

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 26 年度博士課程 入学

氏 名 田徳雨

指導教員名 平山和宏

論文題目 Evaluation of *Francisella tularensis*  $\Delta pdpC$  mutant as a candidate for live attenuated vaccine against tularemia using mouse and monkey models  
(マウスおよびサルモデルを用いた野兎病菌 *Francisella tularensis*  $\Delta pdpC$  変異株の弱毒生ワクチンとしての有用性の評価)

野兎病は、細胞内寄生性グラム陰性菌である *Francisella tularensis* (野兎病菌) の感染によって引き起こされる人獣共通感染症である。野兎病菌は 250 種以上の哺乳類、魚類、爬虫類や鳥類に感染することが知られている。また、野兎病菌はヒトに対して 10 コロニー形成単位 (CFU) 以下の菌量で感染し、抗生物質による適切な治療が無い場合、その致死率は約 5% から 30% と想定されている。野兎病菌の高い感染性と致死率から、本菌が生物テロに使用される可能性が指摘されており、ワクチン開発、病原遺伝子の特定、発症機序の解明等が世界各国で精力的に行われている。

1941 年に米国の患者の潰瘍病変部位から分離された野兎病菌 SCHU 株は、クローニングを経た後に SCHU S4 株として樹立された。現在では SCHU S4 株が強毒株として野兎病菌研究に広く使用され、ヒト、サル、マウスに対する半致死量 ( $LD_{50}$ ) は 10 CFU 以下との報告がされている。野兎病菌 SCHU 株は米国国立衛生研究所 Rocky Mountain Laboratories から福島県の大原総合病院に 1958 年に分与され、それ以降 30 年間人工寒天培地による生菌継代が続けられた後、冷凍保管された。野兎病菌 SCHU 株は、2002 年に大原総合病院から国立感染症研究所に分与されたが、分与された株は既に弱毒化しておりマウスに対して病原性を示さなかった ( $LD_{50} > 10^6$  CFU)。国立感染症研究所の宇田博士らは、弱毒化していた野兎病菌 SCHU 株をマウスで 9 回継代し病原性復帰株 SCHU P9 株を樹立した。さらに、SCHU P9 株の *pathogenicity determinant protein C* (*pdpC*) 遺伝子を破壊した  $\Delta pdpC$  株はマウスに対する病原性を失うが、*pdpC* 遺伝子を相補すると病原性が復帰することを明らかにした。私は、このように *pdpC* 遺伝子が野兎病菌の病原性に必須であることから、 $\Delta pdpC$  株が安全で有効なワクチンとして利用できるのではないかと考えた。

そこで本研究では、野兎病菌  $\Delta pdpC$  株の弱毒生ワクチンとしての安全性と効果について、第1章ではマウスモデルを用いて、第2章ではカニクイザルモデルを用いて解析した。

## 第1章. C57BL/6J マウスモデルにおける野兎病弱毒生ワクチンとしての野兎病菌 $\Delta pdpC$ の評価

野兎病菌は哺乳類に対して極めて高い感染性と致死性を有し、生物テロに使用される可能性のある病原体として危惧されているが、日本において野兎病菌のワクチン開発は行われていない。そこで、本章ではマウスに対して病原性を消失した野兎病菌  $\Delta pdpC$  株に着目し、安全性とワクチン効果について解析し以下の結果を得た。

1.  $\Delta pdpC$  株は、TargeTron mutagenesis システムを用いて強毒 SCHU P9 株の *pdpC* 遺伝子にイントロンを挿入して *pdpC* 遺伝子を破壊している。ワクチンの安全性の指標として、イントロンが脱落して病原性復帰株が出現しないことを、マウスを用いて 10 回継代して確認した結果、イントロンは完全に保持されており病原性も低いまま維持されていた。このことから  $\Delta pdpC$  株は、病原性復帰のリスクがほとんどないことが分かった。
2.  $\Delta pdpC$  株をマウスに筋肉内接種、皮下接種、経鼻接種したところ、接種 3 週間後のマウス血清には、接種経路に係わらず野兎病菌に対する高い抗体価が誘導された。
3.  $\Delta pdpC$  株を筋肉内接種、皮下接種、経鼻接種したマウスに、同経路で強毒 SCHU P9 株で攻撃したところ、投与 3 週間後の生存率はそれぞれ 100%、60%、40%であった。一方、非免疫群のマウスは全ての接種経路で全て死亡した。
4.  $\Delta pdpC$  株を皮下接種後、強毒 SCHU P9 株を経鼻接種で攻撃したところ、生存率は 38%であった。一方、非免疫群のマウスは全ての個体が死亡した。
5.  $\Delta pdpC$  株を皮下接種後、強毒 SCHU P9 株を経鼻接種で攻撃後 3 日目の段階で、顕著な細胞性免疫の誘導は観察されなかった。

これらの結果から、野兎病菌  $\Delta pdpC$  が安全で有効なワクチン株であることが示唆された。また、細胞性免疫の誘導能を改善すれば、さらにワクチン効果が高まると考えられた。

## 第2章. カニクイザルモデルにおける野兎病菌 $\Delta pdpC$ 株の野兎病の防御効果

第1章では、マウスモデルにおける野兎病菌  $\Delta pdpC$  株の安全性とワクチンとしての有効性を明らかにした。第2章では、非ヒト霊長類であるカニクイザルを用いて、野兎病菌  $\Delta pdpC$  株のワクチンとしての有効性を解析した。6 頭のカニクイザルを各 2 頭 3 群に分け、第1群は野兎病菌  $\Delta pdpC$  株を皮下接種 3 週間後に強毒 SCHU P9 株を経気道接種で攻撃した。第2群および第3群はプラセボ処置した 3 週間後に、第2群では強毒 SCHU P9 株を、第3群では  $\Delta pdpC$  株を経気道接種で攻撃した。尚、経気道接種による攻撃の際にはバイオテロを想定し、既に報告されてい

るカニクイザルでの経気道接種による強毒株致死量 ( $LD_{50} < 10^1$  CFU) の 10 万倍以上 ( $10^6$  CFU) を接種した。また、強毒 SCHU P9 株接種後に横臥等の重篤な症状を示した個体は安楽死処置を実施した。これらの検討により以下の結果を得た。

1. 野兎病菌  $\Delta pdpC$  株で免疫後、強毒 SCHU P9 株を経気道接種で攻撃した第 1 群のカニクイザルは、2 頭中 1 頭は発症せず、1 頭は発症したが耐過した。
2. プラセボ処置（非免疫）後、強毒 SCHU P9 株を経気道接種で攻撃した第 2 群のカニクイザルは、2 頭ともに熱、咳、食欲不振、横臥等の臨床症状を示し 7 日および 11 日目に安楽死処置を実施した。一方、弱毒  $\Delta pdpC$  株を経気道接種で攻撃した第 3 群のカニクイザルは、2 頭ともに無症状であった。
3. 病理組織学的解析から、安楽死処置を実施した第 2 群のカニクイザルの全臓器、組織は、抗野兎病菌 LPS 抗体で強く染色された。また第 2 群のカニクイザルでは、肺病変が顕著に認められ、マクロファージだけでなく II 型肺胞上皮細胞に野兎病菌が感染していることが明らかとなった。
4. 野兎病菌  $\Delta pdpC$  株で免疫されたカニクイザルは、ELISA、MA 試験、およびウエスタンブロッティングの 3 つの方法で、野兎病菌に対する抗体応答が確認された。

以上の結果から、 $\Delta pdpC$  株はカニクイザルに対しても病原性がないことが確認された。さらに、 $\Delta pdpC$  株はカニクイザルに皮下接種で高いワクチン効果を示し、強毒 SCHU P9 株の致死感染を防御した。これらの結果から、野兎病菌  $\Delta pdpC$  株は弱毒生ワクチンとして有効であることが示唆された。

野兎病菌は哺乳類に対して高い感染性と致死性を有するが、迅速で適切な抗生物質による治療を施せば、現状においては完治する感染症である。しかしながら、野兎病菌はプラスミドを容易に獲得できることから、薬剤耐性プラスミドを持った野兎病菌がバイオテロに使用された際には既知の抗生物質治療が有効でないことも想定される。このような薬剤耐性を獲得した野兎病菌に対しては、ワクチンが最も安価で効果的な対策であることは疑う余地はない。本研究の第 1 章ではマウス発症モデルを用いて、第 2 章ではカニクイザル発症モデルを用いて、野兎病菌  $\Delta pdpC$  の生ワクチンとしての安全性と、強毒株の致死感染を防御する高い効果が確認された。マウスの発症モデルでは、ワクチン接種経路として多く用いられている皮下接種では、バイオテロに用いられた場合に想定されるエアロゾル化された野兎病菌による経気道感染に対してはワクチン効果が限定的であったが、カニクイザルの発症モデルでは  $\Delta pdpC$  を皮下接種で免疫し、強毒 SCHU P9 株を経気道感染させても致死感染を防御した。これらの結果から、ヒトにおいても  $\Delta pdpC$  を皮下接種で免疫することにより野兎病菌の発症防御が可能であると考えられ、 $\Delta pdpC$

は安全で有効な生ワクチン株であると考えられた。