

## イシククル（Issyk-kul）熱の診断法と疫学

担当責任者： 福士秀悦 国立感染症研究所 ウイルス第一部主任研究官

研究協力者： 須田遊人、下島昌幸 国立感染症研究所 ウイルス第一部

研究要旨：イシククル熱は高熱、頭痛、筋肉痛を主徴とする、ダニあるいは蚊媒介性のイシククルウイルスによる感染症で、中央アジア（タジキスタンなど）で患者が報告されている。2011年、国内で採取されたコウモリマルヒメダニからイシククルウイルスと近縁なウイルスがダニから分離され、国内にも類似のウイルスが常在する可能性が示唆された。本研究では、国内で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。また、国内のダニおよびイシククル様ウイルスの分子疫学を行う手法を確立するため、リアルタイム PCR による遺伝子検出法を確立した。

### A. 研究目的：

イシククル熱はダニあるいは蚊媒介性のイシククルウイルスによる感染症で、中央アジア（タジキスタンなど）で患者が報告されている。1982 から 1985 年にかけてコウモリの捕獲などの野外活動で 34 人がイシククル熱を発症している。主な症状は、熱（39-41℃、3-8 日間）、頭痛（80%）、めまい（50%）、せき・筋肉痛（30%）、吐き気・嘔吐（25%）、その他、発疹、腹痛、眼痛などである。死亡例は確認されていない。1970 年以降、イシククルウイルス及び近縁のウイルスがキルギスタン、タジキスタン、マレーシアなどでコウモリ、野鳥、ダニ、蚊から分離されている。また、ヒトの血清学調査からイラン、アフガニスタン、インド、パキスタンなどにもウイルスが存在すると考えられている。我が国でも 2011 年にコウモリマルヒメダニからイシククルウ

イルスに近縁なウイルス（イシククル様ウイルス）が分離された。イシククルウイルスはクリミア・コンゴ出血熱ウイルスと同じブニヤウイルス科ナイロウイルス属に分類される。このため、イシククルウイルスおよび近縁なウイルスがヒトに重篤な感染症を起こす可能性も否定できない。今回分離されたウイルスがヒトに感染性を示すのか、また、我が国にどの程度分布しているのか明らかにする必要がある。本研究では、国内で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。また、国内のダニおよびイシククル様ウイルスの分子疫学を行う手法を確立するため、リアルタイム PCR による遺伝子検出法を確立した。

### B. 研究方法：

1) 我が国で分離されたイシククル様ウ

ウイルスを各種培養細胞に接種し、それぞれの細胞における増殖性を比較した。

- 2) ウイルス培養上清からイシククル様ウイルスを精製し、次世代シーケンサーによりウイルス遺伝子を解析した。
- 3) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに検出用プライマー、プローブを作製し、リアルタイム PCR 法を構築した。

#### C. 研究結果：

- 1) イシククル様ウイルスを各種培養細胞に接種し、24, 48, 72 時間後の培養上清中のウイルス量を算出し、それぞれの培養細胞における増殖性を比較した(図1)。Vero、Huh7、SW13 細胞等で効率のよいウイルス増殖がみられた。
- 2) ウイルス培養上清からイシククル様ウイルスを精製し、次世代シーケンサーにより M セグメントの一部を除くほぼ全領域の塩基配列を決定した。イシククル様ウイルスはナイロウイルス属のなかでもイシククルウイルスに近縁であることが明らかになった(図2)。
- 3) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに S、M および L 遺伝子検出用プライマー、プローブを作製し(図3)、リアルタイム PCR 法を構築した。また、それぞれのターゲット領域を含む部分を PCR で増幅し、スタンダード DNA とした。One-step RT-PCR および、Two step PCR で各スタンダード DNA を 1-10 コピー以上の感度で検出可能であった。本方法により、イシククル様ウイルス培養上清から抽出した RNA およびこれを用いて逆転写反応で作

製した cDNA を検出可能であった(図4および5)。

#### D. 考察：

2011 年に我が国で、コウモリマルヒメダニからイシククル様ウイルスが分離された。イシククルウイルスはこれまで、ヒトに熱性の疾患を引き起こすことが知られている。イシククル様ウイルスあるいは、これらに近縁なウイルスが日本に常在することが示唆されるため、これらのウイルスの性状解析および、分子疫学、血清疫学的手法を確立することが必要である。本研究では、我が国で分離されたイシククル様ウイルスの増殖性を、各種培養細胞を用いて明らかにした。ヒトおよびサル由来培養細胞でウイルスが増殖可能であったことから、このウイルスはヒトに感染性をもつことが示唆される。

イシククル様ウイルスが分離されたコウモリマルヒメダニは国内では、北海道から九州、沖縄まで分布することが知られており、人家付近に生息するコウモリ類に寄生する。マルヒメダニによるヒト刺症例も報告されていることから、このダニによりイシククル様ウイルス(あるいはその他の病原体)が媒介される可能性もある。本研究で開発したリアルタイム PCR による遺伝子検出法により、イシククル様ウイルスがどの程度、広範囲に存在するのか明らかにする予定である。また、今後、血清疫学を進めていくため、イシククル様ウイルスの抗原を用いた ELISA を構築する予定である。

#### E. 結論

- 1) 本研究で、イシククル様ウイルスの各種培養細胞での増殖性と遺伝的特徴を明らかにした。

- 2) イシククル様ウイルスの遺伝子配列をもとに検出用プライマー、プローブを作製し、リアルタイム PCR 法を構築した。
- 3) 今後、イシククル様ウイルスの分子疫学、血清疫学を進めていく必要がある。

#### F. 健康危機情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tani H, Iha K, Shimojima M, Fukushi S, Taniguchi S, Yoshikawa T, Kawaoka Y, Nakasone N, Ninomiya H, Saijo M, Morikawa S. Analysis of Lujo Virus Cell Entry using Pseudotype Vesicular Stomatitis Virus. *J Virol.* 88 (13): 7317-7330, 2014.
- 2) Bukbuk DN, Fukushi S, Tani H, Yoshikawa T, Taniguchi S, Iha K, Fukuma A, Shimojima M, Morikawa S, Saijo M, Kasolo F, Baba SS. Development and validation of serological assays for viral hemorrhagic fevers and determination of the prevalence of Rift Valley fever in Borno State, Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 108 (12):768-773, 2014.
- 3) Yoshikawa T, Fukushi S, Tani H, Fukuma A, Taniguchi S, Toda S, Shimazu Y, Yano K, Morimitsu T, Ando K, Yoshikawa A, Kan M, Kato N, Motoya T, Kuzuguchi T, Nishino Y, Osako H, Yumisashi T, Kida K, Suzuki F, Takimoto H, Kitamoto H, Maeda K, Takahashi T, Yamagishi T, Oishi K, Morikawa S, Saijo M, Shimojima M. Sensitive and specific PCR systems for the detection of both Chinese and Japanese severe fever with thrombocytopenia

syndrome virus strains, and the prediction of the patient survival based on the viral load. *J Clin Microbiol.* 52(9): 3325-3333, 2014.

##### 2. 学会発表

- 1) 福士秀悦、永田典代、岩田奈織子、谷英樹、吉河智城、谷口怜、福間藍子、下島昌幸、西條政幸. 高齢マウスにおける重症熱性血小板減少症候群ウイルスの感染感受性の解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 2) 福間藍子、福士秀悦、吉河智城、鈴木忠樹、谷英樹、谷口怜、下島昌幸、西條政幸. SFTSウイルスの核蛋白質に対するモノクローナル抗体の作製と抗原検出ELISAへの応用. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 3) 西條政幸、吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、前田健、高橋徹、森川茂、下島昌幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスの分子系統学的特徴とその地理的分布. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 4) 下島昌幸、福士秀悦、谷英樹、谷口怜、西條政幸. プラークを形成するSFTSウイルスによる中和抗体価測定. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜 (2014. 11).
- 5) 谷英樹、谷口怜、福間藍子、福士秀悦、森川茂、下島昌幸、西條政幸. 重症熱性血小板減少症候群ウイルスGPの細胞融合能と25-hydroxycholesterolによる細胞阻害効果. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).
- 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. 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. 第62回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, (2014. 11).

- 7) 吉河智城、福士秀悦、谷英樹、福間藍子、谷口怜、須田遊人、Harpal Singh、江川和孝、下島昌幸、森川茂、西條政幸. ワクシニアウイルスLC16m8株を土台とした組換えワクシニアウイルス作出システムの確立. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜 (2014. 11).
- 8) 岩田奈織子、福士秀悦、福間藍子、鈴木忠樹、竹田誠、田代真人、長谷川秀樹、永田典代. 中東呼吸器症候群コロナウイルスに対するマウスおよびラットの感受性について. 第62回日本ウイルス学会学術集会 横浜 (2014. 11).
- 9) Aiko Fukuma, Shuetsu Fukushi, Satoshi Taniguchi, Hideki Tani, Tomoki Yoshikawa, Tadaki Suzuki, Hideki Hasegawa, Masayuki Saijo, Masayuki Shimojima. Development of antigen-capture ELISA for the detection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleoprotein. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).
- 10) Satoshi Taniguchi, Shuetsu Fukushi, Joseph S Masangkay, Roberto P Puentespina, Tsutomu Omatsu, Ken Maeda, Aiko Fukuma, Tomoki Yoshikawa, Hideki Tani, Masayuki Shimojima, Shigeru Kyuwa, Masayuki Saijo, Shigeru Morikawa. Seroepidemiological study of SFTS in wild bats in the Philippines. The 10th China-Japan International Conference of Virology. Changchun, China. (2014. 08).

#### H. 知的所有権の取得状況

無し

図1) イシククル様ウイルスの各種培養細胞における増殖性

細胞	由来	ウイルス増殖
Vero	アフリカミドリザル腎	+ + +
Vero E6	アフリカミドリザル腎	+ + +
Huh7	ヒト肝細胞	+ + +
SW13	ヒト副腎皮質	+ + +
U2OS	ヒト骨肉腫	+ +
TB1-Lu	コウモリ肺	+ +
Jurkat	ヒトT細胞	+
Daudi	ヒトB細胞	-
C6/36	ヒトスジシマカ	+ / -

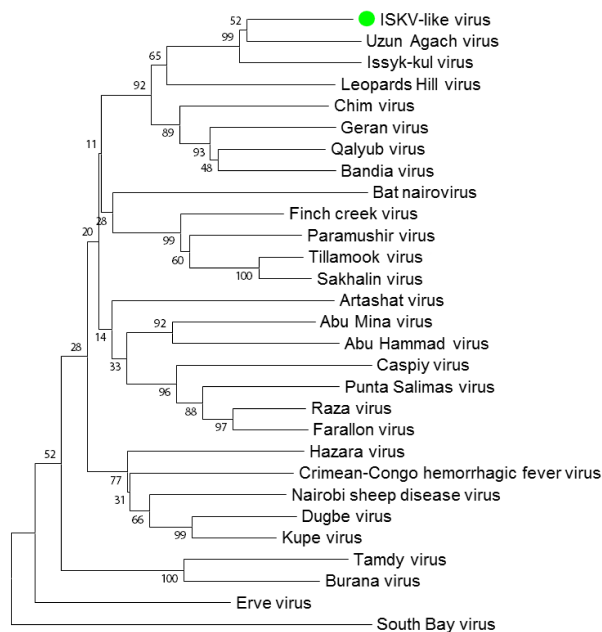


図2) イシククルウイルス(Issyk-kul virus)、イシククル様ウイルス (ISKV-like virus)および、近縁ウイルス(ブニヤウイルス科ナイロウイルス属)の分子系統樹(L遺伝子の部分配列より作製)

### 図3) Primer and Probe

like-S probe	FAM-CGGAGAGATGCGTATGGATT-TAMRA
like-S forward	CCAGTGTGCTCAACTGGAGA
like-S reverse	CCTCACCCATCCTACATGCT
like-M probe	FAM-CACCCAGATGTACAGTGCTGA-TAMRA
like-M forward	TGAACCAAAGACGAGCACAG
like-M reverse	CAGGACCCTTCAGACCATGT
like-L probe	FAM-TGTGCTTAATGGCTGTGGAG-TAMRA
like-L forward	CAGGACAAGATGCTGACGAA
like-L reverse	GACTTTGGGGTGTGGTGCT

図4) One Step RT-PCRによるイシクル様ウイルス遺伝子の検出

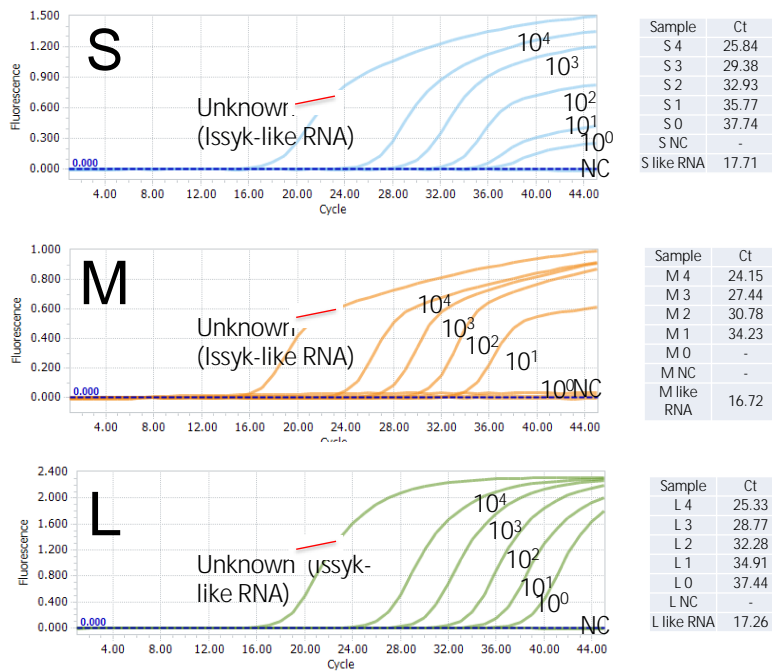
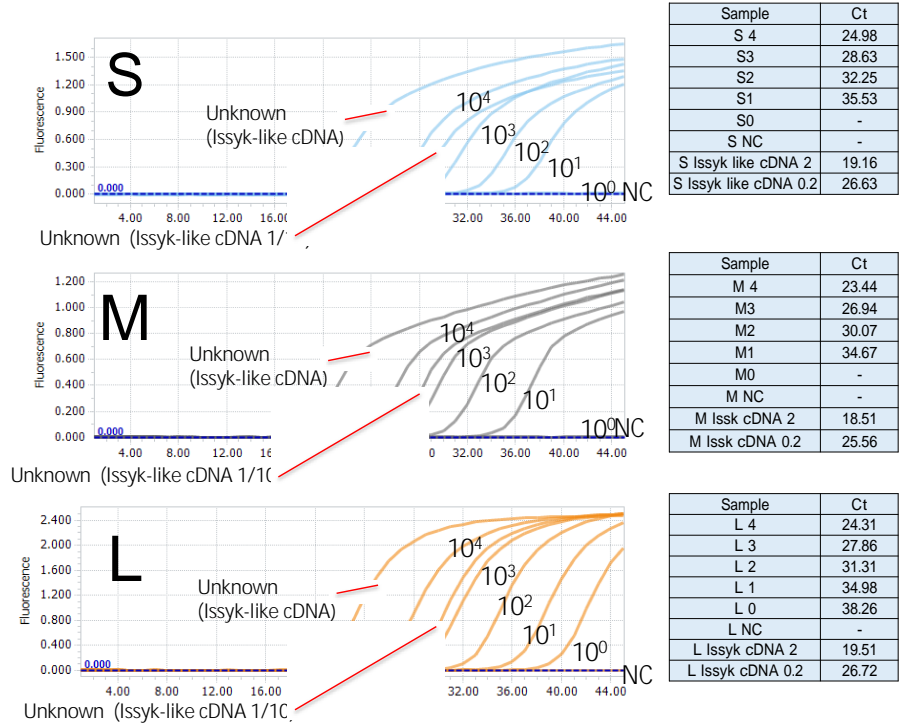


図5) Two Step PCRによるイシクル様ウイルス遺伝子の検出







### 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）

## 新規ブルセラ属菌の遺伝子情報と診断法

担当責任者： 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第一室長

研究協力者： 木村昌伸、奥谷晶子、鈴木道雄、朴ウンシル 国立感染症研究所獣医科学部

吉河智城 国立感染症研究所ウイルス第一部

研究要旨：21世紀に入り新種のブルセラ属菌の発見・報告が相次いでいる。そのような中、2012年には、無尾類より新たなブルセラ属菌が分離され、患者より分離された *B. inopinata* と近縁であることが報告された。我々は国内の愛玩用無尾類よりブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を実施し、イエアメガエル、デニスフロッグからそれぞれ 1 株、計 2 株の新規ブルセラ属菌を分離した。

本研究では、これら新規ブルセラ属菌の全ゲノム解析を行い、旧来のブルセラ属菌と比較し、得られた遺伝子情報に基づき遺伝子診断法、鑑別法を開発することを目的としている。

まず、2 株のカエル由来ブルセラ属菌（A105 株、A141 株）について、次世代シーケンサー-Miseq を用いて各々の全ゲノム情報を得た。得られた Contig について Gene annotation を行い、さらに、*B. melitensis* のゲノム配列を対照として遺伝子地図を作成した。次に、遺伝子タイピングに用いられる 9 座の遺伝子について全遺伝子配列を決定し、他のブルセラ属菌と比較し、ホモロジー解析と系統樹解析を実施した。その他、ブルセラ属菌で保存性の良い 16S rRNA 遺伝子および病原性遺伝子群である *virB* 遺伝子についても解析を行った。Classic species (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. neotomae*)、Marine species (*B. ceti*, *B. pinnipedialis*) と Novel species の *B. microti* は単一のクレードを作ることが明らかとなり、カエル分離株 2 株（A105、A141）は、*B. microti* 以外の Novel species、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、*B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 と第 2 のクレードを構成していた。さらに、通常の 9 座遺伝子タイピングでは対応できていなかった、主として Novel species のブルセラ属菌間についても、その遺伝子的差異を明らかにした。

PCR を用いた特異的遺伝子検出法を開発するため、9 座の全遺伝子配列について、Classic species 等との一塩基変異部位を複数箇所特定し、センス、アンチセンスとも、その変異部位が 3'末端にくるようなプライマーセットを設計した。設計した数種のプライマーセットのうち 3 セットが特異的増幅を示したが、中でも *glk* 遺伝子を標的としたプライマーセットは非常に特異性、増幅効率が良好であった。カエル由来ブルセラ属菌特異的遺伝子検出法が開発された。

## A . 研究目的

ブルセラ属菌 (*Brucella* spp. ) は、世界中の多くの国と地域で未だ主要な人獣共通感染症であるブルセラ症 ( brucellosis ) の起炎菌である。そのなかで、ヒト患者も多く主要なものとしては、病原性の順に *B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*、*B. canis* の 4 菌種が知られている。

ブルセラ属菌は、19 世紀のクリミア戦争時代に英国軍兵士の間で流行したマルタ熱 ( 波状熱 ) の原因菌として、1887 年、Sir David Bruce により *B. melitensis* ( 自然宿主 : ヤギ、ヒツジ ) が最初に分離され、次いで、*B. suis* ( ブタ、1914 年 )、*B. abortus* ( ウシ、水牛、1918 年 )、*B. ovis* ( ヒツジ、1953 年 )、*B. neotomae* ( げっし目、1957 年 )、*B. canis* ( イヌ、1968 年 ) が発見・報告されてきた。その後、新たな菌の報告はしばらく無かったが、1997 年に海棲哺乳類から *B. maris* ( 現在は、*B. ceti* ( クジラ、イルカ ) および *B. pinnipedialis* ( アザラシ ) ) が報告されると、21 世紀に入り、*B. microti* ( アカギツネ、common voles、土壌、2008 年 )、*B. inopinata* ( BO1 株、患者由来、2010 年 )、*B. inopinata*-lik ( BO2 株、患者由来、2010 年 )、その他、未分類ではあるが *B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 ( いずれもげっし目 )、*B. sp.* NVSL 07-0026 ( バブーン )、など新たな発見が続いている ( 表 1 )。

そのような中、2012 年には、独、米の異なるグループにより無尾類 ( カエル ) に由来する新たなブルセラ属菌が相次いで分離された。遺伝子解析の結果、これらはブルセラ症患者から分離され、未だ自然宿主が不明である *B. inopinata* BO1 および BO2 に最も近縁とされた。我が国にも種々の外

国産無尾類が輸入されており、また、国内ブリーダーによる外来種の生産個体と合わせて、愛玩用として流通・販売されている。そこで、我々は外国産および在来種の無尾類より、ブルセラ属菌の遺伝子検出と菌分離を試み、輸入外国産カエル 2 種から新規ブルセラ属菌 2 株 ( A105、A141 株 ) を分離した。

本研究では、これら新規ブルセラ属菌の全ゲノム解析を行い、旧来のブルセラ属菌と比較すること、また、得られた遺伝子情報をもとに、遺伝子診断・鑑別法を開発することを目的とした。

## B . 研究方法

### 1 . 全ゲノムシーケンス :

国内 2 カ所の両生類飼育施設で、それぞれ飼育されていたイエアメガエル (*Litoria caerulea*) とデニスフロッグ (*Rhacophorus dennysi*) から分離された 2 株のブルセラ属菌 ( A105 株、A141 株 ) を研究に用いた。

これら 2 株より、それぞれ DNA を抽出し、次世代シーケンサー Miseq ( illumina 社 ) で各々の全ゲノム配列情報を得た。Miseq により得られた Contig について、微生物アノテーションツールである MiGAP ( Microbial Genome Annotation Pipeline、<http://www.migap.org> ) を用いて Gene annotation を行った。さらに、さらに、ブルセラ属の基準株である *B. melitensis* bioover 1 strain 16M ( NCBI accession number : CP007763, CP007762 ) のゲノム配列を対照として遺伝子地図 ( 塩基配列地図 ) を作成した。地図作成には、GView Server ( <https://server.gview.ca> ) を使用した。

## 2 . 16S rRNA 遺伝子解析 :

A105 株および A141 株のアノテーション後の配列情報から、16S rRNA 遺伝子全長 1492bp について、GenBank に登録されているブルセラ属菌の相同配列と NJ 法で系統樹解析を行った。アウトグループとしてブルセラ属に最も近縁の *Ochrobactrum* 属菌、2 種 (*O. anthropi*、*O. intermedium*) の相同配列を用いた。

## 3 . 多座遺伝子解析 (MLSA) :

近年、ブルセラ属菌の遺伝子タイピング法として多座遺伝子解析法 (*Brucella* MLSA 9、Whatmore et al. 2007) が行われている。同法ではハウスキーピング遺伝子 9 座の、それぞれ、約 500bp の部分配列を連結して解析することで家畜ブルセラ菌、イヌブルセラ菌、海棲哺乳類由来ブルセラ菌の全株を 27 のシーケンスタイプ (ST) として識別することができる。しかし、近年になって発見された *B. inopinata* などには対応していないため、カエル由来株に対し MLSA 9 を用いた場合、いくつかの配列は、定法では増幅が困難であることが判明した。我々は、A105 株および A141 株について、MLSA9 で用いられる 9 座の遺伝子の全配列を決定し、16S rRNA 遺伝子と同様に、GenBank に登録されているブルセラ属菌の相同配列、9 座それぞれ単独、および 9 座連結 (concatenate 12,353, bp) として NJ 法で系統樹解析を行った。

## 4 . 型分泌機構遺伝子解析 :

細胞内寄生性をもつブルセラ属菌は、宿主細胞へ侵入後、型分泌機構 (T4SS) を介して、直接エフェクタータンパク質を輸

送することが知られている。このブルセラ属菌の主要な病原因子である T4SS の構成遺伝子である *virB* 遺伝子群 (*virB1* ~ *virB11*) は、ゲノム中に隣接して配列し、属内で高度に保存されている。*virB* 遺伝子群 (pathogenicity island、12,353bp) について、A105 株および A141 株と他のブルセラ属菌の相同配列を NJ 法により解析した。

## 5 . 遺伝子診断法の開発 :

ブルセラ属菌の遺伝子検出には、*B. abortus* 細胞表面タンパクの 31kDa 抗原 BCSP31 をコードする遺伝子 (*bcs31*) 内の 224 bp の領域を標的とした PCR が最も広く用いられている。これは、全てのブルセラ属菌に保存されている。我々は、通常、*bcs31* (1 組) に *omp31* (1 組) および *omp2* 遺伝子領域 (2 組) を標的としたプライマー計 4 組を組み合わせることで、ヒトに感染する主要 4 菌種を特定している。ただ、A105 株および A141 株は、*B. suis* と同様の反応性を示し、区別ができない。そこで、全配列が明らかとなったハウスキーピング遺伝子 9 座について、他のブルセラ属菌と比較を行い、一塩基変異部位を複数箇所特定した。その部位について GC 含量や Tm 値を検討しながら、センス、アンチセンスとも、その変異部位が 3' 末端にくるようにプライマーセットを設計した。PCR は、puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) を用い、GeneAmp PCRSystem9700 (Applied Biosystems) で実施した。

## C . 研究結果

### 1 . 全ゲノムシーケンス :

図1に概要を示す。遺伝子地図から、リファレンス株との比較で、カエル株2株の配列に数カ所大きなギャップが見られたものの、ほぼ全ての遺伝子の配列が決定された。

## 2. 16S rRNA 遺伝子解析:

アウトグループの *Ochrobactrum* 属菌に対し、ブルセラ属は、大きく2つのクレードに分かれた。第1のクレードは、Classic species (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*, *B. neotomae*)、Marine species (*B. ceti*, *B. pinnipedialis*) と Novel species の *B. microti* から構成され、第2のクレードは、*B. microti* 以外の Novel species、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、*B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 (げっし目) とカエル分離株2株 (A105、A141) で構成されていた (図2)。2つのクレード内での配列のホモロジーは高い (Classic・Marine クレード 99.9~100%、Novel クレード 99.7~100%) が、両クレード間ではやや低かった (99.5~99.6%) (表2)。

## 3. 多座遺伝子解析 (MLSA):

9座の連結配列 (12,353bp) の系統樹を図3-1に、*aroA* (1,353bp)、*cobQ* (1,452bp)、*dnak* (1,914bp)、*gap* (1,008bp)、*glk* (1,032bp)、*gyrB* (2,442bp)、*int-hyp* (312bp)、*omp25* (646bp)、*trpE* (2,196bp) の各遺伝子のNJ法による系統樹を図3-2~5に示す。

12,353bpの連結系統樹では、16S rRNA 遺伝子と同様に、ブルセラ属は2つのクレードからなった。すなわち、Classic species、Marine species と *B. microti* で構成されるクレードと、カエル分離株 (A105、A141)

と *B. inopinata* を含む Novel species の2番目のクレードである。クレード内の株間のホモロジーは、Classic・Marine クレード内で高く、Novel クレード内では、それよりも低くなっていた。また、総じて、16S rRNA 遺伝子よりもホモロジーは低い値を示した (表3)。9遺伝子座、それぞれ単独配列の解析では、*glk*、*gap* ではきれいに2クレードに分かれた (図3-2)。一方、*cobQ*、*trpE* では *B. inopinata* BO1 (図3-3)、*aroA*、*dnak* では A105 (図3-4)、*omp25*、*int-hyp* では A141 (図3-5)、*gyrB* では *B. inopinata*-like BO2 が、Classic・Marine クレード寄りとなっており、2クレードに分かれるものの一様ではなく、バリエーションが認められた。

## 4. 型分泌機構遺伝子解析:

*virB* 遺伝子群 (11,818bp) の解析結果は、16S rRNA 遺伝子、9座の連結配列と同様に Classic species、Marine species と *B. microti* でクレードが形成された。しかしながら、*B. inopinata* BO1 と *B. inopinata*-like BO2 は、最も離れて独立したクレードを形成し、カエル分離株 (A105、A141) は *B. sp.* 83/13、*B. sp.* NF2653 とともにクレードを形成した (図4)。

## 5. 遺伝子診断法の開発:

*glk*、*cobQ*、*dnak* を標的にしたプライマーセットが、ヒトに感染しうる主要4菌種 (*B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*、*B. canis*) およびブルセラ属菌に近縁な *Ochrobactrum* 属菌と反応せず、カエル分離株 (A105、A141) とのみ特異的に反応した。このうち、*cobQ* は異なるサイズではあるがエキストラバ

ンドが見られ、dnak は増幅効率がやや劣っていた。一方、glk を標的にした物は、最も増幅効率が良く、エキストラバンドも認められなかった(図5)。本プライマーセットは、センス、アンチセンスの3'末端側が、それぞれ「g t」「gagg caga」と「プリン塩基 ピリミジン塩基」の変異を反映しており、これが良い結果をもたらしたと考えられる。以上のことから、glk を標的とした本プライマーセットが、カエル由来ブルセラ属菌の有用な特異的遺伝子診断・鑑別法になることが明らかになった。

#### D. 考察

16S rRNA 遺伝子 (1,492bp) による系統解析では、カエル株 (A105, A141)、*B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2、齧歯類株 (*B. sp.* 83/13, *B.sp.* NF2653) は、家畜ブルセラ、イヌブルセラ、マリンプルセラ、*B.microtti* のクレードに対し、別クレードを形成した。しかし 9 遺伝子座の連結配列 (12,353bp) による解析では、家畜ブルセラを含むクレードは、再現されたが、それ以外の菌種は、カエル株 (A105, A141)、*B. inopinata*-like BO2、齧歯類株 (*B. sp.* 83/13, *B.sp.* NF2653) のクレードと *B. inopinata* BO1 のみからなるクレードの2つに分かれた。さらにブルセラ属の主要な病原因子とされる 型分泌機構の遺伝子である *virB* 遺伝子 (11,818bp) の解析結果では、家畜ブルセラを含むクレードは、16S rRNA 遺伝子、9 座連結配列同様にふたたび再現されたが、ノーベルブルセラについては、家畜ブルセラクレードから離れて、それぞれ進化的に遠い系統関係を示す結果になった。とくに *B. inopinata* BO1、*B.*

*inopinata*-like BO2 は、他のブルセラ属菌と離れて2株でアウトグループを形成した。

遺伝子系統解析では、より多くの遺伝子座のより長い配列を用いることで収斂現象などのノイズの影響を抑えて、より正しい系統発生を再現できることが知られている。本研究の解析結果では、家畜ブルセラ、イヌブルセラ、マリンプルセラ、*B.microtti* からなる単系統クレードは、どの配列を用いた解析でも比較的強固に維持されており、それらの菌種の進化的な近縁性は、十分に示されたと考える。また、ノーベルブルセラのなかで、どちらもオーストラリア在来の野生齧歯類分離株である *B. sp.* 83/13 と *B.sp.* NF2653 については、本研究において用いた全ての配列のホモロジーが 100%を示したことから同一菌種である可能性が示されたと考える。しかし、カエル分離株、A105, A141 については、どの配列を用いた解析でもそれぞれが異なっていた (*virB* 遺伝子群で 97.2%)。さらに、未だ自然宿主が見つからないヒトブルセラ症由来の *B. inopinata* BO1、*B. inopinata*-like BO2 と我々のカエル株 (A105, A141) を含むノーベルブルセラグループについては、解析に用いる遺伝子配列の違いにより、異なる系統発生が再現される結果となった。

本研究に用いた輸入野性外国産カエルの分離株は、それぞれ異なる飼育施設で飼われていた原産地も種も異なるカエル (オセアニア原産のイエアメガエル・*Litoria caerulea* と東南アジア原産のデニスフロッグ・*Rhacophorus dennysi*) から分離されている。それぞれの施設で同時期に飼育されていた在来種と外国産のカエルからは、ブ

ブルセラ属菌は、分離されていないため、我々の分離株 2 株は、それぞれの宿主のカエルが輸入前より保有していたと考えられる。異なる地域の異なる種のカエルが異なるブルセラ属菌の宿主となっている可能性がある。*B. Inopinata* の自然宿主を特定するためには、カエル株を含むノーベルブルセラ菌種の系統発生を正しく再現する必要がある、さらに多くの遺伝子座、より長い配列を用いた解析が必要であろう。

#### E . 結論

愛玩用無尾類から分離したブルセラ属菌の全遺伝子配列を決定し、それを基に即特異的遺伝子検出法を開発した。

#### G . 研究発表等

##### 1 . 論文発表等

( 1 ) 今岡浩一, 木村昌伸. ブルセラ症 - 特集・人獣共通感染症の新しい知見. in : 臨床と微生物, 近代出版, 42(1): 27-32, 2015

##### 2 . 学会発表等

( 1 ) 木村昌伸, 宇根有美, 朴ウンシル, 鈴木道雄, 森川茂, 今岡浩一. 無尾類(カエル)に由来するブルセラ属菌の分離と解析. 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, 相模原, 2014 年 11 月

H . 知的財産権の出願・登録状況なし。

表1.ブルセラ属菌

種	宿主動物	ヒトへの感染・発症
<b>Classic species</b>		
<i>B. melitensis</i>	山羊、めん羊、ラクダ	あり（最も一般的で重要）
<i>B. abortus</i>	牛、水牛、エルク	あり（次に重要）
<i>B. suis</i>	ブタ、いのしし、トナカイ、カリブー	あり
<i>B. canis</i>	犬（イヌ科）	あり（近年、報告数が増加傾向）
<i>B. ovis</i>	めん羊	報告無し
<i>B. neotomae</i>	げっ歯目	報告無し
<b>Marine species</b>		
<i>B. ceti</i>	クジラ、イルカ	2例の患者報告あり。実験室感染例も報告あり
<i>B. pinnipedialis</i>	アザラシ、アシカ	
<b>Novel species</b>		
<i>B. microti</i>	ハタネズミ、（土壌）	報告無し
<i>B. inopinata</i>	不明、（カエル？）	株名BO1、BO2の2例の報告あり
<b>(Future species)</b>		
<i>B. sp. 83/13</i> および <i>B. sp. NF2653</i>	げっし目	報告無し
<i>B. sp. NVSL 07-0026</i>	バブーン	報告無し

表2. 16S rRNA 遺伝子のホモロジー

Sequence entity Matrix		Classic - Marine species								Novel species								
		<i>B. melitensis</i> 16M	<i>B. suis</i> 1330	<i>B. abortus</i> 2308	<i>B. canis</i> RM6/66	<i>B. ovis</i> ATCC25840	<i>B. neotomae</i> 5K33	<i>B. ceti</i> Cudo	<i>B. pinnipedialis</i> B2/94	<i>B. microti</i> CCM4915	<i>B. inopinata</i> BO1	<i>B. sp.</i> BO2	A105	A141	<i>B. sp.</i> 83/13	<i>B. sp.</i> NF2653	<i>O. anthropi</i> ATCC49188	<i>O. intermedium</i> LMG3301
16S rRNA DNA (1,492bp)																		
Classic - Marine species	<i>B. melitensis</i> 16M	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. suis</i> 1330	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. abortus</i> 2308	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. canis</i> RM6/66	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. ovis</i> ATCC25840	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. neotomae</i> 5K33	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.999	0.995	0.995	0.995	0.995	0.994	0.994	0.985	0.987
	<i>B. ceti</i> Cudo	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. pinnipedialis</i> B2/94	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	<i>B. microti</i> CCM4915	1	1	1	1	1	0.999	1	1	1	0.996	0.996	0.995	0.996	0.995	0.995	0.986	0.988
	Novel species	<i>B. inopinata</i> BO1	0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.995	0.996	0.996	0.996	1	0.999	1	0.998	0.998	0.983	0.991
<i>B. sp.</i> BO2		0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.995	0.996	0.996	0.996	1	0.999	1	0.998	0.998	0.983	0.991	
A105		0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.999	0.999	0.997	0.997	0.982	0.991		
A141		0.996	0.996	0.996	0.996	0.996	0.995	0.996	0.996	0.996	1	1	0.999	0.998	0.998	0.983	0.991	
<i>B. sp.</i> 83/13		0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.994	0.995	0.995	0.995	0.998	0.998	0.997	0.998	1	0.981	0.99	
<i>B. sp.</i> NF2653		0.995	0.995	0.995	0.995	0.995	0.994	0.995	0.995	0.995	0.998	0.998	0.997	0.998	1	0.981	0.99	
<i>O. anthropi</i> ATCC49188	0.986	0.986	0.986	0.986	0.986	0.985	0.986	0.986	0.986	0.983	0.983	0.982	0.983	0.981	0.981	0.98		
<i>O. intermedium</i> LMG3301	0.988	0.988	0.988	0.988	0.988	0.987	0.988	0.988	0.988	0.991	0.991	0.991	0.991	0.99	0.99	0.98		

表 3. 9 座連結配列のホモロジー

Sequence entity Matrix		Classic • Marine species									Novel species					O.anthropi W13P3 O.intermedium LMG3301		
		B.melitensis 16M	B.suis 1330	B.abortus 2308	B.canis RM6/66	B.ovis ATCC25840	B.neotomae 5K33	B.ceti Cudo	B.pinnipedialis B2/94	B.microti CCM4915	B.inopinata BO1	B.sp. BO2	A105	A141	B.sp. 83/13			B.sp. NF2653
Classic • Marine species	B.melitensis 16M	0.997	0.998	0.997	0.994	0.997	0.997	0.997	0.998	0.998	0.984	0.985	0.982	0.982	0.984	0.983	0.855	0.854
	B.suis 1330	0.997	0.998	0.999	0.994	0.998	0.998	0.998	0.998	0.985	0.985	0.983	0.983	0.984	0.984	0.857	0.855	
	B.abortus 2308	0.998	0.998	0.997	0.997	0.994	0.998	0.998	0.998	0.984	0.985	0.983	0.983	0.984	0.984	0.856	0.855	
	B.canis RM6/66	0.997	0.999	0.997	0.994	0.997	0.997	0.998	0.998	0.984	0.985	0.983	0.982	0.984	0.984	0.856	0.855	
	B.ovis ATCC25840	0.994	0.994	0.994	0.994	0.995	0.994	0.995	0.995	0.981	0.982	0.98	0.98	0.981	0.981	0.854	0.853	
	B.neotomae 5K33	0.997	0.998	0.998	0.997	0.995	0.998	0.998	0.998	0.985	0.985	0.983	0.983	0.984	0.984	0.856	0.855	
	B.ceti Cudo	0.997	0.998	0.998	0.997	0.994	0.998	0.999	0.998	0.985	0.985	0.983	0.983	0.984	0.984	0.856	0.855	
	B.pinnipedialis B2/94	0.997	0.998	0.998	0.998	0.995	0.998	0.999	0.999	0.985	0.986	0.984	0.983	0.985	0.985	0.856	0.856	
	B.microti CCM4915	0.997	0.998	0.998	0.998	0.995	0.998	0.998	0.999	0.985	0.985	0.984	0.983	0.985	0.984	0.856	0.855	
Novel species	B.inopinata BO1	0.984	0.985	0.984	0.984	0.981	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.985	0.984	0.984	0.986	0.856	0.856	
	B.sp. BO2	0.985	0.985	0.985	0.985	0.982	0.985	0.985	0.986	0.985	0.985	0.986	0.987	0.986	0.856	0.855		
	A105	0.982	0.983	0.983	0.983	0.98	0.983	0.983	0.984	0.984	0.984	0.985	0.985	0.984	0.983	0.856	0.855	
	A141	0.982	0.983	0.983	0.982	0.98	0.983	0.983	0.983	0.984	0.986	0.985	0.985	0.985	0.985	0.856	0.855	
	B.sp. 83/13	0.984	0.984	0.984	0.984	0.981	0.984	0.984	0.985	0.985	0.986	0.987	0.984	0.985	0.999	0.856	0.855	
B.sp. NF2653	0.983	0.984	0.984	0.984	0.981	0.984	0.984	0.985	0.984	0.985	0.986	0.983	0.985	0.999	0.856	0.855		
O.anthropi W13P3	0.855	0.857	0.856	0.856	0.854	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.856	0.915		
O.intermedium LMG3301	0.854	0.855	0.855	0.855	0.853	0.855	0.855	0.856	0.855	0.856	0.855	0.855	0.855	0.855	0.855	0.915		

図 1 . カエル分離株 2 株 ( A105、 A141 ) と B. melitensis 16M の遺伝子地図

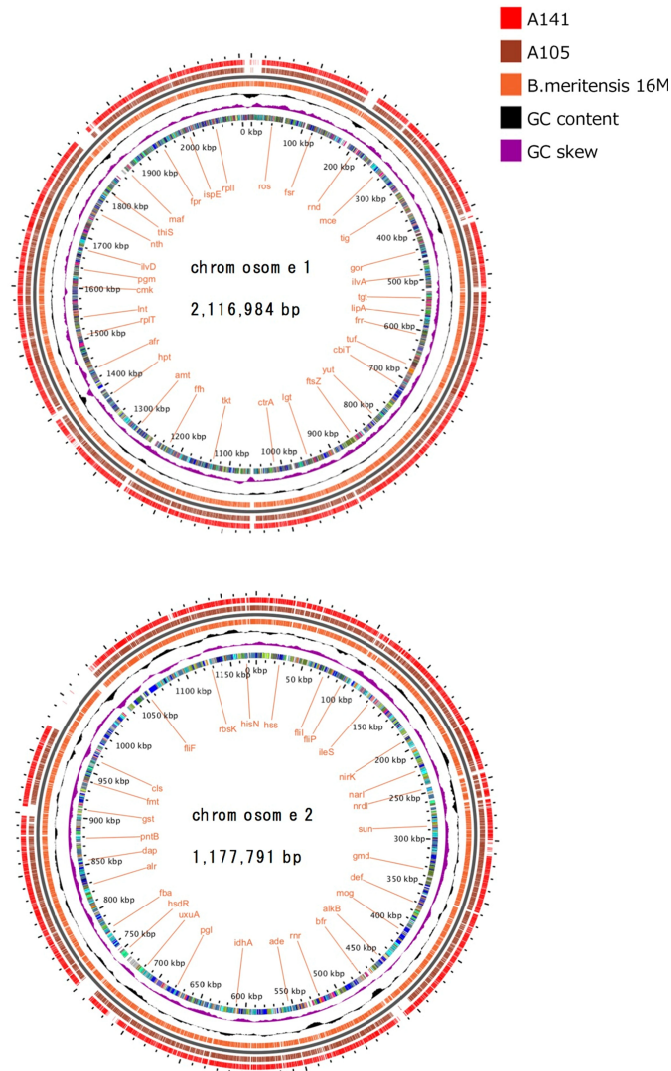




図 2 . 16S rRNA 遺伝子の系統樹解析

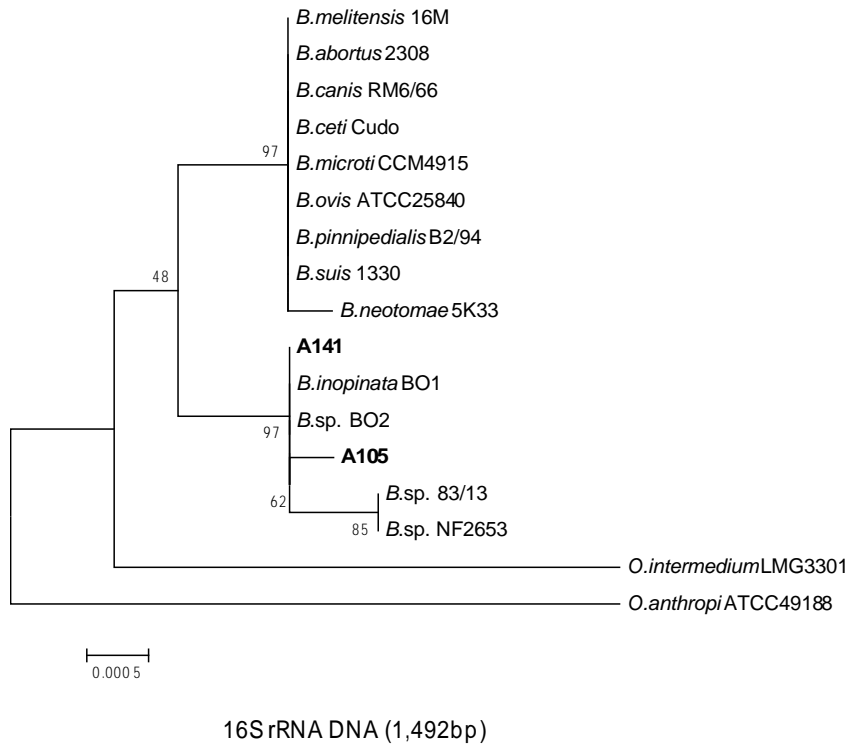


図 3 . 多座遺伝子解析

図 3 - 1 . 9 座連結配列による系統樹解析

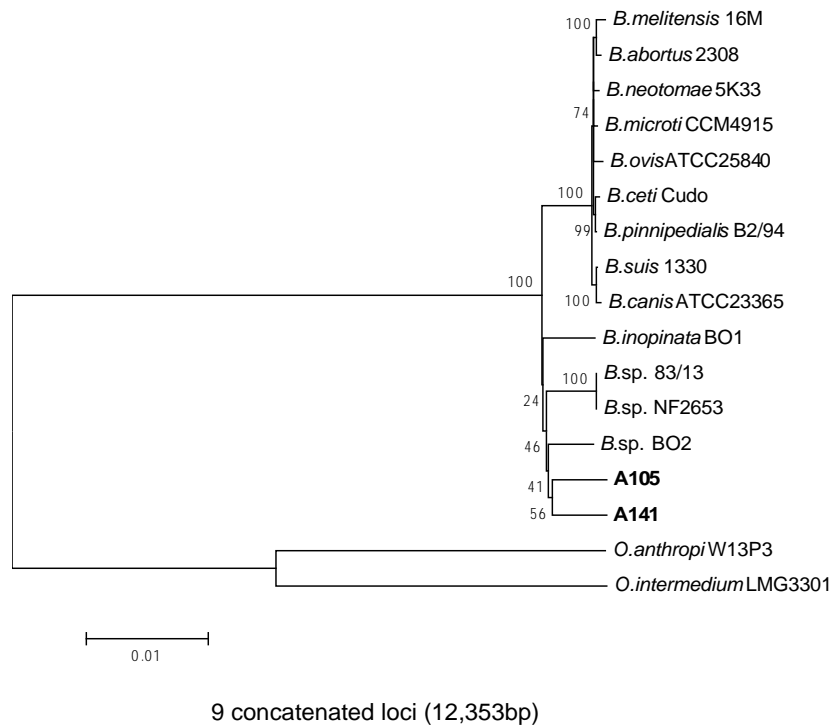


図 3 - 2 . glk 遺伝子の系統樹

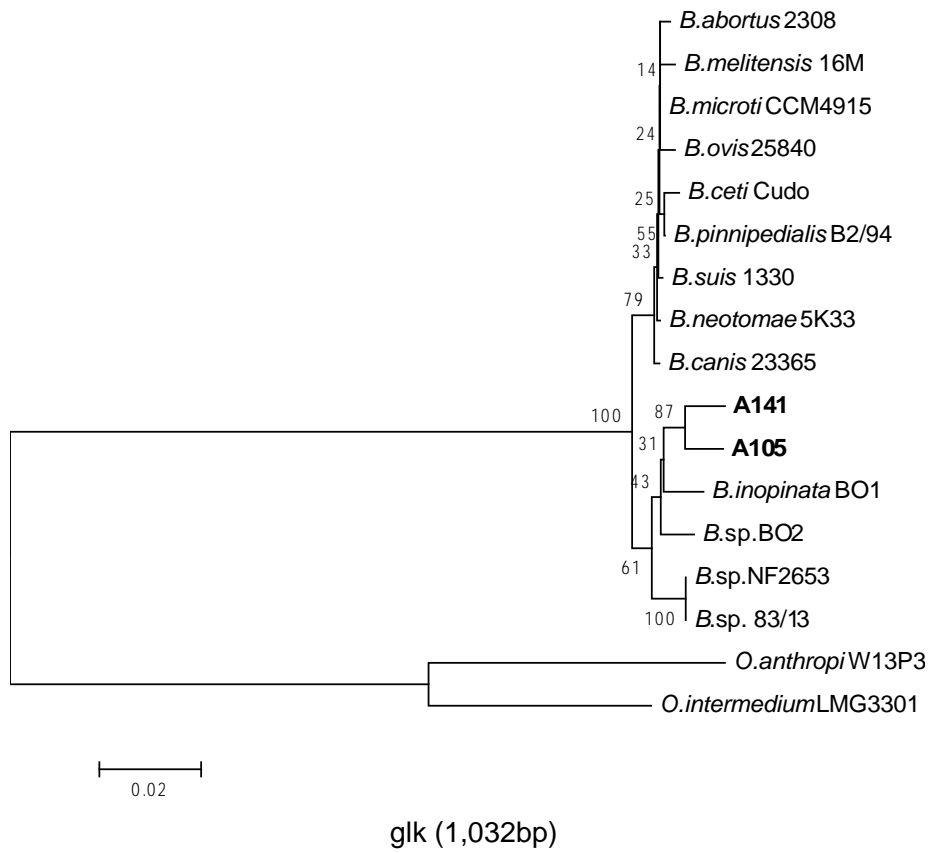


図 3 - 3 . *cobQ* 遺伝子の系統樹

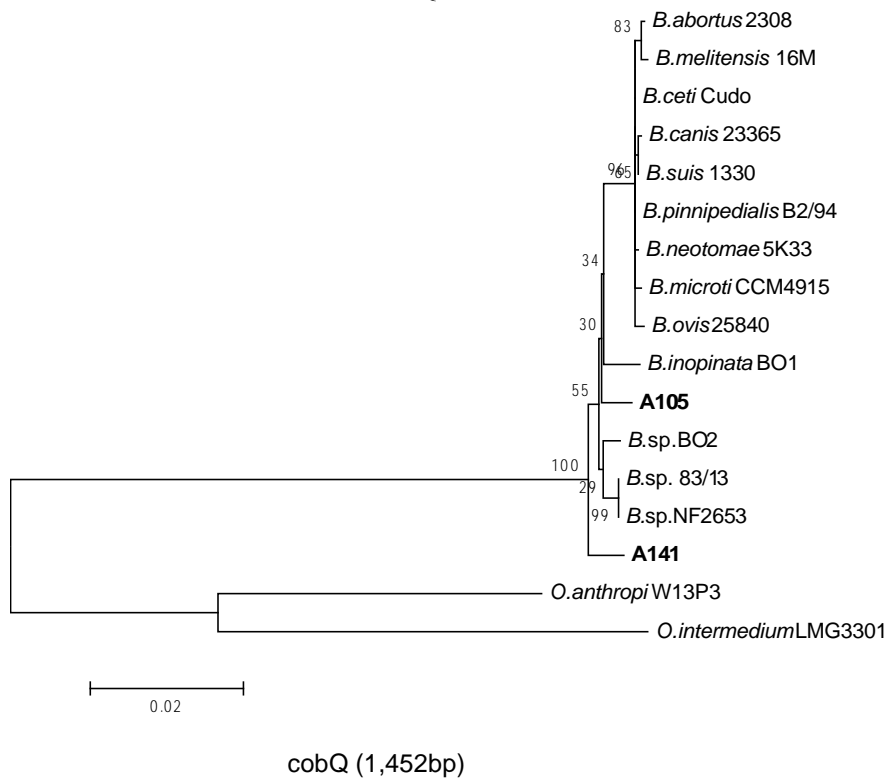


図 3 - 4 . *aroA* 遺伝子の系統樹

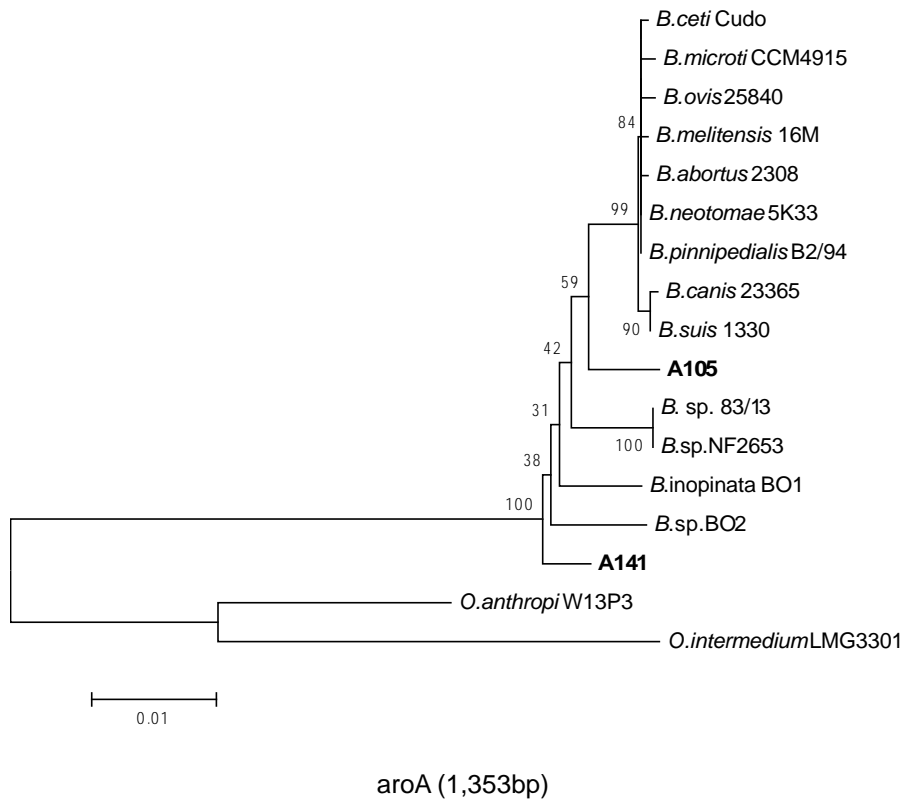


図 3 - 5 . omp25 遺伝子の系統樹

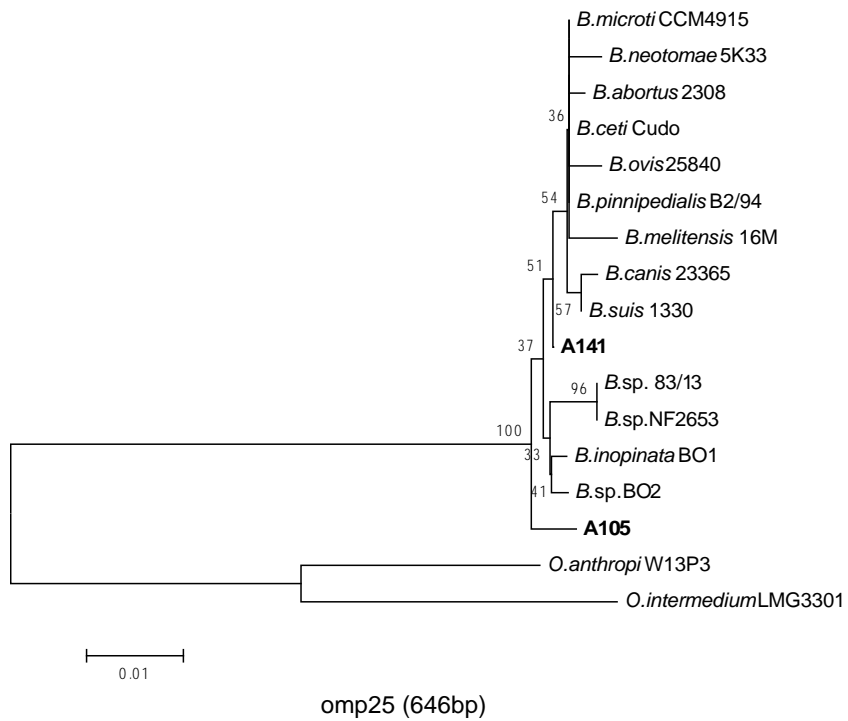
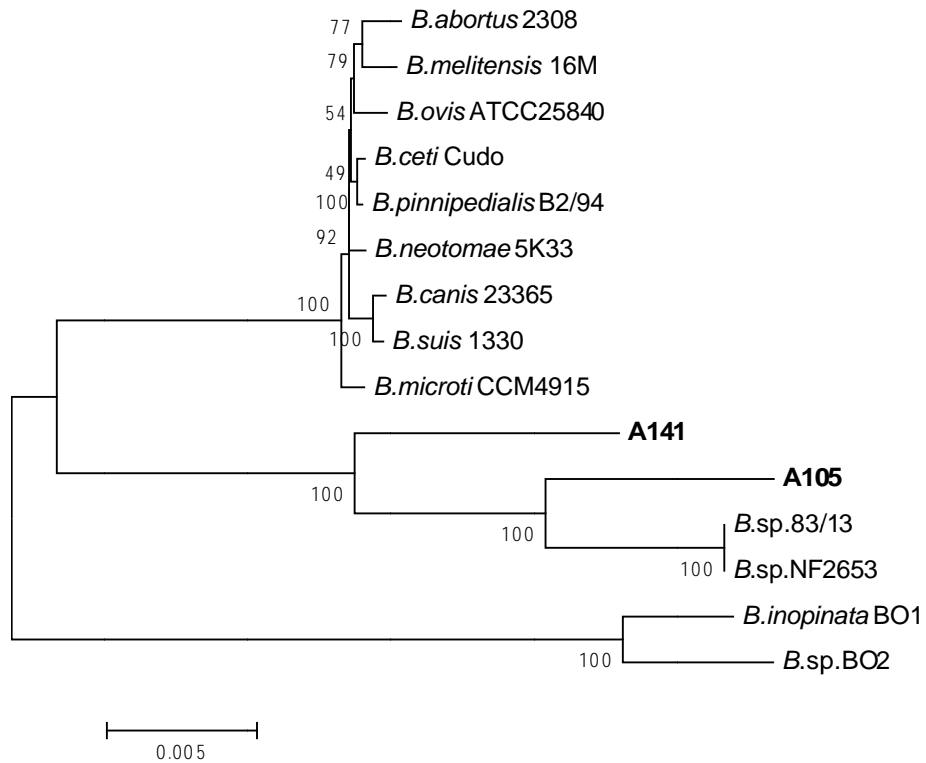
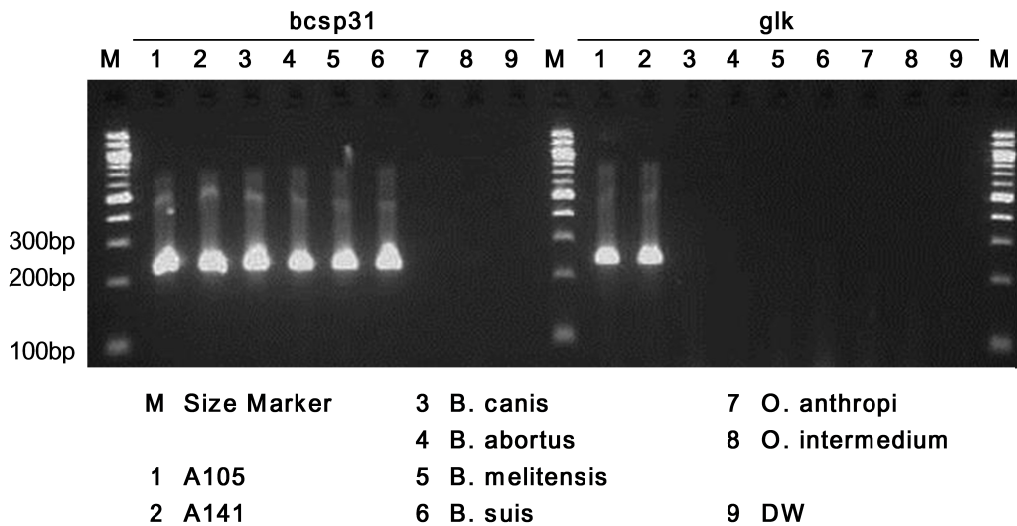


図 4 . virB 遺伝子群の系統樹解析



Type IV secretion system (T4SS) pathogenicity island (11,818bp)

図5 . 無尾類由来ブルセラ属菌特異的遺伝子検出法(PCR)の開発



### 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）

### 新規カプトサイトファーガ属菌の遺伝子情報と診断法に関する研究

担当責任者 鈴木 道雄 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究協力者 今岡 浩一、木村 昌伸、奥谷 晶子 国立感染症研究所 獣医科学部

研究要旨：イヌ・ネコに咬傷・搔傷を受けた際に感染する *Capnocytophaga canimorsus* 感染症の症例情報収集を行う中で、同感染症疑いの重症敗血症例 3 例から *C.canimorsus* とは遺伝的に異なる菌株が分離された。本研究では、この新たな致死性の敗血症原因菌である新規 *Capnocytophaga* 属菌について、全ゲノム解析を含む遺伝子解析および生物学的解析を行い、その性状を明らかにするとともに、鑑別診断法の開発を行った。その結果、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 菌株は、新菌種の提唱において最も決定的なデータとなる近縁種との DNA-DNA ハイブリッド形成試験において、同一菌種の基準である相同値 70% 以上を大きく下回る 12~15% であった。さらに 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子の相同値、また各種の生理・生化学的性状および理化学分析の結果を総合的に考慮して、3 株同士は同一菌種であること、かつ *Capnocytophaga* 属の新菌種であると考えられた。全ゲノム解析においては、3 株それぞれのドラフトゲノムを作成した。リファレンスゲノムとした近縁種 *C. canimorsus* Ce5 株に対するリードマッピングにおけるマッピング率は、同一菌種の *C. canimorsus* 基準株の約 60% に対し、20% 前後と低かった。各コンティグのアノテーションによって、鉄獲得性因子やノイラミニダーゼなどの病原性関連遺伝子を同定した。16s rRNA および *gyrB* 遺伝子をターゲットとした、PCR 法による特異的検出法の開発では、それぞれの遺伝子について、*C.canimorsus* を含む既知の *Capnocytophaga* 菌種には反応せず、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株を特異的に検出する鑑別診断法を確立した。

#### A. 研究目的：

カプトサイトファーガ属菌 (*Capnocytophaga* spp.) はヒトおよびイヌ・ネコの口腔内に常在するグラム陰性桿菌である。現在 8 菌種が知られており、うち 6 菌種はヒトの口腔内常在菌で、イヌおよびネコは *C. canimorsus*、*C. cynodegmi* の 2 菌種を保菌している（表 1）。いずれもヒトに病原性を有するが、公衆衛生上特に重要なのは *C. canimorsus* で、イヌやネコ

に咬傷や搔傷（以下、咬搔傷）を受けた際に感染するほか、傷口をなめられるなど非咬搔傷性の接触感染もある。発熱のほか、敗血症、多臓器不全、播種性血管内凝固症候群（DIC）など、局所症状がみられないまま、急激に強い全身症状が現れることが多いのが特徴である。敗血症を発症したときの致死率は約 30% に達する。

我々はこれまでに、*C. canimorsus* の特異的検出法の開発を行い、国内のイヌの 74%、

ネコの 57%が *C. canimorsus* を保菌していること明らかにし、また、国内の患者発生状況の調査によって、50 例を超える *C. canimorsus* 感染症例を把握してきた。その約 9 割が重症の敗血症例であり、国内症例の致死率も約 25%と、救命救急医療の環境が整ったわが国においても、依然救命の難しい感染症であることが明らかとなった。

さらに、この調査・研究の過程で、従来の *C. canimorsus* 特異的 PCR 検出系では陰性となる、遺伝子的に異なる新菌種と思われる新規 *Capnocytophaga* 属菌による敗血症例 3 例(うち死亡 1 例)が見い出された。本研究は、イヌ・ネコを感染源動物とすることが推測される、この新たな致死性敗血症原因菌について、遺伝子解析や生物学的解析を行い、鑑別診断法を開発することを目的として遂行した。

## B. 研究方法：

敗血症患者由来新規 *Capnocytophaga* 属菌の生物学的解析

国内で *C. canimorsus* 感染疑いの敗血症例から分離された 3 株の新規 *Capnocytophaga* 属菌臨床分離株を解析に供した。菌が分離された症例は 2011 年の 1 例 (HP40001 株) と 2014 年の 2 例 (HP20001 株、HP33001 株) であり、症例のプロファイルは表 2 に示した。

### 1. 理化学分析

HP40001 株と *C. canimorsus* 基準株 ATCC35979 株、HP40001 株と *C. cynodegmi* 基準株 ATCC49044 株の組み合わせで、1 対 2 の DNA-DNA ハイブリッド形成試験をマイクロプレート法によって行った。

### 2. 遺伝子解析

16S rRNA および *gyrB* 遺伝子のそれぞれ 1500bp 弱の領域を増幅して塩基配列

を決定し、結果を近縁種のデータと比較して近隣結合法 (NJ 法) による分子系統解析を行った。さらに、次世代シーケンサー Miseq (illumina 社) を用いて全ゲノムを解析し、得られたリードの de novo アセンブリを行うとともに、国立遺伝学研究所の解析ツール MiGAP を用いて、得られたコンティグに対するアノテーション付与を行った。また、ゲノムデータベース上の *C. canimorsus* Cc5 株の全ゲノム情報をリファレンスとしたリードマッピングを行った。

### 3. 生理・生化学的性状試験

オキシダーゼテスト、カタラーゼテストを常法に従って行った。また、生化学的性状試験の各項目を ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」(日水製薬)、API20A および APIZYM(シスメックス・バイオメリュー)の各検査キットを用いて調べた。

### 4. PCR による新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的検出法の確立

シーケンスデータを元に 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子をターゲットとしたプライマー群を設計し、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株と *Capnocytophaga* 既存菌種基準株を用いて各プライマーの組み合わせによる検出の特異性を検討、鑑別診断に有用なプライマーセットを選定した。PCR は puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (GE Healthcare) を用い、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) で行った。

## C. 研究結果：

### 1. 理化学分析

DNA 塩基組成測定では、G+C 含量が約 35% であり、*Capnocytophaga* 属の特徴(34~44%)と一致した(表 3-1)。

HP40001 株を代表株として行った、菌種の分類において最も決定的な指標となる DNA-DNA ハイブリッド形成試験の結果は、同一菌種の基準となる相同値 70% 以上に対して、対 *C. canimorsus* 基準株で相同値 12~15%、対 *C. cynodegmi* 基準株で相同値 12~13% という結果であり、HP40001 株は新菌種であると判断された (表 3-2)。

## 2. 遺伝子解析

2011 年にネコ搔傷敗血症例から分離された菌株 (HP40001) および本年度、*C. canimorsus* 感染疑いの敗血症例 2 例 (うち死亡 1 例) から分離された 2 株 (HP20001、HP33001 の計 3 株は、*C. canimorsus* 基準株に対して 16S rRNA で 96.9~97.0%、*gyrB* 遺伝子で 75.5~75.6% と低い相同値を示し、またデータベース上には *C. canimorsus* および *C. cynodegmi* よりも類似した配列が存在しなかった (表 4-1)。一方、この 3 株同士は 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子ともに塩基配列の相同値が 99% 以上であり、系統解析の結果、この 3 菌株は同一菌種であり、かつ *Capnocytophaga* 属の新菌種である可能性が高いと判断された (表 4-2、図 1-1、1-2)。全ゲノム解析を行った結果、HP20001 株ではコンティグ数 245、平均コンティグサイズ 11.0kb、N50 (コンティグ長の加重平均) = 18.5kb、HP33001 株ではコンティグ数 572、平均コンティグサイズ 4.8kb、N50 = 7.3kb、HP40001 株ではコンティグ数 2140、平均コンティグサイズ 1.1kbp、N50 = 1.7kb のドラフトゲノムデータが得られた (表 5-1)。リファレンスとして *C. canimorsus* Ce5 株の完全ゲノム情報を用いリードマッピングを行ったところ、同一条件設定で *C. canimorsus* 基準株 ATCC35979 が約 61% のマップ率だったの

に対して、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株は 17~24% のマップ率と低く、これは *C. cynodegmi* 基準株 ATCC49044 株の約 22% と同程度で、*Capnocytophaga* 属菌 3 株は *C. canimorsus* とはゲノムレベルで他菌種相当の差異があることが示唆された (表 5-2、図 2-1)。

各コンティグに対するアノテーションでは、*C. canimorsus* が保有し病原性に関わるとされるノイラミニダーゼや、宿主体内での鉄獲得に関わる因子など、新規 *Capnocytophaga* 属菌の病原性に関わる可能性のある遺伝子が同定された。

## 3. 生理・生化学的性状試験

*Capnocytophaga* 既存菌種と同様、二酸化炭素要求性で、大気中濃度の CO<sub>2</sub> では全く生育せず、5% CO<sub>2</sub> 存在下では良好に生育した。

オキシダーゼおよびカタラーゼ試験はともに陽性で、イヌ・ネコが保菌する *C. canimorsus* および *C. cynodegmi* と同様の性質を示した (これに対してヒト保有の 6 菌種はいずれも陰性)。各試験項目における 3 株間の差異は HP20001 株がマルトース分解陽性を示した点のみで、生化学的性状は 3 株ともほぼ一致した (表 6)。

*C. canimorsus* との鑑別点としては、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株がいずれも -グルタミルアミノペプチダーゼ陽性であったのに対し、*C. canimorsus* は基準株および国内臨床分離株 28 株はいずれも陰性であり、病院検査室で実施できる同定試験における鑑別点と考えられた。

## 4. PCR による新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的検出法の確立

16S rRNA 遺伝子をターゲットとした検出では、プライマー F1 と R2 のセットが、*gyrB* 遺伝子をターゲットとした検出

では F2 と R2 のセットが、特異性、感度においてそれぞれ最も良好な結果を示した。両プライマーセットを用いた PCR では、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株はいずれも陽性となり（図 3-1）、最も近縁な *C. canimorsus* および *C. cynodegmi* を含む既存菌種はいずれも陰性となった（図 3-2）。

#### D. 考察：

*C. canimorsus* 感染症について調査を継続する中で情報の得られた、1 例の死亡例を含む 3 例の *C. canimorsus* 感染疑いの敗血症例から分離された菌株は、既知の *Capnocytophaga* のいずれの菌種とも異なるプロファイルを有しており、新菌種であることが示唆されたことから、本研究において詳細な解析を実施した。

分類学上の新菌種を提唱するためには、所定の性状解析が必要であるため、DNA-DNA ハイブリッド形成試験や生理・生化学的性状解析等の各種の詳細な解析を実施した。その結果、これら 3 株を同一の新菌種として正式な提唱するために十分なデータが得られた。

ゲノム解析では、新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株のドラフトゲノムを作成することができた。*Capnocytophaga* 属菌はリファレンスに利用できるデータが乏しく、まだこれから既存菌種を含めて多くの菌株のゲノムデータを蓄積して将来的な詳細な解析の土台を作る段階であるが、今回の解析で、鉄獲得性因子など病原性因子を含む遺伝子の同定がある程度できたことで、今後、発症メカニズムの解析に利用できるデータが得られた。

新規 *Capnocytophaga* 属菌 3 株は、検査時に *C. canimorsus* 検出系では 16S rRNA 遺伝子検出 PCR 陽性、*gyrB* 遺伝子検出 PCR 陰性となるため、既知の *C.*

*canimorsus* と PCR の検査結果に差は認められるが、新規 *Capnocytophaga* 属菌特異的に陽性を検出する PCR 検査系を確立する必要性から、今回の解析によって得られたデータを元に 16S rRNA および *gyrB* 遺伝子をターゲットとしたプライマーを設計することにより、新規 *Capnocytophaga* 属菌両遺伝子のみを特異的に検出する PCR 法による鑑別診断系が確立された。

今後の課題としては、現在 3 例のみが把握されている新規 *Capnocytophaga* 属菌による患者発生状況を継続的に調査し、実態を解明することをはじめ、これまでの 3 症例には、いずれもネコ咬傷歴やイヌとの接触歴があり、イヌ・ネコから感染したことが推測されたものの、直接的証拠はないことから、イヌ・ネコの保菌状況について、調査することがまず必要と考えられる。

これらの調査には、今回確立した PCR による鑑別診断法が極めて有用となる。さらには、今回解析した菌株のゲノム情報を元にした病原遺伝子の検索や発症メカニズムの解析、また臨床分離株を収集して薬剤感受性試験や生化学的性状試験を実施し、抗菌薬の選択や検査室の菌種同定システムへの情報提供を行うなど診断・治療に貢献できる可能性のある課題が多くある。

また、新規 *Capnocytophaga* 属菌は日常生活に身近なイヌ・ネコが保菌していることが推測されることから、医療関係者のみならず、一般市民に対しても、積極的なアウトリーチ活動を通じて情報の周知を図っていくことが重要と考えられる。

#### E. 結論

いずれも重症の敗血症例から分離された、新菌種と考えられる *Capnocytophaga*



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	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)

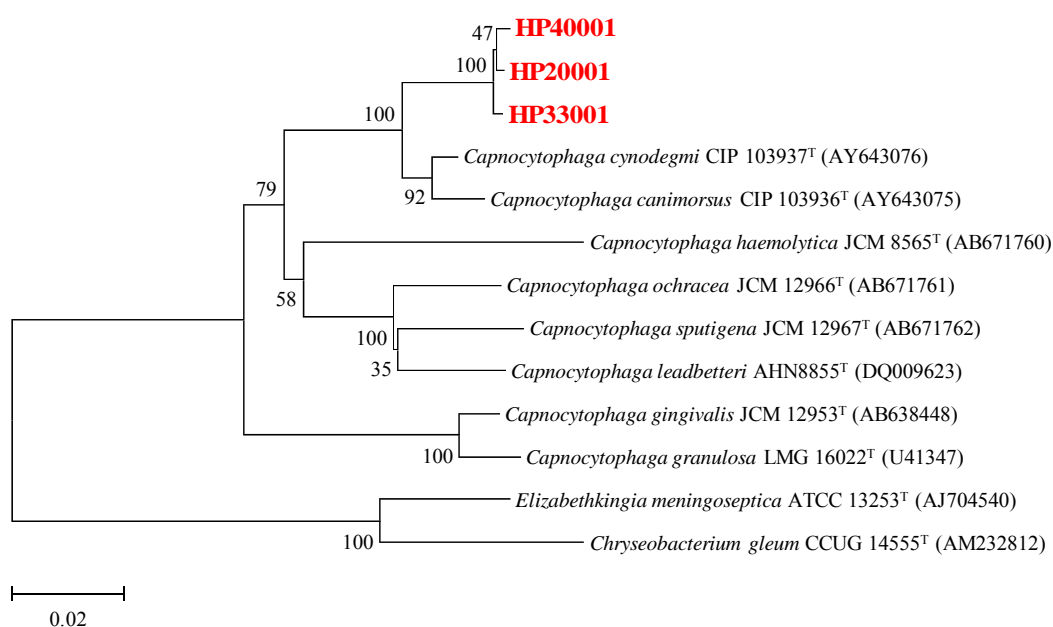


図 1-2. gyrB 遺伝子配列に基づく分子系統樹 (NJ 法)

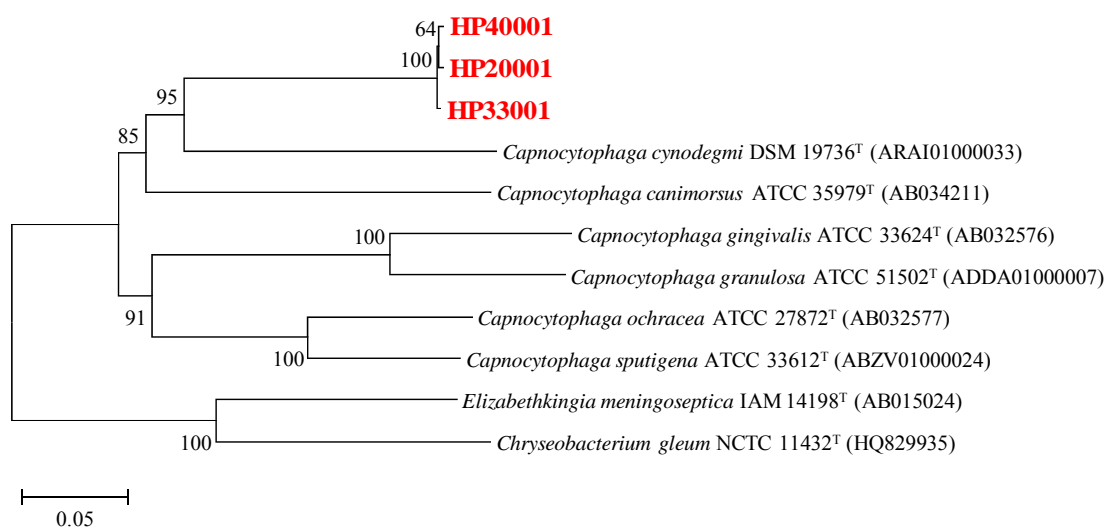


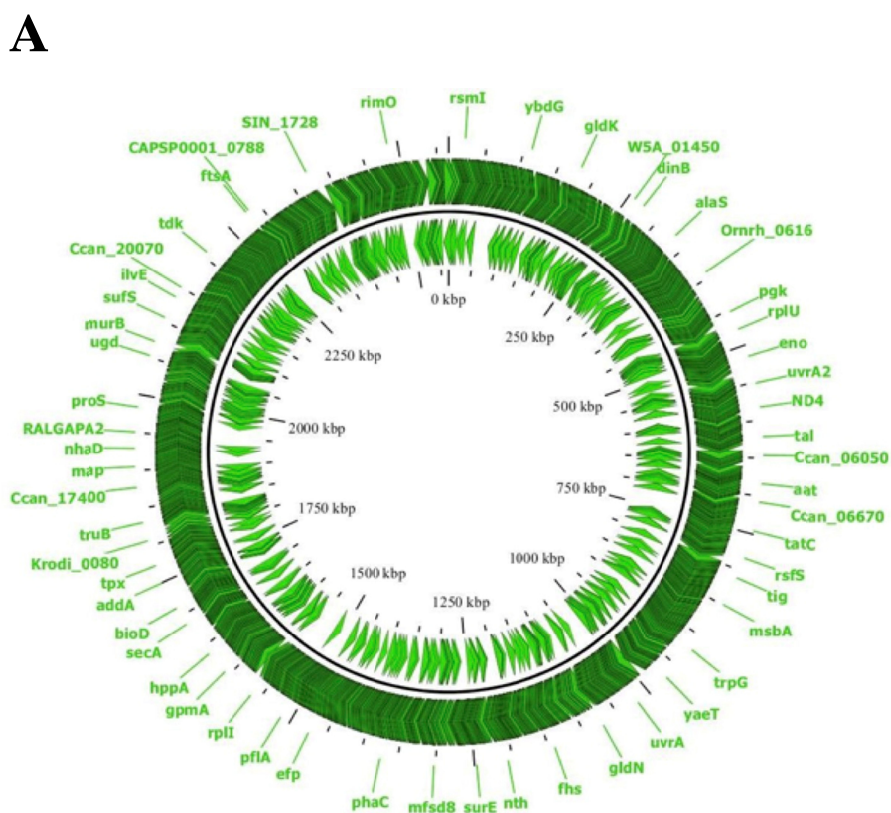
表5 - 1. 新規 *Capnocytophaga* 属菌ドラフトゲノムのプロフィール

	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)



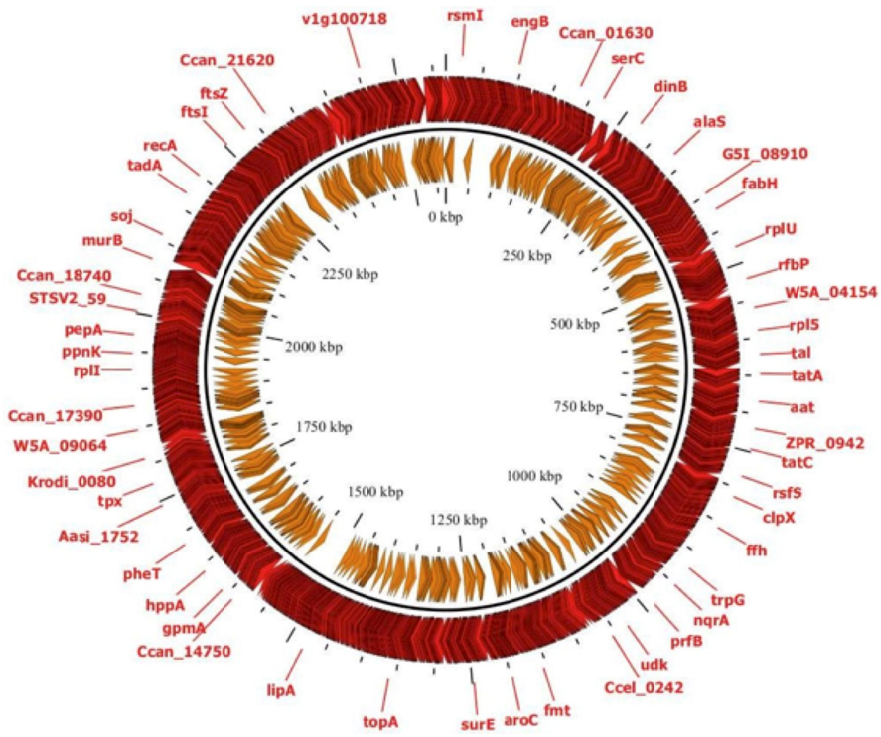
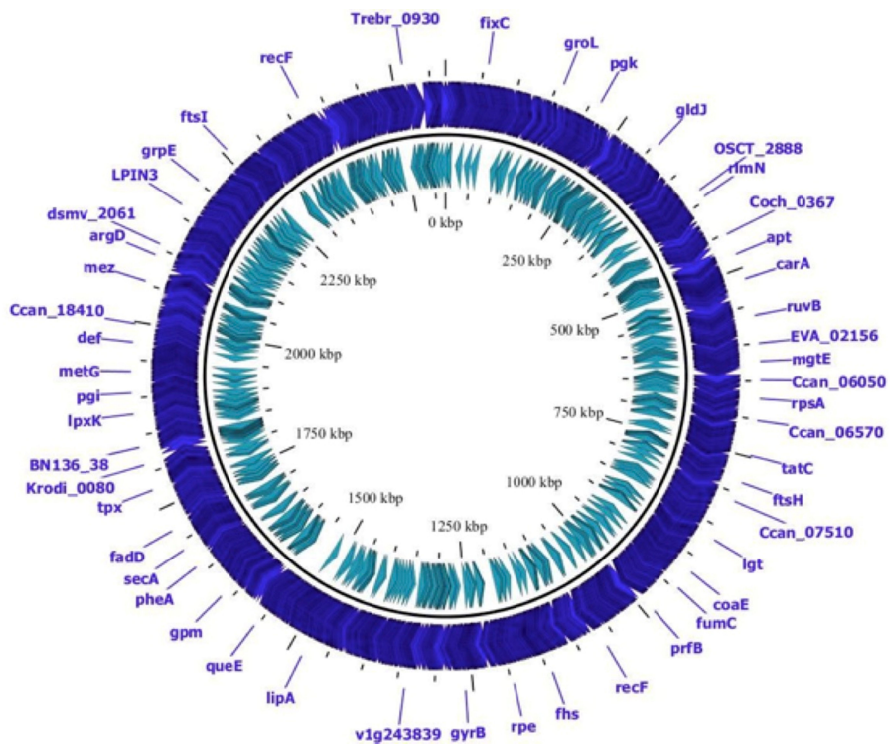
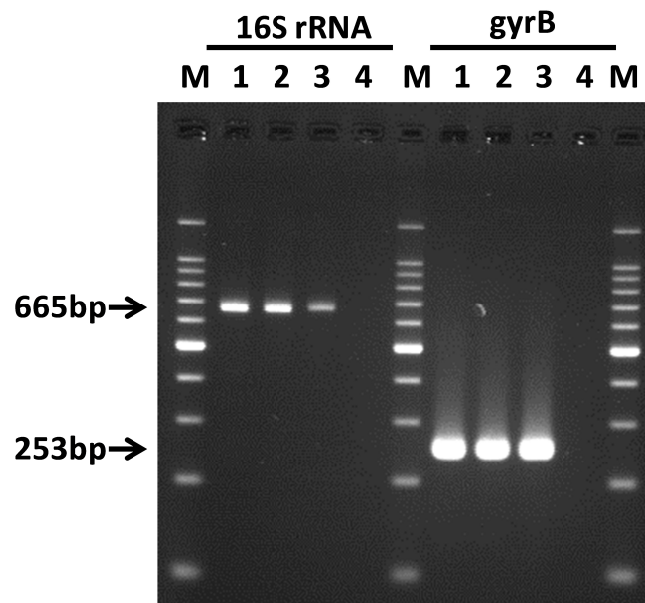
**B****C**

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	+	+	+
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

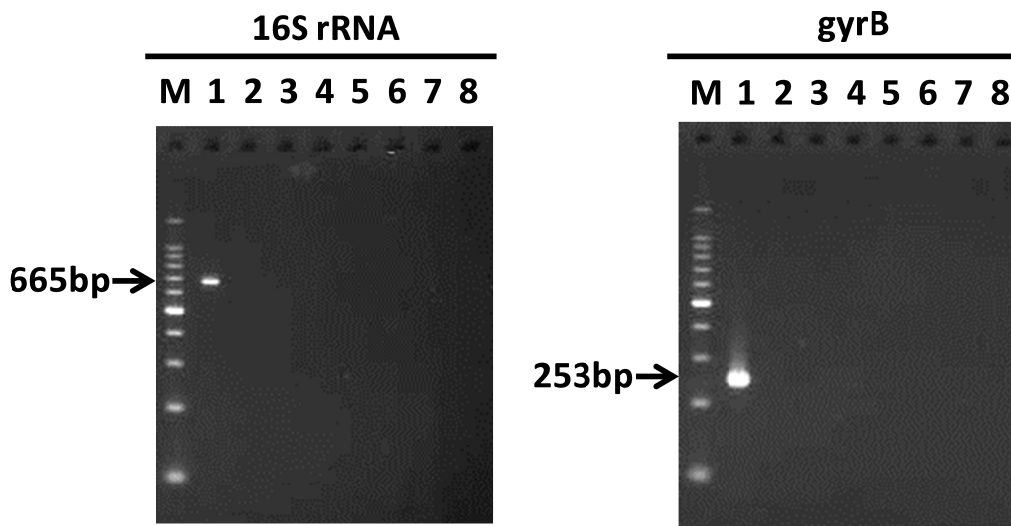
1: HP20001株

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）

## 野兔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：野兔病菌 (*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、野兔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兔病菌 *pdpC* 遺伝子破壊株 (*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 週間後に野兔病菌強毒株 (SCHU P9 株) を接種したところ 4 日目に野兔病を発症し、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 *pdpC* 株を接種しても発症はしなかった。そこで、*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 頭が非致死性の野兔病を発症したが、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 *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 *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。マウスは野兔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、野兔病菌 *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：

野兔病菌 (*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。

野兔病菌に感染した野兔病患者は、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、和歌山県が

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。

野兔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、日本では野兎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、野兎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 ( $\Delta$ 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  $\Delta$ 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、本申請では野兎病菌  $\Delta$ 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：

### 野兎病菌株

野兎病菌強毒株 (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、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保管した。野兎病菌 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 pdpC 株も上記と同様に使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  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 の野兎病菌 pdpC 株を皮下接種にて免疫し、その3週間後に  $1 \times 10^6$  CFU/1 mL の野兎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、 $1 \times 10^6$  CFU/1 mL の野兎病菌 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、野兎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  $\mu\text{L}$  の野兎病菌 pdpC 株又は対照として生理的食塩水を皮下接種し、その3週間後に野兎病菌強毒株を  $100 \text{ LD}_{50}$  ( $= 5 \times 10^3$  CFU/10  $\mu\text{L}$ ) 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兎病菌の病原性確認試験

これまでに、野兎病菌強毒株および 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 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こと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)。脾臓漿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、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 pdpC 株のワクチン効果

2頭のカニクイザルの鼠蹊部に 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、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 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 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、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 週間生存した(図 3)。この実験条件下において、マウスに対する 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 (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 (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 1B 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。pdpC 株で免疫したカニクイザルは 3 週間生存したが、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 1A)。この結果から、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 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 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

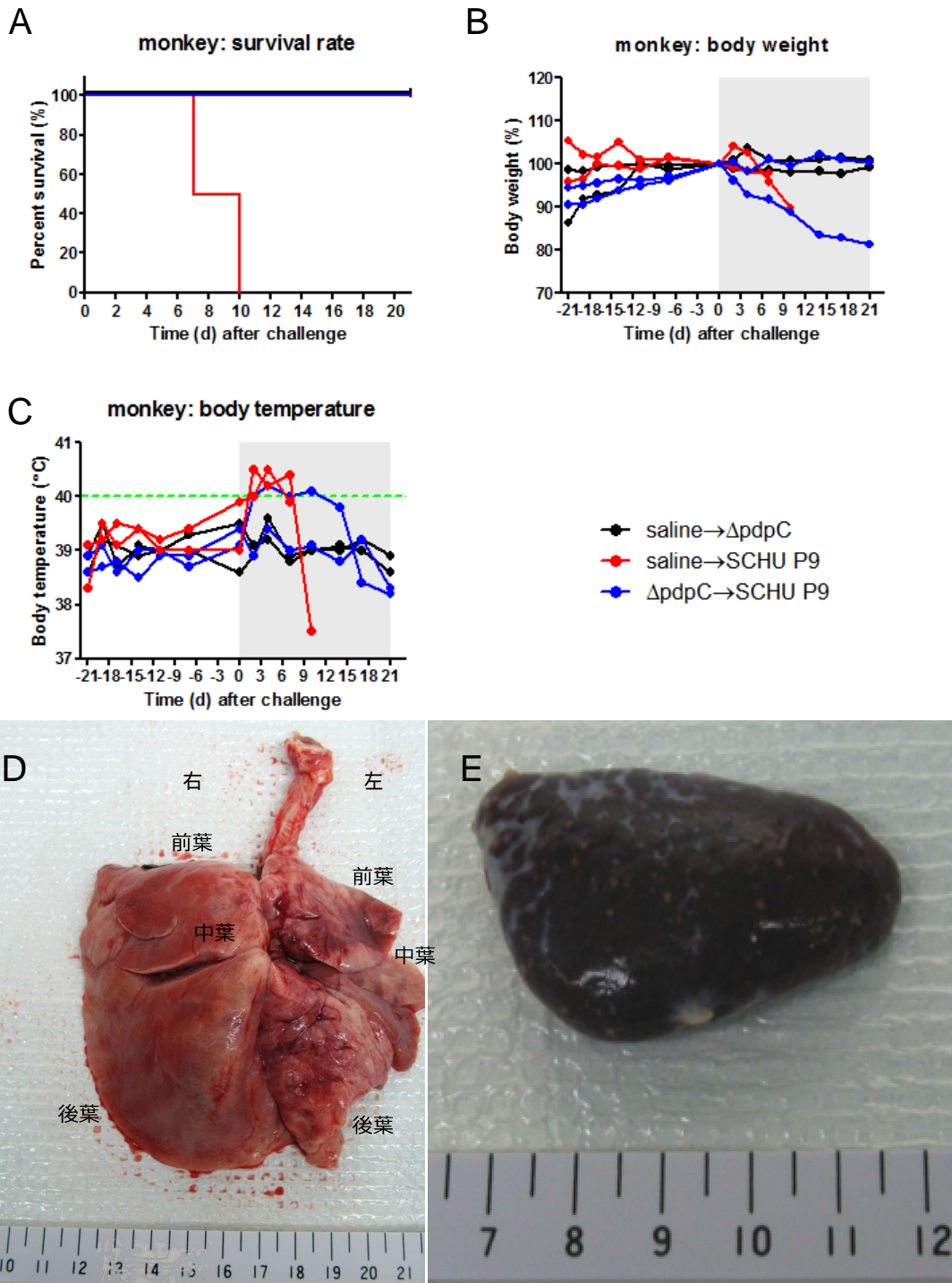


図1. カニクイザルにおける野兎病菌の病原性とワクチン効果 (A-C) 野兎病菌 pdpC株で免疫 (42d強) し、致死的な量の毒株接種 (率0d) したカニクイザルの生存率 (A)、体重変動 (B)、および直腸体温 (C) を示した (青線 食対照と接着生食種野兎病菌強毒株 (赤赤線) または pdpC株 (黒線) を接種したカニクイザルの動向も示後)。(D-E) 生食種強毒株接種による野兎病を発症したカニクイザル (Animal No. A4) の肺および脾臓の写真を示す。

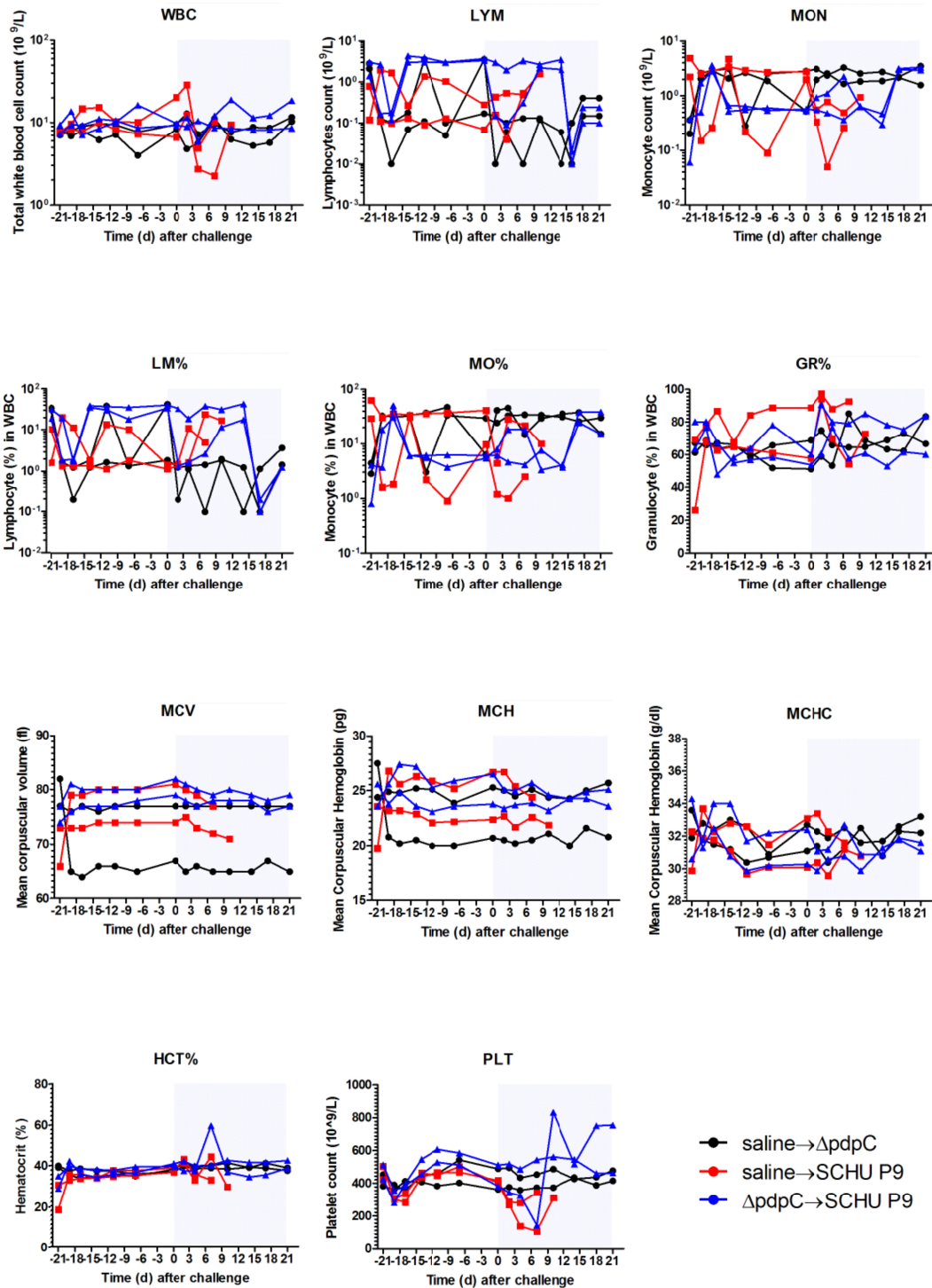


図2. カニクイザルにおける野兎病菌接種後の血液学的変動。野兎病菌ΔpdpC株で免疫(-21d)し、致死的な量の強毒株接種(0d)したカニクイザルにおける抹消血中の白血球数(WBC)、リンパ球数(LYM)、単球(MON)、リンパ球の割合(LM%)、単球の割合(MO%)、顆粒球の割合(GR%)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、ヘマトクリット(HCT%)、血小板数(PLT)を示した(青線)。対照として生食接種後野兎病菌強毒株(赤線)またはΔpdpC株(黒線)を接種したカニクイザルの動向も示した。

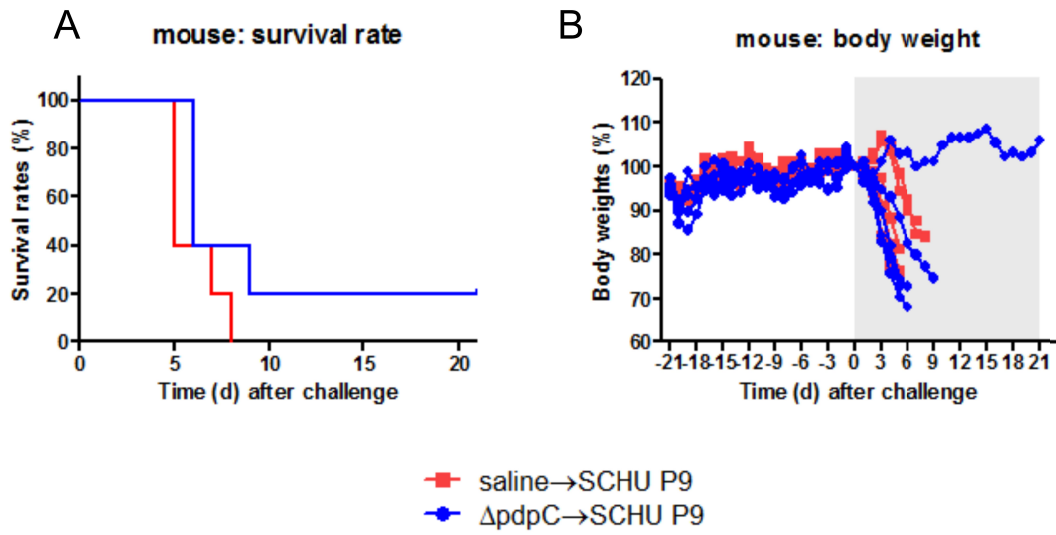


図3. マウスに対する野兔病菌の病原性とワクチン効果。野兔病菌 $\Delta dpC$ 株で免疫し、致死的な量の強毒株接種したマウスの生存率 (A) および体重変動 (B) を示した (青線)。対照として生食接種後野兔病菌強毒株 (赤線) を接種したマウスの動向も示した。