

博士論文

豚丹毒菌国内臨床分離株の遺伝学的解析

白 岩 和 真

豚丹毒菌国内臨床分離株の遺伝学的解析

白 岩 和 真

目次

緒論	1
第一章 慢性型豚丹毒を発症した豚から分離された豚丹毒菌の遺伝学的解析	
序論	5
材料及び方法	7
結果及び考察	11
要約	14
図表	15
第二章 急性型豚丹毒を発症した豚から分離された豚丹毒菌の遺伝学的解析	
序論	24
材料及び方法	26
結果	29
考察	32
要約	34
図表	35
第三章 国内流行株の亜集団を識別するマルチプレックス PCR 法の開発	
序論	41
材料及び方法	43
結果	45
考察	47
要約	49
図表	50
総括	60
謝辞	63
引用文献	64

緒論

豚丹毒菌 *Erysipelothrix rhusiopathiae* は、通性嫌気性、グラム陽性、細胞内寄生性の桿菌で、豚丹毒の原因菌である。本菌が属する *Erysipelothrix* 属の菌は、これまで、形態学的・生化学的に性状が非常に似ていることから、同一の菌種、すなわち 1 菌属 (*Erysipelothrix*) 1 菌種 (*rhusiopathiae*) と考えられ、細胞壁由来の耐熱性抗原と高度免疫家兔血清を用いた寒天ゲル内沈降反応により 1~26 型の血清型とその抗原を欠く N 型に分類されてきた [1]。しかし、DNA-DNA 相同性試験により、*Erysipelothrix* 属菌は、*E. rhusiopathiae* と *Erysipelothrix tonsillarum* とに大別され [2]、さらに、近年では *Erysipelothrix inopinata*、*Erysipelothrix larvae* に加えて、未命名の 3 菌種も存在することが分かってきた [3-5]。現在では、*E. rhusiopathiae* の血清型は、1 (1a、1b)、2、4、5、6、8、9、11、12、15、16、17、19、21、23 及び N 型となっている。野外において、豚丹毒を発症した豚から分離される菌株の血清型は、大部分が 1 型と 2 型であり [1, 6-9]、特に、急性型の症例では 1a 型、慢性型の症例では 2 型が多いが、その理由は解明されていない。

豚丹毒菌は宿主域が広く、これまで、豚、イノシシの他、牛、山羊、綿羊、イルカやヒトを含む多様な哺乳類ばかりでなく、七面鳥、鶏、ダチョウ、エミュー、ウズラ、アヒル等の鳥類からも分離されている [1, 6, 7]。また、魚介類からも菌が分離されるが、それらは、漁獲後に環境中から体表に付着したものと考えられている。*Erysipelothrix* 属菌種の中で、豚と鶏において実験的に感染及び発症が成立するのは *E. rhusiopathiae* のみであり、豚の扁桃から分離されることの多い *E. tonsillarum* は病原性を示さない [5]。また、豚は外見上健康であっても *E. rhusiopathiae* を扁桃に保菌していることが多い [1, 6, 7]。豚での発症は、飼養環境の急変、輸送、高温多湿によるストレスにより、これらの菌が扁桃から血液を介して全身へ移行する結果と考えられている。発症豚は、糞便、唾液、鼻汁から排菌することから、飲水や餌などの飼育環境を汚染し、それが新たな感染源となる。ヒトでは、職業病としての側面が強く、獣医師、養豚農家、食肉処理業者、漁業従事者、鮮魚業者で発生が認められるが、主婦の感染報告もある [1, 6, 7]。

わが国において、豚及びイノシシの豚丹毒は、家畜伝染病予防法において届出伝染病に指定されている。また、本症はと畜場法において、と畜禁止または全部廃棄の対象であ

るため、摘発された際の経済的損失が大きい。監視伝染病発生年報 [10] によると、発生頭数は年間 2,000 頭前後であったが、2008 年以降は増加傾向を示し、2013 年には 4,531 頭に達した (図 1)。その背景には、ワクチン接種率の低下が関係していると考えられているが、詳しい要因は分かっていない。豚丹毒は日本だけでなく世界中で発生しており、養豚・養鶏産業への影響以外に、北極での野生動物の大量死への関与が示唆されている [11]。

豚における豚丹毒の臨床症状は多様で、急性型、亜急性型、慢性型が知られている [1, 6, 9]。急性敗血症型では、40 度以上の高熱が突発し、チアノーゼを呈して数日中に死亡する。死亡豚は全身の鬱血が顕著で、胃や十二指腸に充出血が認められる。亜急性型は、菱形疹 (ダイヤモンド・スキン) を主徴とし、食欲不振や発熱などの症状も示す。慢性型の病態は関節炎と心内膜炎である。前者では、関節の腫脹、疼痛と跛行に加え、関節液の増量や絨毛の増生が見られる。後者は、心臓弁に形成されるカリフラワー状の疣贅が特徴で、と畜検査で摘発される。鳥類では、特に七面鳥は本菌に対する感受性が高く、敗血症の報告がある。ヒトでは、創傷感染による皮膚病変 (類丹毒) が一般的であるが、まれに敗血症や感染性心内膜炎が認められる。

豚丹毒菌において、最も重要な病原因子は莢膜である [12]。本菌の莢膜多糖はホスホリルコリンで修飾されており、菌の白血球に対する貪食抵抗性及び食細胞内生残性に関与する [13, 14]。無莢膜変異株やホスホリルコリン欠損変異株は、豚及びマウスに病原性を示さないことから、菌の病原性発現には莢膜多糖及びホスホリルコリン両方の発現が必須である [13, 15]。また、主要感染防御抗原 SpaA は、ホスホリルコリンに結合することで菌体表層に局在し豚血管内皮細胞への付着因子として機能すること [16]、さらに、SpaA の欠損変異株感染マウスでは半数致死量 (LD₅₀) が上昇することが報告されている [17]。

豚丹毒の予防には、ワクチン接種が有効である。現在、国内では生ワクチンと不活化ワクチンの両方が使用されている。生ワクチン (Koganei 65-0.15 株、以下、Koganei 株と記す) は、血清型 1a 型の野外株をアクリフラビン色素が添加された培地で長期間継代して弱毒化した変異株であり [18]、獲得したアクリフラビン色素耐性は、Koganei 株の識別マーカーとして利用されている。この生ワクチンは、1 回の接種で強固な感染防御免疫を付与できる一方、慢性型を発症した豚から Koganei 株と性状が類似した菌が分離されることがあり、その起病性が問題となっている。しかし、血清型 1a 型でアクリフラビン色素耐性

を有するという従来の指標だけでは Koganei 株と野生株との識別は困難である [9, 19]。アクリフラビン色素耐性試験以外の Koganei 株の同定法として、Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 法 [8]、Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法 [20] 及び *spaA* 高度変異領域の比較解析 (*spaA* タイピング) [21] などが報告されている。しかし、これらの方法を組み合わせて実施しなければ Koganei 株を同定できず、現状では、簡便かつ有用な判別法がない。

また、近年の急性型の症例で、主要感染防御抗原 SpaA のアミノ酸の 203 番目がメチオニン、257 番目がイソロイシン (M203/I257-SpaA) という特徴を有する血清型 1a 型菌の分離報告が増加している [22, 23]。これまで、この配列を有する株の分離頻度は極めて低く、この配列を持った株が近年、日本各地で分離されるようになった原因は不明である。

これらの背景をふまえ、本研究では、国内における豚丹毒の発生要因の解明を目的として、豚丹毒生ワクチンに用いられている Koganei 株及び国内流行株の高精度な識別法を開発し、その手法を用いて臨床分離株の分子遺伝学的解析を行った。本論文は三章から構成される。第一章では、Koganei 株に特有の塩基置換を同定し、この株を特異的に検出できる簡易 PCR 法を開発を行った。次いで、Koganei 株感染と慢性型症例との関連性を明らかにするため、生ワクチンを使用した農場において慢性型豚丹毒を発症した豚から分離された菌株を用いて遺伝子型を判定した。第二章では、過去 20 年にわたり（亜）急性型豚丹毒を発症した豚から分離された菌株について全ゲノム配列情報に基づいた系統解析を行った。第三章では、第二章で国内臨床分離株の中から現在、国内で流行している株のみを識別できるマルチプレックス PCR 法を開発した。

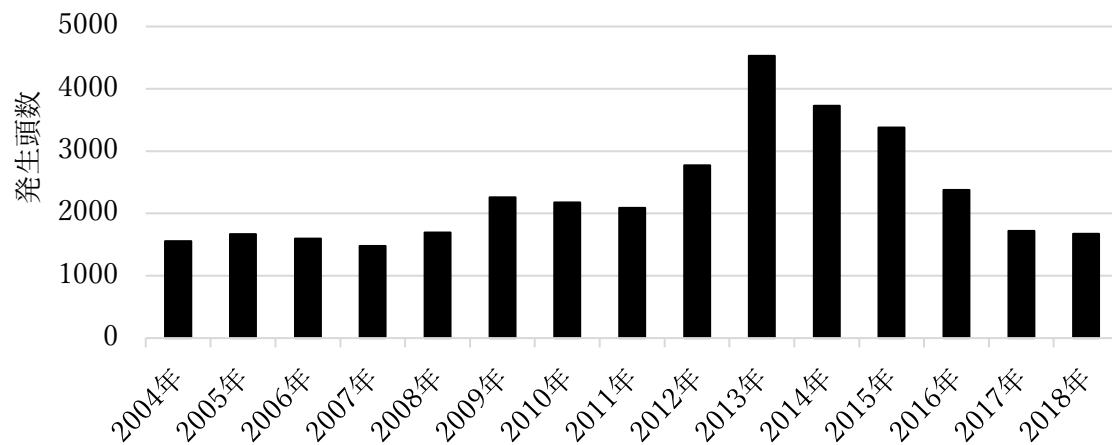


図1. わが国の最近15年間に於ける豚丹毒の発生状況
農林水産省監視伝染病発生年報 [10] より作成。

第一章

慢性型豚丹毒を発症した豚から分離された豚丹毒菌の遺伝学的解析

序論

豚丹毒はグラム陽性桿菌である豚丹毒菌の感染によって生じる疾病であり、本症の発症豚は、急性敗血症、または、慢性の関節炎及び心内膜炎などの臨床症状を呈する。その予防対策として、わが国では、Koganei 株を用いた弱毒生ワクチンが使用されている。しかし、慢性型症例において、表現型や遺伝学的性状が Koganei 株と類似した株が分離されることがあること [8, 9, 19-21] 及び Koganei 株には有効な遺伝子マーカーが存在しないことから、Koganei 株と野生株とを識別することは困難である。

Koganei 株は、血清型が 1a 型の強毒株をアクリフラビン色素添加培地で 65 回の継代を行うことにより、マウス死亡させずに関節炎を発生させるまで弱毒化させた株であり、この色素に対する耐性が Koganei 株の識別マーカーとされてきた [18]。しかし、アクリフラビン色素に対して自然耐性を示す野生株が見つかることから、Koganei 株のマーカーとしてアクリフラビン色素耐性を利用することは適切ではないとされている [9, 19, 21]。このため、アクリフラビン色素耐性試験以外の Koganei 株の同定法として、PCR 法のアニーリング温度を低く設定して反応を行うことで非特異的な DNA 断片を増幅させ、得られる多様な泳動パターンにより菌株を遺伝子型別する方法、すなわち、Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 法が開発された [8]。Imada らは、この手法を用いて、Koganei 株が RAPD 1-2 型に分類されること、また、慢性型豚丹毒を発症した豚に由来する多くの血清型 1a 型菌が Koganei 株と同一の RAPD 1-2 型に属することを報告した [8]。しかしながら、この RAPD 1-2 型は、Koganei 株の血清型と異なる 1b 型の臨床分離株でも見つかり [21]、本 RAPD 法は Koganei 株と一部の野生株とを正確に識別できないことが判明した。

そこで、株特異的な一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) を利用した細菌の菌株レベルでの識別技術に着目した。これまで、SNPs を用いた菌株の検出は、*Salmonella* Montevideo、*Brucella abortus*、*Brucella melitensis*、*Coxiella burnetii*、*Bacillus*

*anthracis*などの菌種に限られており [24-28]、リアルタイム PCR 法もしくは PCR 産物のダイレクトシーケンス解析が用いられている。しかし、前者は標的の SNP を含む領域を増幅するプライマーセットに加えて、その SNP に相補的な配列を含む蛍光標識プローブを用いることから、高価な試薬とリアルタイム PCR 装置とが必要となる。一方、後者はさらに高価なシーケンサーを必要とするだけでなく、迅速に結果を得ることができない。

本章では、まず、多検体を効率よく処理でき、かつ、低コストの手法として、通常のサーマルサイクラーを用いて Koganei 株を特異的に検出できる簡易 PCR 法の開発を試みた。まず、高速シーケンサーを用いて取得した Koganei 株のドラフトゲノム配列と血清型 1a 型菌である Fujisawa 株の完全ゲノム配列とを比較することにより Koganei 株に特異的な塩基置換を同定し、その配列を含む DNA 断片を増幅できる条件を検討することで Koganei 株のみを特異的に検出できる PCR 法を確立した。次に、生ワクチン使用農場で慢性型豚丹毒を発症した豚から分離された菌株について本 PCR 法を実施し、これらの臨床分離株と生ワクチン株との相違を解析した。

材料及び方法

1. ゲノム DNA の抽出

豚丹毒菌弱毒生ワクチン株である Koganei 株の培養は、0.1% Tween 80 及び 0.3% Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) を含む Brain heart infusion (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA; BHI-T80) (pH 8.0) 培地 10 ml を用いて、37°C で 16 時間行った。培養液を 15,000×g で 5 分間遠心分離し、上清を除去した後、5 mg/ml リゾチーム (和光純薬工業、大阪、日本) を含む Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0; TE) バッファーに菌体を再浮遊させ、37°C で 30 分感作した。次に、その溶液を 1 mg/ml プロテアーゼ K (Merck, Darmstadt, Germany) を含む TE バッファーに置換し、56°C で 30 分感作した後、SDS 水溶液 (最終濃度 0.1%) を加えて溶菌した。そして、定法によりフェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって核酸を精製した。RNA は、1 µg/ml リボヌクレアーゼ A (ナカライテスク、京都、日本) を含む蒸留水で 37°C、1 時間処理することによって分解した。再度フェノール・クロロホルム抽出及びエタノール沈殿による精製を行った後、ゲノム DNA を TE バッファーに溶解した。

2. Koganei 株に特異的な SNPs の同定

Koganei 株のショートリード配列の取得は、高速シーケンサーの HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて行った。次に、ソフトウェア Burrows-Wheeler Aligner [29] を使い、得られた配列を Fujisawa 株の完全ゲノム配列 (アクセッション番号; AP012027) へマッピングした。Koganei 株に特異的な塩基置換の同定はソフトウェア SAMtools (version 0.1.19) [30] を用いて実施し、精度を高めるために以下の基準に合致するものは除外した。

- (1) マッピングされたショートリード数のうち、リファレンス (Fujisawa 株) 配列と異なる塩基を有するリード数の割合が 9 割未満の場合 (9 割以上の場合、その塩基は Koganei 株に特異的な塩基置換とみなされる)、その塩基配列
- (2) 隣接する 2 つの塩基置換が 100 bp 未満の距離にある場合、後側の塩基配列
- (3) すべての挿入及び欠失配列

3. プライマーの設計と PCR 条件

上述の方法で同定した Koganei 株に特異的な塩基置換部位からランダムに 5 個を選択し、これらの配列を含む DNA 断片のみが増幅されるように 5 組のプライマーセットを設計した (表 1-1)。すなわち、図 1-1 に示すように、Koganei 株に特異的な塩基置換をフォワードプライマーの 3'側から 2 塩基目に配置させ、さらに、フォワードプライマーの 3'側から 3 塩基目に人工的なミスマッチ塩基を導入した [31]。

PCR は、KOD FX DNA ポリメラーゼ (東洋紡、大阪、日本) 及び T100 サーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA) を用いて行った。PCR 反応液は、取扱説明書に従い、2×PCR バッファー、dNTPs 0.4 mM、プライマー各 0.3 μM、KOD FX 1 U 及びゲノム DNA 50 ng を混合し、合計 50 μl に調整した。Fujisawa 株と Koganei 株のゲノム DNA の抽出は、上述の方法に従った。次いで PCR を行ったが、その条件は、最初に 95°C 5 分の初期変性を行い、熱変性 95°C 30 秒、アニーリング 67°C 30 秒、伸長反応 72°C 30 秒の 3 ステップを 35 回繰り返した後、最終伸長反応を 72°C 2 分とした。DNA 断片の有無及びサイズの確認は、0.8% のアガロースゲルを用いた電気泳動によって行った。

4. 寒天ゲル内沈降反応による血清型の判定

菌株の血清型の同定は、寒天ゲル内沈降反応により実施した。抗原の作製は、以下の手順で行った。BHI-T80 培地 3 ml を用いて菌を 37°C、16 時間培養し、培養液から菌体を回収、蒸留水 100 μl に再浮遊させた後、上述の分離株を 121°C で 1 時間オートクレーブ処理をした。次いで、15,000×g で 5 分間遠心分離し、その上清を抗原として使用した。また、抗血清は、血清型 1~26 型の高度免疫家兎血清を用いた。ゲルは、0.1% アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水で 0.8% アガロースを加熱溶解してスライドガラス上で固化させた。その後、ゲルパンチャーで穴をあけ、そこに抗原と抗血清とが隣接するように 20 μl ずつ添加し、室温で 24 時間反応させた。血清型の判定は沈降線を確認することで行った (図 1-2)。

5. 慢性型症例に由来する臨床分離株を用いた本 PCR 法の特異性の検証

開発した PCR 法の特異性を検証するため、慢性型豚丹毒を発症した豚から分離

される頻度の高い3種類の血清型に属する55株を用いて、上述の方法で解析を行った。血清型及び株数の内訳は、1a型菌26株、1b型菌10株及び2型菌19株である。使用した血清型1a型菌は、RAPD法によりKoganei株と同じ1-2型に分類された9株及び生ワクチンの接種歴があることからKoganei株との関連性が疑われた6株を用いた。また、主要感染防御抗原(SpaA)の203番目のアミノ酸がメチオニン、かつ、257番目がイソロイシン(M203/I257-SpaA)という特徴を有する、近年、急性型豚丹毒を発症した豚から分離される頻度が高い遺伝子型の11株を使用した。上述した3種類の血清型以外では、血清型5、6、11、19、21及びN型の臨床分離株について同様の解析を実施した。

6. 慢性型豚丹毒発症豚から分離された豚丹毒菌と生ワクチン株との関連性の解明

解析に使用した菌株は、2014年から2016年の3年間に生ワクチンを使用した養豚場において慢性型豚丹毒を発症した豚から分離された155株である。これらは、国内の10県(秋田県・神奈川県・富山県・長野県・愛知県・岐阜県・岡山県・広島県・愛媛県・福岡県)に所在する家畜保健衛生所または食肉衛生検査所において分離された。

PCR法によるKoganei株の同定は上述の方法に準じて行った。ただし、ゲノムDNAの調製法は簡易的なアルカリボイル法に変更した[32]。すなわち、BHI-T80寒天培地を用いて37°C、16時間培養した菌株のコロニーを1 μ lのループを使って掻きとり、50 μ lの25mM水酸化ナトリウム溶液に懸濁し、96°Cで5分間加熱した。次に、4 μ lの1M Tris-HCl(pH 8.0)を加えて中和し、15,000 \times gで5分間遠心分離した後、その上清5 μ lを鋳型DNAとしてPCRに使用した。

7. アクリフラビン色素耐性試験

本試験は、上述のPCR法によりKoganei株と同定された菌株について、Imadaらの報告[8]に従って行った。まず、アクリフラビン色素(和光純薬工業)の最終濃度が0%、0.0025%、0.005%、0.01%及び0.02%になるように添加したBHI-T80寒天培地を作製した。次に、あらかじめ培養した菌株を各濃度のアクリフラビン色素添加培地にそれぞれ塗布し、37°C、10%CO₂インキュベーターで、4日間培養した。0.0025%のアクリフラビン色素を含む培地における菌の発育が0%培地と同等である場合、その菌株をアクリフラビン色素

耐性と判定した (図 1-3)。

結果及び考察

1. Koganei 株に特異的な塩基置換の同定

PCR の標的となる Koganei 株に特異的な塩基置換を得るため、高速シーケンサーを用いて本株のドラフトゲノム配列（アクセッション番号; DRA003556）を取得した。次に、得られた配列を Fujisawa 株の全ゲノム配列にマッピングし、SNPs を検索した結果、76 個の Koganei 株に特異的な塩基置換が同定された（表 1-2）。翻訳領域に存在した塩基置換は 70 個であり、このうち、15 個は同義置換であったが、53 個は非同義置換を伴い、また、ストップコドンの消失及び獲得によるオープンリーディングフレームの延長及び短縮化がそれぞれ 1 個ずつ認められた。残りの 6 個の塩基置換は非翻訳領域に存在した。塩基置換はゲノム全体に広く存在していたが、ABC transporter (ERH_1125) 領域には 4 個の非同義置換が確認された。

2. Koganei 株を特異的に検出する PCR 法の開発

表 1-1 に示す 5 組のプライマーセットを用いて PCR を行った結果、すべてのプライマーセットにおいて、Koganei 株では目的とする DNA 断片が増幅されたが、Fujisawa 株では増幅されなかった（図 1-4）。3'側から 3 塩基目にミスマッチ塩基を導入したフォワードプライマーを用いた本 PCR 法では、Koganei 株の DNA 断片が増幅されたが、Fujisawa 株では、フォワードプライマーの 3'側と鋳型 DNA との間の連続する 2 塩基のミスマッチにより DNA ポリメラーゼの伸長反応が阻害され、DNA 断片が増幅されない機構が想定された。また、特異的な増幅効率が低下するアニーリング温度を下げた条件で PCR 反応を行ったところ、Fujisawa 株において DNA 断片の増幅が認められたことから、本 PCR 法においては、アニーリング温度の設定は特に重要であり、T100 以外のサーマルサイクラーを使用する場合は、アニーリング温度の調整が必要であると考えられた。

3. 臨床分離株を用いた本 PCR 法の特異性の検証

血清型が 1a 型であり、かつ、Koganei 株と同一の遺伝子型である RAPD 1-2 型の 9 株、また、生ワクチンの接種歴があることから Koganei 株との関連性が疑われた 6 株は、

5 組すべてのプライマーセットにおいて PCR 陽性であった (表 1-3)。

一方、M203/I257-SpaA 型の血清型 1a 型菌 11 株、血清型 1b 型菌 10 株及び血清型 2 型菌 19 株は、すべてのプライマーセットで PCR 陰性であった。また、血清型 1 型及び 2 型以外の血清型では、血清型 5、6、11、19、21 及び N 型菌株はいずれも PCR 陰性であることが確認された。これらの結果から、本 PCR 法は、事前に血清型別を行わなくても、簡便、迅速、かつ、確実に Koganei 株を同定できることが明らかとなった。

本 PCR 法は、Koganei 株と Fujisawa 株のゲノム比較により同定された Koganei 株に特異的な塩基置換部位を含んだプライマーを使用した。臨床分離株を用いた解析により、これらの塩基置換は、SNP として Koganei 株の同定に利用できることが判明した。

4. 慢性豚丹毒発症豚から分離された豚丹毒菌と生ワクチン株との関連性

生ワクチンを使用した農場で慢性型豚丹毒を発症した豚から分離された 155 株について寒天ゲル内沈降反応による血清型の判定を行った結果、1a 型は 103 株、1b 型は 8 株及び 2 型は 44 株であった (表 1-4)。この結果は、国内における臨床分離株の血清型の大部分が 1a 型及び 2 型であるというこれまでの報告 [8, 9] と同様であった。これらの 155 株について Koganei 株を特異的に検出する PCR を行った。その結果、5 組すべてのプライマーセットにおいて PCR 陽性を示した株は血清型 1a 型菌の 101 株で、残りの 2 株、血清型 1b 型菌 8 株及び 2 型菌 44 株はすべてのプライマーセットで PCR 陰性であった (表 1-4)。すなわち、生ワクチンが使用された農場において慢性型豚丹毒を発症した豚から分離された全 155 株のうち、65.2%(101 株)が Koganei 株であることが明らかとなった。この Koganei 株の高い分離率は、豚丹毒を発症した豚から分離された血清型 1a 型菌 381 株、1b 型菌 56 株及び 2 型菌 87 株の合計 524 株のうち、血清型 1a 型で RAPD 1-2 型を示した 266 株 (50.8%) は Koganei 株であるとした Imada らの成績 [8] とほぼ同様であった。

PCR による解析で Koganei 株と同定された 101 株についてアクリフラビン色素耐性試験を実施したところ、97 株は耐性を示したが、残りの 4 株 (3.9%) は感受性株であった (表 1-4)。この結果から、アクリフラビン色素感受性となった Koganei 株が野外から分離されることが判明した。Imada らは、Koganei 株が疑われた上述の 266 株のうち、22 株 (8.3%) がアクリフラビン色素感受性株であったと報告している [8]。これらのことから、

アクリフラビン色素耐性は Koganei 株が豚の体内で増殖する過程において欠落し得るため、本株の識別マーカーとして適切ではないと考えられた。

要約

本章の研究では、Koganei 株を特異的に検出する簡易 PCR 法の開発し、生ワクチン使用農場で慢性型豚丹毒を発症した豚から分離された菌株についてより詳細な研究を行った。まず、Koganei 株と Fujisawa 株との比較ゲノム解析から、Koganei 株に特異的な塩基置換が 76 個同定された。次に、この塩基置換を含む DNA 断片のみを特異的に増幅するため、ランダムに選択した 5 個の塩基置換部位を標的に PCR プライマーを設計した。すなわち、Koganei 株に特異的な塩基配列をフォワードプライマーの 3'側から 2 塩基目に配置し、そのうえ、フォワードプライマーの 3'側から 3 塩基目は人工的なミスマッチ塩基を導入した。Koganei 株と Fujisawa 株とを用いた条件検討から、Koganei 株の DNA のみが特異的に増幅する簡易 PCR 法を開発した。また、臨床分離株を用いた解析から、Koganei 株と同一の遺伝子型である RAPD 1-2 型株及びワクチン接種歴がある豚から分離された菌株は、いずれも Koganei 株と同定された。このように、標的とした塩基置換部位が SNP として利用できることが判明し、本 PCR 法は、国内の慢性型豚丹毒の疫学的解析に有用であると考えられた。

さらに、生ワクチン使用農場で慢性型豚丹毒を発症した豚から分離された豚丹毒菌 155 株を用いて、生ワクチン株との関連性を解析した。まず、ゲル内沈降反応による血清型の決定及び PCR 法による Koganei 株の同定を行い、次いで、Koganei 株と同定された株については、アクリフラビン色素耐性試験を実施した。解析した 155 株の血清型の内訳は、1a 型 103 株、1b 型 8 株及び 2 型 44 株であった。これらの株のうち、血清型 1a 型菌 101 株は PCR 解析によって Koganei 株であると同定された。この結果から、多くの慢性型症例において、Koganei 株がその原因菌となっていることが明らかとなった。また、Koganei 株と同定された 101 株のうち 4 株は、アクリフラビン色素に対して感受性であることが判明した。このように、これまで Koganei 株の識別マーカーとされてきたアクリフラビン色素耐性は、本株を識別するマーカーとして適切ではないと考えられた。

本 PCR 法は簡便かつ迅速に Koganei 株を同定できることから、家畜保健衛生所や食肉衛生検査所等において、慢性型豚丹毒の疫学的解析への利用が期待される。

表 1-1. Koganei 株に特異的な SNP を検出する PCR 法に使用したプライマー

Fujisawa 株の遺伝子番号 (当該遺伝子における SNP の位置)	遺伝子機能	プライマーセット番号： フォワードプライマー配列 ^a (5'-3') 及び リバースプライマー配列 (5'-3')	プロダクト サイズ
ERH_0001 (831)	Replication initiator protein (<i>dnaA</i>)	プライマーセット①： CGGTGTTGATTCTCCAGAATAGG TAGATGCTGCACGTCCTACAGAGGAC	874 bp
ERH_0543 (343)	Transcription regulator (<i>marR</i>)	プライマーセット②： TTCATAATCAATTTTCATGAAGCGGT ATGTGCCAACTATGTTCGCGGATGCGAGCAC	757 bp
ERH_0636 (171)	tRNA (guanine-N1-)- methyltransferase (<i>trmD</i>)	プライマーセット③： GATGATTATCCTTACGGTGGTGCTG GCTTCTTTTGGGCTAAGGTTTCTCGC	539 bp
ERH_1398 (1188)	Sigma 54-dependent transcription regulator	プライマーセット④： TCTTGTGCTAACATCTCACGATTAG ACGGGGAAGTGGTAAGACGTATTTAT	798 bp
ERH_1449 (301)	Hypothetical protein	プライマーセット⑤： ATACGATGCATATTCAATTCAATTGCAATA ACTTAACGTTTACAGATCGATCATATTT	583 bp

^a Koganei 株に特異的な SNP 配列は赤色、人工的に導入したミスマッチ塩基は緑色で示す。

表 1-2. Fujisawa 株との比較ゲノム解析によって同定された Koganei 株の 76 塩基置換部位

Fujisawa 株の ゲノム上の位置	Fujisawa 株の 遺伝子番号	Fujisawa 株の塩基	Koganei 株の塩基	アミノ酸置換
831	ERH_0001	T	G	非同義置換
22716	ERH_0020	C	T	同義置換
31145	— ^a	G	T	—
43515	ERH_0038	T	G	非同義置換
71218	ERH_0068	T	C	非同義置換
72474	ERH_0070	C	T	非同義置換
73111	ERH_0070	T	C	非同義置換
93151	ERH_0075	C	T	非同義置換
98776	ERH_0080	G	A	非同義置換
113699	ERH_0094	C	A	非同義置換
122855	ERH_0101	A	G	非同義置換
147604	ERH_0124	C	T	非同義置換
156462	ERH_0136	C	T	非同義置換
161301	ERH_0139	A	G	同義置換
180908	ERH_0152	A	C	非同義置換
255932	ERH_0221	T	G	非同義置換
266710	ERH_0231	T	C	同義置換
323572	ERH_0291	A	G	同義置換
325037	ERH_0292	A	G	非同義置換
375093	ERH_0342	A	G	非同義置換
376788	ERH_0344	C	G	非同義置換
399120	—	G	A	—
422204	ERH_0394	A	G	非同義置換
433078	ERH_0403	A	C	非同義置換
435612	ERH_0405	T	G	非同義置換
454176	—	A	G	—
466378	ERH_0427	T	C	非同義置換
505811	ERH_0462	T	C	非同義置換
577599	ERH_0533	T	C	非同義置換
579596	ERH_0534	A	T	非同義置換
588312	ERH_0543	A	G	非同義置換
667326	ERH_0636	G	T	同義置換
670790	ERH_0639	T	C	同義置換
671256	ERH_0640	A	G	同義置換
737587	ERH_0699	G	T	非同義置換
797880	ERH_0754	T	G	終止コドンに置換
863291	ERH_0812	G	A	非同義置換
938464	ERH_0882	A	G	非同義置換
1020900	ERH_0962	C	T	非同義置換
1080179	ERH_1021	A	G	非同義置換
1105852	ERH_1048	A	T	同義置換
1156374	ERH_1077	T	G	非同義置換
1162960	ERH_1081	G	T	非同義置換

1179233	-	G	A	-
1197871	ERH_1113	A	G	同義置換
1204259	ERH_1119	T	C	非同義置換
1208334	ERH_1125	C	G	非同義置換
1208921	ERH_1125	A	G	非同義置換
1209045	ERH_1125	T	G	非同義置換
1209656	ERH_1125	T	G	非同義置換
1248928	ERH_1178	A	T	非同義置換
1251452	-	A	G	-
1265294	ERH_1193	T	C	非同義置換
1270228	ERH_1198	G	A	非同義置換
1284071	ERH_1209	G	T	同義置換
1289153	ERH_1213	A	G	非同義置換
1290059	ERH_1213	C	A	非同義置換
1305062	ERH_1227	C	T	同義置換
1306095	ERH_1229	A	C	終止コード消失
1450465	ERH_1384	C	G	非同義置換
1462190	ERH_1398	C	A	同義置換
1470045	ERH_1402	A	G	非同義置換
1470059	ERH_1402	G	A	同義置換
1486956	ERH_1412	C	A	非同義置換
1487824	ERH_1413	G	A	非同義置換
1532873	ERH_1449	G	T	非同義置換
1586103	ERH_1501	C	A	非同義置換
1630487	ERH_1545	T	C	非同義置換
1641946	ERH_1554	G	A	非同義置換
1667722	ERH_1582	C	G	非同義置換
1682069	ERH_1598	C	A	非同義置換
1684170	ERH_1599	A	G	同義置換
1708883	-	T	C	-
1714843	ERH_1637	C	T	同義置換
1738971	ERH_1659	G	A	非同義置換
1757923	ERH_1678	G	T	非同義置換

^a 塩基置換が非翻訳領域に位置するため、該当する遺伝子番号及びアミノ酸置換が存在しない。

表 1-3. 豚丹毒菌臨床分離株の PCR 解析結果

血清型	株数	PCR の結果					備考
		プライマー セット①	プライマー セット②	プライマー セット③	プライマー セット④	プライマー セット⑤	
1a	9	+ ^a	+	+	+	+	RAPD 1-2 型 [8] を示し、Koganei 株と疑われた株
1a	6	+	+	+	+	+	生ワクチンの接種 歴から Koganei 株 と疑われた株
1a	11	-	-	-	-	-	M203/I257- SpaA 株
1b	10	-	-	-	-	-	
2	19	-	-	-	-	-	

表 1-4. 生ワクチンを使用した農場で慢性型豚丹毒を発症した豚から分離された豚丹毒菌 155 株の PCR 及びアクリフラビン色素耐性解析結果

血清型	株数	PCR 陽性を示した菌株数					アクリフラビン色素耐性株/ PCR 陽性を示した菌株
		プライマーセット①	プライマーセット②	プライマーセット③	プライマーセット④	プライマーセット⑤	
1a	103	101	101	101	101	101	97/101
1b	8	0	0	0	0	0	該当なし
2	44	0	0	0	0	0	該当なし

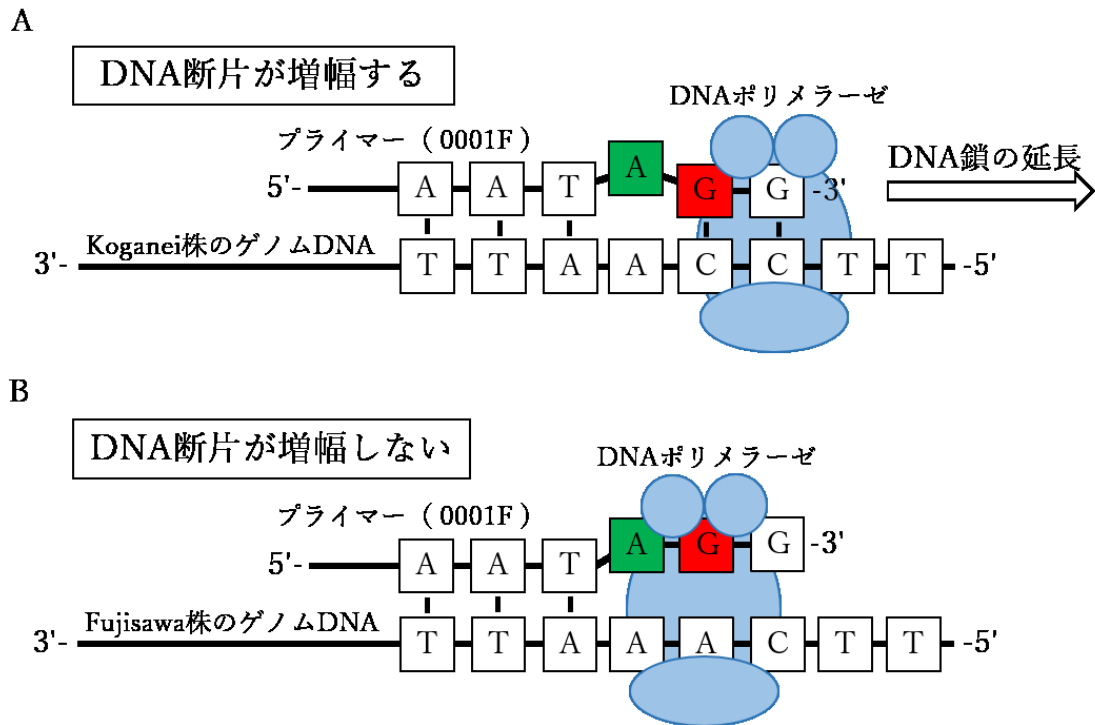


図 1-1. Koganei 株に特異的な SNP を検出する PCR 法の原理

(A) Koganei 株のゲノム DNA が鋳型の場合は、1 塩基のミスマッチが DNA ポリメラーゼによる伸長反応を阻害しないため、DNA 鎖が延長する。

(B) Fujisawa 株のゲノム DNA が鋳型の場合は、連続するミスマッチが DNA ポリメラーゼによる伸長反応を阻害するため、DNA 鎖が延長しない。

Koganei 株に特異的な SNP 配列は赤色、人工的に導入したミスマッチ塩基は緑色で示す。

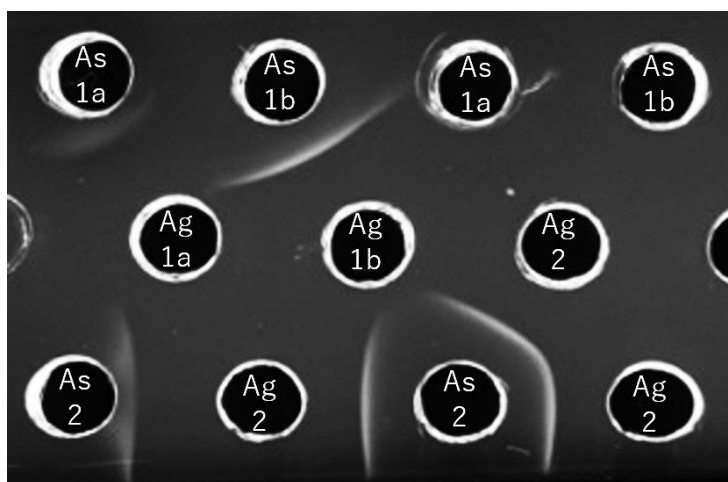


図 1-2. 寒天ゲル内沈降法による血清型の判定
Ag 及び As は、それぞれ抗原及び抗血清を示す。また、1a、1b、2 は血清型を示す。

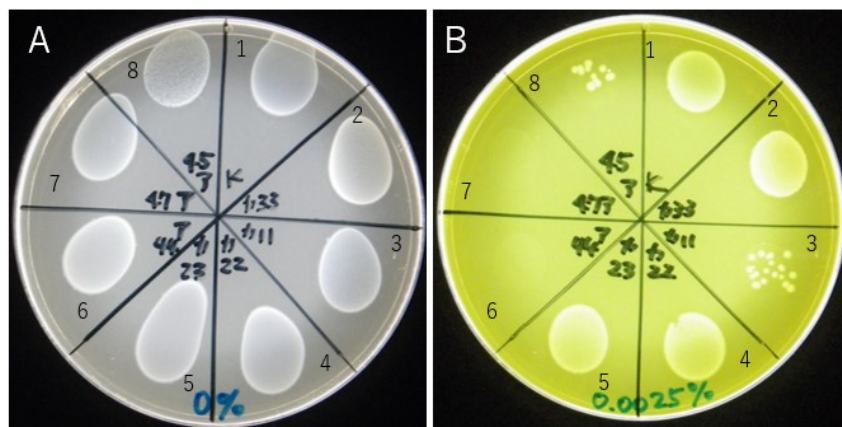


図 1-3. アクリフラビン色素 0%培地 (A) 及びアクリフラビン色素 0.0025%培地 (B) における豚丹毒菌の発育

シャーレ画分の番号 1 は Koganei 株、2~8 は臨床分離株を示す。菌株 1、2、4 及び 5 はアクリフラビン色素耐性、菌株 3、6、7 及び 8 はアクリフラビン色素感受性。

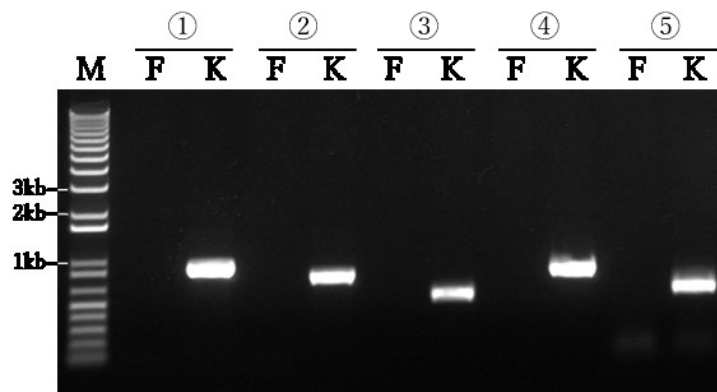


図 1-4. Fujisawa 株 (F) と Koganei 株 (K) を用いた PCR の電気泳動像
 レーンの上の数字は、プライマーセット番号である。M は、分子サイズマーカー (1Kb plus DNA ladder、Invitrogen) を示す。

第二章

急性型豚丹毒を発症した豚から分離された豚丹毒菌の遺伝学的解析

序論

家畜・家禽及び野生動物における豚丹毒の流行が世界中で問題となっている。米国では、2001年から2004年に血清型1a型の豚丹毒菌による豚丹毒の発生が増加し [33]、また、EU諸国では、これまで報告が少なかった家禽における発生が増加した [34]。さらに、2009年以降、カナダ北極圏における野生ジャコウウシの大量死も本症が原因であると報告されている [11]。一方、わが国でも2008年以降、養豚場における豚丹毒の発生頭数が顕著に増加している [10]。さらに、2009年7月から2011年4月までに国内11県で発生した急性型豚丹毒の病性鑑定では、臨床分離株の血清型はすべて1a型であることが確認された（未発表）。現在のところ、2008年以降に急性型豚丹毒の発生が増加した要因は明らかになっていない。しかし、第一章において、生ワクチンとして用いられている血清型1a型のKoganei株が多くの慢性型症例の原因菌となっていることを明らかにしたように、急性型症例においても、病原性が復帰し強毒化したKoganei株がその原因となっている可能性も考えられる。したがって、国内における本症の発生要因を明らかにするには、血清型1a型分離菌の分子遺伝学的解析が不可欠である。

豚丹毒菌の疫学的解析法としては、以前から寒天ゲル内沈降反応による血清型別 [1, 6-8] 及び Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法 [20, 33-35] が用いられてきた。本菌の血清型別は、型特異的な免疫家兔血清とオートクレーブ処理により抽出した細胞壁由来の耐熱性抗原を使用して行われる [36]。この方法により、発症豚から高頻度で分離される重要な血清型 (1a, 1b 及び 2 型) の同定 [8, 33, 37-39] 及び健康豚の扁桃から頻繁に分離される豚丹毒菌と同属近縁種の *Erysipelothrix tonsillarum* との識別が可能である [1, 6, 7]。一方、PFGE法は、染色体DNAを任意の制限酵素で分解した後、電場の方向を変化させながら電気泳動することにより、高分子のDNA断片を分離する方法で、得られたDNAバンドパターンを比較することで菌株の遺伝学的関連性を推定することができる。

最近では、全ゲノム配列を利用した分子系統学的解析が行われている。Fordeらは、

世界中の様々な動物から分離された豚丹毒菌 86 株について解析し、これらの菌株は大きく分けて 3 つの系統群（クレード 1・2・3）に分類されること、中でもクレード 3 が最も大きな群で、血清型 1a 型の Fujisawa 株はクレード 2 とクレード 3 との間の中間グループに属することを明らかにした [40]。また、このクレードは、菌が分離された宿主や血清型とは関連していないことも報告した [40]。

本章では、1990 年から 2011 年の間に国内で（亜）急性型豚丹毒を発症した豚から分離された血清型 1a 型菌について解析を行い、2008 年以降に急増した急性型症例から分離された臨床分離株が弱毒生ワクチンである Koganei 株から派生したものであるのか、また、これらの株に遺伝学的関連性があるのかを調べた。従来法である PFGE 法に加え、最新の全ゲノム配列に基づいた系統解析を行った。さらに、細菌ゲノムの再編成に影響を与えるプロファージについても、その分布を解析した。

材料及び方法

1. 使用菌株

解析に使用した血清型 1a 型菌は、1972 年以前に敗血症を呈した豚より分離された Fujisawa 株、弱毒生ワクチン株の Koganei 株及び 1990 年から 2011 年の間に国内 16 県において（亜）急性型豚丹毒を発症した豚から分離された 34 株である（図 2-1）。臨床分離株の菌株名は分離された県名の後に分離された西暦の下 2 桁の数字を付して示した。菌株の培養は第一章に記した方法で行った。

2. PFGE 法

豚丹毒菌の PFGE 解析には、制限酵素として主に SmaI が用いられている [20, 33-35]。そこで、より適切な制限酵素を探索するため、ソフトウェア インシリコモレキュラー クローニング ゲノミクス版 (imc-ge; インシリコバイオロジー、神奈川、日本) [41] を使用して Fujisawa 株の完全ゲノム配列について *in silico* 解析を行い、ゲノムを 15~25 個程度の断片に分解する ApaI、CpoI、NgoMIV を選択した。本解析は、これらに SmaI を加えた 4 種類の制限酵素を用いて、以下の方法により実施した。

一晩培養した菌液 400 μ l をチューブに取り、1 分間煮沸した後、氷上で冷却した。次に、10,000 \times g で 5 分間遠心分離し、沈殿を 100 μ l の EET バッファー (100 mM EDTA, 10 mM EGTA, 10 mM Tris, pH 8.0) に懸濁して 65 $^{\circ}$ C で保温した。これに加熱溶解した 1.6% アガロースを含む EET バッファーを 100 μ l 加え、よく混和した後、プラグモールドに注いで固化させた。ゲノム DNA を抽出するため、2 mg/ml リゾチームを含む TE バッファーで 37 $^{\circ}$ C、48 時間プラグを処理し、TE バッファーで洗浄後、100 μ g/ml プロテアーゼ K を含む TE バッファーで 56 $^{\circ}$ C、24 時間処理した。この DNA プラグを TE バッファーで 3 回洗浄し、適当なサイズに切断した後、プラグに含まれる EDTA 濃度を低下させるため、0.1 \times TE バッファー内に 1 時間静置した。その後、15 U の SmaI (タカラバイオ、滋賀、日本)、CpoI (タカラバイオ)、ApaI (タカラバイオ)、または、NgoMIV (New England Biolabs、Ipswich、MA、USA) を用いてメーカーが推奨するバッファー及び温度条件でプラグを 4 時間反応させた。最後に、TE バッファーを加え、酵素反応を停止させた。

電気泳動は、CHEF-DR III システム (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)、1% Pulsed-Field Certified アガロースゲル (Bio-Rad Laboratories) 及び 0.5×Tris-ほう酸-EDTA バッファー (44.5 mM Tris, 44.5 mM ほう酸, 0.5 mM EDTA, pH 8.3) (タカラバイオ) を用いて行った。泳動条件は、6 V/cm、14°C、22 時間とし、パルスタイムを 1~15 秒 (SmaI 及び ApaI を用いた場合) または、10~20 秒 (CpoI 及び NgoMIV を用いた場合) に設定した。泳動が終了後、エチジウムブロマイド溶液で 15 分間ゲルを染色し、蒸留水で洗浄し、UV ライト下で撮影した。

CpoI で消化して得られた DNA バンドパターンを利用したデンドログラムの作成は、ソフトウェア BioNumerics version 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, East Flanders, Belgium) を用いて菌株間の Dice similarity index を算出し、非加重結合法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean: UPGMA) により既報に従って行った [42]。

3. 全ゲノム上の塩基置換を利用した系統解析

国内臨床分離株の近縁性を解明するため、ゲノム上に存在する塩基置換を検出し、それを利用して系統樹を作成した。臨床分離株のうち、Kagoshima 11A 株のドラフトゲノム配列は第一章で解析した Koganei 株と同様に高速シーケンサーの HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) を用い、他の菌株のドラフトゲノム配列は MiSeq (Illumina) を用いて取得した (表 2-1)。得られた配列の Fujisawa 株完全ゲノム配列へのマッピングと各菌株の塩基置換の検出は、第一章に記した方法で行った。中国で急性型豚丹毒を発症した豚から分離された SY1027 株 (アクセッション番号; CP005079) [43] 及び GXBY-1 株 (アクセッション番号; CP014861) [44] の完全ゲノム配列については、NCBI の Nucleotide データベースより取得した。それらの配列と Fujisawa 株とのアライメント解析及び塩基置換の検出は、上述の方法とは異なり、ソフトウェア MUMmer package version 3.23 [45] に含まれる NUCmer 及び Show-SNPs をそれぞれ用いて実施した。系統解析のアウトグループには、Forde らが報告した北米またはヨーロッパで分離された豚丹毒菌のドラフトゲノム配列 [40] の中から 10 株を選んで、第一章に記した方法で解析した。上述の方法により同定されたすべての塩基置換部位の塩基を菌株毎に再構成した後、系統樹の構築はソフトウェア

RAxML [46] を用いて最尤法により行った。さらに、系統樹の信頼性を検証するため、1000 反復のブートストラップ解析を実施した。

4. プロファージ解析

Fujisawa 株の完全ゲノム配列において、36.5 kb のプロファージ (PP_Erh_Fujisawa) の存在が報告されている [47]。そこで、プロファージが豚丹毒菌の進化と遺伝的多様性に影響を与える可能性を検証するため、本研究で使用した豚丹毒菌のゲノム上に PP_Erh_Fujisawa が保存されているかどうかを解析した。各菌株のショートリード配列が Fujisawa 株のゲノム配列のファージ領域全体にマッピングされている場合、PP_Erh_Fujisawa が保存されていると判断した。一方、ショートリード配列が当該領域の一部のみ、もしくは、全くマッピングされていない菌株については、ソフトウェア *platanus* [48] を用いてトリミングしたショートリード配列のアッセンブルを行った。ソフトウェア *imc-ge* [41] を用いて PP_Erh_Fujisawa の挿入領域近傍の遺伝子配列を含むコンティグを検索し、得られた配列をソフトウェア *GenomeMatcher* [49] の *blastn* 解析により、PP_Erh_Fujisawa の配列と比較した。

結果

1. PFGE 法による国内臨床分離株の解析

Fujisawa 株及び Koganei 株に加え、2007 年以降に分離された国内臨床分離株からランダムに選んだ 13 株の合計 15 株について、*in silico* 解析により選択した ApaI、CpoI、NgoMIV 及び SmaI を用いて電気泳動を行った。その結果、ApaI 及び NgoMIV を用いた場合には多型が認められなかったが、SmaI では 5 種類、また、CpoI では 6 種類の DNA バンドパターンが確認された。そこで、CpoI を用いて Fujisawa 株及び Koganei 株、また、1990 年から 2011 年の間に（亜）急性型症例から分離された 34 株を解析したところ、24 種類の DNA バンドパターンが確認された（図 2-2）。この解析において、Koganei 株は臨床分離株とは異なる DNA バンドパターンであることが判明した。臨床分離株では、同一県内及び近隣県で分離された一部の菌株で同じ DNA バンドパターンが確認された。しかしながら、PFGE 解析結果と後述する系統解析によるクラスター分類との間に明確な相関は認められなかった。

2. 全ゲノム上の塩基置換を利用した系統解析

1990 年から 2011 年の間に国内で分離された臨床分離株の遺伝学的関連性を解明するため、（亜）急性型豚丹毒発症豚に由来する 34 株及び Koganei 株のショートリード配列を Fujisawa 株完全ゲノム配列（1,787,941 bp）にマッピングして塩基置換の解析を行った。その結果、全体で 904 個の塩基置換が同定され、このうち、翻訳領域に存在した塩基置換は 793 個で、非翻訳領域に存在した塩基置換は 111 個であった。臨床分離株 1 株あたりの塩基置換数は 100 個から 186 個で、平均は 135 個であった。解析した各株において、Fujisawa 株の完全ゲノム配列にマッピングされたショートリードの割合は 95.6%を超えており、また、その完全ゲノム配列に対する被覆率も 98.0%を超えていた（表 2-1）。

Forde らは、保存された 400 個以上の共通遺伝子を利用したゲノム解析を行い、その結果に基づき、豚丹毒菌は 3 つの系統群（クレード 1・2・3）に大きく分類されること、また、Fujisawa 株はクレード 2 と 3 の間の中間グループに属することを報告した [40]。本研究では、非翻訳領域を含むゲノムワイドな塩基置換解析を行い、系統樹を作成した。その

結果、今回解析したすべての国内臨床分離株は、塩基置換が少ないことから極めて近縁であることが判明した（図 2-3 A）。この解析において、Koganei 株は独立したクラスターIII に属すること、臨床分離株は、分離された年代の古い順にクラスターI、II 及び IV の 3 つの集団に分類されることが明らかとなった（図 2-3B）。興味深いことに、クラスターIV は、Saitama 94 株、及び Mie 04 株が属する集団（クラスターIVa）と 2007 年以降に分離された菌株が属する集団（クラスターIVb）とに区別され、また、クラスターIVb は、菌株が分離された地域によって九州型（クラスターIVb-1）と本州型（クラスターIVb-2）に細分類された。中国株である SY1027 株（分離年不明）はクラスターII、また、GXBY-1 株（2012 年分離）はクラスターIVb-2 にそれぞれ属することが判明した。

2007 年以降の臨床分離株（クラスターIVb）には、非同義置換を伴う共通の塩基置換が 20 個あり、このうち 2 個の塩基置換は、宿主への付着やバイオフィーム形成に関与すると推定される表層タンパク質 RspB (*E. rhusiopathiae* surface protein B; ERH_0669) 及び Collagen-binding protein (ERH_1436) [47] をコードする遺伝子に認められた。

4. プロファージ解析

Fujisawa 株のゲノム上に認められたプロファージの配列 (PP_Erh_Fujisawa) について、国内臨床分離株 34 株と Koganei 株における分布を解析した。その結果、クラスターI と IV に属するすべての臨床分離株 (28 株)、クラスターII に属する Chiba 92B 株及びクラスターIII の Koganei 株は、PP_Erh_Fujisawa を保有することが判明した。これに対し、PP_Erh_Fujisawa を保有しない 5 株の臨床分離株のうち、Chiba 90 株、Mie 99 株、及び Saitama 06 株は Fujisawa 株と同じ座位に PP_Erh_Fujisawa と異なるプロファージを保有しており、これら 3 株間のファージ遺伝子の相同性は 99%以上であった（図 2-4）。Akita 00 株にもプロファージの存在が確認されたが、その配列には広範囲の組換えが起きていた。一方、Okinawa 04 株は、ファージに関連する遺伝子群を欠失しており、PFGE 解析において、この領域を含むと推定される 85 kb のバンドが消失していた（図 2-2）。このように、今回解析した臨床分離株において、PP_Erh_Fujisawa は高度に保存されていること、欠失や組換えによるプロファージの多様性はクラスターII に属する株に限ることが確認された。中国株でクラスターII に属する SY1027 株には、Okinawa 04 株と同様にファージに関連する遺伝

子群が存在しなかった。これに対し、もうひとつの中国株でクラスターIVb-2 に属する GXBY-1株は、同じクラスターに属する国内株と同様に PP_Erh_Fujisawaを保有していた。

考察

国内では、2008年以降に急性型豚丹毒の発生が急増している [10]。そこで、その要因を明らかにするために、1990年から2011年の間に、国内で（亜）急性型豚丹毒罹患豚から分離された血清型 1a 型の豚丹毒菌 34 株について遺伝学的解析を行った。

まず、PFGE 法を用いて、これらの臨床分離株と生ワクチンの泳動パターンを比較解析した。その結果、Koganei 株の DNA バンドパターンは、臨床分離株とは異なることが判明した。また、34 株の臨床分離株において、菌株の分離年、分離された地域、及び DNA バンドパターンの中に相関が認められないことが明らかになった。臨床分離株のプロファージ解析では、その配列のサイズ及びゲノム上の挿入位置が各菌株で同一であり、プロファージ内の組換えや欠失が認められた株は少なかったため、プロファージが本菌の進化やゲノムの多様性に与える影響は限定的であることが示唆された。また、PFGE 解析で使用した CpoI の認識配列はプロファージの配列内に存在しないことも確認された。Janßen ら [34] は、生存に必須とされるハウスキーピング遺伝子のシーケンス解析を利用した Multi-locus sequencing typing (MLST) 解析を行い、本菌の PFGE 結果と MLST 結果との間に関連性は認められないことを確認した。さらに、Forde ら [50] は、本菌はコアゲノムの高頻度な組換えにより、染色体の再編が起きていることを報告している。以上のことから、臨床分離株の PFGE における各菌株の DNA バンドパターンの違いは、プロファージの存在とは無関係の染色体再編の結果であると考えられた。したがって、PFGE 法は、本菌の分子遺伝学的解析法として適切ではないと考えられた。

そこで、臨床分離株について、全ゲノム上の塩基置換を利用した高精度の系統解析を行った。その結果、アウトグループに用いた北米・ヨーロッパ分離株と比較して、国内臨床分離株は塩基置換が少ないことから、遺伝的多様性が極めて低く、いずれも Fujisawa 株と同じグループに属することが判明した。また、これらの臨床分離株は、分離された年代により大きく 3 つの集団（クラスター I・II・IV）に分類されたが、このうち、クラスター IV に属する菌株は、2007 年以降に分離された集団（クラスター IVb）とそれ以前に分離された亜集団（クラスター IVa）に区別されること、さらに、クラスター IVb は、菌株が分離された地域により、九州型（クラスター IVb-1）と本州型（クラスター IVb-2）に細分類されるこ

とが明らかとなった。一方、中国株である SY1027 株及び GXBY-1 株はそれぞれクラスター-II と IVb-2 に分類されたことから、国内分離株と中国株は、共通の祖先を起源とすることが示唆された。

以上のように、全ゲノム上の塩基置換を利用した系統解析により、Koganei 株は臨床分離株とは異なるクラスターに分類されることが判明した。したがって、Koganei 株と急性型症例に由来する臨床分離株との遺伝的関連性は無いと考えられた。一方、第一章で開発した Koganei 株を検出する PCR により Koganei 株と同定された株のうち、2 株について系統解析を行った結果、それらの株は Koganei 株と同じクラスターに属することを確認した（未掲載）。

2008 年以降、国内における急性型豚丹毒の発生が急増した背景はこれまで不明であったが、本章で行った全ゲノム解析を利用して作成した系統樹から、クラスターIVb に属する集団株による感染が原因であることが明らかとなった。加えて、これらの菌株には、表層タンパク質である RspB や Collagen-binding protein にアミノ酸置換を伴う変異が存在することも判明した。グラム陽性細菌において、病原性の発現機構に表層タンパク質が重要な役割を果たすことから [51]、これらの表層タンパク質遺伝子に変異した近年の流行株は、過去の臨床分離株よりも強毒化している可能性が考えられた。一方、北米北極圏に棲む野生動物の大量死の原因として豚丹毒菌の関与が報告されているが、その原因菌は様々な系統群に属していた [50]。そのため、その大量死は、特定の流行株が原因ではなく、気候変動などの環境要因により免疫力が低下した結果としての日和見感染であることが示唆されている [50]。今回、国内の流行にはクラスターIVb に属する系統学的に近縁の集団株が関与していることが明らかとなり、また、近年、中国で分離された GXBY-1 株も同じクラスターに属することから、極東アジア地域においては遺伝学的に近縁の強毒株が流行している可能性が考えられた。このように、国内養豚場における豚丹毒の発生には菌側の因子や環境要因など様々な原因が考えられるが、それ以外にも、ウイルス感染症など豚の免疫機構に影響を与える要因が関わっている可能性も考えられた。

要約

家畜・家禽及び野生動物など様々な動物種において、豚丹毒の流行が問題となっている。わが国の養豚場でも、2008年以降に急性型豚丹毒の発生頭数が顕著に増加しており、その症例から血清型1a型の豚丹毒菌が頻繁に分離されている。本症の予防のために用いられている弱毒生ワクチンのKoganei株（血清型1a型）は、多くの慢性型症例の原因菌となっていることから、急性型の発生増加においても病原性が復帰した本株の関与が懸念される。そこで、本章では、1990年から2011年の間に（亜）急性型豚丹毒を発症した豚から分離された血清型1a型菌34株について分子遺伝学的解析を行い、Koganei株との関連性を調べた。

全ゲノム上の塩基置換を利用して作成した系統解析から、解析した34株の国内臨床分離株は、分離した年代により大きく3つの集団（クラスターI・II・IV）に分類されることが明らかとなった。一方、Koganei株は独立したクラスターIIIに分類されたことから、Koganei株と国内で急性型豚丹毒を発症した豚から分離された菌株との疫学的関連性は無いと考えられた。この系統解析では、クラスターIVは、1994年及び2004年に分離された古い株が属する集団（クラスターIVa）と2007年以降に分離された株の集団（クラスターIVb）とに区別され、さらに、クラスターIVbは、地理的な関連性によって九州型（クラスターIVb-1）と本州型（クラスターIVb-2）とに細分類された。一方、中国株はクラスターII及びIVb-2に分類され、いずれも国内株と同じクラスターに属することが判明したことから、国内株と中国株は、共通の祖先を起源とすることが示唆された。

本研究の結論として、国内養豚場における近年の豚丹毒の流行は、極めて近縁なクラスターIVbに属する集団株の感染が原因であることが明らかとなった。これらの株は、病原性の発現に関与すると推定される2種類の表層タンパク質遺伝子の変異により強毒化している可能性が考えられた。国内養豚場での豚丹毒の発生には、菌側の因子や環境要因などに加え、宿主側の要因も関与している可能性も考えられた。

表 2-1. 高速シーケンサーを用いた全ゲノム上の塩基置換解析の結果

株名	解析機器	トリミングされたリード		マッピングされたリード		冗長度	Fujisawa 株の完全ゲノム配列にマッピングされた塩基数	Fujisawa 株の完全ゲノム配列に対する被覆率 (%)	アクセス番号
		数	割合 (%)	数	割合 (%)				
Koganei 65-0.15	Hiseq 2000	73,692,462	100	73,020,477	99.09	4033.7	1,787,914	100	SAMD00029842
Chiba 90	Miseq	1,600,496	95.43	1,585,500	99.06	153.7	1,777,755	99.43	SAMD00029844
Chiba 91	Miseq	2,912,664	95.94	2,801,808	96.19	177.8	1,785,720	99.88	SAMD00029845
Saitama 91	Miseq	1,923,544	89.90	1,839,657	95.64	182.8	1,785,800	99.88	SAMD00029846
Chiba 92A	Miseq	3,348,324	95.69	3,216,646	96.07	203.7	1,785,453	99.86	SAMD00029847
Chiba 92B	Miseq	3,784,886	96.44	3,641,225	96.20	221.5	1,787,369	99.97	SAMD00029848
Chiba 93	Miseq	3,232,548	95.69	3,111,593	96.26	193.7	1,785,783	99.88	SAMD00029849
Saitama 94	Miseq	1,204,410	94.58	1,188,049	98.64	116.9	1,781,127	99.62	SAMD00029850
Kanagawa 95	Miseq	2,593,778	96.54	2,492,350	96.09	148.4	1,787,177	99.96	SAMD00029851
Nagano 98	Miseq	3,295,122	95.39	3,153,688	95.71	327.1	1,787,300	99.97	SAMD00029852
Mie 99	Miseq	1,546,938	96.17	1,531,655	99.01	148.4	1,777,797	99.43	SAMD00029853
Akita 00	Miseq	1,014,372	95.95	993,791	97.97	91.3	1,757,566	98.30	SAMD00029854
Saitama 01	Miseq	2,458,398	95.83	2,358,002	95.92	246.6	1,787,231	99.96	SAMD00029855
Okinawa 04	Miseq	1,224,354	93.95	1,223,146	99.90	126.9	1,751,748	97.98	SAMD00029856
Mie 04	Miseq	1,169,240	94.07	1,160,892	99.29	117.3	1,784,159	99.79	SAMD00029857
Saitama 06	Miseq	1,481,122	95.28	1,465,793	98.97	149.1	1,777,787	99.43	SAMD00029858
Aichi 07	Miseq	1,112,920	94.54	1,111,932	99.91	112.8	1,787,890	100	SAMD00029859
Aichi 08A	Miseq	857,960	96.24	857,108	99.90	88.3	1,787,896	100	SAMD00029860
Aichi 08B	Miseq	776,540	89.25	775,855	99.91	76.2	1,787,899	100	SAMD00029861
Gunma 08	Miseq	717,322	96.18	716,665	99.91	74.4	1,787,897	100	SAMD00029862
Gunma 09	Miseq	1,058,870	95.00	1,057,957	99.91	104.9	1,787,854	100	SAMD00029863
Ibaraki 09	Miseq	2,387,002	96.03	2,384,862	99.91	249.6	1,787,909	100	SAMD00029864
Chiba 09	Miseq	1,265,292	95.32	1,264,378	99.93	120.8	1,787,908	100	SAMD00029865

Aomori 09	Miseq	997,802	73.56	996,917	99.91	99.7	1,787,907	100	SAMD00029866
Yamanashi 10	Miseq	895,710	94.90	894,780	99.90	91.2	1,787,901	100	SAMD00029867
Gifu 10	Miseq	657,744	94.31	657,229	99.92	63.9	1,787,892	100	SAMD00029868
Nagasaki 11A	Miseq	1,181,792	89.63	1,180,685	99.91	110.3	1,787,911	100	SAMD00029869
Nagasaki 11B	Miseq	952,128	96.51	951,425	99.93	89.1	1,787,908	100	SAMD00029870
Nagasaki 11C	Miseq	977,496	96.71	970,534	99.29	92.6	1,787,899	100	SAMD00029871
Kagoshima 11A	Hiseq 2000	96,037,682	97.54	95,264,058	99.19	5073.7	1,787,914	100	SAMD00029843
Kagoshima 11B	Miseq	1,352,386	96.49	1,342,148	99.24	128.7	1,787,907	100	SAMD00029872
Miyazaki 11	Miseq	1,305,024	96.18	1,294,840	99.22	123.4	1,787,913	100	SAMD00029873
Aomori 11A	Miseq	878,374	95.83	877,781	99.93	81.3	1,787,733	99.99	SAMD00029874
Aomori 11B1	Miseq	1,296,692	95.59	1,295,027	99.87	132.4	1,787,910	100	SAMD00029875
Aomori 11B2	Miseq	1,198,822	96.16	1,197,660	99.90	123.2	1,787,782	99.99	SAMD00029876
HC-585 ^a	Miseq	142,602	97.16	126,711	88.86	4.8	1,654,944	92.56	SAMN03837082
SY1027 ^b	454	— ^d	—	—	—	—	1,727,777	96.64	CP005079
GXBY-1 ^c	Hiseq 2000	—	—	—	—	—	1,770,020	99.00	CP014861

^a Forde ら [40] を参照。

^b Kwok ら [44] を参照。

^c Tang ら [45] を参照。

^d 完全ゲノム配列のため、リードに関するデータが存在しない。

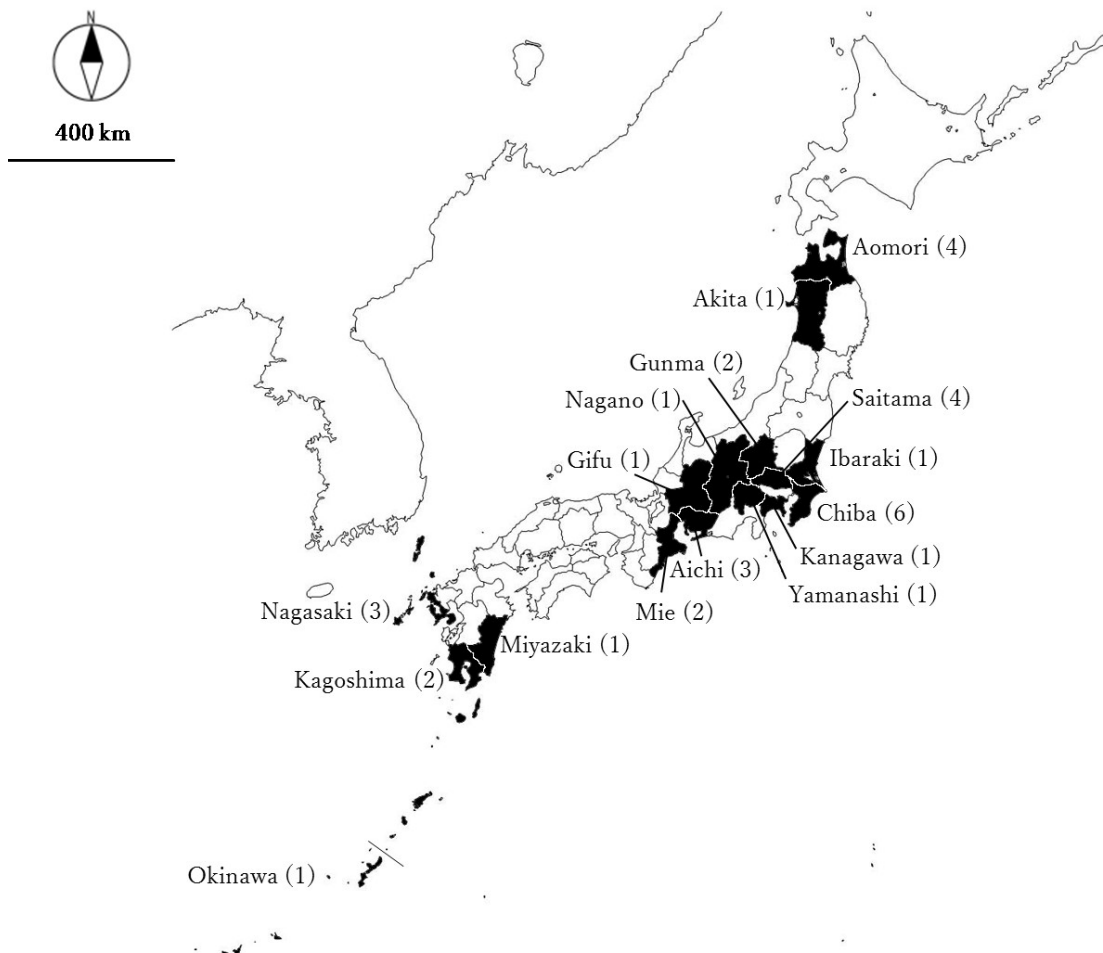


図 2-1. 用いた豚丹毒菌が分離された県名の中の括弧内は株数を示す。

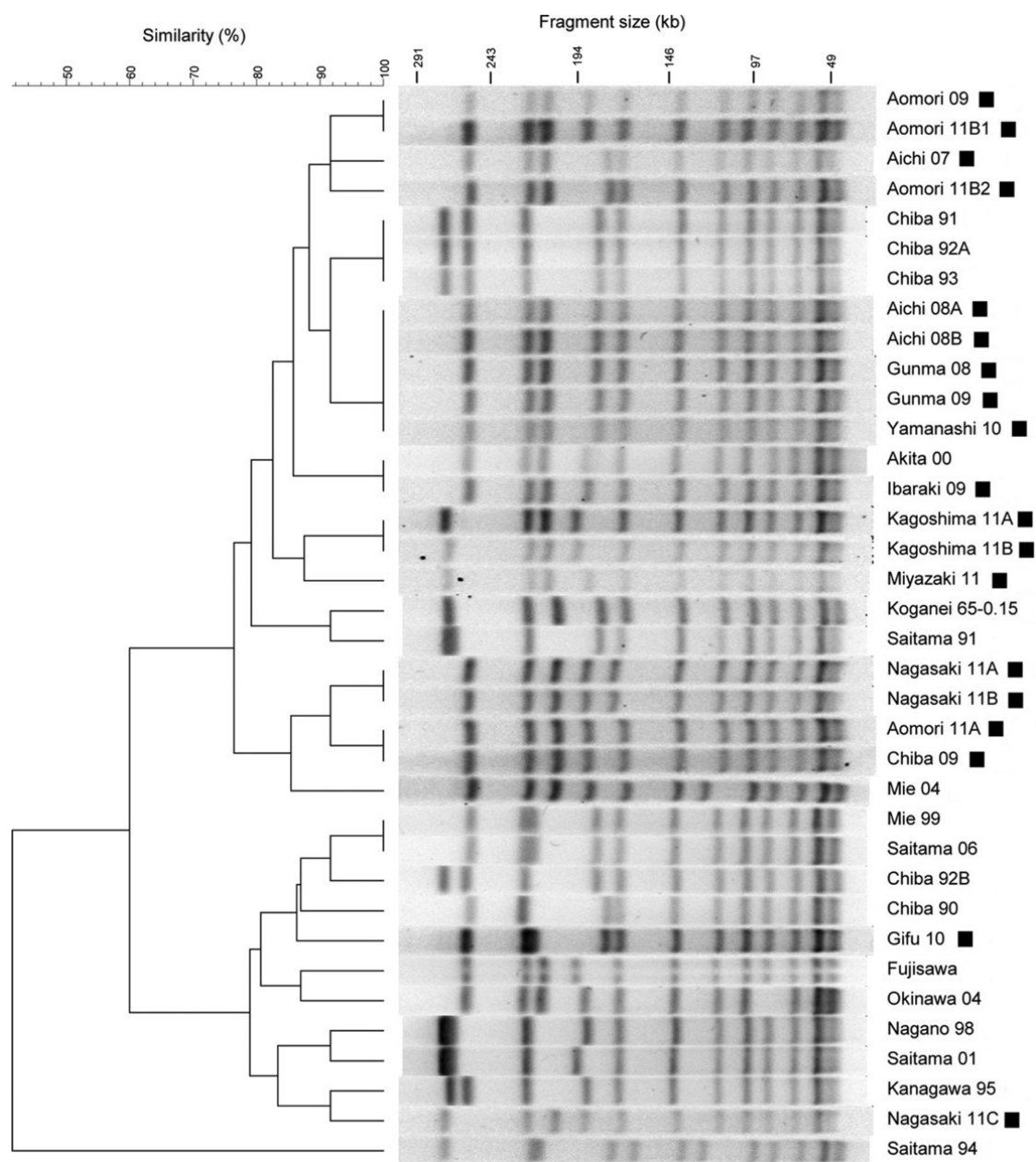


図 2-2. 豚丹毒菌臨床分離株 36 株の PFGE 解析結果

株名は、分離された県名の後に分離された西暦年号の下 2 桁の数字を付して示す。株名の後の■は全ゲノム上の塩基置換を利用した系統解析により、クラスターIVb に属する菌株を示す。Okinawa 04 株はプロファージの脱落により 85 kb 付近のバンドが消失している。

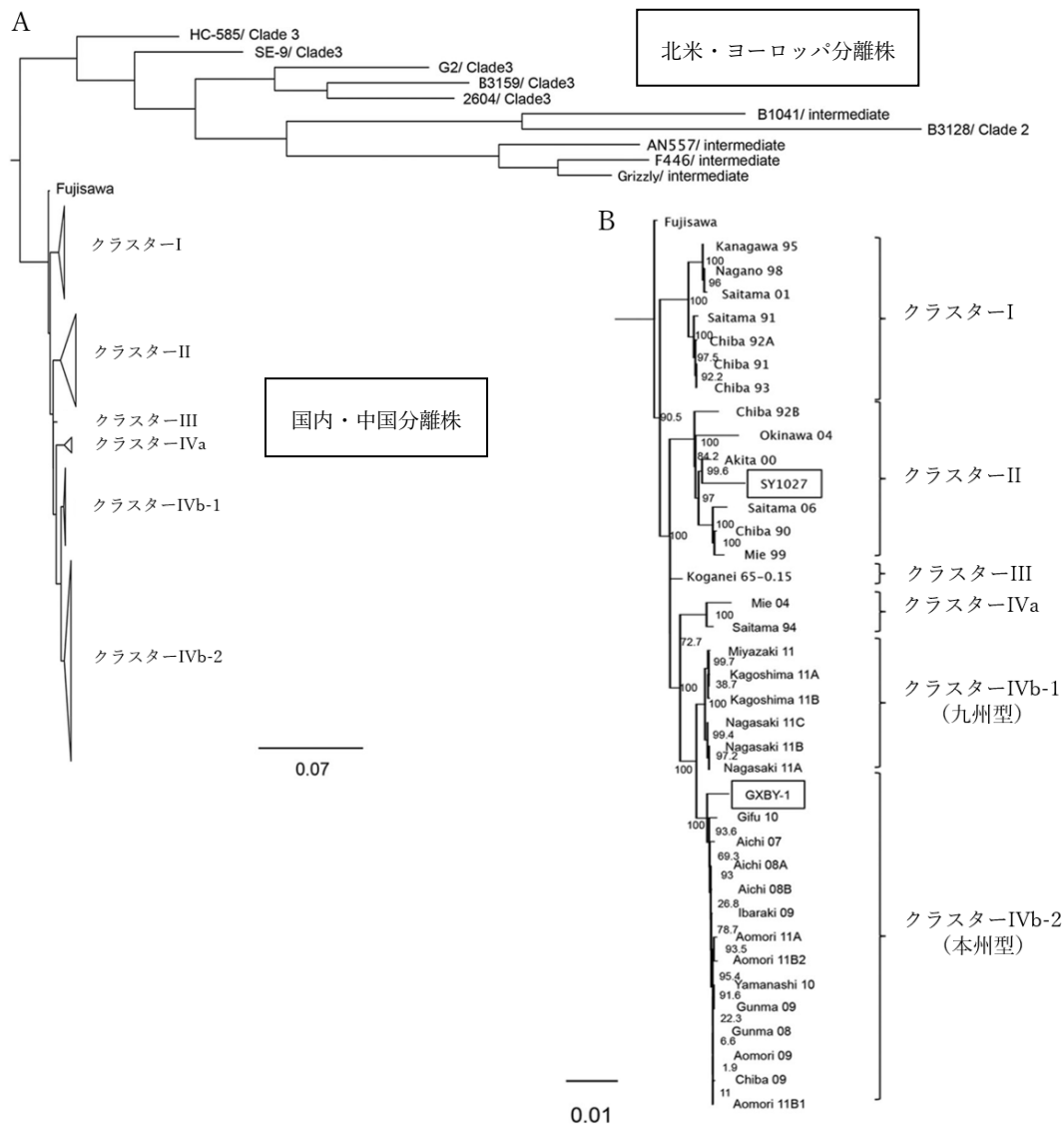


図 2-3. 全ゲノム SNPs を利用して構築した豚丹毒菌の系統樹

(A) 北米・ヨーロッパ分離株（アウトグループ）を含めた系統樹。

(B) 血清型 1a 型の国内臨床分離株 36 株と中国株 2 株を含む部分の拡大図。

系統樹は最尤法を用いて作成し、ブートストラップ値を百分率で示す。中国株は株名を四角で囲って示す。スケールは塩基置換部位に対する置換数を示す。アウトグループにおいて、血清型 1a 型菌は HC-585 株のみである。

Forde らは、世界中で分離された豚丹毒菌を含む *Erysipelothrix* 属菌について、保存された 400 個以上の共通遺伝子を用いたゲノム解析により豚丹毒菌を大きく 3 つの系統群に分類し、Fujisawa 株及び SY1027 株はクレード 2 と 3 の中間に分類されることを報告した [40]。

本系統樹は、Forde らの方法 [40] とは異なり、Fujisawa 株の完全ゲノム配列にマッピングして得られた翻訳領域・非翻訳領域の両方に存在する塩基置換を用いて作成した。また、豚丹毒菌以外の *Erysipelothrix* 属菌やクレード 1 に属する豚丹毒菌を使用していないため、アウトグループの樹形が Forde らの結果 [40] とは一致しない。解析した国内・中国分離株は、分離された年代により大きく 4 つのクラスターに分類された。

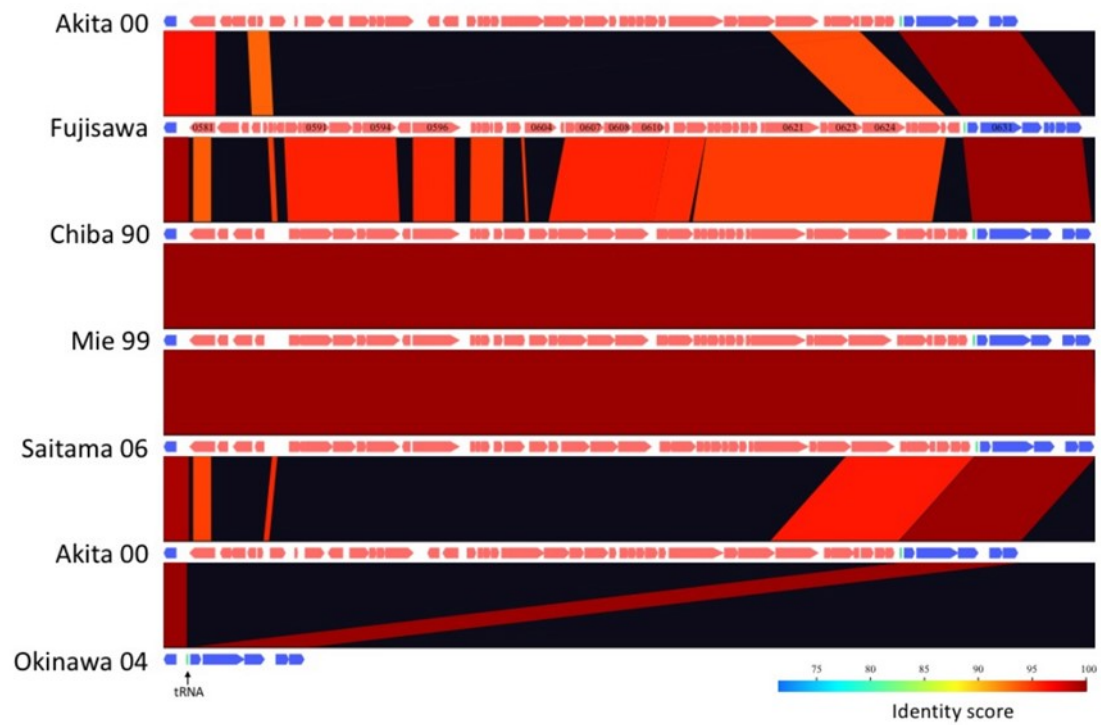


図 2-4. 豚丹毒菌国内臨床分離株に認められたプロファージ領域の blastn 解析結果
 株名の右側の矢印は、赤色がファージ関連遺伝子、青色がファージ非関連遺伝子、緑色は tRNA をそれぞれ示す。菌株間における個々の遺伝子の同一性を色で示し、濃赤色～赤色は同一性が非常に高く、黒色は同一でないことを示す。

第三章

国内流行株の亜集団を識別するマルチプレックス PCR 法の開発

序論

豚丹毒菌の疫学的解析法として、寒天ゲル内沈降反応による血清型別 [1,6-8] 及び Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法 [20,33-35] に加えて、近年では、遺伝子配列に基づいて解析を行う方法が報告されている。その一つとして、Multi-locus sequence typing (MLST) 法がある。本解析法は、複数 (通常 7 個以上) のハウスキーピング遺伝子の配列を解析し、その差異をパターン化して菌のタイピングを行う方法であり、高精度の解析ができると考えられている。しかし、Janßen ら [34] が行った MLST 解析では、様々な宿主から分離された 165 株の豚丹毒菌において宿主特異性や地理的関連性は認められず、また、MLST 結果と PFGE 結果との間においても関連性は認められないことが確認されている。

一方、単一遺伝子配列情報を利用した疫学解析として広く用いられてきた *spaA* タイピング法 [21] は、本菌の主要な感染防御抗原をコードする *spaA* 遺伝子の高度変異領域、すなわち、502~933 塩基の 432 bp をシーケンス解析することにより、菌株の遺伝子型を判別する方法である。この方法により、近年、国内で急性型豚丹毒を発症した豚から分離される血清型 1a 型豚丹毒菌の多くが、SpaA の 203 番目のアミノ酸がメチオニン、257 番目のアミノ酸がイソロイシン (M203/I257-SpaA) である特徴を有することが判明している [22, 23]。

第二章における全ゲノム上の塩基置換を利用した系統解析により、国内臨床分離株は、分離した年代により大きく 3 つの集団 (クラスター I・II・IV) に分類されることが明らかとなった。この解析において、生ワクチンである Koganei 株は独立したクラスター III に分類されること、また、近年、(亜) 急性型豚丹毒を発症した豚から分離された血清型 1a 型の流行株集団 (クラスター IVb) は、九州型 (クラスター IVb-1) と本州型 (クラスター IVb-2) の 2 種類の亜集団から構成されることが明らかとなった。さらに、これらの国内分離株は、中国で分離された株と共通の祖先に由来することも判明した。そこで、本章では、

spaA タイピング法を実施し、その結果と全ゲノム解析によるクラスター分類との関連性を解析した。次に、より高精度な遺伝学的解析を迅速かつ簡便に実施するため、クラスター IVb 中の IVb-1 及び IVb-2 の亜集団に特異的な塩基置換を SNPs として利用し、それらの SNPs を検出することで亜集団の識別を同時に行えるマルチプレックス PCR 法を確立した。さらに、他の血清型と様々な *Erysipelothrix* 属菌種の臨床分離株について本 PCR 法による遺伝子型を解析し、本 PCR 法の特異性を検討した。

材料及び方法

1. 使用菌株

使用菌株は、Fujisawa 株、Koganei 株、豚由来の臨床分離株、豚丹毒菌基準株(ATCC 19414 株) 及び *Erysipelothrix* 属の血清型参考株、計 127 株である。菌株の培養、ゲノム DNA の抽出及び血清型の判定は第一章に記した方法で行った。

2. *spaA* タイピング

血清型 1a 型の国内臨床分離株の *spaA* タイピングは、以下の方法で行った。表 3-1 に示すプライマー及び KOD FX DNA ポリメラーゼを用いた PCR 法により *spaA* の高度変異領域を含む 1,085 bp の DNA 断片を増幅し、塩基配列を決定した。PCR 反応液の調製は、第一章に記した方法に準じて実施した。PCR 条件は、初期変性 94°C 2 分の後、熱変性 98°C 10 秒、アニーリング 55°C 30 秒、伸長反応 68°C 1 分の 3 ステップを 30 回繰り返すプログラムとした。1%アガロースゲルを用いた電気泳動により PCR 産物の有無及びサイズを確認した後、illustra ExoStar (GE Healthcare、Fairfield、CT、USA) を使用して精製した PCR 産物について BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems、Waltham、MA、USA) 及び 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてシーケンシングした。最後に、得られた塩基配列をソフトウェア ATGC version 7.0 (ゼネティクス、東京、日本) を使用してアッセンブルし、Fujisawa 株の *spaA* 配列と比較した。

外国株の *spaA* タイピングは、NCBI のデータベースに登録されている塩基配列を利用した。血清型 1a 型の中国株 (臨床分離株 74 株及び弱毒生ワクチン 2 株) の *spaA* 配列は Nucleotide データベースから取得した。他には、世界各地の家畜及び野生動物から分離された豚丹毒菌について、Sequence Read Archive データベースから取得したショートリード配列 (BioProject アクセッション番号; PRJNA288715) を用いた。コンティグの作成は Forde らの方法 [40] に従い、ソフトウェア ConDeTri [52] を用いてショートリード配列をトリミングし、ソフトウェア SPAdes [53] を使用してアッセンブルを行った後、ソフトウェア imc-ge [41] を用いた blastn 解析により、作成したコンティグから各菌株の *spaA* 配列を取得し、Fujisawa 株の配列と比較した。

3. マルチプレックス PCR 法のプライマー設計と PCR 条件

系統解析により同定されたクラスターIVb とその亜集団である IVb-1 及び IVb-2 に特異的な塩基置換からそれぞれ 1 個を選択し、これらの配列を含む DNA 断片のみが増幅されるように第一章に記した方法を用いて 3 組のプライマーセットを設計した(表 3-2)。PCR 反応液は、2×PCR バッファー、dNTPs 0.4 mM、プライマー各 0.3 μ M、KOD FX 0.5 U 及びゲノム DNA 25 ng を混合し、合計 25 μ l に調整した。PCR 条件は、最初に 95°C 5 分の初期変性を行い、熱変性 95°C 30 秒、アニーリング 67°C 30 秒、伸長反応 72°C 40 秒の 3 ステップを 35 回繰り返した後、最終伸長反応を 72°C 2 分とした。DNA 断片の有無及びサイズの確認は、1.5% のアガロースゲルを用いた電気泳動により行った。

結果

1. *spaA* タイピング

1990年から2011年に国内で分離された臨床分離株34株について *spaA* タイピングを行った。その結果、これらの臨床分離株は Koganei 株（クラスターIII）とは異なる3つの SpaA 型に分類され、さらに、それらの SpaA 型は全ゲノム解析によるクラスター分類と一致することが明らかとなった（表 3-3）。1991年から2001年にかけて分離されたクラスターIに属する7株は Fujisawa 株と同じ遺伝子型、すなわち、203番目のアミノ酸がイソロイシン、かつ、257番目のアミノ酸がロイシンである特徴を有する I203/L257-SpaA 型であった。1990年から2006年にかけて分離されたクラスターIIに属する6株は195番目のアミノ酸がアラニン、かつ、257番目のアミノ酸がイソロイシンの I203/I257-SpaA 型であり、Fujisawa 株とは異なる特徴が認められた。また、2007年以降に分離された株が主体を成すクラスターIVに属する21株は、近年の国内臨床分離株に特徴的とされる M203/I257-SpaA 型であった。しかしながら、*spaA* タイピングでは、クラスターIVに属する株の中でも、2004年以前に分離された株で構成されるクラスターIVa と近年の流行株で構成されるクラスターIVb とを区別できなかった。

M203/I257-SpaA 型菌が海外で分離されているかを調べるため、NCBI のデータベースに登録されている血清型 1a 型の中国株 76 株の *spaA* 配列を解析した。その結果、66 株は M203/I257-SpaA 型、8 株は I203/I257-SpaA 型であり、弱毒生ワクチンの 2 株は Koganei 株と同じ遺伝子型であった（表 3-4）。このうち、M203/I257-SpaA 型の GXBY-1 株は、国内流行株のうち、本州型の亜集団と同様にクラスターIVb-2 に分類されることが第二章で行った系統解析により確認されている。一方、I203/I257-SpaA 型の SY1027 株は、クラスターIIに属することから、中国株においても、SpaA 型とクラスター分類には関連性があることが明らかとなった。

また、これらの株以外に、北米北方圏を含む世界各地の家畜及び野生動物から分離された 135 株 [40, 50] を用いて *spaA* タイピングを行ったが、M203/I257-SpaA 型菌は認められなかった（未掲載）。

2. 国内流行株を特異的に検出するマルチプレックス PCR 法の開発と特異性の検証

spaA タイピングでは、2004 年以前に分離された株で構成されるクラスター IVa と近年の流行株で構成されるクラスター IVb とを区別できなかった。そこで、クラスター IVb を特異的に検出し、さらに、その亜集団である IVb-1 と IVb-2 とを識別できる簡易 PCR 法を開発するため、これらの集団に特異的な塩基置換を含む 3 種類のプライマーセット（表 3-2）を設計し、マルチプレックス PCR を行った。その結果、全ゲノム上の塩基置換を利用して系統解析を行った 35 株のうち、クラスター IVb-1 に属する 6 株はプライマーセット①及び②、一方、クラスター IVb-2 に属する 13 株はプライマーセット①及び③でそれぞれ PCR 陽性であった（表 3-5、図 3-1）。これに対し、クラスター I、II、III（Koganei 株）及び IVa に属する計 16 株はすべてのプライマーセットで PCR 陰性であった。このように、本 PCR 法は、クラスター IVb に属する集団株を特異的に検出し、さらに、亜集団を簡便に識別できることが確認された。

本 PCR 法の特異性をさらに検証するため、国内臨床分離株、*Erysipelothrix* 属のすべての血清型参考株及び豚丹毒菌基準株、計 92 株について解析を行った。その結果、血清型 1a 型の M203/I257-SpaA 型菌 17 株のうち、11 株はクラスター IVb-1、6 株はクラスター IVb-2 にそれぞれ型別された（表 3-6）。これに対して、Fujisawa 株、ME-7 株及び血清型 1a 型以外の *Erysipelothrix* 属菌、計 75 株はすべてのプライマーセットで PCR 陰性であった。これらの結果から、本 PCR 法は、血清型 1a 型の国内流行株のみを特異的に検出できることが明らかとなった。

考察

第二章で解析した国内の豚丹毒菌血清型 1a 型の臨床分離株について、全ゲノム上の塩基置換解析に基づき作製された系統樹のクラスター分類は、本章で行った *spaA* タイピングによる結果と関連性が認められ、クラスター I、II 及び IV は、それぞれ、I203/L257-SpaA 型、I203/I257-SpaA 型、M203/I257-SpaA 型に分類された。また、M203/I257-SpaA 型菌が頻繁に見出されるようになった時期と国内で豚丹毒の発生頭数が顕著に増加した時期とがほぼ一致することが判明した。クラスター IV には、2004 年以前に分離された株で構成されるクラスター IVa と近年の流行株で構成されるクラスター IVb が存在するが、*spaA* タイピング法では、これらの集団が区別されないことが判明した。これに対し、本章の研究で開発したマルチプレックス PCR 法は、クラスター IVb に属する現在の国内流行株を特異的に検出するだけでなく、亜集団、すなわち、IVb-1 (九州型) 及び IVb-2 (本州型) も正確に識別できることから、国内における豚丹毒菌血清型 1a 型菌の全ゲノム解析の簡易代替法として利用できると考えられた。

本 PCR 法による詳細な解析の結果から、2013 年に本州で分離された Hyogo 13-1 株が九州型のクラスター IVb-1 に型別された (表 3-6)。さらに、北海道で分離された 2 株はクラスター IVb-1 及び IVb-2 にそれぞれ型別され (表 3-6)、それらの結果は、全ゲノム上の塩基置換を利用した系統解析によるクラスター分類とも一致することを確認した (未掲載)。以上から、本マルチプレックス PCR 法の特異性が確認されるとともに、九州と本州でそれぞれ出現して進化したと考えられる国内流行株は、他の地域にも伝播していることが示唆された。

spaA タイピングにより、クラスター IVb-2 に属する GXBY-1 株を含む多くの中国株も近年の国内臨床分離株に特徴的とされる M203/I257-SpaA 型であることが明らかとなった。一方、Janßen らの報告 [34] では、菌株の血清型は不明であるが、ドイツを中心とした EU 諸国における M203/I257-SpaA 型菌の分離率は、わずか 2.7% (165 株のうち、4 株) であることが分かっている。また、北米北方圏を含む世界中の家畜及び野生動物から分離された 135 株 [40, 50] には、M203/I257-SpaA 型菌は存在しないことも確認されている。以上のことから、M203/I257-SpaA 型菌の分布は極東アジア地域に特有のものであり、本 PCR

法は、日本国内のみならず、極東アジア地域における豚丹毒菌の疫学解析にも利用できると想定された。

要約

第二章における全ゲノム SNPs 解析を利用した系統解析により、2007 年以降に分離された国内流行株はクラスターIVb に属すること、さらに、九州型 (IVb-1) と本州型 (IVb-2) という 2 種類の亜集団により構成されることが明らかとなった。そこで、本章では、系統解析に基づくクラスター分類と単一遺伝子配列に基づく *spaA* タイピングとの関連性を解析した。次いで、現在の国内流行株の亜集団に特異的な SNPs を利用して、それらの株の識別が可能なマルチプレックス PCR 法を開発し、臨床分離株の遺伝子型を調べた。

国内臨床分離株について *spaA* タイピングを行ったところ、SpaA 型とクラスター分類は一致することが明らかとなった。しかしながら、本法では、M203/I257-SpaA 型菌が属するクラスターIVのうち、2004 年以前に分離された株が属するクラスターIVa とクラスターIVb とを区別できないことが判明した。

国内流行株を識別するマルチプレックス PCR 法は、クラスターIVb、IVb-1 及び IVb-2 の各集団に特異的な SNPs を含む DNA 断片が増幅するように設計した 3 種類のプライマーセットを用いて行った。国内臨床分離株、*Erysipelothrix* 属のすべての血清型参考株及び豚丹毒菌基準株、計 127 株を用いた解析の結果、クラスターIVb に属する 21 株及び血清型 1a 型の M203/I257-SpaA 型菌 15 株は、複数の DNA 断片の増幅が確認され、IVb-1 と IVb-2 が区別された。一方、他の *Erysipelothrix* 属菌 91 株では、DNA 断片の増幅が認められなかった。以上の結果から、本 PCR 法は、血清型の判定及び全ゲノム解析を行わずに血清型 1a 型の国内流行株を検出することが可能であり、亜集団も識別できる簡易かつ高精度な遺伝学的解析法であると考えられた。

本研究により、国内流行株に特徴的な M203/I257-SpaA 型菌が中国でも高率に分離されていることが明らかとなった。本 PCR 法は、クラスターIVb に属する M203/I257-SpaA 型菌を特異的に検出できることから、日本国内だけでなく、極東アジア地域における豚丹毒菌の疫学解析に役立つと期待される。

表 3-1. *spaA* タイピング法に使用したプライマー

プライマー名	プライマー配列 (5'-3')	<i>spaA</i> 遺伝子上の位置
0094F	TCGGCTACAGAAGTTTTATGCAGG	395 - 418
0094R	TGCTACCTTCTTCCAACCCGTAAC	1456 - 1479

表 3-2. 国内流行株を検出するマルチプレックス PCR 法に使用したプライマー

Fujisawa 株の遺伝子番号 (当該遺伝子における SNP の位置)	遺伝子機能	プライマーセット番号： フォワードプライマー配列 ^a (5'-3') 及び リバースプライマー配列 (5'-3')	プロダクト サイズ	標的のクラスター
ERH_0022 (1244)	DNA mismatch repair protein gene (<i>mutL</i>)	プライマーセット①： GGATGTTATATTCTCGCTCAAGGGCCA CTGTTTTGAGTTCATTCACTTCATCCA	1,195 bp	IVb
ERH_0533 (887)	single-stranded DNA-specific exonuclease gene (<i>recJ</i>)	プライマーセット②： AATGACTATCGCAAAGAGCAAGGAAAACGTG ATCATCTTGCGTCACCGCAACACGACGTGA	851 bp	IVb-1
ERH_0655 (915)	UDP-N-acetylmuramoyl- tripeptide-D-alanyl-D-alanine ligase gene (<i>murF</i>)	プライマーセット③： TAAATCATGTAGCATTAACGTCTCAGC CCATCTTTACCGATGTATAAGGGTACA	574 bp	IVb-2

^a 標的のクラスターに属する株に特異的な SNP 配列は赤色、人工的に導入したミスマッチ塩基は緑色で示す。

表 3-3. 第二章で系統解析を行った豚丹毒菌国内臨床分離株 36 株における *spaA* タイピング結果

株名	分離年/ 開発年 ^a	クラスター ^b	SpaA の各アミノ酸の位置における SNP プロファイル ^c				
			185	195	203	242	257
Fujisawa	1972 以前		Pro (CCC)	Asp (GAT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Leu (CTT)
Koganei 65-0.15	1974	III	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Chiba 90	1990	II	Pro (CCC)	Ala (GCT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Chiba 91	1991	I	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Leu (CTT)
Saitama 91	1991	I	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Leu (CTT)
Chiba 92A	1992	I	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Leu (CTT)
Chiba 92B	1992	II	Pro (CCT)	Ala (GCT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Chiba 93	1993	I	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Leu (CTT)
Saitama 94	1994	IVa	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Kanagawa 95	1995	I	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Leu (CTT)
Nagano 98	1998	I	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Leu (CTT)
Mie 99	1999	II	Pro (CCC)	Ala (GCT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Akita 00	2000	II	Pro (CCC)	Ala (GCT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Saitama 01	2001	I	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Leu (CTT)
Okinawa 04	2004	II	Pro (CCC)	Ala (GCT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Mie 04	2004	IVa	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Saitama 06	2006	II	Pro (CCC)	Ala (GCT)	Ile (ATT)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Aichi 07	2007	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Aichi 08A	2008	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Aichi 08B	2008	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Gunma 08	2008	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Gunma 09	2009	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Ibaraki 09	2009	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Chiba 09	2009	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Aomori 09	2009	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Yamanashi 10	2010	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)

Gifu 10	2010	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Nagasaki 11A	2011	IVb-1	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Nagasaki 11B	2011	IVb-1	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Nagasaki 11C	2011	IVb-1	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Kagoshima 11A	2011	IVb-1	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Kagoshima 11B	2011	IVb-1	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Miyazaki 11	2011	IVb-1	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Aomori 11A	2011	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Asp (GAT)	Ile (ATT)
Aomori 11B1	2011	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Glu (GAG)	Ile (ATT)
Aomori 11B2	2011	IVb-2	Pro (CCC)	Asp (GAT)	Met (ATG)	Asp (GAT)	Ile (ATT)

^a 生ワクチン株である Koganei 65-0.15 株は開発年を示す。

^b クラスター分類は第二章で行った全ゲノム SNPs を利用した系統解析に基づく。

^c Fujisawa 株と比較して、異なるアミノ酸及び塩基を赤字で示す。

Ala: アラニン、Asp: アスパラギン酸、Glu: グルタミン酸、Ile: イソロイシン、Leu: ロイシン、Met: メチオニン、Pro: プロリン。

表 3-4. 血清型 1a 型の中国株 76 株の SpaA 型

SpaA 型	株数	備考
M203/I257-SpaA	66	GXBY-1 株を含む
I203/I257-SpaA	8	SY1027 株を含む
その他	2	

表 3-5. 豚丹毒菌国内臨床分離株 35 株におけるマルチプレックス PCR 法の特異性の解析結果

クラスター ^a	株数	PCR の結果			備考
		プライマー セット①	プライマー セット②	プライマー セット③	
I	7	− ^b	−	−	I203/L257-SpaA 型
II	6	−	−	−	I203/I257-SpaA 型
III	1	−	−	−	Koganei 65-0.15 株
IVa	2	−	−	−	M203/I257-SpaA 型
IVb-1	6	+ ^c	+	−	M203/I257-SpaA 型
IVb-2	12	+	−	+	M203/I257-SpaA 型

^a クラスター分類は、第二章で行った全ゲノム SNPs を利用した系統解析に基づく。

表3-6. 豚丹毒菌国内臨床分離株及び *Erysipelothrix* 属菌血清型参考株のマルチプレックスPCR法による解析結果

株名 ^a	血清型	分離年	由来	PCRの結果		
				プライマー セット①	プライマー セット②	プライマー セット③
<i>E. rhusiopathiae</i>						
Kumamoto 13-1	1a ^b	2012	豚	+	+	-
Kagoshima 13-8	1a	2012	豚	+	+	-
Kagoshima 13-9	1a	2012	豚	+	+	-
Kagoshima 13-10	1a	2012	豚	+	+	-
Kagoshima 13-11	1a	2012	豚	+	+	-
Kagoshima 13-15	1a	2011	豚	+	+	-
Kagoshima 13-17	1a	2013	豚	+	+	-
Kagoshima 13-20	1a	2011	豚	+	+	-
Hokkaido 13A	1a	2013	豚	+	+	-
Hyogo 13-1	1a	2013	豚	+	+	-
Fukuoka 13-1	1a	2013	豚	+	+	-
Chiba 12-1	1a	2012	豚	+	-	+
Ibaraki 12-1	1a	2012	豚	+	-	+
Fukui 12-1	1a	2012	豚	+	-	+
Niigata 12-3	1a	2012	豚	+	-	+
Niigata 13-4	1a	2013	豚	+	-	+
Hokkaido 14A	1a	2014	豚	+	-	+
Chiba 93-87	1b	1993	豚	-	-	-
Nagano 00-1	1b	1999	豚	-	-	-
Nagasaki 02-18	1b	2002	豚	-	-	-
Tokyo 03-2	1b	2002	豚	-	-	-
Oita 03-19	1b	2002	豚	-	-	-
Ishikawa 04-1	1b	2003	豚	-	-	-
Niigata 10-16	1b	2010	豚	-	-	-
Mie 11-5	1b	2010	豚	-	-	-
Kagoshima 13-22	1b	2012	豚	-	-	-
Niigata 13-5	1b	2013	豚	-	-	-
Niigata 94-2	2	1994	豚	-	-	-
Iwate 95-4	2	1995	豚	-	-	-
Mie 02-10	2	2000	豚	-	-	-
Osaka 02-2	2	2002	豚	-	-	-
Toyama 02-2	2	2002	豚	-	-	-
Tochigi 02-1	2	2002	豚	-	-	-
Yamanashi 04-1	2	2004	豚	-	-	-
Ishikawa 04-21	2	2004	豚	-	-	-
Niigata 05-1	2	2003	豚	-	-	-
Ishikawa 07-4	2	2004	豚	-	-	-

Saitama 08-256	2	2008	豚	—	—	—
Niigata 10-12	2	2008	豚	—	—	—
Tottori 10-42	2	2010	豚	—	—	—
Mie 11-1	2	2009	豚	—	—	—
Nagano 11-2	2	2011	豚	—	—	—
Niigata 12-8	2	2012	豚	—	—	—
Kagoshima 13-1	2	2005	豚	—	—	—
Kagoshima 13-18	2	2012	豚	—	—	—
Kanagawa 13-A1	2	2009	豚	—	—	—
Hokkaido 13-B	2	2013	豚	—	—	—
Hokkaido 14-B	2	2012	豚	—	—	—
Ibaraki 09-4	5	2009	豚	—	—	—
Kanagawa 13-Y4	5	2013	豚	—	—	—
Kanagawa 13-Y2	6	2012	豚	—	—	—
Mie 13-14	11	2012	豚	—	—	—
Niigata 05-67	15	2004	豚	—	—	—
Aichi 12-1	19	2012	豚	—	—	—
Mie 02-47	N	1999	豚	—	—	—
Ishikawa 02-26	N	1999	豚	—	—	—
Ehime 02-38	N	2002	豚	—	—	—
Yamanashi 04-44	N	2003	豚	—	—	—
Mie 09-19	型別不能	2009	豚	—	—	—
Fujisawa	1a	1972 以前	豚	—	—	—
ME-7*	1a	不明	不明	—	—	—
422/1E*	1b	1958	豚	—	—	—
R32E11*	2	不明	不明	—	—	—
NF4E1*	2	1958	豚	—	—	—
ATCC 19414 ^T	2	不明	豚	—	—	—
Doggerscharbe*	4	1958	魚	—	—	—
Pécs 67*	5	1970	豚	—	—	—
Tuzok*	6	1970	ノガン	—	—	—
Goda*	8	1970	オグロシギ	—	—	—
Kaparek*	9	1962	魚	—	—	—
14B	9	1987	養豚場の土	—	—	—
IV.12/8*	11	1964	豚	—	—	—
Pécs 9*	12	1970	豚	—	—	—
Pécs 3597*	15	1971	豚	—	—	—
Tanzania*	16	1973	オウム	—	—	—
545*	17	1971	豚	—	—	—
2017*	19	1972	豚	—	—	—
Bãno 36*	21	不明	洗羊液	—	—	—
CJPT-97*	23	不明	豚	—	—	—
MEW22*	N	1958	不明	—	—	—

<i>E. tonsillarum</i>						
Wittling*	3	不明	魚	—	—	—
P-43*	7	1960	魚	—	—	—
Lengyel-P*	10	不明	リス	—	—	—
Iszap-4*	14	1970	動物園の水たまりの泥	—	—	—
2553*	20	1975	豚	—	—	—
Bãno 107*	22	不明	洗羊液	—	—	—
CJSF 14-2*	24	不明	海棲魚	—	—	—
KS20A*	25	不明	豚に付着した泥	—	—	—
L136*	26	不明	豚に付着した泥	—	—	—
<i>Erysipelothrix</i> sp.-1						
Pécs 56*	13	1970	豚	—	—	—
<i>Erysipelothrix</i> sp.-2						
715*	18	1971	豚	—	—	—
2179	10	1977	豚に付着した泥	—	—	—

^a 血清型参考株及び豚丹毒菌基準株は、株名の後に*または^Tをそれぞれ付して示す。

^b Fujisawa 株及び ME-7 株以外の血清型 1a 型菌は、M203/I257-SpaA 型である。

N 型は型特異的な抗原を欠く。

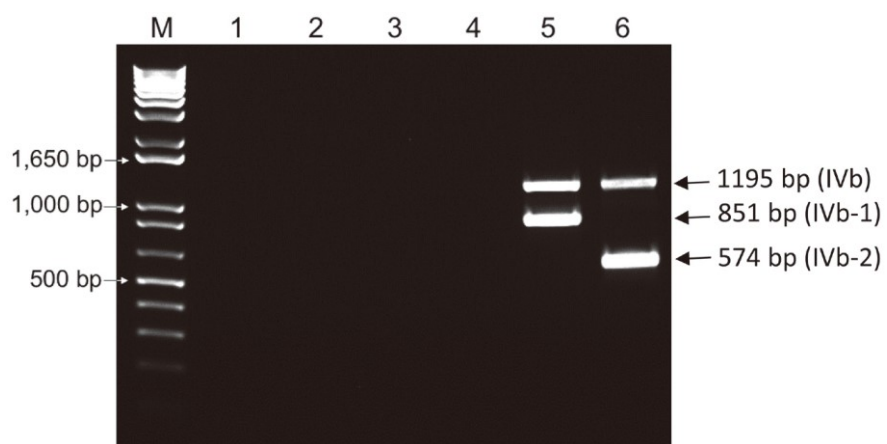


図 3-1. マルチプレックス PCR の電気泳動像

レーン番号はそれぞれ以下の菌株を示す。1: Nagano 98 株 (クラスターI)、2: Akita 00 株 (II)、3: Koganei 株 (III)、4: Saitama 94 株 (IVa)、5: Miyazaki 11 株 (IVb-1)、6: Gifu 10 株 (IVb-2)。M は、分子サイズマーカー (1Kb plus DNA Ladder、Invitrogen) を示す。

総括

豚丹毒菌は豚に敗血症、菱形疹、関節炎及び心内膜炎等を引き起こし、世界中の養豚産業に甚大な損害を与えている病原体である [1, 6, 7]。わが国の養豚における豚丹毒の発生頭数は 2008 年から増加傾向を示したが [10]、その詳しい要因は分かっていない。本症の予防として、現在、弱毒生ワクチンと不活化ワクチンの両方が使用されており、このうち、弱毒生ワクチンには、アクリフラビン色素に耐性を有する血清型 1a 型の Koganei 株を用いている [18]。これまで、慢性型豚丹毒を発症した豚から Koganei 株に類似したアクリフラビン色素耐性株が高頻度で分離されていることから、生ワクチン株が慢性型豚丹毒を引き起こすことが指摘されてきた [8, 9, 19-21]。しかしながら、アクリフラビン色素に自然耐性を有する野生株が見つまっていることから、慢性型を発症した豚から分離される臨床分離株が Koganei 株なのか、あるいは野生株なのかを識別することは困難である [8, 9, 19, 21]。Koganei 株を識別する遺伝学的解析法として、これまで、Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 法 [8]、Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 法 [20] 及び *spaA* 高度変異領域の比較解析 (*spaA* タイピング) [21] が行われてきたが、いずれも確実とは言えず、また、簡便な方法でもない。したがって、Koganei 株をはじめ、国内で流行している株の高精度な識別法の開発が不可欠である。本研究では、このような高精度の識別法の開発を目指した。

第一章では、Koganei 株を確実に識別できる簡易 PCR 法を開発を行った。全ゲノム解析によりこの株に特異的な塩基置換を同定し、その配列を含む DNA 断片のみが増幅するように PCR プライマーを設計した。開発した PCR 法を用いて、生ワクチンを使用した農場で慢性型豚丹毒を発症した豚から分離された 155 株について遺伝子型を解析した結果、101 株 (65.2%) が Koganei 株であると判明した。さらに、Koganei 株と同定されたこれら 101 株のうち、4 株 (3.9%) は、アクリフラビン色素に対して感受性を示すことが判明した。以上の結果から、国内で慢性型豚丹毒を発症した豚から分離される株の半数以上は Koganei 株であり、その一部はこれまでワクチンマーカーとされてきたアクリフラビン色素耐性を消失していることが明らかになった。したがって、Koganei 株に代わる安全な生ワクチンの開発が必要であり、現在、実用化に向けた研究が行われている [54]。

第二章では、国内の急性型豚丹毒の症例から分離される菌株について遺伝学的解析を行った。豚の急性型豚丹毒において、分離される豚丹毒菌の血清型は 1a 型が大多数を占める [1, 6-9]。そこで、国内で急性型豚丹毒を発症した豚から分離された血清型 1a 型菌が Koganei 株から派生したものであるのか、また、これらの臨床分離株間に遺伝学的関連性があるのかを明らかにするために、1990 年から 2011 年の間に（重）急性型豚丹毒を発症した豚から分離された菌株を解析した。まず、染色体 DNA の制限酵素消化パターンを解析する PFGE 法による解析を行ったところ、これらの臨床分離株は Koganei 株とは異なる DNA バンドパターンを示すこと、また、これらの株間において、菌株の分離年、分離された地域及び DNA バンドパターンの間に関連性は無いことが明らかとなった。また、解析した臨床分離株のゲノム上に確認されたプロファージ解析では、その配列のサイズやゲノム上の挿入位置が多くの株で同一であったことから、プロファージの存在が本菌の進化やゲノムの多様性に与える影響は小さいことが示唆された。本菌では、コアゲノムの高頻度な組換えが起きていることが報告されている [50]。したがって、PFGE 法における DNA バンドパターンの違いは、プロファージの存在ではなく、染色体再編の結果であり、本法は豚丹毒菌の遺伝学的解析法として適当でないと考えられた。

次に、より高精度な方法として、全ゲノム上の塩基置換を利用した系統解析を行った。その結果、国内臨床分離株は、互いに近縁であり北米・ヨーロッパ分離株とは遺伝的に離れていること、また、Koganei 株（クラスター III）とは異なる 3 つの集団（クラスター I・II・IV）に分類されることが明らかとなった。このうち、クラスター IV は、2004 年以前に分離された株で構成されるクラスター IVa と 2007 年以降に分離された株で構成されるクラスター IVb に区別され、さらに、クラスター IVb のうち、九州で分離された株はクラスター IVb-1、本州で分離された株はクラスター IVb-2 に分類された。一方、中国で分離された 2 株は、クラスター II 及び IVb-2 にそれぞれ分類されたことから、これらの株と国内分離株は共通の祖先から進化したと考えられた。以上の結果から、近年、国内で急性型豚丹毒の発生が増加した要因として、生ワクチン株である Koganei 株ではなく、クラスター IVb に属する株による感染が関係していると考えられた。また、中国でも同じクラスターに属する株が高率に分離されていることから、極東アジア地域において遺伝的に近縁の強毒株集団が流行していることが示唆された。しかしながら、国内株と中国株の疫学的な接点は未解明で

ある。豚丹毒の宿主域は極めて広いため、多くの野生動物、特に渡り鳥を介した伝播を否定できないと考えられた。

第三章では、第二章で系統解析を実施した国内臨床分離株について単一遺伝子配列を利用した *spaA* タイピングを行い、その結果と全ゲノム上の塩基置換を利用した系統解析に基づくクラスター分類との関連性を解析した。さらに、現在の国内流行株クラスターを識別できる簡易手法を開発した。*spaA* タイピング法を用いた解析の結果、近年、国内で急性型症例から分離される血清型 1a 型菌において、203 番目のアミノ酸がメチオニン、257 番目のアミノ酸がイソロイシン (M203/I257-SpaA) という特徴的な遺伝子配列を有する臨床分離株の報告が増加している [22, 23]。クラスター I、II 及び IV に分類される国内臨床分離株について *spaA* タイピングを行った結果、クラスター I は I203/L257-SpaA 型、クラスター II は I203/I257-SpaA 型、また、クラスター IV は M203/I257-SpaA 型であった。しかし、*spaA* タイピングでは、クラスター IV において、2007 年以降の分離株で構成されるクラスター IVb と 2004 年以前の分離株で構成されるクラスター IVa が区別できないことが判明した。そこで、現在の国内流行株の亜集団である IVb-1 及び IVb-2 に特異的な SNPs を検出するマルチプレックス PCR 法を開発を行い、臨床分離株及び血清型参考株について遺伝子型を判定した。その結果、本マルチプレックス PCR 法は、現在国内で流行している血清型 1a 型の M203/I257-SpaA 型菌のみを検出し、同時に IVb-1 と IVb-2 も識別したことから、全ゲノム解析の簡易代替法として利用できると考えられた。さらに、この手法は、国内流行株の伝播経路の解明や臨床分離株と野生動物及び環境中に存在する菌株との遺伝的関連性の解析に利用できると考えられる。

本研究により、2008 年以降に豚丹毒の発生が顕著に増加した要因として、クラスター IVb に属する、特定の遺伝子型を有する株の流行が原因であると明らかになった。この流行株に対し、現在のワクチンは有効であると報告されており [23]、本症の予防には、ワクチン接種率を向上することが重要であると考えられた。豚丹毒菌は健康豚の扁桃からも分離されるため、発生が終息した後も農場内に菌が存在していると推定される。したがって、病原体の侵入を防ぐだけでなく、豚にストレスを与えないような飼養管理を行う必要がある。

謝辞

本論文を終えるにあたり、御校閲賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科 中山裕之教授、関崎勉教授、平山和宏教授、芳賀猛教授及び内田和幸准教授に深甚の謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、常に懇切な御指導とご助言を賜りました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 下地善弘博士、小川洋介博士、江口正浩博士をはじめ、先輩諸氏及び同僚諸氏、また、当部門の病性鑑定特殊講習会に参加された地方自治体の研修生に深謝いたします。

引用文献

1. Opriessnig T, Wood RL. Erysipelas. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, eds. *Diseases of Swine*. 10th ed. Ames: Blackwell Publishing Professional; 750-759, 2012.
2. Takahashi T, Fujisawa T, Tamura Y, Suzuki S, Muramatsu M, Sawada T, Benno Y, Mitsuoka T: DNA relatedness among *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains representing all twenty-three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. *Int J Syst Bacteriol* **42**: 469-473, 1992.
3. Verbarg S, Rheims H, Emus S, Frühling A, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E, Schumann P: *Erysipelothrix inopinata* sp. nov., isolated in the course of sterile filtration of vegetable peptone broth, and description of *Erysipelotrichaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 221-225, 2004.
4. Bang BH, Rhee MS, Chang DH, Park DS, Kim BC: *Erysipelothrix larvae* sp. nov., isolated from the larval gut of the rhinoceros beetle, *Trypoxylus dichotomus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Antonie Van Leeuwenhoek* **107**: 443-451, 2015.
5. Takahashi T, Fujisawa T, Umeno A, Kozasa T, Yamamoto K, Sawada T: A taxonomic study on *Erysipelothrix* by DNA-DNA hybridization experiments with numerous strains isolated from extensive origins. *Microbiol Immunol* **52**: 469-478, 2008.
6. Brooke CJ, Riley TV: *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J Med Microbiol* **48**: 789-799, 1999.
7. Wang Q, Chang BJ, Riley TV: *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Vet Microbiol* **140**: 405-417,

2010.

8. Imada Y, Takase A, Kikuma R, Iwamaru Y, Akachi S, Hayakawa Y: Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. *J Clin Microbiol* **42**: 2121-2126, 2004.
9. Ozawa M, Yamamoto K, Kojima A, Takagi M, Takahashi T: Etiological and biological characteristics of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated between 1994 and 2001 from pigs with swine erysipelas in Japan. *J Vet Med Sci* **71**: 697-702, 2009.
10. 農林水産省 消費・安全局動物衛生課：監視伝染病の発生状況
(http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html)
2019年10月10日閲覧
11. Kutz S, Bollinger T, Branigan M, Checkley S, Davison T, Dumond M, Elkin B, Forde T, Hutchins W, Niptanatiak A, Orsel K: *Erysipelothrix rhusiopathiae* associated with recent widespread muskox mortalities in the Canadian Arctic. *Can Vet J* **56**: 560-563, 2015.
12. Shimoji Y, Yokomizo Y, Sekizaki T, Mori Y, Kubo M: Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. *Infect Immun* **62**: 2806-2810, 1994.
13. Shi F, Harada T, Ogawa Y, Ono H, Ohnishi-Kameyama M, Miyamoto T, Eguchi M, Shimoji Y: Capsular polysaccharide of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, and its modification with phosphorylcholine. *Infect Immun* **80**: 3993-4003, 2012.

14. Shimoji Y, Yokomizo Y, Mori Y: Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. *Infect Immun* **64**: 1789-1793, 1996.
15. Shimoji Y, Mori Y, Sekizaki T, Shibahara T, Yokomizo Y: Construction and vaccine potential of acapsular mutants of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: use of excision of Tn916 to inactivate a target gene. *Infect Immun* **66**: 3250-3254, 1998.
16. Harada T, Ogawa Y, Eguchi M, Shi F, Sato M, Uchida K, Nakayama H, Shimoji Y: Phosphorylcholine and SpaA, a choline-binding protein, are involved in the adherence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* to porcine endothelial cells, but this adherence is not mediated by the PAF receptor. *Vet Microbiol* **172**: 216-22, 2014.
17. Borrathybay E, Gong FJ, Zhang L, Nazierbieke W: Role of surface protective antigen A in the pathogenesis of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain C43065. *J Microbiol Biotechnol* **25**: 206-216, 2015.
18. 瀬戸健次, 西村豊, 藤木正之, 畦地速見, 鈴木勝夫: アクリフラビン耐性弱毒菌の研究
マウスにおける関節炎発生能と豚における免疫原性との関係. *日本獣医学雑誌* **33**:
161-171, 1971.
19. Makino S, Ishizaki H, Shirahata T, Fujiwara S, Sawada T: Isolation of acriflavine resistant *Erysipelothrix rhusiopathiae* from slaughter pigs in Japan. *J Vet Med Sci* **60**:
1017-1019, 1998.
20. Sawada T, Hassanein R, Takahashi E, Ando S, Entomack B, Kataoka Y, Takagi M,
Yamamoto K, Kojima A: Pathogenic and genetic characterization of acriflavine resistant
Erysipelothrix isolates from arthritic pigs. *J Vet Epidemiol* **10**: 21-28, 2006.

21. Nagai S, To H, Kanda A: 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, 2008.
22. To H, Sato H, Tazumi A, Tsutsumi N, Nagai S, Iwata A, Nagano T: Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from recent swine erysipelas outbreaks in Japan. *J Vet Med Sci* **74**: 949-953, 2012.
23. Uchiyama M, Yamamoto K, Ochiai M, Yamamoto T, Hirano F, Imamura S, Nagai H, Ohishi K, Horiuchi N, Kijima M: Prevalence of Met-203 type *spaA* variant in *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolates and the efficacy of swine erysipelas vaccines in Japan. *Biologicals* **42**: 109-113, 2014.
24. Bakker HC, Switt AI, Cummings CA, Hoelzer K, Degoricija L, Rodriguez-Rivera LD, Wright EM, Fang R, Davis M, Root T, Schoonmaker-Bopp D, Musser KA, Villamil E, Waechter H, Kornstein L, Furtado MR, Wiedmann M: A whole-genome single nucleotide polymorphism-based approach to trace and identify outbreaks linked to a common *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Montevideo pulsed-field gel electrophoresis type. *Appl Environ Microbiol* **77**: 8648-8655, 2011.
25. Gopaul KK, Sells J, Bricker BJ, Crasta OR, Whatmore AM: Rapid and reliable single nucleotide polymorphism-based differentiation of *Brucella* live vaccine strains from field strains. *J Clin Microbiol* **48**: 1461-1464, 2010.
26. Huijsmans CJ, Schellekens JJ, Wever PC, Toman R, Savelkoul PH, Janse I, Hermans MH: Single-nucleotide-polymorphism genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q fever outbreak in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* **77**: 2051-2057, 2011.

27. Kuroda M, Serizawa M, Okutani A, Sekizuka T, Banno S, Inoue S: Genome-wide single nucleotide polymorphism typing method for identification of *Bacillus anthracis* species and strains among *B. cereus* group species. *J Clin Microbiol* **48**: 2821-2829, 2010.
28. Van Ert MN, Easterday WR, Simonson TS, U'Ren JM, Pearson T, Kenefic LJ, Busch JD, Huynh LY, Dukerich M, Trim CB, Beaudry J, Welty-Bernard A, Read T, Fraser CM, Ravel J, Keim P: Strain-specific single-nucleotide polymorphism assays for the *Bacillus anthracis* Ames strain. *J Clin Microbiol* **45**: 47-53, 2007.
29. Li H, Durbin R: Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**: 1754-1760, 2009.
30. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Subgroup, G. P. D. P.: The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078-2079, 2009.
31. Nakamura A, Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Kajimura M, Soya Y, Hishida A: Determination of mutations of the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori* by allele specific primer-polymerase chain reaction method. *J Gastroenterol Hepatol* **22**: 1057-1063, 2007.
32. Ojima T, Hirano K, Honda K, Kusumoto M: Development of a multiplex PCR assay for rapid virulence factor profiling of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from cattle. *J Microbiol Methods* **128**: 31-33, 2016.
33. Opriessnig T, Hoffman LJ, Harris DL, Gaul SB, Halbur PG: *Erysipelothrix rhusiopathiae*: genetic characterization of Midwest US isolates and live commercial vaccines using pulsed-field gel electrophoresis. *J Vet Diagn Invest* **16**: 101-107, 2004.

34. Janßen T, Voss M, Kühl M, Semmler T, Philipp HC, Ewers C: A combinational approach of multilocus sequence typing and other molecular typing methods in unravelling the epidemiology of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains from poultry and mammals. *Vet Res* **46**: 84, 2015.
35. Okatani AT, Uto T, Taniguchi T, Horisaka T, Horikita T, Kaneko K, Hayashidani H: Pulsed-field gel electrophoresis in differentiation of *Erysipelothrix* species strains. *J Clin Microbiol* **39**: 4032-4036, 2001.
36. Kucsera G: Proposal for standardization of the designations used for serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Migula) Buchanan. *Int J Syst Bacteriol* **23**: 184-188, 1973.
37. Bender JS, Shen HG, Irwin CK, Schwartz KJ, Opriessnig T: Characterization of *Erysipelothrix* species isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine erysipelas outbreaks in the United States. *Clin Vaccine Immunol* **17**: 1605-11, 2010.
38. Takahashi T, Nagamine N, Kijima M, Suzuki S, Takagi M, Tamura Y, Nakamura M, Muramatsu M, Sawada T: Serovars of *Erysipelothrix* strains isolated from pigs affected with erysipelas in Japan. *J Vet Med Sci* **58**: 587-589, 1996.
39. Wood RL, Harrington R: Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine and from soil and manure of swine pens in the United States. *Am J Vet Res* **39**: 1833-1840, 1978.
40. Forde T, Biek R, Zadoks R, Workentine ML, De Buck J, Kutz S, Opriessnig T, Trewby H, van der Meer F, Orsel K: 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, 2016.

41. Ohyama A, Kurokawa K, Enai K, Saitoh H, Kanaya S, Amin MAU, Ogasawara N: Bioinformatics tool for genomic era: a step towards the *in silico* experiments-focused on molecular cloning. *J Comp Aid Chem* **7**:102-115, 2006.
42. Kusumoto M, Fukamizu D, Ogura Y, Yoshida E, Yamamoto F, Iwata T, Ooka T, Akiba M, Hayashi T: Lineage-specific distribution of insertion sequence excision enhancer in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from swine. *Appl Environ Microbiol* **80**: 1394-1402, 2014.
43. Kwok AH, Li Y, Jiang J, Jiang P, Leung FC: Complete genome assembly and characterization of an outbreak strain of the causative agent of swine erysipelas-*Erysipelothrix rhusiopathiae* SY1027. *BMC Microbiol* **14**: 179, 2014.
44. Tang HB, Xie J, Wang L, Liu F, Wu J: Complete genome sequence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strain GXBY-1 isolated from acute swine erysipelas outbreaks in south China. *Genom Data* **8**: 70-71, 2016.
45. Kurtz S, Phillippy A, Delcher AL, Smoot M, Shumway M, Antonescu C, Salzberg SL: Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol* **5**: R12, 2004.
46. Stamatakis A: RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688-2690, 2006.
47. Ogawa Y, Ooka T, Shi F, Ogura Y, Nakayama K, Hayashi T, Shimoji Y: 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, 2011.

48. Kajitani R, Toshimoto K, Noguchi H, Toyoda A, Ogura Y, Okuno M, Yabana M, Harada M, Nagayasu E, Maruyama H, Kohara Y, Fujiyama A, Hayashi T, Itoh T: Efficient de novo assembly of highly heterozygous genomes from whole-genome shotgun short reads. *Genome Res* **24**: 1384-95, 2014.
49. Ohtsubo Y, Ikeda-Ohtsubo W, Nagata Y, Tsuda M: GenomeMatcher: a graphical user interface for DNA sequence comparison. *BMC Bioinformatics* **9**: 376, 2008.
50. Forde TL, Orsel K, Zadoks RN, Biek R, Adams LG, Checkley SL, Davison T, De Buck J, Dumond M, Elkin BT, Finnegan L, Macbeth BJ, Nelson C, Niptanatiak A, Sather S, Schwantje HM, Van Der Meer F, Kutz SJ: Bacterial genomics reveal the complex epidemiology of an emerging pathogen in Arctic and boreal ungulates. *Front Microbiol* **7**: 1759, 2016.
51. Fischetti VA. Surface proteins on Gram-positive bacteria. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Rood JI, eds. *Grampositive pathogens*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press; 12-25, 2006.
52. Smeds L, Künstner A: ConDeTri--a content dependent read trimmer for Illumina data. *PLoS One* **6**: e26314, 2011.
53. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA: SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* **19**: 455-77, 2012.

54. Shimoji Y, Ogawa Y, Tsukio M, Shiraiwa K, Nishikawa S, Eguchi M: Genome-wide identification of virulence genes in *Erysipelothrix rhusiopathiae*: Use of a mutant deficient in a *tagF* homolog as a safe oral vaccine against swine erysipelas. *Infect Immun* **87**: e00673-19, 2019.