

サルモネラの診断・予防法の開発

課題番号 H11-新興-7

平成11年度 厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業) 研究報告書

平成12年3月

主任研究者 林 英 生
(筑波大学基礎医学系教授)

サルモネラの診断・予防法の開発

課題番号 H11-新興-7

平成11年度 厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業) 研究報告書

平成12年3月

主任研究者 林 英 生
(筑波大学基礎医学系教授)

サルモネラの診断・予防法の開発

課題番号 H11-新興-7

平成11年度 厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)

研究代表者

林 英生 筑波大学基礎医学系 教授

研究分担者

倉園久生 岡山大学保健衛生学科 教授

江崎孝行 岐阜大学医学部 教授

牧野壮一 帯広畜産大学畜産学部 助教授

中山周一 国立感染症研究所細菌部 主任研究官

研究目的の概要

サルモネラ属には血清型で2000種類以上もの菌種があり、それらは爬虫類からほ乳類まで幅広い自然宿主域に寄生している。サルモネラ属の分類法は国際的に議論が多く、なお完全な分類法はないが、ヒトに病原性のある血清型は限られている。しかし、その菌種は他の非ヒト病原サルモネラと混在しており、ヒト病原性サルモネラのみを制御する方策はない。多くの研究者達は病原因子としては現在約50種類の遺伝子が候補に挙げているが、そのほとんどは大腸菌と共通するものでありサルモネラ特異性因子はまだはっきりしない。また、サルモネラの病原因子遺伝子は生体内でのみ発現するものがあり、試験管で病原性を検定することがかなり困難である。したがってサルモネラ症の問題点は以下のように要約できる。

(1) サルモネラは多様な病原因子を産生しそれらが協奏的に作用して組織に障害を与え、コレラ菌のような特異的な病原因子が特定されていない。

(2) 血清型およびファージ型—外膜多糖体分子構造—が極めて多様で、2000種以上の血清型があり、疫学的にはその血清型・ファージ型を同定しなければならないために技術や労力が一般に普及しにくく、診断・同定が困難である。

(3) 宿主の感受性（動物種と人の個体の差）と感染防御機能（炎症反応や免疫反応）が多様で、症状に軽重があり、治療法、予後の予測が困難である。

これらの点が明らかになり、診断・同定方法が確立すれば、媒介・担体となりやすい食肉などの生産工程のHACCPが容易となり、食材を大量に調理する施設の環境管理も容易くなり、食品取扱者、取り扱い業者の健康診断などが簡便になることにより、
具体的には以下のような点を明らかにし、実用化を試みる。

(1) サルモネラの主要な病原因子（定着、侵入、毒素産生、炎症誘起因子など）を遺伝子と蛋白分子のレベルで同定する。

(2) ヒトに特異的に感染するサルモネラの遺伝学的な特性を明らかにする。

(3) 1および2の成果を利用した免疫抗体法、遺伝子診断法を確立する。

(4) 3の方法を一般食材に応用し、その有用性を調べる。

(5) サルモネラ症（敗血症を含む）の病理像を解析し、病原因子と宿主の感染防御機構（免疫機構、情報伝達機構）との反応様式を分子レベルで解明する。

(6) サルモネラのヒトへの伝播は鶏の食材をとおして感染することが多いので、鶏へのワクチンの開発を試みる。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

（総括）研究報告書

サルモネラの診断・予防法の開発

主任研究者 林英生 筑波大学基礎医学系教授

研究要旨

サルモネラは自然環境中に広く棲息し、両生類からヒトまで広範囲の動物に寄生し、疾病を惹起する場合がある。しかし、ヒトに疾病を惹起する菌株はある種の特定病原因子を保有するものに限られるはずであるが、その因子がまだ特定できていない。自然界に普遍的に棲息するサルモネラ属の中から、ヒトに特異的病原性を発揮する菌株を早期に検出し、食品への混入を防止するとともに、その病原因子の病理作用を解明しサルモネラ性胃腸炎の治療法を見出すことが本研究の目的である。

A. 研究目的

サルモネラは自然環境中に広く棲息し、両生類からヒトまで広範囲の動物に寄生し、疾病を惹起する場合がある。ヒトに敗血症と胃腸炎を惹起する *Salmonella* 属は遺伝学的には均一な属であるが鞭毛抗原と糖鎖の抗原により2000種類以上の血清型に細分されている。この中の特定の血清型のみが特異的な感染を起こすがその病原因子がまだ特定できていない。自然界に普遍的に棲息するサルモネラ属の中から、ヒトに特異的病原性を発揮する菌株を早期に検出し、食品への混入を防止するとともに、その病原因子の病理作用を解明しサルモネラ性胃腸炎の予防と有効な治療法を見出すことが本研究の目的である。

B. 研究方法

病原細菌学の研究方法に精通した研究者が共同して研究を行う。自然界に普遍的に棲息するサルモネラ属の中から、ヒトに特異的病原性を発揮する菌株を早期に検出し、食品への混入を防止するために、次のような方法を用いる。

病原因子の遺伝子解析としてはヒト由来菌の侵入に関する因子（様々な分泌蛋白と表面抗原など）を解析するために、広く、背景の確定した菌株を収集し解析するとともに、様々な遺伝子欠損株を作成し解析する実験法を作成する。そのために可能な遺伝子操作法は基本手技とし、菌株の分離同定、蛋白化学的な病原因子の解析、病原遺伝子の解析などを行う。食細胞内での増殖に関与する遺伝子を解析するためサルモネラの遺伝子チップを作成し食細胞内でのサルモネラのmRNAの発現を解析するシステムの作成する。

診断法の開発には、既知の病原因子の特定領域を指標とした、ランダムPCR法の開発、特定因子の抗体によるELIZAの開発、感染症の迅速診断および汚染食品の迅速診断のために遺伝子を15分で増幅できるcapillaryPCR法を用いて*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. paratyphiA*の迅速同定方法の作成を目指す。

サルモネラの腸炎の病理像はなお確立した所見がない。この方面からの研究は患者材料が入手できれば進展させる。

(倫理面への配慮)

分離菌株の背景である個人や特定場所は公表しないので、プラオバシーは保護され、倫理面への配慮は特段には要しない。

C. 研究結果

サルモネラの診断・同定

サルモネラの病原因子の一つと見なされる、エンテロトキシン遺伝子 (*stn*) を指標に、サルモネラの混入の有無を検出する方法を試行した。*stn* の特定の領域を指標としたPCR法で、細菌一個を検出することが可能であり、食品中(肉類)、糞便中からの検出には増菌培養を介在させれば1g中に100個程度の菌体の混入を検出することができた。

病原因子の特定の項で作成したprimerで各*Salmonella*の血清型の遺伝を特異的に増幅することを確認した。今後はCapillary法による検出系の感度の測定が残されている。InvAおよびEnterotoxinのprimerはsalmonella全体の検出に、*S. enteritidis*の検出にはrfbE遺伝子とfliCのgmp抗原を増幅する2つのprimerの組み合わせで検出系が作成できることが確認された。

病原因子の特定

ヒトに特異的に病原性を発揮するサルモネラの病原因子を特定するために、疫学的解析、侵入因子の分子機構、細胞内寄生機構を解析した。いか菓子の原因食とした茨城県内の食中毒事例から分離された*S. oranienburg*では、分離された場所(環境中、食肉処理場、およびヒトの糞便)に関らず、PFGEパターンは同一であった。しかし、ヒトから分離された菌株は約3kbのプラスミドを共通して保有しており、そのプラスミドを保有していた菌株は培養細胞への侵入性をしめした。

*Salmonella*において侵入能を担うsspBCD遺伝子は赤痢菌のipaBCDに相同性を示し、赤痢菌のipaBCD遺伝子は2成分制御系であるcpxR-cpxAの支配を受けている。サルモネラはcpxR-cpxAを保有しているため、これがサルモネラの侵入性に関与している機構を変異株を作製して解析した。

チフス菌はVi抗原の発現を環境の変化に応じて調節していることがわかった。食塩濃度が高い腸管ではViの発現を抑制していた。Viを抑制したチフス菌は鞭毛抗原を大量に発現し活発に分泌蛋白を生産していた。この分泌蛋白は生産するチフス菌は組織侵入生が高まり、約30分のでパイエル板の構造を破壊した。上皮細胞だけでなく基底膜を破壊し出血を誘導した。

分泌蛋白sipB, sipCおよびその分泌調節因子InvAを欠損させた株は全く侵入できなかったことからチフス菌の細胞侵入機構はこれらの分泌蛋白が重要な役割を果たしていることがわかった。一方これらの変異株は食細胞にどん食させると野生株以上に食細胞内でよく増殖したことから、分泌蛋白は食細胞内での増殖にはマイナスの因子であることがわかった。また食細胞内では野生株はViを大量に発現しており、分泌蛋白の生産は抑制されていた。Vi欠損株は食細胞内では増殖ができなかったことから食細胞内での増殖にはViの発現が不可欠であることがわかった。

チップに固定するDNAのprimerの作成まで研究が進展している。今後はPCR産物をチップに固定し、mRNAの発現を定量的に見る実験へと移行する計画でいる。

D. 考察

PCR法による検出法は実用化が可能である。他の遺伝子として侵入性遺伝子 (*invA*) を指標として検出する系は既に市販されているものもあるが、*stn*も*invA*のいずれも、サルモネラ属では亜種、血清型に関らず共通して保有しているので、起因菌として特定できるほどの特異性はまだ備えていない。今後はサルモネラの病原性は複合的な因子の協奏的な作用であることを考慮し、複合プライマーでの検出系を試行する必要がある。

病原因子の特定法をして3 kbのプラスミドと細胞侵入性との関連性が確立すれば、これを検出する方法を診断法として利用できるかもしれない。DNAチップを検出系に利用するには費用が高価すぎるが、これにより細胞内寄生性遺伝子が特定できればそれを診断に利用でき、環境・食品などのランダム検査でヒトや動物の感染を予防することができる。サルモネラは同一血清型においてもPFGEパターンは多様性を示し、しばしが感染経路の解析が困難である。各地で分離された*S. oranienburg*はむしろ例外的にPGGEパターンが一致している。しかし、この菌種が食中毒を惹起したのは珍しく、何らかの病原因子を新たに獲得した可能性もある。この点に注目して解析したところ新たに3kbのプラスミドが病原因子を担っている可能性が見いだされた。

E. 結論

ヒトに病原性のある特異的な遺病原因子の遺伝子および遺伝子産物を特定している。検出方法として遺伝子診断法の開発を試行している。また、遺伝子産物を免疫法にて検出する方法も試行している。

F. 研究発表

1 論文発表

Makino S. et al. 1999

Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples

J. Vet. Med. Sci. 61:1245-1247

Ezaki, T., Y. Kawamura, and E. Yabuuchi. 2000.

Recognition of nomenclatural standing of *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, and *S. typhimurium*, and conservation of the specific epithets enteritidis and typhimurium.

Int. J. Syst. Bacteriol. 50 (In press)

Ezaki, T. M. Amano, Y. Kawamura, and E. Yabuuchi 2000.

Proposal of *Salmonella paratyphi* sp. Nov., nom. Rev., and request for an opinion to conserve the specific epithet paratyphi in the binary combination *Salmonella paratyphi*. Int. J. Syst. Bacteriol. 50. (inpress)

Yabuuchi E. and T. Ezaki. 2000.

Arguments against the replacement of type species of the genus *Salmonella* from *S. choleraesuis* to *S. enterica* and the creation of word neotype species, and for conservation of *S. choleraesuis*. IJSEMÅA50, in press.

Xu, H.X, Y. Kawamura, N. Li, L. Zhao, T.M. Li, Z.H. Li, S. Shu, and T. Ezaki. 2000.

A rapid method to determine the G+C content of bacterial chromosomes by monitoring fluorescence intensity during DNA denaturation in a capillary tube. Int. J. Syst. Bacteriol. 50 (inpress)

Zhao, L. H. H. Hirose, Z.H. Li, Y. Kawamura, and T. Ezaki. 2000.

Vi-suppressed or deleted *Salmonella typhi* mutants produce massive invasion protein and become hyperinvasive to destruct ileal Peyer's patches and lamina propria.

Mol. Microbiol. (submitted to Molecular Microbiology)

Tapchaisri, P., P. Wangroongsarb, W. Panbangred, T. Kalambaheti, M. Chongsa-nguan, P. Srimanote, H. Kurazono, H. Hayashi, and W. Chaicumpa: 1999

Detection of *Salmonella* Contamination in Food Samples by Dot-ELISA, DNA Amplification and Bacterial Culture. Asian Pasific Journal of Allergy and Immunology 17: 41-51.

2. 学会発表

Zhao, L., T. M. Li, Z. Y. Li, H.X. Xu, Y. Kawamura, S. Shu, and T.

Ezaki. 1999. Vi suppressed *Salmonella typhi* produces massive secreted proteins and induces epithelia disruption of Peyer's patches within 20 minutes.

35th U.S.-Japan cholera and other bacterial enteric infections joint panel meeting, Baltimore, MD 184-189

Makino, S, Chongsanguan, M, Kurazono, H, and Hayashi H: Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. 第40回日本熱帯医学会・第14回日本国際保健医療学会合同大会（国立国際医療センター、東京都新宿区戸山）1999.9.3.-5.

G. 知的所有権の獲得状況

現時点では特に取得や申請をしていない。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
（分担）研究報告書

サルモネラの診断・治療法の開発
分担研究者 林英生 筑波大学基礎医学系教授

研究要旨

サルモネラは自然環境中に広く棲息し、両生類からヒトまで広範囲の動物に寄生し、疾病を惹起する場合がある。しかし、ヒトに疾病を惹起する菌株はある種の特定病原因子を保有するものに限られるはずであるが、その因子がまだ特定できていない。自然界に普遍的に棲息するサルモネラ属の中から、ヒトに特異的病原性を発揮する菌株を早期に検出し、食品への混入を防止するとともに、その病原因子の病理作用を解明しサルモネラ性胃腸炎の治療法を見出すことが本研究の目的である。

A. 研究目的

食中毒発生の正確な感染経路を特定するために、経歴ないし背景の明確な菌株を対象に分子疫学的な解析を行い、ヒトに感染した菌株の病原因子を特定する。

B. 研究方法

菌株の経歴、背景の確実なもの入手するために、茨城県衛生研究所管轄で分離されたサルモネラ株（血清型は衛生研究所で同定、179株）から、分離材料別に環境由来、食肉処理場由来、ヒト由来についてPFGE、リボタイピング、プラスミドプロファイルをしらべた。分離された菌株の内、73株は*S. oranienburg*であったので、今回は追跡調査がしやすい本菌株に限って解析した。病原因子の指標としては培養細胞への侵入性を検定した。

（倫理面への配慮）

分離菌株の背景である個人や特定場所は公表しないので、プラオバシーは保護され、倫理面への配慮は特段には要しない。

C. 研究結果

平成10年から11年に茨城県内で分離され、経歴の明らかな菌株は約180株にのぼった。血清型としては*S. Enteritidis*がもっとも多く、ついで*S. Typhimurium*であった。いか菓子原因食とした*S. oranienburg*が茨城県内にもかなり多数発生していたので、これについて検出由来材料別に調べたところ、PFGEパターンは同一であり、リボタイピングでも特徴はみられなかった。ヒトから分離された菌株のプラスミドプロファイル調べたところ、4種類（3kb、2.5kb、2.9kbおよび1.5kb）のは約3kbのプラスミドを共通して保有していたが、そのうち3kbのそのプラスミドを保有していた菌株は培養細胞への侵入性をしめした。このプラスミドの遺伝子構造を解析し病原因子との関連性を詳細に検討している。

D. 考察

サルモネラは同一血清型においてもPFGEパターンは多様性を示し、しばしが感染経路の解析が困難である。各地で分離された*S. oranienburg*はむしろ例外的にPGGEパターンが一致している。しかし、この菌種が食中毒を惹起したのは珍しく、何らかの病原因子を新たに獲得した可能性もある。この点に注目して解析したところ新たに3kbのプラスミドが病原因子を担っている可能性が見いだされた。

E. 結論

ヒトに病原性を発揮する特異的な遺伝子を担う3kbのプラスミドが同定できる可能性がある。

F. 研究発表

Tapchaisri, P., P. Wangroongsarb, W. Panbangred, T. Kalambaheti, M. Chongsanguan, P. Srimanote, H. Kurazono, H. Hayashi, and W. Chaicumpa: Detection of *Salmonella* Contamination in Food Samples by Dot-ELISA, DNA Amplification and Bacterial Culture. *Asian Pasific Journal of Allergy and Immunology* (1999) 17: 41-51.

Makino S. et al. 1999

Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples

J. Vet. Med. Sci. 61:1245-1247

2. 学会発表

Makino, S, Chongsanguan, M, Kurazono, H, and Hayashi H: Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. 第40回日本熱帯医学会・第14回日本国際保健医療学会合同大会（国立国際医療センター、東京都新宿区戸山）1999.9.3.-5.

G. 知的所有権の獲得状況

現時点では特に取得や申請をしていない。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

サルモネラの診断・予防法の開発に関する研究
分担研究者 倉園久生 岡山大学医学部教授

研究要旨

サルモネラ属菌による食中毒事例は世界中で増加傾向にあり、先進国を含めて毎年、死者が出ている。サルモネラ症は本菌で汚染された畜産および水産食品の摂取により引き起こされるため、これらの食品に対する不断の監視が最も重要である。本研究では、サルモネラの病原因子であるエンテロトキシンの免疫学的迅速診断法を開発し、サルモネラにより汚染された食品に対する簡便かつ迅速な検出法の確立を行う。

A. 研究目的

サルモネラ属菌の病原因子はまだ不明な点が多い。現在、厚生行政上で問題になっているサルモネラ腸炎を起こす病原因子は、侵入性因子、エンテロトキシン、サイトトキシン等が報告されているがまだ決定的ではない。しかし、サルモネラを投与した幼弱ウサギの腸管絨毛には顕著な液体貯留が見られることから、エンテロトキシンの関与は明らかである。更に、サルモネラ属菌に存在するエンテロトキシン遺伝子に対して構築したPCRの系を用いて、他の腸内細菌を調べたところ、この遺伝子はサルモネラ属菌にしか存在しない事が判明した。以上の結果より、サルモネラ・エンテロトキシンに対する免疫学検出法の構築は、1)サルモネラ属菌に対して特異的である、2)末端の検査機関においても既存の設備で検査が可能である、3)この検出法を用いてサルモネラ・エンテロトキシンの精製を行い、このエンテロトキシンの詳細な作用機作の研究が可能になり、最終的なワクチン開発への重要なステップとなる、等を可能にする。

B. 研究方法

既報のサルモネラ・エンテロトキシン遺伝子（以下*stn*遺伝子と略す）をPCR法によりクローニングし、種々の発現ベクターを用いて大腸菌での発現を試みたが、大腸菌に著しい毒性を示し、発現実験は不調に終わった。このため、まず、*stn*遺伝子から推定されるアミノ酸配列からエピトープと考えられるペプチドを合成し、これらのペプチドに対する家兎抗血清を用いて迅速検出法の構築を目指した。

1)サルモネラ・エンテロトキシン（以下STNと略す）のエピトープと考えられるペプチドの合成：STNのアミノ酸配列よQPDSKDRAFTLNTFとALGKVFRQPFDRERを選び、F-Moc法により合成した。

2)各々のペプチドに対する抗家兎血清の調整：各々のペプチドはKeyhoke Limpet Hemocyaninと結合させ、定法に従い、家兎に免疫した。

3)抗ペプチド特異家兎IgGの調整：各々の合成ペプチドをFMP活性化セルロファインカラムに固定し、それぞれの抗ペプチド家兎血清に対してアフィニティ・クロマトグラフィー

を行い、抗ペプチド特異IgGを調整した。

4) Western blotting法によるSTNの検出：PCR法により *stn* 遺伝子の存在が確認された臨床分離株の、*Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis*, *S. Anatum*, *S. Choleraesuis*, および *S. Typhi* の培養上清を12% SDS-PAGEにかけ、分離された蛋白をPVDF膜にtransferした。このブロットに対して抗ペプチド特異家兎IgGを用いて、定法に従いWestern blotting解析を行った。

(倫理面への配慮)

抗原として用いたペプチドはSTNの一部であり、合成した物であるので感染や毒性等の危険はない。

家兎の免疫に際しては、岡山大学医学部動物実験施設に倫理面を含む実験計画書を提出し、その許可を取得しているため、問題はないと考える。

C. 研究結果

1) 抗ペプチド家兎血清の力価：免疫後の抗ペプチド力価は、Plate ELISA法で、それぞれ213および217であった。

2) Western blotting解析：いずれの菌株の上清にも抗ペプチド特異IgGと反応する約3.3 kDaのバンドが見られた。このバンドの分子量は、推定されるSTNの分子量と一致した。

D. 考察

今回得られた、抗ペプチド家兎血清は、アフィニティ・クロマトグラフィーにより抗ペプチド特異IgGにまで調整することにより、Western blotting解析でSTNに特異的なバンドを検出することが出来た。このバンドは他の腸内細菌科の細菌には見られなかった。

次に多数のサルモネラ属菌を同時に検出するために、Dot blotting法による解析を試みたが、backgroundが高すぎて検出が困難であった。

サルモネラ属菌の不断の監視には、設備が十分でない末端の検査所でも検査可能な検出法の構築が急務である。現在、今回構築した、Western blotting法を用いて、完全なSTNの精製を行っている。次年度以降はSTNの精製を完了して、これに対する抗血清を調整し、どのようなサンプルに対しても検出可能な診断法の確立を目指す。

E. 結論

今回作成した抗ペプチド家兎特異IgGは、Western blotting法によりSTNを特異的に検出することが出来た。さらに、サルモネラ属菌以外の腸内細菌の培養上清には反応しなかった。しかし、Dot blotting法に使用するとbackgroundが高く、検出不能になることから、ペプチド抗体の限界であった。簡便かつ迅速な同定法の構築のためには、完全なSTNの精製が必要不可欠である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tapchaisri, P., P. Wangroongsarb, W. Panbangred, T. Kalambaheti, M. Chongsa-nguan, P.

Srimanote, H. Kurazono, H. Hayashi, and W. Chaicumpa: Detection of *Salmonella* Contamination in Food Samples by Dot-ELISA, DNA Amplification and Bacterial Culture. Asian Pasific Journal of Allergy and Immunology (1999) 17: 41-51.

2. 学会発表

Makino, S, Chongsanguan, M, Kurazono, H, and Hayashi H: Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. 第40回日本熱帯医学会・第14回日本国際保健医療学会合同大会（国立国際医療センター、東京都新宿区戸山）1999.9.3.-5.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

Salmonellaの病原性の解析および迅速診断法の開発

分担研究者 江崎孝行 岐阜大学医学部教授

研究要旨

Salmonella属の菌種は遺伝学的に均一であるが抗原により2000種類以上の血清型に細分されている。この中の特定の血清型が特定の動物に特異的な感染を起こすので、侵入における分泌蛋白と表面抗原の役割を解析することを目的として遺伝子欠損株を作成し解析した。また細胞内での増殖に関与する遺伝子を解析するためサルモネラの遺伝子チップを作成し食細胞内でのサルモネラのmRNAの発現を解析するシステムの作成した。また、サルモネラ感染症の迅速診断および汚染食品の迅速診断のために遺伝子を15分で増幅できるcapillaryPCR法を用いて*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. paratyphiA*の迅速同定方法の作成を目指した。

A. 研究目的

Salmonella属の菌種は遺伝学的に均一であるが鞭毛抗原と糖鎖の抗原により2000種類以上の血清型に細分されている。この中の特定の血清型が特定の動物に特異的な感染を起こすがその理由は解明されていない。

1. 我々はチフス菌を用いて菌種が特異的にヒトに病気を起こす理由を解析するため、侵入における様々な分泌蛋白と表面抗原の役割を解析することを目的として様々な遺伝子欠損株を作成し解析する実験法を作成した。

2. 食細胞内での増殖に関与する遺伝子を解析するためサルモネラの遺伝子チップを作成し食細胞内でのサルモネラのmRNAの発現を解析するシステムの作成を計画した。この成果は将来のワクチン開発の基礎データを提供できると予測している。

3. サルモネラ感染症の迅速診断および汚染食品の迅速診断のために遺伝子を15分で増幅できるcapillaryPCR法を用いて*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. paratyphiA*の迅速同定方法の作成を目指した。

B. 研究方法

1. チフス菌の表面抗原であるVi抗原の合成遺伝子群および侵入に関与する蛋白とその発現調節遺伝子群をhomologous recombination法でin frame deletion mutantsを作成し、培養細胞を用いた感染実験、およびラットの腸管を使った感染実験を行い野生株と比較し、機能を解析する。

2. サルモネラの遺伝子約500種類を選択しチップに固定するためのprimerを作成す

る。

遺伝子は3末端から5末端に向けて原則として1000塩基の長さになるようにデザインした。

3. *Salmonella*のO抗原の合成遺伝子、vi遺伝子、および鞭毛のflagellin遺伝子を使いヒトに病気を起こす主要は*Salmonella*の血清型を同定検出する11種類のprimersセットを作成した。

C. 研究結果

1. チフス菌はVi抗原の発現を環境の変化に応じて調節していることがわかった。食塩濃度が高い腸管ではViの発現を抑制していた。Viを抑制したチフス菌は鞭毛抗原を大量に発現し活発に分泌蛋白を生産していた。この分泌蛋白は生産するチフス菌は組織侵入生が高まり、約30分のでパイエル板の構造を破壊した。上皮細胞だけでなく基底膜を破壊し出血を誘導した。

分泌蛋白sipB, sipCおよびその分泌調節因子InvAを欠損させた株は全く侵入できなかったことからチフス菌の細胞侵入機構はこれらの分泌蛋白が重要な役割を果たしていることがわかった。一方これらの変異株は食細胞にどん食させると野生株以上に食細胞内でよく増殖したことから、分泌蛋白は食細胞内での増殖にはマイナスの因子であることがわかった。また食細胞内では野生株はViを大量に発現しており、分泌蛋白の生産は抑制されていた。Vi欠損株は食細胞内では増殖ができなかったことから食細胞内での増殖にはViの発現が不可欠であることがわかった。

2. 今年度の研究ではチップに固定するDNAのprimerの作成まで研究が進展している。今後はPCR産物をチップに固定し、mRNAの発現を定量的に見る実験へと移行する計画でいる。

3. 作成したprimerで各*Salmonella*の血清型の遺伝を特異的に増幅することを確認した。今後はCapillary法による検出系の感度の測定が残されている。InvAおよびEnterotoxinのprimerはsalmonella全体の検出に、*S. enteritidis*の検出にはrfbE遺伝子とfliCのgmp抗原を増幅する2つのprimerの組み合わせで検出系が作成できることが確認された。

D. 考察

*Salmonella*は腸管、食細胞内で表面抗原、分泌蛋白の発現を調節し巧みの環境に適応し生育している。これらの現象の全容を解析するには多数のmRNAを幅広く解析できるDNAチップを使った解析が不可欠である。また生菌ワクチンが有効とされるsalmonellaのワクチン開発にもこれらのDNAチップを使った食細胞内での発現遺伝子の解析は重要な貢献ができると考えている。*Salmonella*の食品汚染が進行している中で

capillary PCRを使った迅速同定、検出藻社会的には重要なテーマである。CapillaryPCR法ではsample中のSalmonellaの量もrealtimeで定量できることから、新鮮な食品を迅速に出荷しなければならない市場にも重要な貢献ができると期待している。

F. 研究成果発表

1. 論文発表

Ezaki, T., Y. Kawamura, and E. Yabuuchi. 2000.

Recognition of nomenclatural standing of *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, and *S. typhimurium*, and conservation of the specific epithets enteritidis and typhimurium.

Int. J. Syst. Bacteriol. 50 (In press)

Ezaki, T. M. Amano, Y. Kawamura, and E. Yabuuchi 2000.

Proposal of *Salmonella paratyphi* sp. Nov., nom. Rev., and request for an opinion to conserve the specific epithet paratyphi in the binary combination *Salmonella paratyphi*. Int. J. Syst. Bacteriol. 50. (inpress)

Yabuuchi E. and T. Ezaki. 2000.

Arguments against the replacement of type species of the genus *Salmonella* from *S. choleraesuis* to *S. enterica* and the creation of word neotype species, and for conservation of *S. choleraesuis*.

IJSEM, 50, in press.

Xu, H.X, Y. Kawamura, N. Li, L. Zhao, T.M. Li, Z.H. Li, S. Shu, and T.

Ezaki. 2000.

A rapid method to determine the G+C content of bacterial chromosomes by monitoring fluorescence intensity during DNA denaturation in a capillary tube. Int. J. Syst. Bacteriol. 50 (inpress)

Zhao, L. H. H. Hirose, Z.H. Li, Y. Kawamura, and T. Ezaki. 2000.

Vi-suppressed or deleted *Salmonella typhi* mutants produce massive invasion protein and become hyperinvasive to destruct ileal Peyer's patches and lamina propria.

Mol. Microbiol. (submitted to Molecular Microbiology)

2. 学会発表

Zhao, L., T. M. Li, Z. Y. Li, H.X. Xu, Y. Kawamura, S. Shu, and T.

Ezaki. 1999. Vi suppressed *Salmonella typhi* produces massive secreted proteins and induces epithelia disruption of Peyer's patches within 20 minutes.

35th U.S.-Japan cholera and other bacterial enteric infections joint panel meeting. Baltimore, MD. p 184-189.

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

分担研究報告書

サルモネラ特異的 PCR 法の確立とその食品や糞便検査への応用

分担研究者 牧野壮一 帯広畜産大学畜産学部家畜微生物学教室助教授

研究要旨

サルモネラは食中毒の原因菌として各種食品を汚染して、結果的にヒトの食中毒の原因となる。しかも、近年卵のサルモネラ汚染や食肉のサルモネラ汚染が大きな問題となっており、食中毒の発生件数も常に上位である。そこで、サルモネラを食品から迅速に検出する方法の確立は極めて食品衛生条重要な課題である。同様に、サルモネラ汚染動物を摘発するためにも、糞便からサルモネラを迅速に検出する方法の確立も急務であるといえる。現在一般的に行われているサルモネラの検出方法は、食品や糞便を増菌培地にて一晚培養し、それを選択培地に接種してサルモネラ特異的なコロニーの検出を行い、血清型によりサルモネラを診断する。ヒトの食中毒患者からは糞便から直接選択培地に接種して分離できることもあるが、それ以外は、少なくとも 3 日間は必要である。我々はサルモネラのエンテロトキシン産生遺伝子 (stn) 配列を利用し、サルモネラ特異的 PCR 法を確立した。ミンチ肉と糞便サンプルにサルモネラを混入させて調べた結果、増菌方法を併用することで 1 グラム当たり 1 個の菌が存在すれば検出可能であった。最終結果を導きだすのに、一日半要するのみであった。このことは、今回確立したサルモネラ属全てに共通な検出系は、公衆衛生分野で有効であると言える。また今回確立した方法は、

A. 研究目的

サルモネラは食中毒の原因菌として各種食品を汚染して、結果的にヒトの食中毒の原因となる。しかも、近年卵のサルモネラ汚染や食肉のサルモネラ汚染が大きな問題となっており、食中毒の発生件数も常に上位である。そこで、サルモネラを食品から迅速に検出する方法の確立は極めて食品衛生条重要な課題である。同様に、サルモネラ汚染動物を摘発するためにも、糞便からサルモネラ

を迅速に検出する方法の確立も急務であるといえる。現在一般的に行われているサルモネラの検出方法は、食品や糞便を増菌培地にて一晚培養し、それを選択培地に接種してサルモネラ特異的なコロニーの検出を行い、血清型によりサルモネラを診断する。ヒトの食中毒患者からは糞便から直接選択培地に接種して分離できることもあるが、それ以外は、少なくとも3日間は必要である。そこで、本課題では、サルモネラの迅速検出系をPCR法を利用して確立することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1) 菌株および培養方法

動物由来89株、ヒトの食中毒由来サルモネラ432株、および食品由来131株を用いた(表1および表2)。動物由来株は20血清型に及び、62株はウシから(糞便由来52株、農場環境由来3株、肝臓、腎臓および腸管由来各1株づつ)、他の27株は食鳥処理場の鶏から分離されたものである。その他、サルモネラ特異性を確認するために用いた菌種は以下に示す。グラム陽性菌は、*Listeria monocytogenes* (血清型1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6, 7)、*L. innocua*、*L. seeligeri*、*L. welshimeri*、*L. ivanovii*、*L. grayi*、*L. murrayi*、*Clostridium botulinum* 003-9、*Clostridium difficile* 7626、*Clostridium perfringens* 5256、*Corynebacterium diphtheriae* 3182、*Corynebacterium pyogenes*、*Erysipelothrix rhusiopathiae*、*Enterococcus faecalis* 8357、*Streptococcus suis*、*Lactococcus lactis* 8591、*Mycobacterium tuberculosis* 27874、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae*、*Bacillus cereus* HSCC187、*B. cereus* HSCC1049、*B. cereus* HSCC1207、*B. thuringiensis* HSCC345、*B. mycoides* HSCC395、*B. pseudomyces* HSCC1477、*B. weihenstephanensis* HSCC1480、*B. amyloliquefaciens* IAM 1521、*B.adius* IAM 11059、*B. cereus* IAM 12605、*B. circulans* IAM 12462、*B. firmus* IAM 12464、*B. licheniformis* IAM 13417、*B. megaterium* IAM 13418、*B. mycoides* IAM 1190、*B. pumilus* IAM 12469、*B. sphaericus* IAM 13420、*B. subtilis* IAM 12118、*B. thuringiensis* IAM 12077、*B. subtilis* UOTO 277、*B. subtilis* ISW 1214、*B. megaterium* # 210、*B. cereus* # 211、*B. thuringiensis* # 212、*B. nato* # 213、*B. subtilis* # 360、*B. brevis* HPD 31、*B. anthracis* No.2、*B. anthracis* 34-F2である。グラム陰性菌は*Actinobacillus pleuropneumoniae* Ngl、*Aeromonas* sp. ATCC 9071、*Campylobacter fetus*