

機関番号：82111

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580349

研究課題名 (和文) 豚レンサ球菌の調節系遺伝子欠損株を用いたワクチン候補の開発

研究課題名 (英文) Development of vaccine candidate by using global regulator gene-deficient strains of *Streptococcus suis*.

研究代表者

大崎 慎人 (OSAKI MAKOTO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌・寄生虫病研究チーム・主任研究員

研究者番号：80355164

研究成果の概要 (和文)：豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*) はブタやヒトに重篤な疾病を引き起こす病原体である。今回、我々が作出した豚レンサ球菌強毒株由来の調節系遺伝子欠損株のうち、P1/7 由来 *clpP* 欠損株は豚に対して明らかな病原性の低下を示し、扁桃定着能もあることを確認した。本株は、豚レンサ球菌症に対する生ワクチン株候補として有望と考えられた。

研究成果の概要 (英文)： *Streptococcus suis* is an important pathogen in pig industry and also a causative agent of zoonosis. In this study, we generated deletion mutants of several global regulator genes from virulent strains of *S. suis*. One of those strains, a caseinolytic protease gene (*clpP*)-deletion mutant derived from *S. suis* P1/7 strain, was shown to be attenuated in pigs and possess ability for colonization at tonsil of pigs. Our results suggest that the *S. suis clpP*-deletion mutant strain can be a live-vaccine candidate for *S. suis* infection in pigs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用獣医学

キーワード：疾病予防・制御、獣医細菌学、分子遺伝学、ワクチン開発

1. 研究開始当初の背景

豚レンサ球菌 (*Streptococcus suis*) はブタに髄膜炎、敗血症、関節炎等多彩な疾病を惹起する養豚産業上重要な病原体であり、ヒトにも重篤な髄膜炎を起こすことが知られる。従来、本菌によるヒトの感染は散発的な発生にとどまっていたが、近年養豚が盛んなアジア諸国でヒトへの集団発生が続発し、人獣共通感染症の原因菌としても本菌の重要性が世界的に注目されてきている。1998 年には中国江蘇省でブタ 8 万頭に及ぶ本病の発生があり、その際 25 名の患者

(うち 14 名は死亡) が発生した。また、2005 年には中国四川省で 215 名の患者発生に対して 39 名が死亡した。タイ・ベトナムにおいてもヒトの集団発生と死亡例が報告されている。日本でも誌上に報告されていないものも含め少なくとも 9 名の患者 (うち 2 名は死亡) が確認されている。これらヒトの感染事例の多くは *S. suis* に感染したブタまたはその生肉との接触によると考えられることから、ヒトでの感染リスクを低減するためにはブタにおける *S. suis* 感染を防除することが不可欠である。

S. suis はブタに常在する菌で、日本においても 40-60% のブタが本菌を扁桃に保菌している。このような扁桃に常在する株の中にはブタに疾病を起こさない弱毒あるいは無毒な株も多いと考えられるが、体内に侵入しブタやヒトに感染を引き起こす能力のある強毒株も存在する。これまで強毒株と弱毒株の比較により、muramidase released protein (MRP)、extracellular factor (EF)、溶血毒素 SLY 等いくつかの菌体成分及び菌体外成分が本菌の病原性関連因子として報告され、これらの因子は感染防御抗原の候補としても注目されてきた。しかしながら、これらの因子はヨーロッパで分離される強毒株では保有率が高いが、北米で分離される強毒株では保有率が低く、強毒株に共通するワクチン抗原とはならない。そのため、*S. suis* に対する有効なワクチンは開発されていなかった。

一方、近年開発された Multilocus Sequence Typing (MLST) による型別の結果、*S. suis* 株集団は主に遺伝的にクローナルな 3 つの集団 (ST1 complex, ST27 complex, ST87 complex) から構成されていることが明らかとなっていった。このうち、特に ST1 complex にはヒトやブタに髄膜炎や敗血症など重篤な疾病を引き起こした強毒株が多数含まれており、強毒株の集団として注目されている。また、我々の最近の研究では、ST27 complex に属する株も地域によっては死亡例を含むヒトの *S. suis* 感染の原因となっていることが判明した。ST1 complex に属する株の中には MRP, EF, 及び SLY を保有するものが多いが、ST27 complex に属する株のほとんどはこれら因子のいずれかを欠いている。また日本の病豚からは ST1 complex 及び ST27 complex のいずれに属する株も分離されている。そこで我々は、ST1 complex と ST27 complex とに属する株のそれぞれを弱毒化させることができれば、*S. suis* 強毒株の主要な集団に対して有効な生ワクチンの開発につながると考えた。

他の病原細菌では、Caseinolytic protease (Clp) complex 及び High temperature requirement A (HtrA) protease のような分子シャペロンや環境からの刺激を検知するセンサーキナーゼ等の分子が、病原遺伝子を含むさまざまな遺伝子発現を調節するグローバルレギュレーターとして機能し、これら調節系分子をコードする遺伝子を不活化させた株は弱毒化することが報告されている。これら調節系遺伝子は細菌に普遍的に存在することから、ST1 complex 及び ST27 complex に属する *S. suis* 強毒株を弱毒化させるための共通の標的となり得る。更に我々は *S. suis* における効率の良い遺伝子操作系を開発し、標的遺伝子に欠失変異を導入した遺伝子欠損株を作出できる技術を確立させている。本技

術を用いれば、野外におけるワクチン試験を行う上で好ましくない薬剤耐性のような表現形を付加することなく標的遺伝子を不活化することが可能である。

2. 研究の目的

ST1 complex と ST27 complex それぞれの代表株から作製した調節系遺伝子欠損株における病原性の変化及び感染防御効果を解析する。更に、弱毒化した株で発現が変化した表層タンパク質を同定することで、弱毒ワクチン候補及び弱毒化に重要な因子に関する知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 血清型 2 型である P1/7 株 (ST1 complex) 及び 89-1951 株 (ST27 complex) の 2 株のゲノム情報を基に、病原性の発現に関与すると予想される調節系遺伝子領域の探索を行った。標的となる遺伝子領域について、温度感受性プラスミドを用いてノックアウトベクターを構築し、染色体上の標的遺伝子が変異型に置換された遺伝子欠損株を選択した。
- (2) マウス敗血症モデルを用いて、作出した遺伝子欠損株及び親株の病原性を比較した。
- (3) 遺伝子欠損株、親株、及びプラスミドに連結した遺伝子を欠損株に導入した相補株を子宮摘出初乳未摂取 (HPCD) 豚に $4.5 \sim 6.9 \times 10^9$ cfu 鼻腔内接種し、臨床症状・

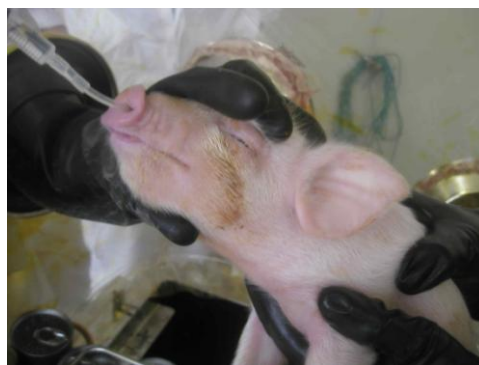


図 1 HPCD 豚への鼻腔接種光景

通常の豚は扁桃に *S. suis* を保菌するため、帝王切開で生産した子豚を無菌アイソレータ内で飼育し、実験に用いた。

体温を 16 日間観察した (図 1)。死亡または安楽死させたブタから菌回収と病理

学的検査を行った。

- (4) Todd-Hewitt Broth 培地で対数増殖期まで培養した *S. suis* 遺伝子欠損株及び親株から RNA を抽出し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 他菌種で病原性の発現に関与することが報告されたグローバルレギュレーターである HtrA, Stk, 及び ClpP について、P1/7 株及び 89-1591 株の当該遺伝子領域の配列を確認した。また、P1/7 株由来 *htrA*, *stk*, または *clpP* 欠損株、及び 89-1591 株由来 *htrA* 欠損株の作出に成功した。
- (2) 特に重要と考えられる ST1 complex について、マウス敗血症モデルで 3 種類の調節系遺伝子欠損株の病原性を解析したところ、いずれの株も親株と比較して有意な死亡率の変化が見られなかった (図 2)。当初の計画では、マウスモデルで病原性の低下を確認した遺伝子欠損株について、自然宿主であるブタを用いた感染実験を行う予定であったが、この成績を受けて、これまでの予備実験からブタでの弱毒化が最も期待できる *clpP* 欠損株を用いてブタの感染実験を行うこととした。

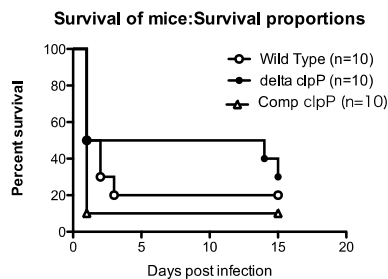


図 2 P1/7 株由来 *clpP* 欠損株接種マウスの生存曲線

- (3) HPCD 豚の鼻腔内接種実験において、P1/7 由来 *clpP* 欠損株 (delta *clpP*) は親株 (Wild Type) 及び遺伝子相補株 (Comp *clpP*) と比較して、致死率及び髄膜炎形成率の有意な低下が認められた (図 3)。また、欠損株接種豚では実質臓器からの菌分離率は明らかに低下したが、扁桃からは親株及び相補株と同様に分離された。本成績は、*clpP* 欠損株は扁桃への定着能を維持している弱毒株であることを示す。

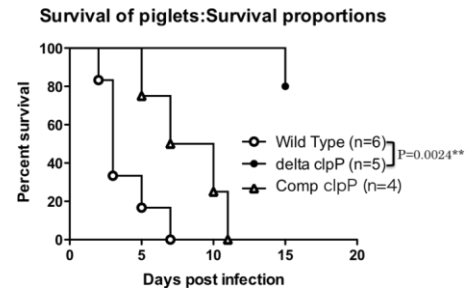


図 3 P1/7 株由来 *clpP* 欠損株鼻腔接種 HPCD 豚の生存曲線

- (4) 1,905 個の遺伝子を標的としたマイクロアレイ解析では、P1/7 株 (親株) と比較して *clpP* 欠損株で 2 倍以上の発現上昇を認めた遺伝子は 55 個、発現が半分以下となった遺伝子は 25 個であった。これら遺伝子の推定される機能は多様であるが、MRP や EF 等、病原性との関連が注目されている因子は含まれておらず、また莢膜や表層タンパク質のような表層抗原に関連すると予想される遺伝子に顕著な発現低下は認められなかった。この成績からは、*S. suis* の弱毒化に重要な因子に関する知見は得られなかったものの、P1/7 由来 *clpP* 欠損株の抗原性は親株と比較して大きく変化はないことが示唆され、本株はワクチン株候補として有望であると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

第 91 回日本細菌学会関東支部会抄録(口頭発表)、p49、2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大崎 慎人 (OSAKI MAKOTO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所・細菌・寄生虫病研究チーム・主任研究員
研究者番号：80355164

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

関崎 勉 (SEKIZAKI TSUTOMU)

東京大学・農学部・教授

研究者番号：70355163

高松 大輔 (TAKAMATSU DAISUKE)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究

機構・動物衛生研究所・細菌・寄生虫病研

究チーム・主任研究員

研究者番号：60414728