

動物実験による *Histophilus somni* 免疫グロブリン結合蛋白質遺伝子改変株の病原性および免疫付与能の評価

星野尾歌織¹⁾, 上野勇一¹⁾, 木村久美子²⁾, 播谷亮²⁾, 田川裕一³⁾

Virulence and vaccine efficacy of the *Histophilus somni* *ibpA* mutant in calves and mice.

Kaori HOSHINO¹⁾, Yuichi UENO¹⁾, Kumiko KIMURA²⁾, Makoto HARITANI²⁾, Yuichi TAGAWA³⁾

背景と目的

Histophilus somni は牛に髄膜脳脊髄炎や肺炎等の様々な疾病を引き起こす病原細菌として知られている。本菌の病原因子や発病機構については長らく未解明であったが、我々は本菌が産生する菌体表面蛋白質のひとつ、高分子量免疫グロブリン結合蛋白質 immunoglobulin binding protein A (IbpA) が、マクロファージ・単球系細胞の貪食機能を阻害することを、*ibpA* 遺伝子のほぼ全領域を欠失させた遺伝子改変株 2336.A1 を用いた実験により見出した¹⁾。さらに、この作用はIbpAによるマクロファージ・単球の細胞骨格形成障害に起因し、またIbpA内に存在する二つのダイレトリピート DR1DR2 領域がその責任領域であることを、*ibpA* 遺伝子の一部を欠失させた種々の改変株および組み換え蛋白質を用いた細胞接種試験によって明らかにした²⁾。マクロファージ・単球は感染防御の初期段階で大きな役割を果たす免疫細胞であり、その機能を抑制し得るIbpAは*H. somni*の感染成立に関わるきわめて重要な病原因子であると考えられる。また、本菌の関与する疾病は日和見・複合感染症としての発生も多く、こうした病態にも本菌のマクロファージ抑制作用による易感染化が関与している可能性がある。これらの可能性を明らかにするためには、*in vitro*の実験に加え、生体内でのIbpAの働きを知るための動物接種による比較試験が必須となる。そこで本研究では、感染モデル動物としてのマウス、および本来の宿主である牛を用いて、肺炎由来の野生株 2336 および 2336 株から貪食抑制機能領

域 DR1DR2 を欠失させて作出した遺伝子改変株 2336: Δ DR1DR2 の定着性や肺炎起病性を比較し、IbpA の病原因子としての重要度の評価を試みた。さらに、DR1DR2 遺伝子改変株の弱毒生ワクチンへの応用の可能性を考え、2336: Δ DR1DR2 株の生菌接種に対して防御免疫が誘導されるか否かの解析を行った。

研究の概要

1. マウス接種試験による 2336: Δ DR1DR2 株の病原性および免疫付与能の評価

ibpA 遺伝子改変株 2336: Δ DR1DR2 およびその親株である野生株 2336 をマウスに経鼻接種し、病原性や定着性の比較と免疫付与能の解析を行うことにより、牛感染試験のための予備的な情報を得るとともに、*H. somni* 感染モデルとしてのマウス利用の可能性を検討した。

1) 2336: Δ DR1DR2 株および野生株のマウスにおける呼吸器定着性の比較

マウス (ICR, メス, 6~10 週齢) に 2336: Δ DR1DR2 株および 2336 株の生菌懸濁液 (1.0~2.0 × 10⁹CFU/15 μl) を麻酔下で鼻腔内に接種した。接種直後、5 時間後および 24 時間後にそれぞれ、肺および気管を無菌的に採材・ホモジナイズ後に希釈培養して、呼吸器内に生残している菌の数を測定した。

一群 6 匹で 3~4 回の試験を行った結果、いずれの菌株も速やかに排除され、接種直後の分離菌数を 100% とした場合、5 時間後の菌数は 2336 株が 24.3 ± 4.3%, 2336: Δ DR1DR2 株が 26.8 ± 8.9% であり、24 時間後には 2336 株が 0.0035 ± 0.0017%, 2336: Δ DR1DR2 株 0.0058 ± 0.0023% に減少し、両株間に有意差は認められなかった。また、24

1) 農研機構 動物衛生研究所 細菌寄生虫研究領域
2) 農研機構 動物衛生研究所 病態研究領域
3) 農研機構本部 総合企画調整部

時間, 48 時間後の肺と気管の病理組織学的検査では, いずれの群でも化膿性気管支肺炎が認められた。炎症の主体は好中球で, マクロファージの浸潤は軽度から中程度 (24 時間より 48 時間で増加), 免疫染色で好中球・マクロファージともに細胞質内に *H. somni* 抗原が認められた。菌の定着性と同様, 病理組織学的にも群による顕著な違いは認められなかった。

2) 2336: Δ DR1DR2 株によるマウスへの免疫付与能の評価

2336: Δ DR1DR2 株, 2336.A1 株および 2336 株を麻酔下のマウスに鼻腔内接種 ($1.0 \sim 2.0 \times 10^9$ CFU/15 μ l) して免疫し, 14 日後に 2336 株 ($1.0 \sim 2.0 \times 10^9$ CFU/15 μ l) を同様に接種して攻撃した。その後, 上記 1) と同様に呼吸器内に生残していた菌数を測定した。

鼻腔内免疫マウスの肺および気管に生残していた攻撃菌株の菌数は, 攻撃 5 時間後では非免疫群のそれより少ない傾向にあり, 攻撃直後の分離菌数を 100% とした場合, 2336 株免疫マウスで $17.2 \pm 8.5\%$, 2336: Δ DR1DR2 株免疫で $13.5 \pm 5.8\%$, 2336.A1 株免疫で $11.8 \pm 2.5\%$, 非免疫で $24.3 \pm 5.7\%$ であったが, 有意な差異は認められなかった。また, 攻撃 24 時間後のそれは 2336 株免疫で $0.00024 \pm 0.00079\%$, 2336: Δ DR1DR2 株免疫 $0.00092 \pm 0.00077\%$, 2336.A1 株免疫で $0.0038 \pm 0.0037\%$, 非免疫で $0.0035 \pm 0.0018\%$ であり, 2336 株および 2336: Δ DR1DR2 株で免疫したマウスは 2336.A1 株で免疫したマウスより菌がより排除されている傾向にあったが, 有意差は認められなかった。

2. 牛接種試験による 2336: Δ DR1DR2 株の病原性および免疫付与能の評価

宿主動物である牛を用いた 2336: Δ DR1DR2 および 2336 株による呼吸器への感染実験を行い, それぞれの株における病原性の比較と免疫付与能の解析を行った。

1) 2336: Δ DR1DR2 株および野生株の牛における病原性の比較

麻酔下の牛 (ホルスタイン, オス, 2 ヶ月齢, 各群 5 頭) にファイバースコープを用いて 2336: Δ DR1DR2 株または 2336 株 2×10^8 CFU を左肺前葉後部気管支内に接種した。接種後 7 日間, 臨床症状 (体温, 呼吸数, 発咳, 全身状態等をスコア化) を観察して, 7 日目に剖検し, 肺全体に占める肉眼的肺炎病変部の割合および, 各肺葉における分離菌数を測定した。その結果, 2336: Δ DR1DR2 株

接種牛では 2336 株接種牛よりも臨床病状が明らかに軽減していた。また, 肺全体に占める肉眼的肺炎病変の割合も, 2336: Δ DR1DR2 株接種牛では 2336 株接種牛より低かった。肺からの分離菌数は個体間のばらつきが大きく, 両株間で有意差は認められなかったが, 2336: Δ DR1DR2 株接種牛からの分離菌数は 2336 株接種牛よりもやや少なく, 肺内で菌が広がりにくい傾向にあった。これらのことから, 2336: Δ DR1DR2 株は 2336 株よりも病原性が低下していることが示唆された。

2) 2336: Δ DR1DR2 株による牛への免疫付与能の評価

2336: Δ DR1DR2 株を牛の気管支内に 1 回 (2×10^8 CFU) または鼻腔内に 2 回 (1 回目: 1×10^9 CFU, 2 回目 = 13 日後: 5×10^9 CFU), 各 1 頭に接種し, その後の 2336 株全菌体抗原に対する血中 IgG 抗体の推移を ELISA 法で測定した。また, 最初の免疫から 5 週間後に 2336 株 (2×10^8 CFU) を左肺前葉後部気管支内に攻撃接種し, 7 日後に剖検して上記 1) と同様に評価を行った。2336: Δ DR1DR2 株を肺葉気管支内接種した牛の 2336 株全菌体抗原に対する血清 IgG 抗体価 (OD 値) は, 接種前の 0.11 から接種 2 週間後で 0.25, 3 ~ 4 週間後では 0.36 ~ 0.37 に上昇した。また鼻腔内接種牛でも接種前の 0.18 から接種 2 週間後では抗体上昇は認められなかったものの, 接種 3 ~ 4 週間後では 0.35 ~ 0.38 に達しており, 鼻腔内への菌投与でも気管支内投与と同等の IgG 抗体産生が確認された (図 1)。攻撃後の臨床スコアおよび肺病変面積は鼻腔内免疫牛よりも気管支内免疫牛で低く抑えられたが, 今回は各処置一頭ずつの結果であるため, 頭数を増やしての解析が必要と判断された。

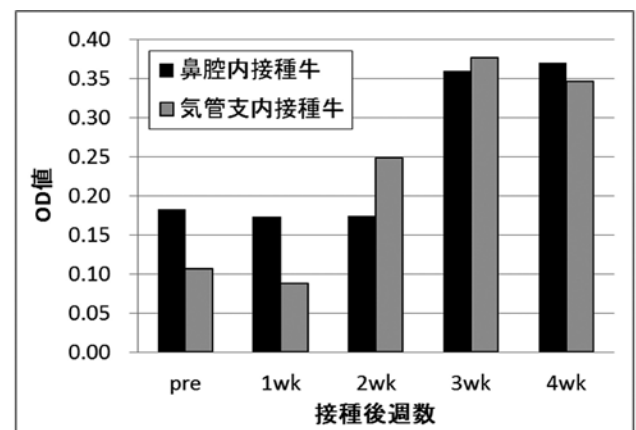


図 1. 2336: Δ DR1DR2 株接種牛における抗 *H. somni* 血中 IgG 抗体の推移

残された課題

マウスを用いた実験では、呼吸器への定着性を菌のクリアランスと比較しようと試みた。しかしながら、マウス肺からの *H. somni* の排除は非常に早く、マウスを感染モデル動物として確立するためには採材時間や接種菌量等について、さらに適した条件を検討する必要があると考えられた。本研究の実験条件下では、マクロファージ機能を抑制しない 2336: Δ DR1DR2 株の方が 2336 株より早く排除されるのではないかと仮説に反し、両株間に有意差は認められなかった。病理組織学的検索の結果からも、感染初期に働くマクロファージ以外の免疫機構、特に好中球による菌の排除が影響しているのではないかと推察されている。培養細胞を用いた *in vitro* の実験では、牛だけでなくマウス由来のマクロファージ系株化細胞でも IbpA の細胞骨格傷害作用による貪食抑制が確認されているが、生体内でも同様の作用があるのかについては、マクロファージだけでなく好中球に対する同様の作用の有無も含めて、今後検討が必要と考える。

IbpA には DR1DR2 領域以外にも防御免疫誘導能を有する領域が同定されており^{3) 4) 5)}、2336: Δ DR1DR2 株ではこの領域は保存されていることから、IbpA のほぼ全域を欠失した 2336.A1 株よりも高い防御免疫誘導能を持つことが考えられる。本研究では明確にそれを示すデータが得られたとは言えないが、生菌免疫マウスにおける攻撃菌の定着性比較においては、有意な差異ではないものの、2336.A1 株よりも 2336: Δ DR1DR2 株による免疫マウスの方が 24 時間後の生残菌数が少なく、2336 株による免疫時に近い傾向を示しており、引き続き検討すべき内容であるものと考えられた。

これらの結果から本研究では、経気道接種後、呼吸器への生残など、マウスを *H. somni* の感染モデル動物として用いるにあたっての予備的なデータは得られたものの、十分な実験条件の確立にまでは至らなかった。今後、他の実験用小動物の利用も考慮に入れ、実験モデル動物作成を目指し検討をしていきたい。

一方、牛を用いた実験では、IbpA の貪食抑制機能領域 DR1DR2 の欠失により、*H. somni* の呼吸器への病原性を低下させることが可能であることが明らかとなった。このことから、DR1DR2 領域は牛体内において *H. somni* の病原因子のひとつとして機能していることが示唆された。

今後の展開としては、弱毒化した 2336: Δ DR1DR2 株をワクチン株に応用することが考えられるが、そのためには、さらに実験条件や評価項目を検討し、有効な防御

免疫付与能の実証が必要となる。前述の通り、IbpA には DR1DR2 領域以外にも防御免疫誘導能を有する領域があり、組換え IbpA フラグメントの投与によって、牛に *H. somni* に対する免疫防御能を付与できることが確認されている^{3) 4) 5)}。今回、牛を用いた免疫試験では、抗体応答は認められたものの、野生株での攻撃に対する防御効果については十分なデータが得られておらず、誘導された抗体の認識する抗原の解析等も含め、更なるデータの蓄積が必要である。

Histophilus somni による疾病は、急性経過での死亡例が多い髄膜脳脊髄炎や混合感染により重篤化若しくは長期化する肺炎など、大きな経済的損失を招くものであるため、予防対策が重要視されている。そのため現在、不活化ワクチンが使用されているが、死亡に至るような重篤な副反応の報告もあり、また当該ワクチンは筋肉内投与のため本菌の侵入門戸である粘膜面への免疫誘導は難しく、感染自体の防御は期待できない。より高い防御効果を付与しつつも副反応のリスクが低減された新たなワクチン開発を考えるならば、簡便な経鼻投与で粘膜免疫を誘導可能な弱毒生ワクチンの開発が渴望される。本研究の結果をもとに、今後も有効な弱毒生ワクチン株の作出を目指す予定である。

謝 辞

本研究は平成 22～23 年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施したものである。

引用文献

- 1) Hoshinoo, K., Sasaki, K., Tanaka, A., Corbeil, L.B., Tagawa, Y.: Virulence attributes of *Histophilus somni* with a deletion mutation in the *ibpA* gene. *Microb. Pathog.* 46(5), 273-282. (2009).
- 2) 星野尾歌織, 上野勇一, 田川裕一: *Histophilus somni* の免疫グロブリン結合蛋白質によるマクロファージ細胞骨格形成傷害作用の遺伝学的解析. *動衛研研究報告* .118, 65-68. (2012).
- 3) Tagawa, Y., Sanders, J.D., Uchida, I., Bastida-Corcuera, F.D., Kawashima, K., Corbeil, L.B.: Genetic and functional analysis of *Haemophilus somnus* high molecular weight-immunoglobulin binding proteins. *Microb. Pathog.* 39, 159-70. (2005).
- 4) Geertsema, R.S., Zekarias, B., Scheuch, L.L., Worby, C., Russo, R., Gershwin, L.J., Herdman, D.S., Lo, K., Corbeil, L.B.: IbpA DR2 subunit immunization

- protects calves against *Histophilus somni* pneumonia. Vaccine. 29(29-30), 4805-12. (2011).
- 5) Lo, K.L., Kimball, R.A., Lehmann, J., Gershwin, L.J., Worby C, Corbeil, L.B.: Antibody responses of calves to *Histophilus somni* recombinant IbpA subunits. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 35(5):453-9. (2012).