

博士論文

豚丹毒菌変異株の流行と病原性調査に関する研究

(Research for outbreaks and virulence of
Erysipelothrix rhusiopathiae variant in swine)

2023 年 4 月

森元 美紗子

<論文要旨>

豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) はグラム陽性の桿菌である。豚に主たる病原性を示し、世界中の養豚業界において経済的損失を与える重要な人獣共通感染症であり、わが国では届出伝染病に指定されている。豚における豚丹毒の症状は主に3つに分類され、急性・亜急性・慢性症状がある。急性症状では敗血症による突然死、亜急性症状では発熱や食欲不振に加えて最も特徴的とされる蕁麻疹（ダイヤモンド・スキン）の出現、慢性症状では関節炎、リンパ節炎および心内膜炎などを引き起こし、その症状は多岐に渡る。疾病対策には他の疾病との類症鑑別が重要となる。豚丹毒菌の菌体表層に発現する Spa (Surface protective antigen) A タンパク質は、感染防御ならびに病原性に関わる抗原として、多くの研究が報告されている。

日本における豚丹毒菌の発生は1970年代に生ワクチンが普及してから減少しているものの、未だに年間2000頭前後の発生があり、養豚業界において決して無視できない疾病である。特に2008年から20011年にかけては血清型1aの SpaA タンパク質の203位と257位のアミノ酸がそれぞれメチオニンとイソロイシンに変化した M203/I257-SpaA 変異株が新たな変異株として流行した。この他にも、少数ながら同じ血清型1aにおける SpaA タンパク質の203位と242位のアミノ酸が、それぞれメチオニンとアラニンに置換した M203/A242-SpaA 変異株および203位のアミノ酸のみがメチオニンに置換した M203-SpaA 変異株も発見された。このように、これまで分離されてこなかった豚丹毒菌血清型1aの SpaA 変異株の台頭が近年では見受けられている。

これらの背景をふまえ、本研究は2008年から2011年の調査で初めて見つかった豚丹毒菌 SpaA 変異株のその後の動向および2012年以降、我が国で流行している株の病原性について検討した。本研究は3章から構成される。野外サンプル調査、血清型別、SpaA 変異株と血清型別の細菌学的特性調査並びにマウス及び豚での病原性調査、不活化ワクチンの豚丹毒菌 SpaA 変異株に対する豚での有効性を中心に検討し、以下のような成果を得た。

第一章：2012 年から 2019 年に分離した豚丹毒菌株を中心に血清型、*SpaA* 遺伝子の表現型を調査し、*SpaA* 変異株の国内分離状況および、マウスにおける病原性を検討した。

2012 年から 2019 年に日本各地から集めた 79 株の豚丹毒菌の血清型、*SpaA* 遺伝子塩基配列の変異部分の解析および Lineage 型別を行った。調査した 79 株のうち、59 株が血清型 1a に属しており、その 59 株のうち 56 株が 2008 年から 2011 年の調査で初めて見つかった株と同じ血清型 1a の M203/I257-*SpaA* 変異株であった。2012 年以降も血清型 1a の M203/I257-*SpaA* 変異株の流行の継続が明らかとなった。さらには、血清型 1a の M203/I257-*SpaA* 変異株の Lineage 型別をすると、これまで主に九州地域（LineageIVb-1）と本州地域（LineageIVb-2）で分離した株が、2012 年以降では日本全国に分布し、地域性が消失していることが確認できた。また、マウスを用いた病原性確認試験において血清型 1a の M203/I257-*SpaA* 変異株は血清型 2a の株と比較して病原性が強いことが示唆された。一方、同じ血清型 1a で病原性比較対照株である藤沢株と M203/I257-*SpaA* 変異株においては大きな病原性の違いはないことが明らかとなった。これらの結果より、わが国における 2012 年以降の豚丹毒菌の流行は豚丹毒菌の *SpaA* 遺伝子の塩基配列に新たな変異が挿入された株などによるものではなく、2008 年から引き続いて血清型 1a の M203/I257-*SpaA* 変異株の地域性が混在し、流行が拡大していることが明らかとなった。また血清型 1a の M203/I257-*SpaA* 変異株はマウスを用いた病原性試験では藤沢株と同様な病原性を示す強毒株であることが判明した。

第二章：2012 年以降の分離株から血清型 1a の M203/I257-*SpaA* 変異株を 2 株、血清型 1b、2a 株をそれぞれ 1 株ずつ選択した合計 4 株を、病原性比較対照株として広く用いられている血清型 1a の藤沢株と *in vitro* の細菌学的特性および *in vivo* の病原性の違いを比較検討し、M203/I257-*SpaA* 変異株が国内で流行拡大を続ける原因を検索した。国内での分離数が少ない血清型 2a 株は血清型 1a 株と比較して *in vitro* での増殖性が低く、豚血管内皮細胞との細胞接着性が低く、マウスや豚における *in vivo* 病原性も低いことが明らかとな

った。豚を用いた動物試験では、病原性を臨床症状スコアで評価すると、血清型 1a 株と血清型 2a 株の間、血清型 1a 株と血清型 1b 株の間、さらには血清型 1b 株と血清型 2a 株の間においても病原性の臨床症状スコアに有意差が認められた。以上のことより、血清型 1a 株と 1b 株、2a 株の間に病原性の違いを見出すことが出来た。さらに血清型 1b 株と血清型 2a 株は第一章より分離数が少ないことも踏まえると、我が国で分離数が最も多い血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株は藤沢株同様に、豚へも強い病原性をもち、我が国に広く浸潤していることを裏付ける結果となった。

第三章では豚丹毒菌不活化ワクチンの血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株に対する豚での有効性を検討した。豚を 4 頭ずつ 4 つの群に振り分け、群 1 と群 3 に豚丹毒菌不活化ワクチン SER-ME(スワインテクト SER-ME、日生研株式会社)を投与し、群 2 と群 4 を非接種対照群とした。接種菌として群 1、2 に病原性比較対照株である血清型 1a の藤沢株を、群 3、4 に血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株（2012 年宮崎株）を用いた。非接種対照群である 2 つの群は菌接種後、臨床観察期間中に全頭が死亡した。一方でワクチンを投与した 2 つの群は臨床観察を示すことなく試験終了まで生存した。以上より、豚丹毒菌不活化ワクチンは豚で血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株に対しても従来株同等に有効であることを示した。従って、血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株の流行拡大の原因はワクチン投与後のブレイクスルー感染によるものではないことが示唆された。

以上の結果より、（１）血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株の流行拡大は現在も続いていること（２）最も流行している血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株はマウスや豚への病原性が強いこと（３）血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株の流行拡大の原因は豚での感染・防御試験によりワクチン投与後のブレイクスルー感染によるものではないことが明らかとなった。

豚丹毒菌は豚のみならず、家禽や多くの動物、自然環境から分離されている。今後は血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株が野生動物を含めた他の宿主や自然環境中に分布してい

る可能性などを考慮し、広範囲な調査を続けることが、豚の豚丹毒の予防と制御に必要であると思われる。本研究で得られた一連の知見が今後の養豚業界における豚丹毒菌制御の一助になれば幸いである。

本研究は以下の論文に公表している。

第一章：Morimoto M, Kato A, Kojima H, Akaike Y, Nogami K, Sasakawa C, Nagai S, To H. Serovars and SpaA Types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Isolated from Pigs in Japan from 2012 to 2019. Curr Microbiol. 2021 Jan;78(1):55-66. doi: 10.1007/s00284-020-02254-2. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33145611.

第二章：Morimoto M, Kato A, Akaike Y, Nogami K, Ono H, Furusawa T, Kojima H, Sasakawa C. Comparative study of the phenotype and virulence of recent serovar 1a, 1b, and 2a isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Japan. Vet Microbiol. 2022 Jul;270:109458. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109458. Epub 2022 May 12. PMID: 35623133.

第三章：Morimoto M, Kato A, Nogami K, Akaike Y, Furusawa T, Kojima H, Sasakawa C. The Swine Erysipelas Vaccine SER-ME Effectively Protects Pigs against Challenge with the *Erysipelothrix rhusiopathiae* M203/I257 SpaA-Type Variant. Vet Sci. 2022 Jul 26;9(8):382. doi: 10.3390/vetsci9080382. PMID: 35893775; PMCID: PMC9332197.

<Abstract>

Erysipelothrix rhusiopathiae, which causes swine erysipelas (SE), is a zoonotic bacterium that causes economic loss in pig farms. Infection with *E. rhusiopathiae* in pigs can be classified as acute, subacute, or chronic. The main acute sign is sudden death from sepsis or miscarriage. Subacute signs include fever and anorexia, as well as characteristic skin lesions, such as urticaria (diamond skin). Common chronic signs are arthritis, lymphadenitis, and endocarditis. It is important to distinguish *E. rhusiopathiae* from other diseases which causes similar clinical signs to control *E. rhusiopathiae*.

In the 1970s, the spread of live vaccines in Japan decreased the occurrence of SE but it still occurs in around 2000 pigs annually, which cannot be ignored in the pig farms. Especially during SE outbreaks that occurred sporadically from 2008 to 2011 in Japan, new *E. rhusiopathiae* strains were isolated with a specific surface protective antigen (Spa)A protein characterized by methionine at position 203 and isoleucine at position 257 (M203/I257-SpaA type).

Based on these backgrounds, we investigated the subsequent trend of the *E. rhusiopathiae* M203/I257-SpaA type, which was first discovered in the survey from 2008 to 2012, with the aim of clarifying the factors of the epidemic. This research paper consists of 3 chapters: investigation of field samples affected by *E. rhusiopathiae*, bacteriological characterization by serotypes of *E. rhusiopathiae*, pathogenicity investigations in mice and pigs, the efficacy of inactivated vaccines against *E. rhusiopathiae* in pigs and obtained the following results.

In the first chapter, we isolated 79 strains of *E. rhusiopathiae* from pigs in Japan between 2012 and 2019 and identified their serovars and SpaA types. Genetic lineages of some serovar 1a strains were also identified. The pathogenicity of

representative *E. rhusiopathiae* isolates in mice was also evaluated in comparison with the Fujisawa reference strain. Our epizootic investigation showed that serovar 1a was the most common serovar among the isolated strains (59/79) during the study period. None of the 59 serovar 1a strains had the SpaA type of the Fujisawa reference strain, while three strains were the I257-SpaA type and 56 strains were the M203/I257-SpaA type. This indicated that the M203/I257-SpaA type of *E. rhusiopathiae* was the prevalent strain in Japan, and that the outbreak of the M203/I257-SpaA type from 2008 to 2011 has continued until the time of this writing. Furthermore, the lineage IVb-1 and IVb-2 strains were isolated in the Kyushu and Honshu regions of Japan respectively, but the region-specific distribution of the *E. rhusiopathiae* lineages IVb-1 and IVb-2 were not clear in 2013, and both strains eventually co-circulated in Japan because they were isolated in the same prefecture in the same year. The disappearance thus seemed to occur within these few years from 2013 to 2019. In addition, the serovar 1a M203/I257-SpaA type of *E. rhusiopathiae* were more pathogenic than other serovars in the virulence confirmation test of using mice, and it was suggested that there is a high tendency to be isolated from acute symptoms pigs. On the other hand, no significant difference in virulence was found in a mice infection experiment with the Fujisawa reference strain which is the same serovar 1a. Based on these results, the epidemics of SE that have been observed in Japan in recent years are not due to strains in which a new mutation has been inserted into the base sequence of the *SpaA* gene of *E. rhusiopathiae*, and since in 2008, M203/I257-SpaA type of *E. rhusiopathiae* continues to infiltrate, and although it tends to be isolated from pigs with acute symptoms, its pathogenicity is not significantly different from that of the serovar 1a Fujisawa reference strain, at least in mice.

In the second chapter, to find the reason why the M203/I257-SpaA type of *E. rhusiopathiae* is currently the major causative agent in outbreaks, four recent *E. rhusiopathiae* isolates comprising of two serovar 1a with M203/I257-SpaA type strains, one serovar 1b strain, and one serovar 2a strain were compared with each other and with the serovar 1a Fujisawa reference strain regarding *in vitro* phenotypes and *in vivo* virulence in mice and pigs. The serovar 1b and 2a strains, which are the less prevalent strains in the field in Japan, showed lower growth in liquid culture and lower virulence in animals than the serovar 1a variants. Adhesion of the serovar 2a strain to porcine endothelial cells was weaker than that of the serovar 1a and 1b strains. Several advantages of serovar 1a strains were found, but no plausible cause of the M203/I257-SpaA type variants to be selected for the most prevalent strains among serovar 1a strains was identified in this study. Other feasible phenotypic assay such as the antimicrobial susceptibility test, or the studies on phagocytosis resistance and intracellular persistence may resolve this issue. We think these approaches as the further study and will continue this research from the viewpoints of antigenicity and vaccine-induced immunity as the next step.

In the third chapter, we used SER-ME containing *E. rhusiopathiae* Tama-96 (serovar 2a) as a representative of current inactivated vaccines to investigate whether it was effective for protecting pigs against infection with the Fujisawa reference strain or the M203/I257-SpaA type variant. Sixteen pigs were used in this study. Half of pigs (8/16) were vaccinated, and the rest were unvaccinated and used as control. Challenge tests were performed using the Fujisawa reference strain or the M203/I257-SpaA type 2012 Miyazaki variant, both of which belong to serovar 1a of *E. rhusiopathiae*. Vaccinated pigs in groups 1 and 3 showed no apparent clinical signs regardless of the *E.*

rhusiopathiae strain used during the challenge, indicating that vaccination protected pigs not only from the Fujisawa reference strain but also from the newly emerged M203/I257-SpaA type 2012 Miyazaki variant. However, all the unvaccinated pigs in group 2 and 4 developed SE. In group 2, two of the four pigs died (including the humane endpoint, the same shall apply hereafter) on the third day after Fujisawa strain challenge, one pig died on the fourth day, and the remaining pig died on the ninth day. In group 4, all four pigs died on the third day after challenge. The sum of the clinical scores were not significantly different ($p < 0.01$) between unvaccinated pigs challenged with the Fujisawa strain (group 2) versus the Miyazaki variant (group 4). Therefore, it was clarified that the cause of the domestic epidemic of M203/I257-SpaA type of *E. rhusiopathiae* was not caused by the vaccine failure.

Summarizing these results, we indicated three conclusions. First: the epidemic of M203/I257-SpaA type of *E. rhusiopathiae* continues to dominate of the isolates in Japan, Second: there was no significant difference of the growth in liquid culture, adherence of porcine endothelial cells, and the virulence in mice and pigs between M203/I257-SpaA type and Fujisawa reference strain, The third: current vaccines in Japan, including SER-ME, suggest that outbreaks in Japan are unlikely caused by vaccine failure. Since it remains unclear why the M203/I257-SpaA type variant of *E. rhusiopathiae* is currently the major causative agent in outbreaks, we will further analyze the pathogenicity of the variants. In the future, it will be necessary to examine the superiority of the M203/I257-SpaA type of *Erysipelas* swine, for example, in animals that can infect and spread *E. rhusiopathiae*, or in sewage and soil where *E. rhusiopathiae* can exist. We hope that the series of findings obtained in this study will be of help in the future control of *Erysipelas* swine in the pig farming industry.

This version of the article has been accepted for publication, after peer review in 2019 and is subject to Springer Nature's AM terms of use, but is not the Version of Record and does not reflect postacceptance improvements, or any corrections. The Version of Record is available online at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-020-02254-2>.

The contents of all chapters are published in scientific journal below.

- Morimoto M, Kato A, Kojima H, Akaike Y, Nogami K, Sasakawa C, Nagai S, To H. Serovars and SpaA Types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Isolated from Pigs in Japan from 2012 to 2019. Curr Microbiol. 2021 Jan;78(1):55-66. doi: 10.1007/s00284-020-02254-2. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33145611.

- Morimoto M, Kato A, Akaike Y, Nogami K, Ono H, Furusawa T, Kojima H, Sasakawa C. Comparative study of the phenotype and virulence of recent serovar 1a, 1b, and 2a isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Japan. Vet Microbiol. 2022 Jul;270:109458. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109458. Epub 2022 May 12. PMID: 35623133.

- Morimoto M, Kato A, Nogami K, Akaike Y, Furusawa T, Kojima H, Sasakawa C. The Swine Erysipelas Vaccine SER-ME Effectively Protects Pigs against Challenge with the *Erysipelothrix rhusiopathiae* M203/I257 SpaA-Type Variant. Vet Sci. 2022 Jul 26;9(8):382. doi: 10.3390/vetsci9080382. PMID: 35893775; PMCID: PMC9332197.

目次

緒論	1
第一章 2012 年から 2019 年における豚丹毒菌 SpaA 変異株の動向	
1-1. 序論	3
1-2. 材料と方法	5
1-3. 結果	9
1-4. 考察	12
1-5. 要約	15
1-6. 図表	16
第二章 日本で分離された血清型 1a、1b、2a 豚丹毒菌の細菌学的特性と病原性比較検討	
2-1. 序論	23
2-2. 材料と方法	25
2-3. 結果	29
2-4. 考察	35
2-5. 要約	38
2-6. 図表	39
第三章 豚丹毒不活化ワクチンの M203/I257-SpaA 変異株に対する豚での有効性	
3-1. 序論	46
3-2. 材料と方法	50
3-3. 結果	52
3-4. 考察	55
3-5. 要約	57
3-6. 図表	59
総括	65
謝辞	69
参考文献	70

緒論

豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) は分類学的には *Erysipelotrichales* 目 *Erysipelotrichaceae* 科に属する通性嫌気性のグラム陽性菌である。形態学的には非抗酸性の鞭毛および線毛などの移動・定着器官を有せず、芽胞も形成しない単在性の小桿菌であるが、増殖過程においては二連鎖から多連鎖を示すことがある[1,2]。19世紀後半、豚丹毒菌はヒトの病原体として初めて報告されたが、まもなくヒトが唯一の宿主でなく、豚に主たる病原性を示す細菌であることが判明した[1,3]。豚丹毒菌は豚に豚丹毒を発症させ、世界中の養豚産業において大きな経済的損失を与える重要な人獣共通感染症であり、わが国では家畜伝染予防法の届出伝染病に指定されている。豚における豚丹毒の症状は主に 3 つに分類され、急性・亜急性・慢性症状がある。急性症状では敗血症による突然死、亜急性症状では発熱や食欲不振に加えて最も特徴的とされる蕁麻疹（ダイヤモンド・スキン）の出現、慢性症状では関節炎、リンパ節炎および心内膜炎などを引き起こし、その症状は多岐に渡る[1,3,4]。疾病対策には他の疾病との類症鑑別が重要となる。

豚丹毒菌は土壌や海水中など様々な環境中に分布する[1,3]。さらに、豚丹毒菌は豚のみならず、ヒトに加えてトリおよび海棲哺乳類等の広範囲な宿主に感染する[1,3]。健康豚の扁桃などにも本菌は存在し、唾液や排泄物を介して豚丹毒菌を排出している[1,3]。養豚場ではこのように健康豚から排泄された豚丹毒菌が飼育環境を汚染し、それが一定の感染源となっていると考えられている[5,6]。

豚丹毒菌は 10 種類以上の多くの血清型が報告されており、なかでも豚に主として強い病原性を示す血清型は、1a、1b および 2 である[1,3,6]。これらの血清型は、ヒトおよび鶏に対しても病原性を示す[6]。豚丹毒菌は株間によって大きく病原性が異なることが知られている一方で、その病原性発現機構はほとんど分かっていない。これまでの研究で病原因子のうちノイラミニダーゼ、莢膜、Spa (Surface protective antigen) A 抗原を含む菌体表面タンパク質が病原性因子として重要とされている[3,8]。特にノイラミニダーゼは豚丹毒

菌の菌体外酵素であり、細胞の付着と侵入に関与することが知られている[6,7,9,10,11]。また、豚丹毒菌の血管親和性が病原性の発現機構を考えるうえで重要な因子であり、豚丹毒菌の侵入経路として血管内皮細胞への付着が着目されている[3,9,10,11,12]。

日本における豚丹毒菌の発生は1970年代に生ワクチンが普及してから発生頭数は減少しているものの、未だに年間2000頭前後の発生があり、養豚業界において決して無視できない疾病である。特に2008年から2011年にかけては血清型1aに属するSpaAタンパク質の203位と257位のアミノ酸がそれぞれメチオニンとイソロイシンに変化したM203/I257-SpaA型が新たな豚丹毒菌の変異株として流行した[13,14]。この他にも、少数ながらSpaAタンパク質の203位と242位のアミノ酸が、それぞれメチオニンとアラニンに置換したM203/A242-SpaA変異株および203位のアミノ酸のみがメチオニンに置換したM203-SpaA変異株も発見された[15]。このように、これまで発見されてこなかった豚丹毒菌SpaA変異株の出現・流行が近年では認められている。

これらの背景を踏まえ、本研究では日本の豚丹毒菌SpaA変異株の動向を探り、流行の原因解明を目的とした。本論文は3章から構成される。第一章では2012年から2019年に分離した豚丹毒菌株を中心に表現型を調査し、SpaA変異株の国内分離状況とその病原性を明らかにした。第二章では豚丹毒菌SpaA変異株の優位性をその細菌学的性状および病原性の観点から血清型1a、1b、2aの近年分離豚丹毒菌及びワクチン有効性評価の際に病原性比較対照株として主に用いる藤沢株の間で比較検討した。第三章では豚丹毒菌SpaA変異株に対する豚丹毒菌不活化ワクチンの有効性を藤沢株と比較検討した。

第一章

2012 年から 2019 年における豚丹毒菌 SpaA 変異株の動向

1-1. 序論

感染防御と病原性発揮に関与しているタンパク質として豚丹毒菌の菌体表層に発現する Spa (Surface protective antigen) A 抗原がよく研究されている[11,12,16,17,18]。2008 年から 2011 年に日本において豚丹毒菌 SpaA 変異株が群馬県と長野県の農場を中心に発見され、まもなく全国規模で存在が確認された[13]。具体的には、血清型 1a に属する SpaA タンパク質の 203 番目のアミノ酸がイソロイシン (I) からメチオニン (M) に、257 番目のアミノ酸がリシン (K) からイソロイシン (I) に変化した M203/I257-SpaA 変異株が流行した[13]。この他にも、少数ながら SpaA タンパク質の 203 番目のアミノ酸がイソロイシン (I) からメチオニン (M) に置換した M203-SpaA 変異株や 195 番目のアスパラギン酸 (D) がアラニン (A) に置換した A195-SpaA 変異株など、*SpaA* 遺伝子の塩基配列に変異が入った豚丹毒菌が発見されるようになった[15]。どうして豚丹毒菌 SpaA 変異株が流行したのか、その原因は不明であるが、従来の豚丹毒菌株ではなく *SpaA* 遺伝子に変異した豚丹毒菌が流行したのである。

日本で主流を占める血清型 1a の豚丹毒菌はゲノムの制限酵素切断断片のパルスフィールド電気泳動上の特徴からは区別できないが、ゲノムワイドの一塩基変異多型 (single-nucleotide polymorphism, SNIP) 解析により 4 つの大きな系統 (Lineage I、II、III、IV) に分類される[14]。Lineage I は I203/I257-SpaA 変異株、Lineage II は I203/I257-SpaA 変異株、Lineage III は生ワクチンで使用されている小金井株 65-0.15 が分類されている。Lineage IV はさらに細かく Lineage IVa と IVb-1、IVb-2 と分類され、いずれも M203/I257-SpaA 変異株が属する[14]。特に Lineage IVb-1 は九州地域で分離される株、Lineage IVb-2 は本州地域で分離される株といった様に株の流行地に地域性を持つ特

徴がある[14]。

これらをふまえ本章では 2012 年から 2019 年に弊所（一般財団法人日本生物科学研究所）に依頼された病性鑑定にて分離された豚丹毒菌株並びに農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門（農研機構）から分与された株を用いて菌の血清型、*SpaA* 遺伝子塩基配列の変異部位を解析し、2008 年から 2011 年に流行していた M203/I257-*SpaA* 変異株がどうなっているのかを検討し、更に変異株の分離地域と Lineage の相関性がどうなっているのかを Lineage IVb-1 と Lineage IVb-2 の遺伝子型別を実施して検討した。また、分離された株から任意の株を選んでマウス病原性試験を実施し、従来の株との病原性の差異を検証した。

1-2. 材料および方法

1-2-1. 使用菌株

2012 年から 2019 年にかけて弊所病性鑑定試験の際に分離した豚丹毒菌保存菌 62 株および農研機構で分離した 17 株を動物衛生研究部門動物感染症研究領域・領域長 下地善弘先生より分与頂き、合計 79 株を試験に供した。これらの菌株は brain heart infusion (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland) に 0.1%(v/v) Tween 80 を添加した培地 (BHI-T80) に 10~15%グリセロール添加した液体にて使用時まで-80℃で保管した。

1-2-2. 血清型別検査

菌株の血清型別は弊所で作製した抗ウサギ血清を用いてゲル内沈降反応で血清型を判別した。加えて血清型特異的 PCR 法を用いた方法でも判別した[13,19]。使用したプライマーは 1a-F (5'-CTCCTAACGCTTTAGCACGC-3')、1a-R (5'-TGATCCTTTGCCACTAATGC-3')、1b-F (5'-GGAAAGCATCCCTGTAATCAGTTGC-3')、1b-R (5'-TGCGTGTAACCTGATAGTGTAATC-3')、2-F (5'-CCACGTCTTCCCACACTACAAAAAGTAAATTC-3')、2-R (5'-TCATCCTAATGCATATCATTATGTGGATATGAA-3') である。反応条件は 95℃ 2 分、25 サイクルの 94℃ 30 秒・60℃ 30 秒と 68℃ 1 分である。これらの結果から総合的に血清型を確定した。これらの判別方法で互いに矛盾する結果になることはなかった。

1-2-3. 液体培地の性状

菌株の培養は Bacto Tryptose Phosphate Broth (Becton, Dickinson and

Company)、Bacto Proteose Peptone No.3 (Becton, Dickinson and Company)、0.1% Tween 80 を添加した培地 (TPB 培地) を用いて 37°C 好気培養にて約 13 時間静置培養で行った。

1-2-4. 生菌数測定法

1.5%(w/v)の agar (Oxoid, LP0011, Bacteriological [Agar No.1], Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) を TPB 培地に添加したもの (TPB 寒天培地) をオートクレーブ滅菌器で均一に溶解後、プレートに流し込んで平板寒天培地を作製し、この平板プレートを生菌数測定に使用した。測定する菌株原液を 10^{-8} まで TPB 培地で 10 段階希釈し、 10^{-7} と 10^{-8} に希釈したものをそれぞれ 500 μ L ずつ 2 枚の TPB 寒天プレートに撒いた。菌を撒いた寒天プレートを 37°C 好気培養にて約 48 時間培養し、発育した 2 枚のコロニー数の和に希釈率を乗じて生菌数 (colony forming unit, CFU/mL) を算出した。

1-2-5. *SpaA* 遺伝子配列解析

既報の *SpaA* 遺伝子 PCR 法[13]により各株の *SpaA* 遺伝子を増幅した。Erko-1F (5'-GTGAAACACAGTATTTTAGTA-3') と Erko-2R (5'-TTCAAGAAGTTCCTGTAGTTT-3') のプライマーペアを用い、95°C 3 分の熱変性反応、94°C 40 秒・56°C 45 秒・72°C 45 秒の増幅反応を 30 サイクル行い、その後 72°C 5 分の伸長反応を行った。アガロース電気泳動で増幅した 432bp の DNA 断片を確認後に、ExoSAP-IT Express PCR Product Cleanup Reagent kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts) を用いて DNA を精製し、DNA シークエンス解析サービス (株式会社 FASMAC、神奈川県) に委託して DNA 配列を得た。得られた塩基配列を遺伝子解析ソフト (GENETYX-Windows、Ver.16) を用いて *SpaA* 遺伝子塩基配列上の変異部分を解析した。

1-2-6. 豚丹毒菌 lineage と地域性の確認

豚丹毒菌の lineage を型別できる Multiplex PCR 法[20]を用いた。Lineage IVb 用プライマーペアとして 0022F3 (5'-GGATGTTATATTCTCGCTCAAGGGCCA-3') と 0022R3 (5'-CTGTTTTGAGTTCATTCACTTCATCCA-3') を用いた。Lineage 亜型を知るため九州地域由来の Lineage IVb-1 用各プライマーペアとして 0533F (5'-AATGACTATCGCAAAGAGAAGGAAAAGT-3') と 0533R (5'-ATCATCTTGGGTCACCGCAACACGACGACGCGTTGA-3') を、と本州地域由来の Lineage IVb-2 用プライマーペアとして 0655F2 (5'-TAAATCATGTAGCATTAACGTCTCAGC-3') と 0655R1 (5'-CCATCTTTACCGATGTATAAGGGTACA-3') を用いた。PCR 反応条件は 95°C 5 分、95°C 30 秒、67°C 30 秒、72°C 40 秒を 35 サイクル行った。増幅断片は Lineage IVb が 1195bp、Lineage IVb-1 と Lineage IVb-2 がそれぞれ 851bp と 574bp である。

1-2-7. マウス感染実験

各群 10 匹の ddY マウス（雌、5 週齢；日本 SLC、静岡）に約 10^2 CFU の藤沢株および近年分離した 79 株から血清型 1a 型菌 18 株、1b 型菌 2 株、2a 型菌 2 株からなる 22 株を選んでそれぞれを 10^3 CFU/mL に調製し、0.1 mL を皮下接種した。接種後 7 日目までのマウスの臨床症状および人道的エンドポイントを含む生死を観察した。試験は 2 回に分けて実施し、それぞれの試験で 11 株（表 1-4）を接種し、病原性比較対照株である藤沢株攻撃群をどちらの試験にも置いた。血清型 1a 豚丹毒菌は全て M203/I257-SpaA 変異株を用いた。過去の文献を参考にしてそれぞれの株の病原性の強さを「Very High」・「High」・「Moderate」に分類した[13]。3 日目以内に 90%以上死亡のものを病原性「Very High」、4 日～5 日目以内に 80%以上が死亡する場合を病原性「High」、それ以外

のものを病原性「Moderate」とする分類を基本にした。加えて t 検定による平均死亡日の統計学的有意差解析を加えて矛盾がないように分類した。本動物実験は実験動物福祉・動物実験管理委員会の承認を受け（承認番号 19-247A）、日本生物科学研究所動物実験要領に従い実施した。

1-3. 結果

1-3-1. 豚丹毒菌が分離された豚の症状および菌の血清型

試験に供した 79 株の豚丹毒菌株は 2012 年から 2019 年において国内 32 か所の地域から分離された。このうち 29 か所は養豚場から、2 か所は食肉衛生検査所から、残りの 1 か所は県の畜産試験場から分離されたものである（表 1-1）。分離した 79 株のうち 24 株は臨床症状の情報を得ることが出来なかった。臨床症状が得られた 55 株中、豚の臨床症状として最も多かったのは 26 株の関節炎・心内膜炎・チアノーゼなどの慢性症状であった。次いで多かった臨床症状は 21 株の突然死・敗血症などの急性症状であり、残り 8 株が亜急性症状であった。また、調査した 79 株のうち血清型 1a が 59 株、血清型 1b が 3 株、2a が 6 株、型別不能が 11 株となった（表 1-2）。これらの結果は日本では 2012 年以降も変わらず血清型 1a の株が最も多く流行していることを示唆した。

1-3-2. 豚丹毒菌血清型 1a における *SpaA* 遺伝子解析

59 株の血清型 1a に対して、*SpaA* 遺伝子解析を実施した。その結果、病原性比較対照株である藤沢株と配列が同じ血清型 1a 株は一つもなく、59 株中 56 株が M203/I257-*SpaA* 変異株であり、残りの 3 株は I257-*SpaA* 変異型であることが判明した（表 1-3）。この結果より 2008 年から 2011 年に引き続き 2012 年以降もわが国で豚丹毒菌 M203/I257-*SpaA* 変異株の流行が継続していることを示した。

1-3-3. 豚丹毒菌の地域性（Lineage）

2017 年に小川[14]らは M203/I257-*SpaA* 変異株は豚丹毒菌の Lineage IVb 系統に分類されており、さらにその中でも九州地域から分離出来るものは Lineage IVb-1、本州地域から分離出来るものは Lineage IVb-2 として細分でき、株の系統に地域性があるこ

とを報告した。この知見に基づき、56 株中 55 株の M203/I257-SpaA 変異株に対して白岩らの方法に基づく PCR 法にて Lineage IVb-1、Lineage IVb-2 の判別を行った[20]。その結果、2013 年熊本株・2015 年大分株・2017 年沖縄株・2018 年沖縄株は、九州・沖縄地域から採取された豚丹毒菌であるにも関わらず Lineage IVb-2 を示した。一方、2013 年秋田株・2014 年北海道株・2015 年千葉株・2019 年宮城株は本州地域から採取された菌であるにも関わらず Lineage IVb-1 を示した(表 1-1)。これより、2013 年以降に分離された株に関しては、もはや Lineage IVb-1、Lineage IVb-2 に属する豚丹毒菌の地域特異性が失われていることが確認された (図 1-1)。

1-3-4. マウス病原性確認試験

国内分離した豚丹毒菌の病原性を調べるため、分離された 79 株から任意に 22 株 (1a 型菌 18 株、1b 型菌 2 株、2a 型菌 2 株)を選んだ。豚丹毒の病原性の評価には従来から小動物試験として ddY 系マウスが用いられており、その試験方法に従った[13]。病原性比較対照株である血清型 1a の藤沢株を接種すると我々の用いた条件下では、マウスは接種後 3 日目以内に 1 群 10 匹中 10 匹の全てが死亡した (図 1-2A,E)。一方、対照とした PBS 投与群、無投与対照群、TPB broth 投与群は全例が生残した (図 1-2C,G)。このとき [A]2012 年宮崎株、[D]2012 年千葉株、[L]2012 年宮崎株、[R]2015 年宮崎株を接種した群のマウスは藤沢株を接種した群と同様に接種後 3 日目以内に全例が死亡した (図 1-2A,E)。これらの株を接種したマウスの群が藤沢株を接種したマウスより早く死亡する例は見られなかった。以上の結果から、これら 4 つの株の病原性を最も高い「Very High」に分類した。この 4 つの株以外の 15 株は接種後 3 日目～5 日目で 80%以上の死亡率を示し、病原性は「High」に分類された (図 1-2B,F)。[C]2012 年長野株・[S]2016 年栃木株・[P]2015 年宮崎株の 3 株を接種した群のマウスは接種後 5 日目まで 80%以上が生残した (図 1-2C,G)。この中で[S]2016 年栃木株・[P]2015 年宮崎株の病原性は最も低い

「Moderate」に分類した。一方、[C]2012 年長野株は、接種後に用いた菌を改めて菌数確認したところ予想される菌数(10^3 CFU/mL)よりも少なかったため、接種菌量不足による試験不成立として病原性分類から除外した（表 1-4）。血清型別にみていくと、病原性「Very High」に分類された株は藤沢株と血清型 1a が 3 株、血清型 1b が 1 株であった。「High」に分類された株は血清型 1a が 14 株、血清型 1b が 1 株であった。「Moderate」に分類されたのは血清型 1a が 1 株と血清型 2a が 1 株であった。マウスの平均生存日数とその統計学的解析結果を図 1-2D、H に示した。これらの結果より、少なくとも血清型 1a 豚丹毒菌は血清型 2a 豚丹毒菌よりもマウスにおいて強い病原性をもたらすことが示唆された。

1-4. 考察

本章では 2012 年から 2019 年に分離した 79 株の豚丹毒菌に関して血清型、地域性を中心に疫学的調査を行い、2008 年から 2011 年に報告された M203/I257-SpaA 変異株 [13] の流行のその後の動向を探索した。加えて 79 株から任意に 22 株を選んでそれらの病原性をマウスで評価した。今回の疫学的調査により、79 株中 59 株が血清型 1a 豚丹毒菌であり、血清型 1a が最も流行している血清型であると分かった（表 1-1、1-2）。血清型 1a 豚丹毒菌 59 株の *SpaA* 塩基配列を調べたところ、どの血清型も藤沢株と同じ *SpaA* 塩基配列を示さず、59 株のうち 3 株は I257-SpaA 変異株、56 株は M203/I257-SpaA 変異株であった。これは現在の日本で最も流行している株は M203/I257-SpaA 変異株であり、2008 年から 2011 年の流行期に確認された M203/I257-SpaA 変異株がそれ以降も日本で流行を継続し、その多数を占めていることを示唆した。

2013 年に中国東部で分離された豚丹毒菌 8 株はすべて血清型 1a に属し、半数の 4 株が日本で観察されたのと同様の *SpaA* の 203 番目のアミノ酸がメチオニンに変異した豚丹毒菌であったと報告されている [21]。これより、日本で分離された M203/I257-SpaA 変異株と中国で分離された M203-SpaA 変異株はおそらく極東アジアに共通の起源を持つだろうことが示唆された [14]。対照的に 1987 年から 2015 年にイギリスで分離された 128 株のうち 75 株は血清型 2 の豚丹毒菌であり、血清型 1a の豚丹毒菌は主要な分離株ではなかった [22]。また、同時期の米国でも血清型 2 の豚丹毒菌が多く流行していると報告がなされた [23,24]。

小川ら [14] と白岩ら [20] はゲノムワイドの一塩基変異多型解析に基づき、豚丹毒菌を Lineage I ～IV に分類し、さらに Lineage IV には Lineage IVa、Lineage IVb-1、Lineage IVb-2 に細分化できるとした。また、Lineage IVb-1、Lineage IVb-2 型の豚丹毒菌が分離される場所には、それぞれ九州地域、本州地域の特異性があることを報告している。本研究における 55 株の血清型 1 の M203/I257-SpaA 変異株において、37 株が

Lineage IVb-1、18 株が Lineage IVb-2 型にそれぞれ分類された。これまでは Lineage IVb-1 型の菌が九州地域で分離された株、Lineage IVb-2 の菌が本州地域で分離された株と報告されてきたが[20]、本研究の結果、2013 年以降は Lineage IVb-1、Lineage IVb-2 型の菌の分離地には地域性がなくなり、中には同じ農場から、それぞれ Lineage IVb-1、Lineage IVb-2 型の豚丹毒菌が分離される例もあった（表 1-3、図 1-1B）。これより、Lineage IVb-1、Lineage IVb-2 型の菌の地域特異性は、どちらも 2013 年から 2019 年の間に流行地を拡大することにより消失したと推察できた。

豚丹毒菌が分離された豚の臨床症状について比較してみると、血清型 1b と 2a は急性症状を示した豚からは分離されていない（表 1-2）。対照的に分離した血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株 56 株のうち、約 3 分の 1 にあたる 20 株が急性症状を呈した豚由来であった。さらに急性症状を示した豚から分離された 21 株のうち 20 株が血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株由来であった（表 1-2）。これらの結果より、血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株は他の血清型の豚丹毒菌よりも豚での病原性が高い事が推定された。しかし、一方で 56 株の M203/I257-SpaA 変異株のうち 7 株が亜急性症状、12 株が慢性症状を示した豚からそれぞれ分離されている事実を考慮すると株の血清型だけで一概に豚の病原性が定まるわけではないことも推定された（表 1-2）。豚丹毒菌の *SpaA* 遺伝子と豚における病原性との関連性は今後も引き続き調査を行い、慎重に結論付けなければならない。

病原性と *SpaA* 遺伝子を含む特定の血清型との関連性を判断するために、22 株の豚丹毒菌をマウスに接種し、株を採取した豚との症状の類似性を比較した。マウス病原性確認試験では、豚丹毒菌の病原性を To らの分類を参考に、平均死亡日の統計学的有意差を加味して「Very High」・「High」・「Moderate」の 3 つのカテゴリーに分類した[13]。いずれの株のマウス病原性も病原性比較対照株である藤沢株を超えるものはなかった。マウスで高病原性「Very High」に分類された[A]2012 年宮崎株、[D]2012 年千葉株、

[L]2015 年宮崎株と [R]2015 年宮崎株の 4 株のうち、[A]2012 年宮崎株、[D]2012 年千葉株と[L]2015 年宮崎株は、いずれも血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株であったが、[R]2015 年宮崎株は血清型 1b であった。他の 16 株の血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株は高病原性「High」に分類された。従って、豚丹毒菌の血清型とマウスにおける病原性の間には血清型 1a の菌は比較的マウス病原性が高いという関連性が認められた。この知見はマウスにおける豚丹毒菌の病原性は、血清型と *SpaA* 遺伝子によって決められる要因と、その他の要因によっても決定され得ることを示唆した。一方で、豚における急性症状は型別不能菌 1 株を除いてすべて血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株による感染で占められていた(表 1-2)。他の血清型の株による感染では急性および亜急性感染がほとんど観察されなかった。血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株は他の血清型菌と比べて豚に強い病原性をもつことが示唆された。しかし、血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株だからといってすべて急性症状 (20/56 株) を示す訳ではなく、亜急性(7/56 株)、慢性(12/17 株) 症状例もあり、発症の程度は飼育環境要因によっても左右されることも示唆された。

1-5. 要約

豚丹毒菌は豚に豚丹毒を引き起こし、養豚場に経済的損失を与える。日本では 2008 年から 2011 年において分離された豚丹毒菌には、菌の病原性と感染防御に関与する菌体表面抗原 *SpaA* 遺伝子の塩基配列の特定部分に変異の入った株が見つかった。特に血清型 1a の *SpaA* タンパク質の 203 位と 257 位のアミノ酸がそれぞれメチオニンとイソロイシンに変化した M203/I257-*SpaA* 変異株の豚丹毒菌が数多く分離された。この M203/I257-*SpaA* 変異株が現在も豚丹毒の流行の主となっているのかの確認とその原因究明のため、手始めに我々は 2012 年から 2019 年に日本各地から集めた 79 株の豚丹毒菌の血清型、*SpaA* 遺伝子塩基配列の変異部分の解析及び Lineage 型別を行った。調査した 79 株のうち、59 株が血清型 1a に属しており、その 59 株のうち 56 株が M203/I257-*SpaA* 変異株であった。このため 2012 年以降も血清型 1a の M203/I257-*SpaA* 変異株の流行の継続が明らかとなった。さらには、M203/I257-*SpaA* 変異株の Lineage 型別をすると、これまで九州地域と本州地域で分離した株が、それぞれ Lineage IVb-1 と Lineage IVb-2 に型別され、Lineage 型と菌の分離地に地域性があったものが、2013 年以降に分離された株ではその地域性の消失が確認出来た。また、マウスを用いた豚丹毒菌の病原性確認試験において血清型 1a の M203/I257-*SpaA* 変異株は他の血清型の株に比較して病原性が強いことが示唆された。一方、同じ血清型 1a の藤沢株との比較では、大きな病原性の違いを見出すことは出来なかった。これらの結果より、我が国で近年見られる豚丹毒菌の流行は豚丹毒菌の *SpaA* 遺伝子の塩基配列に新たに変異が挿入された株などによるものではなく、2008 年から引き続いて M203/I257-*SpaA* 変異株が浸潤し続けていること、その病原性は少なくともマウスでは血清型 1a の藤沢株と大きな差を生じていないことが判明した。

1-6. 図表

表 1-1. 2012 年から 2019 年に分離した豚丹毒菌

年	都道府県	地域	臨床症状	分離臓器	血清型	地域性 Lineage	マウス 投与株
2012	長野	1	関節炎	不明	1a	NT	
	宮崎	2	突然死	心臓	1a	IVb-1	A
			突然死	心臓	1a	IVb-1	
		3	不明	不明	型別不能		
	長野	4	なし	不明	1b		B
		5	関節炎	不明	2a		C
			関節炎	不明	2a		
	千葉	6	チアノーゼ	不明	1a	IVb-2	D
			チアノーゼ	不明	1a	IVb-2	
			チアノーゼ	不明	1a	IVb-2	
	愛知	7	沈鬱	心臓	型別不能		
			沈鬱	心臓	型別不能		
			沈鬱	心臓	型別不能		
			沈鬱	不明	型別不能		
	静岡	8	関節炎	関節	1a	NT	
			関節炎	関節	型別不能		
			関節炎	関節	1b		
			関節炎	リンパ節	1a	NT	
			関節炎	関節	型別不能		
			心内膜炎	心臓	1a	NT	
2013	宮崎	9	蕁麻疹	皮膚	2a		
			不明	臍帯	型別不能		
	鹿児島	10	突然死	肝臓	1a	IVb-1	E
			突然死	肝臓	1a	IVb-1	
			突然死	肝臓	1a	IVb-1	
			突然死	脾臓	1a	IVb-1	
			突然死	肝臓	1a	IVb-1	
	長崎	11	突然死	不明	1a	IVb-1	F
			突然死	不明	1a	IVb-1	
			突然死	不明	1a	IVb-1	
			突然死	不明	1a	IVb-1	
	熊本	12	不明	不明	1a	IVb-2	G
			不明	不明	1a	IVb-1	
			不明	不明	1a	IVb-1	
			不明	不明	1a	IVb-1	
			不明	不明	1a	IVb-1	
	宮崎	14	突然死	不明	1a	IVb-1	I
		15	突然死	肝臓	1a	IVb-1	J
		16	突然死	肺	1a	IVb-1	K
	北海道	17	敗血症	不明	1a	IVb-2	
	秋田	18	敗血症	不明	1a	IVb-1	
			関節炎	不明	1a	IVb-1	

(次項に続く)

2014	北海道	19	敗血症	不明	1a	IVb-1	
	宮崎	20	突然死	肺	1a	IVb-1	L
			突然死	肝臓	1a	IVb-1	
			突然死	肺	1a	IVb-1	
2015	千葉	21	不明	不明	1a	IVb-2	M
	千葉	22	不明	肺	1a	IVb-1	N
			不明	肺	1a	IVb-1	
	大分	23	不明	肺	1a	IVb-2	O
			不明	肺	1a	IVb-2	
	宮崎	24	不明	不明	2a		P
			不明	不明	1a	IVb-1	Q
			不明	不明	2a		
			不明	不明	2a		
			不明	不明	1a	IVb-1	
			不明	不明	1b		R
2016	栃木	25	不明	肺	1a	IVb-2	S
	宮崎	26	蕁麻疹	心臓	1a	IVb-1	T
			蕁麻疹	心臓	1a	IVb-1	
			蕁麻疹	心臓	1a	IVb-1	U
		27	蕁麻疹	不明	1a	IVb-1	V
2017	沖縄	28	蕁麻疹	不明	1a	IVb-2	
2018	沖縄	29	蕁麻疹	不明	1a	IVb-2	
			蕁麻疹	不明	1a	IVb-2	
			関節炎	不明	1a	IVb-2	
			関節炎	不明	1a	IVb-2	
			関節炎	不明	1a	IVb-2	
			心内膜炎	不明	1a	IVb-2	
			心内膜炎	不明	1a	IVb-2	
			関節炎	不明	1a	IVb-2	
	宮崎	30	突然死	心臓	型別不能		
2019	宮城	31	不明	不明	1a	IVb-1	
			不明	不明	1a	IVb-1	
			不明	不明	1a	IVb-1	
			不明	不明	1a	IVb-1	
	宮崎	32	チアノーゼ	心臓	型別不能		
			チアノーゼ	脾臓	型別不能		

NT：未実施。マウス投与株：病原性確認のためにマウスに接種した 22 株を A から V のアルファベットで示す。

表 1-2. 豚丹毒菌分離株 79 株の臨床症状、血清型と血清型 1a の SpaA 塩基配列

臨床症状	血清型					合計
	1a		1b	2a	型別不能	
	Ile-257 ^{*4}	Met-203/Ile-257 ^{*5}				
急性 ^{*1}		20			1	21
亜急性 ^{*2}		7		1		8
慢性 ^{*3}	3	12	1	2	8	26
不明		17	2	3	2	24
合計	3	56	3	6	11	79

*1 急性症状…突然死や敗血症など。*2 亜急性症状…蕁麻疹など。*3 慢性症状…関節炎や心内膜炎など。*4, 5 日本でこれまで発見報告された豚丹毒菌 SpaA 変異株[13,15]

表 1-3. 豚丹毒菌の分離年と分離数、SpaA 塩基配列変異部位

SpaA 遺伝子塩基配列	ヌクレオチド配列(アミノ酸置換位置)					分離数								
	555 (185)	584 (195)	609 (203)	726 (242)	769 (257)	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	total
藤沢株	CCC (P)	GAT (D)	ATT (I)	GAG (Q)	CTT (K)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
P185*	CC <u>A</u> (P)					0	0	0	0	0	0	0	0	0
A195*		G <u>C</u> T (A)				0	0	0	0	0	0	0	0	0
M203*			AT <u>G</u> (M)			0	0	0	0	0	0	0	0	0
D242*				GAT <u>T</u> (D)		0	0	0	0	0	0	0	0	0
I257					<u>A</u> TT (I)	3	0	0	0	0	0	0	0	3
M203/I257			AT <u>G</u> (M)		<u>A</u> TT (I)	6	20	1	6	5	1	8	4	56

*日本でこれまで発見報告された豚丹毒菌 SpaA 変異株[13,14,15]。() 内は変異アミノ酸を 1 文字コードで示す。

表 1-4. マウスに接種した豚丹毒菌株と死亡率

試験 1

接種株	病原性* ¹	死亡率	CFU/mouse (x10 ²)* ²	豚における 症状* ³
藤沢株	Very high	100%	5.3	急性
[A] 2012年 宮崎株 (1a)	Very high	100%	4.1	急性
[B] 2012年 長野株 (1b)	High	100%	4.3	慢性
[C] 2012年 長野株 (2a)	Not determinec	50%	1.3	慢性
[D] 2012年 千葉株 (1a)	Very high	100%	5.6	急性
[E] 2013年 鹿児島株 (1a)	High	100%	5.2	急性
[F] 2013年 長崎株 (1a)	High	100%	9.6	急性
[G] 2013年 熊本株 (1a)	High	100%	6.7	不明
[H] 2013年 熊本株 (1a)	High	100%	4.7	不明
[I] 2013年 宮崎株 (1a)	High	100%	3.3	急性
[J] 2013年 宮崎株 (1a)	High	100%	4.2	急性
[K] 2013年 宮崎株 (1a)	High	100%	5.4	急性
PBS	None	0%	-	-
無投与対照群	None	0%	-	-

試験 2

接種株	病原性* ¹	死亡率	CFU/mouse (x10 ²)* ²	豚における 症状* ³
藤沢株	Very high	100%	5.3	急性
[L] 2014年 宮崎株 (1a)	Very high	100%	4.0	急性
[P] 2015年 宮崎株 (2a)	Moderate	100%	3.9	不明
[R] 2015年 宮崎株 (1b)	Very high	100%	6.1	不明
[M] 2014年 千葉株 (1a)	High	100%	4.3	不明
[N] 2015年 千葉株 (1a)	High	100%	9.5	不明
[O] 2015年 大分株 (1a)	High	100%	6.6	不明
[Q] 2015年 宮崎株 (1a)	High	100%	6.8	不明
[S] 2016年 栃木株 (1a)	High	100%	5.1	不明
[T] 2016年 宮崎株 (1a)	High	100%	5.7	甚急性
[U] 2016年 宮崎株 (1a)	High	100%	4.8	甚急性
[V] 2016年 宮崎株 (1a)	High	100%	4.5	甚急性
PBS	None	0%	-	-
TPB broth	None	0%	-	-

*1 病原性分類：Very High：90～100%のマウスが豚丹毒菌接種後 3 日以内に死亡。
High：80%から 100%のマウスが豚丹毒菌接種後 4 日～5 日以内に死亡。Moderate：豚丹
毒菌接種後 4～5 日で 50%以上のマウスが生存。*2 接種菌数確認：接種した豚丹毒菌の
残りを接種後に生菌数測定した結果。*3 豚症状：株が由来する豚における臨床症状の分
類

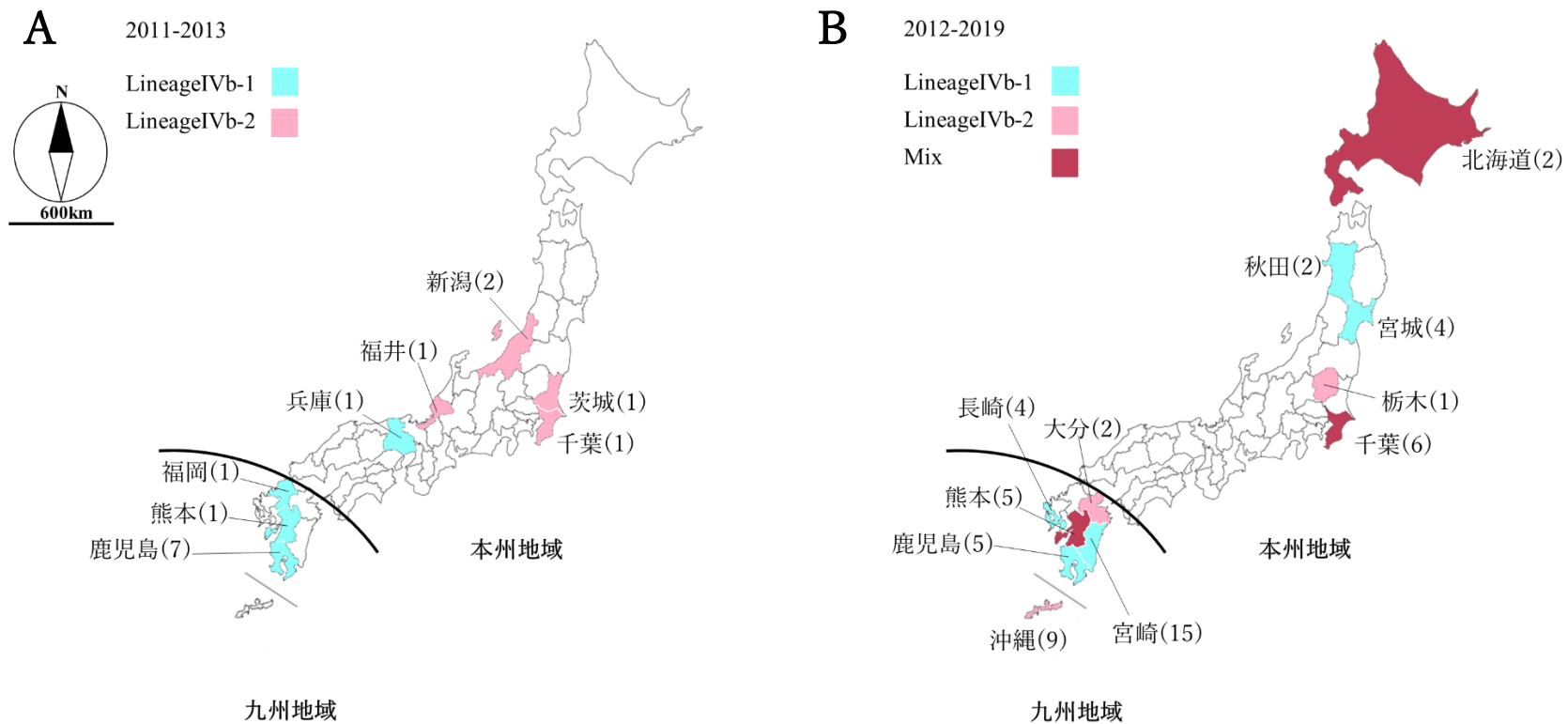


図 1-1. M203/I257-SpaA 変異型豚丹毒菌の地域性

A) 2011 年から 2013 年に分離した M203/I257-SpaA 変異株(文献[14]に従って作図) B) 2012 年から 2019 年に分離した M203/I257-SpaA 変異株 水色が LineageIVb-1 (九州地域由来)、桃色が LineageIVb2 (本州地域由来)、茶色は LineageIVb-1,2 両方に由来する M203/I257-SpaA 変異株が分離出来た都道府県を示す(Mix)

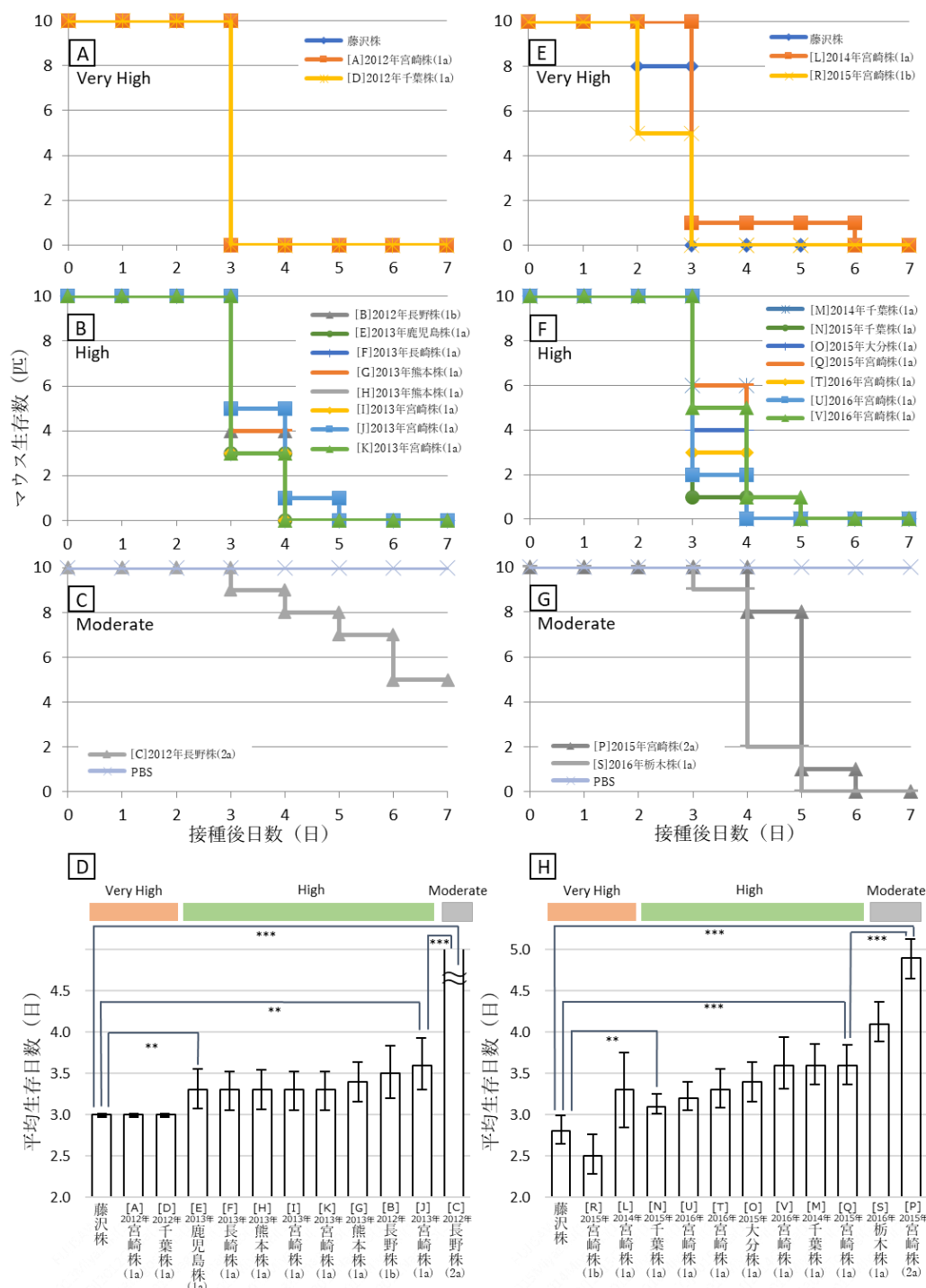


図 1-2. マウス病原性確認試験における Kaplan-Meier プロットと株の病原性評価

A, E; 病原性「Very High」に分類 B, F; 病原性「High」に分類 C, G; 病原性

「Moderate」に分類。縦軸はマウス生存匹数、横軸は接種後日数を示す。D, H; 平均生存

日数による統計学的解析 (t 検定) 横軸が豚丹毒菌接種株、縦軸が平均生存日数。縦棒は

標準誤差を示す。有意差; ***($p < 0.01$), **($p < 0.05$)

第二章

日本で分離された血清型 1a、1b、2a 豚丹毒菌の細菌学的特性と病原性の比較検討

2-1 序論

豚丹毒菌の流行は日本だけでなく世界でも報告されており、様々な血清型の菌が分離されるが、なかでもブタに主として強い病原性を示す豚丹毒菌は血清型 1a、1b および 2 である[1,3,6]。イギリスでは 1987 年から 2015 年に得られた分離株のうち、大部分は血清型 2 (58.6%) であり、血清型 1a (16.4%) と 1b (13.3%) は少数であった[22]。ブラジルでは、1980 年から 2004 年までに得られた分離株の中で血清型 2 (39.7%)最も主流であった[25]。米国のアイオワ州では、2007 年から 2009 年にかけて、血清型 1a (40.7%) と血清型 2 (49.2%) が豚丹毒菌分離株ではほぼ同じ割合で流行していた[23]。一方、1999 年から 2002 年にかけて米国中西部で得られた分離株では、血清型 1a (79.6%) 株が優勢であった[26]。2008 年から 2011 年にかけての日本での散発的な発生では、分離株の 95.2%が血清型 1a であり[13]、2012 年から 2019 年までに得られた分離株を使用した先の研究でも血清型 1a であることが観察できた[27]。

豚丹毒菌の病原性に関わる因子については多くの報告があるが、なかでも菌体表層に発現する Spa(Surface protective antigen)A 抗原がよく研究されている[11,12,16,17,18]。SpaA 遺伝子は、1881 塩基からなるタンパク質読み枠で 626 個のアミノ酸からなる SpaA タンパク質をコードする。SpaA タンパク質を欠失した豚丹毒菌は試験管内では増殖するが、SpaA タンパク質を持つ親株と比較してマウス病原性が著しく低下し、この一方で組み換え体として発現させた SpaA タンパク質で免疫したマウスは致死量の豚丹毒菌攻撃から逃れることができることが知られており[28]、SpaA タンパク質は病原性発揮と感染防御に関わることが明らかになっている[16,17,18,28]。SpaA タンパク質

のカルボキシル末端部分は、*Streptococcus pneumoniae* 菌のコリン結合タンパク質との相同性が高く、実際 SpaA タンパク質のこの部分を介して内皮細胞と菌が結合することが示されている[11]。一方、SpaA タンパク質のアミノ末端側部分は株間で変異が多く認められ、菌特異的免疫に関わっている部分であることが知られている[12]。

2008 年から 2011 年に我が国で分離された血清型 1a の豚丹毒菌の 96.2%が SpaA タンパク質のアミノ末端側の 203 位と 257 位のアミノ酸がメチオニンとイソロイシンに変化した M203/I257-SpaA 変異株を示し、続いて筆者が行なった 2012 年から 2019 年までの調査でも血清型 1a の豚丹毒菌の 74.6% が M203/I257-SpaA 変異株であった[27]。この事実をふまえて本章では、なぜ血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株が日本で優位を占めているのか、その原因を探るため M203/I257-SpaA 変異株の細菌学的特性と病原性に着目し、それらの違いの有無を検証した。具体的には、血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株 2 株と血清型 1b 菌 1 株、血清型 2a 菌 1 株の計 4 株の豚丹毒菌に病原性比較対照株である藤沢株を加えて *in vitro* での細菌学的特性および *in vivo* での病原性の観点から比較検討した。

2-2. 材料および方法

2-3-1. 使用菌株

第一章で使用した菌株のうち特に病原性が高い「Very High」と判断した血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株から 2 株（2012 年宮崎株と 2012 年千葉株）とその他の血清型菌として 1b 株（2015 年宮崎株）、2a 株（2012 年長野株）をそれぞれ 1 つずつ選出し、合計 4 つの株と病原性比較対照株である藤沢株を今回の比較検討に使用した（表 2-1）。以上に加えて、生菌凝集試験（Growth Agglutination test, GA test）用として豚丹毒菌 Mariefelde 株を使用した。これらは BHI-T80 培地に 10~15%グリセロール添加した液体にて使用時まで-80℃で保管していた。Mariefelde 株は農研機構の下地先生のご好意で分与された株である。本章では以降、株名のあとに血清型を括弧で表記する。

2-3-2. 寒天培地におけるコロニーサイズ

菌が形成する寒天平板上のコロニーの大きさを比較するために TPB 培地に 1.0×10^2 CFU/0.5mL となるように各菌株をあらかじめ調製し、TPB 寒天培地に 0.5 mL を塗抹し 37℃好気培養で 6 日間培養した。培養日数は既報を参考にした[29]。培養後、シャーレを OM-DE-M5 デジタルカメラ（OLYMPUS corporation, 東京）と写真撮影装置（DigDog-It System, Analytic Jena, フナコシ株式会社, 東京）とライトボックス 5000（富士フイルムコーポレーション、東京）を用いて撮影し、各菌株のコロニーの面積を Image J 1.53a ソフトウェア（National Institutes of Health, Bethesda, MA）により比較解析した。

2-3-3. 液体培養における増殖曲線

50mL のバイオリアクターチューブ(ビーエム機器株式会社、東京)に 30mL の TPB 培地とあらかじめ 5.0×10^2 CFU/0.3mL に調整した各菌株 0.3 mL を接種し、37℃好気培養にて菌を増殖させた。増殖曲線を作成のため、培養開始時を 0 時間として 3 時間お

きに 24 時間後までサンプリング(約 2 mL)を実施した。サンプリングした液体は吸光度計 U-2900 (日立ハイテクコーポレーション、東京) にて吸光度 630nm (OD_{630}) を計測した。別試験として各菌株の 5.0×10^9 CFU/mL から 10 段階希釈を繰り返し 5.0×10^1 CFU/mL まで下げたものを同様に吸光度計にて OD_{630} を測定し、吸光度と菌数の関係を調べた。ただし、2012 年長野株 (2a) はその株の増殖率の限界から最も多い菌数は 3.5×10^9 CFU/mL であった。これにより吸光度値から CFU/mL を算定できるようにし、各サンプルポイントの点を結んで増殖曲線を描いた。

2-3-4. 豚血管内皮細胞(PECs)における細胞接着性

豚血管内皮細胞 (Porcine endothelial cells, PECs, Code No.ENC01C) をコスモバイオ株式会社より購入し、PECs 専用培地 (コスモバイオ株式会社、東京) にて培養した。豚丹毒菌の細胞接着試験は原田らの文献を参考に実施した[11]。具体的には、24 ウェルプレート面を覆った状態になった PECs をリン酸緩衝食塩水 (PBS) にて洗浄し、あらかじめ 5.0×10^5 CFU/well に調製した各菌株を PECs と混ぜて、 37°C にて 1 時間培養した。培養後は PBS にて 3 回洗浄し、PECs に接着していない豚丹毒菌を除去した。その後、トリプシン処理により慎重に PECs をプレートから剥がした。剥がした PECs を TPB 培地によく攪拌し、攪拌した溶液を TPB 寒天培地に撒き、 37°C 、48 時間好気培養して生菌数判定を実施した。データは 4 回の試験の平均値を示しており、藤沢株が PECs に接着した菌数を 100% として他の菌株の細胞接着数をその相対割合として算出した。

2-3-5. 2 株間競合性試験

試験に供した 5 株のうち 2 株を選択して競合性試験を実施した。競合性試験に使用した各菌株はあらかじめ 5.0×10^2 CFU/0.3mL に調製し、50mL バイオリアクターチューブに TPB 30mL を入れたものに 2 株を各 0.3mL ずつ接種した。 37°C 好気培養にて 15 時間培養し、培養を終えたものをサンプリングした。サンプリングした一部を 10^5 倍希釈し、再び 0.3 mL を 50 mL バイオリアクターチューブに TPB 培地 30 mL を入れたものに

接種し培養するという工程を10回繰り返した。サンプリング溶液中の二つの菌株の有無を確認するためにDNAを抽出し、各株のDNAを特異的に増幅するPCR法にて各菌株の存在を確認した[19,20]。具体的には、血清型1a、1b、2aを判別するMultiplex PCRにより血清型1aの藤沢株・2012年宮崎株・2012年千葉株とそれ以外の2015年宮崎株（1b）と2012年長野株（2a）を区別した[19]。同じ血清型1aである藤沢株と2012年宮崎株と2012年千葉株の区別はそれぞれLineage IV陰性、Lineage IVb-1陽性、Lineage IVb-2陽性という各株の特徴を用いて区別した[20]。PCRのプライマーと反応条件は第一章の1-2-2 血清型別検査、1-2-6 豚丹毒菌 Lineage と地域性の確認のとおり行った。

2-3-6. マウス病原性確認試験

5週齢の10匹のddYマウス（雌、日本SLC、静岡）に約1~2 CFUの各菌株をそれぞれ皮下接種した。接種後14日までマウスの臨床症状と生死を観察した。臨床症状は次に述べる通りにスコアリングした。立毛・眼球異常・足のひきずりを+1、食欲低下や活動レベルの低下を含めた沈鬱状態を+2、うずくまりを+3、人道的エンドポイントを含む死亡を+6とした。本動物実験は実験動物福祉・動物実験管理委員会の承認を受け（承認番号20-067A）、一般財団法人日本生物科学研究所動物実験要領に従い実施した。

2-3-7. 豚病原性確認試験

約8週齢の15頭の豚（LWD：Landrace, White Yorkshire × Duroc）を各菌株につき3頭ずつ試験に供した。1週間の検疫馴化後、各菌株の攻撃菌量約 10^7 CFU/頭を耳根部に皮下接種した。攻撃日から7日間、発熱・食欲不振・沈鬱などの臨床症状を観察した。具体的なスコアリングは次に述べるとおりである。発熱・関節炎・沈鬱を+1とした。発疹は範囲により定め、接種部位のみの発疹は+1、接種部位から頸部までの発疹が+2、頸部を超える全身発疹を+3とした。豚丹毒菌接種により死亡した場合は+5とした。この死亡には人道的エンドポイントも含めた。スコアは毎日つけ、死亡スコアは死亡時から試験終了時まで継続して死亡スコアをつけた。

抗豚丹毒菌抗体価を測定するために生菌凝集試験（GA test）を既報に従って実施した [30,31]。まず血清を 0.2M のメルカプトエタノールと等量混合して 37℃で 1 時間加温し、非特異反応の 1 つになり得る IgM の五量体の鎖を切断した。その後に 0.3% Tris-HCL (pH 7.6) を添加した BHI-T80 培地を等量混合した。最後に 10^7 CFU/mL の豚丹毒菌 Mariefelde 株を生菌抗原として添加して 37℃で 18～24 時間好気培養した。凝集反応が起こった最も高い血清希釈割合を抗体価として判定した。

感染させた豚から豚丹毒菌を再分離するため、豚丹毒菌各株接種後 2 日目に全頭から部分採血し、菌分離に利用した。また、豚の死亡または人道的エンドポイントにより安楽殺となった際には、心臓・脾臓・扁桃・関節液をそれぞれ採材した。豚丹毒菌の分離方法は既報に従い、BHI-T80 寒天培地に抗生剤を添加したもの [13] を使用し、37 °C、48 時間培養にて豚丹毒菌の発育の有無を確認した。平板上に発育した単コロニーから DNA を抽出し、血清型判定 PCR と SpaA PCR 及びその塩基配列決定を組み合わせることにより血液中の菌株を同定した [13,19]。本動物実験は実験動物福祉・動物実験管理委員会の承認を受け（承認番号 20-076A）、一般財団法人日本生物科学研究所動物実験要領に従い実施した。

2-3. 結果

2-3-1. 寒天培地における豚丹毒菌のコロニーの大きさ

世界的に多くの血清型が報告されている豚丹毒菌のうち、豚での流行の主体は血清型 1a,1b,2 である[1,3,6,13,24]。日本国内においては血清型 1a が主流であるが、特に近年では M203/I257-SpaA 変異株が最も多く分離されている[13,27]。この要因を知るために、血清型 1a の藤沢株、同じ血清型の M203/I257-SpaA 変異株 (1a) として 2012 年宮崎株と 2012 年千葉株、血清型 1b 株として 2015 年宮崎株、血清型 2a 株として 2012 年長野株を選択し、株間の比較を試みた。はじめに、寒天培地上のコロニーの大きさを比較した。藤沢株、2012 年宮崎株 (1a)、2012 年千葉株 (1a)、2015 年宮崎株 (1b)、2012 年長野株 (2a) をそれぞれ TPB 寒天平板に個々のコロニーが重ならないよう 1.0×10^2 CFU/plate で撒いた。培養開始後 2 日目から縁辺部のなめらかな乳白色コロニーが観察された。コロニーの形態に菌株間の違いは認められなかった。培養開始後 6 日目の平板を写真撮影し、得られた写真を用いて平板周辺部に位置するコロニーを除いて 100 個のコロニーの面積を計測した。コロニーの大きさには多少のバラツキがあり均一ではなかった。藤沢株、2012 年宮崎株 (1a)、2012 年千葉株 (1a)、2015 年宮崎株 (1b)、2012 年長野株 (2a) それぞれのコロニーの大きさは、算術平均±標準誤差で表記すると、 1.68 ± 0.69 、 0.63 ± 0.40 、 0.69 ± 0.34 、 0.50 ± 0.44 、 $1.36 \pm 0.81 \text{ mm}^2$ であった (図 2-1A)。藤沢株と 2012 年長野株 (2a) は比較的コロニーが大きく、藤沢株と比較して 2012 年宮崎株 (1a)、2012 年千葉株 (1a)、2015 年宮崎株 (1b) のコロニーは有意に小さいという結果になった (図 2-1B)。菌株間で平板上コロニーのサイズに差があることが分かった。

2-3-2. 液体培地における増殖曲線

平板上のコロニーのサイズに差がある要因が菌の増殖速度の差によって生じる可能性を考え、次に液体培養液中の菌の増殖速度を検討した。TPB 液体培地に藤沢株、

2012 年宮崎株 (1a)、2012 年千葉株 (1a)、2015 年宮崎株 (1b)、2012 年長野株 (2a) それぞれを同量接種し、一定時間ごとに菌の濁度(OD_{630})を測定し、各株の OD_{630} と菌数の相関表より培地中の菌濃度を算出した。対数増殖期においては 5 つの株に有意に大きな増殖の差は計測されなかった。一方、定常期の最大増殖菌数において、藤沢株と 2012 年宮崎株 (1a)、2012 年千葉株 (1a) においては 10^{10} CFU/mL まで増殖したのに対し、2015 年宮崎株 (1b)、2012 年長野株 (2a) はそれぞれ 7.0×10^9 CFU/mL と 3.6×10^9 CFU/mL までしか増殖しないという差が観測された (図 2-2A)。特に血清型 2a の 2012 年長野株は他の 3 つの血清型 1a 株の増殖菌数の約半分の最大増殖菌数であった。菌株間で液体培養液中の最大増殖濃度に差が認められた。

2-3-3. PECs 接着試験

豚丹毒菌が豚の体内に侵入する機構として血管内皮細胞への付着が重要であると報告されている[11]。そこで市販の細胞内皮細胞株(PECs)を入手し、菌の細胞接着能を比較した。細胞接着能は、藤沢株が PECs に接着した菌数を 100%として他の菌株の細胞接着数をその相対割合として算出した。藤沢株の PECs への接着率を 100%としたときの 2012 年宮崎株 (1a)、2012 年千葉株 (1a)、2015 年宮崎株 (1b) の接着率は、それぞれの接着率は算術平均 \pm 標準誤差で表記すると、 97.6 ± 74.8 、 104.7 ± 60.2 、 $129.8 \pm 84.7\%$ であり、藤沢株と比較して 2012 年宮崎株 (1a)、2012 年千葉株 (1a)、2015 年宮崎株 (1b) の PECs への接着率に統計的に有意な差は計測されなかった (図 2-2B)。一方、2012 年長野株 (2a) の PECs への接着率は $38.1 \pm 25.5\%$ となり、藤沢株より有意に低かった (図 2-2B)。血清型 2 の菌株と血清型 1a の菌株間に差が認められ、血清型 1a の菌株間においては差が認められなかった。

2-3-4. 2 株による競合性試験

以上の実験では、2012 年長野株 (2a) が平板上のコロニーの大きさ、液体培地での菌の増殖性、豚血管内皮細胞への接着率において他の株と差があることは観察された

が、血清型 1a の藤沢株と M203/I257-SpaA 変異株である 2012 年宮崎株（1a）および 2012 年千葉株（1a）の形態学的有意差は認められなかった。液体培地の増殖試験では、対数増殖期の差を明確化できなかったため、2 つの株を混ぜて競合増殖させ、さらに共継代培養することによりその株間における増殖性の違いを明らかにする手法で再検討した。2 株を等量混合して培養し、一定時間後に希釈して再度培養する操作を 10 回行った。培養液中の菌株は株特異的 PCR を行い、増幅 DNA のサイズから 2 株の存在が識別できるように工夫した。液体培地で定常期の増殖量が低い 2012 年長野株(2a) と 2012 年宮崎株（1a）を混ぜて共継代培養すると、継代培養 3 代目から 2012 年長野株（2a）を示す DNA のバンド増幅が消失し、液体培地での増殖試験で 2012 年長野株(2a)の増殖が悪いという結果が確認された（図 2-3A）。同様に、2012 年千葉株（1a）と 2012 年長野株（2a）を混合し、共継代培養すると継代培養 3 代目からやはり 2012 年長野株（2a）を示す DNA のバンド増幅が消失した（図 2-3B）。更に同様に 2015 年宮崎株（1b）と 2012 年長野株（2a）を混合し、共継代培養すると継代培養 3 代目からやはり 2012 年長野株（2a）を示す DNA のバンド増幅が消失した（図 2-3C）。この条件下で M203/I257-SpaA 変異株である 2012 年宮崎株（1a）と 2012 年千葉株（1a）を混ぜて共継代培養したとき、菌株を示す DNA のバンド増幅は 10 継代に到るまでいずれからも検出され、2 株間の増殖力の違いは認められなかった（図 2-3D）。同様に、藤沢株と M203/I257-SpaA 変異株である 2012 年宮崎株（1a）もしくは 2012 年千葉株（1a）を混合し、共継代培養すると、いずれの菌株においてもそれぞれを示す DNA のバンド増幅は 10 継代に到るまで検出され、増殖力の違いは認められなかった（図 2-3E,F）。以上より、藤沢株と M203/I257-SpaA 変異株である 2012 年宮崎株（1a）および 2012 年千葉株（1a）の 3 株においては継代増殖能力において違いはなく、2012 年長野株（2a）が他の血清型の菌株と共培養すると増殖能力が劣ることが観察された。

2-3-5. マウス病原性確認試験

以上の *in vitro* 実験で示した株の細菌学的な特徴からは M203/I257-SpaA 変異株の 2012 年宮崎株 (1a) および 2012 年千葉株 (1a) の優位性を示すことができなかった。そこで *in vivo* での病原性を評価するために改めてマウス感染実験を試みた。第 1 章で実施したマウス感染実験では約 1.0×10^2 CFU/mouse で接種し、結果的にマウスでの病原性が著しく表れて菌株が採取されたときの豚の症状と相関性が低かったと予想されたため、本実験では接種量を限界まで下げた約 1~2 CFU/mouse とした。各株間のマウスにおける病原性を評価するため、1 群 10 匹のマウスを用意し、それぞれの株を皮下接種して 14 日間の経過観察を行った。藤沢株と 2012 年宮崎株 (1a)、2012 年千葉株 (1a) を接種した群のマウスは接種後 2 日目までは生残したが、いずれの群も接種後 3~4 日目の間に全てのマウスが死亡した (図 2-4A)。一方で、2015 年宮崎株 (1b) 接種群においては 10 匹中 7 匹が接種後 3 日目に死亡したが残りの 3 匹は 14 日目まで生き残るという結果になった。さらに 2012 年長野株 (2a) 接種群においては 10 匹中 2 匹が 3 日目、5 日目と 6 日目にそれぞれ 1 匹の合計 4 匹が死亡し、6 匹が 14 日目まで生残するという結果になった。各菌株を接種したマウスの臨床症状をスコア化し 14 日間の臨床スコアの合計値でそれぞれ株の病原性を評価したところ、藤沢株は算術平均±標準誤差で表記すると、 72.0 ± 1.34 となり、これに対して M203/I257-SpaA 変異株の 2012 年宮崎株 (1a) は 71.2 ± 1.60 、2012 年千葉株 (1a) は 71.8 ± 0.98 となり、ほとんど違いの無いスコアを示した。一方、2015 年宮崎株 (1b) は 52.0 ± 33.24 と低いスコアを示したもののバラツキが大きいため藤沢株と統計的な有意差を示すことはできなかった。この一方で 2012 年長野株 (2a) は 24.4 ± 28.93 となり、臨床症状スコアが藤沢株と比べて統計的な有意に低かった (図 2-4B)。

2-3-6. 豚病原性確認試験

マウスに接種する豚丹毒菌の量を最小限に留めたにも関わらず、2012 年長野株 (2a) を除き、病原性の差を明らかにすることができなかった。そこで次に豚丹毒菌の本来の宿主であるブタを用いて感染実験を行うことで各株間における病原性の違いを見出そ

うと検討した。1 群 3 頭、合計 15 頭の豚を用意し、それぞれの株を皮下接種して 7 日間の経過観察を行うことを計画した。試験に用いる豚の検疫期間中に豚丹毒菌に対する抗体価を生菌凝集反応で測定した。1 頭のみ陰性陽性限界値付近の凝集抗体価 4 を示したが他の 11 頭は全て凝集抗体価 4 未満という結果になり、いずれも抗豚丹毒菌抗体陰性と判断して以降の感染試験に用いた（表 2-2）。接種後 7 日目の凝集抗体価は藤沢株、2012 年宮崎株（1a）、2012 年千葉株（1a）を接種した豚のうち各群 3 頭中 1 頭ずつ生存した豚はいずれも凝集抗体価 32 を示した。一方で 2015 年宮崎株（1b）においては 1 群 3 頭のいずれの豚も抗体価 16 を示し、2012 年長野株（2a）においては 1 群 3 頭中、1 頭が凝集抗体価 16、残り 2 頭が凝集抗体価 4 未満という結果になった。藤沢株、2012 年宮崎株（1a）、2012 年千葉株（1a）および 2015 年宮崎株（1b）を接種した後、7 日間生存した豚の体内では、免疫系を刺激するに十分な量の菌が増殖し、抗体が誘導されたと考えられた。一方、2012 年長野株（2a）を接種した豚では、個体内の菌の増殖が免疫系を刺激するに十分ではないため、接種後 7 日目の段階では抗体誘導が血清型 1a および 1b の株に比べて低いと考えられた。

藤沢株を接種した豚は 1 群 3 頭のうち 2 頭は接種後 4 日目と 5 日目に死亡した。2012 年宮崎株（1a）を接種した豚は 1 群 3 頭のうち 2 頭が 2 日目と 3 日目に死亡した。2012 年千葉株（1a）を接種した豚においても 1 群 3 頭のうち 2 頭が 2 日目に死亡した。一方で 2015 年宮崎株（1b）を接種した豚においては 1 群 3 頭とも 7 日目まで生存したが、接種後 3 日目に発熱を示し、4 日目から 7 日目にかけて蕁麻疹を呈した。さらに 2012 年長野株（2a）においては 1 群 3 頭とも 7 日目まで生存したが、接種後 4 日目と 7 日目に 1 頭ずつそれぞれ発熱を示し、7 日目に発熱した豚は全身発疹も加えて呈した（表 2-2）。接種後の豚の死亡日を見ると藤沢株を接種した群よりも M203/I257-SpaA 変異株の 2012 年宮崎株（1a）あるいは 2012 年千葉株（1a）を接種した群のほうが、1 日早く豚が死亡しており、M203/I257-SpaA 変異株の方も病原性が高い可能性が示唆された。そこで、こ

の差を検証するため死亡に加えて7日間の観察された臨床スコアを合計して総合的に各株における豚の病原性を評価することを試みた。

臨床症状スコアを群ごとにまとめた結果、藤沢株は算術平均±標準誤差で表記すると、 31.3 ± 0.3 、2012年宮崎株（1a）は 29.3 ± 0.9 、2012年千葉株（1a）は 30.0 ± 1.3 、2015年宮崎株（1b）は 15.7 ± 0.9 、2012年長野株（2a）は 4.0 ± 1.7 となった（図 2-5）。豚丹毒菌接種後の豚の死亡日で差が生じた藤沢株を接種した群と M203/I257-SpaA 変異株の 2012年宮崎株（1a）あるいは 2012年千葉株（1a）を接種した群の間に統計的有意差は認められなかった。一方、臨床症状スコアの合計においては、藤沢株接種群と 2015年宮崎株（1b）接種群の間、藤沢株接種群と 2012年長野株（2a）接種群間および、2015年宮崎株（1b）接種群と 2012年長野株（2a）接種群の間に有意差が認められた（図 2-5）。観察期間7日間の臨床症状スコアを接種後日数ごとにまとめてみると群間の臨床症状スコアで有意差があったのは観察期間2日目から7日目であり、特に3日目から5日目では大きな群間有意差が認められた。

2-4. 考察

本章では、なぜ血清型 1a M203/I257-SpaA 変異株が日本で優位に発生しているのか、その原因を血清型 1a M203/I257-SpaA 変異株である 2012 年宮崎株と 2012 年千葉株、血清型 1b 豚丹毒菌である 2015 年宮崎株、血清型 2a 豚丹毒菌である 2012 年長野株を病原性比較対照株である藤沢株と *in vitro* の細菌学的性質および *in vivo* の病原性の観点から比較することで探った。

TPB 寒天培地における各株のコロニーの大きさは藤沢株と 2012 年長野株 (2a) のコロニーが大きく ($1.36\text{--}1.68\text{ mm}^2$)、2012 年宮崎株 (1a)・2012 年千葉株 (1a)・2015 年宮崎株 (1b) のコロニーの大きさは小さい ($0.50\text{--}0.69\text{ mm}^2$) と分類された。同じ豚丹毒菌であるにも関わらず藤沢株と比較して 2012 年宮崎株 (1a)・2012 年千葉株 (1a)・2015 年宮崎株 (1b) のコロニーの大きさは有意に小さいという結果になった (図 2-1B)。これより、近年分離豚丹毒菌の中では血清型 2a の 2012 年長野株だけが用いた他の血清型のコロニーサイズより大きいという違いが認められた。また、液体培養における対数増殖期の増殖速度に関しては、2012 年宮崎株 (1a)・2012 年千葉株 (1a)・2015 年宮崎株 (1b)・2012 年長野株 (2a) の 4 株の有意差は認められなかった。しかし、定常期の最大増殖菌数において、藤沢株と 2012 年宮崎株 (1a)、2012 年千葉株 (1a) では約 10^{10} CFU/mL まで増殖したのに対し、2015 年宮崎株 (1b) の増殖は 7.0×10^9 CFU/mL、2012 年長野株 (2a) の増殖は 3.6×10^9 CFU/mL までと増殖最大菌数に違いが観察された。(図 2-2A)。特に 2012 年宮崎株 (1a) と 2012 年千葉株 (1a) は藤沢株と比較して小さいコロニーを形成するにも関わらず、その増殖速度と増殖最大菌数は藤沢株とほぼ同じであったこと、2012 年長野株 (2a) は藤沢株と同程度の大きさのコロニーを形成するにも関わらず、他の 3 つの血清型 1a 株の増殖菌数の約半分の最大増殖菌数であるという矛盾する結果が得られ、平均コロニーの大きさと増殖速度・最大増殖濃度においては相関関係が低い事が示された。2 株による競合性試験においては藤沢株と 2012 年宮崎株 (1a)、2012 年千

葉株（1a）の3つの株はいずれの2つを選んで競合試験を行っても株間では増殖性に差は認められなかった（図 3-3D,E,F）。しかし、2012 年宮崎株（1a）と 2012 年長野株（2a）、2012 年千葉株（1a）と 2012 年長野株（2a）、2015 年宮崎株（1b）と 2012 年長野株（2a）間においてはいずれの場合も 2012 年長野株（2a）が競合試験を初めてから 3 継代目の段階で消失した（図 3-3A,B,C）。これより、2012 年長野株（2a）においては増殖速度・最大増殖濃度の結果と競合性試験の結果が相関した。

ホスホリルコリン（PCho）は莢膜多糖を修飾し、宿主動物における豚丹毒菌の接着と病原性に重要な役割を果たすことが分かっている[8,11,32]。加えて SpaA タンパク質は豚丹毒菌の菌体表層の莢膜に局在し PCho 残基への結合を介して血管内皮細胞への付着に関与することが知られている[11]。藤沢株と比較して、2012 年宮崎株（1a）と 2012 年千葉株（1a）においては細胞接着性に有意な差はなかった。これより、SpaA タンパク質の 2 か所に変異が入りアミノ酸配列が変化したとしてもこの 2 か所の変化だけでは藤沢株と比較して細胞接着性に影響しないことを示唆した。一方で 2012 年長野株（2a）は藤沢株（1a）と同じ SpaA タンパク質を持っているにも関わらず細胞接着率の有意な低下が観察された。この結果から 2012 年長野株（2a）は SpaA タンパク質以外の菌の細胞接着関連分子の機能が低下していることが推察された。

接種菌量を 1~2 CFU/mouse にしたマウス病原性確認試験において病原性スコアを用いて株を比較したところ藤沢株と比較して 2012 年宮崎株（1a）と 2012 年千葉株（1a）と 2015 年宮崎株（1b）はその病原性の程度に有意差がなかった。一方で、2012 年長野株（2a）においては藤沢株と比較して有意に低い臨床症状スコアを示した（図 2-4A）。これより、2012 年長野株（2a）は PECs 接着力の低さとマウスの病原性の低さにおいて相関関係がみられた。

動物試験をマウスだけでなく豚においても実施したのは、同じ菌株を接種した場合でも評価に使用した動物種によって病原性の程度が異なる場合が報告されていたため

ある[33]。豚における病原性確認試験においては3つの血清型1a豚丹毒菌（藤沢株・2012年宮崎株・2012年千葉株）は2015年宮崎株（1b）との間、及び2012年長野株（2a）との間、ならびに2015年宮崎株（1b）と2012年長野株（2a）との間で臨床症状スコアにおいて有意差が認められた。このため、豚丹毒菌の病原性はマウスでは強く表れる傾向があるが豚ではより幅広く病原性が現れ、病原性の評価という点では効果的に評価し得ると推察された。2012年長野株（2a）の増殖性は他株に比べて劣っており、PECs接着力が低く、マウスと豚における病原性が低いという特性が、日本国内で血清型2a豚丹毒菌の分離が少ない要因になっていると考えられた。

以上より本章では病原性比較対照株である藤沢株と比較して血清型1a M203/I257-SpaA 変異株においては病原性に有意差はないことが明らかとなった。血清型1b豚丹毒菌である2015年宮崎株においてはマウスと豚の病原性確認試験より、藤沢株よりも病原性が有意に低いことが示唆された。血清型2a豚丹毒菌である2012年長野株においては、コロニーサイズ、液体培養での増殖、2株の連続共継代、およびマウスとブタでの病原性の点で、他の株とは異なることが示され、さらにマウスと豚の病原性確認試験より、藤沢株と比較して病原性が低いことが確認できた。これより、病原性は血清型1a変異株、血清型1b株、血清型2a株の順に強く、本章の結果は第一章の血清型1a M203/I257-SpaA 変異株が病原性が強く、広く浸潤している事実を裏付ける結果となった。

2-5. 要旨

本章では、第一章で近年日本国内の分離株の多くを占め、藤沢株と同等に病原性が強いと判断した血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株 2 株と血清型 1b、2a の 4 株を藤沢株と *in vitro*、*in vivo* で比較検討を行い、細菌学的特性および病原性の違いを評価し、国内で主流を占める要因を探索することを試みた。国内での分離数が少ない血清型 1b と 2a 株において、特に血清型 2a の豚丹毒菌は血清型 1a と比較して *in vitro* での増殖性が低く、豚血管内皮細胞との細胞接着性が低く、マウスや豚での *in vivo* 病原性も低いことが分かった。さらに豚を用いた動物試験においては血清型 1a 豚丹毒菌と血清型 1b の菌株間、血清型 1b の菌と血清型 2a の菌株間においても病原性に有意差が認められた。以上のことから、血清型別による病原性の違いは、血清型 1a 変異株が最も病原性が強く、次いで血清型 1b、血清型 2a 豚丹毒菌となった。この結果は第一章の血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株が現在でも日本で流行し、広く浸潤している事実を裏付ける結果となった。

2-6. 図表

表 2-1. 本章で使した菌株とその SpaA 変異部位配列

使した株名と SpaA 変異型（血清型）	ヌクレオチド配列の違い（アミノ酸配列）				
	555	584	609	726	769
	(185)	(195)	(203)	(242)	(257)
藤沢株(1a)	CCC (P)	GAT (D)	ATT (I)	GAG (Q)	CTT (K)
2012 年宮崎株、M203/I257-SpaA (1a)	CCC (P)	GAT (D)	AT <u>G</u> (M)	GAG (Q)	<u>A</u> TT (I)
2012 年千葉株、M203/I257-SpaA (1a)	CCC (P)	GAT (D)	AT <u>G</u> (M)	GAG (Q)	<u>A</u> TT (I)
2015 年宮崎株 (1b)	CC <u>A</u> (P)	GAT (D)	ATT (I)	GAG (Q)	<u>A</u> TT (I)
2012 年長野株 (2a)	CC <u>A</u> (P)	<u>A</u> AT (N)	ATT (I)	GAG (Q)	<u>A</u> TT (I)

SpaA 遺伝子の変異塩基部位をその位置とアンダーラインで、コードされるアミノ酸を()内にその位置と 1 文字コードで示す。

表 2-2. 豚丹毒菌接種後の臨床症状など

豚 番号*1	接種後の豚の反応			生菌凝集試験抗体価		血液中に含まれ る菌数 [CFU/mL]
	接種株 SpaA 変異型 (血清型)	最高体温 [°C] (日)*2	生存率 (死亡日)	接種前	接種後	
580	藤沢株 (1a)	41.9 (3d)	生存	< 4	32	NT*3
593		41.7 (2d)	死亡 (4d)	< 4	NT*3	1.8×10^3
596		41.4 (3d)	死亡 (5d)	4	NT*3	1.9×10^3
584	2012 年宮崎株 M203/I257- SpaA (1a)	39.9 (1d)	死亡 (2d)	< 4	NT*3	4.4×10^3
588		39.9 (2d)	死亡 (3d)	< 4	NT*3	2.9×10^4
589		41.3 (3d)	生存	< 4	32	6.6×10^3
583	2012 年千葉株 M203/I257- SpaA (1a)	39.5 (1d)	死亡 (2d)	< 4	NT*3	1.8×10^4
592		41.4 (1d)	生存	< 4	32	3.2×10^3
595		39.4 (1d)	死亡 (2d)	< 4	NT*4	4.8×10^4
582	2015 年宮崎株 (1b)	40.5 (3d)	生存	< 4	16	Undetectable
591		40.3 (3d)	生存	< 4	16	Undetectable
594		40.2 (3d)	生存	< 4	16	Undetectable
585	2012 年長野株 (2a)	40.7 (4d)	生存	< 4	16	Undetectable
587		39.2 (1d)	生存	< 4	< 4	Undetectable
590		41.4 (7d)	生存	< 4	< 4	Undetectable

*1 豚は雌雄区別することなく各群で使用した。*2 観察期間中に記録した最大体温とその日を記録した。*3 NT; 未実施

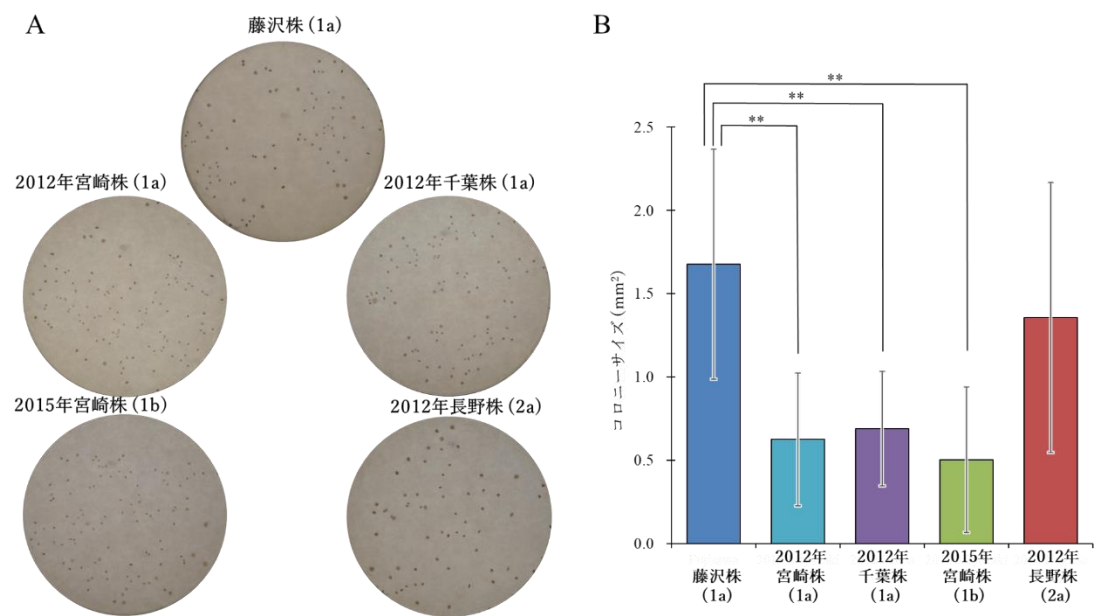


図 2-1. 豚丹毒菌各株のコロニーの大きさ

A) TPB 寒天培地に撒いた豚丹毒菌各株の様子 B) コロニーサイズ解析 縦棒は標準誤差を示す。有意差**($p < 0.05$)

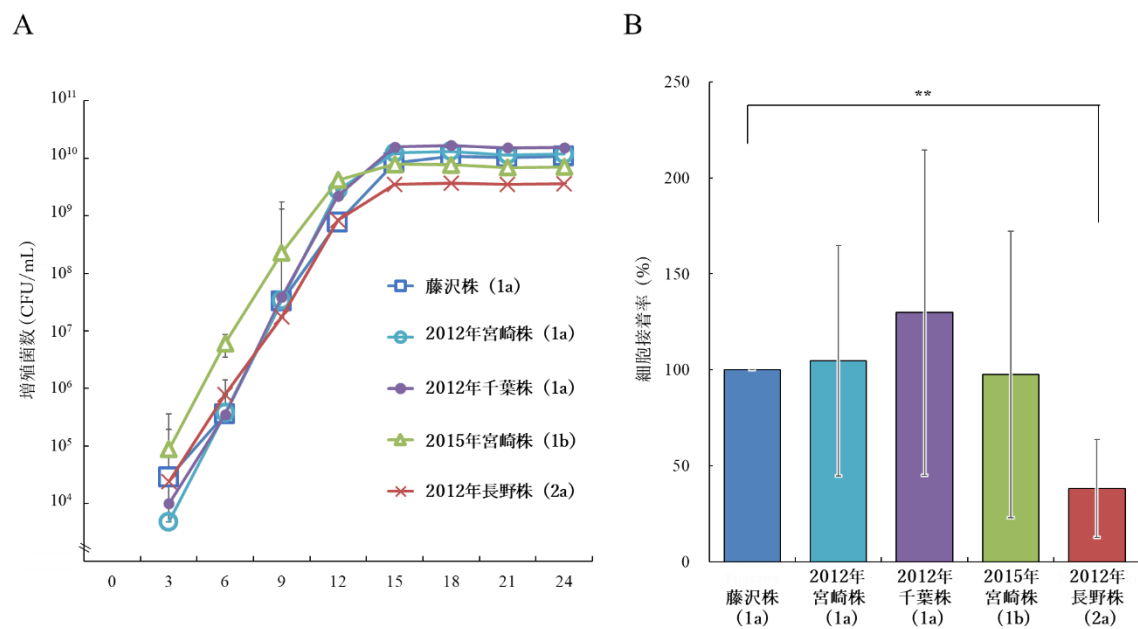
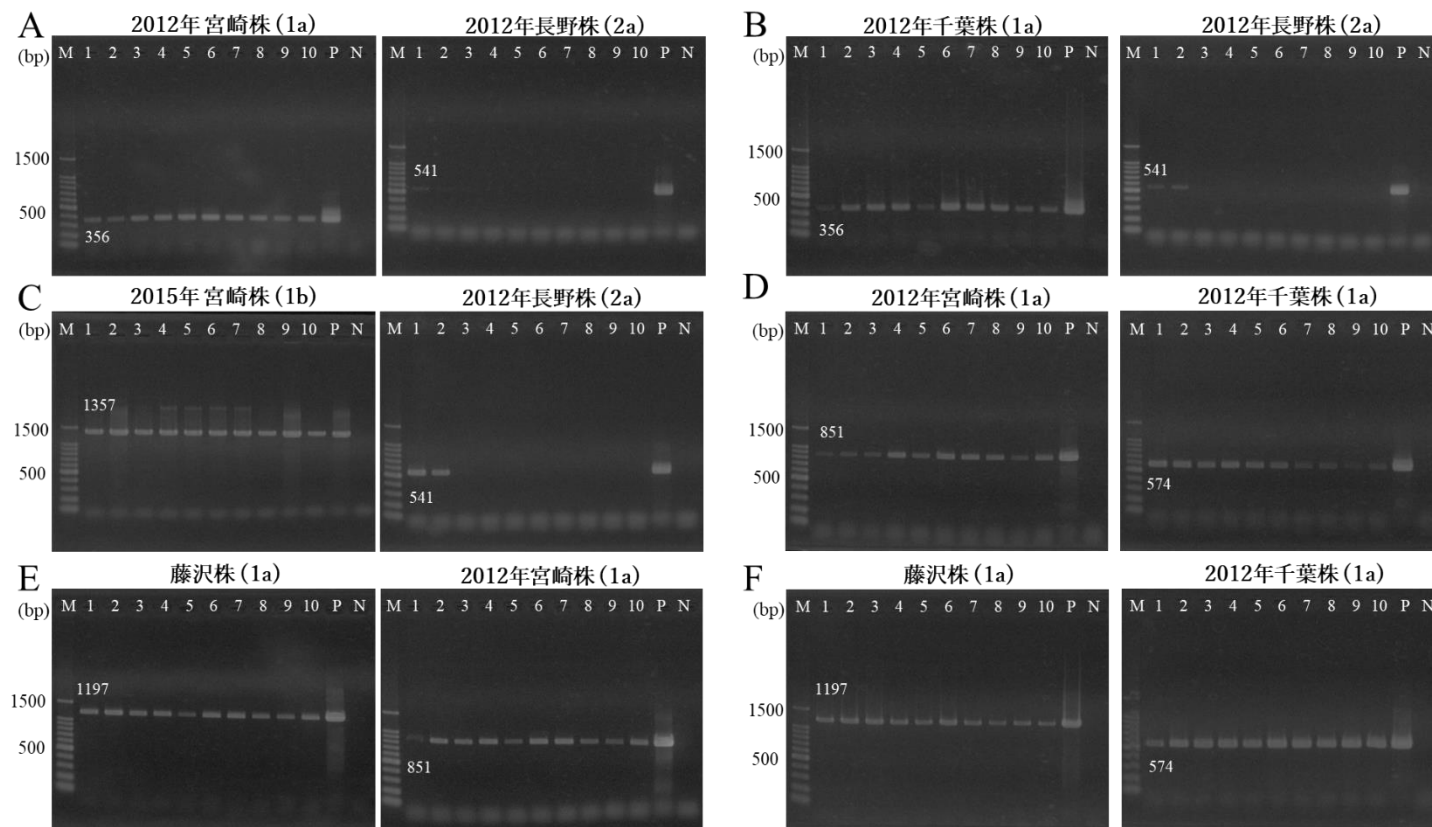


図 2-2. 豚丹毒菌の液体培養における増殖と細胞接着率

A) TPB 培地における増殖曲線 縦棒は標準誤差を示す。B) PEC における細胞接着率

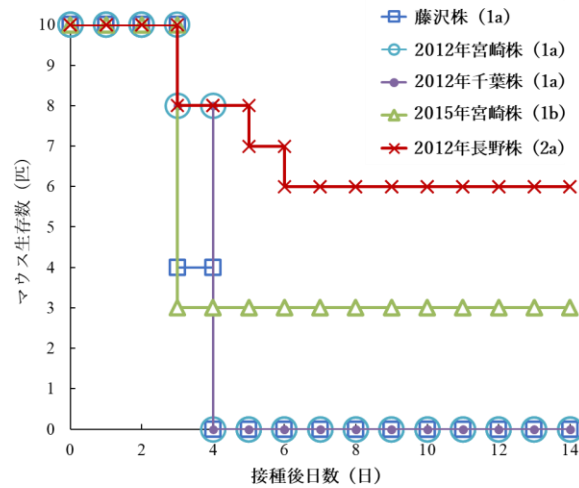
縦棒は標準誤差を示す。有意差**($p < 0.05$)



2-3. 豚丹毒菌 2 株による競合性試験

試験に供した 5 株のうち 2 株を選択して 10 回継代培養を繰り返した。それぞれの図の上の数字が継代数を示す。図の中の数字は株特異的に増幅される DNA のサイズ(bp)を示す。M は DNA サイズマーカー(bp)、P は陽性対照、N は陰性対照を示す。A) 2012 年宮崎株 (1a) と 2012 年長野株 (2a) による競合性試験。B) 2012 年千葉株 (1a) と 2012 年長野株 (2a) による競合性試験。C) 2015 年宮崎株 (1b) と 2012 年長野株 (2a) による競合性試験。D) 2012 年宮崎株 (1a) と 2012 年千葉株 (1a) による競合性試験。E) 藤沢株と 2012 年宮崎株 (1a) による競合性試験。F) 藤沢株と 2012 年千葉株 (1a) による競合性試験。

A



B

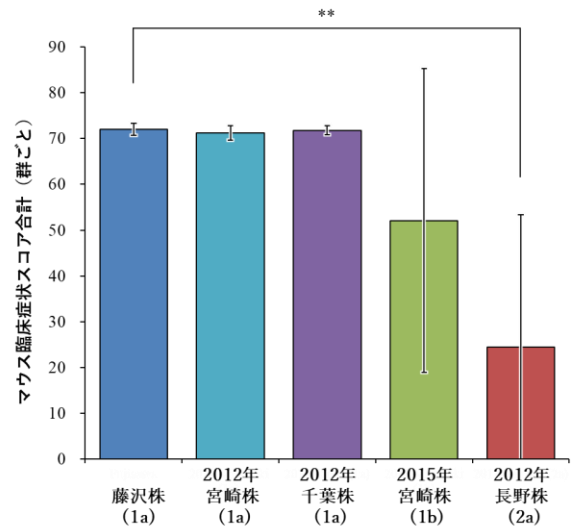


図 2-4. マウス病原性確認試験

A) 豚丹毒菌各株を接種後のマウスの 14 日間の生存数を Kaplan・マイヤープロットで示す。B) 豚丹毒菌各株の観察期間中の臨床症状スコアの合計値を株ごとに比較したもの。縦棒は標準誤差を示す。有意差**($p < 0.05$)

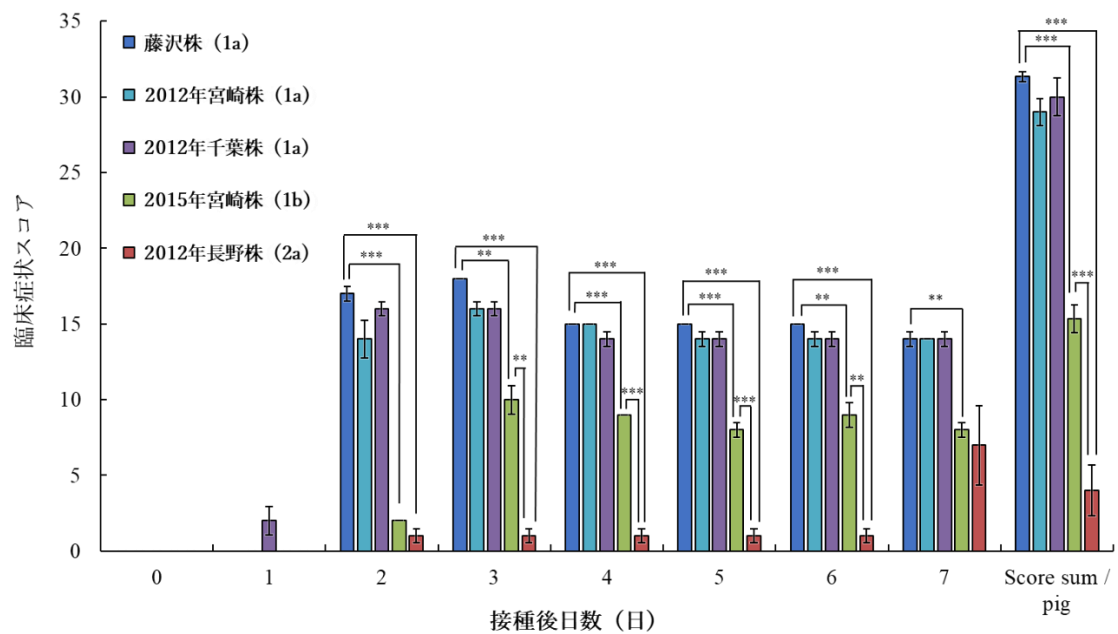


図 2-5. 豚病原性確認試験

豚丹毒菌各株接種後の臨床症状スコアを株ごとにまとめたものを日ごと(0-7日)と観察期間中の合計値で示している。縦棒は標準誤差を示す。有意差***($p < 0.01$)、**($p < 0.05$)

第三章

豚丹毒不活化ワクチン（SER-ME）の M203/I257-SpaA 変異株に対する豚での有効性

3-1 序論

2008 年から 2011 年の我が国の豚丹毒菌の流行は主に血清型 1a 豚丹毒菌によって引き起こされ、そのほとんど(96.2%)が M203/I257-SpaA 変異株であった[13]。その後の調査である本章第一章では、2012 年から 2019 年の間に日本各地から得た 79 株の分離株調査でも引き続き M203/I257-SpaA 変異株が流行している(56 株/79 株、70.8%)ことを確認した[27]。続いて第二章では、M203/I257-SpaA 変異株が国内分離株の優勢を占める要因を探るため、血清型 1a の藤沢株と血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株から 2 株、1b、2a 株からそれぞれ 1 株を選び、それら 5 株の血清型別細菌学的特性およびマウスと豚に対する病原性を比較検討した。血清型 2a 株が液体培地での増速性および豚血管内皮細胞に対する細胞接着能が血清型 1a と 1b の株と比べて劣っており、マウスと豚における病原性においては血清型 1a 変異株の病原性が最も強く、次いで血清型 1b 株、血清型 2a 株であることが認められた[34]。そこで次に国内で使用されている豚丹毒ワクチンの M203/I257-SpaA 変異株への有効性について検討することにした。

かつて豚丹毒菌の発生は 1960 年代に年間数万頭というピークに達したが、アクリフラビン添加寒天平板培地で継代して弱毒化した豚丹毒菌が 1970 年代にアクリフラビン耐性弱毒豚丹毒菌小金井 65-0.15 株（血清型 1a）生ワクチンとして承認され、普及したことでその発生は激減した（図 1）。2000 年代初頭には生ワクチンを接種された豚における病原性復帰疑い例が一部で指摘された[35]が、生ワクチンを投与することにおける豚丹毒発生の予防効果の利益の方が病原性復帰疑い例によるリスクの方よりも大きいという議論で落ち着いた[36]。1997 年代以降は豚丹毒不活化ワクチンが普及し、豚を飼育する農家は生ワクチンと不活化ワクチンのどちらかを選択できるようになり、現在に至っている。近年、豚丹毒ワクチンの使用量の半分以上が不活化ワクチンになっている（図 2）。豚丹毒菌ワクチンの接種率は 2006 年の豚熱ワクチンとの同時接種がされなくなったことを背

景に接種率が減少しており、現在では全体の 60%程度とされている[37]。

従来から広く国内で使われている豚丹毒生ワクチン（1a 弱毒型小金井株）の M203/I257-SpaA 変異株に対する有効性に関しては、2014 年に内山ら[38]が豚を使って防御効果を示すことを報告している。内山らはマウスを使って当時流通していた複数の不活化豚丹毒ワクチン（商品名非公開）をマウスに接種して M203/I257-SpaA 変異株に対する有効性を示してはいるが、血清型 2a を抗原とする不活化ワクチンの M203/I257-SpaA 変異株に対する豚における効果は調べられていない。そこで、本章では血清型 2a の豚丹毒菌多摩-96 株を抗原とする豚丹毒菌不活化ワクチン（スワインテクト SER-ME、日生研株式会社）を用いた豚での免疫・攻撃試験にて M203/I257-SpaA 変異株に対する不活化ワクチンの有効性を病原性比較対照株である藤沢株攻撃群と比較検証した。



図1 日本における豚丹毒菌の発生状況 (農林水産省 監視伝染病の発生状況より改変)

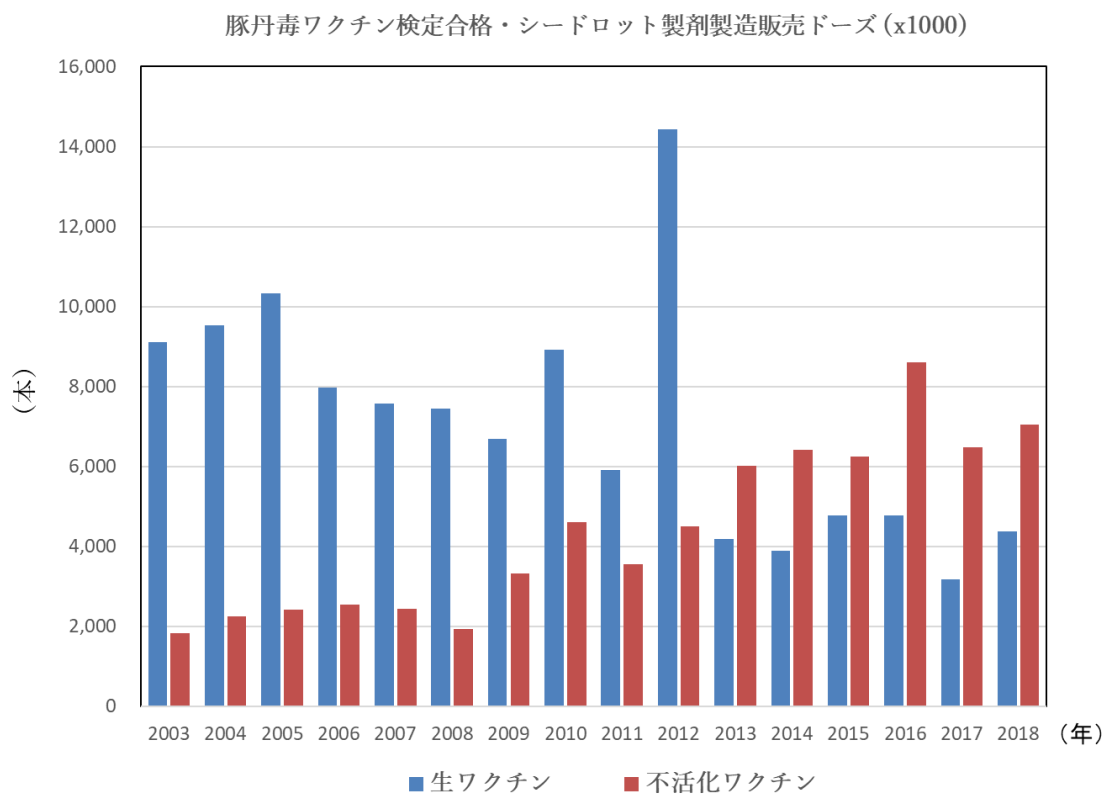


図2 豚丹毒ワクチンの種類と販売本数の推移（動物医薬品検査所 検定・検査情報より改変）

3-2. 材料および方法

3-2-1. 使用菌株

第一章と第二章で使用した血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株である 2012 年宮崎株と血清型 1a の 藤沢株を使用した（表 3-1）。以上に加えて、生菌凝集試験（Growth Agglutination test, GA test）用として豚丹毒菌 Marienfelde 株を使用した。これらは BHI-T80 培地に 10~15%グリセロール添加した液体にて使用時まで-80℃で保管していた。液体培地の性状・生菌数測定法・SpaA 遺伝子配列解析に関しては第一章の材料および方法と同様の 1-2-3・1-2-4・1-2-5 の通り行った。GA test については、第二章の材料および方法と同様の 2-3-7 の通り行った。

3-2-2. 使用したワクチンと免疫方法

血清型 2a の豚丹毒菌（多摩-96 株）を抗原とする豚丹毒菌不活化ワクチン（スワインテクト SER-ME、日生研株式会社）を用法・用量に従い使用した。本試験では 1 回 0.5mL を 3 週間隔で 2 回、豚に筋肉内投与した。

3-2-3. 豚におけるワクチンの有効性確認試験

約 4 週齢の 16 頭の豚（LWD：Landrace, White Yorkshire × Duroc）を試験に供した。群わけは、まず藤沢株攻撃群と 2012 年宮崎株(1a)攻撃群の 2 つに分け、さらにその中でワクチン投与群とワクチン非投与群の各 4 頭ずつの合計 4 群を設けて免疫・攻撃試験を実施した（表 3-2）。豚は導入後、1 週間の検疫馴化期間を経て 1 回目の免疫をし、その 3 週間後に 2 回目の免疫、最終免疫から 2 週間後に豚丹毒菌各株を約 10^7 CFU/頭に皮下接種攻撃した。豚丹毒菌接種後は 2 週間の臨床症状期間を設け、第二章と同様に臨床症状スコアを毎日記録し、スコアの合計値を求め、その値を統計学的に処理して有効性を評価した。

抗体価を測定するために生菌凝集試験（GA test）及び、市販の抗豚丹毒菌抗体測定 ELISA キット（CIVTEST SUIS SE/MR indirect ELISA kit; HIPRA、Amer、Spain）を

用いて抗体価測定を実施した。ELISA 測定は製造所が添付する手順書類に従って実施した。抗体価を測定するために 5 つのポイントにて豚の採血を行った。初回ワクチン接種直前 1 回目時（0 日目）、初回目免疫後 2 週目時（14 日目）、2 回目免疫直前時（21 日目）、攻撃直前時（35 日目）、試験観察期間終了時（49 日目）の 5 点である。試験終了時はワクチン接種群と非接種群とで生残している個体にバラツキがあり、試験終了時（49 日目）以前に死亡もしくは人道的エンドポイントに至った豚の試験終了時（49 日目）の抗体価試験結果は割愛した。

感染させた豚から豚丹毒菌を再分離するため、以上に示した採血日とは別に豚丹毒菌各株攻撃後 3 日目の豚の採血をした。また、豚が死亡または人道的エンドポイントに到り、安楽殺となった際には、心臓・肝臓・脾臓・腎臓・肺・関節液・下顎リンパ節をそれぞれ採材した。豚丹毒菌の分離方法は既報に従い[13]、第二章の材料および方法と同様の 2-3-7 の通り行った。PCR と *SpaA* 遺伝子配列解析は第一章の材料と方法の 1-2-5 の通り行った。本動物実験は実験動物福祉・動物実験管理委員会の承認を受け（承認番号 21-063A）、一般財団法人日本生物科学研究所動物実験要領に従い実施した。

3-3. 結果

3-3-1. 不活化豚丹毒ワクチン投与後における豚の反応と抗体価の推移

1 回目ワクチン接種時に投与した群 1 と群 3 の 8 頭のうち 4 頭において接種部位の腫れ、2 頭に接種部位の硬結、2 頭に発熱 ($>40.5^{\circ}\text{C}$) を認めた (表 3-2)。2 回目ワクチン接種時には投与した群 1 と群 3 の 8 頭のうち 2 頭で接種部位の硬結を認めたが、それ以外の部位あるいは豚では臨床症状は観察されなかった (表 3-1)。

ワクチンによる豚丹毒菌に対する免疫応答を確かめるため ELISA kit により抗体価を測定した。ワクチン接種直前の豚丹毒菌に対する抗体価はすべての群の豚で測定されず、母豚からの移行抗体、あるいは感染抗体の影響は無視できることが示された。ワクチン投与群である群 1 と群 3 においては 1 回目のワクチン接種後 2 週目 (14 日目) および 2 回目のワクチン接種直前 (21 日目) では ELISA 抗体価の上昇は検出されなかったが、2 回目免疫後 2 週目にあたる攻撃直前時 (35 日目) に抗体価の上昇が確認出来た (図 3-1A)。一方でワクチン非接種群である群 2 と 4 においてはどの期間においても抗体価の上昇は認められなかった (図 3-1A)。豚丹毒菌抗体測定 ELISA kit に加えて抗体価の上昇をより確定的なものにするために生菌凝集試験 (GA test) を合わせて実施した。ワクチン接種群である群 1 と群 3 においては 1 回目のワクチン接種後 2 週目 (14 日目) および 2 回目のワクチン接種直前 (21 日目) では GA 抗体値の上昇は検出されなかったが、2 回目免疫後 2 週目にあたる攻撃直前時 (35 日目) に抗体価の上昇が確認出来た (図 3-1B)。一方でワクチン非投与群である群 2 と 4 においては 14 日目、21 日目、35 日目のいずれの期間も抗体価の上昇は認められなかった (図 3-1B)。しかし、初回免疫直前にいくつかの豚で GA 抗体価 4 倍が観察された。これより、ELISA kit による抗体価と生菌凝集試験の抗体価は概ね一致しており相関性は高いが、GA 抗体価 4 倍程度の場合は GA test の信頼性が低いことが分かった。どちらの抗体価試験においても群 1 の豚個体が 1 頭だけ抗体価の上昇があまり大きくなかった。

3-3-2. 豚におけるワクチンの有効性

豚丹毒不活化ワクチン（SER-ME）の M203/I257-SpaA 変異株に対する有効性を検討するために、変異株と従来株接種豚の感染防御能を比較した。ワクチン接種群である群 1 と群 3 とワクチン非接種群である群 2 と群 4 において、群 1 と群 2 は藤沢株（1a）攻撃群、群 3 と群 4 は M203/I257-SpaA 変異株である 2012 年宮崎株（1a）攻撃群とした。ワクチン非接種群である群 2 と 4 において群 2 は藤沢株攻撃群、群 4 は 2012 年宮崎株（1a）攻撃群であるが、いずれの場合も豚丹毒菌症状を示し、試験期間中に人道的エンドポイントによる安楽殺も含めて全頭が死亡した（表 3-3）。具体的には群 2 においては藤沢株接種後 3 日目に 2 頭死亡し、4 日目に 1 頭死亡、9 日目に 1 頭死亡した（図 3-2B）。群 4 においては全頭が 2012 年宮崎株（1a）接種後 3 日目に全頭死亡した（図 3-2B）。群 2 と群 4 における 14 日間の発熱・食欲不振・沈鬱などの臨床症状スコアの合計値は、算術平均±標準誤差で表記すると、1 頭あたりそれぞれ 84.0 ± 1.9 と 89.75 ± 0.11 となった。（図 3-2A）。群 2 と群 4 における統計学的有意差（ $p < 0.01$ ）はみられなかった。一方で、ワクチンを接種した群 1 と群 3 のいずれの豚も攻撃後に臨床症状が観察されることなく臨床症状スコアの合計値は 0 として試験期間を終えた（表 3-3）。このため、ワクチンは従来株である血清型 1a 豚丹毒菌と現在の流行株である M203/I257-SpaA 変異株のいずれにも有効であることが確認された。

攻撃した豚丹毒菌株が豚の体内に残存しているかどうか、及び接種した株が群を超えて感染していないかを調べるため、攻撃した豚の血液から菌分離を行った。ワクチン投与群である群 1 と 3 においては、ワクチンで誘導された免疫により攻撃菌の増殖が抑えられたため、いずれの血液・臓器からも豚丹毒菌を分離することは出来なかった（表 3-4）。一方、ワクチン非接種群である群 2 と群 4 においては血液から $10^2 \sim 10^7$ CFU/mL の豚丹毒菌を分離出来た（表 3-4）。分離出来た豚丹毒菌は各分離臓器・血液から代表的なコロニーを選出して DNA を抽出した後に SpaA PCR ならびに遺伝子配列解析をしたところ、攻撃株と血液から分離された株が一致することが確認され、攻撃期間中に菌が群を超

えて感染してないことを裏付けた。

3-4. 考察

本章では、血清型 2a の豚丹毒菌（多摩-96 株）を抗原とする豚丹毒菌不活化ワクチン（スワインテクト SER-ME、日生研株式会社）に関して、豚を用いた免疫・攻撃試験を行って従来株である藤沢株と M203/I257-SpaA 変異株である 2012 年宮崎株（1a）に対する有効性を比較した。

致死量の dose で攻撃したのにも関わらず攻撃株の SpaA の変異の有無に関わらず、ワクチンを接種した全ての豚は攻撃後に臨床症状が観察されることはなかった。さらに、観察期間終了後にワクチン接種した豚の血液から攻撃株を分離することも出来なかった。加えて、ワクチン非接種対照群においては攻撃株に関わらず発熱や全身発疹をはじめとする豚丹毒菌特有の臨床症状を示し、その臨床症状スコアの有意差がなく、藤沢株と M203/I257-SpaA 変異株である 2012 年宮崎株（1a）における病原性の違いを見出すことは出来なかった。この事実は、第二章で得られた結果を再現した。ワクチンを接種した群の豚では用いた二つの攻撃株の種類によらず、どちらにもワクチンによる有効性が確認されたことから、ワクチンにより惹起された防御免疫は、SpaA の変異の有無によらず有効であることが示唆された。さらに、ワクチン投与群である群 3 の 1 頭は十分な抗体価上昇が観察されなかったにも関わらず豚丹毒菌攻撃を防御したことを踏まえると、必ずしも抗体価の上昇が豚丹毒菌防御の必要十分な条件ではないことも示唆した。これまでの研究において従来から広く国内で使われてきた豚丹毒生ワクチン（1a 弱毒型小金井株）が豚で、3 種類の不活化ワクチンがマウスで M203/I257-SpaA 変異株に対して有効であることが報告されている[37]。今回は初めて豚で血清型 2a を抗原とする不活化ワクチンとしてスワインテクト SER-ME ワクチンが M203/I257-SpaA 変異株に対して有効であることが確認できた。現在使用されている豚丹毒ワクチン全てにおいて M203/I257-SpaA 変異株に対する有効性を確認したわけではないが、我が国で使われている豚丹毒ワクチンがいずれもスワインテクト SER-ME ワクチン同様に従来型 SpaA 抗原並びに豚丹菌体を含んでいることを考えると、どのワクチンも同様に感染防御効果があると類推された。以上のことから、

M203/I257-SpaA 変異株の国内流行の原因は我が国で使われている豚丹毒ワクチンの有効性が M203/I257-SpaA 変異株に対して低いために生じたものではないこと、すなわちブレイクスルー感染ではないことが明らかとなった。

豚丹毒菌は土壌や廃水を含む自然環境や野生動物を媒介としている[1,3]。さらには健康な豚にも一定の割合で未発症持続感染キャリアが存在するとされている[5,6]。このため、養豚場では飼育豚にワクチンを接種すると同時に良好な飼育環境を維持し、農場外からの豚丹毒菌の侵入を防ぐことも非常に重要であると考えられる。本研究では M203/I257-SpaA 変異株に対して既存のワクチン接種でも有効であることを示したが、ワクチン接種への過度の依存は、良好な飼育環境への配慮不足になる可能性があるため、両方のバランスを保つ必要がある。つまり、用法・用量に従った正しいワクチン接種と農場における衛生管理の両方が豚丹毒菌を防ぐためには重要である。同時に豚丹毒菌は宿主範囲が非常に広く、マウス・ラット・鶏・イノシシなどへの感染が確認されている[1,3]。環境中や豚以外の他の媒介動物における M203/I257-SpaA 変異株の有意性を今後検討していく必要がある。

3-5. 要旨

近年、日本国内で分離される豚丹毒菌の多くを占める血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異型菌の優位性の要因を第二章では試験管内の細菌学的特性、並びに個体レベルでの病原性の観点から血清型 1a の藤沢株と比較して検討する事を試みたが、要因を示せなかった。そこで第三章では、豚丹毒菌ワクチンの血清型 2a の M203/I257-SpaA 変異株に対する有効性を検討することにした。内山らは、既に従来から広く国内で使われて獣医公衆衛生上大きく貢献してきた弱毒豚丹毒生ワクチン（血清型 1a 小金井株）を接種した豚は、M203/I257-SpaA 変異株の攻撃にも防御効果を示すことを報告している[37]。近年、我が国では豚丹毒ワクチンの半分以上を不活化ワクチンが占めることから、本章では血清型 2a の豚丹毒菌多摩-96 株を抗原とする豚丹毒菌不活化ワクチン（スワインテクト SER-ME、日生研株式会社）を例にして、豚を用いた防御・攻撃試験を行って M203/I257-SpaA 変異株に対する有効性を検証した。

血液中の豚丹毒菌抗体陰性の豚を 4 頭ずつ 4 群に振り分け、2 つの群 8 頭にそれぞれ不活化豚丹毒ワクチン SER-ME を接種した。前 2 群とは別に非接種の対照群を 2 群設定し、攻撃株として血清型 1a の藤沢株または M203/I257-SpaA 変異株の 2012 年宮崎株を用いた。豚丹毒菌に対する抗体価を GA test 並びに市販の ELISA キットで測定すると、試験開始時には全例陰性であったものが、ワクチンを接種した豚 8 頭は 2 回目免疫後 2 週間後にあたる攻撃直前時（初回接種後 35 日目）に抗体価が上昇した。非接種対照群は藤沢株攻撃群（群 2）においては攻撃後 3 日目で 4 頭中 2 頭が死亡、4 日目に 1 頭死亡、更に 9 日目に 1 頭死亡という経過をたどった。非接種対照群の 2012 年宮崎株（1a）攻撃群（群 4）においては安楽殺 1 頭も含めて、攻撃後 3 日目で 4 頭全頭が死亡し、藤沢株ならびに M203/I257-SpaA 変異株である 2012 年宮崎株はどちらも致死量の攻撃が行われたことが示された。このとき、不活化豚丹毒ワクチンを接種した 2 群の豚 8 頭は、藤沢株もしくは M203/I257-SpaA 変異株の 2012 年宮崎株攻撃によらず、観察期間中いずれの豚も発

熱あるいは紅斑などの豚丹毒症状を示すことなく生残した。以上より、血清型 2a の豚丹毒菌を抗原とする不活化ワクチンは、豚で M203/I257-SpaA 変異株に対しても従来株同等に有効であることを示した。従って、M203/I257-SpaA 変異株の国内流行の原因は、SpaA 変異株に対してワクチンの防御効果が不十分という理由ではないことが明らかとなった。

このことは、M203/I257-SpaA 変異株で優位に流行するための別の背景要因があることを示した。たとえば、豚丹毒菌は広い宿主域をもち、豚以外の保菌動物が流行を媒介しており、その動物で変異株が他株に対して優位性を有している可能性、もしくは豚丹毒菌は汚水や土壌中等の自然環境中でも存在し得る特性有していることから、それら自然環境中で変異株が優位性を有している可能性が考えられた。

3-6. 図表

表 3-1. ワクチン株と使用菌株の特徴とその SpaA 変異部位配列

株名と SpaA-変異型 (血清型)	SpaA 遺伝子におけるヌクレオチドの違い (アミノ酸配列)			
	555 (185)	584 (195)	609 (203)	769 (257)
Koganei 65-0.15 (1a)	CCC (P)	GAT (D)	ATT (I)	<u>A</u> TT (<u>I</u>)
Tama-96 (2a)	CC <u>A</u> (P)	GAT (D)	ATT (I)	CTT (K)
Fujisawa (1a)	CCC (P)	GAT (D)	ATT (I)	CTT (K)
2012 Miyazaki, M203/I257 SpaA (1a)	CCC (P)	GAT (D)	AT <u>G</u> (<u>M</u>)	<u>A</u> TT (<u>I</u>)

SpaA 遺伝子の変異塩基部位をその位置とアンダーラインで、コードされるアミノ酸を()内にその位置と 1 文字コードで示す。

表 3-2. ワクチン投与後の豚の反応

群	豚 番号	ワクチン 投与有無	1 回目免疫時				2 回目免疫時			
			腫脹*1	硬結*2	発熱*3	元気消失*4	腫脹*1	硬結*2	発熱*3	元気消失*4
1	1	投与群 (SER-ME)	-	-	-	-	-	-	-	-
	2		-	-	-	-	-	+	-	-
	3		-	-	+	-	-	+	-	-
	4		+	+	-	-	-	-	-	-
2	5	非投与群 (対照群)	異常なし							
	6									
	7									
3	8	投与群 (SER-ME)	+	+	-	-	-	-	-	-
	9		+	-	+	-	-	-	-	-
	10		+	-	-	-	-	-	-	-
	11		-	-	-	-	-	-	-	-
4	12	非投与群 (対照群)	異常なし							
	13									
	14									
	15									
	16									

ワクチン投与後 7 日間の臨床観察を行った。+ は反応陽性、- は反応陰性を示す。

*1 ワクチン接種部位の腫れ。 *2 ワクチン接種部位の硬結。 *3 40.5℃以上を発熱と定義。 *4 食欲不振や沈鬱などの臨床症状を指す。

表 3-3. 豚丹毒菌攻撃後の豚の臨床症状

群	豚番号	ワクチン 投与有無	攻撃株	発現した臨床症状				血液からの菌分離*3
				発熱(° C) *1	発疹 *2	沈鬱	生死	
1	1		藤沢株(1a)	—	—	—	生存	検出限界以下
	2	投与群		—	—	—	生存	検出限界以下
	3	(SER-ME)		—	—	—	生存	検出限界以下
	4			—	—	—	生存	検出限界以下
2	5		藤沢株(1a)	41.5	+++	+	死亡 (9日目)	2.2×10^2
	6	非投与群		41.4	+++	+	死亡 (3日目)	4.9×10^5
	7	(対照群)		41.7	+++	+	死亡 (3日目)	2.3×10^3
	8			41.8	+++	+	死亡 (4日目)	5.0×10^3
3	9		2012年 宮崎株(1a)	—	—	—	生存	検出限界以下
	10	投与群		—	—	—	生存	検出限界以下
	11	(SER-ME)		—	—	—	生存	検出限界以下
	12			—	—	—	生存	検出限界以下
4	13		(M203/I257)	41.7	+++	+	死亡 (3日目)	8.2×10^5
	14	非投与群		41.7	+++	+	死亡 (3日目)	1.8×10^7
	15	(対照群)		41.7	+++	+	死亡 (3日目)	1.2×10^6
	16			41.9	+++	+	死亡 (3日目)	9.1×10^5

*1 40.5℃以上の体温を発熱とし、観察期間中（14 日間）における最大体温を示す。*2 接種反応； + 接種部位のみの発疹、++ 接種部位から頸部にかけての発疹、+++ 全身発疹。*3 豚丹毒菌接種後 3 日目の血液中の菌数（CFU/mL）を示す。血液塗抹平板培地にコロニーが検出されなかった場合を検出限界以下（ 1.0×10^1 CFU/mL 以下）と示した。

表 3-4. 各臓器からの豚丹毒菌の分離状況

群	豚番号	ワクチン 投与有無	攻撃株	分離臓器*1						
				心臓	肝臓	脾臓	腎臓	肺	関節液	下顎 リンパ節
1	1	投与群 (SER-ME)	藤沢株(1a)	—	—	—	—	—	—	—
	2			—	—	—	—	—	—	—
	3			—	—	—	—	—	—	—
	4			—	—	—	—	—	—	—
2	5	非投与群 (対照群)	藤沢株(1a)	+	+	+	+	+	+	+
	6			+	+	+	+	+	+	+
	7			+	+	+	+	+	+	+
	8			+	+	+	+	+	+	—
3	9	投与群 (SER-ME)	2012 年 宮崎株(1a) (M203/I257)	—	—	—	—	—	—	—
	10			—	—	—	—	—	—	—
	11			—	—	—	—	—	—	—
	12			—	—	—	—	—	—	—
4	13	非投与群 (対照群)		+	+	+	+	+	+	+
	14			+	+	+	+	+	+	+
	15			+	+	+	+	+	+	+
	16			+	+	+	+	+	+	+

*1 分離培地（BHI-T80 抗生剤入り）で豚丹毒菌が分離出来たものを示す。+は菌分離陽性、—は菌分離陰性を示す。

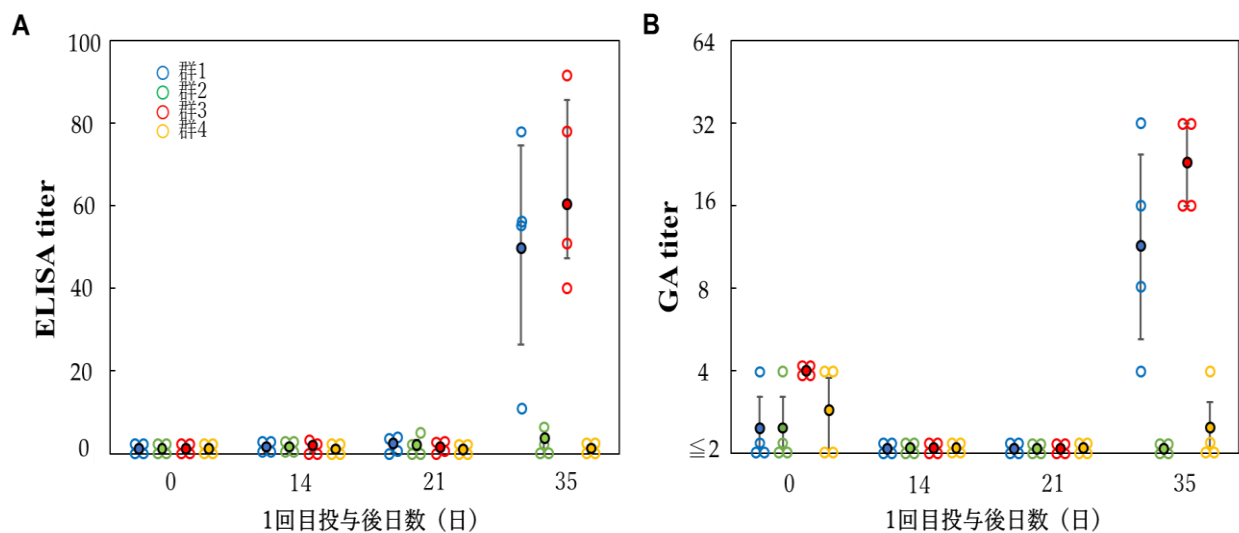
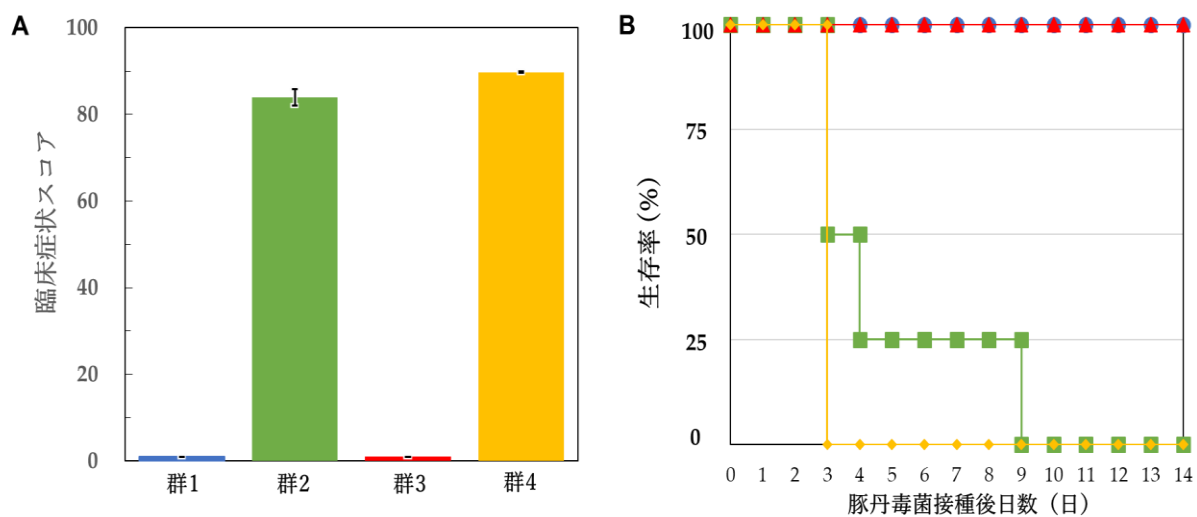


図 3-1. ELISA と生菌凝集試験（GA）による抗体価測定結果

A) ELISA kit による抗体価測定、B)生菌凝集試験（GA test）による抗体価測定を示す。横軸は検疫馴化期間を終えて 1 回目免疫時を 0 日目とし、採血を実施した日数とイベントを示す。縦軸はそれぞれの抗体価数値を示す。個体ごとの抗体価は白抜き丸で示しており、群の平均値は中塗りの丸で示している。縦棒は標準誤差を示す。群 1、群 2、群 3、群 4 については表 3-2、3-3 及び本文を参照。



3-2. 豚における臨床症状スコアと生存率

A) 豚丹毒菌接種後 14 日間の臨床症状スコアの合計値を示したもの。群 1 と 3 がワクチン投与群であり、群 2 と 4 がワクチン非投与群である。縦棒は標準誤差を示す。B) 豚丹毒菌各株接種後の生存率を示す。横軸が日数で縦軸が生存率を示す。群 1、群 2、群 3、群 4 の詳細については表 3-2、3-3 及び本文を参照。

総括

本研究は 2008 年から 2012 年の調査で初めて見つかった豚丹毒菌 SpaA 変異株のその後の動向を探り、流行の要因解明を目的として行った。具体的には、野外サンプル調査、豚丹毒菌血清型、SpaA 変異株別の細菌学的特性調査並びにマウス及び豚での病原性調査、不活化ワクチンの豚丹毒菌 SpaA 変異株に対する豚での有効性を中心に検討し、以下のような成果を得た。

第一章では 2012 年から 2019 年に分離した豚丹毒菌株を中心に血清型及び SpaA 遺伝子の表現型を調査し、SpaA 変異株の国内分離状況および、菌分離された豚の臨床症状とマウス病原性との関係を明らかにすることを試みた。2012 年から 2019 年に日本各地から集めた 79 株の豚丹毒菌の血清型、*SpaA* 遺伝子塩基配列の変異部分の解析および Lineage 解析を行った結果、調査した 79 株のうち、59 株が血清型 1a に属しており、その 59 株のうち 56 株が 2008 年から 2012 年の調査で初めて見つかった株と同じ M203/I257-SpaA 変異株であった。このため 2012 年以降も血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株の流行の継続が明らかとなった。さらには、M203/I257-SpaA 変異株の Lineage 型別をみると、これまで九州地域と本州地域で分離した株が、それぞれ Lineage IVb-1 と Lineage IVb-2 に型別され、Lineage 型と菌の分離地に地域性があったものが、2013 年以降に分離された株ではその分離場所の地域性の消失が確認出来た。また、マウスを用いた豚丹毒菌の病原性確認試験において血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株は他の血清型の株に比較して病原性が強く、急性症状を示した豚から分離される傾向が高いことが示唆された。一方、同じ血清型 1a の藤沢株とのマウス感染実験の比較では、大きな病原性の違いを見出すことは出来なかった。これらの結果より、我が国で近年見られる豚丹毒菌の流行は豚丹毒菌の *SpaA* 遺伝子の塩基配列に新たに変異が挿入された株などによるものではなく、2008 年から引き続いて分離された M203/I257-SpaA 変異株が浸潤し続けていること、急性症状を示した豚から分離される傾向が高いが、その病原性は少なくともマウス感染実験

では血清型 1a の藤沢株と大きな差がないことが明らかとなった。

第二章で近年日本国内の分離株の多くを占め、藤沢株と同じ病原性を有すると示唆された血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株から 2 株、それらに加えて血清型 1b、2a 菌からそれぞれ 1 株を選び、合計 4 株を血清型 1a の藤沢株と *in vitro* の細菌学的特性および *in vivo* の病原性の違いを比較検討し、M203/I257-SpaA 変異株が国内で主流を占める背景要因を解明することを試みた。国内での分離数が少ない血清型 1b と 2a 株において、特に血清型 2a の菌は血清型 1a の菌と比較して *in vitro* での増殖性が低く、豚血管内皮細胞との細胞接着性が低く、マウスや豚での *in vivo* 病原性も低いことが明らかとなった。特に豚を用いた動物試験において、病原性を臨床スコアで評価すると血清型 1a の菌と血清型 2a との病原性の差のみならず、血清型 1a 豚丹毒菌と血清型 1b の菌の間、並びに血清型 1b の菌と血清型 2a の菌の間においても病原性のスコア値に有意差が認められた。以上のことから、血清型 1a と 1b、2a 間には病原性の違いを見出すことが出来た。しかし、病原性比較対照株である血清型 1a 藤沢株と血清型 1aSpaA 変異株における病原性の違いは見出せなかったため、引き続き研究を進めていく必要がある。

第三章では豚丹毒菌 SpaA 変異株に対する豚丹毒菌不活化ワクチンの有効性を既存株に対する有効性と比較検討した。血液中の抗豚丹毒菌抗体陰性の豚を 4 頭ずつ 4 群に振り分け、2 つの群に豚丹毒菌不活化ワクチン SER-ME を投与した。前 2 群と別に非接種対象の 2 群を設定し、攻撃株として一方の 2 群に血清型 1a の藤沢株をもう一方の 2 群に M203/I257-SpaA 変異株の 2012 年宮崎株を用いた。豚丹毒菌に対する抗体価を測定すると、試験開始時には全例陰性であったものが、ワクチンを投与した豚は 2 回目免疫後 2 週間後にあたる攻撃直前時（初回接種後 35 日目）に抗体価が上昇した。非接種対照群は藤沢株攻撃群においては攻撃後 3 日目で 2 頭死亡、4 日目に 1 頭死亡、9 日目に 1 頭死亡という経過をたどった。非接種対照群の 2012 年宮崎株攻撃群においては安楽殺 1 頭も含めて、攻撃後 3 日目で 4 頭全頭が死亡した。これより、各株の攻撃菌量は致死量であることが確認できた。一方で不活化ワクチンを接種した豚は発熱や全身発疹などの臨床症状を示

すことなく試験終了まで生存した。以上より、血清型 2a の豚丹毒菌を抗原とする不活化ワクチンは、豚で M203/I257-SpaA 変異株に対しても従来株同等に有効であることを示した。従って、M203/I257-SpaA 変異株の国内流行の原因はブレイクスルー感染ではないことが強く示唆された。

以上の結果より、(1) 豚丹毒菌血清型 1a の M203/I257-SpaA 変異株の流行の継続は現在も続いており、日本に広く浸潤していること、(2) 豚丹毒菌の血清型別に着目した病原性比較検討においては、血清型 1a 変異株が最も病原性が強く、次いで血清型 1b 株、血清型 2a 株であること、(3) M203/I257-SpaA 変異株の流行継続の原因は豚での感染・防御試験によりブレイクスルー感染によるものではないことが明らかとなった。これより、現在わが国に分布している豚丹毒菌は強毒株ですが、ワクチンが有効であることが科学的に証明された。流行拡大を防ぐためにワクチン接種による予防が非常に重要であり、今後も積極的なワクチンの普及を啓発していく必要があるという結論に至った。

今後はより広い視点たとえば、豚丹毒菌が豚に感染し伝播させ得る動物、あるいは豚丹毒菌が存在し得る汚水や土壌中での M203/I257-SpaA 変異株の優位性の検討が必要になるだろうと考えている。本研究で得られた一連の知見が今後の養豚業界における豚丹毒菌制御の一助になれば幸いである。

本論文の一部は以下に公表した。

・ Morimoto M, Kato A, Kojima H, Akaike Y, Nogami K, Sasakawa C, Nagai S, To H.

Serovars and SpaA Types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Isolated from Pigs in Japan from 2012 to 2019. Curr Microbiol. 2021 Jan;78(1):55-66. doi: 10.1007/s00284-020-02254-2.

Epub 2020 Nov 3. PMID: 33145611.

・ Morimoto M, Kato A, Akaike Y, Nogami K, Ono H, Furusawa T, Kojima H, Sasakawa C.

Comparative study of the phenotype and virulence of recent serovar 1a, 1b, and 2a isolates

of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Japan. Vet Microbiol. 2022 Jul;270:109458. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109458. Epub 2022 May 12. PMID: 35623133.

• Morimoto M, Kato A, Nogami K, Akaike Y, Furusawa T, Kojima H, Sasakawa C. The Swine Erysipelas Vaccine SER-ME Effectively Protects Pigs against Challenge with the *Erysipelothrix rhusiopathiae* M203/I257 SpaA-Type Variant. Vet Sci. 2022 Jul 26;9(8):382. doi: 10.3390/vetsci9080382. PMID: 35893775; PMCID: PMC9332197.

謝辞

本研究に関して終始ご指導ご鞭撻頂きました、一般財団法人日本生物科学研究所 所長 笹川千尋 博士、研究アドバイザー 加藤篤 博士に心より敬意を表し深謝いたします。

また、本研究を進めるうえで様々な助言や協力を賜りました国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 動物感染症研究領域 領域長 下地善弘 博士、一般財団法人日本生物科学研究所 理事長 長井伸也 博士、理事 杉浦勝明 博士、渋谷一元 博士、堤信幸 博士、佐藤哲朗 博士、ToHo 博士、研究部 豚細菌チームの皆様感謝いたします。

学位取得にあたりご審査頂きました麻布大学獣医学部公衆衛生学第二研究室 教授 森田幸雄 博士、伝染病学研究室 教授 長井誠 博士、公衆衛生学第二研究室 講師 岡谷友三アレシャンドレ 博士、生化学研究室 教授 山下匡 博士、その他関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

本研究はこれらの方々のご協力なくして完成させることは出来ませんでした。

最後に、私の学位論文執筆活動を一番に支え、応援して頂いた夫・大前俊昭氏に感謝致します。

参考文献

1. Opriessing T, Coutinho TA. Erysipelas. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J. *Diseases of swine*, 11th ed. Ames: Blackwell Publishing Professional; 835–843, 2019
2. 岡谷友三アレシヤンドレ、加藤行男、林谷秀樹：豚丹毒とは－古くて新しい人獣共通感染症、モダンメディア、53:231-237, 2007.
3. Wang Q, Chang BJ, Riley TV. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Vet Microbiol. 2010 Jan 27;140(3-4):405-17. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.012. Epub 2009 Aug 8. PMID: 19733019.
4. Takahashi T, Sawada T, Takagi M, Seto K, Kanzaki M, Maruyama T. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from slaughter pigs affected with chronic erysipelas. Nihon Juigaku Zasshi. 1984 Apr;46(2):149-53. doi: 10.1292/jvms1939.46.149. PMID: 6748441.
5. Takahashi T, Sawada T, Muramatsu M, Tamura Y, Fujisawa T, Benno Y, Mitsuoka T. Serotype, antimicrobial susceptibility, and pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from tonsils of apparently healthy slaughter pigs. J Clin Microbiol. 1987 Mar;25(3):536-9. doi: 10.1128/jcm.25.3.536-539.1987. PMID: 2437149; PMCID: PMC265981.
6. Opriessnig T, Forde T, Shimoji Y. *Erysipelothrix* Spp.: Past, Present, and Future Directions in Vaccine Research. Front Vet Sci. 2020 Apr 15;7:174. doi: 10.3389/fvets.2020.00174. PMID: 32351978; PMCID: PMC7174600.
7. Ogawa Y, Oishi E, Muneta Y, Sano A, Hikono H, Shibahara T, Yagi Y, Shimoji Y. Oral vaccination against mycoplasmal pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. Vaccine. 2009 Jul 16;27(33):4543-50. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.04.081. Epub 2009 May 21. PMID: 19433128.
8. Shi F, Harada T, Ogawa Y, Ono H, Ohnishi-Kameyama M, Miyamoto T, Eguchi M, Shimoji Y. Capsular polysaccharide of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, and its modification with phosphorylcholine. Infect Immun. 2012 Nov;80(11):3993-4003. doi: 10.1128/IAI.00635-12. Epub 2012 Sep 4. PMID:

22949554; PMCID: PMC3486058.

9. Shimoji Y. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. *Microbes Infect.* 2000 Jul;2(8):965-72. doi: 10.1016/s1286-4579(00)00397-x. PMID: 10962280.
10. Nakato H, Shinomiya K, Mikawa H. Adhesion of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to cultured rat aortic endothelial cells. Role of bacterial neuraminidase in the induction of arteritis. *Pathol Res Pract.* 1987 Apr;182(2):255-60. doi: 10.1016/S0344-0338(87)80114-0. PMID: 3601804.
11. Harada T, Ogawa Y, Eguchi M, Shi F, Sato M, Uchida K, Nakayama H, Shimoji Y. Phosphorylcholine and SpaA, a choline-binding protein, are involved in the adherence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to porcine endothelial cells, but this adherence is not mediated by the PAF receptor. *Vet Microbiol.* 2014 Aug 6;172(1-2):216-22. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.04.012. Epub 2014 May 9. PMID: 24856134.
12. Zhu W, Cai C, Wang Y, Li J, Wu C, Kang C, Sun X, Jin M. Characterization of roles of SpaA in *Erysipelothrix rhusiopathiae* adhesion to porcine endothelial cells. *Microb Pathog.* 2017 Dec;113:176-180. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.020. Epub 2017 Oct 14. PMID: 29038054.
13. To H, Sato H, Tazumi A, Tsutsumi N, Nagai S, Iwata A, Nagano T. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from recent swine erysipelas outbreaks in Japan. *J Vet Med Sci.* 2012 Jul;74(7):949-53. doi: 10.1292/jvms.11-0533. Epub 2012 Mar 9. PMID: 22446396.
14. Ogawa Y, Shiraiwa K, Ogura Y, Ooka T, Nishikawa S, Eguchi M, Hayashi T, Shimoji Y. Clonal Lineages of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Responsible for Acute Swine Erysipelas in Japan Identified by Using Genome-Wide Single-Nucleotide Polymorphism Analysis. *Appl Environ Microbiol.* 2017 May 17;83(11):e00130-17. doi: 10.1128/AEM.00130-17. PMID: 28314730; PMCID: PMC5440707.
15. Uchiyama M, Shimazaki Y, Isshiki Y, Kojima A, Hirano F, Yamamoto K, Kijima M, Nagai H. Pathogenic characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Met-203 type SpaA strains from chronic and subacute swine erysipelas in Japan. *J Vet Med Sci.* 2017 Jan 20;79(1):18-21. doi: 10.1292/jvms.16-0164. Epub 2016 Oct 21. PMID: 27773881;

PMCID: PMC5289231.

16. Imada Y, Goji N, Ishikawa H, Kishima M, Sekizaki T. Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. *Infect Immun*. 1999 Sep;67(9):4376-82. doi: 10.1128/IAI.67.9.4376-4382.1999. PMID: 10456877; PMCID: PMC96755.
17. Zhu W, Wang Y, Cai C, Li J, Wu C, Kang C, Jin M. *Erysipelothrix rhusiopathiae* recruits host plasminogen via the major protective antigen SpaA. *FEMS Microbiol Lett*. 2017 Mar 1;364(5). doi: 10.1093/femsle/fnx036. PMID: 28201685..
18. Wu C, Zhang Z, Kang C, Zhang Q, Zhu W, Zhang Y, Zhang H, Xiao J, Jin M. The C-Terminal Repeat Units of SpaA Mediate Adhesion of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to Host Cells and Regulate Its Virulence. *Biology (Basel)*. 2022 Jul 5;11(7):1010. doi: 10.3390/biology11071010. PMID: 36101391; PMCID: PMC9311908.
19. Shiraiwa K, Ogawa Y, Nishikawa S, Eguchi M, Shimoji Y. Identification of serovar 1a, 1b, 2, and 5 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* by a conventional gel-based PCR. *Vet Microbiol*. 2018 Nov;225:101-104. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.09.014. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30322520.
20. Shiraiwa K, Ogawa Y, Nishikawa S, Eguchi M, Shimoji Y. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of clonal lineages of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serovar 1a strains currently circulating in Japan. *J Vet Med Sci*. 2017 Aug 4;79(8):1318-1322. doi: 10.1292/jvms.17-0255. Epub 2017 Jun 22. PMID: 28637945; PMCID: PMC5573815.
21. Zou Y, Zhu X, Muhammad HM, Jiang P, Li Y. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from acute swine erysipelas outbreaks in Eastern China. *J Vet Med Sci*. 2015 Jun;77(6):653-60. doi: 10.1292/jvms.14-0589. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25649849; PMCID: PMC4488401.
22. McNeil M, Gerber PF, Thomson J, Williamson S, Opriessnig T. Serotypes and Spa types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates from British pigs (1987 to 2015). *Vet J*. 2017 Jul;225:13-15. doi: 10.1016/j.tvjl.2017.04.012. Epub 2017 May 3. PMID: 28720292.

23. Bender JS, Irwin CK, Shen HG, Schwartz KJ, Opriessnig T. *Erysipelothrix* spp. genotypes, serotypes, and surface protective antigen types associated with abattoir condemnations. J Vet Diagn Invest. 2011 Jan;23(1):139-42. doi: 10.1177/104063871102300126. PMID: 21217046.
24. Bender JS, Shen HG, Irwin CK, Schwartz KJ, Opriessnig T. Characterization of *Erysipelothrix* species isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine erysipelas outbreaks in the United States. Clin Vaccine Immunol. 2010 Oct;17(10):1605-11. doi: 10.1128/CVI.00206-10. Epub 2010 Aug 18. PMID: 20719987; PMCID: PMC2952986.
25. Coutinho TA, Imada Y, de Barcellos DE, de Oliveira SJ, Moreno AM. Genotyping of Brazilian *Erysipelothrix* spp. strains by amplified fragment length polymorphism. J Microbiol Methods. 2011 Jan;84(1):27-32. doi: 10.1016/j.mimet.2010.10.003. Epub 2010 Oct 14. PMID: 20951173.
26. Opriessnig T, Hoffman LJ, Harris DL, Gaul SB, Halbur PG. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: genetic characterization of midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed-field gel electrophoresis. J Vet Diagn Invest. 2004 Mar;16(2):101-7. doi: 10.1177/104063870401600202. PMID: 15053359.
27. Morimoto M, Kato A, Kojima H, Akaike Y, Nogami K, Sasakawa C, Nagai S, To H. Serovars and SpaA Types of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Isolated from Pigs in Japan from 2012 to 2019. Curr Microbiol. 2021 Jan;78(1):55-66. doi: 10.1007/s00284-020-02254-2. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33145611.
28. Borrathybay E, Gong FJ, Zhang L, Nazierbieke W. Role of surface protective antigen A in the pathogenesis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain C43065. J Microbiol Biotechnol. 2015 Feb;25(2):206-16. doi: 10.4014/jmb.1407.07058. PMID: 25223326.
29. Tamura M, Honda N, Fujimoto H, Cohen SN, Kato A. PpsA-mediated alternative pathway to complement RNase E essentiality in *Escherichia coli*. Arch Microbiol. 2016 Jul;198(5):409-21. doi: 10.1007/s00203-016-1201-0. Epub 2016 Feb 16. PMID: 26883538.
30. Sawada T, Muramatsu M, Seto K. Response of growth agglutinating antibody and protection of pigs inoculated with swine erysipelas live vaccine. Nihon Juigaku Zasshi.

1979 Dec;41(6):593-600. doi: 10.1292/jvms1939.41.593. PMID: 522336.

31. Takahashi T, Takagi M, Yamaoka R, Ohishi K, Norimatsu M, Tamura Y, Nakamura M. Comparison of the pathogenicity for chickens of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Erysipelothrix tonsillarum*. Avian Pathol. 1994 Jun;23(2):237-45. doi: 10.1080/03079459408418992. PMID: 18671089.
32. Shimoji Y, Yokomizo Y, Sekizaki T, Mori Y, Kubo M. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. Infect Immun. 1994 Jul;62(7):2806-10. doi: 10.1128/iai.62.7.2806-2810.1994. PMID: 8005671; PMCID: PMC302885.
33. Takahashi T, Sawada T, Seto K, Muramatsu M, Maruyama T, Kanzaki M. Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains of serovars 1a, 3, 5, 6, 8, 11, 21, and type N isolated from slaughter pigs affected with chronic erysipelas. Nihon Juigaku Zasshi. 1985 Feb;47(1):1-8. doi: 10.1292/jvms1939.47.1. PMID: 3981829.
34. Morimoto M, Kato A, Akaike Y, Nogami K, Ono H, Furusawa T, Kojima H, Sasakawa C. Comparative study of the phenotype and virulence of recent serovar 1a, 1b, and 2a isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in Japan. Vet Microbiol. 2022 Jul;270:109458. doi: 10.1016/j.vetmic.2022.109458. Epub 2022 May 12. PMID: 35623133.
35. Imada Y, Takase A, Kikuma R, Iwamaru Y, Akachi S, Hayakawa Y. Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. J Clin Microbiol. 2004 May;42(5):2121-6. doi: 10.1128/JCM.42.5.2121-2126.2004. PMID: 15131179; PMCID: PMC404604.
36. Takahashi T, Nitta H, Morioka A, Yamamoto K. THE HISTORY AND CURRENT ISSUES WITH THE USE OF LIVE VACCINES AGAINST SWINE ERYSIPELAS. 動薬検年報第 43:1-7,2006.
37. 豚丹毒の問題点とワクチンによる対策の要点, 化血研 営業管理部学術第三課 島田英明, SDI, 第 13 号, p1,平成 19 年 4 月 26 日発行
38. Uchiyama M, Yamamoto K, Ochiai M, Yamamoto T, Hirano F, Imamura S, Nagai H, Ohishi K, Horiuchi N, Kijima M. Prevalence of Met-203 type spaA variant in *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates and the efficacy of swine erysipelas vaccines in

Japan. *Biologicals*. 2014 Mar;42(2):109-13. doi: 10.1016/j.biologicals.2013.12.002.
Epub 2014 Jan 7. PMID: 24405986.