

日 生 研 報

2012年(平成24年)11月号 第58巻 第6号(通巻577号)

挨拶・巻頭言

「序破急」

.....小林 恒夫 (2)

獣医病理学研修会

第51回 No.1043 イヌの下腿部筋間腫瘍
.....大阪府立大学 (3)

第50回 No. 1002 イヌの舌下部腫瘍
.....鹿児島大学 (4)

第51回 No. 1038 ラットの頸腹部腫瘍
.....残留農業研究所 (5)

論文紹介

Avibacterium paragallinarum の
RTX 毒素様遺伝子およびオベロンの
同定と性状解析.....今井 孝彦 (6)

発表論文紹介

近年の日本における豚丹毒発症例から分離
した *Erysipelothrix rhusiopathiae*
株の性状について.....堤 信幸 (14)



NIBS

一般財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

<http://nibs.lin.gr.jp/>



「序破急」

小林 恒夫

今年の夏、数十年ぶりに能を観賞した。学生の頃、謡を習っていたこともあって、若いころは年に4・5回は能に接する機会があったように思う。学生の頃といっても高校までの間なので、必ずしも好きで能を見に行っていたわけでもなく、行き掛かり上謡を習い、その延長上で能に接していたというところである。そんなわけで、演目がどうか、作者や演者がどうかというようなことを考えたり、調べたりするというようなこともなく、ただ漫然とその場に居合わせたというような塩梅であった。それでも、避けようともせず機会があれば能楽堂に座っていたのは、もともと笛、鼓といった和楽器が好きであったことと、一応謡を習っていたので居心地が悪くはなかったためであろう。

能は構成上歌舞劇に分類されるが、オペラやミュージカルと違って使われる楽器は1本の笛、太鼓、大鼓、小鼓の4種だけで、極めて簡素な構成である。演目によっては太鼓がない場合もある。その簡素な構成の楽器で奏でられる楽曲というよりお囃子を楽しむということになるが、そのお囃子で物語の情景を想像するための雰囲気を提供される。その雰囲気の中で謡によって物語が語られ、舞われる。お囃子は概してゆっくりで単調に聞こえる上、物語も世の喜怒哀楽を題材にした比較的単純なものが多い。物語が単純なだけに、頑張っって物語を追う必要はなく、また、音楽に耳を集中させる必要もないので、物語から離れて自由気儘に情景を想像することが出来る。それが大変心地よい。数十年ぶりに観賞しても同じような感覚に浸ることが出来た。極めていい加減な観賞の仕方である。昔、舞い手七分に聞き手三分の利があり、楽しみがあるという様なことを聞いたことがある。演じる側には物語を自らの感性で感じ表現する楽しみがあるが、観賞する側は演じられたものから感じることになり、その分、感動が少ない、あるいは自由に感じる事ができないというようなことであったと思う。それなら、分の悪い聞き手としては、少々は自由に接してもいいのではないかと勝手に解釈して、いい加減な観賞の仕方の言訳にしている。

謡には観世、金剛、金春、宝生、喜多の5流があり、私は京都で育ったこともあって、金剛流の謡を習った。その為、金剛流の能に接する機会が多い。俗に、舞金剛といわれるが、金剛流の舞は華やかであり、優美であるといわれ、謡もそれを反映している。残念ながら能を観賞するというより、雰囲気に入りながら夢想する方なので、金剛流の能に優美さとか、華やかさを見出すほどの観賞眼を持たないが、メリハリがはっきりしていて心地よく、物語に入り込み易いという風を感じている。

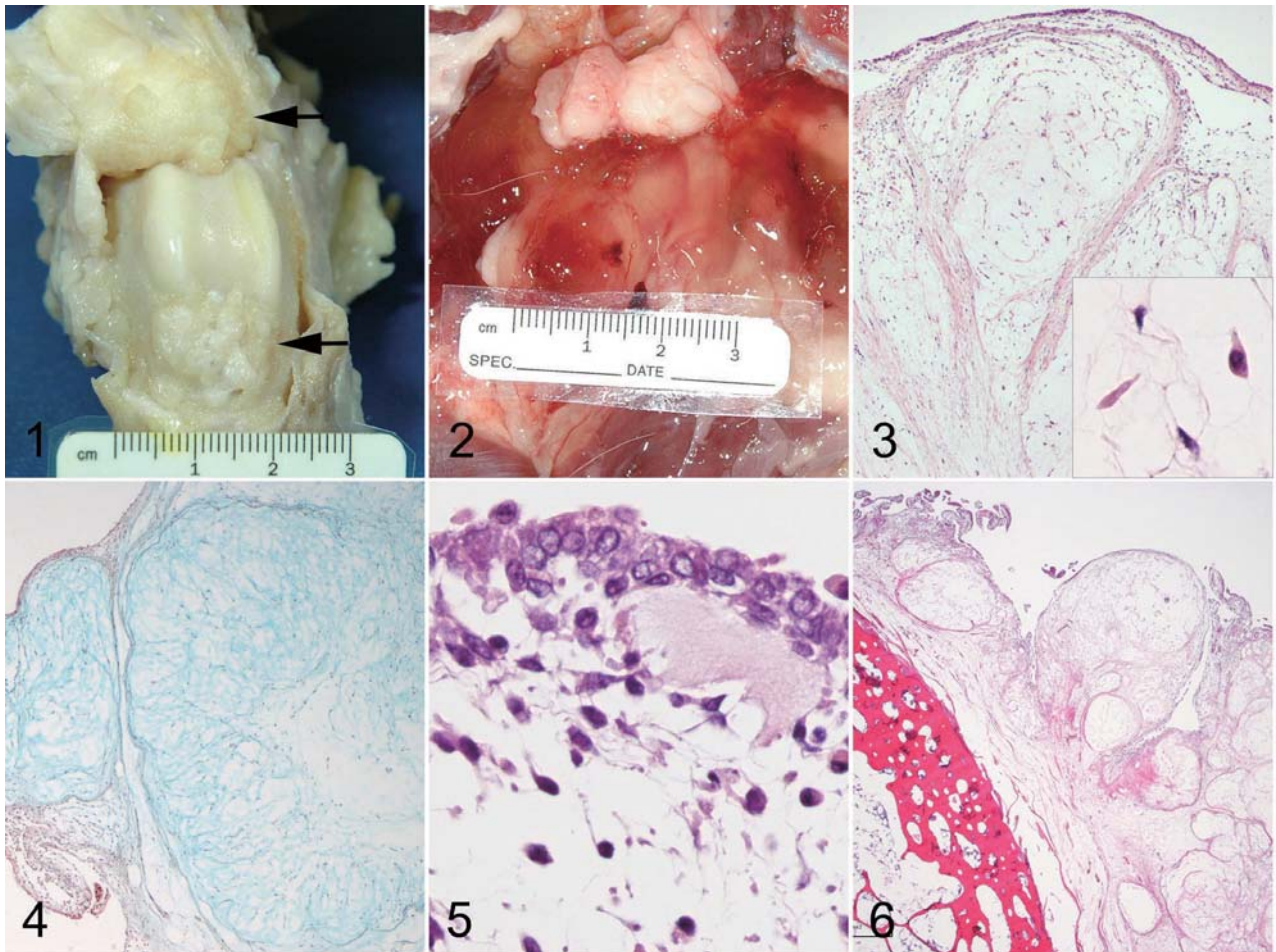
能では「序破急」という言葉が使われ、1番の能、1曲の謡、1句の中に、さらには1音、1舞の中に「序破急」があり、なければならないといわれる。能は構成上、「序」の物語の導入部、それを受け継ぐ「破」での展開部、「急」での終結部に至る3つの部分からなっている。それに合わせて、「序」ではゆっくり、「破」では少し早く細やかに変化に富んで、「急」ではテンポを速めて短く、躍動的に、メリハリをつけて演じられる。この序破急のメリハリが「序」「破」「急」の中にも、1句の中にも、一つの足の運びにも表現される。そのリズムを、舞を楽しむのであるが、一般的にテンポはゆっくりしている。「序」の部分は始まったばかりで集中して観ているが、「破」の場面になると、少しは速くなってはくるものの、猶ゆるやかなので、ついつい物語からそれて余分なことを想ってしまう。派手さはないものの、この「破」の部分は物語の展開部、中枢部分で「急」のクライマックスに向けての準備期間なので、演ずる側にとっても、観賞する側にとっても最も重要な部分であるが、観る側には最もつらい、眠気を催す時間でもある。一見静かに演じられるのであるが、「静中動あり」で変化もあり、クライマックスに導く準備が粛々と進められるのである。ところが、この一番大切な玄人好みの部分で大抵いい加減な観方で余計なことを想っているため、「急」に向かう切り替えの笛に慌てて居住まいを正し、物語に戻ることを繰り返している。「破」の場面でより深く入り込めれば、能をより深く楽しめるものと悔やんでいる。

今、我々はバブル崩壊後の新たな秩序の求められている場面にいる。グローバル資本主義が世界経済活性化の切り札のように言われていた時期もあったが、グローバル資本が自由を獲得すればするほど富や所得の格差拡大や地球規模の環境破壊、世界経済の不安定化を招く兆候を示すなど、社会に様々な負の効果をもたらしてきているように見える。先進諸国といわれる国々では不安定な経済情勢に汲々としている一方、新興諸国は着実に豊かになってきている。伝統産業で活性を取り戻した地域もあれば、誘致企業の海外移転で活性が失われていく地域もある。技術開発で新たな市場開拓をなした企業もあれば、既存技術の応用で新たな市場を生み出した企業もある。今、新しい時代に向かって、世界が、国が、地域が、そして様々な組織が、人が、着地点を模索している。見えてはいないが、すでにあるべき安寧秩序への道筋を歩んでいるのかもしれない。その最も重要な変化の時期、「破」の場面に遭遇しているのではないかと思ひながら、先日も国立能楽堂に座っていた。

(理事)

イヌの下腿部筋間腫瘍

大阪府立大学獣医病理学教室 第 51 回獣医病理学研修会 No. 1043



動物：イヌ，雑種，雄，17歳。

臨床事項：腎不全の治療のため本学を来院。その際，右後肢の浮腫が認められた。初診から7ヶ月後，元気消失および起立不能となり，超音波検査にて左腎に腫瘍が認められた。状態悪化のため，安楽殺が施され，当教室にて剖検が行われた。

剖検所見：右膝関節の大腿脛関節および大腿膝蓋関節の関節面に，直径7mmに至る多結節性灰白色軟性腫瘍が認められた（図1）。腫瘍は大腿脛関節から連続して，近位下腿部の筋間まで伸展していた。同様の腫瘍が大腿部筋間にも認められた。筋間腫瘍の一部は嚢胞状を呈し，その内部に透明なゼリー状物質が貯留していた（図2）。

参考所見：左腎に3×3×4cmの白色硬性腫瘍がみられ，病理組織学的に腎細胞癌と診断されたが，他臓器への転移は認められなかった。

組織所見：筋間腫瘍は，少数の紡錘形ないし星状の間葉系細胞（図3；挿入図）と粘液基質（図4；アルシアン青染色）からなる多結節性病変であり，嚢胞内腔面ではA型滑膜細胞様細胞の内張りが認められた（図5）。同様の病変が，膝関節の関節包および大腿骨・脛骨の関節面でみられたが，骨浸潤は認められなかった（図6）。免疫染色では，結節内の間葉系細胞および嚢胞の内張り細胞はビメンチンに強陽性で，その一部はマクロファ-

ジマーカー（MSR-A）とPCNAに陽性を示した。サイトケラチンとS-100には陰性を示した。

診断：滑膜粘液腫 Synovial myxoma

考察：上記の病理学的所見は，既報のイヌの滑膜粘液腫と一致しており，膝関節原発の滑膜粘液腫と診断した。本症例では，大腿部および下腿部の筋間に広く浸潤がみられたものの，明らかな臨床症状（運動障害）を示さず，骨浸潤も認められないことから良性腫瘍と考えた。滑膜粘液腫の由来細胞については未だ不明であるが，本症例では膝関節から離れた下腿部筋間においても，間葉系細胞（B型滑膜細胞様）に加えて，嚢胞を内張りする細胞（A型滑膜細胞様）の増殖が認められ，滑膜粘液腫の病理組織学的特徴の一つと考えられた。

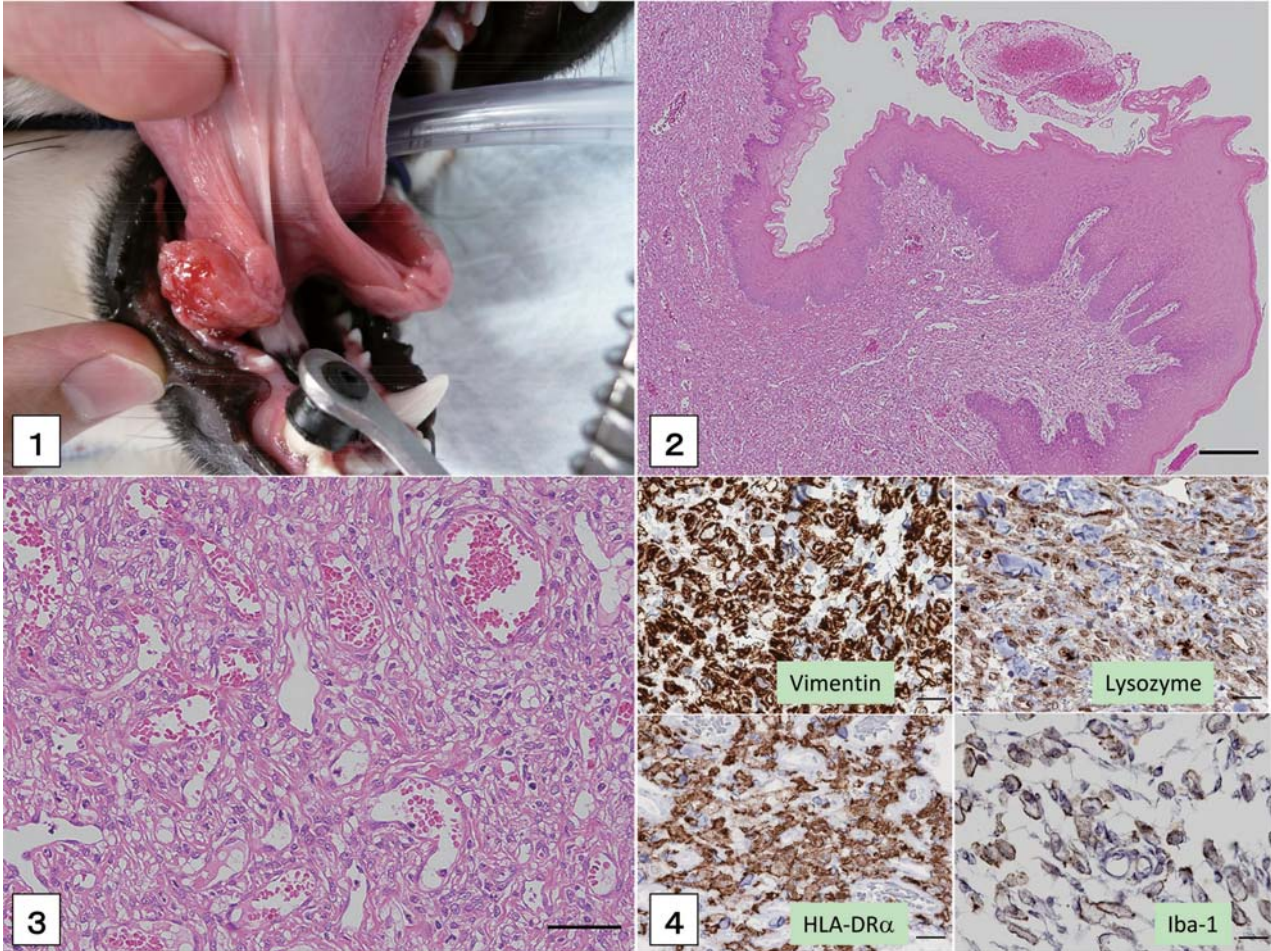
（井澤武史）

参考文献：

1. Craig, L. E., Krimer, P. M., Cooley, A. J. 2010. Canine synovial myxoma : 39 cases. *Vet. Pathol.* **47** : 931-936.
2. Craig, L.E., Julian, M.E., Ferracone, J.D. 2002. The diagnosis and prognosis of synovial tumors in dogs : 35 cases. *Vet. Pathol.* **39** : 66-73.
3. Pool, R. R. and Thompson, K. G. 2002. Tumors of joints. pp. 199-243. *In* : Tumors in Domestic Animals, 4th ed. (Meuten, D. J. ed.), Iowa State Press, Ames, Iowa.

イヌの舌下部腫瘍

鹿児島大学組織病理学分野 第50回獣医病理学研修会 No. 1002



動物：イヌ，柴犬，雄，7カ月齢。

臨床事項：5カ月齢頃から歩行時にふらつくようになり，徐々に顕著となり，6カ月齢時に開業動物病院に来院した。頭位変換時の外側腹斜視が認められ，血液検査ではリンパ球の細胞質に空胞が観察されたため，GM1 ガングリオシドーシスを疑い，本学に遺伝子検査が依頼された。検査の結果，柴犬のGM1 ガングリオシドーシスの原因変異 (del C1647) のホモ接合体であることが明らかとなった。本症例は，購入時の3カ月齢時にはすでに左右の舌下腺付近に腫瘍が生じており，提出標本は7カ月齢時に摘出された腫瘍である。腫瘍は左3×2 cm大，右2.5×1.5 cm大 (提出標本)，両側とも淡赤色を呈し，嚢胞状で，少量の透明な粘液が貯留し，嚢胞壁は1～数 mm 大に肥厚していた (図1)。本症例は，12カ月齢時に中枢神経障害が進行性に悪化して自然死したが，剖検は行われなかった。

組織所見：口腔粘膜の固有層に大型類円形の泡沫細胞が多数浸潤し，血管線維組織の増生もみられた (図2)。泡沫細胞の核は類円形で，淡明や空虚な細胞質は単発空胞状あるいは微細網状を呈しており，脂肪芽細胞様であった (図3)。腫瘍のスタンプ塗抹標本でも細胞質は

空胞状であった。嚢胞内腔側および嚢胞壁の中心部も同様で，腫瘍全体に泡沫細胞が多数浸潤していた。一部には好中球を主体とする細胞浸潤も認められた。泡沫細胞の空胞はアルシアンブルー染色およびPAS染色陰性で，ズダンⅢ陽性の微細な脂質顆粒が空胞内に認められる細胞が少数存在した。免疫染色において，泡沫細胞はビメンチン強陽性サイトケラチン陰性，S-100陰性，リゾチーム陽性，HLA-DR陽性，Iba-1陽性であり，腫大したマクロファージであった (図4)。ホルマリン固定後の電顕検索では，泡沫細胞の細胞質にライソゾームと思われる空胞構造はみられるが，明瞭な細胞質内層状構造物はみられなかった。また，厚切り標本において細胞質に大型の脂肪滴は認められなかった。

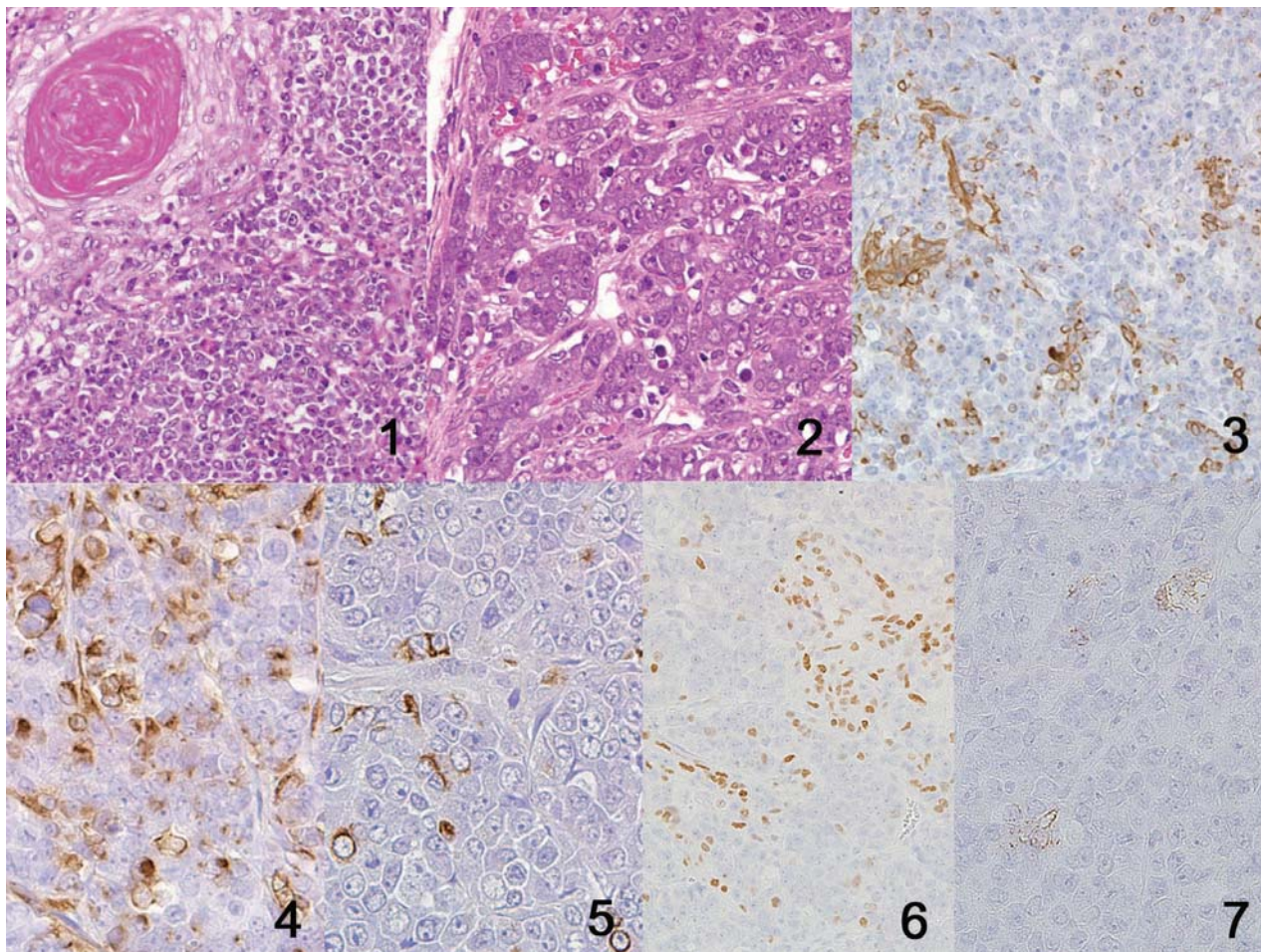
診断：GM1 ガングリオシドーシスの柴犬における泡沫細胞集簇を伴う唾液腺嚢胞

考察：一般的な犬の唾液腺嚢胞においてもマクロファージが多数浸潤するが，本症例のような脂肪芽細胞様に腫大した泡沫細胞の形態を呈することはなく，GM1 ガングリオシドーシスによるマクロファージの形態変化を伴うことが特徴的である。

(三好宣彰)

ラットの頸腹部腫瘍

残留農薬研究所 第 51 回獣医病理学研修会 No. 1038



動物：ラット, Wistar Hannover (BrlHan: WIST@Jcl [GALAS]), 雌, 16 週齢。

臨床事項：繁殖毒性試験に用いた動物で、妊娠 20 日目に計画殺、剖検の 12 日前より頸腹部に腫瘍が触知された。

剖検所見：頸腹部皮下に直径約 30 mm の淡褐色腫瘍が観察された。腫瘍の一部に正常の唾液腺が確認された。腫瘍の横断面は、淡褐色～白色、充実性で、内部に暗赤色巣が散見された。

組織所見：腫瘍は皮下に存在し、線維性の被膜で被包化され表皮との連続性は見られなかった。腫瘍細胞は類円形から楕円形の核と好塩基性の比較的乏しい細胞質を有し、充実性に増殖していた。また、腫瘍全体に扁平上皮化生が散見された (図 1)。腫瘍の辺縁部では線維性結合織に分画され胞巣状に増殖する部位 (図 2) が認められ、明瞭ではないものの、一部に腺管状に増殖する像も見られた。高悪性度を示す所見として、核の異型性や分裂像とともに、出血、壊死、被膜への軽度の浸潤像が観察された。腫瘍細胞は PAS 染色陰性、免疫染色では Keratin (図 3)、Vimentin (図 4)、GFAP (図 5)、p63 (図 6)、Prominin-1 (図 7) に陽性であった。

診断：唾液腺にみられた低分化腺癌

考察：腫瘍細胞は中心部では充実性増殖を、辺縁部では胞巣状増殖を示し、Keratin および Vimentin に陽性で

あった。ラットの唾液腺由来の未分化癌では、腫瘍細胞が Keratin と Vimentin の両方に陽性を示すという報告¹⁾があり、組織像も今回の症例と類似していたことから、診断の候補に挙げられた。一方、本症例では p63 および GFAP に陽性を示す筋上皮様の細胞が認められたことから、多形腺腫もしくは筋上皮腫 (筋上皮癌) も疑われた。しかし軟骨や粘液などの基質の産生を認めないこと、および増殖パターンの違いからこれらを除外した。前述の未分化癌では腫瘍細胞が筋上皮への分化を示すという報告はなされていないこと、本症例では一部に腺管状に増殖する部位が見られたことから、本症例を未分化癌ではなく低分化腺癌と診断した。Prominin-1 は唾液腺の介在導管および腺房の上皮細胞の頂端膜や stem cell に陽性を示すことが報告されており、腫瘍細胞にも一部、正常な顎下腺、耳下腺に類似する陽性像がみられたことから、本腫瘍の由来は顎下腺もしくは耳下腺であると考えられた。

(嶋田悠子)

参考文献：

1. Nishikawa, S., Sano, F., Takagi, K., Okada, M., Sugimoto, J., Takagi, S. 2010. Spontaneous poorly differentiated carcinoma with cells positive for vimentin in a salivary gland of a young rat. *Toxicol. Pathol.* 38 : 315-318.

Avibacterium paragallinarum の RTX 毒素様遺伝子およびオペロンの同定と性状解析

今井 孝彦

Identification and Characterization of an RTX Toxin-Like Gene and Its Operon from *Avibacterium paragallinarum*

Avian Diseases 56 : 537–544, 2012

Yen-Chiang Pan^a, Duen-Huey Tan^a, Jui-Hung Shien^b, Chun-Chi Liu^c, Yi-Siang He^a, Pin-Chun Shen^b, and Poa-Chun Chang^{a,d}

Graduate Institute of Microbiology and Public Health^a, Department of Veterinary Medicine^b, Institute of Henomics and Bioinformatic^c, Agricultural Biotechnology^d, National Chung Hsing University, Taichung 402, Taiwan.

要旨

Avibacterium paragallinarum は鶏の重要な呼吸器疾患、伝染性コリーザの原因菌である。全ゲノム解析により *A. paragallinarum* H18 株は、*Pasteurellaceae* の RTX オペロンと非常によく似た RTX 毒素様オペロンを有していることが明らかとなった。このオペロン中には、*avxIC*, *avxIA*, *avxIB*, *avxID* と名付けられた 4 つの遺伝子が見つかった。*avxIA* は、分子量 250 kDa と推定される RTX 様毒素 (AvxIA) をコードしている。AvxIA はペプチダーゼ S8 ドメインと前駆タンパク質転換酵素 P ドメインを持つが、どちらのドメインも他の RTX 毒素では見つかっていない。大腸菌で発現させた組換え AvxIA は溶血性も細胞毒性も持っていなかった。PCR とシーケンス解析により *avxIA* は、本研究で調べた全ての *A. paragallinarum* 株および野外株がコードしていることが明らかになった。*A. paragallinarum* を感染させた鶏から採取した血清は AvxIA に強く反応したことから、AvxIA には免疫原性があることが示唆された。本研究は、*A. paragallinarum* において RTX 毒素様オペロンを同定した最初の報告である。このオペロンの遺伝子産物は疾病の原因に関連している可能性があり、*A. paragallinarum* の優れたワクチンターゲットとなり得ることが示唆された。

序論

Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum (A. paragallinarum) は、鶏に発育不良や産卵率の低下をもたらす重大な呼吸器病である伝染性コリーザの原因菌である。全菌体を使った *A. paragallinarum* 不活化ワクチンは広く用いられているが、伝染性コリーザの発生は続いており、世界中で多大な経済的損失が生じている。*A. paragallinarum* は Page らによって A, B, C 型の 3 つの血清型に分類され、不活化ワクチンはそれぞれの血清型に対してのみ効果を示す。*A. paragallinarum* では、これまでにヘマグルチニン抗原や莢膜、鉄獲得機能を有するタンパク質、リポ多糖、メタロプロテアーゼや putative toxin といったいくつかの病原性因子が同定されている。これらの因子の研究は、*A. paragallinarum* の病原性発現機構の解明と新たな *A. paragallinarum* ワクチンを開発する上で重要である。

RTX 毒素 (Repeats in the structural toxin) は、多くの病原性グラム陰性菌によって産生されるポア形成毒素である。RTX オペロンは CABD パターンをとることが多く、C は活性化タンパク質をコードしており、A は毒素、B と D は I 型に分類される分泌装置をコードしている。多くの RTX 毒素が溶血活性および細胞毒性を有している。近年、RTX 毒素が $\beta 2$ -インテグリンの β サブユニット (CD18)

に結合し、標的細胞のアポトーシスを誘導することが示された。RTX 毒素はグリシンとアスパラギン酸に富む反復配列（ヘモリシンのカルシウム結合配列としても知られている）を有しており、RTX 毒素はこれらの配列を介して自身の機能に必須である Ca^{2+} イオンに結合する。RTX 毒素は *Pasteurellaceae* 科に属するいくつかの菌で主要な病原性因子である。*Pasteurellaceae* 科によって引き起こされる疾患に対するワクチンに RTX 毒素が含まれていることも多々ある。これまで *A. paragallinarum* が RTX 毒素をコードする遺伝子を有しているとの報告はなかったが、RTX 様タンパク質が存在することは示唆されていた。本論文は、*A. paragallinarum* の RTX 毒素様遺伝子とそのオペロンの同定と性状解析について述べている。この RTX 毒素様タンパク質の活性を、溶血性および細胞毒性試験の観点から調べた。また、異種菌株や野外分離株の RTX 毒素様遺伝子の分布を PCR とシーケンス解析によって調べた。

材料と方法

菌株と DNA 抽出

本研究では、221 株と H18 株（それぞれ *A. paragallinarum* A 型および C 型の参照株）と台湾から分離された 6 種類の野外株（TW95, TW96, TW07, TW08, TW09, TW11）を使用した。全ての菌株は、種特異的な PCR により *A. paragallinarum* であることを確認した。台湾で分離された 6 株の血清型は、赤血球凝集抑制法によって全て C 型であると同定した。*A. paragallinarum* は、5% ウシ血清と 0.01% NAD を加えたブレインハートインフュージョン寒天培地で培養した。平板は、37°C のろうそく瓶培養法で培養した。細菌の DNA は DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて分離した。

全ゲノムシーケンス

全ゲノムシーケンスを行うため、H18 株のゲノム DNA を Mission Biotech Inc. (Taipei, Taiwan) に送付した。シーケンス解析は、Genome Sequencer GS Junior System (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) を用いて行った。平均サイズ 8190 bp, 計 296 個のシーケンス配列が得られた。これらの断片から、GLIMMER ソフトを用いてコード領域

である ORF を予測し、BLASTP プログラム (NCBI) を用いて GenBank における相同性を検索した。タンパク質のドメイン構成は Pfam search を用いて調べた。配列のアライメントは LASERGENE (DNASTAR Inc., Madison, WI) の MegAlign プログラムを用いて行った。プロモーターと転写終結点は BPROM と ARNold を用いて予測した。

組換え AvxIA の発現

表 1 に示したプライマーを用いた PCR により RTX 毒素様タンパク質をコードする遺伝子を増幅した。増幅した PCR 産物を適切な制限酵素 (*EcoRI*, *XhoI*, *NheI*, *BamHI* または *Sall*) で切断し、発現ベクター pET23a (Novagen, Gibbstown, NJ) に挿入した。pET23a に挿入された DNA は、シーケンスによって確認した。この組換えプラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し、user's manual of the pET system (Novagen) に従って組換えタンパク質を作製した。この過程を簡単に述べると、組換えプラスミドを有する大腸菌 BL21 (DE3) を 50 mL の Luria-Bertani 培地で OD600 = 0.6 に達するまで培養した。そこに isopropylthio- β -d-thiogalactose を、終濃度 0.4 mM となるように加え、25°C でさらに 12 時間培養した。培養後、3,000×g で 20 分間遠心することにより細胞を沈殿させ、10 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 からなる緩衝液 2 mL に再浮遊した。この懸濁液を超音波処理し、12,000×g で 20 分間遠心した。上清と沈殿画分をそれぞれ集め、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) とウェスタンブロットによって解析した。上清を組換えタンパク質の可溶性画分とした。タンパク質濃度は protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて測定した。

ウェスタンブロット

Animal Health Research Institute (Council of Agriculture, Taiwan) から入手した 20 週齢の SPF 鶏 3 羽から、感染前の血清を採取した。鶏の鼻腔から 5×10^9 CFU の *A. paragallinarum* 台湾分離株である TW07 を感染させた。感染後、全ての鶏が伝染性コリエーザの臨床症状（鼻汁および顔面浮腫）を示した。感染 1 週間後に、全ての鶏の眼窩下洞スワブから *A. paragallinarum* が分離された。感染 1 週間後の血清

表 1 本研究で使用したプライマー

	Primer name	Primer sequence ^A
Primers used for amplification of RTX toxin genes		
Gene amplified ^B		
<i>avxIA</i> (6861 bp)	AvxIA-Eco(+)	5'- <u>GAA TTC</u> ATG AGT AGT GGA AAT AAA G-3'
	AvxIA-Xho(-)	5'- <u>CTC GAG</u> TTT CCA ATT CGC TGC CAA AA-3'
<i>avxICA</i> (7447 bp)	AvxIC-Nhe(+)	5'- <u>GCT AGC</u> AAA CTG ATA GAC TTC TTA AAC-3'
	AvxIA-Xho(-)	5'- <u>CTC GAG</u> TTT CCA ATT CGC TGC CAA AA-3'
<i>apxIA</i> (3069 bp)	ApxIA-Bam(+)	5'- <u>GGA TCC</u> AAC TCT CAG CTC GAT AGA-3'
	ApxIA-Xho(-)	5'- <u>CTC GAG</u> AGC AGA TTG TGT TAA ATA A-3'
<i>apxICA</i> (3594 bp)	ApxIC-Nhe(+)	5'- <u>GCT AGC</u> AAA AAA ATT AAT GGA TTT GAG G-3'
	ApxIA-Sal(-)	5'- <u>GTC GAC</u> AGC AGA TTG TGT TAA ATA A-3'
Primers used for detection of the <i>avxIA</i> gene in <i>A. paragallinarum</i>		
Fragment amplified ^C		
F1 (nt 1-2843)	F1(+)	5'-ATG AGT AGT GGA AAT AAA G-3'
	F1(-)	5'-GCT GAG TGA TAA CAA AAG GA-3'
F2 (nt 2533-4800)	F2(+)	5'-AGT GGT GAT GGA GGT GAT GA-3'
	F2(-)	5'-ACC AAT GAG CAA ATT ACG CTT A-3'
F3 (nt 3409-6858)	F3(+)	5'-CAT TGG GTT GGT GCG GAT AC-3'
	F3(-)	5'-TTT CCA ATT CGC TGC CAA AA-3'
F4 (nt 165-2843) ^D	F4(+)	5'-GAT CAA CAA CTC GAA ACA GCA A-3'
	F1(-)	5'-GCT GAG TGA TAA CAA AAG GA-3'

^A制限酵素 (*EcoRI*, *XhoI*, *NheI*, *BamHI*, *SalI*) 切断配列を下線で示した。

^BPCR で増幅される遺伝子の大きさを括弧で示した。

^CH18 株の *avxIA* の開始コドンに nt 1 とした。

^DF4 は H18, TW95, TW08, TW09, TW11 株, F4' は 221, TW96, TW07 株ゲノム DNA から PCR によって増幅した。

を採取し、感染前後の血清をそれぞれウェスタンブロット解析用にプールした。動物実験は、Institutional Animal Care and Use Committee at National Chung Hsing University の許可を受けて行った。

ウェスタンブロット解析では、まず組換えタンパク質の可溶性画分と不溶性画分を、Mini-Protein 3 system (Bio-Rad) を用いた SDS-PAGE に供した。タンパク質を semi-dry transfer system (Bio-Rad) を使ってニトロセルロースメンブレンに転写した。メンブレンを 3% スキムミルクでブロッキングし、2000 倍に希釈した 6 × ヒスチジンタグに対するマウスモノクローナル抗体 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) または 500 倍に希釈した感染前もしくは後の血清を作用させた。その後、アルカリフォスファターゼでラベルされた抗マウス IgG 抗体 (200 倍希釈) または抗鶏 IgG 抗体 (5000 倍希釈) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) を用いて検出した。

細胞毒性、溶血性およびプロテアーゼ試験

細胞毒性試験は、Kuhnert らが述べた方法に従って行った。簡単に述べると、鶏から 10 mL の全血をヘパリンシリンジを用いて採取した。血液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 1:3 となるように希

釈し、10 mL の Histopaque-1077 溶液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) の上に慎重に重層した。これを 600 × g で 20 分間遠心し、相分離した。中間層から末梢血単核球 (PBMC) を回収し、PBS で一回洗浄した。細胞を RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich) に再浮遊し、3 × 10⁵ 個の PBMC (200 μL の培地中) を 96 穴プレート各ウェルに撒いた。組換えタンパク質 (5 μg/μL) の可溶性画分をフィルター滅菌し、これを各ウェルに加え 37°C、5% CO₂ の条件下で 3 時間培養した。CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega, Madison, WI) を用いて user's manual に従って、細胞毒性を測定した。

溶血性試験は Kristensen らが述べた方法に従って行った。10 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ からなる緩衝液に、2% となるように鶏赤血球を加えた。この赤血球浮遊液 (900 μL) とフィルター滅菌した組換えタンパク質 (5 μg/μL) の可溶性画分を混合し、37°C で 2 時間培養した。800 × g で 2 分間遠心して溶血していない赤血球を除いた後、上清に放出されたヘモグロビンの量を 540 nm の吸光度により測定した。赤血球を 1% Triton X-100 で溶解したサンプルを、100% の赤血球が溶解した基準とした。

異なる *A. paragallinarum* 株間における *avxIA* 遺伝子の PCR による検出

F1 (+) /F1 (-), F2 (+) /F2 (-), F3 (+) /F3 (-), F4 (+) /F1 (-) という 4 組のプライマーを *avxIA* の異なる領域を増幅するために使用した。これらのプライマーの配列は表 1 に示した。PCR 産物は QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製し, Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて自動シーケンサー (ABI-3730XL DNA Analyzer, Applied Biosystems) で両方向から配列を決定した。配列は LASERGENE package (DNASTAR Inc.) の Seqman プログラムに集めた。本研究で得られた塩基配列は, GenBank の登録番号 JQ289154-JQ289156 から入手できる。

結果

A. Paragallinarum における RTX 毒素様オペロンの同定

A. paragallinarum H18 株の全ゲノムシーケンスを行い, H18 株が RTX 毒素様オペロンを有していることが明らかになった。このオペロンは, 別の細菌の RTX オペロンに類似していたことから,

avxI (*Avibacterium* RTX toxin I) と名付けられた。このオペロンには, *avxIC*, *avxIA*, *avxIB*, *avxID* と名付けられた 4 つの遺伝子が見つかった (図 1A)。配列から推定されるプロモーターが *avxIC* の上流に, 転写終結点シグナルは *avxID* の下流に見つかった (図 1A)。推定されるプロモーターと転写終結点の位置は, 他の細菌の RTX 毒素オペロンとよく似ていた。*avxI* オペロンは, *orf1*, *nhaP* という二つの遺伝子に挟まれている (図 1A)。*orf1* 遺伝子は, GenBank に登録されたどのタンパク質とも相同性のない, 機能未知なタンパク質をコードしている。*nhaP* 遺伝子は, Na⁺/H⁺対向輸送体遺伝子と 77% の相同性を示すタンパク質をコードしており, このタンパク質が RTX 毒素の機能に関連するとの報告はない。

avxI オペロンにある 4 つの遺伝子の中で, 配列から推定すると *avxIA* は RTX 様毒素をコードしており, 約 250 kDa であると推定される。BlastP で検索したところ, AvxIA は *G. anatis* (登録番号 AEC17940) の RTX 毒素様溶血素ともっとも相同性が高い (74%) ことが分かった。Pfam で調べたところ, AvxIA は 24 個のヘモリシンカルシウム結合反復配列と 1 個の RTX C 末端ドメインを有していることが明らかになった (図 1B)。これらの特徴は, Avx-

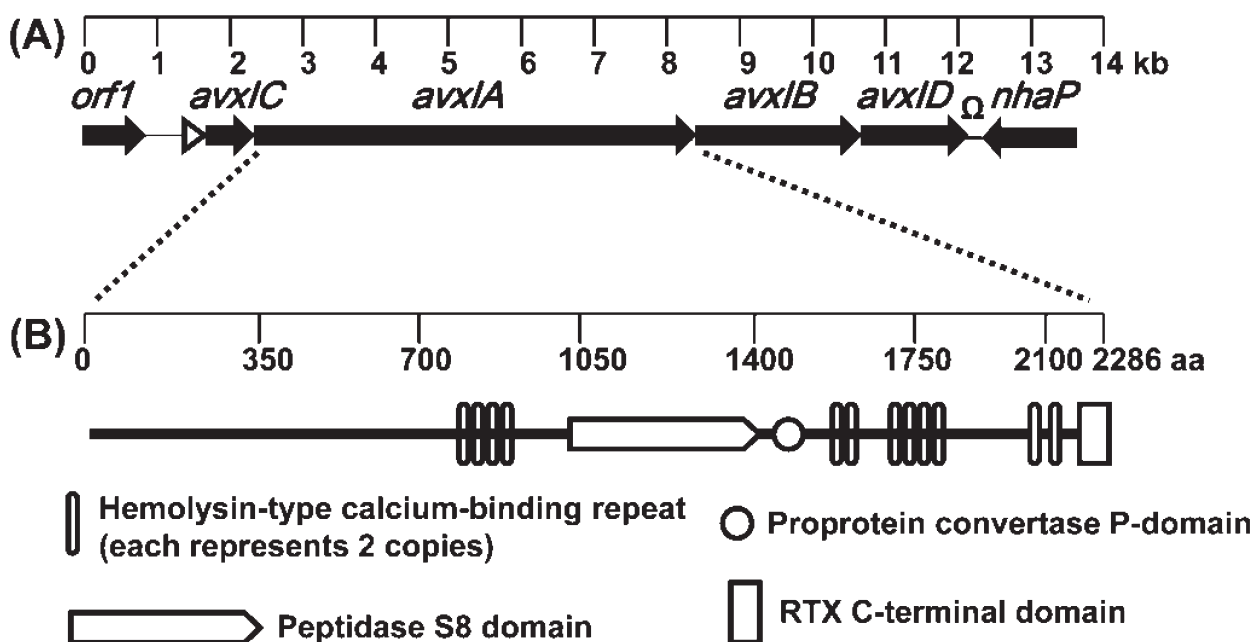


図 1 (A) *A. paragallinarum* の *avxIA* オペロンの遺伝子構成。

矢印は遺伝子の位置と向きを表している。

遺伝子の名前を各矢印の上部に示した。

推定されるプロモーター配列 (Δ) と転写終結シグナル (Ω) を示した。

(B) H18 株の AvxIA のドメイン構成。

1	MSK	KING	FEVLG	--	EVA	WL	WASS	SPLH	---	RKW	PLS	LL	LAIN	VLP	-	AIES	NQ	ApxIC																					
1	ML	----	FD	VMG	--	KVA	WL	WACS	SPLH	---	KKW	PLS	VF	AIN	VIP	-	AIOT	NQ	HlyC																				
1	MSK	LID	FLN	RIK	CRH	VAC	LF	VMY	LIF	LP	FQ	PW	VIA	EIT	TP	IR	KK	MI	EEDA	AvxIC																			
45	YV	LL	KR	-	DG	FP	--	IA	FCS	WAN	LN	-	LE	NE	IK	YL	DD	VAS	---	LV	AD	DW	TSG	D	ApxIC														
40	FAL	L	IK	-	DEL	P	--	VA	FCS	WAS	LD	-	LE	CE	VK	YI	ND	VTS	---	LY	PK	DW	MS	SGE	HlyC														
51	IQ	IY	VQ	P	DE	WR	RL	R	GIT	S	VAT	AS	T	P	LE	WY	FL	WE	VE	HSD	I	M	F	Q	T	I	V	FEN	AvxIC										
88	RR	WF	ID	WI	AP	FG	DS	AA	LY	KH	---	MR	DN	FP	NE	LF	RA	-	IR	VD	PD	SR	VG	KIS	ApxIC														
83	RK	WF	ID	WI	AP	FG	HN	ME	LY	KY	---	MR	KK	YP	YE	LF	RP	-	IR	LD	ES	SK	TG	KIA	HlyC														
101	RV	YN	AR	F	ID	P	-	KT	KIL	LY	NN	DE	T	K	ER	K	R	F	GG	C	I	F	AS	RY	LY	YD	PL	I	H	KII	AvxIC								
133	EF	HGG	KID	KK	L	ASK	I	FQ	QY	H	FEL	M	S	E	L	K	N	KON	--	FK	F	S	L	VNS	ApxIC														
128	EF	HGG	GID	KK	L	ASK	I	FR	QY	H	HE	L	M	S	E	V	K	N	ROD	--	F	N	F	N	I	E	KEN	HlyC											
150	AS	VR	---	D	V	F	AL	S	P	N	Y	L	S	G	G	Y	N	M	A	E	D	E	F	N	N	Q	S	R	L	R	K	F	L	Q	N	Y	N	F	AvxIC

図2 *A. paragallinarum* AvxIC, *E. coli* の HlyC, *A. pleuropneumoniae* の ApxIC のアミノ酸配列比較。同一もしくは類似したアミノ酸は太字で示した。全ての株で保存されているアミノ酸は影付きで示した。

IA が RTX 毒素様タンパク質であることを示唆している。Pfam から得られた結果から、AvxIA はペプチダーゼ S8 ドメインと前駆タンパク質転換酵素 P ドメインを有していることも分かった。これら2つのドメインが、AvxIA 中でどのような機能を持つかは明らかになっていない。avxIB と avxID という二つの遺伝子が avxIA の下流にある (図 1A)。これら二つの遺伝子は、*Gallibacterium anatis* の HlyB と HlyD (AEC17941, AEC17942) とそれぞれ 81% および 88% の相同性を有するタンパク質をコードしている。HlyB と HlyD は、RTX 毒素の分泌に必須の I 型分泌装置を構成している。

avxIC 遺伝子は、avxIA の上流にコードされている。avxIC 遺伝子は、配列から推定するに活性化タンパク質をコードしている。AvxIC は他の細菌の RtxC タンパク質とあまり相同性がないが、AvxIC の配列は二つの代表的な RtxC タンパク質である大腸菌の HlyC そして *Actinobacillus pleuropneumoniae* の ApxIC と並べてみると、合計 46 個のアミノ酸残基がこれら3つのタンパク質間で保存されていたことがわかった (図 2)。このアミノ酸配列の保存性は AvxIC が、RTX 毒素の活性化タンパク質であるアシラーゼ HlyC や ApxIC と似た機能を有している可能性を示唆している。このことは、AvxIA には 15 個ものアシル化されうるリジンがあることから支持される。

組換え AvxIA の発現と性状解析

多くの RTX 毒素が細胞毒性および溶血活性を示す。AvxIA にこれらの活性があるかを調べるために、avxIA を *A. paragallinarum* からクローニングし、6 × ヒスチジンタグを C 末端に持つ AvxIA を大腸菌で組換えタンパク質として発現した。単独でも avxIC と同時に発現させても、avxIA は発現した。avxIA に加え、*A. pleuropneumoniae* の apxIA も発現させた。この ApxIA は、溶血性と細胞毒性の両方を有していることが知られているため、本研究では陽性コントロールとして用いた。avxIA と同様、apxIA も単独または avxIC と同時に発現させた。組換え AvxIA (r-AvxIA) および ApxIA (r-ApxIA) の分子量は計算上それぞれ約 250 kDa と 110 kDa である。r-AvxIA と r-ApxIA を大腸菌で発現させた (図 3A)。r-AvxIA では、250 kDa より小さいタンパク質のバンドが多数検出され、これは単独で発現しても avxIC と共発現しても同様であった (図 3A)。これらのタンパク質のバンドは、r-AvxIA が翻訳後修飾を受けているもしくは切断されているために生じるのかもしれない。r-AvxIA とは対照的に、r-ApxIA ではこれらのバンドは検出されなかった。r-AvxIA および r-ApxIA いずれも、発現したタンパク質の大部分が不溶性画分で検出されたが、いくらかは可溶性画分でも検出された。通常、不溶性画分にあるタンパク質は生理活性の無い封入体を形成することから、溶血試験と細胞毒性試験には可溶性の r-AvxIA および r-ApxIA のみを使用した。コント

ロールと比較して, r-AvxIA は単独発現でも r-AvxIC と共発現でも溶血活性と細胞毒性のいずれも示さなかった (図 3B)。一方で r-ApxIA は r-ApxIC と共発現したときに強烈な溶血性と細胞毒性を示した (図 3B)。この結果は, r-AvxIA は溶血素でも細胞毒素でもないということを示唆している。

A. *paragallinarum* における *avxIA* 遺伝子の分布

異なる領域にアニーリングするプライマーを用いた PCR により, *A. paragallinarum* の異種菌株や台湾分離株での *avxIA* 遺伝子の分布を調べた (図 4A)。はじめに F1 (+) /F1 (-), F2 (+) /F2 (-), F3 (+)

/F3 (-) という三組のプライマーを用いた。三組のプライマーは H18 株のシーケンス解析に基づいて設計した (表 1)。これらのプライマーを用いた PCR では F1, F2, F3 という DNA 断片が増幅されるが, これはそれぞれ *avxIA* の 5'末端, 中央部分そして 3'末端にあたる (図 4A)。F1 (+) /F1 (-) プライマーを用いた PCR では, F1 フラグメント (2.8 kb) は H18 株のみから検出された (図 4B)。この結果は F1 (+) もしくは F1 (-) プライマーは, H18 以外の株では F1 フラグメントの増幅に適していないことを示している。一方, F2 (+) /F2 (-) と F3 (+) /F3 (-) プライマーを用いた PCR では,

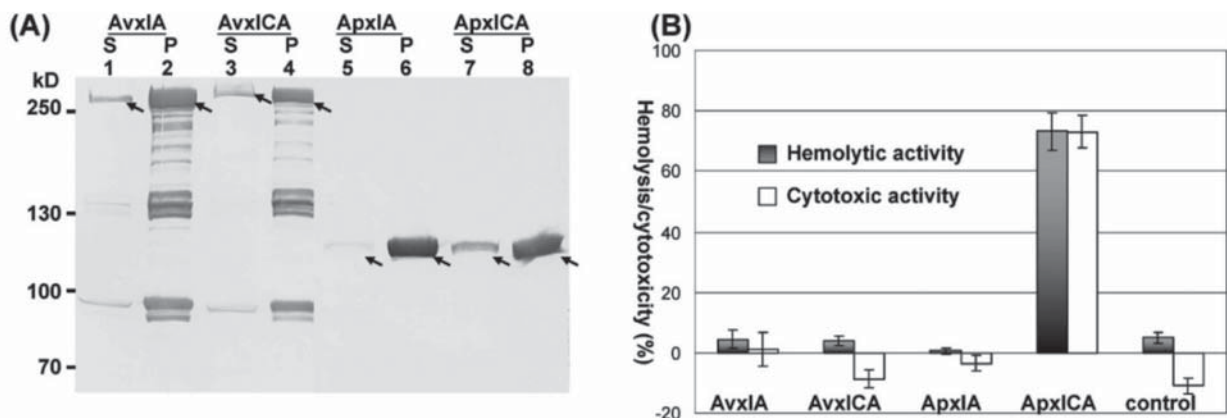


図 3 (A) 大腸菌で発現した組換え RTX のウェスタンブロット解析。組換えタンパク質はマウス抗 6 x ヒスチジン抗体で検出した。S と P はそれぞれ可溶性画分と沈殿物画分を表している。全長の r-AvxIA と r-ApxIA に相当するバンドを矢印で示した。
(B) 組換え RTX の可溶性画分を用いた溶血性および細胞毒性試験。

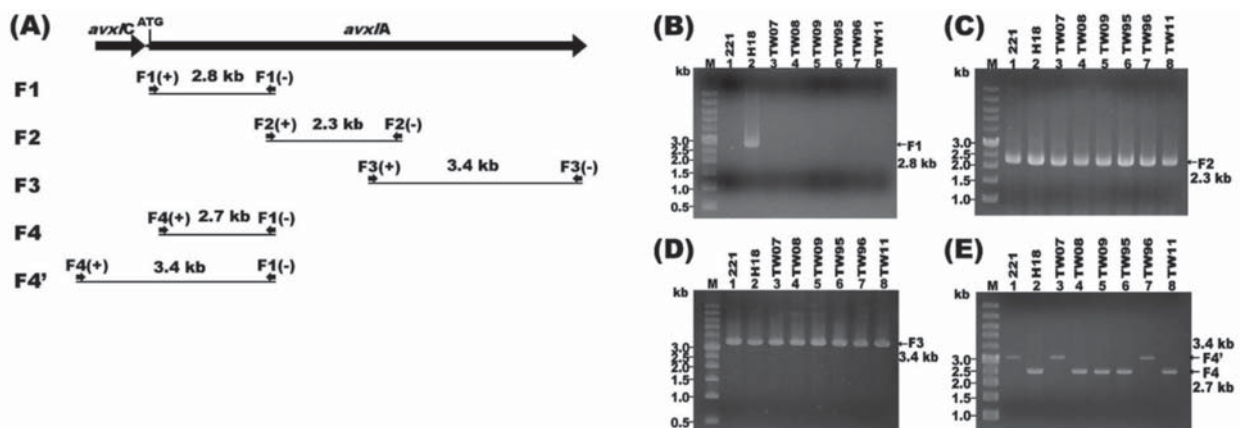


図 4 (A) *avxIA* を検出するために使用したプライマーの位置。大きい矢印は遺伝子の位置と向きを示しており, ATG は *avxIA* の開始コドンを表している。小さい矢印は各プライマーの位置を示している。細い線は PCR によって増幅される DNA のフラグメント (F1-F4 と F4') を示しており, 線の上には各フラグメントの大きさを表示した。
(B-E) *A. paragallinarum* ゲノムから PCR で増幅した F1-F4 と F4' フラグメントを泳動したアガロースゲルをエチジウムブロムマイドで染色した写真。
(E) に示したフラグメント F4 と F4' は, 電気泳動前に QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて精製した。

全ての株において F2 (2.3 kb) と F3 (3.4 kb) フラグメントが検出された (図 4C, D)。株間で F2 と F3 の配列を比較したところ、99.4-100%の相同性があった。H18 以外の株で F1 領域の DNA フラグメントを PCR で増幅するために、いくつかのプライマーを試した。その中で F4 (+) /F1 (-) プライマーの組み合わせにより、H18, TW08, TW09, TW95, TW11 の F4 フラグメント (2.7 kb) が増幅することを見出した (図 4E)。さらに 221, TW07, TW96 株において、F4 (+) /F1 (-) プライマーを用いた PCR では F4' と名付けられた 3.4 kb のフラグメントが検出された (図 4A, E)。F4' のシーケンス解析により、F4' は *avxIC* の上流から *avxIA* の 5' 末端領域であることがわかった (図 4A)。F4 と F4' のシーケンス解析により、*avxIA* の 5' 末端領域の配列が明らかになった。

株間で F4 と F4' のシーケンス配列を比較したところ、*avxIA* の 1-993 番目 (H18 株) の配列は非

常に多様性が高く、*A. paragallinarum* はこの可変領域の配列に基づき、三つのクラスに分類できることが判明した。グループ 1 は 221 株であり、グループ 2 は H18, TW08, TW09, TW95, TW11, グループ 3 は TW07 と TW96 である。同じグループに属する株の配列は高度に保存されていたが、グループが異なるとわずか 34.9-47.9%の相同性しかなかった。グループ 1, 2, 3 に属する代表的な株のアミノ酸配列を図 5 に示す。AvxIA の a.a. 1-331 (H18 株) は非常に変化しやすいが、331 番目以降は高度に保存されていることがわかる。この AvxIA の a.a. 1-331 は血清型と相関していない。たとえば、H18 と TW07 はどちらも C 型に属するが、この領域の配列は全く異なっている (図 5)。

In vivo における AvxIA の発現と抗原性

実験的に *A. paragallinarum* を感染させた鶏の血

1	-----MVDKDE-QEQSNTVIIIFELSKQAGLQSI	EAAKF	221	
1	MSSGNKALLASASYIDFFNSDGYMKNKEKIEENLKGVRGLTESQINQFLD	TYEVLDDQQL	H18	
1	-----MSKEVKIIS-LKGDYALEVLKAYNAGKTEILISEEEF		TW07	
34	VRTQLDEVLKQS-----SELDKLLTK--PYSVKLFLV-----	ENGAKYVDPIYK	221	
61	TASGFSAMVVREK----S---SGKNLFVIRGTQEPVDFLQDGM	LVAATGLAKAQVIDALNY	H18	
37	MKSGYSEQISPANFKMMEYFFSGRDYKGRK--VDYSSFRD-----	EQGNVVDHEQF	TW07	
76	IAVSFE-----SKDPNKIARAITAQLS-----	ALQIGAYGAT-IGAGAGV	221	
114	FNKVTTPKQQTYNVSWKTLPAAPPSPFPVPRRTLISSEKQGTGIISGKVDL	VGHSLGHV	H18	
88	INLFYSD-----NRDLRNIARTARVAFSNYTNNIGSDYADKAFVFGSSSFR-	IDVEK-I	TW07	
115	GYAINNTATWLKAPLVNKALPWIGRIGGAYLGSILGEDIVDYLWD-IDTNNGI	SSYTS	221	
174	AVALNSMVDNVDKVIGLNGAGINLERNSTDLEHIAALARRQVNYGRITNITNY	VGSNIRLV	H18	
141	QYVINPKGEPISIRNFAVIPVDFYHSDSLIAKPVNPLLKYFFS-NNIENQIQIK	FKYN	TW07	
174	MNITVFRDG-----NNIDVQNFSSKTYIPPKPSLN-----	VKFMPPFTYGYHMTAEE	221	
234	ASSIPYNQYKGMVLDTGFTYTPSSFSIKSKYGLYNI	GGKPNFDFPTQAI	DDHGVTNLI	H18
200	DNHRVYRDY-----SLKDFKAVNIKENIKSVLTFSGAGANFLTAFSKMAQTGGY	LYYKAQ	TW07	
222	MKYYEIP-----T-----	KNDFKVSSSNPLEKTADGKYKYPVYKNHGWL	221	
294	VMQENTLFASTKSTIDLTKRIDPNTLOYNQFVVSPLKLEKTADGKYKYPVYKNHGWL		H18	
255	LEPAIDFSNMFSWGTEK-----KEVKNDFKVSSSNPLEKTADGKYKYPVYKNHGWL		TW07	
264	WSDSHALNFDHGEKGSVDNTFNAFTANILSNDYRVNTNNFSRPIIESTLSSKPTAOKDY		221	
354	WSDSHALNFDHGEKGSVDNTFNAFTANILSNDYRVNTNNFSRSPPIESALSSKPTAOKDY		H18	
310	WSDSHALNFDHGEKGSVDNTFNAFTANILSNDYRVNTNNFSRSPPIESALSSKPTAOKDY		TW07	
324	LKLNHMANFGRSRLPVDPLVLDLNGDGVKLTGYTENAVLFDIDNDGALEETGWVSAEDGL		221	
414	LKLNHMANFGRSRLPVDPLVLDLNGDGVKLTGYTENAVLFDIDNDGALEETGWVSAEDGL		H18	
370	LKLNHMANFGRSRLPVDPLVLDLNGDGVKLTGYTENAVLFDIDNDGALEETGWVSAEDGL		TW07	
384	LVRDLNNGKIDNISEIFSEYGGGRAGRDGESGKHFNRNGFEALRSLDSNHDGLFNERDS		221	
474	LVRDLNNGKIDNISEVVFSEYGGGRAGRDGESGKHFNRNGFEALRSLDSNHDGLFNERDS		H18	
430	LVRDLNNGKIDNISEVVFSEYGGGRAGRDGESGKHFNRNGFEALRSLDSNHDGLFNERDS		TW07	
444	GFAOVRVWCKDNONGITDSEELFDLKSLGITEINLAYKEKGGEYVOONELLAEGSFSRGT		221	
534	GFAOVRVWCKDNONGITDSEELFDLKSLGITEINLAYKEKGGEYVOONELLAEGSFSRGT		H18	
490	GFAOVRVWCKDNONGITDSEELFDLKSLGITEINLAYKEKGGEYVOONELLAEGSFSRGT		TW07	

図 5 221 株, H18 株, TW07 株の AvxIA N 末端領域のシーケンスアライメント。同一のアミノ酸残基は太字で、全ての株で保存されているものは影付きで示した。332 番目 (H18 株) のアミノ酸は▼で示した。

清を用いたウェスタンブロット解析により, AvxIA の抗原性を調べた。その結果, 感染鶏の血清は r-AvxIA に強く反応した (図6)。この感染鶏の血清で検出されたバンドは, 抗6×ヒスチジンタグ抗体で検出されたバンドとよく似ていることから, これらのバンドは r-AvxIA あるいはその修飾産物であると考えられる。感染後わずか7日で回収した血清がこれほどにも r-AvxIA に強く反応するということから, AvxIA は *in vivo* でも発現しており, 鶏で高い免疫原性を有していることが示唆された。なお, 感染前の血清は r-AvxIA に反応しなかった (図6)。

考察

RTX 毒素は *Pasteurellaceae* に属するいくつかの菌で主要な病原性因子であると考えられている。本研究で紹介したデータは, *A. paragallinarum* が他の菌の RTX オペロンと同様の遺伝子構成からなる RTX 様オペロンを有していることを示していた。我々の知る限りでは, 本研究が *A. paragallinarum* に RTX オペロンが存在するという最初の報告である。AvxIA はペプチダーゼ S8 ドメインと前駆タンパク質転換酵素 P ドメインを持つが, これらは他の RTX 毒素では見つかっていない。ペプチダーゼ S8 ドメインはトリプシンと同様の触媒三残基 (Asp/His/Ser) を持つプロテアーゼのグループに属する。これらのプロテアーゼは, 細菌の栄養摂取

や宿主への侵入に重要な役割を果たす。前駆タンパク質転換酵素 P ドメインは, ペプチダーゼ S8 ドメインの下流でよく見つかり, ペプチダーゼ S8 の折り畳みに関与している。AvxIA にこれら二つのドメインがあることは, AvxIA はペプチダーゼ S8 ファミリーの一つであることが示唆された。この仮説を検証するためには, AvxIA のペプチダーゼ S8 活性を調べる必要がある。

多くの RTX 毒素が細胞毒性および溶血性を有しており, この標的となる細胞は赤血球を含む広範な細胞である。しかしながら RTX 毒素の中には細胞毒性しか示さないものもあり, さらにその毒性は宿主や細胞の種類に依存する。我々が作製した組換え AvxIA に溶血性あるいは細胞毒性が無かったことについて説明することは困難である。r-AvxIA に溶血性がなかったことは, *A. paragallinarum* 自体に溶血性がないと知られていることから, 驚くべきことではない。細胞毒性が無かったのは, 大腸菌で発現した r-AvxIA の不溶性もしくは誤った立体構造のためかもしれない。AvxIA の細胞毒性は細胞の種類に特異性があり, 本研究で用いた PBMC といった細胞は AvxIA の細胞毒性試験には適していなかったのかもしれない。AvxIA が細胞毒素であるかを調べるためには, マクロファージ, 好中球あるいはマクロファージ様の細胞株など, 他の標的細胞を用いた試験が必要である。

AvxIA のアミノ末端領域 a.a. 1-331 の配列は非常

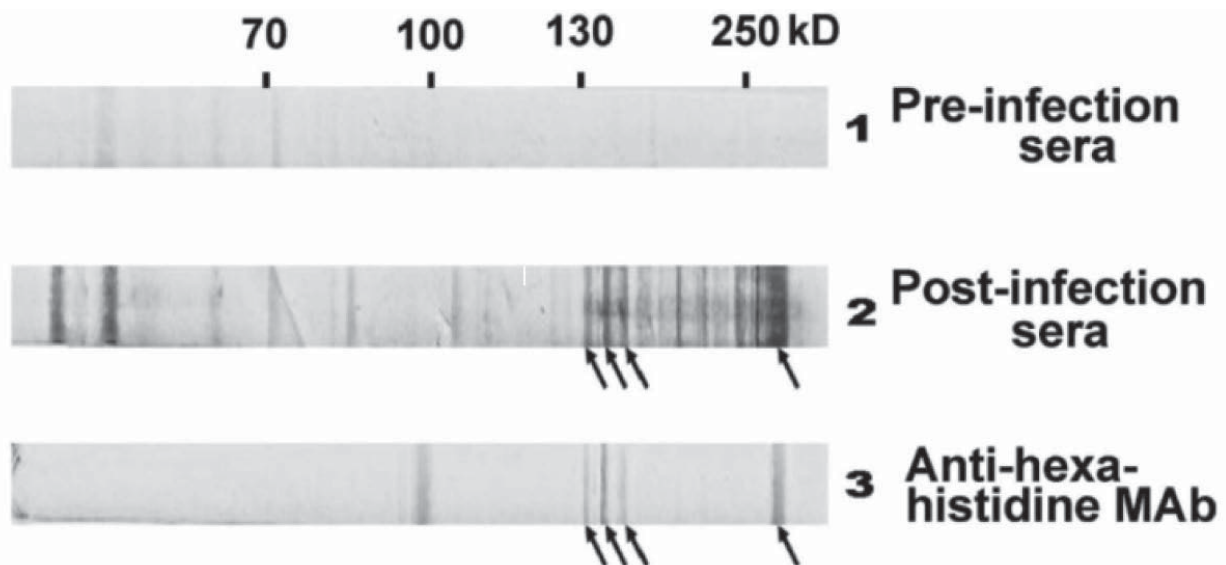


図6 組換え AvxIA の抗原性を表すウェスタンブロット。
組換え AvxIA の可溶性画分を感染前, 感染後の鶏血清もしくはマウス抗6×ヒスチジン抗体を用いて検出した。全長の組換え AvxIA あるいはその分解物のバンドを矢印で示した。

に変化しやすいことが明らかになり、*A. paragallinarum* はこの領域の配列によって3つのグループに分類された。この可変領域は AvxIA のほんの一部であることから、この領域内の変異は AvxIA の活性には影響しないかもしれない。一方で、過去に *Mannheimia haemolytica* の RTX 毒素 (LktA) のアミノ末端領域 a.a. 1-167 が標的細胞の特異性に関与していることを示した報告もある。さらに、ApxIA のアミノ末端領域の a.a. 40-380 の組換えタンパク質は、宿主を *A. pleuropneumoniae* の致死感染から防御することも知られている。これらの結果は、RTX 毒素のアミノ末端領域が標的細胞の特異性や免疫原性の決定に重要であることを示している。

AvxIA のアミノ末端領域にあるこの可変配列がこれらの機能を有しているかは、まだ不明である。

RTX 毒素は、*Pasteurellaceae* が引き起こす疾病に対するワクチンの重要なコンポーネントにもなっている。本研究では、*avxIA* 遺伝子が 221 株、H18 株そして台湾分離された全ての野外株に存在することを示した。また、AvxIA は *A. paragallinarum* に感染した鶏において免疫原性があることを示した。これらの結果から、今後、組換え AvxIA を基盤としたワクチンの開発が発展するかもしれない。

(研究員)

参考文献は割愛いたします。

発表論文紹介

近年の日本における豚丹毒発症例から分離した *Erysipelothrix rhusiopathiae* 株の性状について

堤 信幸

Erysipelothrix rhusiopathiae はグラム陽性の小桿菌で、人の皮膚病である類丹毒、豚の豚丹毒、及び他の動物種における様々な病気の原因菌である。豚丹毒は、日本及びアメリカ中西部での養豚における臨床的問題として再登場して以来、養豚産業に大きな経済的損失をもたらす再興感染症とみなされている。日本では豚丹毒を防ぐのに、小金井 65-0.15 株 (血清型 1a) が生ワクチン製造用種菌として使用されている。この小金井 65-0.15 株は、アクリフラビン色素を 0.15% 含む寒天平板で 65 代継代することで弱毒化したものである。その後、生ワクチンを用いた集中的なワクチンプログラムによって、豚丹毒の発生は大きく減少した。しかしながら、このような大規模ワクチン接種にもかかわらず、1985 年以降、毎年約 2000 頭の豚が急性又は亜急性の感染を起こし、亜急性又は慢性の豚丹毒として毎年約 2000 頭の豚が食肉検査所で廃棄されている。このため、急

性、亜急性そして慢性型の豚丹毒による経済的損失は無視できるものではない。近年の調査において、慢性型の豚丹毒から分離された *E. rhusiopathiae* 株のいくつかは生ワクチン株と密接な関係にあると記載されたことから、生ワクチン株が日本における慢性型豚丹毒の増加の原因かもしれないという疑念が生じた。*Erysipelothrix* spp. を識別する目的で、RAPD 型別、リボタイピング、制限酵素断片長多型 (RFLP) 解析、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 解析といった分子生物学的手法が試された結果、ワクチン株と野外株を区別出来る可能性があったのは PFGE 解析だけであった。このことにより、ワクチン株と野外株を迅速に区別することができ、正確で信頼性の高い診断法の開発が強く望まれている。最近の研究で注目されているのは、菌体表面の防御抗原 (surface protective antigen : Spa) タンパクをコードする遺伝子である *spa* の型に基づ

いた菌株の識別である。*E. rhusiopathiae* の Spa タンパク質は、遺伝学的及びその抗原性から3つに分類される。すなわち、SpaA (血清型 1a, 1b, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 17, N), SpaB (血清型 4, 6, 11, 19, 21) そして SpaC (血清型 18) の3種である。さらに近年、アクリフラビン耐性とマウス病原性試験とを組み合わせ、RAPD 型別、リボタイピング及び PFGE 解析の結果を比較することにより、*spaA* 遺伝子上の 432 bp の高度可変領域の塩基配列に基づいてワクチン株と野外株を区別する手法が開発された。その研究によれば、生物学的試験と組み合わせた遺伝子型別手法の結果は、*spaA* 遺伝子の配列解析とよく一致し、操作も容易で得られた結果も明解であることが示されている。

今回の研究では、血清型、アクリフラビン耐性、そしてマウス病原性試験と組み合わせた *spaA* 遺伝子の塩基配列解析により、2008 年から 2011 年における豚丹毒の発症例から分離された *E. rhusiopathiae* の野外株の同定と識別を行なった。

アクリフラビン耐性試験と *spaA* 遺伝子の 432 bp の高度可変領域の塩基配列解析の参照株には、*E. rhusiopathiae* の 3 株 (藤沢株, 標準株 ATCC 19414^T 株, 小金井 65-0.15 株) を使用した。藤沢株は公知の高病原性攻撃株で、アクリフラビン感受性である。小金井 65-0.15 株はアクリフラビン耐性の弱毒生ワクチン株である。

今回の研究には、豚丹毒を発症した豚から分離された *Erysipelothrix* sp. 78 株と、急性豚丹毒が発生した養豚場で症状を示した 5 頭の豚の脾臓、腎臓及び心臓から分離された 5 株を使用した。これらの 83 株は、2008 年から 2011 年にかけて秋田、茨城、群馬、長野、山口、熊本、宮崎及び鹿児島県での急性 (敗血症型)、亜急性 (蕁麻疹型) 及び慢性 (関節炎型、心内膜炎型及びリンパ節炎型) の豚丹毒罹患豚から分離されたものである。

菌分離方法は、以前に報告した方法に若干の変更を加えた。組織サンプルからの *Erysipelothrix* spp. の分離には、クリスタルバイオレット (5 µg/mL) とアジ化ナトリウム (0.03%) の代わりに、カナマイシン (400 µg/mL) とゲンタマイシン (25 µg/mL) を添加した BHI 寒天平板とブイヨンを用いた。

分離株の血清型は、以前の報告と同様の方法で決定した。簡単に述べると、寒天平板を用い培養 24

時間で発育したコロニーを滅菌蒸留水 (DW) に浮遊させた。生理食塩水で 1 回洗浄した後、DW に再浮遊した。この浮遊液を 121°C で 1 時間オートクレーブにかけた後に、15,000 rpm で 15 分間遠心した。遠心上清を回収し、DW で作製した 1% アガロース (Sigma-Aldrich Co. Inc.) を用いて、*E. rhusiopathiae* の血清型 1a, 1b, 2a 及び 2b 型に対するウサギ抗血清に対してゲル内沈降反応を行なった。室温で 16 時間反応させ、沈降線の形成を観察し、これら 4 つの血清で沈降線を示さない分離株については、残りの抗血清を用いてゲル内沈降反応を行なった。使用した血清型 1-23 型と N 型に特異的なウサギ抗血清は著者らの研究所で作製したものを用いた。どの抗血清にも沈降線を示さない分離株は判定不能とした。

野外株 15 株 (血清型 1a の 14 株, 血清型 2 の 1 株) と参照株 3 株 (藤沢株, ATCC 19414^T, 小金井 65-0.15 株) のアクリフラビン耐性試験は、他の論文での報告に従って実施した。

野外株 15 株 (急性型の 3 株, 亜急性型の 2 株, 慢性型の 10 株) と参照株 2 株 (藤沢株, 小金井 65-0.15 株) のマウスにおける病原性の決定は、他の論文で報告された方法に従った。簡単に述べると、4 週齢の雌の ddY マウス (日本 SLC) の右鼠径部皮下に約 10² CFU の野外株と藤沢株を 0.1 mL ずつ 10 匹に注射し、無処置の対照群を 5 匹とした。また約 10⁷ CFU の生ワクチン株 (小金井 65-0.15 株) も同様に注射した。その後 10 日間臨床症状を観察した。日本の動物用生物学的製剤基準によると生ワクチン株はマウスを殺さないが、1 匹あたり 10⁷ CFU の攻撃で 80% 以上のマウスに関節炎を起こすとされる。豚丹毒菌の病原性レベルの分類として、3 日以内に 100% のマウスを殺した株は超高病原性、4-5 日以内に 80-100% のマウスを殺した株は高病原性であると考えた。本研究で用いたマウスは、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針等に準拠した一般財団法人日本生物科学研究所の動物実験の適正な実施の為の実験動物管理規程に沿って取り扱われた。

spaA 遺伝子の N 末端側半分の 432 bp の断片を PCR で増幅し、過去に報告したように直接配列を決定した。簡単に説明すると、まず *E. rhusiopathiae* のゲノム DNA を以前報告したように調製した。

プライマーとして用いた Erko-1F (5'-GTGAAACAC-CGTATTTTAGTA-3') と Erko-2R (5'- TTCAA-GAAGTTCCTGTAGTTT-3') はそれぞれ *spaA* 遺伝子の第 502 番目から 522 番目と第 933 番目から 913 番目の塩基配列部分に位置しており、432 bp の断片が増幅された。PCR 法は他の報告にある通り、以下の条件で実施した。まず変性のステップを 94°C で 3 分間、その後 94°C で 45 秒間の変性、55°C で 1 分間のアニーリング、72°C で 2 分間の伸長のサイクルを 30 回繰り返し、サイクルの最後に 5 分間の伸長を行なった。PCR 産物のシーケンス反応はプライマー Erko-1F と Erko-2R で行なった。DNA 配列は以前報告した方法で解析した。

分離菌は BHI 寒天平板とブイヨンで継代培養し、

Erysipelothrix 属様の特徴を持つコロニーはグラム染色を施して鏡検した。さらに *E. rhusiopathiae* が疑われるコロニーは、*spaA* 特異的なプライマー Erko-1F と Erko-2R を用いた PCR で同定した。

急性敗血症型豚丹毒の臨床症状を示した 5 頭の豚組織サンプルから *Erysipelothrix* が分離された。血清型別と *spaA* の PCR から 5 株全てが血清型 1a の *E. rhusiopathiae* であると同定された。2008 年から 2011 年に分離された株は、血清型 1a, 2a, 型別不能のいずれかに分類された。菌株と病型の関係を表 1 に示した。83 株全てが *E. rhusiopathiae* であり、そのうちの 79 株 (95.2%) が血清型 1a, 1 株 (1.2%) が血清型 2a, 3 株 (3.6%) が型別不能に分類された。

参照株 2 株 (藤沢株, ATCC 19414^T) と最近の野

表 1 2008 年から 2011 年に発生した豚丹毒より分離された野外 83 株の血清型

症状	各血清型の株数			
	1a	2a	判定不能 ^{a)}	合計
敗血症	50			50
蕁麻疹	3		2	5
リンパ節炎	6			6
心内膜炎	5			5
関節炎	15	1	1	17
合計	79	1	3	83

a) 血清型 1 から 23 と N の抗血清で判定不能。

表 2 豚丹毒菌 15 株のマウス病原性とアクリフラビン耐性

由来 ^{a)}	グループ ^{b)}	マウスに対する病原性を示した株数 ^{c)}		アクリフラビン耐性 ^{d)}
		非常に高い	高い	
敗血症	1	1		S
	2	2		
蕁麻疹	2		2	S
リンパ節炎	2		1	S
心内膜炎	2		1	S
関節炎	2		7	S
	3		1	S

a) 亜急性 (蕁麻疹型) と慢性 (関節炎型) の菌株は屠殺場由来であり、それぞれ 2 株と 4 株であった。

一方、慢性例のリンパ節炎、心内膜炎、関節炎の菌株は養豚場由来であり、それぞれ 1 株、1 株、4 株であった。

b) *spaA* 配列の高度可変領域の類似性に基づいてグループに分類した。

c) 5 又は 10 匹のマウスに、藤沢株と野外株を 10² CFU の菌量で皮下注射を行った。

非常に高い、攻撃後 3 日以内に全てのマウスが死亡。; 高い、攻撃後 4-5 日以内に 80 - 100% のマウスが死亡。

d) S, 0.01% の濃度のアクリフラビンに感受性。生ワクチン株は 0.01% アクリフラビンに耐性。

外株 15 株は、0.01%の濃度のアクリフラビンに感受性であったが、生ワクチン株である小金井 65-0.15 株は同じ濃度のアクリフラビンに耐性であった (表 2)。

藤沢株と急性例由来株を合わせた 3 株は、3 日以内に 100%のマウスを殺した。一方、亜急性例由来の 2 株と慢性例由来株を合わせた 10 株は、マウス 1 匹当たり約 10^2 CFU の攻撃で 4-5 日以内に 80-100%のマウスを殺した (表 2)。生ワクチン株である小金井 65-0.15 株は 100%のマウスに関節炎を起こした。

野外株の 83 株と高病原性藤沢株の *spaA* 遺伝子における 432 bp の高度可変領域の塩基配列を、生ワクチン株である小金井 65-0.15 株と比較し、その違いを表 3 に示した。*spaA* 遺伝子の塩基配列解析に基づき、83 株は 3 つのグループに分類された。すなわち、グループ 1 は血清型 1a の 3 株、グループ 2 は血清型 1a の 76 株と型別不能の 3 株、そしてグループ 3 は血清型 2a の 1 株となった。グループ

1 の株は他のグループの株と比較すると塩基配列が 2 箇所異なり、グループ 2 の株とは 584 番目と 609 番目、グループ 3 の株とは 583 番目と 584 番目の塩基配列が異なっていた。これらの塩基配列の違いにより、アミノ酸配列には以下の変異が生じた。すなわち、i) グループ 1 では 195 番目がアラニン、203 番目がイソロイシンとなり、ii) グループ 2 では 195 番目がアスパラギン酸、203 番目がメチオニンとなり、iii) グループ 3 では 195 番目がアスパラギン、203 番目がイソロイシンとなった。さらに、グループ 1, 2, 3 の株は藤沢株との間にも 2 箇所の塩基配列の違いがあり、それぞれ 584 番目と 769 番目、583 番目と 769 番目、609 番目と 769 番目の塩基であった。これらの塩基配列の違いによって、195 番目、203 番目、257 番目のアミノ酸配列に変異が生じた。また、グループ 1, 2, 3 の株は小金井 65-0.15 株との間に 1 箇所の塩基配列の違いがあり、それぞれ 583 番目、584 番目、609 番目であった。これらの塩基配列の違いにより、195 番目と 203 番

表 3 生ワクチン小金井 65-0.15 株と比較した野外 83 株と藤沢株の *spaA* 遺伝子の 432 bp 高度可変領域における塩基又はアミノ酸置換

株またはグループ	県	株数	血清型	塩基置換 (アミノ酸の位置) ^{a), b)}		
				塩基 (アミノ酸 195 番目)	塩基 (アミノ酸 203 番目)	塩基 (アミノ酸 257 番目)
小金井 65-0.15			1a	GAT (Asp)	ATT (Ile)	ATT (Ile)
藤沢			1a	GAT (Asp)	ATT (Ile)	<u>CTT</u> (<u>Leu</u>)
グループ 1	熊本	2	1a	G <u>CT</u> (<u>Ala</u>)	ATT (Ile)	ATT (Ile)
	山口	1	1a			
グループ 2	宮崎	2	1a	GAT (Asp)	AT <u>G</u> (<u>Met</u>)	ATT (Ile)
	鹿児島	3	1a			
	長野	35	1a			
	群馬	31	1a			
	茨城	2	1a			
	秋田	3	1a			
	長野	3	判定不能			
グループ 3	長野	1	2a	<u>AAT</u> (<u>Asn</u>)	ATT (Ile)	ATT (Ile)

a) Asp, アスパラギン酸; Ala, アラニン; Asn, アスパラギン; Ile, イソロイシン; Leu, ロイシン; Met, メチオニン。

b) 下線を施した文字, 同じ位置の塩基と置き換わった塩基; 下線を施した文字列, 同じ位置のアミノ酸と置き換わったアミノ酸。

目のアミノ酸配列に変異が引き起こされた。

血清型別は、疾患発生の疫学解明、疾患制御のためのワクチン対応、そして汚染農場の血清学的モニタリングといった目的に有用であることが報告されている。これまでの多くの報告によれば、豚丹毒の豚から分離された *E. rhusiopathiae* のほとんどは血清型 1a, 1b, 2 に同定されている。2008 年から 2011 年に発生した豚丹毒の分離株に高い割合 (83 株中の 95.2%) で血清型 1a が存在したという我々の調査結果は、1999 年から 2001 年のアメリカ中西部で発生した豚丹毒からの分離株で血清型 1a が 44 株中 79.6%であったとする報告と一致する。しかしながら、我々の結果はこれまでの多くの報告とは部分的に異なっている。それらの報告では血清型 1a と 2 が高率であったことが示されており、アイオワ州で 2007 年から 2009 年に発生した豚丹毒では 59 株中 40.7%が血清型 1a, 49.2%が血清型 2, 日本で発生した豚丹毒では 1983 年から 1993 年の調査で 1046 株中 40.4%が血清型 1a, 34.3%が血清型 2, 1992 年から 2002 年の調査で 800 株中 47.6%が血清型 1a, 31.8%が血清型 2, 1994 年から 2001 年の調査で 66 株中 28.8%が血清型 1a, 47%が血清型 2 とされている。今回の結果を、他のグループの調査結果と合わせて考察すると、血清型 1a は世界中の豚丹毒に罹患豚から高率に分離される血清型であり続けていることが強く示唆されているが、今回の 2008 年から 2011 年に発生した豚丹毒における血清型 1a と 2 の分離率に大きな差異 (95%と 1.2%) が認められたことの説明はつかなかった。

今回の我々の調査で、*spaA* 遺伝子の 432 bp の高度可変領域における塩基配列とアミノ酸が生ワクチン株である小金井 65-0.15 株と異なっていた株がマウスに病原性を示した結果は、Nagai *et al.* による最近の報告と一致している。彼らは、中部地方において 2001 年から 2002 年に慢性型 (関節炎) の症例から分離された 16 株 (血清型 1 の 10 株, 血清型 1b の 6 株) の生物学的及び遺伝学的性状を調べ、以下のことを示した。すなわち、i) 生ワクチン株の *spaA* 遺伝子と同じ塩基配列を示した血清型 1a の 3 株は、生ワクチン株と密接に関係していると思われた。ii) 生ワクチン株と異なる *spaA* 遺伝子の塩基配列を示した血清型 1a と 1b の株は、マウスに対して病原性を示し、野外株であると考えられた。

今回の調査では、熊本県と山口県で分離された血清型 1a の 3 株において 584 番目の 1 箇所の塩基が置換していたことを除いては、7 つの県 (宮崎, 鹿児島, 長野, 群馬, 茨城, 宮城, 秋田県) で分離された血清型 1a の 76 株と型別不能の 3 株ではワクチン株である小金井 65-0.15 株と比較して 609 番目の 1 塩基が置換していた。本研究で明らかになった血清型 1a の 79 株の塩基配列は以前の報告とは異なっていた。以前の報告では、3 株で 0 塩基, 5 株で 1 塩基, 2 株で 2 塩基の置換があり、生ワクチン株の小金井 65-0.15 株と比較すると、1 塩基置換のあった 5 株ではそれぞれ 591 番目, 711 番目, 729 番目, 796 番目または 911 番目の塩基に置換が起こり、2 塩基置換のあった 2 株についてはそれぞれ 511 番目と 638 番目, または 555 番目と 773 番目の塩基での置換であった。本研究の結果から、*E. rhusiopathiae* の 83 株は *spaA* 遺伝子の塩基配列の類似性により、3 つのグループに分類されることが示唆された。すなわち、i) グループ 1 (血清型 1a の 3 株が含まれる) は 195 番目のアミノ酸がアラニン, 203 番目がイソロイシンで、熊本県と山口県で急性敗血症型豚丹毒を引き起こした。ii) グループ 2 (血清型 1a の 76 株と型別不能の 3 株が含まれる) は 195 番目のアミノ酸がアスパラギン酸, 203 番目がメチオニンで、多くの県で急性, 亜急性, 慢性の症例を引き起こした。iii) グループ 3 (血清型 2a の 1 株が含まれる) は 195 番目のアミノ酸がアスパラギン酸, 203 番目がイソロイシンで、長野県で慢性関節炎の症例を引き起こした。我々の結果からは、血清型 1a で SpaA でグループ 2 に分類される型が日本に広く浸潤していることが示された。

慢性の豚丹毒から分離された株がマウスに高い病原性を持つという我々の結果は、過去に報告されたデータと一致している。Imada *et al.* によると、1992 年から 2002 年において慢性型症例のブタから分離された血清型 1a の 50 株中 21 株 (42%) が、 10^4 CFU の攻撃でマウスに高い病原性を示したことが報告されている。2008 年に、Nagai *et al.* は、慢性の関節炎型症例のブタから分離された 16 株中 8 株 (50%) がマウス 1 匹当たり 10^7 CFU の攻撃菌量で高い病原性を示したことを報告している。近年、Ozawa *et al.* により、1994 年から 2001 年に慢性型症例から分離された 55 株中 39 株 (70.9%) がマウ

ス1匹当たり 10^8 CFU の攻撃菌量で高い病原性を示すことが報告されている。本研究では、慢性例のブタから分離された10株（血清型1aの9株と血清型2aの1株が含まれる）は、生ワクチン株と比較して生物学的及び遺伝的特徴が異なっており、マウス1匹当たり約 10^2 CFU の攻撃菌量の高い病原性を示すことが示された。他の研究者の報告データと合わせ、これらの結果は、生ワクチン株と関連性のない慢性型症例由来株の多くはマウスに高い病原性を有しているという考えを支持するものである。

本研究で行われた *spaA* 遺伝子の432 bp 高度可変領域の塩基配列解析における最も重要な利点は、その簡便さと一度により多くのサンプルがスクリーニング可能な応用性である。この塩基配列解析は、野外株から生ワクチン株を識別するためのマウス病原性試験及びアクリフラビン耐性試験の結果に対しても相関していることが示された。塩基配列解析は実施が容易である上に、得られた結果に曖昧さが無く、

実施した研究室に関係なく同じ結果が得られ、一度により多くのサンプルをスクリーニングできることが報告されている。

本研究の結果からは以下のことが示された (i) 近年発生した豚丹毒から分離された株のほとんど (83株中の95.2%) は血清型1aと同定された。(ii) *spaA* 遺伝子の432 bpの高度可変領域のアミノ酸配列の類似性に基づいて、83株は3つのグループに分類された。(iii) これら83株は全て野外株であり、ワクチン株は含まれなかった。現在のところ、豚丹毒発症例における菌株間の関連性をより明確にするため、PFGE プロファイルに関する研究、現在利用可能なワクチンの近年分離株に対する防御効果について研究を進めている。

参考文献は割愛いたします。

本稿は J. Vet. Med. Sci. (2012) 74 (7), 949–953 に掲載された論文を編集・日本語訳したものです。

編集室からの訂正とお詫び

平素は本誌をご愛読頂き、ありがとうございます。

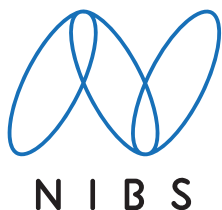
先回到発行いたしました9月号の獣医病理学研修会記事につきまして、表紙目次および本誌ページに誤植がございました。関係者の方々ならびに読者の皆様には深くお詫び申し上げます。

9月号5ページに掲載しました記事のタイトル「**第51回 No.1045 イヌの卵巣部腫瘍（摂南大学）**」は誤りで、正しくは「**第51回 No.1043 イヌの下腿部筋間腫瘍（大阪府立大学）**」でありました。またそれに連動する表紙目次も「第51回 No.1043 イヌの下腿部筋間腫瘍（大阪府立大学）」に訂正させていただきます。当方の不手際により関係者の方々に多大なご迷惑をおかけし、大変申し訳ございませんでした。

このため、本号の研修会記事にはあらためて「第51回 No.1043 イヌの下腿部筋間腫瘍（大阪府立大学）」を掲載させて頂いております。

今後はより一層の注意を払い、日生研たよりの編集にあたっていく所存でございますので、引き続きご愛読いただけますようお願い申し上げます。

日生研たより編集室



—— テーマは「生命の連鎖」——
生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)
(通巻577号) 平成24年10月25日印刷 平成24年11月1日発行(第58巻第6号)
発行所 一般財団法人 日本生物科学研究所
〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1
TEL: 0428(33)1056(企画学術部) FAX: 0428(33)1036
発行人 林志鋒
編集室 委員/堤 信幸(委員長), 大嶋 篤, 山下 龍
事務/企画学術部
印刷所 株式会社 精興社
(無断転載を禁ず)