

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18500333
 研究課題名（和文） 遺伝的性状の異なる肺パスツレラの病原性
 研究課題名（英文） Pathogenicity of *Pasteurella pneumotropica* having different genetic characteristics

研究代表者
 川本 英一（KAWAMOTO EIICHI）
 東京医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：20074718

研究成果の概要：動物実験に用いられるマウスやラットの日和見病原体である肺パスツレラ菌の遺伝学的性質を詳しく調べた。日和見病原体とは健康な動物には病気を起こさないが、抵抗力のない動物には病気を起こす病原体のことである。その結果、本菌は3つのグループに大きく分けられた。その一つについて免疫不全マウスに対する病原性を調べたところ、全身感染を起こして死亡した。免疫不全マウスとは抵抗力の低下している動物のことで、病原性とは病気を起こす能力を意味する。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	240,000	3,540,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：*Pasteurella pneumotropica*、肺パスツレラ、細菌、毒素、RTX toxin、感染、病原性、実験動物

1. 研究開始当初の背景

(1) わが国の実験動物の感染症においては、センダイウイルスのような病原性の強い病原体による感染はほとんど認められなくなった。しかし、それらに代わって病原性が無いかあるいは弱い日和見病原体による感染症が問題となってきている。この意味において、げっ歯類であるマウスやラットのパスツレラ症の病因である肺パスツレラ *Pasteurella pneumotropica* (Pp) は現在のわが国の実験動物施設において最も問題となっている

微生物の一つである。

(2) 私達は、多数の Pp 野外分離株および各国の参照株を収集し、その生物・生化学的性状および遺伝学的性状を調べた結果、本菌が諸性状において大きな多様性を有し、その遺伝学的性状からいくつかのグループに分類されることを明らかにした。また、マウスにおける感染実験系を開発し、免疫正常動物では不顕性感染にとどまるが、免疫不全動物では死亡を伴う肺炎が引き起こされることを見いだした。

2. 研究の目的

近年、遺伝子組換え等によって免疫不全動物が多く作出され、その動物における日和見病原体による感染が動物実験の障害となっている。肺パスツレラ (*Pasteurella pneumotropica*) は日和見病原体の代表的な細菌の一つであり、その病原性が問題となっている。

私達は、本菌の生物・生化学的性状および遺伝学的性状から本菌を4つのグループに分類し、病原性解析のための実験系を開発した。そこで、本研究では、性状の異なる本菌の4つのグループにおける病原性の差異を知ることが目的とする。さらに、より簡便で安価な病原性検査のための *in vivo* 実験系を確立したい。

3. 研究の方法

炭素源とアミノ酸の利用性試験については、Bromocresol purple semisolid medium とリジン・アルギニン加水分解用試験培地をそれぞれ用いた。遺伝子配列の決定には、ABI310 genetic analyzer または 3730XL DNA analyzer を用いた。染色体 DNA のサイズ測定には、制限酵素未処理 DNA を 0.8% アガロースゲル中で 3 V cm⁻¹ で 48 時間のパルスフィールド電気泳動を行った。毒素の同定については ATCC 35149 のクローンライブラリーを作製し、コロニーハイブリダイゼーションでスクリーニングを実施し、遺伝子配列を決定した後、未解読の部分については inverse PCR などによって決定した。免疫不全マウスに対する病原性については、接種菌として本菌 ATCC 35149 株 10⁷ を用い、動物は 5~6 週齢の NOD/Shi-scid マウスを用いた。

4. 研究成果

肺パスツレラ *Pasteurella pneumotropica* の遺伝的多様性解析

(1) 生化学的性状

アミノ酸、炭素源試験

アミノ酸や炭素源などの6項目について試験した結果、少なくとも2つのタイプが存在し、明確な溶血性を示すラット由来株のすべての株は、Heyl 型と同一の性状を示した。

炭素源資化性試験

菌株間で著しく利用性が異なる炭素源複数種を選択し、資化性の違いに基づく解析を行ったところ、6つのクラスターに分類された。

(3) 遺伝学的性状

rpoB の系統樹解析

RNA polymerase サブユニットをコードする rpoB の塩基配列を用いた系統樹解析の結果、5~6のクラスターに分類されることがわかった。

DNA のサイズ測定

パルスフィールド電気泳動を用いて、本菌の環状ゲノミック DNA のサイズを測定したところ、2.3 Mb~3.2 Mb を示し、マウス由来株よりもラット由来株のほうが大きいこと ($P > 0.05$) が明らかとなった。

毒素の同定

Pasteurellaceae に広く分布する RTX toxin に着目し本菌の DNA を分析した結果、RTX をコードする遺伝子領域と類似した3種類の遺伝子配列があることがわかった。また、サザン解析によって、多くの野外株がこれら3種類の RTX toxin のいずれかを保有していることが明らかとなった。

これらの得られた結果について、主成分分析を行うと、本菌は3つのグループに大別されることがわかった。すなわち、マウス、ラットの宿主に依存するそれぞれのグループと両者の由来宿主が混合された1グループに分類された。また、これらのグループについて、RTX toxin の分布をみると、マウス由来宿主のグループに RTX toxin タンパク質のうち Pnx A をコードする遺伝子を保有している傾向にあることが明らかとなった。

肺パスツレラ *Pasteurella pneumotropica* の免疫不全マウスに対する病原性

細胞表面構造を有するマウス由来宿主のグループである本菌 ATCC 35149 株を用いて、重度免疫不全動物である NOD/Shi-scid に本菌を腹腔内接種を行ったところ、すべてのマウスが 18 時間以内に死亡した。

病原性を調べるために用いる本菌の菌株の性状について、形態学的、生物・生化学的および遺伝学的に総合的かつ詳細に明らかにできる技術と方法論を持つ研究室は、私達の研究室を除けば、国内外に存在しない。本研究では、動物数の削減 (Reduction) を意識してなるべく少ない数の動物を用いることとしたので、本菌の性状と病原性の関係を部分的にしか明らかにできなかった。この点については今後の課題としたい。また、代替法 (Replacement) にも配慮した病変性検査のための実験系の開発についても、今後の研究として進めていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Kawamoto, E., Okiyama, E., Sasaki, H., Sawada, T., Mikazuki, K., and Ueshiba, H. Ultrastructural characteristics of *Pasteurella pneumotropica* from mice and *Pasteurella multocida* from rabbits. Lab. Anim., 41, 285-291, 2007. 査読有

Sasaki, H., Kawamoto, E., Kunita, S., and Yagami, K. Comparison of the in vitro susceptibility of rodent isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pasteurella pneumotropica* to enrofloxacin. J. Vet. Diagn. Invest., 19, 557-560, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

川本英一、*Pasteurella pneumotropica* の免疫不全および免疫正常マウスに対する病原性、日本実験動物技術 2008、2008 年 5 月 17 日、仙台。

〔図書〕(計 1 件)

川本英一、朝倉書店、現代実験動物学、2009 年、80-87.

〔その他〕

佐々木啓、川本英一 マウスにおける肺パストツレラの最近の知見と課題、アニテックス、37-39、2007 年。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川本 英一 (KAWAMOTO EIICHI)
東京医科大学・医学部・准教授
20074718

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

