



Bordetella bronchisepticaの病原因子と相互作用

はじめに

Bordetella bronchiseptica (Bb)は、萎縮性鼻炎 (AR) や気管支肺炎の原因として古くから知られています。生産現場では、ワクチンでARの発症は抑制されていますが、Bb菌自体はなくなっておりません。一方、研究の現場では、Bb菌は、人の百日咳菌 (*Bordetella pertussis*) のモデルとしてよく研究され、Bb菌の病原因子と病原性発揮、Bb菌の生体内における生き残り戦略などが次第にわかってきています。

本稿では、Bb菌の病原性研究の最新情報から生産現場におけるBb対策 (AR及び呼吸器病対策) をどう考えておくべきか、について考察してみたいと思います。Bb菌の“技”が多彩なため、少しばかり長くなってしまいました。しばらくお付き合いください。

Bb菌の特徴

Bb菌は、グラム陰性の鞭毛を有する非芽胞形成の好気性の小桿菌です。ブドウ糖を分解利用できない、クエン酸は利用できる、尿素を分解できるなどの特徴があります。また、相変異といって、病原因子を産生するI相菌から全く産生しないIII相菌に容易に変異する性質があります (問題は生体内でIII相菌からI相菌への病原性復帰変異が起こること; 試験管内では再現できていない)。相変異の結果、免疫保有の豚では定着因子・毒素などの病原因子の生産を止めて宿主の免疫の攻撃を回避することになり、まるでイソギンチャクのような感じです。ほか、I相菌であっても、大量にある毒素を放出し、好中球など免疫細胞を機能不全に陥れて免疫をすり抜けた⁽¹⁾、マクロファージなど免疫細胞そのもののなかに潜り込み、I相菌よりIII相菌で顕著に長く生きながらえること⁽²⁾がわかっています。巧妙な手口です。

宿主域が広いのも本菌の特徴です。同じ属でも百日咳菌が人にしか感染しないことと大違いです。Bb菌は豚以外に、人、猿、犬、猫、馬、牛、ウサギ、ネズミ、キツネほか多くの野生動物など各種哺乳動物間に広く分布し、ときに上気道炎、気管支肺炎を起こします。なかでも、ウサ

ギ・ネズミは実験的にARを起こすとされています⁽³⁾。

Bb菌の病原因子

Bb菌の病原因子は「定着因子」と「毒素」なのですが、ことは単純ではなく、定着因子には線毛、赤血球凝集素 (FHA)、パータクチン、毒素には皮膚壊死毒素 (DNT)、アデニル酸シクラーゼ毒素 (ACT)、溶血素、気管細胞毒 (TCT)、リポ多糖 (LPS) などが知られています。加えて、最近の研究で、外膜蛋白 (パータクチンも外膜蛋白)、毒素注入装置、自己輸送体などの報告もあり、病原性を発揮するのに複雑なことをしているのは間違いなさそうです。

これまでわかっている病原因子それぞれの役割について、以下に整理しておきます (図1参照)。

(1)定着因子

それぞれの定着因子がBb菌の定着にどう関与しているかは、それぞれの定着因子の欠損株を作出して、元株と定着性及び起病性を比較して研究が進められています。

①線毛

例えば、線毛欠損株 (FHAは産生) をネズミの鼻腔内に接種すると、鼻腔内の定着菌量は元株と変わらなかったが、気管内の菌量が著しく少なかったそうです⁽⁴⁾。気管内に直接投与しても、元株より定着菌量が有意に少ない結果でした。このことから、鼻腔内には線毛がなくても感染が成立するが、気道をさらに奥に進むには線毛があった方が効率的に感染すると考えられます。感染抗体について、線毛欠損株感染では感染初期抗体 (IgM) 応答が見られなかった (元株では抗体応答あり) ことから、線毛が感染免疫応答に重要な役割を果たしていると考えられました。

②赤血球凝集素 (FHA)

FHA欠損株 (I相菌からFHA遺伝子のみ削除; 線毛は保有) をネズミの鼻腔内に接種した試験⁽⁵⁾では、鼻腔内の定着菌量は接種10日後で若干少なかったものの26・60日後では元株と変わらず、気管内の定着菌量ははず

れのタイミングでも検出限界以下でした。さらに、Ⅲ相菌にFHAを組換えてFHAだけ発現した株を接種したところ、鼻腔にも気管にも定着は認められませんでした⁽⁵⁾。元株は鼻腔内接種で鼻腔内は当然、気管にも定着が認められており、Bb菌の鼻腔内定着にはまずは線毛が重要な役割を果たしていると考えられます(FHA組換え発現Bb菌では鼻腔に定着しておらず、FHAは鼻腔定着の必要十分条件ではない)。また、気管への定着は線毛だけでもFHAだけでも認められず、両者が補完して成立する、と考えられています(Mattoらの報告⁽⁴⁾と合わせ技)。

これだけだとFHAが色褪せて見えますが、Bb菌は線毛を介して気管粘膜細胞に接着した後、FHAを介して粘膜上皮細胞の繊毛運動による菌排除に耐えうる(強調して言えば“濁流をも物ともしない”)強固な定着を果たしているそうです⁽⁵⁾⁽⁶⁾。百日咳菌ではFHAがワクチン成分となっている理由として納得できます。“強固な定着”はその後の感染局所の炎症抑制、定着長期化、“毒素注入”へと病原性が展開されていきますので、Bb菌のしつこさを体現しているのはむしろFHAということが出来ます。

③ パータクチン(PRN)

これまでPRNは定着因子の一つとして紹介されることが多かったのですが、PRN欠損株で検討された結果⁽⁷⁾から、PRNは豚のBb菌の鼻腔・気管定着そのものに必須ではないようです。ただ、欠損株は接種56日目の定着菌量が若干少なく、感染抗体応答が促進されることから、免疫抑制に関わりがあるのではと疑われています⁽⁷⁾。PRN欠損株を子豚の鼻腔に接種すると、元株と変わらないくらいAR及び肺炎を発症していますので、病原因子の“主役級”ではなさそうです。同時に、FHA欠損株を子豚に接種したデータがあり、元株より明らかにARスコアは減少していますが、非接種対照にはないスコア2の個体もあり、FHAがなくても(線毛による定着で)若干の侵襲を許している、と読めます。元株ではスコア4以上があるので、病原性発揮にFHAが重要であることに違いはありません(鼻甲介スコアは4つの渦巻きそれぞれの4段階評価合計値)。

PRNは定着因子というより、Bb菌の外膜上に存在し、自己輸送体として機能しているそうです⁽⁸⁾。何を輸送しているかはわかりませんが、好中球に食われないことに関与していると疑われています⁽⁸⁾。PRN欠損株はネズミの気管・マクロファージへの定着は元株と変わらないが、好中球が活躍できるネズミは生き残り(元株では死亡)、好中球が活躍できないネズミは死亡してしまう実験データ⁽⁸⁾がその根拠です。PRNの機能の詳細は不明ですが、Bb菌が免疫細胞の一つである好中球に殺されまいとするしたたかさの一端と考えられます。

(2) 毒素

① 皮膚壊死毒素(DNT)

DNTは熱に弱く、致死、血管収縮、脾臓萎縮、鼻腔粘膜損傷、骨芽細胞・骨膜変性(鼻甲介萎縮)、細胞毒性(皮膚壊死毒性)などの作用の報告があります⁽⁹⁾。Bb菌の細胞内に存在し、菌が壊れて出てくるか、感染(定着)成立後、豚の粘膜損傷が“分泌注入装置”を介して起こって

いる可能性もあります(“注入装置”は後述)。Bb菌を破碎した無細胞抽出物を鼻腔内スプレーまたは綿棒で擦り込むと⁽¹⁰⁾、また、精製DNTの注射でもAR同様の骨病変が再現され⁽¹¹⁾、DNT非産生菌ではARにならないことが確認されており、ARの直接の原因がDNTであることは疑いの余地がありません。

Bb菌の定着についても、DNT欠損株(I相菌からDNT遺伝子のみ削除)では定着菌量が元株より有意に少なくなったことから、DNTによる鼻粘膜損傷で、Bb菌そのものもさらに定着が促進されると考えられています。「Bb菌は他の菌種の定着促進にも寄与している」とのことゆえ、DNTの鼻粘膜損傷作用は捨て置けません。

DNTは鼻甲介萎縮だけでなく、肺炎の起病にも関連しています。DNT欠損株では肺炎を起こさなかったのですが、DNT産生の元株では1週齢子豚の鼻腔内に 3×10^5 CFU程度投与しただけで4週後に15%前後の肺病変が形成されています⁽⁹⁾。この結果から、DNTが肺炎起病にも関係していることが示唆されます。ちなみに病変の特徴は、肺硬化、肺胞壁の肥厚(線維素、線維芽細胞、マクロファージ浸潤)、膿瘍、細気管支・肺胞内腔に好中球浸潤などです。通常、Bbは母豚にワクチンが投与されているので、この実験のような若齢感染による発症はないとは思いますが、DNTが肺炎病変形成にも寄与することが疑われることから、DNT対策の必要性が示唆されます。

野外農場でも、Bb菌単独では肺炎の原因として有意に多いことはないものの、*Pasteurella multocida*(Pm)、*Mycoplasma hyopneumoniae*、レンサ球菌との混合感染で有意に多く、Bb菌は混合感染という形で肺炎起病に寄与している可能性があります⁽¹²⁾。DNTは、鼻腔や肺で活躍するBb菌病原性の“主役”です。

② アデニル酸シクラーゼ毒素(ACT)

ACTは食細胞(好中球・マクロファージ・樹状細胞・NK細胞)のなかに侵入し、細胞内にcAMPという物質を大量に蓄積させて食細胞を機能不全に陥れ⁽¹⁾、炎症抑制に働き、オプソニンを経た溶菌も抑制して免疫細胞による菌の排除に待ったをかける毒素です。実際、ACT欠損株は元株より早期に排除され⁽¹³⁾、その違いが確認されています。ACTは生体内におけるBb菌延命の主役でしょう。PRNとの関連性は今のところ不明です。

そのほか、ACT分子内に溶血活性も確認されており、Bb菌の溶血活性の正体はACTの一部のことかもしれません。

③ 気管細胞毒素(TCT)

TCTは百日咳菌の説明によく出てくる毒素ですが、Bb菌でも産生される可能性を示唆する報告があります⁽¹⁴⁾。TCTは低分子(分子量1000以下)のペプチドグリカン由来化合物であり、耐熱性で、培養上清(菌体外)に存在し、気管繊毛運動を阻害、また気管上皮細胞を破壊する、などの記述があります。豚の輪切りにした気管にTCT(厳密には「熱処理したBb菌培養上清」)を先行感作するとPm定着が促進されるとのことです。Bb菌のTCT研究は活発ではなさそうなので、主役級ではないかもしれませ

ん。

④リポ多糖(LPS)

LPSについては、病原性を検討した報告がいくつかあり、何か悪いことをしてそうだとはいいますが、病原因子としてのLPSの役割は明確に整理されていない⁽¹⁵⁾ようです。LPS生合成系だけ欠損させたBb菌を健康ネズミに 5×10^5 CFUを投与すると、元株に比べ気管、肺の定着が悪くなり(鼻腔は変わらない)、免疫不全ネズミでは死ななくなった(元株は50日以内に100%死亡)とのことで、Bb菌の定着・病原性に関与していることは間違いなさそうです。ただし、その機序については不明です。また、Bb菌のLPSの構造は相変異によって変化する⁽¹⁶⁾とされており、LPSそのものの毒性がどのように変化するかも興味深いところです。

一般的に、LPSはグラム陰性菌が保有(構造は様々)、発熱、細胞増殖、毒性、サイトカイン産生などの作用があり、医療の現場では敗血症の指標として検査されており、医薬品製造では副反応の原因としてできるだけ排除したい物質として位置づけられています。

(3)Ⅲ型分泌装置

「分泌装置」は、聞きなれない用語かもしれませんが、細菌学の分野ではホットなテーマのようです。構造・機能によりⅠ～Ⅶ型に分類されており⁽¹⁷⁾、Ⅲ型分泌装置は鞭毛に似た“注射針”をターゲット細胞に刺して菌体内毒素などを注入するタイプの装置で、グラム陰性菌に認められ、Bb菌にも確認されています。Ⅲ型分泌装置の機能だけノックアウトしたBb菌では、強毒元株と比較すると、鼻粘膜への定着は若干、気管・肺の定着は鼻粘膜より顕著に悪くなります⁽¹⁸⁾。また豚に対する病原性は、接種2週間には元株と同等の鼻甲介萎縮が認められるものの4週・8週間には元株より軽度であり、肺炎スコアも同様の結果だったことから、分泌装置は病原因子の伝達・作用に部分的に関与していると考えられます。ただし、裏を返せばⅢ型分泌装置が機能しなくても部分的に発症はしているので、毒素作用は分泌装置経路だけでなく、菌が物理的に壊れた(溶菌した)だけでARになることも否定できません。細胞内に病原因子を直接送り込む分泌装置を介してDNTが病原性を発揮すると仮定すれば、細胞外体液に触れる機会がなくなりDNT中和抗体は効果を発揮しにくいと想像されますが、結果が全てで、DNT中和抗体が鼻甲介萎縮だけでなく鼻粘膜損傷も防御する(部分的でなくほぼクリアに防御する)ことから、その仮定自体が棄却されるか、線毛・FHAによる定着後の分泌装置経路もともに効果を発揮するかになります。

Bb菌の相互作用

Bb菌とPm菌の相互作用は周知のとおりで、Bb菌の先行感染がPm菌の定着を促進するという現象は古くから知られています(Bb菌の先行感染がDNTやTCTの作用で

粘膜上皮を損傷しPm菌の定着が促進される)。鼻粘膜損傷は他の菌種の定着も促進することや、逆に他の病原体がBb菌感染を増悪するとの報告がいくつかありますので、かいつまんで紹介致します。

・Bb菌先行感染でレンサ球菌鼻内感染成立⁽¹⁹⁾

・Bb菌先行感染でグレーサー病菌(*Haemophilus parasuis*; Hps)が5～138倍増殖促進⁽²⁰⁾、逆にBb菌は10～14分の1に減少(Hps感染による炎症促進で“延命効果”に影響?)

・Bb菌とPRRSVを鼻内に同時接種すると、PRRS肺病変はPRRSV単独接種と同程度だったが、Bb菌による肺病変(硬化;肝変化様)が認められた(21日後に平均14.8%; Bb菌単独接種では認められず)⁽²¹⁾

・Bb菌と豚インフルエンザウイルス(SIV)を鼻内に同時接種すると、Bb菌の定着が促進され、単独接種群に比べ肺病変が重度となった⁽²²⁾

・Bb菌と豚呼吸器コロナウイルス(PRCV)を鼻内に同時接種すると、単独接種群に比べ肺病変が重篤化⁽²³⁾

Bb菌の単独接種では、どの試験でも離乳豚が供試されたせいか、気管までの感染は確認されるものの、肺までは到達していない結果ばかりで、混合感染によってはじめてBb菌が肺まで到達して肺炎を引き起こしています(1週齢ではBb菌単独の鼻腔内接種で肺炎再現⁽⁹⁾)。野外農場調査のPalzerらの報告⁽¹²⁾と一致します。また、Bb菌による鼻粘膜損傷がレンサ球菌やHps菌の感染を増長しており、鼻粘膜環境を健康に保つことが重要と考えられます。

最後に

最近のことですが、ARワクチンを使用中止していた農場で成績が悪化し、検査したところ肺膿瘍からDNT産生のPm菌が純粋培養的に分離された事例がありました。Bb菌の方もDNT産生株で肺膿瘍を形成する⁽⁹⁾、という情報の記憶があったので、DNTについて情報収集していたら、Bb菌の病原性は単純ではなく、病原因子全てについて整理しなければ理解したことにはならない、と考えるに至りました。ゆえに、長い原稿になってしまいました。最後までお付き合い頂きありがとうございます。

Bb菌は宿主域が広いこともあり、生体に対しても強固に定着して、さらに免疫をすり抜けて、飼養環境からもなかなかなくなるいしつこい菌であることを再認識した次第です。また、Bb菌はARの原因として認識されていますが、鼻・気管粘膜に悪さをして、他の病原体の増殖を許したり、相互作用のなかで二次病原体としても肺炎を起病させたり、いまだに無視できない存在です。病原因子の性状をまとめると、①鼻腔には線毛またはFHAのどちらかがあれば定着、②鼻腔粘膜損傷にはDNT(肺炎起病にも関与)、③気管定着には線毛・FHA両方必要、④分泌装置がなくても(DNTの存在で)AR・肺炎を発症(若干軽減)、となります。これらについて整理したことが、生産現場で何がベストかを考える参考になれば幸いです。

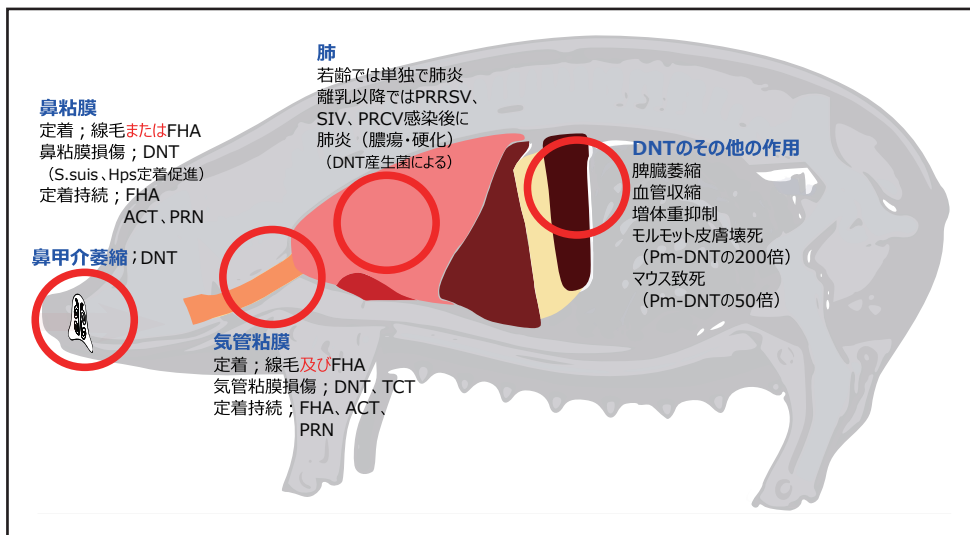


図1 Bb 菌の病原因子の作用と生体への影響
 (分泌装置は病変の重篤度(毒素分泌)と定着持続に関与)

参考文献

- (1) 豚病学第4版
- (2) Banemannら, Infect. Immun., 65(8), 3469-73, 1997
- (3) 豚病学第3版
- (4) Mattooら, Infect. Immun., 68(4), 2024-33, 2000
- (5) Cotterら, Infect. Immun., 66(12), 5921-9, 1998
- (6) Schellerら, MBio., 6(3), e00500-15, 2015
- (7) Nicholsonら, Infect. Immun., 77(5), 2136-46, 2009
- (8) Inatsukaら, Infect. Immun., 78(7), 2901-9, 2010
- (9) Brockmeierら, Infect. Immun., 70(2), 481-90, 2002
- (10) 尾形学監修「豚の萎縮性鼻炎」(文永堂)
- (11) 堀口, 日本細菌学雑誌, 51(4), 963-72, 1996
- (12) Palzerら, Vet. Rec., 162, 267-71, 2008
- (13) Harvillら, Infect. Immun., 67(3), 1493-500, 1999
- (14) Dugalら, Can. J. Vet. Res., 56, 260-4, 1992
- (15) Mattoら, Front Biosci., Nov 1;6:E168-86, 2001
- (16) Harvillら, Infect Immun., 68(12), 6720-8, 2000
- (17) 安部, 感染症学雑誌, 83(2), 94-100, 2009
- (18) Nicholsonら, Infect. Immun., 82(3), 1092-103, 2014
- (19) Vechtら, Am. J. Vet. Res., 50(7), 1037-43, 1989
- (20) Brockmeier, Vet. Microbiol., 99(1), 75-8, 2004
- (21) Brockmeierら, Aus. J. Vet. Res., 61(8), 892-9, 2000
- (22) Lovingら, Microb. Pathog., 49(5), 237-45, 2010
- (23) Brockmeierら, Vet. Microbiol., 128(1-2), 36-47, 2008