

学位論文題名

Development of New Typing Methods of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Based on the Genetic Diversity of the Protective Outer Membrane lipoprotein

(*Actinobacillus pleuropneumoniae* の感染防御抗原である外膜リポタンパク質の遺伝的多様性を利用した新しい型別法の開発)

学位論文内容の要旨

Actinobacillus pleuropneumoniae は、線維素性出血性肺炎を主徴とする豚の胸膜肺炎の原因菌である。本菌の血清型は、主に莢膜多糖及びリポ多糖の抗原性で規定されていると考えられており、現在までに 15 の血清型が報告されている。豚の胸膜肺炎は世界各国で多発し、養豚産業に甚大な被害を与えているが、国、地域及び農場によって流行している *A. pleuropneumoniae* の血清型は異なる。日本では血清型 2 が高頻度に分離され、次いで血清型 1 が多く、その他の血清型も少数ながら分離されているが、血清型 4、10 や世界的にも分離報告例の少ない血清型 13~15 の分離報告はない。

現在、血清型別の検査には全菌体を免疫して作製したポリクローナルな抗血清が主に使用されている。しかし、全ての型別用抗血清を所有している検査機関は少ない。さらに検査法によっては、いくつかの血清型間で交差反応がしばしば認められ、正確な型別ができない場合がある。その原因は、使用する免疫血清が *A. pleuropneumoniae* に共通する様々な抗原に対する抗体を含有するためと考えられ、さらに、これら様々な抗原の菌株ごとの発現量の違いも、型別成績に影響を与えると考えられる。また、本病の予防対策に使用される不活化全菌体ワクチンの効果は、血清型に依存するとされるが、血清型が感染防御抗原型を反映するものではない。そのために、共通抗原の影響を受けない予防対策に有効な新しい型別法の開発が望まれる。従って、ある特定の単一の抗原及びその遺伝子を利用した抗原型別法を開発すれば、共通抗原等の影響を受けずに従来の血清型別法よりも正確な型別が可能であると考えられる。

さらに型別用抗原が感染防御抗原であれば、新しく開発した抗原型別法は、豚の胸膜肺炎の制御及び疫学解析を行なう際に直接有効で実用的な方法であると言える。そこで、*A. pleuropneumoniae* の感染防御抗原である特定の抗原及びその遺伝子を利用した新しい抗原型別法の開発を目的として、一連の研究を行なった。

いくつかの細菌種の感染防御抗原である外膜タンパク質には、遺伝的多様性がある事が報告されている。著者は、*A. pleuropneumoniae* に存在する遺伝的多様性を持った外膜タンパク質及びその遺伝子が、本菌の型別に利用する抗原及び遺伝子に適すると考え、まず本菌の野外株 (NG-8 株、血清型 5a) 実験感染豚から得られた抗血清を用いて、NG-8 株の外膜タンパク質遺伝子の分子クローニングを試みた。その結果、クローニングした遺伝子は、その性状解析結果から、分子量約 43,000Da の外膜リポタンパク質(outer membrane lipoprotein)をコードする事が判明し、そのタンパク質を OmlA、また遺伝子を *omlA* と名付けた。

組換え OmlA をマウスに免疫し、感染防御試験を行った結果、有意な死亡阻止効果が認められたので、OmlA を感染防御抗原と同定した。OmlA 及び *omlA* が本菌の抗原型別法に利用可能な抗原及び遺伝子であるためには、これらが *A. pleuropneumoniae* に広く存在する事が必要である。そこで、まず NG-8 株の *omlA* をプローブに用いて、low stringent な条件下で Southern blotting(SB)を実施し、NG-8 株の *omlA* と相同な配列を持つ DNA が、血清型 1~12 の参考株にも存在するかを検討した。その結果、プローブは血清型 1~12 の参考株全てと反応し、血清型 1~12 の参考株全てが *omlA* を保有すると考えられた。一方、high stringent な条件下で SB を実施したところ、血清型 5a, 5b 及び 10 の参考株とのみ反応し、全ての血清型の参考株の *omlA* が NG-8 株の *omlA* と高い相同性を持つわけではなく、*omlA* には多様性がある事が示唆された。

omlA の多様性を明らかにするために血清型 1~12 の参考株が保有する *omlA* の塩基配列を決定した。即ち、NG-8 株の *omlA* の上流及び下流領域の塩基配列を参考にして、*omlA* の完全長の open reading frame (ORF)を含む DNA を増幅可能なプライマーを設計して PCR を実施し、増幅した DNA の塩基配列の決定及び解析を行った。その結果、血清型 1~12 の参考株全てから NG-8 株の *omlA* と相同な ORF が検出された。*A. pleuropneumoniae* 血清型 1~12 の参考株の *omlA* の分子系統樹を作成すると、血清型 1~12 の参考株及び NG-8 株 (血清型 5a) は、(1)血清型 1、9、11、12、(2)2、8、(3)3、4、6、7、(4)5a、5b、10 の 4 グループに分けられる事が判明した。同一グループに属する *omlA* の塩基配列の同一性は、95.4~100%と高かったが、異なるグループに属する *omlA* の塩基配列の同一性は、70.7~82.9%であり、OmlA には遺伝的多様性が認められる事が明らかとなった。

上述の成績を基に、OmlA の遺伝的多様性を利用した *A. pleuropneumoniae* の新しい抗原型別法の開発を試みた。即ち、まず血清型 1~12 の参考株の *omlA* の塩基配列を比較し、保存領域を検索した。保存領域の塩基配列を基に、PCR 用プライマーを新たに設計して PCR を実施した結果、約 970 塩基長の DNA が血清型 1~12 の参考株全てから増幅された。さらに、PCR で増幅した DNA を切断可能ないくつかの制限酵素で切断し、アガロースゲル電気泳動法で解析した。その結果、制限酵素 *VspI* で切断して得られた PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)型は、血清型 1~12 の参考株を、(1)血清型 1、9、11、12、(2)2、8、(3)3、6、7、(4)4、(5)5a、

5b、10の5つのグループに分ける事ができ、後述の Western blotting(WB)法で型別できなかつた血清型3及び12の参考株も区別する事ができた。また日本で分離された血清型1、2、3、5、7の野外株(計41株)及びカナダで分離された血清型10の野外株(1株)の *omlA* の PCR-RFLP 型は、それぞれの血清型参考株の型と同一であり、本法を野外株の型別にも利用できると考えられた。

血清型1~12の参考株全てが、*OmlA* を発現しているかを血清型5aの野外株(NG-8株)、血清型1及び7の参考株の *OmlA* に対する特異抗血清を用いた WB 法で検討した結果、血清型3及び12の参考株以外の血清型参考株全てが、*OmlA* を発現している事が明らかとなった。また *OmlA* の抗原性には多様性があり、WBでの反応性の違いに基づき、*A. pleuropneumoniae* の *OmlA* は (1)血清型1、2、8、9、11、(2)4、6、7、(3)5a、5b、10)の3つのグループに分けられた。このように血清型3及び12の血清型参考株を除き、*OmlA* の抗原性に基づいた *A. pleuropneumoniae* の抗原型別が可能であった。

本研究で開発した型別法は、従来の血清型別法とは異なり、感染防御に関わる特定のタンパク質及びその遺伝子を利用した新しい抗原型別法である。豚の胸膜肺炎の予防対策上、感染防御抗原が何型かを調べる事がワクチン選定で重要であると考えられ、本研究で開発した抗原型別法は本病の予防対策に直接有効な実用的な方法であると言える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 喜 田 宏
副 査 教 授 杉 本 千 尋
副 査 教 授 鈴 木 定 彦
副 査 助 教 授 迫 田 義 博

学位論文題名

Development of New Typing Methods of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Based on the Genetic Diversity of the Protective Outer Membrane lipoprotein

(*Actinobacillus pleuropneumoniae* の感染防御抗原である外膜リポタンパク質の遺伝的多様性を利用した新しい型別法の開発)

本論文は豚の胸膜肺炎の原因菌 *Actinobacillus pleuropneumoniae* の外膜リポタンパク質遺伝子の多様性を利用した新規型別法の開発について述べたものである。

本論文の提出者である伊藤博哉氏はまず、型別に利用する抗原及び遺伝子の候補として、実験感染豚の血清を用いて本菌の野外株（血清型 5a）の外膜リポタンパク質およびその遺伝子の性状を解析した。その結果、外膜リポタンパク質が感染防御抗原であり、その遺伝子をプローブに用いた Southern blotting により、血清型 1～12 の参考株は血清型 5a の外膜リポタンパク質遺伝子と相同性を示す DNA を保有することが判明した。次に、血清型 1～12 の参考株全ての外膜リポタンパク質遺伝子の塩基配列を決定、比較解析したところ、多様性を認めた。

以上の成績を基に、氏は遺伝子の多様性を利用した PCR-restriction fragment length polymorphism による新しい型別法を開発した。この方法で血清型 1～12 の参考株は 5 つのグループに型別され、血清型 1、2、3、5、7 および 10 の野外株（計 42 株）をすべて型別することができた。さらに 3 種の異なる外膜リポタンパク質に対する特異抗血清を作製し、これらの抗血清を用いた Western blotting により、外膜リポタンパク質の抗原性に多様性があることを明らかにした。氏はさらに、外膜リポタンパク質の抗原性の違いに基づき、*A. pleuropneumoniae* が大きく 3 つのグループに型別できることを示した。

本研究で氏が開発した型別法は、従来の血清型別とは異なり、感染防御に関わる特定のタンパク質及びその遺伝子を利用した新しい抗原型別である。豚の胸膜

肺炎ワクチンの製造株を選定する際に感染防御抗原の型を同定することは極めて重要である。したがって、氏が開発した *Actinobacillus pleuropneumoniae* 抗原型別法は本病の予防対策に有効で実用的である。

よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者 伊藤博哉氏が博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。