

## 次世代型豚丹毒ワクチンの将来展望

農水省家畜衛生試験場 製剤研究部 下地 善弘

### 1. はじめに

豚丹毒は豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) の感染によって起こる豚の伝染病で、養豚界に多大な被害を及ぼす。現在、豚丹毒ワクチンは生菌または死菌ワクチンが世界各国で広く実用化されているが、これまでわが国ではアクリフラビン耐性弱毒株をワクチン株とした生ワクチンのみが用いられてきた。この株はアクリフラビンを添加した培地で継代することにより弱毒化させた変異株で、その弱毒化のメカニズムは不明である。生ワクチン株の作出法として、ある条件下で培養・継代して弱毒化した変異株をワクチン株として用いる方法がこれまでの主流であったが、このようにして作出された生菌ワクチンには病原性の復帰という懸念があり、これが生菌ワクチンの大きな問題点であった。このため、これからの生ワクチンの開発には目的とする菌の病原性を分子レベルで解析し、病気を起こす役割を担っている遺伝子あるいは抗原を同定することが必要で、さらに、その遺伝子を不活化し病気を起こさない弱毒菌を作製する必要がある。また、使用される生ワクチン株は野外株と識別できることが望ましく、この場合、目印となるマーカーが必要となってくる。

筆者は、これまで遺伝学的手法を用いて豚丹毒菌の病原因子の解析を行ってきた。その結果、本菌の強毒株は莢膜という物質を菌体表層に保有しており、そのことで白血球の貪食作用から逃れる

ことを初めて明らかにした。<sup>1)</sup> また、強毒株は白血球に貪食されたとしても白血球の細胞内で増殖することが判明し、それにも莢膜が深く関与することが明らかになった。<sup>2)</sup> さらに、莢膜の生合成に関わる遺伝子を見つけだし、その遺伝子を破壊して強毒株から弱毒変異株を作製することに成功した。<sup>3)</sup> この株を使った感染防御試験の結果、この株は免疫したマウスに強い感染防御能を与えることが明らかになり、豚丹毒の新しい生ワクチン株としての可能性が示唆されている。この株は病原遺伝子の変異しており病原性が復帰する可能性がほとんど考えられないこと、また生ワクチンに必要な遺伝子マーカーを保有しており野外株との識別が容易であることから、生ワクチンの候補株として有力である。本稿では豚丹毒の病原性に莢膜がどのように関わっているか概説する。また、莢膜欠損株の生ワクチン株としての可能性について、これまでの筆者の研究成績について紹介するとともに豚丹毒ワクチンの将来展望について述べる。

### 2. トランスポゾンを使った病原因子の解析

トランスポゾン Tn916はテトラサイクリン耐性を持つ転移遺伝子で、異種細菌の染色体間を自由に移動することができる。このため、Tn916がある細菌の染色体から別の細菌の染色体に移動すると、その細菌はあらたにテトラサイクリン耐性の性質を示すようになるが、同時に Tn916が

挿入した場所はその領域の遺伝子が破壊されるため、その菌は遺伝子変異菌となる。これらの変異菌は、Tn916の挿入によって変異が起こった遺伝子以外はもとの菌と遺伝学的に全く同じであること、また破壊された遺伝子はTn916を目印として比較的容易に見つけだすことができることから病原因子の解析に非常に有用な道具になる。そこで、Tn916を利用して豚丹毒菌の強毒株から弱毒変異株を作製し、その両菌株の性状を比較することでこの菌の病原因子の解析を行った。まず最初にTn916を染色体上に保有する腸球菌CG110株から豚丹毒菌強毒株のFujisawa-SmR株に接合伝達によりTn916を転移させ、約6,000株の変異株を作製した。菌体の表層構造物に変化することで培地上のコロニー形態が変化することはよく知られており、その表層構造物一つに莢膜がある。そこで、豚丹毒菌の病原因子が莢膜である可能性を考え、得られた変異株約6,000株の中から親株のFujisawa-SmR株と培地上のコロニー形態が異なった数個の変異株を分離し、それらのマウスにおける病原性を解析した。実験の結果、コロニー形態が異なったこれらの変異株はいずれもマウスに対して全く病原性がないことが判明した。さらに、変異株の一つ33H6株の染色体からTn916が脱落してコロニー形態がもとの復帰した株(33H6-R株)は親株と同様にマウスに対して強い病原性を持つことも判明した。このことは、コロニー形態の変化は、ある遺伝子領域におけるTn916の挿入が原因であること、また、33H6株においてTn916が挿入して破壊された遺伝子はこの菌の病原性に関係する遺伝子であることを示している。さらに、電子顕微鏡を使った菌体表層の解析の結果から、親株と33H6-R株は菌

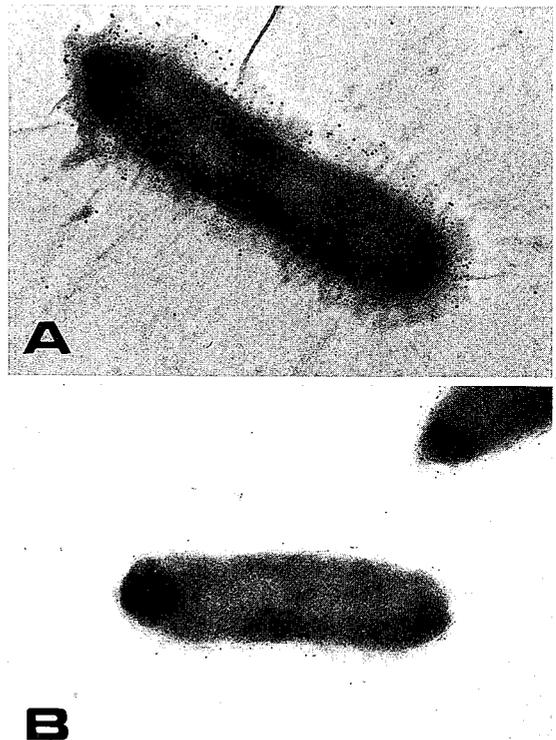


図1 金コロイド粒子標識法を用いた豚丹毒菌(Fujisawa-SmR株)の菌体表層に存在する莢膜の免疫電顕像

A: Fujisawa-SmR株(強毒株)

B: 33H6株(弱毒株)

体表層に厚い莢膜様の物質を保有している(図1)が、コロニー形態が異なった変異株はいずれもその物質を欠失していることが確認された。

### 3. 無莢膜変異株の食食抵抗能と食細胞内生残能

莢膜は白血球の認識を逃れて食食作用に抵抗する重要な病原因子である。そこで、弱毒化した変異株がこの性質を欠失しているかどうか確認するため、マウスの好中球(白血球の一種)を使って菌の食食能試験を行った。その結果、正常血清存在下で親株と33H6-R株は強い食食抵抗能を示し



図2 マウス好中球による豚丹毒菌の食食  
A: Fujisawa-SmR 株 (強毒株)  
B: 33H 6 株 (弱毒株)

A では食食された菌はほとんど見られないが、  
B では多くの菌が食食されている像がみられる。

たが、弱毒変異株はいずれも食食されたことが判明した (図2)。この実験成績から、豚丹毒菌は莢膜を保有しておりそれによる食食抵抗能がこの菌の病原性として重要であることが証明された。<sup>1)</sup>

ところで、本菌の病原性には食細胞 (白血球) 内生残能が示唆されてきた。そこで莢膜がこの性質に関与するかどうか確認するため、親株と無莢膜変異株とでマウスのマクロファージ (白血球の一種) 内生残能を比較した。その結果、正常血清存在下で食食された親株は食食後3時間目には食食直後の約2倍の細胞内生菌数を示し、この菌は

マクロファージ内で増殖することが判明した。一方食食された無莢膜変異株はいずれも食食直後からその細胞内生菌数は減少しつづけて3時間目にはその数は有意に減少したことから、無莢膜変異株は細胞内で生残できないことが判明した。さらに、正常血清存在下における強毒株のマクロファージ内生残機構の解析を行った。その結果、マクロファージに食食された無莢膜変異株は食細胞の殺菌機構の一つである活性酸素を強く誘導して殺菌されるが、強毒株は活性酸素を誘導せずマクロファージによる殺菌から逃れることが明らかになった。<sup>2)</sup> このように、本菌の病原性の一つである食細胞内生残能にも莢膜が深く関与することが明らかになり、豚丹毒菌の病原因子として莢膜は非常に重要であることが判明した。

#### 4. 無莢膜変異株の生ワクチン株としての可能性

無莢膜変異株の生ワクチン株としての可能性を検討するため、Tn916の挿入により得られた無莢膜変異株の一つ33H 6株を使ってマウスおよび無菌豚における免疫試験を行った。その結果、この株はマウスおよび無菌豚に対して全く病原性を示さず、また強毒株の攻撃に対してもほぼ完璧な防御効果を示すことが判明した。そこで、新しいワクチン株を作製することを目的に、33H 6株においてTn916の挿入により破壊された遺伝子を同定してクローニングし、その解析を行った。その結果、その破壊された遺伝子は他の菌の莢膜の生合成に関係する糖転移酵素遺伝子と構造およびその塩基配列に類似する点が多く、その遺伝子もまた莢膜形成の過程において糖転移酵素として機能することが強く示唆された (未発表データ)。さらに、この遺伝子が変異し病原性が復帰するこ

とのない新しいワクチン候補株を作製し、この菌の病原性を確認した。実験の結果、この株はマウスに対し全く病原性を示さないこと、また、この株を使った免疫試験の結果では、この株は豚丹毒の感染防御に重要な防御抗体を誘導するばかりでなく、細胞性免疫を誘導することが明らかとなった。<sup>3)</sup> この株は遺伝学的には33H 6株と全く変わらないことから、無菌豚に対して病原性を示さず、また強毒株の攻撃に対しても防御効果を示すことが予想される。また、この株と野外株とを区別するため変異した遺伝子領域をもとに設計したプライマーを用いてPCR法を行ったところ、この株は実験に使用した野外株すべての識別が可能であったことから、生ワクチンに必要なマーカーがPCR法により簡単に検出できることが示された。

##### 5. 次世代型豚丹毒ワクチンの将来展望

豚丹毒に対するワクチンにはこれまでの生ワクチンの他に、新たに海外から輸入・販売される死菌ワクチンがある。生菌ワクチンの特徴として、死菌ワクチンに比べて免疫持続期間が長く強固であり、一回の免疫で有効な感染防御能を誘導できることがあげられる。しかしながら、感染防御に抗体が重要な役割をする豚丹毒のような感染症において母親から移行抗体を受け継いだ哺乳豚ではそのワクチン効果がみられない場合が多い。一方、死菌ワクチンにはその安全性や移行抗体を持った哺乳豚でも使用できることなど、生菌ワクチンにはない利点もあるが、一回の免疫で十分なワクチン効果を期待できないという欠点もある。このように、いずれのワクチンにもそれぞれ問題点があり、両者の利点のみを合わせ持った完璧なワ

クチンの開発は今後の研究課題である。

ところで、これまで欧米を中心にサルモネラ菌などの遺伝子組み替え弱毒菌をベクターとした多価ワクチンの開発研究が盛んに行われている。これは生ワクチン株の染色体DNAやプラスミドDNAに他の病原体の遺伝子を組み込み、このワクチン株に他の病原体の感染防御に重要な抗原を発現させて免疫するという方法で、一回のワクチン投与で複数の疾病に対し免疫することをねらったものである。この方法は、経済性が問題となる畜産分野におけるワクチン法としては非常に有望な方法であるが、これには安全かつ十分な感染防御を与えることのできる生ワクチン株の開発が必須である。この点、今回紹介した豚丹毒菌の無莢膜変異株は動物に対して極めて安全であること、また、サルモネラ菌と同様に細胞性免疫を誘導できる菌であること、さらに、豚丹毒菌は経口投与型ワクチンとしても使用することが可能であることを考え合わせると、この株は経口投与型の多価ワクチンベクターの候補株として魅力ある研究材料である。現在、筆者は無莢膜変異株の菌体表面に他の病原体の抗原を発現させるための研究を行っており、将来この株をワクチンベクターとして用いることを検討中である。

##### 参考資料

- 1) Shimoji, Y. et al. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. *Infect. Immun.* 62: 2806-2810 (1994)
- 2) Shimoji, Y. et al. Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of in-

duction of the oxidative burst of macrophages. Infect. Immun. 64: 1789-1793 (1996)  
3) Shimoji, Y, et al. Construction and vaccine potential of acapsular mutants of *Erysipe-*

*lothrix rhusiopathiae*: use of excision of Tn 916 to inactivate a target gene. Infect. Immun. 66: 印刷中 (1998)

ブタ・ア・ラ・カルト



メコンデルタ北部でイ一種と呼ばれているブタ

(写真提供: 吉原 忍 氏)