

# 日 生 研 報

2017年(平成29年)4月号 第63巻 第2号(通巻603号)

## 挨拶・巻頭言

多様性 .....長井伸也(2)

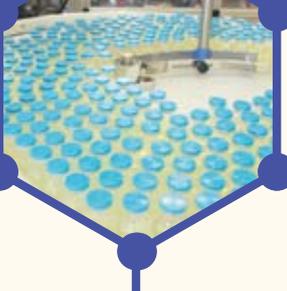
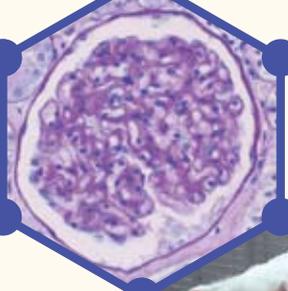
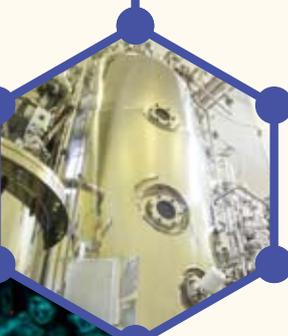
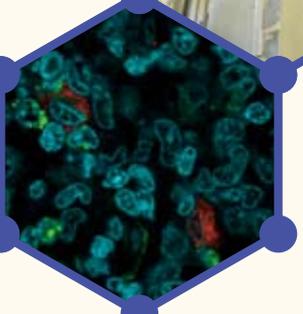
## レビュー

動物に由来する薬剤耐性菌  
.....浅井鉄夫(3)

ゲノム解読がもたらす豚丹毒菌研究の発展  
.....下地善弘(7)

## お知らせ

編集後記 ..... (12)



## 多様性

長井伸也

世界中の人の、母親から伝わる DNA の系統樹を 100 種類程度に分類すると、日本人からそのうち 20 種類程度が見つかるそうである。これはお隣の韓国人にくらべてずっと数が多い。つまり日本人の遺伝的多様性が高いことを示している。平たく言うと人種のるつぼということだ。日本は地理的にユーラシア大陸の東の端に位置し、その東側は太平洋となり行く手を阻んでいる。人類は 20 万年ほど前にアフリカ大陸で誕生し、その後世界に散らばっていった。ある民族はヨーロッパからロシアを通して、別の民族は中央アジアから朝鮮半島を経由して、また別の民族は南方のスマトラ半島からインドネシアを経由して、それぞれ若干時期をずらしながらユーラシア大陸東端の日本にたどり着いたのだろう。

今まで私たちは「日本人は単一民族だからお互いなんでもすぐに分かりあえる」と思い込む傾向があった。しかし、実は私達の祖先は「異なった民族の文化をお互い分かり合って、うまく融合してゆくことが非常に上手な」つまり、世界で一番異文化に対して寛容な民族だったのかも知れない。困ったときに「神様、仏様…」と口を突いて出てくるように、同じ敷地内に異なる宗教、つまり神社とお寺が並んで建っているような国が他にあるだろうか？文化の多様性を受け入れ、またその多様性を保ちながら社会を形成できることが日本人の強みののだとは言えないだろうか。

話は変わるが、ヒトゲノム上には 21,000 個の遺伝子しかなく、これは線虫の遺伝子数 (19,000 個) と著しく変わらない。しかし、これだけの遺伝子でもヒトが複雑な生命活動を営むことができるのは、生命維持における多くの重要な部分を体内に棲んでいる微生物群にアウトソーシングしているおかげだそう。私たちの体は約 37 兆個の細胞から成るものの、微生物は腸管内だけでも 100 兆個、およそ 4,000 種が定着していると言われている。他にも体表面、腸管以外の粘膜面に棲んでいる微生物も合わせると、体細胞 1 個に対して微生物細胞 9 個の割合となるそう。つまり、自分の体の全細胞数のうち、ヒトの部分は 10% しかなく、残り 90% は微生物の細胞から成り立っている。この体の 90% を構成している微生物叢 (マイクロバイオータと呼ぶ) の多様性を維持することが、ヒトの健康に極めて重要であることが、2008 年に開始されたヒトマイクロバイオーマ・プロジェクトの成果等から明らかになってきている。

20 世紀半ば以降急増している「21 世紀病」と呼ばれる疾病のうち、肥満、アレルギー、自己免疫疾患のみならず、発達障害のひとつである自閉症までもが、マイクロバイオータの多様性の喪失と関係していることが分かりつつある。加えて、ヒトの高度な精神活動までもが腸内のマイクロバイオータの構成と関連付けられるとのこと。ところが、20 世紀後半に抗生物質の使用範囲が拡大されたこと等によって、もはや体内のマイクロバイオータの多様性を保つことができなくなり、それが 21 世紀病の増加に繋がったのかもしれないという説もある。その詳細は「あなたの体は 9 割が細菌：微生物の生態系が崩れはじめた 原題：10% Human」(アランナ・コリン：著、矢野真千子：訳／河出書房新社) をご一読頂きたい。

社会の健康、個体の健康、そのいずれにおいても多様性を受け入れ、そしてその多様性を維持することが肝要なのではないかと特に最近感じている。

(所長)

## 動物に由来する薬剤耐性菌

浅井 鉄 夫 (岐阜大学大学院連合獣医学研究科)

### 1. はじめに

医療・獣医療分野で細菌感染症を治療するために抗菌性物質が使用され、人を含めた多くの動物を救い、安全な畜産物の安定した供給を実現してきた。一方で、抗菌性物質を使用することで抗菌性物質に抵抗する細菌（薬剤耐性菌）が増加するということが歴史的に経験した。近年、人類の生命活動から放出される薬剤耐性菌が身の回りの環境を汚染し、交通網の発達による世界規模での汚染を広げる中、薬剤耐性菌の出現や拡散を防止するため、地球規模での取り組み“**One Health Approach**”が必要とされている。

### 2. 薬剤耐性菌の問題への取り組み

1969年に英国から公表された「スワン・レポート」が、家畜に抗菌性物質を使用することで薬剤耐性菌が発現するという問題を提起した。その報告書は、家畜の飼料へ抗菌剤を添加する、いわゆる「飼料添加剤」による薬剤耐性菌の発現、その耐性菌が人へ伝播する危険性、医療分野への悪影響、さらに調査研究の充実や獣医師の疫学教育にいたる広範囲な内容である。この報告書が契機となって、各国が家畜における抗菌性物質の使用と関連する薬剤耐性菌問題に取り組むようになり、わが国においても1976年に「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（いわゆる飼料安全法）」を改正して、家畜に使用する抗菌性物質を動物用医薬品（いわゆる「薬」）と飼料添加物として別々に規制するようになった。1990年代の後半から、WHO（世界保健機関）、FAO（国連食料農業機関）、OIE（国際獣疫事務局）などの国際機関により薬剤耐性菌の問題が議論され、2003年に三国際機関により人以外への抗菌性物質の使用（**non-human use**）と薬剤耐性に関する合同専門家会議が開催され、「人以外での抗菌剤使用は、人の健康に影響する。」と結論づけ

られた。その後、各国で薬剤耐性菌のリスク分析を実施できるようにするため、リスク分析に必要な耐性菌のモニタリング方法、リスク評価やリスク管理に関するガイドライン、抗菌剤の慎重使用に関するガイドライン、耐性菌の情報収集や耐性菌対策に関わる啓発など、耐性菌対策に関連する体制整備がOIE、コーデックスなどにより取り組まれている。2011年には、人、動物、環境を包含した地球規模での取り組み（**One Health Approach**）がWHOにより提言され、2015年のWHO総会において「薬剤耐性（AMR）に関するグローバル・アクション・プラン」が採択された。さらに、薬剤耐性菌の問題は、2015年と2016年の主要国首脳会議（サミット）で重要課題として取り上げられた。さらに、国内では2016年4月に我が国の「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン（2016–2020年）」が策定され、内閣官房を中心に、関係省庁により薬剤耐性対策が進められている。また、2016年から毎年11月を「薬剤耐性（AMR）対策推進月間」と設定して、国民の知識や理解を深めるための普及啓発が取り組まれている。

### 3. 薬剤耐性菌の制御

現在、家畜において抗菌性物質は、疾病の治療を目的とした動物用抗菌剤や、飼料中の栄養成分の有効利用を目的とした抗菌性飼料添加物として使用されている。使用される抗菌性物質の種類、量、期間は、両者で大きな違いがあり、家畜における薬剤耐性菌の出現や分布へ影響する程度も異なる。家畜由来細菌における薬剤耐性の発現状況は、群（集団）治療される豚やブロイラーから分離される菌株で耐性割合が高く、個体治療される牛や産卵中には投薬されない採卵鶏由来株で低い傾向がある。また、家畜で最も多く使用されているテトラサイクリン系抗生物質は、カンピロバクター、サルモネラ、大腸菌及び腸球菌に共通して耐性菌の割合が高い。

一方、薬剤耐性菌の制御に向けて、諸外国で抗菌性物質の動物への使用を制限する取り組みが行われてきたが、その効果は一定ではない。そこには、薬剤の種類、菌種、耐性の分布状況や耐性機序などが複雑に影響していると考えられる。

#### (1) バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)

アボパルシンは、日本やヨーロッパで家畜の抗菌性飼料添加物として使用されていたが、化学構造が類似するバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) の増加に関連するとして、家畜への使用が禁止された。動物へアボパルシンを使用していないスウェーデンやアメリカでは、動物由来 VRE は認められていない。日本では 1997 年に飼料添加物としての指定が取り消された。日本では 1995～1996 年に実施した調査でブロイラー由来腸球菌の 3% で認められたのみで、その後、ほとんど検出されていない。デンマークでは、VRE はアボパルシンの使用中にブロイラーで高率 (約 70%) に認められたが、使用中止 1 年後には約 20% まで減少した。しかし、ほぼ検出されなくなるまでに約 7 年を必要とした (図 1)。このように、動物における VRE の分布は、アボパルシンの使用状況と深く関係している。

#### (2) フルオロキノロン耐性カンピロバクター

動物用フルオロキノロン剤は、1991 年 11 月に牛及び鶏用のエンロフロキサシン製剤が承認されて以来、現在までに、オフロキサシン、オルビフロキサシン、ジフロキサシン、ダノフロキサシン、ノルフロキサシン及びマルボフロキサシン製剤 (計 7 成分) が動物の細菌感染症 (肺炎と下痢) の治療に使用されている。フルオロキノロン耐性は、細菌の DNA 複製に関する DNA ジャイレースやトポイソメラーゼ IV のキノロン耐性決定領域における遺伝子変異が主な機序で、一定の頻度で自然発生する。カンピロバクターは鶏を含む家畜に対し起病性を示さないため、フルオロキノロン剤がカンピロバクターに起因する疾病の治療に投与されることはない。鶏に分布するカンピロバクターは、*Campylobacter jejuni* が中心で、汚染鶏群において鶏は 3～4 週齢から分離されるようになり出荷頃には全羽から分離される。また、カンピロバクター保菌鶏にフルオロキノロン剤を投与すると速やかにフルオロキノロン耐性カンピロバクターを排菌するようになる。フルオロキノロン剤の使用に当たって、カンピロバクターの汚染状況を確認することが重要である。2005

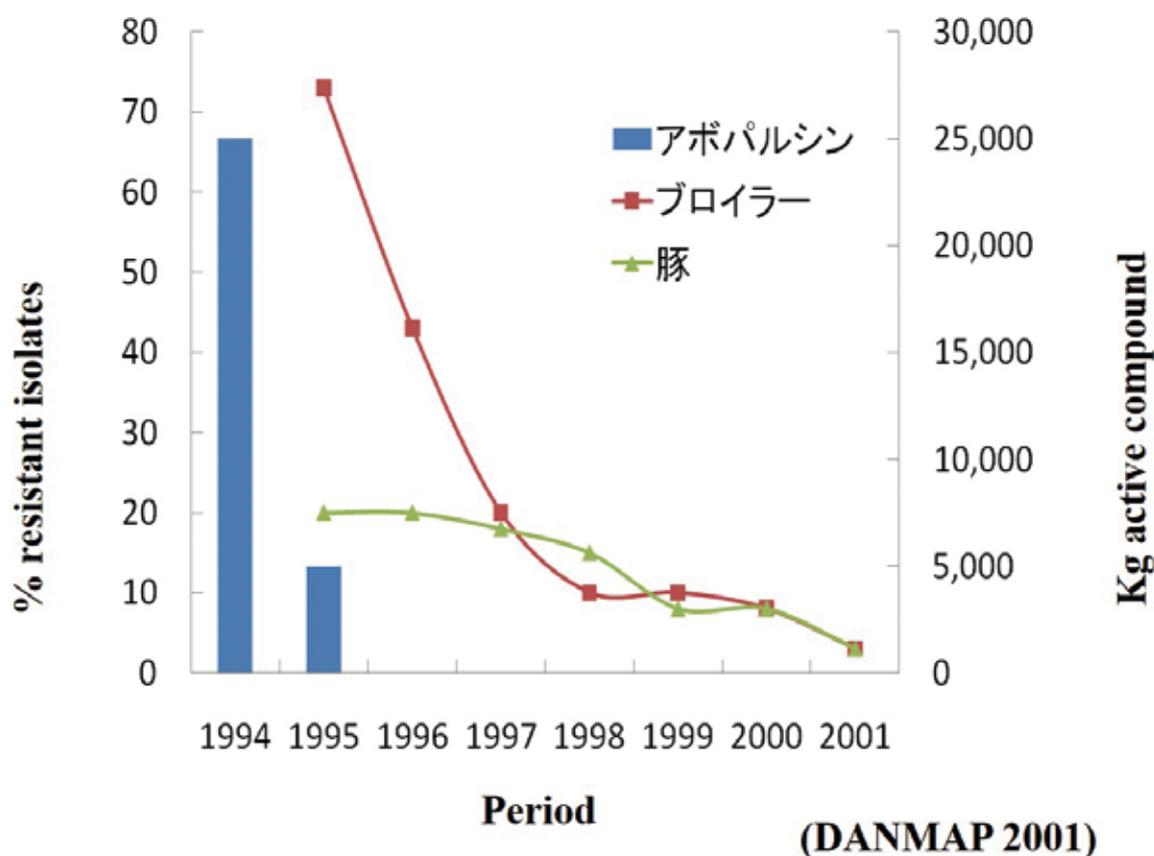


図 1 デンマークにおけるブロイラー及び豚由来 *Enterococcus faecium* のバンコマイシン耐性とアボパルシンの使用

年9月に米国では、家禽用フルオロキノロン剤の承認が取り消されたが、ブロイラー由来カンピロバクターにおけるフルオロキノロン耐性は減少していない(図2)。フルオロキノロン耐性カンピロバクターは、出現しやすく、使用禁止されても減少しにくい、制御の難しい耐性菌である。

### (3) 第三世代セファロスポリン耐性腸内細菌

セファロスポリンは、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質の一つで、抗菌力や抗菌スペクトルに基づいて第一世代から第四世代に分類されている。牛で第一世代～第三世代、豚では第三世代の7成分のセファロスポリン系抗生物質が承認されている。牛や豚で承認されている第三世代セファロスポリンは、セフトオフルとセフキノムの2成分で、第一次選択薬が無効な症例のみで使用することとされている。動物用医薬品として鶏用セファロスポリンは承認されていない。ブロイラー由来大腸菌における第三世代セファロスポリン耐性の割合は、2000～2003年では約4%であったが、2004～2007年で10%程度まで、さらに2008～2011年には約20%まで上昇した。カナダのグループが、ブロイラーにおける第三世代セファロスポリン耐性大腸菌の増加には、セフトオフル(動物用第三世代セファロスポリン)をワクチンの卵内接種時に混合注射することが関与することを報告し

た。2012年3月に国内の養鶏団体からセフトオフルの使用に関する注意喚起が自主的に行われた。その後、ブロイラーにおける第三世代セファロスポリン耐性の割合は減少している(図3)。

### (4) 家畜関連メチシリン耐性黄色ブドウ球菌

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、院内感染型と市中感染型に大別されてきたが、家畜に蔓延するMRSAが明らかになり家畜関連MRSA(Livestock-associated MRSA: LA-MRSA)として注目されている。2004年にオランダでの養豚農家の少女(6歳)や2005年に養豚農家の家族から分離されたMRSAは、飼育されていた豚由来株と同一のmultilocus sequence typing (MLST)型(MRSA ST398)であった。2008年に実施したヨーロッパ全域での豚のMRSAに関する調査で、多くの国に分布しているが、スペインとドイツで高率(30%以上)、イギリス、ノルウェー、スウェーデンでは低率と、汚染状況は、国間で違いがあることが明らかにされている。アジア諸国の豚では、MRSA ST398以外にCC9が分布する。これらの遺伝子型は、わが国の豚から分離したメチシリン感受性黄色ブドウ球菌において認められ、豚に親和性の高い系統と考えられる。国内の養豚場に出現した場合には蔓延する危険性がある。国内の家畜では、乳牛や豚からMRSA

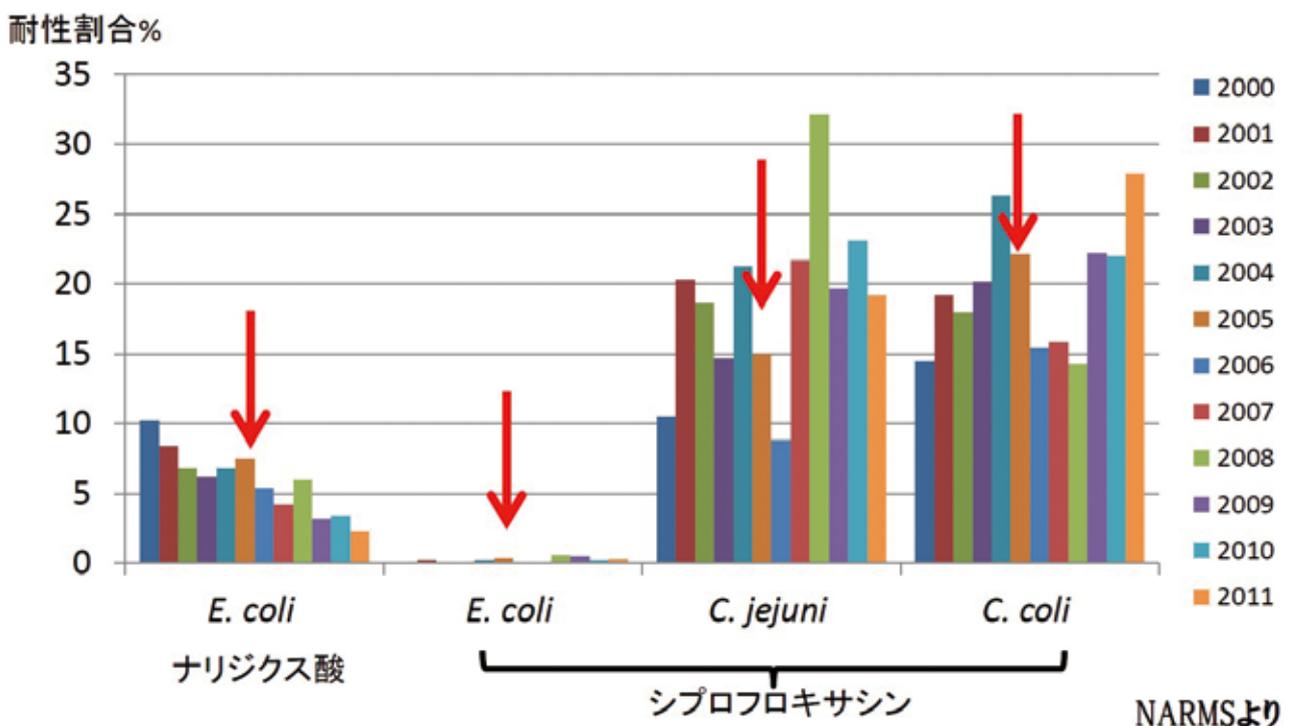
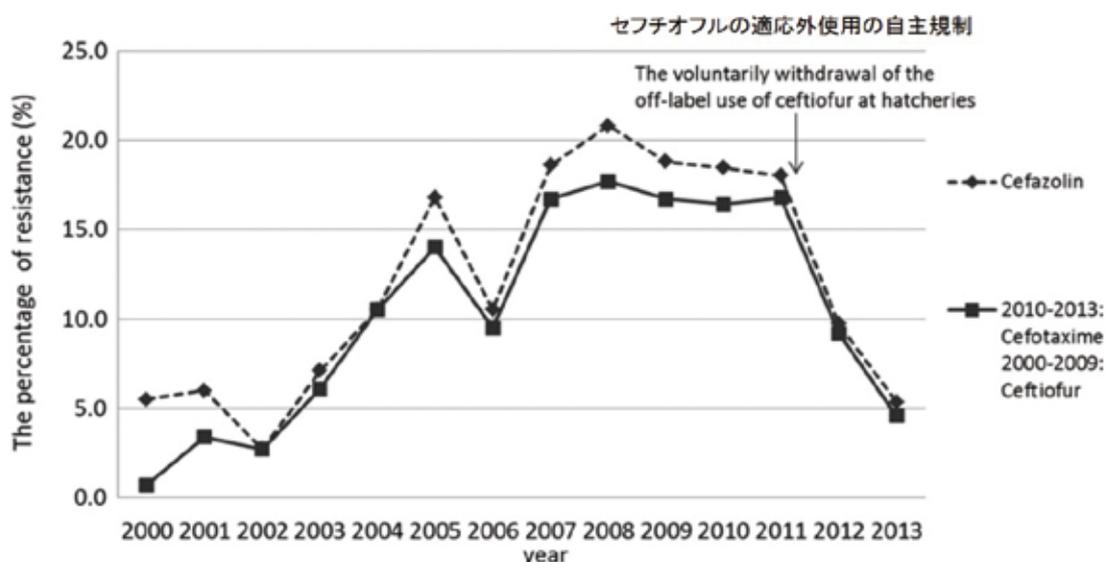


図2 米国ブロイラーから分離された大腸菌とカンピロバクターのキノロン耐性の推移  
家禽用フルオロキノロンは、2005年8月にFDAの長官により承認取消しが決定され、9月から施行された。



Hiki et al. 2015. *Foodborne Pathog. Dis.* 12(7): 639-643.

図3 国内のブロイラー由来大腸菌におけるセファロスポリン耐性の推移

が分離されているが、院内感染型 MRSA が中心で、人から動物へ MRSA が伝播していることが考えられる。また、2013 年に豚を対象に実施した調査では、市中感染型 MRSA が複数の個体から分離されており、定期的の実態調査が必要である (表 1)。

#### 4. 最後に

動物用抗菌剤は、動物の健康を守るとともに安定した畜産物の生産に貢献している。しかし、病気の

治療に抗菌剤を使用すると、病原菌や常在菌において薬剤耐性菌が出現し、増加する。本稿で述べたように、薬剤耐性菌の分布要因は多様で、増加した耐性菌を制御する方法は確立されていない。したがって、病気の発生を防止するため、飼育環境を適正にして、ワクチン等を効果的に使用する必要がある。また、人の医療で重要な抗菌性物質と同系統の抗菌剤が使用される細菌感染症のワクチン開発が望まれる。

表 1 国内の家畜から分離された MRSA の遺伝子型

畜種	MLST	Spa type	SCCmec	由来	調査年(分離年)	参考文献
牛	ST5	t002	II	乳汁	1998-2005	1
	ST5	t375	II	乳汁	1998-2005	1
	ST89	t5266	IIIa	乳汁	1998-2005	1
	ST8	t024	IV	乳汁	2003-2009	2
豚	ST221	t002	型別不能	鼻腔スワブ	2009	3
	ST97	t1236	V	鼻腔スワブ	2013	4
	ST5	t002	型別不能	鼻腔スワブ	2013	4

1 Hata et al. 2010. *J. Clin. Microbiol.* 48:2130-2139.

2 Baba et al. 2012. *J. Vet. Med. Sci.* 74:561-565.

3 Baba et al. 2010. *Int. J. Antimicrob. Agents* 36:352-354.

4 Sato et al. 2015. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 3:283-285.

## ゲノム解読がもたらす豚丹毒菌研究の発展

下地 善弘 (国立研究開発法人農研機構・動物衛生研究部門 細胞内寄生菌ユニット)

### はじめに

豚丹毒菌 *Erysipelothrix rhusiopathiae* はグラム陽性の細胞内寄生菌である。本菌の宿主域は極めて広く、鳥類やイルカなどの海棲哺乳類を含め、様々な動物種に感染し豚丹毒を発症させることができる。本疾病は産業的には豚および七面鳥での被害が最も大きい。わが国では、豚およびイノシシの本疾病は家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されており、毎年 2,000 頭前後の発生報告の届出がある。豚における臨床症状は、敗血症として重篤な急性型、皮膚病変（蕁麻疹）の亜急性型、また、関節炎や心内膜炎を主徴とする慢性型に分けられる。本疾病は、と畜検査ではと殺禁止、全部廃棄の対象となることから、予防対策が重要な疾病である。

我々の研究グループは、2011 年、この菌のゲノム解読に初めて成功した [1]。その後、カナダの研究グループにより大規模な集団のゲノム解析が行われ、本菌の生態や進化に関する重要な知見が得られている [2]。本稿では、本菌のゲノム解読から得ら

れた新しい細菌学的知見の他、ゲノム解析を基に我々の研究グループが開発した本菌の株レベルでの検出技術について紹介する。

### 豚丹毒菌のゲノム構造と系統学的位置

我々が解読した豚丹毒菌 Fujisawa 株のゲノムサイズは 1,787,941bp であり、*Firmicutes* 門（グラム陽性の染色体 DNA の GC 含量が通常 50 mol% 以下の細菌群）に属する門に属する細菌の中で最も小さく、細胞壁を欠くマイコプラズマのグループ、すなわち *Mollicutes* 綱に属する細菌のゲノムサイズに近いことが明らかとなった（図 1） [1]。また、本菌ゲノムの細菌学的特徴として、本菌ゲノムは脂肪酸、ビタミン類、補酵素、アミノ酸（7 種類のみが合成可能）等の多くの栄養素の合成に関わる遺伝子群に加えて、通常のグラム陽性菌の細胞壁構成成分、すなわち、テイコ酸、リポテイコ酸の合成経路、また、*dltABCD* オペロンを欠くことも判明した。このように、豚丹毒菌はゲノム収縮の結果として必要な栄

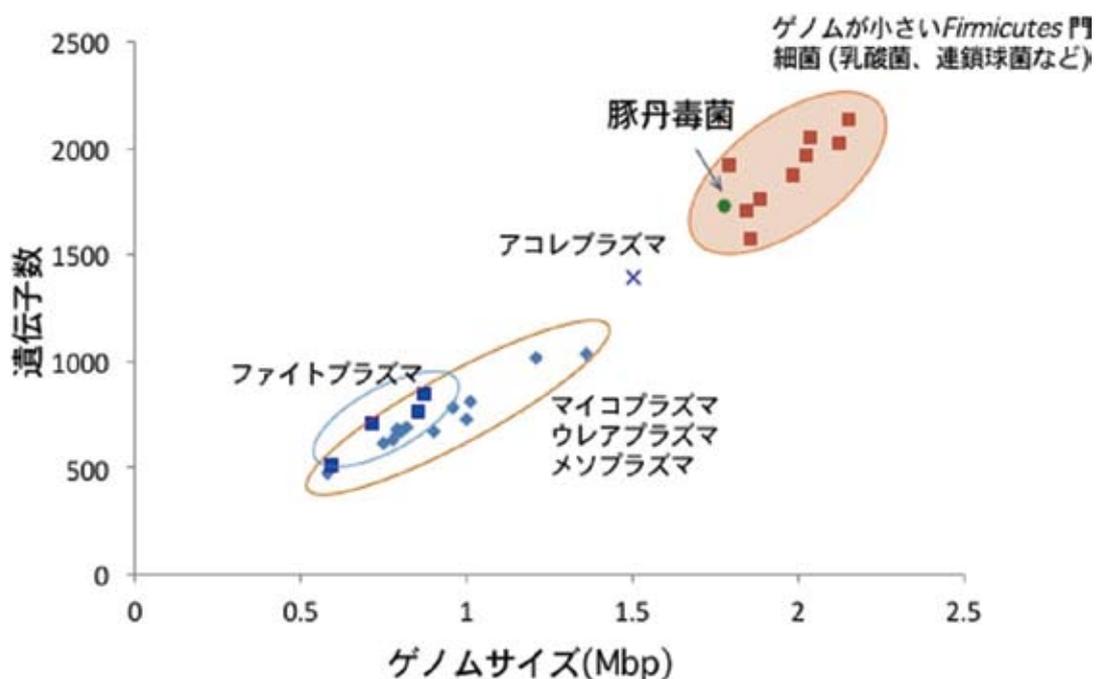


図 1 豚丹毒菌のゲノムサイズと他の菌種との比較

養素を宿主に依存する退行的進化をしており、そのゲノム構造もまた、マイコプラズマのゲノムに類似することが明らかとなっている。ゲノム収縮はライ菌やクラジミアなどの細胞内寄生病原体や共生細菌が共通に持つ特徴であるが、後述するように、細胞内寄生病原体である豚丹毒菌は限られたサイズのゲノム上に細胞内生残に重要な因子の遺伝子を極めて冗長的に保有する特徴的なゲノム構造を示す。

さらに興味深いことに、本菌は系統学的に極めてユニークな分子系統学的位置を占めることが明らかになった [1]。16S rRNA 及び 31 個の翻訳に関わる蛋白を用いたゲノムワイドな系統学的解析から、本菌を代表菌種とする *Erysipelotrichia* 綱は他の *Firmicutes* 門に属する細菌と系統学的に離れた位置にあり、*Mollicutes* 綱に近縁であることが判明している (図2)。このように、豚丹毒菌が *Firmicutes* 門に属する細菌と系統学的に離れた位置にあり、*Mollicutes* 綱に近縁であること、また、ゲノム構造が *Firmicutes* 門と *Mollicutes* 綱の両方の特徴を持つことは、マイコプラズマはグラム陽性菌から進化したとされる仮説を考える上で極めて興味深い。

### ゲノムからみる豚丹毒菌の病原性

豚丹毒菌の病原性で最も重要な因子は莢膜である。

本菌の莢膜多糖はインフルエンザ菌、肺炎球菌など多くの粘膜病原体が免疫回避の為に菌体表層に保有するフォスフォリルコリン (PCho) によって分子修飾を受けており、PCho を発現できない変異株はマウスや豚に対して全く病原性を示さなくなる [3]。興味深いことに、莢膜を保有する強毒株は食細胞に対して貪食抵抗性を示すばかりでなく、たとえマクロファージや好中球に取り込まれても細胞内で増殖することが可能である。ゲノム解析の結果、本菌が食細胞内殺菌を回避するためのエスケープ機構として、食細胞内の殺菌物質である活性酸素から逃げるための抗酸化酵素遺伝子やファゴゾーム等を構成する細胞膜を分解するためのフォスホリパーゼ酵素遺伝子をそれぞれ 9 個ずつ持つことが明らかになった [1]。

このように、豚丹毒菌は食細胞内環境に適応する形で進化をする一方、他のグラム陽性の病原細菌と同様に、体内に侵入後感染を成立させるために重要と考えられている菌体表層の付着因子を多く発現する。これまで本菌の重要な病原因子としてヒアルロニダーゼやノイラミニダーゼなどの菌体外酵素が報告されてきた。前者は組織への侵襲因子に、後者は菌の血管内皮細胞への侵入に関与すると考えられるが、ゲノム解析からこれらの酵素遺伝子はそれぞれ、3 及び 2 個の遺伝子が存在することが判明した。こ

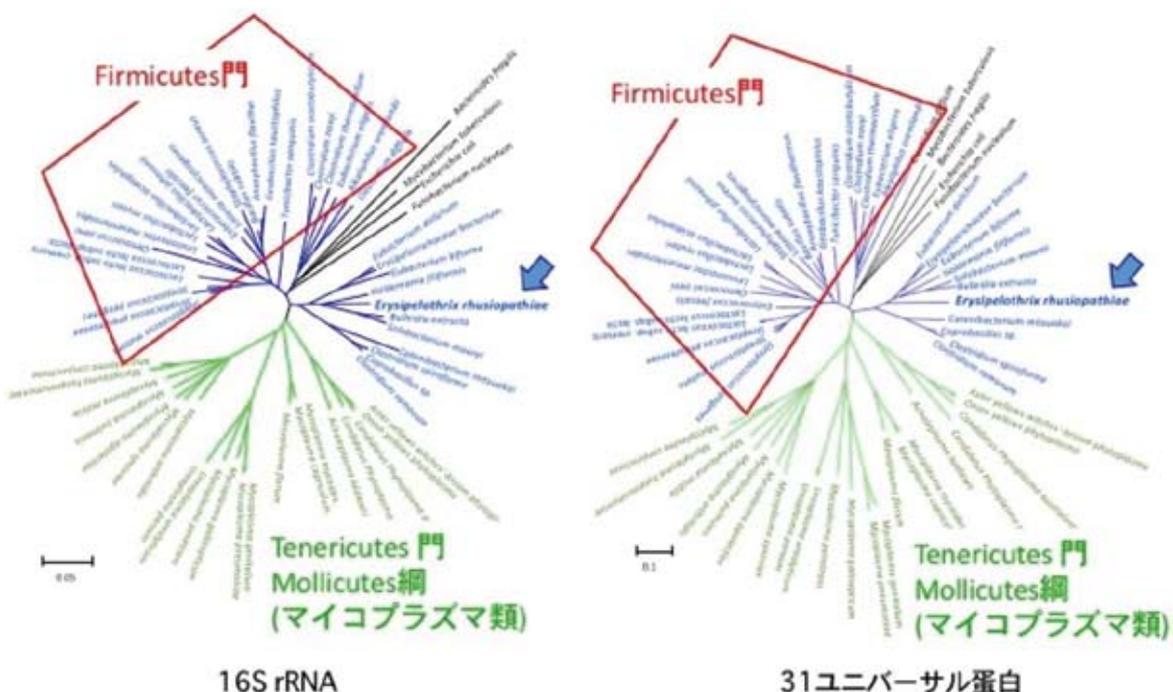


図2 豚丹毒菌の系統学的位置。現行の分類に従い、*Firmicutes* 門に属する細菌は青、*Mollicutes* 綱に属する細菌は緑、他 (アウトグループ) は黒で示した。矢印は豚丹毒菌を示す。

のように、本菌の重要病原因子遺伝子は進化の過程でゲノム上に重複して保存されてきたと考えられる [1]。

### 豚丹毒菌の大規模ゲノム解析

昨年、カナダカルガリー大学の研究グループは、1958年から2014年までに世界中の様々な動物から分離された合計83株の全ゲノム解析を行い、本菌の生態や進化に関する興味深い論文を発表した [2]。この研究で、本菌種のコアゲノム、すなわち、すべての豚丹毒菌が共通して保有する遺伝子群は、全ゲノムの58%であること、また、Fujisawa株が保有する1704個の遺伝子のうち、1137個がコアゲノム中に存在することが明らかになっている。抗酸化酵素遺伝子群やフォスホリパーゼ酵素遺伝子群など、上で示した病原性に関与する遺伝子のほとんどはコアゲノム中に存在することから、これらの病原因子はFujisawa株に特有のものではないことも判明した。また、この研究では、本菌種は大きく分けて宿主や地域性で区別されない3つのクレード (clade: 系統群) に分類されることも判明している。この中でClade 3が優占であり、系統学的にClade 2とClade 3の中間に位置するintermediateのグループが存在する。

### 国内流行株の遺伝子型と簡易検出法

本疾病の予防対策として、現在、生ワクチン及び不活化ワクチンが市販されている。しかし、依然として国内での発生は多く、2008年以降の届出頭数はむしろ増加している。その主な原因としてはワクチン接種率の低下が考えられるが、他の要因も懸念される。2008年以降の急性型及び亜急性型発生事例のほとんどから、ある特定の遺伝子型、すなわち、菌体表層抗原SpaAタンパクの203番目のアミノ酸がメチオニンタイプである血清型1aの強毒株 (Met-203 SpaAタイプ株) が分離されている [4, 5, 6]。我々は1990年から2011までに国内の急性型及び亜急性型の豚丹毒罹患豚から分離された血清型1a型の34株の全ゲノム配列を解析したが、これらの国内株はすべてintermediateグループに属する極めてクローナル (clonal) な集団であることが判明した。

また、食肉衛生検査所等では、生ワクチン株に性状が類似した株が関節炎や心内膜炎罹患豚から分離されている。国内で使用される生ワクチンはアクリフラビン色素耐性の弱毒株Koganei 65-0.15株 (血清型1a) であるが、この株の形質マーカーとされるアクリフラビン色素耐性は継代により変化することから、関節炎病変部から分離される野外株の血清型が1a型であった場合、この株が野生株であるか、ワクチン株であるかどうかの識別は困難となる。現在、細菌の種 (species) レベルでの同定はPCR法により簡単に行うことができるが、株 (strain) レベルでの同定は極めて困難であり、特に食肉衛生検査所や家畜保健衛生所等の現場で行える手法はほぼ皆無である。

我々は、血清型1a型の野外分離株34株の全ゲノム塩基配列の多様性の中から、Koganei 65-0.15株のゲノム配列中のみで認められる塩基配列の違い、すなわち、一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) をPCR法により検出することで、本ワクチン株と野生株とを特異的かつ迅速に同定することができる技術を開発した [7]。本法は、ブルーフリーディング (3 → 5' エクソヌクレアーゼ) 活性及び遺伝子増幅能が高いPCR酵素を用い、さらに擬陽性の発生を抑制するために、検出したいSNPの隣に人工的に導入したミスマッチの塩基を置くことでゲノム中のSNPを特異的に検出している (図3)。この原理を用いて、我々はさらに、Met-203 SpaAタイプ株を検出できるPCR法を開発した。また、国内で分離されるMet-203 SpaAタイプ株は大きく分けて2つの亜集団に分類されることが判明したが、この方法はこれらの2つの集団も識別できる。

### PCR法による主要血清型の同定

豚丹毒菌は、細胞壁由来の耐熱性抗原と家兔血清を用いた寒天ゲル内沈降反応により、少なくとも1 (1a, 1b)、2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 21型とその抗原を欠くN型に分類される (欠番の血清型番号は近縁の別菌種)。豚丹毒罹患豚から分離される株の血清型は、そのほとんどが急性型に多い1型と慢性型に多い2型であり、その傾向は世界的に見ても同様である。現在、それらの血清型を決定する

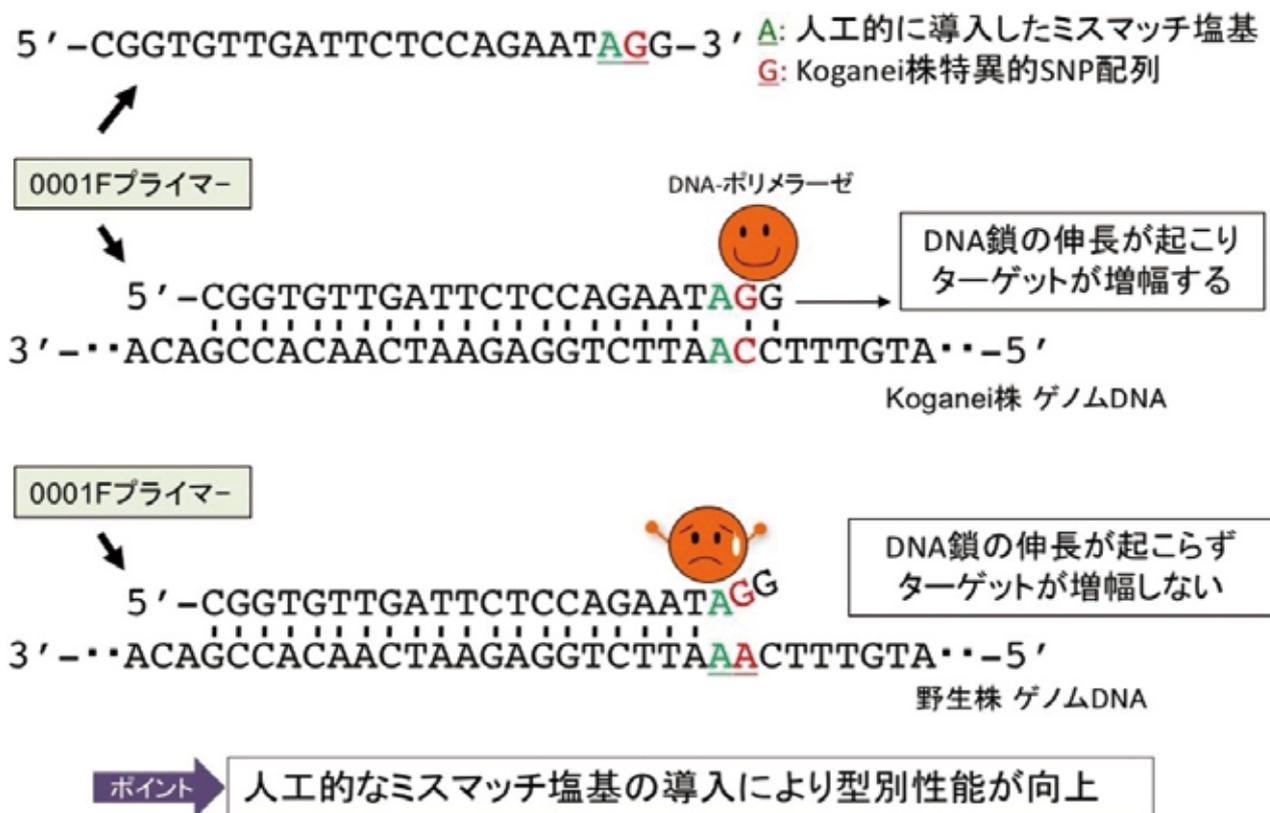


図3 PCR法による生ワクチン株 (Koganei65-0.15株) ゲノム SNP 検出の原理 (右) と PCR 増幅断片の検出 (左)。ゲノム中の5箇所のSNPをターゲットにしたプライマーセットを用いてPCRを行う。

抗原は同定されておらず、またその病原学的役割も分かっていない。しかし、菌の病原性や、本症の病理発生を理解する上で、その抗原の同定と機能を明らかにすることは重要である。また、野生動物における本感染症の報告では分離菌の血清型が同定されていないことが多く、臨床的に重要な1及び2型の血清型について、抗血清を用いることなく同定できる技術を開発することは、自然環境下における本疾病の発生要因を調査する上でも必要となる。

我々は、本菌の遺伝子機能及び病原性のすべてを明らかにすることを目的として、強毒株であるFujisawa株 (血清型1a) のゲノムに網羅的に変異を導入し、それに伴う表現形質変化の解析を行っている。これまでに、本株が持つ1704個の遺伝子のうち、700個以上の遺伝子について不活化したトランスポゾン変異株を作製した。この中から、寒天ゲル内沈降反応で抗1a型家兔血清との反応性を消失した変異株を同定することに成功したが、さらに、相補試験により変異した遺伝子の機能を復元させ、抗1a型血清との反応性の回復も確認した。これらの解析結果を基に、血清型1及び2型を規定する染色体領域が同定され、現在では血清型1a、

1b、及び2型の主要血清型の判定はPCR法にて簡単に行えるようになっている。

#### おわりに

本疾病の発生は、畜産現場ばかりでなく自然環境下の野生動物においても問題となっている。近年、中国の養豚現場やドイツの養鶏産業において豚丹毒の発生件数の顕著な増加が観察されている。また、カナダからアラスカ地方の寒帯地方から北極圏における広範な地域において、野生の偶蹄類動物の大量死の原因として本菌の関与が報告された。80株以上の分離菌の全ゲノム解析から、これらの大量死は新しく出現したクローナルな強毒株による感染死ではなく、気候変動等のストレスや他のファクターが原因の日和見感染症であることが明らかとなっている [8]。興味深いことは、ドイツや北米で認められた発生例と異なり、中国や日本国内での養豚における本症の発生は遺伝学的に近縁の2つの亜集団からなるMet-203 SpaAタイプ株であることが我々の解析から明らかになっている。極東地域における本症の発生要因を理解するには、今後も全ゲノム解析に

基づく分離菌の詳細な解析が必要とされる。

ところで我々は、作製したトランスポゾン遺伝子変異株をすべてマウスに接種し本菌の病原性に関連する遺伝子の同定を進めているが、これまでに報告されていない複数の病原性関連遺伝子領域が同定されている。今後、これらの遺伝子領域の機能を解明することで、新しい予防法の開発につながることを期待したい。

#### 引用文献

1. Ogawa, Y., Ooka, T., Shi, F., Ogura, Y., Nakayama, K., Hayashi, T., Shimoji, Y. 2011. The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of *Firmicutes* and the organism's intracellular adaptations. *J. Bacteriol.* **193** : 2959–2971.
2. Forde, T., Biek, R., Zadoks, R., Workentine, M. L., De Buck, J., Kutz, S., Opriessnig, T., Trewby, H., van der Meer, F., Orsel, K. 2016. Genomic analysis of the multi-host pathogen *Erysipelothrix rhusiopathiae* reveals extensive recombination as well as the existence of three generalist clades with wide geographic distribution. *BMC Genomics.* **17** : 461.
3. Shi, F., Harada, T., Ogawa, Y., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Miyamoto, T., Eguchi, M., Shimoji, Y. 2012. Capsular polysaccharide of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, and its modification with phosphorylcholine. *Infect. Immun.* **80** : 3993–4003.
4. Nagai, S., To, H., Kanda, A. 2008. Differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains by nucleotide sequence analysis of a hypervariable region in the *spaA* gene : discrimination of a live vaccine strain from field isolates. *J. Vet. Diagn. Invest.* **20** : 336–342.
5. To, H., Sato, H., Tazumi, A., Tsutsumi, N., Nagai, S., Iwata, A., Nagano, T. 2012. Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from recent swine erysipelas outbreaks in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **74** : 949–953.
6. Uchiyama, M., Yamamoto, K., Ochiai, M., Yamamoto, T., Hirano, F., Imamura, S., Nagai, H., Ohishi, K., Horiuchi, N., Kijima, M. 2014. Prevalence of Met-203 type *spaA* variant in *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates and the efficacy of swine erysipelas vaccines in Japan. *Biologicals.* **42** : 109–113.
7. Shiraiwa, K., Ogawa, Y., Eguchi, M., Hikono, H., Kusumoto, M., Shimoji, Y. 2015. Development of an SNP-based PCR assay for rapid differentiation of a Japanese live vaccine strain from field isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J. Microbiol. Methods.* **117** : 11–13.
8. Forde, T. L., Orsel, K., Zadoks, R. N., Biek, R., Adams, L. G., Checkley, S. L., Davison, T., De Buck, J., Dumond, M., Elkin, B. T., Finnegan, L., Macbeth, B. J., Nelson, C., Niptanatiak, A., Sather, S., Schwantje, H. M., Van Der Meer, F., Kutz, S.J. 2016. Bacterial Genomics Reveal the Complex Epidemiology of an Emerging Pathogen in Arctic and Boreal Ungulates. *Front Microbiol.* **7** : 1759.

