実験は国立感染症研究所資源調整委員会及、同動物実験委員会の承認を受け ABSL3 で実施した。

マウス

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 10^6 CFU/100 μL の野兔病菌 Δ pdpC 株又は対照として生理的食塩水を皮下接種し、その3週間後に野兔病菌強毒株を 100LD_{50} ($=5 \times 10^3$ CFU/10 μL) 経鼻接種した。合計6週の間、毎日健康状態の確認および体重測定を行った。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. 研究結果：

カニクイザルにおける野兔病菌の病原性確認試験

これまでに、野兔病菌強毒株および Δ pdpC 株のマウスに対する病原性の差異については知見の集積が有ったが、カニクイザルにおける病原性の差異については不明であった。そこで、両株のカニクイザルにおける病原性に関する検討を行った。

生食を皮下接種した3週間後に Δ pdpC 株を経気道接種した2頭のカニクイザル (Animal No. A1 および A2) は、菌接種後2~3日目に軽度の食欲不振が見られたが、体重減少 (図1B 黒線)、体温 (図1C 黒線)、行動および多項目自動血球計算装置 vetscan (Abaxis 社) の結果に異常は認められなかった (図2)。解剖時の肉眼所見では、Animal No. A1 において

肺の一部に体色が認められたが、その他に顕著な変化は見られなかった。

一方で、生食を皮下接種して3週間後に強毒株を経気道接種した2頭のカニクイザル (Animal No. A3 および A4) は、致死的な野兔病を発症したので安楽殺を実施した。

Animal No. A3 は、菌接種2日目以降に持続的な40℃以上の発熱 (図1C 赤線) および血小板数の減少 (図2)、4~7日目に激しい咳及びうずくまる時間が長くなり行動力の減退が認められた。更に、7日目には鼻血および横臥が見られたので、安楽殺を即日実施した。解剖時の体重は、強毒株接種前と比較して2.2%減少に留まっていた (図1B 赤線)。解剖の肉眼所見において、肺の縮退と癒着、胸水 (~15mL) および腹水 (~50mL) の貯留が観察されたが、野兔病菌の主な増殖臓器である脾臓、リンパ節や肝臓には顕著な病変は認められなかった。

Animal No. A4 は、菌接種2~10日目までの発熱と11日目の低体温 (図1C 赤線)、4~7日目に激しい咳、11日目に鼻血および横臥を確認した事から安楽殺を実施した。体重は、菌接種前と比較して解剖時には10%減少していた (図1B 赤線)。血液検査の結果では Animal No. A3 と同様の傾向を示したが、その変動幅は大きかった (図2)。解剖時の肉眼所見は、胸水および腹水の貯留が若干観察された程度であったが、肺においては病変が顕著に表れ、退縮、癒着および肺水腫が見られた (図1D)。脾臓莖膜の広範において野兔病菌コロニーとそれに誘引された白血球集団と思われる2~3mm程度の白色斑点が多数確認された (図1E)。また、体表リンパ節では、顕著な腫脹及びその断面で黒色斑が認められた。野兔病菌の主な増殖の場である肝臓においては、黄茶色に変色していた。また、脳全体にやや浮腫気味で、前頭葉の髄膜の一部が白色を呈し、脳底において3mm程度の出血巣が確認され、軽度の脳炎が疑われた。また、7~11日目の咽

頭拭い液から、野兔病菌の生菌が分離された。以上の結果から、野兔病菌強毒株を接種したカニクイザルは致死的な野兔病を発症したが、 Δ pdpC株接種群は健常であった。このことから、野兔病菌強毒株と Δ pdpC株の病原性は、カニクイザルとマウスにおいて差異が無い事が明らかとなった。

カニクイザルにおける Δ pdpC株のワクチン効果

2頭のカニクイザルの鼠蹊部に Δ pdpC株を皮下投与し、免疫を行った。免疫2~7日目に鼠蹊リンパ節の腫脹が認められたが、食欲等の健康状態に異常は認められなかった。免疫3週間後に強毒株を経気道接種した2頭のカニクイザル (Animal No. B1 および B2) は各々異なる病態を示したが、2頭共に3週間生残した。Animal No. B1 は、強毒株接種後に野兔病を疑う症状を全く示さなかった。強毒菌接種21日目に解剖を実施した結果、肺右後葉の気管分岐部周辺で1mm程度の出血斑が認められ、気管分岐部周辺が灰色~淡褐色で脱色していたが、その他に著変は無かった。

Animal No. B2 は、 Δ pdpC株免疫時には無症状であったが、強毒株接種後2~10日目に40℃以上の発熱 (図1C)、2~13日目に食欲減退、6日目に咳及びうずくまる時間が長くなり行動力の減退が認められ、7日目にはヘマトクリットの上昇で確認される脱水症状が見られた (図2)。また、体重は接種前と比較して10日目には18%減少が見られたが (図1B)、致死感染群 (Animal No. A3 と A4) と比較してヒトに対する反応性は良好であった。14日目以降の食欲および行動力の回復と共に低調ながら体重が維持され、最終的には3週間生残した。多項目自動血球計算装置による解析の結果、菌接種4~7日目に抹消血からの白血球数と血小板数の減少が認められた (図2)。病理解剖肉眼所見は、肺前葉、中葉、後葉および副葉が灰色に変色し、癒着していた。特

に右後葉は広範にかけて灰色から淡褐色を呈し、脱縮が見られた。脾臓は腫大しその断面は粗造だったが、肝臓に変化は無かった。右腎臓の背側面に 0.5cm×1cm の被膜下出血を認めた。

この結果から、カニクイザルにおいて Δ pdpC 株免疫は強毒株感染による致死性を回避する効果が認められた。

マウスにおける Δ pdpC 株のワクチン効果

生食を皮下接種 3 週間後に強毒株を経鼻接種したマウスは、菌接種 4 日後から顕著な体重減少が確認され、5 日目に 50%が死亡し、8 日目までに全て死亡した(図 3)。一方、 Δ pdpC 株で免疫したマウスは 6 日目に 50%が死亡したが、20%のマウスは 3 週間生残した(図 3)。この実験条件下において、マウスに対する Δ pdpC 株のワクチン効果は限定的である可能性が示唆された。

D. 考察：

野兎病菌強毒株を接種したマウスは、接種菌量に依存して野兎病発症の日数に差が見られるものの、食欲不振から生じる 25%以上の体重減少を示した後、死亡する事は既に知られていた。一方で、我々が作出した *pdpC* 遺伝子欠損 (Δ pdpC) 株は、マウスに対して病原性を全く示さない事は以前報告した。本研究では、この野兎病菌 *pdpC* 遺伝子破壊株 (Δ pdpC 株) のワクチン効果についてカニクイザルとマウスを用いて検討を行った。実験開始当初は野兎病発症による致死性とカニクイザルの体重減少は相関すると考えていた。しかし図 1 B で示したように、野兎病の重症化は体重減少と相関は見られるものの、致死性と一致しなかった。その他にヘマトクリットおよび血小板減少も同様に、致死性とは一致しなかった。そこで我々は、カニクイザルの横臥を野兎病発症による安楽殺の指標とした。

これまでに、5 CFU の野兎病菌強毒株を含むエアロゾルを吸引したアカゲザル (*Macaca mulatta*) は、感染 7~11 日目に死亡するとの報告されている。本研究では、バイオテロによる強毒株暴露を想定し、致死量をはるかに超える強毒株 (10^6 CFU) をカニクイザルの気道に接種した。 Δ pdpC 株で免疫したカニクイザルは 3 週間生残したが、無免疫の強毒株接種対照群は接種 7 および 11 日目に安楽殺した(図 1 A)。この結果から、 Δ pdpC 株はワクチンとして有効であることを示している。特に通常の感染では、 10^6 CFU のような大量の野兎病菌の暴露は考えられないため、より低力価の強毒株のチャレンジ試験ではより有効性が確認できると思われる。

一方で、マウスにおけるワクチン効果は限定的であった(図 3A)。野兎病菌の実験動物モデルとしてマウスが多用されているが、野兎病菌への感受性が非常に高い事も知られている。マウスに対して 2 回あるいは 3 回の Δ pdpC 株による免疫を実施すれば、強毒株感染時の野兎病発症を抑制は可能であると考えられる。本研究で得られた結果を踏まえて、今後マウスに対する免疫方法について検討を必要である事が考えられた。

E. 結論

カニクイザルにおいて野兎病菌 Δ pdpC 株はワクチンとして有効であったが、マウスにおいては更に検討を要する事が明らかとなった。

F. 健康危機情報

無し

G. 研究発表

無し

H. 知的所有権の取得状況

無し

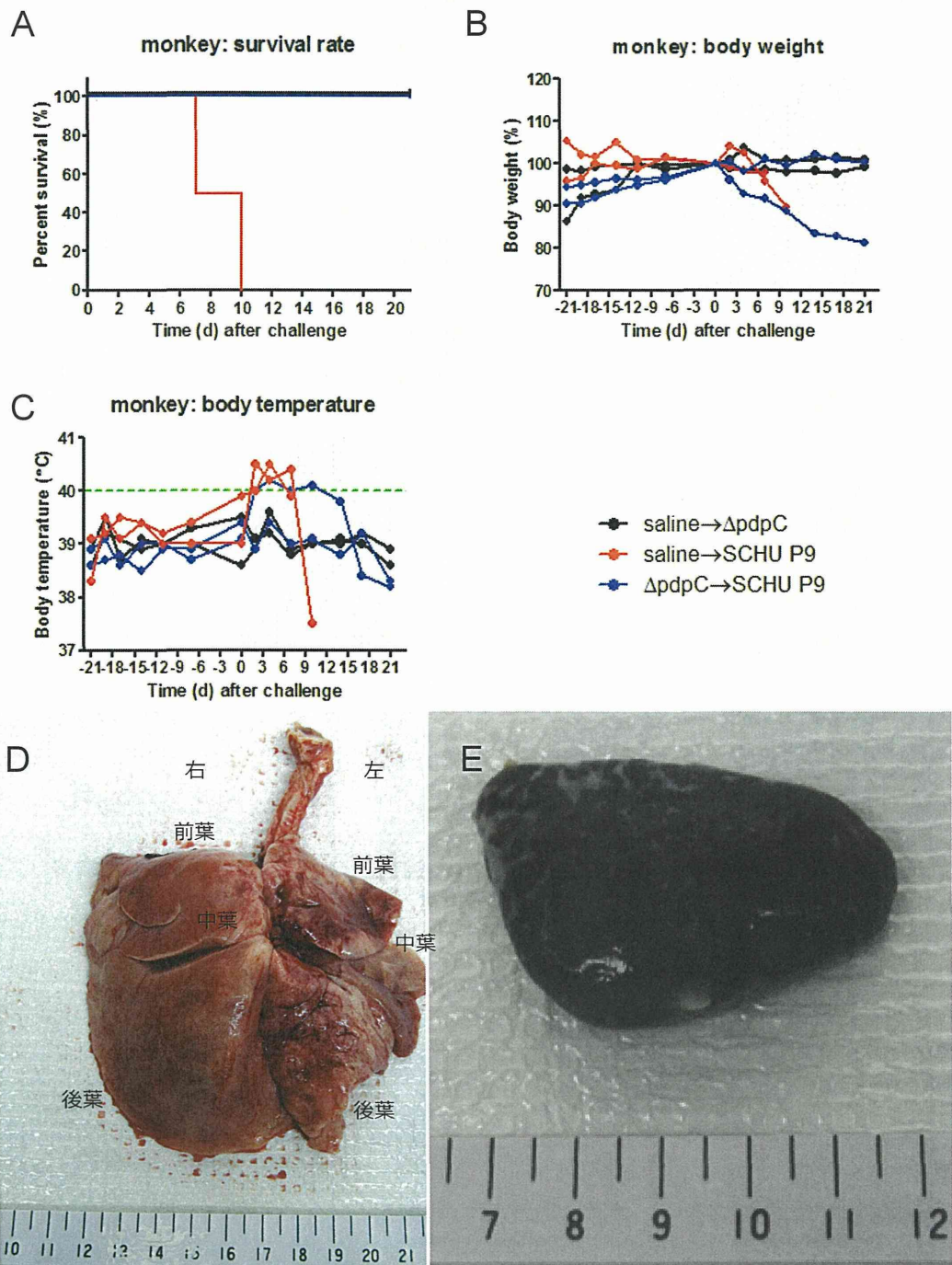


図1. カニクイザルにおける野兔病菌の病原性とワクチン効果。(A-C) 野兔病菌 Δ pdpC株で免疫(-21d)し、致死的な量の強毒株接種(0d)したカニクイザルの生存率(A)、体重変動(B)、および直腸体温(C)を示した(青線)。対照として生食接種後野兔病菌強毒株(赤線)または Δ pdpC株(黒線)を接種したカニクイザルの動向も示した。(D-E) 生食接種後強毒株接種によって野兔病を発症をしたカニクイザル(Animal No. A4)の肺および脾臓の写真を示した。

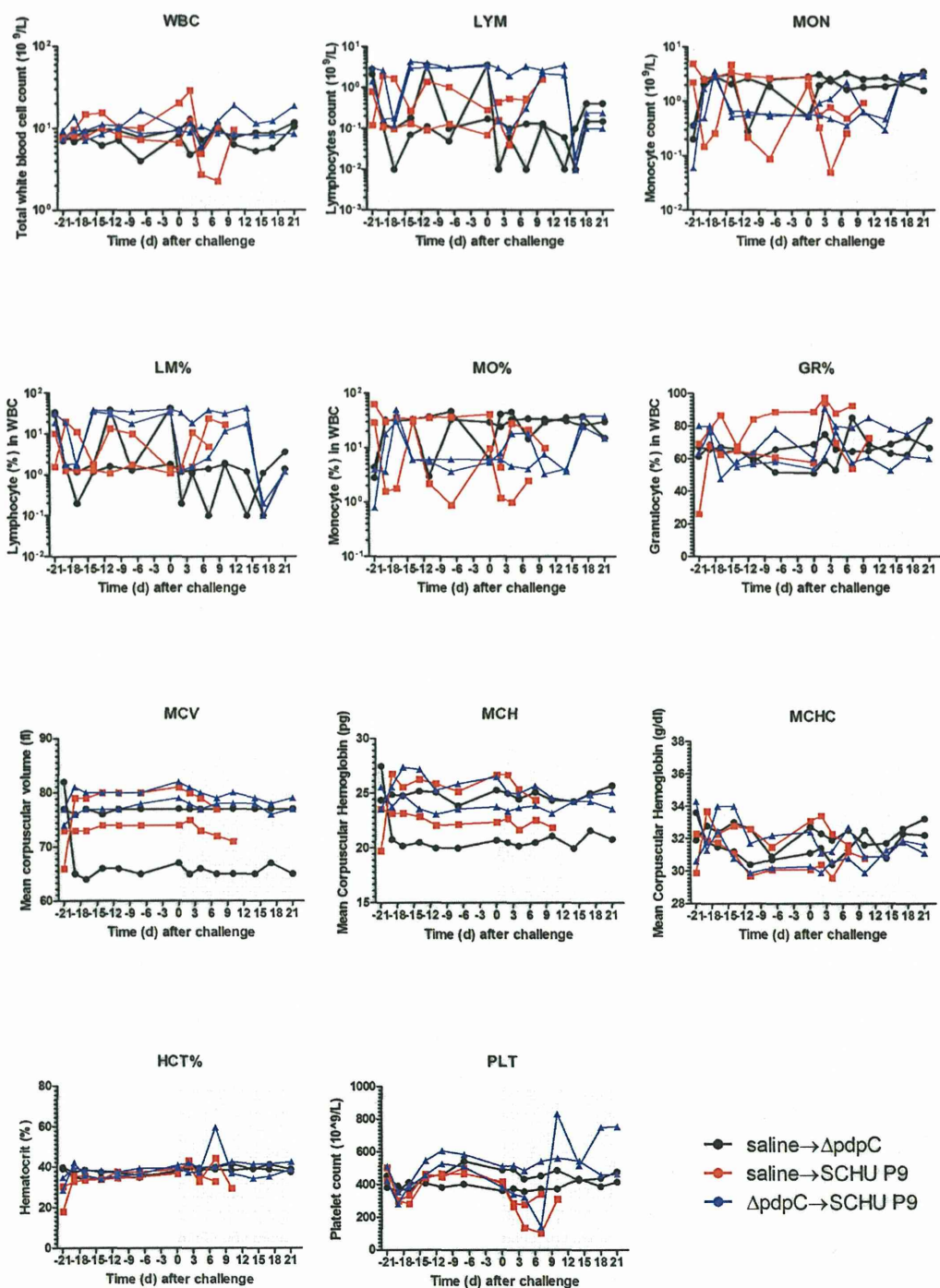


図2. カニクイザルにおける野兔病菌接種後の血液学的変動。野兔病菌ΔdpdC株で免疫(-21d)し、致死的な量の強毒株接種(0d)したカニクイザルにおける抹消血中の白血球数(WBC)、リンパ球数(LYM)、単球(MON)、リンパ球の割合(LM%)、単球の割合(MO%)、顆粒球の割合(GR%)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、ヘマトクリット(HCT%)、血小板数(PLT)を示した(青線)。対照として生食接種後野兔病菌強毒株(赤線)またはΔdpdC株(黒線)を接種したカニクイザルの動向も示した。

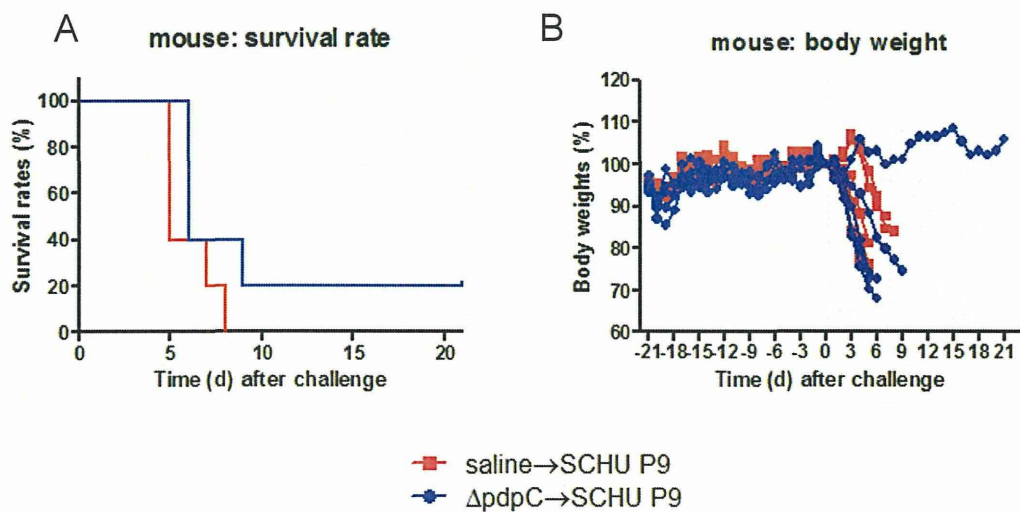


図3. マウスに対する野兔病菌の病原性とワクチン効果。野兔病菌 Δ pdpC株で免疫し、致死的な量の強毒株接種したマウスの生存率 (A) および体重変動 (B) を示した (青線)。対照として生食接種後野兔病菌強毒株 (赤線) を接種したマウスの動向も示した。

III. 学会等発表実績

様式第19

学会等発表実績

委託業務題目「「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究」

機関名：国立感染症研究所

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
フィリピンのコウモリからのブテロパインオルソレオウイルスの分離（口頭発表）	6) 谷口怜、堀本泰介、Joseph Masangkay、Puentepina Roberto Jr.、大松勉、永田典代、江川和孝、福間藍子、Harpal Singh、福士秀悦、谷英樹、吉河智城、下島昌幸、吉河泰弘、西條政幸、久和茂、前田健	第62回日本ウイルス学会 学術集会	2014.11	国内
無尾類(カエル)に由来するブルセラ属菌の分離と解析	木村昌伸、宇根有美、朴ウンシル、鈴木道雄、森川茂、今岡浩一	第13回爬虫類・両生類の臨床と病理のための研究会ワークショップ	2014.11	国内

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

（注2）本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

様式第 19

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目 「「顧みられない動物由来感染症」の対策及び検査法・治療法の確立に関する研究」

機関名：国立感染症研究所

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
ブルセラ症－特集・人獣共通感染症の新しい知見	今岡 浩一、木村昌伸	臨床と微生物（42(1):27-32, 2015、近代出版)	2015	国内

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

（注2）本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

