

8746、Campylobacter jejuni 91-569、Enterohemorrhagic Escherichia coli、Enteropathogenic Escherichia coli、Enterotoxigenic Escherichia coli、Klebsiella pneumoniae IID5209、Legionella pneumophila 10260、Pasteurella multocida 87-37、Proteus vulgaris IID874、Pseudomonas acidovorans 11501、Pseudomonas aeruginosa P13、Serratia marcescens IID5218、Shigella flexneri YSH6000、Vibrio cholerae IID936、Vibrio parahaemolyticus 91-572、Yersinia enterocolitica、Yersinia pseudotuberculosis である。

Table 1. Salmonella strains used in this study.

Serovar	Cattle	Fowl
S. Agona	1	3
S. Anatum	1	-
S. Bredeney	3	-
S. Cerro	-	3
S. Dublin	16	-
S. Enteritidis	6	-
S. Give	-	7
S. Hadar	2	-
S. Infantis	1	2
S. MontevideoS.	-	3
Newport	2	-
S. Panama	1	-
S. Senftenberg	-	5
S. Typhimurium	21	2
other serovars	5	2
Unidentified	3	-
Total	62	27

2) PCR法の条件およびプライマーの設定

各菌株は一晩培養した培養液を使用した。各培養液を滅菌蒸留水で100倍希釈し、その希釈液を95℃、15分間加熱し、その後15000rpm、5分間遠心した。その上清の1μlを直接PCRに使用した。PCRの条件は、[94℃30秒間、55℃30秒間、72℃1分間]のサイクルを計25回繰り返す、アガロースゲル電気泳

動により増幅産物を確認した。使用したプライマーは
Stn-101 (5'-CTTTGGTCGTAAAATAAGGCG-3')

Stn-111 (5'-TGCCCAAAGCAGAGAGATTC-3')

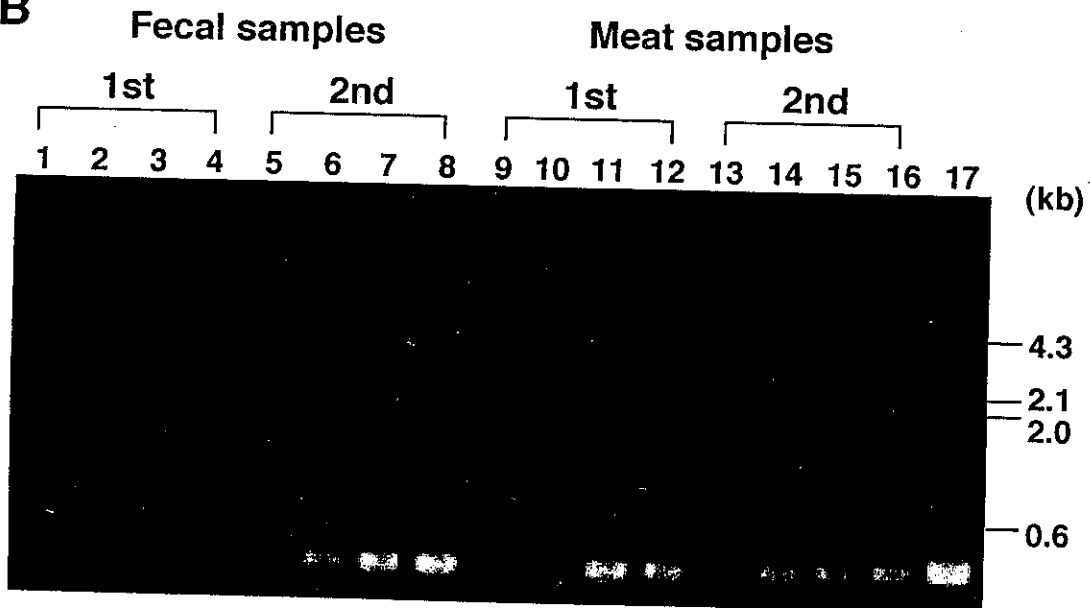
であり、サルモネラのエンテロトキシンを支配する遺伝子 (stn) の塩基配列
(accession number L16014) をもとに作成し、260 塩基対 (bp) の増幅産
物が確認できる。

A



Fig. 1.

B



3) 食品および糞便からのサルモネラの PCR による検出方法

糞便は健康なウシの新鮮糞便を用いた。食品はサルモネラ汚染がミンチ肉に多いことから市販のハンバーグパテを購入し使用した。各サンプル1グラム当たり0、1、10、および100個の *S. Enteritidis* を人工的に混入させて実験を行った。それらのサンプル1グラムにトリプトソイブイヨン (TSB) 10ml を加え、12時間培養した (1次増菌液)。更に、その増菌液の 0.1ml を 5ml の TSB に混

合し、6 時間振盪培養した（2次増菌液）。その 1ml をとり、遠心後、滅菌水で洗浄し、最終的に 1ml の滅菌水に懸濁し、95℃で、15 分間加熱後、その 1 μ l を直接 PCR に用いた。

C. 研究結果

表 1 および表 2 に示した全てのサルモネラ菌株に、共通に 260 b p の増幅産物が確認された。さらに、表 3 に示したサルモネラ以外の菌株では増幅産物が検出できなかった。このことは、今回確立した PCR 法はサルモネラ属特異的な検出法であることを意味している。また、食品および糞便への応用では、2 次増菌液を使用すると 1 グラム当たり一個のサルモネラが存在すれば、260 b p の増幅産物が検出できた。しかし、糞便サンプルでは、1 次増菌液からは全く増幅産物が確認できなかった。それに反して、食品からは 1 次増菌液からは、1 グラム当たり一個以上の菌体があれば、260 b p の増幅産物が確認できた。

D. 考察

1) サルモネラのエンテロトキシン遺伝子はサルモネラに共通の遺伝子であるとともに、サルモネラ特異的な遺伝子であることが本研究から明らかになった。このことは、サルモネラがこの遺伝子産物を共通に産生していることが明らかになれば、今回確立した遺伝学的な検出方法のみならず、菌体が検出できないがサルモネラに感染しているヒトや動物の免疫学的な検出法等への応用が可能になるかもしれない。次年度以降の検討課題になろう。

2) 迅速検出という観点で PCR 法を応用したが、通常の検査法では 3 日間は要するのに反し、今回確立した方法は一日半で結果が出るため迅速性に優れているといえる。しかし、迅速化は出来ればその日に判定可能な方が優れている。特に、検体から直接検出が出来る方法が最も優れている。現在その方法を検討しているところであり、次年度以降の課題である。しかし、今回の方法は技術的になれたヒトであれば、非常に簡便な方法であり、現場に対応しているといえる。さらに、サルモネラ菌種共通の PCR 法のため、サルモネラ汚染のスクリーニングに最も適した方法であるといえる。食品衛生現場での応用が可能であると期待している。

E. 結論

1) サルモネラ属共通の PCR 法を確立した。

2) 食品および糞便からサルモネラを迅速に検出するためのサンプル処理方法を確立した。

F. 研究発表

- 1) S-I. Makino, M. Chongsanguam, H. Kurazono, H. Hayashi, H. Chun, S. Suzuki, T. Shirahata. 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

Fig. 1. PCR amplification using representative animal-origin Salmonella isolates (A) and its practical use (B).

S. Typhimurium was artificially contaminated into 1 gram of fecal (lanes 1 to 8) and meat (lanes 9 to 16) samples at final number of 0 (lanes 1, 5, 9 and 13), 1 (lanes 2, 6, 10 and 14), 10 (lanes 3, 7, 11 and 15) and 100 (lanes 4, 8, 12 and 16) cells. 1st, first enrichment culture; 2nd, second enrichment culture. Lane17, DNA samples purified from S. Typhimurium.

厚生科学研究費補助金（新興・再興研究事業）

（分担）研究報告書

サルモネラ菌の菌体内情報伝達を攪乱する抗菌治療法の開発に関する研究

分担研究者 中山周一 国立感染症研究所 主任研究官

研究要旨

赤痢菌とサルモネラ菌の細胞侵入機構の類似点に着目して、この表現型に関与する赤痢菌における最上位の制御遺伝子 *cpxR-cpxA* が、サルモネラでの細胞侵入にも関与する可能性を検定した。このうち *cpxA* については、少なくともある条件で細胞侵入能の発現活性化に関与することが分かった。

A. 研究目的

Salmonella と *Shigella* の腸管上皮細胞への侵入性発現機構には類似点が多い。*Shigella* の場合、*ipaBCD* 遺伝子産物が菌の上皮細胞への侵入能を直接担う。*ipaBCD* 遺伝子は *virF*, *invE* という2つの制御遺伝子によって正に調節されることが明らかになっている。さらに、*virF* の発現は pH による制御を受け、それには2成分制御系遺伝子 *cpxR-cpxA* が関与し、特に *cpxR* は *virF* の発現に必須な因子であることが分担研究者、中山らによって報告されている。*Salmonella* において侵入能を担う *sspBCD* は *ipaBCD* に相同性を示す。また、*sspBCD* 遺伝子の発現制御遺伝子 *hilA*, *invF* について、*invF* は *Shigella* の *virF* とある程度の相同性を示すことや、*hilA* 発現は *virF* 発現同様、pH による制御を受けること等が明らかにされた。このような背景から、両菌種間の侵入性遺伝子を環境条件依存的に活性化する因子も共通である可能性がある。本研究では *Salmonella* における *cpxR-cpxA* 相同遺伝子の探索、及びその遺伝子の *hilA*、*sspBCD* 遺伝子発現や、総体的病原性への関与を検討することを目的とした。

B. 研究方法

この目的のため、まず *Salmonella* の *cpxR-cpxA* の探索を試み、実際にそれが存在した場合、当該遺伝子の欠損株を作製することとした。結果、先ず、*Salmonella* が *cpxR-cpxA* 相同遺伝子を持つかどうかを大腸菌 *cpxR-cpxA* をプローブとした Southern hybridization で検定した。次いで、*Salmonella* の *cpxR-cpxA* 領域のクローニングを大腸菌 *cpxR* 変異株の表現型（クローン化した赤痢菌 *virF* を発現できない）を相補するクローンを選択する方法で行った。得られたクローンを基に、*cpxR*、*cpxA* それぞれの reading frame 内に Km 耐性カセットを挿入した Disrupted copy を自殺ベクター上に構築し、*Salmonella* 染色体と相同組み換えによる各遺伝子の変異株を分離した。得

られた各変異株について、hilA遺伝子の発現をモニターした。hilA-lacZ転写融合遺伝子を持つプラスミドを作製し、野生株、各変異株に保持させ、pH6.0とpH8.0での発現を測定した。これは、赤痢菌、大腸菌においては、cpxR-AがpH依存的な遺伝子発現制御を行うことから、類似の現象がサルモネラでも起こる可能性を鑑みて試行した実験条件である。また、各遺伝子変異株の実際の細胞侵入度をINT407 Cell lineを用いて測定した。各菌をMOI ~10で細胞に感染させ、侵入した細菌数のInitial Inculumに対する比率で侵入度を定量化した。この実験でもpH6.0とpH8.0の培養後の条件を設定した。

C. 研究結果

cpxR-Aのサザンハイブリダイゼーションでは、High stringencyの条件でも大腸菌と同程度の強さのシグナルが検出され、両菌種間でのこの遺伝子の相同性がかなり高いことが示唆された。これにより、次いで、SalmonellaのcpxR-cpxA領域のクローニングを大腸菌cpxR変異株の表現型（クローン化した赤痢菌virFを発現できない）を相補するクローンを選択する方法で行った。いくつかの断片のクローン化に成功したが、4.5kbのEcoRV断片には、cpxR-cpxAオペロンと、大腸菌で報告されているcpxP遺伝子が完全に含まれていることが塩基配列決定によってわかった。cpxPがcpxR-cpxAの直ぐ上流に逆向きに存在する位置関係も共通であった。各遺伝子産物の予想されるアミノ酸配列は両菌種間でそれぞれ90%以上の相同性が見られた。この断片を材料に、cpxR、cpxAそれぞれのreading frame内にKm耐性カセットを挿入したDisrupted copyをRnaseH感受性repliconを持つ自殺ベクターpKH5002上に構築し、Salmonella染色体と相同組み換えを試みたが、組み換え体を得ることができなかった。SalmonellaにおけるcpxR-cpxAのessentialityの予備検定では、essentialityを補強するデータが得られなかった

ため、さらに長いDNA断片のクローン化を試み、得られた6.5kbのSalI断片を使用したところ、目的の組み換え体を得ることができた。得られた組み換え体の染色体構造は今回クローン化したサルモネラのcpxR-cpxA遺伝子断片を用いたサザンハイブリダイゼーションで確認した。Salmonella染色体のこの領域では、比較的長く、Salmonellaのidentityを規定する塩基配列が存在しないことが示唆されるが、その生物学的意義については今後の解析と検討を待たねばならない。hilA遺伝子の発現は、pH6.0での培養後、cpxA変異株においてのみ、野生株や、cpxR変異株の約7分の1程度にまで低下した。pH8.0では野生株との発現量の差は見られなかった。また、このことから予想されるように、細胞侵入能もcpxA変異株のpH6.0培養後のみ、10分の1程度低下した。

D. 考察

C.の項より明らかなように、cpxA遺伝子は、pH6.0での培養条件でのhilA発現、従っ

てその制御下にあるsspBCD発現、最終的には細胞侵入能の活性化に強く関与することが分かった。これらの実験はin vitroでのものであるので、pH8.0ではin vivoでのこれらの現象へのcpxAの関与は今後の課題である。また、cpxAとcognate pairをなすと考えたcpxRは上記の遺伝子発現や表現型に関与するデータが得られなかった。このことから、このregulatory circuitにおいて、センサーであるcpxAと連絡し、直接転写活性化をおこなうレギュレーターはcpxR以外のものである可能性が考えられ、それを同定することが次なる課題となった。

E. 結論

サルモネラ菌cpxA遺伝子は、少なくとも、ある条件下では細胞侵入能を司る遺伝子群のアクチベーター遺伝子、hilAの発現そのものを上昇させる機能を持っていることが分かった。

F. 研究発表

学会発表

中山周一、清水健介、久代 明、田中隆一郎、渡辺治雄 第73回日本細菌学会総会
(要旨受理済み。Salmonella TyphimuriumのcpxR, cpxA変異株の作製とキャラクターゼーション)

G. 知的所有権の取得状

なし

19990442

以降のページは雑誌／図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

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.

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