

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02658

研究課題名(和文)豚レンサ球菌の表層抗原変換による病原性への影響

研究課題名(英文)Effect on virulence of *S. suis* by switching the surface antigenicity

研究代表者

大倉 正稔 (Okura, Masatoshi)

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・上級研究員

研究者番号：60508315

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*)の血清型の相違に寄与する遺伝子領域を他の血清型に交換した血清型変換株を実験的に作出し、マウス及びブタへの接種試験やブタ上皮細胞への付着侵入能、マウスマクロファージ細胞による貪食抵抗性、マウス及びブタの血中生残性などについて親株と比較することにより、本菌の血清型の相違が動物への病原性や宿主細胞との相互作用に影響しうることを、そして、その影響が血清型により多様であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、血清型の相違が動物への病原性や宿主細胞との相互作用に多様に影響することを実証した。血清型の相違による表現型への影響については、多くの病原細菌において、よく分かっておらず、血清型によっては、病原性が高くなることが示唆される型も明らかにした。本菌については、有効なワクチンがまだ開発されておらず、表層抗原はワクチンの開発にもつなげるため、得られた成果を活用することにより、本菌の有効な新規ワクチンも期待できる。以上から、本研究成果は学術的にも社会的にも非常に重要な成果と見なすことができる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, several types of surface antigen switching mutants of *Streptococcus suis* were constructed with the method developed by the authors, and then compared with parent strain on virulence in mice and piglets, colonization on/invasion in the host cells, resistance against macrophage phagocytosis and the bactericidal effect of leukocytes, etc. The results provides the first evidence that serotype switch in *S. suis* can definitively modify the interactions with host cells and in vivo.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌 表層抗原 血清型 抗原変換

1. 研究開始当初の背景

S. suis はブタやヒトに髄膜炎や敗血症、心内膜炎等を引き起こし、家畜衛生および公衆衛生上大きな問題となっている人獣共通感染症起因菌である。ヒトへの感染は豚や豚肉との接触に起因し、その感染事例は世界各地で起こっており、重篤な場合、敗血症性のショック症状により、死に至る。特に、2005年に発生した中国でのアウトブレイク(215名の患者が発生し、39名が死亡)以降は、医療、獣医療、食品衛生関係者における*S. suis*感染症についての認識の高まりとともに、世界各地で集団発生事例及び死亡事例の報告がされるようになり、本菌感染症は社会的な問題になっている。しかし、全ての*S. suis*株がブタやヒトに重篤な感染症を引き起こすわけではなく、ほぼ全てのブタが扁桃や上部気道に本菌を保菌しており、分子疫学的なデータから一部の強毒な系統の株がブタやヒトにおける病気と関連していると考えられている。しかし、*S. suis*の毒性を高めることに寄与している病原因子についてはまだ不明な点が多い。

*S. suis*は表層の抗原性により、30以上の血清型(1-34型, 1/2型, 21/29型, Chz型)に型別されているが、その相違は菌体を覆う莢膜多糖の構造の違いによると考えられている。これまでに蓄積されている疫学データでは、分離される血清型の頻度は国により異なるものの、髄膜炎等の重篤な症状を呈した宿主からは特定の血清型(2型, 9型, 7型, 14型など)が高頻度に分離されることが明らかになっている。特に2型は世界中のヒトの症例分離株のほとんどを占めており、ブタにおいても、分離頻度が高いため、最も危険な血清型と考えられている。莢膜は多くの病原細菌において、宿主による認識部位を覆い隠すことにより、宿主による免疫系からの回避に寄与しているため、重要な病原因子の一つに位置付けられている。本菌においても2型及び14型について、莢膜の抗貪食能が示されており、莢膜欠失によりマウスやブタへの病原性が低下することが実証されている。一方で、莢膜は菌体表層の付着・侵入因子も覆うため、莢膜の欠失により、宿主細胞への付着・侵入能が上昇することも明らかにされている。しかし、血清型の相違が病原性に寄与するかについては本菌を含め、多くの病原細菌についてよく分かっていない。実際、本菌では、2型の病豚及び患者からの分離頻度が高いが、マウスや豚での感染試験では同じ血清型(2型を含む)の株でも毒性が様々であるため、血清型の違い、すなわち、莢膜多糖の構造の相違が株の毒性を含め、表現型にどのように影響するかについては全く分かっていなかった。

研究代表者らは、これまでに、独自の遺伝子改変法により、特定の株の莢膜合成関連遺伝子領域を交換し、異なる血清型に変換した変異株の作出に成功している。さらに、予備実験として、マウス(CD1)に親株、莢膜欠失株、いくつかの血清型変換株を腹腔内に接種したところ、血清型によりマウスの生存率が異なることが分かった。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが開発した遺伝子改変法より作出した血清型変換株を用い、親株と比較することにより、血清型変換による動物への病原性や宿主細胞との相互作用への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 血清型変換株の作出

図1に従い、全ゲノム解析が解読されているP1/7株を親株として、血清型変換株を作出した。血清型変換は型特異的抗血清を用いた、共凝集反応試験により確認した。さらに、変換株より、莢膜多糖を抽出・精製し、実際に変換していることを糖鎖組成からも確認した。

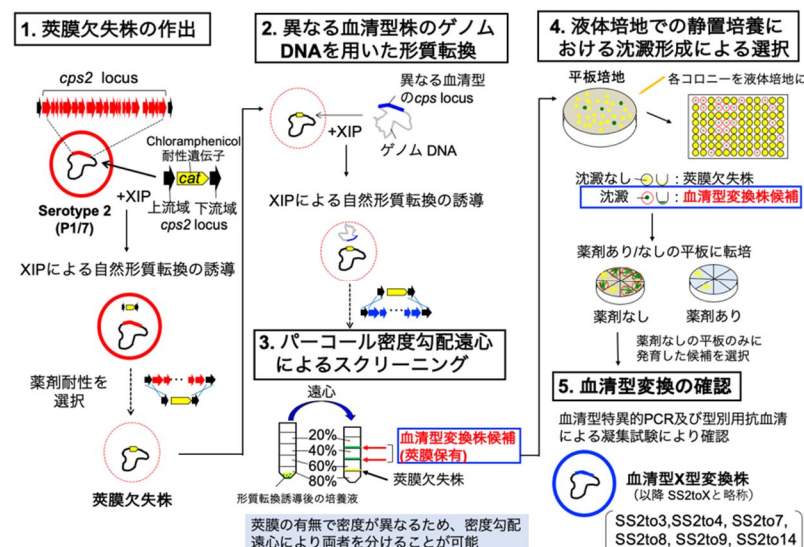


図1 血清型変換株の作出法

(2) マウス及びブタへの病原性への影響

マウスについては、*S. suis* の敗血症モデルとして活用されている 10-12 週齢の C57BL/6 マウスを用いた。10-11 匹/群、腹腔内接種 (10^7 CFU/匹) で行い、14 日間生存を観察した。接種 12 時間後の血漿中の各種炎症促進因子産生 (IL6, IL-12p70, IFN- γ , CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL2) 及び 24 時間後の血中菌数も測定した。ブタについては、4-5 週齢の SPF 豚を 4-5 匹/群使用し、経鼻接種 (2×10^6 CFU/匹) により行った。7 日間経過を観察後、安楽殺し、解剖後、主要臓器及び扁桃、血中より菌分離を行った。いずれの感染試験についても機関内の動物実験委員会の承認のもと、動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに沿って行った。

(3) ブタ上皮細胞への付着・侵入能への影響

新生子豚気管上皮細胞 (NPT_r 細胞) を用い、各株について、 1×10^6 CFU/ 10^5 cells (MOI=10) で感染させ、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 添加条件で 2 時間培養し、表層に付着した菌数 (付着菌数) と抗菌剤を用いて、処理後、細胞内菌数 (侵入菌数) を測定した。

(4) マウスマクロファージ細胞を用いた貪食抵抗性への影響

マウスマクロファージ J774A.1 細胞を用い、各株について、 1×10^6 CFU/ 10^4 cells (MOI=100) で感染させ、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 添加条件で 2 時間培養し、抗菌剤を用いて、処理後、細胞内菌数 (貪食菌数) を測定した。

(5) マウス及びブタ血中生残性への影響

マウスについては、各株菌液を 9×10^6 CFU/mL になるよう調整し、C57BL/6 マウスより採取した血液及び血漿と混和し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間培養後、それぞれの菌数を測定し、(全血中菌数/血漿中菌数) $\times 100\%$ を算出した。ブタについては、各株菌液を 1×10^6 CFU/mL になるよう調整し、ブタより採取した血液及び PBS と混和し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間培養後、それぞれの菌数を測定し、(全血中菌数/PBS 菌数) を算出した。

(6) マウス樹状細胞による炎症誘発因子産生性への影響

C57BL/6 マウスの大腿骨及び脛骨由来骨髓造血細胞を用い、各株について、 1×10^6 CFU/ 10^6 cells (MOI=1) で 16 時間反応させ、各種炎症促進因子産生 (TNF, IL-6, IL-12p70, CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL9) を測定した。

4. 研究成果

研究代表者らが開発した遺伝子改変法より、血清型 3 型、4 型、7 型、8 型、9 型及び 14 型に変換した血清型変換株の作出に成功した。変換株より、莢膜多糖を精製し、実際に変換していることを糖鎖組成から確認した。また、抗原性の変換についても型特異的抗血清により確認した。変換による動物への病原性を評価するため、*S. suis* の敗血症モデルとして広く使用されている C57BL/6 マウスを用いた感染試験を実施した。その結果、4 型への変換で生存率、24h 後の血中菌濃度、12 時間後の血漿炎症促進性因子産生性全てについて、親株 (2 型) と比較して有意な低下が、3 型への変換で 12 時間後の血漿炎症促進性因子産生性の低下が認められた (図 2)。一方、8 型への変換で親株と比較して上記の全てが有意に上昇した。その以外の血清型の変換では、上記について、有意な差は認められなかった。自然宿主であるブタでの病原性についても評価するため、経鼻接種による SPF 豚の感染試験を実施した。その結果、親株と 7 型と 8 型変換株の感染のみで発症が認められた (図 2)。また、14 型変換株感染豚では、発症はしなかったものの血中から分離された個体が認められた (図 2)。

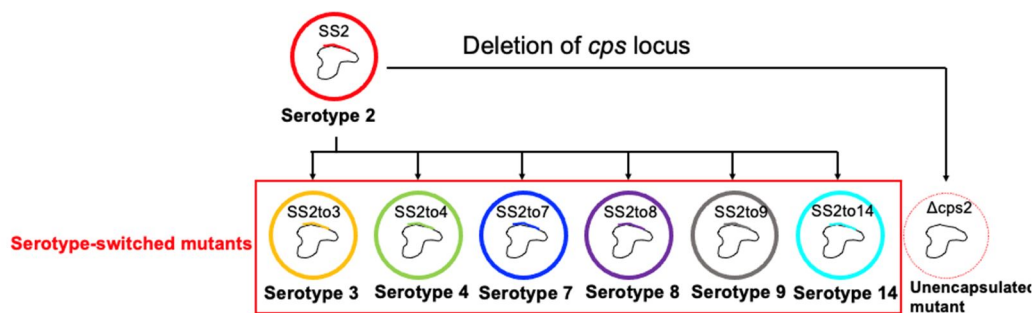
S. suis の 2 型莢膜については、宿主細胞との最初の相互作用 (付着・侵入) に関わる表層の因子を覆うことにより、マクロファージによる貪食抵抗や血中での生残に寄与し、全身性の疾患の発症を起こす。また、表層の免疫認識部位を覆うことにより、樹状細胞による炎症性サイトカイン産生の阻害にも寄与している。そこで、まず、新生子豚気管上皮細胞を用い、付着・侵入能を評価した。その結果、付着能については、7 型及び 8 型変換株が親株と比較して有意に上昇が見られ、他の血清型変換株については有意な差は認められなかった (図 2)。一方、侵入能については、血清型変換による影響はないと考えられた (図 2)。

続いて、マウスマクロファージ細胞 (J774A.1 細胞) を用いた貪食抵抗性を評価した。その結果、1 時間の反応では親株と比較して、血清型変換による影響は認められなかったが、4 型、7 型及び 8 型変換株で貪食抵抗性の低下が認められた (図 2)。しかし、低下は莢膜欠失株ほど大きくはなかった。

マウスの全血生残性については、3 型及び 4 型変換株では親株と比較して殺菌されたが (3 型、20%; 4 型、30%)、それ以外の血清型変換株については、親株同様殺菌されなかった。豚の全血生残性については、親株以外では 8 型変換株のみが生残し、それ以外の変換株については全て殺菌された (図 2)。

最後に、C57BL/6 マウス骨髓由来樹状細胞による炎症性サイトカイン産生誘導能については、4 型変換により、親株と比較して有意に低下し、8 型変換により、有意に上昇した (図 2)。一方、他の血清型へ変換では誘導能への影響は認められなかった (図 2)。

以上をまとめると、動物への病原性や宿主細胞との相互作用が変換した抗原性により、様々に変化することが明らかになった (図 2)。



Mortality	-	↓	-	↑	-	-	↓
Blood burden	-	↓	-	↑	-	-	↓
Pro-inflammatory mediator production in plasma	↓	↓	-	↑	-	-	↓
Anti-phagocytosis	-	-(↓) ^a	-(↓) ^a	-(↓) ^a	-	-	↓
Survival in whole blood	↓	↓	-	-	-	-	↓
Pro-inflammatory mediator production by DC cells	-	↓	-	↑	-	-	↑
Adhesion to epithelial cells	-	-	↑	↑	-	-	↑
Survival in whole blood	↓	↓	↓	-	↓	↓	↓
Morbidity (Exp.1/ Exp. 2)	NT/-	↓/NT	↓/NT	NT/↑	NT/NT	NT/-	↓/NT
Organ dissemination (Exp.1/ Exp. 2)	NT/↑	↓/NT	↓/NT	NT/↑	NT/NT	NT/↑	↓/NT

-, no significant difference compared to SS2; ↑, significantly higher than SS2; ↓, significantly lower than SS2; NT, not tested.

^a After 2h incubation, significantly higher than SS2

図 2 表層抗原変換による *S. suis* の病原性及び宿主細胞との相互作用への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Payen S, Roy D, Boa A, Okura M, Auger JP, Segura M, Gottschalk M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Role of Maturation of Lipoproteins in the Pathogenesis of the Infection Caused by Streptococcus suis Serotype 2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 2386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms9112386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Okura M, Auger JP, Shibahara T, Goyette-Desjardins G, Van Calsteren MR, Maruyama F, Kawai M, Osaki M, Segura M, Gottschalk M, Takamatsu D.	4. 巻 11
2. 論文標題 Capsular polysaccharide switching in Streptococcus suis modulates host cell interactions and virulence.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85882-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwanaga M, Imai N, Kamikawa A, Shimada K, Okura M, Takamatsu D, Ueda D, Nakayama M, Shibahara T.	4. 巻 84
2. 論文標題 Suppurative meningoencephalitis and perineuritis caused by Streptococcus gallolyticus in a Japanese Black calf.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of veterinary medical science	6. 最初と最後の頁 8798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mariela Segura, Virginia Aragon, Susan L Brockmeier, Connie Gebhart, Astrid de Greeff, Anusak Kerdsin, Mark A O'Dea, Masatoshi Okura, Mariette Salery, Constance Schultsz, Peter Valentin-Weigand, Lucy A Weinert, Jerry M Wells, Marcelo Gottschalk	4. 巻 9
2. 論文標題 Update on Streptococcus suis Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on S. suis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathogens	6. 最初と最後の頁 374 ~ 374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pathogens9050374	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sonia Lacouture, Masatoshi Okura, Daisuke Takamatsu, Lorelei Corsaut, Marcelo Gottschalk	4. 巻 32
2. 論文標題 Development of a mismatch amplification mutation assay to correctly serotype isolates of Streptococcus suis serotypes 1, 2, 1/2, and 14	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Diagnostic Investigation	6. 最初と最後の頁 490 ~ 494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1040638720915869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Goyette-Desjardins Guillaume, Vinogradov Evgeny, Okura Masatoshi, Takamatsu Daisuke, Gottschalk Marcelo, Segura Mariela	4. 巻 473
2. 論文標題 Structure determination of Streptococcus suis serotypes 7 and 8 capsular polysaccharides and assignment of functions of the cps locus genes involved in their biosynthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 36 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carres.2018.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Goyette-Desjardins Guillaume, Vinogradov Evgeny, Okura Masatoshi, Takamatsu Daisuke, Gottschalk Marcelo, Segura Mariela	4. 巻 466
2. 論文標題 Streptococcus suis serotype 3 and serotype 18 capsular polysaccharides contain di- N -acetyl- bacillosamine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Carbohydrate Research	6. 最初と最後の頁 18 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.carres.2018.07.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Roy David, Takamatsu Daisuke, Okura Masatoshi, Goyette-Desjardins Guillaume, Van Calsteren Marie-Rose, Dumesnil Audrey, Gottschalk Marcelo, Segura Mariela	4. 巻 9
2. 論文標題 Capsular Sialyltransferase Specificity Mediates Different Phenotypes in Streptococcus suis and Group B Streptococcus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.00545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masatoshi Okura, Jean-Philippe Auger, Tomoyuki Shibahara, Guillaume Goyette-Desjardins, Marie-Rose Van Calsteren, Fumito Maruyama, Makoto Osaki, Mariela Segura, Marcelo Gottschalk, Daisuke Takamatsu
2. 発表標題 Switching of capsular type impacts on Streptococcus suis virulence in mice and pigs
3. 学会等名 4th international workshop on Streptococcus suis (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masatoshi Okura, Jean-Philippe Auger, Tomoyuki Shibahara, Guillaume Goyette-Desjardins, Marie-Rose Van Calsteren, Fumito Maruyama, Mikihiro Kawai, Mariela Segura, Marcelo Gottschalk, Daisuke Takamatsu
2. 発表標題 血清型変換は豚レンサ球菌の病原性を変化させうる
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	芝原 友幸 (Shibahara Tomoyuki) (00355207)	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・上級研究員 (82111)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	高松 大輔 (Takamatsu Daisuke) (60414728)	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・上級研究員 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------