

心内膜炎を惹起させる豚レンサ球菌の新たな戦略

遠矢 真理 関崎 勉[†]

東京大学大学院農学生命科学研究科 (〒113-8657 文京区弥生1-1-1)

Newly Identified Strategy of *Streptococcus suis* to Provoke EndocarditisMari TOHYA and Tsutomu SEKIZAKI[†]

*Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, 113-8657, Japan

1 はじめに

Streptococcus suis はグラム陽性球菌であり、ブタに髄膜炎、敗血症、心内膜炎等を引き起こす [1, 2]。S. suis はブタだけでなくヒトにも感染する人獣共通感染症の病原体であり、特にタイやベトナムではヒトの S. suis 感染症が大きな問題になっている [3, 4]。S. suis がヒトへ感染すると、髄膜炎をおもに引き起こし、難聴を併発することが特徴の一つである [1]。タイやベトナムで S. suis 感染者数が多い理由の一つは、ブタの血を熱処理せずに喫食することが挙げられる [3, 4]。このため S. suis は食中毒細菌としての側面も持っており、ヒトの腸管から感染する可能性を示唆する研究成果も報告されている [5]。日本でも S. suis 感染者は報告されているが、養豚関係者や豚肉加工業関係者に限定された感染症となっており、またその感染経路は傷口からと限られ、報告例も少ない [1]。

S. suis は上記のような問題を起こすが、毒力の強い菌株は、S. suis 全体でみると少なく、多くは常在菌としてブタに生息している。S. suis として現在 29 の血清型が認められているが、続々と新規と思われる血清型が報告されている [6-9]。さまざまな血清型のなかでも、2 型の菌株はヒト及びブタに対して毒力の強いタイプであることが知られている [1]。このため、S. suis の研究は 2 型菌株を中心に行われている。

近年、S. suis は血清型の分類に加えて、Multi-Locus Sequence Typing (MLST) によっても詳細に分類されている。MLST は S. suis のどの株も基本的に持つ 7

つの遺伝子について DNA 塩基配列を調べ、その配列パターンを Sequence Type (ST) として番号をつける方法である [10]。この方法を用いることで、菌株の詳細な類縁性を比較し、整理することができる。これまで S. suis 感染者や病豚から分離された菌株は、おもに ST1, ST25, ST28, ST87 を中心としたグループにそれぞれ集約することがわかった [1, 11]。このうち ST1 のグループには、2005 年中国で 215 人が感染し、39 人が死亡するという大規模なアウトブレイクを引き起こした菌株が属している [1, 12]。また、ヒトやブタに重篤な症状を引き起こす菌株は、このグループに属するものが多い。日本国内では、この強毒の ST1 も分離されるが、ST28 の菌株も分離される。この ST28 に型別される菌株の毒力の程度はさまざまであることが報告されており、日本、アメリカ、カナダで多くの分離例がある [13]。

2 S. suis の莢膜について

本菌の病原因子はさまざまなものが候補として報告されているが、依然としてどの因子が真の病原因子であるかは不明な点が多い。さまざまな候補のなかでも有力な候補として注目されているものが莢膜である。

莢膜は血清型を決定する主要な抗原であり、capsular polysaccharide synthesis (cps) 遺伝子群 (図 1) にコードされた糖転移酵素の働きによって合成される。基本的な組成はグルコース、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン及びシアル酸であり、毒力の強い株が多い 2 型株はラムノースも保有している [14, 15]。シアル酸は

[†] 連絡責任者：関崎 勉 (東京大学大学院農学生命科学研究科食品病原微生物学研究室)

〒113-8657 文京区弥生1-1-1 ☎ FAX 03-5841-0916 E-mail: asekizak@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

[†] Correspondence to: Tsutomu SEKIZAKI (Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, 113-8657, Japan

TEL・FAX 03-5841-0916 E-mail: asekizak@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp



図1 *S. suis* の *cps* 遺伝子群

S. suis 血清型 2 型の *cps* 遺伝子群の基本構造 *cps2A* から S までの遺伝子があり、莢膜の合成に関わる重要な領域である。

表 髄膜炎由来株と心内膜炎由来株の莢膜産生性

由来	莢膜の有無		合計
	有	無	
髄膜炎	32 株 (100%)	0 株	32 株
心内膜炎	170 株 (66%)	86 株 (34%)	256 株

(Lakkitjaroen N et al. [21] より)

補体の活性化を抑え、マクロファージや単球に付着する。これを活用して、髄膜炎を発症する際の最初の関門である脳血管関門を通過していると考えられている。また有莢膜菌は無莢膜菌に比べ、炎症性サイトカインの分泌誘導能が低く、そのため好中球やマクロファージの浸潤を抑制していると考えられる。さらに莢膜そのものも、好中球やマクロファージの食菌作用からの回避に貢献しているとされている [16-19]。以上のように莢膜は *S. suis* がブタに感染後、宿主体内で生存するためにとても重要な因子として認識されている。

これまでの研究で、有莢膜菌と無莢膜菌をそれぞれ動物へ接種し、両者の毒力を比較する実験が行われている。その結果、有莢膜菌は高い致死性を示した一方で、無莢膜菌は病原性が認められず、接種された個体を死に至らすことはなかった [19, 20]。この成績から、莢膜は *S. suis* にとっては病原性を発揮するために必須であり、莢膜を持たない無莢膜菌については着目されていなかった (図1)。

3 無莢膜菌への注目

(1) 無莢膜菌の分離

近年、家畜保健衛生所や食肉衛生検査所で保存されていた *S. suis* 菌株の莢膜の保有の有無が調査された。その結果、髄膜炎病変部由来の菌株はすべて有莢膜菌であったが、心内膜炎病変部由来の菌株には無莢膜菌が約 30% 含まれていた (表) [21]。さらに発見された無莢膜菌 43 菌株について、*cps* 遺伝子群の DNA 塩基配列を解析した。その結果、43 株のすべての無莢膜菌は *cps* 遺伝子群のいずれかの遺伝子に莢膜の欠失に関わりと予想される突然変異が認められた。この成績から、無莢膜菌が心内膜炎病変部に存在すること、さらに *cps* 遺伝子群に莢膜産生に影響を与えるような突然変異が入ることによって無莢膜菌が派生することが予想された。一方で、*cps* 遺伝子群の一部の遺伝子における突然変異は菌にとって危険であることも明らかとなっている。すなわち、特定の領域のみに変異が入ることで、合成産物が菌

体内に蓄積されることが起きると予想され、そのような変異は菌にとって致死的となる [22]。

(2) 無莢膜菌の特性

これまで注目されていなかった無莢膜菌の性状として、有莢膜菌よりも組織や血小板への接着性やバイオフィーム形成能力 [21, 23]、さらに上皮細胞への侵入性が高いことが明らかとなった [5, 24-26]。さらに無莢膜菌は、ワクチン効果の影響を受けないという一面も併せ持つ。また、無莢膜菌の血小板への付着能の高さは、心内膜に疣贅を形成するにあたり、必要となる能力であるとも予想できる [21]。つまり心内膜に傷口などが出来た際に、血小板が集まり、そこに無莢膜菌も付着。そしてその付着能を生かして、フィブリン等にも接着することで病変部が形成されるという工程が想定される (図2)。

以上の報告から、*S. suis* の有莢膜菌は *cps* 遺伝子群に変異が入ることで無莢膜菌となる。そして、食菌作用を受けやすくなる反面、組織や血小板への付着能力、バイオフィーム形成能力が高くなる。さらに心内膜炎病変部形成にあたり、共存する有莢膜菌の食菌作用からの高い回避能力も利用していることも想定される。心内膜炎病変部から異なる表現型の菌株がそれぞれ分離されていることから、この両表現型の存在が心内膜炎発症に関わっていることが考えられた (図3)。しかし、この研究では、心内膜炎病変部での有莢膜菌と無莢膜菌の共存については明らかにされておらず、また無莢膜菌に関してはその発生場所や発生過程についても疑問が残っていた。

4 ブタ心内膜炎病変部由来菌株の詳細な解析

(1) 有莢膜菌と無莢膜菌の共存

最新の調査で、無莢膜菌が有莢膜菌と心内膜炎病変部に実際に共存していることが明らかとなった。日本国内の 28 農場由来 70 検体の心内膜炎病変部の調査を行ったところ、*S. suis* は 59 検体 (24 農場由来) から分離された。さらに分離された *S. suis* の莢膜保有を調査した。59 検体中 31 検体から分離された菌株はすべて有莢膜菌であったが、2 検体から分離された菌株はすべて無莢膜菌であり、さらに 26 検体において両表現型の共存が認められた。この有莢膜菌と無莢膜菌の共存が認められた心内膜炎検体は 24 農場中 17 農場から分離されており、両表現型の共存による感染症が 7 割以上の農場で

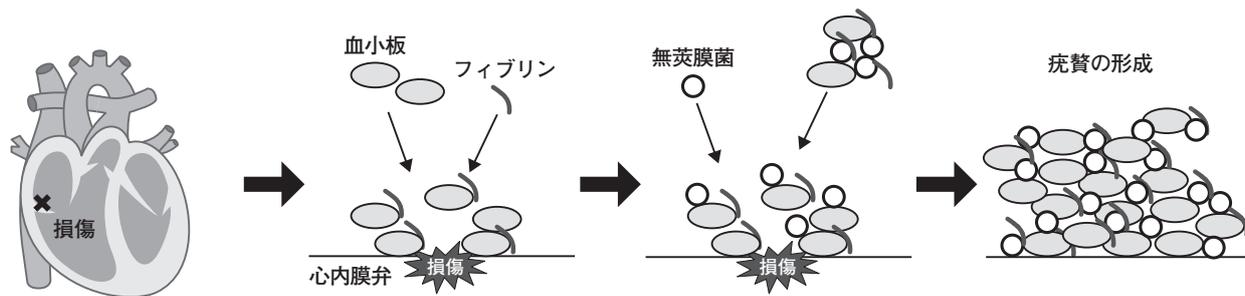


図2 心内膜炎病変部形成過程の想像図

心臓弁内皮に損傷が入ることで、血小板やフィブリンが集合してくる。そこに無莢膜菌が存在すると、その付着能力を利用して疣贅が形成される。

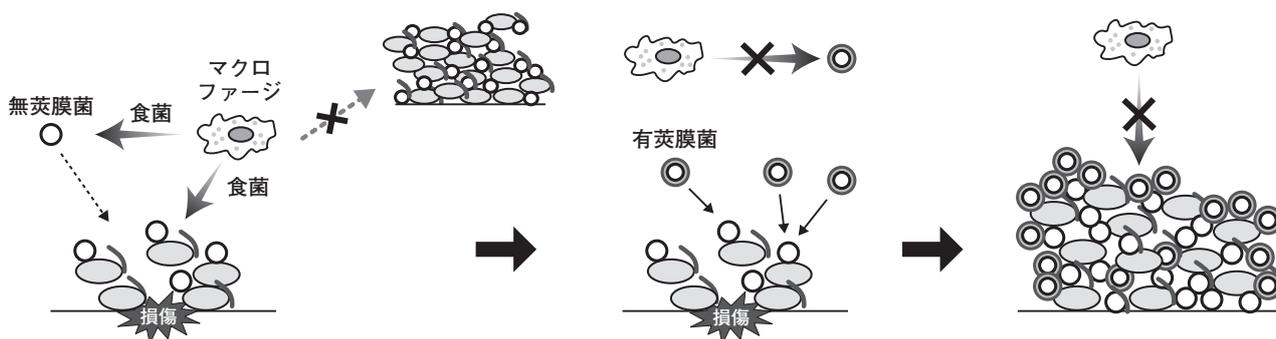


図3 有莢膜菌と無莢膜菌の共存による心内膜炎病変部形成の過程想像図

無莢膜菌はマクロファージなどによる食菌作用を受けることから、無莢膜菌のみでの病変部形成は難しいと考えられる。そこに抗食菌性の有莢膜菌が共存することで、食菌作用から逃れ、病変を形成する。

起きていることが明らかとなった(図4)。すなわち、これら2つの表現型の *S. suis* による感染症は一般的などの農場でも起こり得ることが予想された。

(2) 心内膜炎病変部に共存する菌株の関係性

さて、ここで疑問となるのが、感染症を起こした有莢膜菌と無莢膜菌の由来と、両者に分岐した場所及びその原因である。

近年、遺伝子解析技術が急速に進歩している。高速シーケンサーを用いることで、細菌の全遺伝子配列を容易に解析できるようになった。そこで、この高速シーケンサーを用いて、心内膜炎病変部に共存していた両表現型のそれぞれの菌株の解析を行った。その結果、同一の農場から分離された菌株同士が最も近縁であり、さらに多くはブタ個体ごとに細かく分かれていくことが明らかとなった(図5)。この成績から、有莢膜菌から無莢膜菌への分岐が各農場で(あるいは各豚個体内で)それぞれ別個に起こっていることが示唆された。さらに解析成績のなかには、異なる個体の有莢膜菌同士が非常に近縁であったケースも認められた。この成績は、*S. suis* が農場内のどこかに潜伏し、異なる個体に感染を繰り返していることを強く示唆している。

一方、無莢膜菌が発生した原因に迫るために、同一の

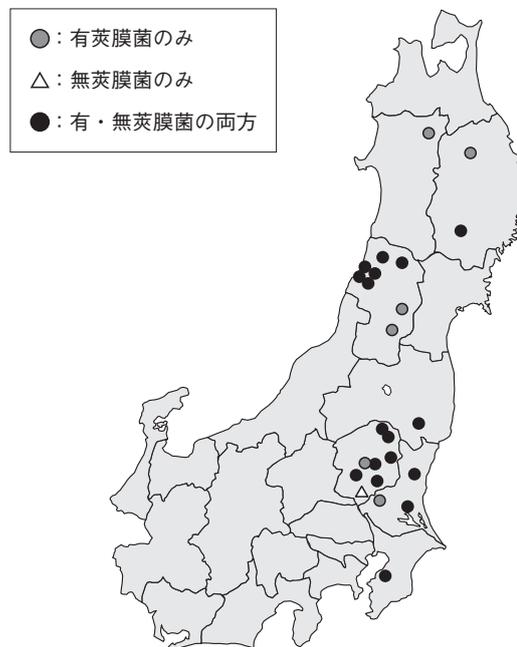


図4 *S. suis* 心内膜炎検体の由来農場の位置

合計24農場から *S. suis* による心内膜炎検体が認められた。それぞれの農場由来の心内膜炎検体における有莢膜菌と無莢膜菌の共存の有無を表示した。24農場のうち17農場で、有莢膜菌と無莢膜菌の両方が心内膜炎検体から分離された。

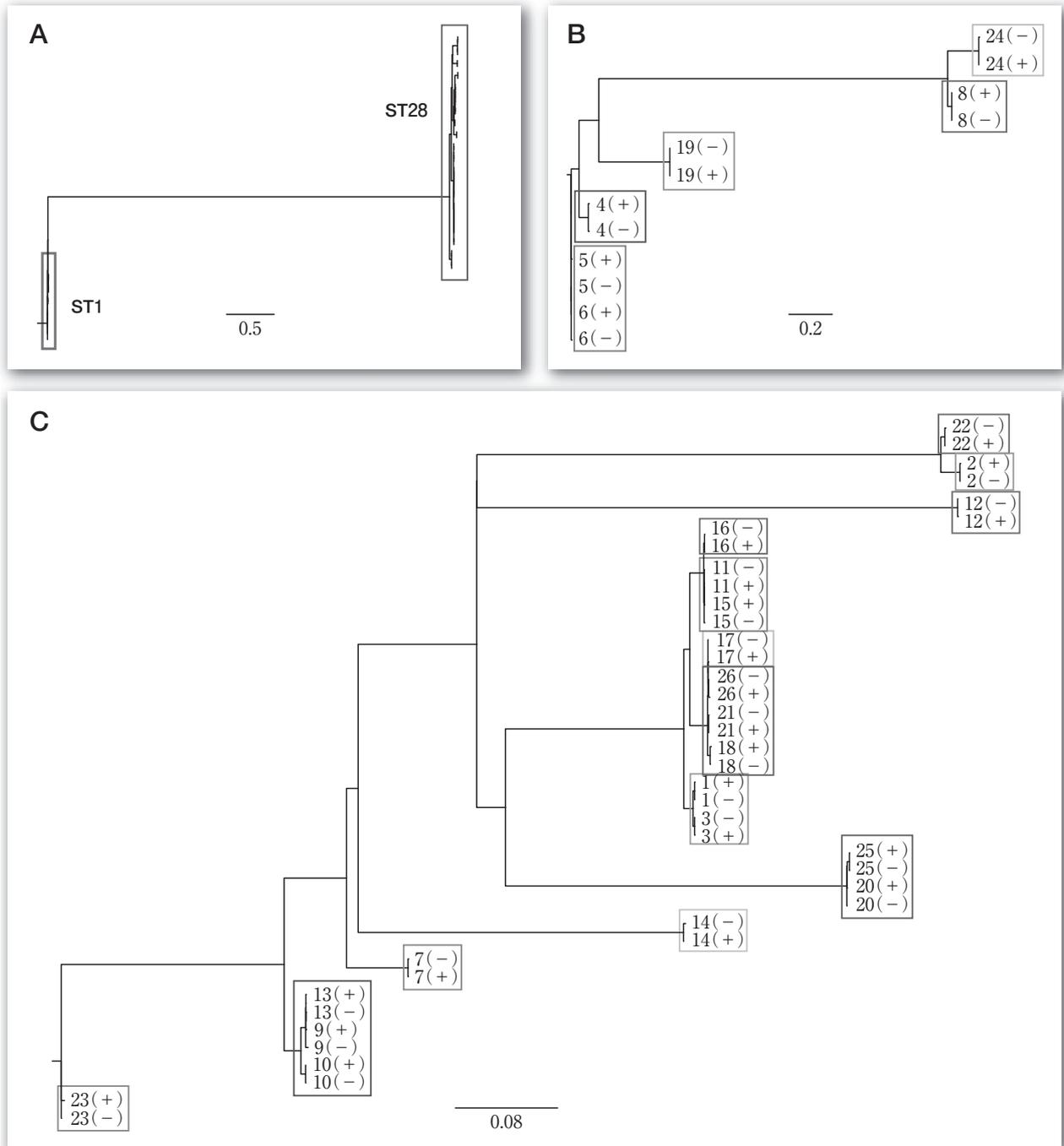


図5 分離された有莢膜菌と無莢膜菌の系統樹

A: 26 ペア 52 菌株の MLST 解析の結果と分岐.

B: ST1 だった 6 ペア 12 菌株の分岐.

C: ST28 だった 20 ペア 40 菌株の分岐. それぞれの数字はブタ個体番号であり, 括弧内には有莢膜菌と無莢膜菌が+と-でそれぞれ示されている. 菌株は農場ごとに四角枠で囲まれている. この系統解析の成績から農場ごとに分岐し, 最終的にはブタ個体ごとの有莢膜菌と無莢膜菌に分かれていくことが明らかとなった.

病変部から分離された有莢膜菌との相違箇所を精査した. その結果, 無莢膜菌は *cps* 遺伝子群のいずれかの遺伝子に突然変異が入っており, 数塩基程度の変異に対して, 変異していない有莢膜菌の *cps* 遺伝子を導入すると, 莢膜が産生され有莢膜菌に復帰することが確認されている.

5 おわりに

以上のように, 最近まで *S. suis* 無莢膜菌の毒力は低く, 発症に無関係なものと認識されていた. しかし, 本総説で述べたように分離菌株を詳細に解析してみると,

心内膜炎や関節炎では無莢膜菌が分離されている [27, 28]. また, 心内膜炎病変部では, 有莢膜菌と無莢膜菌が共存しており, この表現型の分岐が多くは農場内 (またはブタ個体内の環境) で起こっていることが明らかとなった. さらに, *S. suis* は各農場に潜伏しており, 感染を繰り返していることも同様に明らかとなった.

これらの知見は, *S. suis* 感染症成立の機序を根本的に理解する上で重要であり, *S. suis* が生体内で病変を形成する上での重要な戦略の一端を明らかにしている. また, このように異なる表現型の同一菌種による感染症の成立は, *S. suis* だけでなくその他の菌種でも成立し得ると考えられる. さらに, 一度農場に侵入した菌が豚に感染を繰り返しているという推測は, 農場の衛生管理の上でも重要な知見となる. これらの知見をきっかけに, 今後さらに高速シーケンサーを用いた解析が盛んになっていくことが予想される. この技術を用いることで, さまざまな環境サンプルの細菌叢解析が可能となり, *S. suis* の潜伏場所も明らかになっていくと期待される.

なお, 豚心内膜炎由来株の詳細な解析に用いた菌株は, 茨城県西食肉衛生検査所, 栃木県宇都宮市食肉衛生検査所, 及び山形県庄内食肉衛生検査所から分与戴いたもので, ここに謝意を表します.

引用文献

- [1] 高松大輔: *Streptococcus suis* の多様性と病原因子. 日本細菌学雑誌, 66, 7-21 (2011)
- [2] Fittipaldi N, Segura M, Greiner D, Gottschalk M: Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*, *Future Microbiol*, 7, 259-279 (2012)
- [3] Suankratay C, Intalaporn P, Nuthapisud P, Aruny-ingmongkol K, Wilde H: *Streptococcus suis* meningitis in Thailand, *Se Asian J Trop Med*, 35, 868-876 (2004)
- [4] Mai NT, Hoa NT, Nga TV, Linh LD, Chau TT, Sinh DX, Phu NH, Chuong LV, Diep TS, Campbell J, Nghia HD, Minh TN, Chau NV, de Jong MD, Chinh, NT, Hien TT, Farrar J, Schultsz C: *Streptococcus suis* meningitis in adults in Vietnam, *Infect Dis*, 46, 659-667 (2008)
- [5] Ferrando ML, de Greeff A, van Rooijen WJM, Stockhofe-Zurwieden N, Nielsen J, Schreur PJWS, Pannekoek Y, Heuvelink A, van der Ende A, Smith H, Schultsz C: Host-pathogen interaction at the intestinal mucosa correlates with zoonotic potential of *Streptococcus suis*, *J Infect Dis*, 212, 95-105 (2015)
- [6] Ishida S, Tien LHT, Osawa R, Tohya M, Nomoto R, Kawamura Y, Takahashi T, Kikuchi N, Kikuchi K, Sekizaki T: Development of an appropriate PCR system for the reclassification of *Streptococcus suis*, *J Microbiol Meth*, 107, 66-70 (2014)
- [7] Hill JE, Gottschalk M, Brousseau R, Harel J, Hemmingsen SM, Goh SH: Biochemical analysis, *cpn60* and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotype 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti*, *Vet Microbiol*, 107, 63-69 (2005)
- [8] Nomoto R, Maruyama F, Ishida S, Tohya M, Sekizaki T, Osawa R: Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotype 20, 22 and 26: *Streptococcus parasuis* sp. nov, *Int J Syst Evol Microbiol*, 65, 438-443 (2015)
- [9] Pan Z, Ma J, Dong W, Song W, Wang K, Lu C, Yao H: Novel variant serotype of *Streptococcus suis* isolated from piglets with meningitis, *Appl Environ Microbiol*, 81, 976-985 (2015)
- [10] King SJ, Leigh JA, Health PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, Whatmore AM: Development of a multi-locus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange, *J Clin Microbiol*, 40, 3671-3680 (2002)
- [11] Wang S, Gao M, An T, Liu Y, Jin J, Wang G, Jiang C, Tu Y, Hu S, Li J, Wang J, Zhou D, Cai X: Genetic diversity and virulence of novel sequence types of *Streptococcus suis* from diseased and healthy pigs in China, *Front Microbiol*, 6, 173 (2015), (online), (<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00173>), (accessed 2015-11-13)
- [12] Ye C, Zhu X, Jing H, Du H, Segura M, Zheng H, Kan B, Wang L, Bai X, Zhou Y, Cui Z, Zang S, Jin D, Sun N, Luo X, Zhang J, Gong Z, Wang X, Wang L, Sun H, Li Z, Sun Q, Liu H, Dong B, Ke C, Yuan H, Wang H, Tian K, Wang Y, Gottschalk M, Xu J: *Streptococcus suis* sequence type 7 outbreak, Sichuan, China, *Emerg Infect Dis*, 12, 1203-1208 (2006)
- [13] Athey TBT, Auger JP, Teatero S, Dumesnil A, Takamatsu D, Wasserscheid J, Dewar K, Gottschalk M, Fittipaldi N: Complex population structure and virulence differences among serotype 2 *Streptococcus suis* strains belonging to sequence type 28, *Plos One*, 2015, (online), (<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137760>), (accessed 2015-10-5)
- [14] Elliott SD, Tai JY: The type-specific polysaccharides of *Streptococcus suis*, *J Exp Med*, 148, 1699-1704 (1978)
- [15] Van Calsteren MR, Gagnon F, Lacouture S, Fittipaldi N, Gottschalk M: Structure determination of *Streptococcus suis* serotype 2 capsular polysaccharide, *Biochem Cell Biol*, 88, 513-525 (2010)
- [16] Segura M, Gottschalk M, Olivier M: Encapsulated *Streptococcus suis* inhibits activation of signaling pathways involved in phagocytosis, *Infect Immun*, 72, 5322-5330 (2004)
- [17] Benga L, Fulde M, Neis C, Goethe R, Valentin-Weigand P: Polysaccharide capsule and suilysin contribute to extracellular survival of *Streptococcus suis* co-cultivated with primary porcine phagocytes, *Vet Microbiol*, 132, 211-219 (2008)

- [18] Houde M, Gottschalk M, Gagnon F, Van Calsteren MR, Segura M : *Streptococcus suis* capsular polysaccharide inhibits phagocytosis through destabilization of lipid microdomains and prevents lactosylceramide-dependent recognition, *Infect Immun*, 80, 506-517 (2012)
- [19] Smith HE, Damman M, van der Velde J, Wagenaar F, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Smiths MA : Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor, *Infect Immun*, 67, 1750-1756 (1999)
- [20] Charland N, Harel J, Kobisch M, Lacasse S, Gottschalk M : *Streptococcus suis* serotype 2 mutants deficient in capsular expression, *Microbiology*, 144, 325-332 (1998)
- [21] Lakkitjaroen N, Takamatsu D, Okura M, Sato M, Osaki M, Sekizaki T : Loss of capsule among *Streptococcus suis* isolates from porcine endocarditis and its biological significance, *J Med Microbiol*, 60, 1669-1676 (2011)
- [22] Lakkitjaroen N, Takamatsu D, Okura M, Sato M, Osaki M, Sekizaki : Capsule loss or death: The position of mutations among capsule genes sways the destiny of *Streptococcus suis*, *FEMS Microbiol Lett*, 354, 46-54 (2014)
- [23] Tanabe S, Bonifait L, Fittipaldi N, Grignon L, Gottschalk M, Grenier D : Pleiotropic effects of polysaccharide capsule loss on selected biological properties of *Streptococcus suis*, *Can J Vet Res*, 74, 65-70 (2010)
- [24] Vanier G, Segura M, Friedl P, Lacouture S, Gottschalk M : Invasion of porcine brain microvascular endothelial cells by *Streptococcus suis* serotype 2, *Infect Immun*, 72, 1441-1449 (2004)
- [25] Benga L, Goethe R, Rohde M, Valentin-Weigand P : Non-encapsulated strains reveal novel insights in invasion and survival of *Streptococcus suis* in epithelial cells, *Cell Microbiol*, 6, 867-881 (2004)
- [26] Tenenbaum T, Papandreou T, Gellrich D, Friedrichs U, Seibt A, Adam R, Wewer C, Galla HJ, Schwerk C, Schroten H : Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood-cerebrospinal fluid barrier *in vitro*, *Cell Microbiol*, 11, 323-336 (2009)
- [27] Gottschalk M, Lacouture S, Bonifait L, Roy D, Fittipaldi N, Grenier D : Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada, *Vet Microbiol*, 162, 819-825 (2013)
- [28] Gomez E, Kennedy CC, Gottschalk M, Cunningham SA, Patel R, Virk A : *Streptococcus suis*-related prosthetic joint infection and streptococcal toxic shock-like syndrome in a pig farmer in the United States, *J Clin Microbiol*, 52, 2254-2258 (2014)