

サルモネラの診断・予防法の開発

課題番号 H11-新興-7

平成12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

目 次

サルモネラの診断・予防法の開発

課題番号 H11-新興-7

平成12年度 厚生科学研究費補助金

(新興・再興感染症研究事業)

研究目的の概要	2
12年度総括報告	3
分担報告	
サルモネラのヒト特異的な病原因子の解析	11
林 英生 筑波大学基礎医学系	
サルモネラの診断・予防法の開発に関する研究	13
倉園久生 岡山大学保健衛生学科	
遺伝子ノックアウト法を使ったSalmonellaの病原性解析	16
江崎孝行 岐阜大学医学部	
セルモネラ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	20
中山周一 国立感染症研究所細菌部	
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	24
牧野壮一 帯広畜産大学畜産学部	

(参考)

Vi-suppressed wild strain Salmonella typhi cultured in high osmolality is hypersensitive toward epithelial cells and destructive of Peyer's patches.

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

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。

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必要である。本研究では、サルモネラがヒトへ特異的に接着・寄生する因子とヒトへの病原因子を同定し、それを指標として環境・食品・保菌者等から早期に菌を検出し、感染の伝播を事前に遮断できる方策を探索する。

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因子（接着因子、毒素、侵入因子、抗食菌因子など）を指標とした菌株の早期・簡便検出法を開発し、病原菌株の食品への混入を防止する方策および伝播経路を遮断する方策を探索し、さら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。具体的には以下の6点に集約して研究する。

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

1. 侵入因子とその発現過程の解明
2. 接着と侵入（食食後）における発現遺伝子の相違の探索

3. サルモネラの病原候補遺伝子を用いたDNAチップ法、マクロアレイ法による網羅的な解析

(2) ヒトに特異的に感染する *Salmonella* の遺伝学的な特性を明らかにする。

1. ヒトにのみ感染する菌株と非ヒト感染菌株とでサブトラクション法による遺伝子の探索

2. サルモネラの病原候補遺伝子を用いたDNAチップ法、マクロアレイ法による網羅的な解析

(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。

1. エンテロトキシンを指標とした酵素抗体法の開発

2. 迅速PCR法による血清型の同定

3. サルモネラの病原候補遺伝子を用いたDNAチップ法、マクロアレイ法による網羅的な解析

(4) 上記の方法を一般食材の簡易検査法として応用し、その有用性を調べる。

1. 食品由来、患者由来、環境由来の分離菌株についてエンテロトキシンと侵入性因子を指標とした遺伝子診断法

2. 食品由来、患者糞便由来、環境由来の分離菌株についてエンテロトキシンを指標とした酵素抗体法

(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）との反応様式を解明する。

1. モデル動物の試作

(6) *Salmonella* 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、鶏の *Salmonella* の感染予防ないしワクチンの開発を試みる。

1. in-egg の感染の可能性について

2. 鶏舎の清潔度と飼育密度の管理

B. 研究方法

病原細菌学の研究方法に精通した研究者が専門分野を分担しつつ共同して研究を行う。目的に則して、項目別にそれぞれ以下

のような方法を用いる。

(1) 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。

1. 侵入因子とその発現過程の解明

培養細胞系、HeLa、CaCo2、U937を用いて、菌株の接着、侵入性、細胞内棲息性を調べる。一定の菌量（ 10^{6-7} /ml）を培養細胞と一定時間共存させ、経時的に接着細、侵入菌、細胞内生存を採取し、菌のmRNAを抽出し、differential display法にて菌の表層構造物の発現と誘導を測定する。

2. 接着と侵入（食食後）における発現遺伝子の相違の探索

サルモネラの環境応答性のモデルとして、塩濃度の変化に対するビルレンスファクターの産生性を調べる。通常培地で培養した菌株と高塩濃度下で培養した菌の、Vi抗原分泌蛋白、表層線毛の発現を観察する。

3. サルモネラの病原候補遺伝子を用いたDNAチップ法、マクロアレイ法による網羅的な解析

サルモネラのO抗原関連遺伝子、線毛関連遺伝子群を選定し、プライマーを作製し、PCRで相違を検出するとともに、候補遺伝子をDNAチップに貼付して遺伝子発現の条件を探索する。

(2) ヒトに特異的に感染する *Salmonella* の遺伝学的な特性を明らかにする。

1. ヒトにのみ感染する菌株と非ヒト感染菌株とでサブトラクション法による遺伝子の探索

チフス菌、食中毒事例から分離された

S. oranienburg、*S. enteritidis*、*S. paratyphi*、*S. typhimurium* などからサブトラクション法により、菌株特有でかつヒトに特異的な病原関連遺伝子断片を抽出する。

(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。

1. エンテロトキシンを指標とした酵素抗体法の開発

エンテロトキシンの部分ペプチドで作製したウサギ多価抗体の特性を検定し、それを用いて、ドットプロット法、ウエスタン法、さらに感度を上げるために、ビーズ ELISA 法を作製する。

2. 迅速 PCR 法による血清型の同定

ヒトに感染する血清型の関連遺伝子、*rfb*、*filC*、*vip* に特異的なプライマーを作製し、分離菌株の血清型を迅速に同定する。

3. サルモネラの病原候補遺伝子を用いた DNA チップ法、マクロアレイ法による網羅的な解析

(4) 3 の方法を一般食材の簡易検査法として応用し、その有用性を調べる。

1. 食品由来、患者由来、環境由来の分離菌株についてエンテロトキシンと侵入性因子を指標とし、PCR と DNA チップを利用した遺伝子診断を行う。

2. 食品由来、患者糞便由来、環境由来の分離菌株についてエンテロトキシンを指

(5) *Salmonella* 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 *Salmonella* の感染予防ないしワクチンの開発を試みる。

1. 鶏舎の清潔度と飼育密度の管理お

よび in-egg の感染の可能性について

生後まもないヒヨコに一定量の菌を投与し、感染系を確立した。飼育条件を変えて経時的に個体から菌の分離を行い、鶏舎の清潔度・飼育密度との関連で解析した。感染したニワトリが産卵を始める時機に、卵巣、輸卵管、排卵口、および卵内から菌の検出をお行う。飼育中に、試料に添加する発育促進剤（多くは抗生物質）の影響を、分離菌株について調べた。

(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

(1) 主要な病原因子（定着、侵入、毒素産生、炎症誘起因子など）を遺伝子と蛋白質のレベルで同定する。および (2) ヒトに特異的に感染する *Salmonella* の遺伝学的な特性を明らかにする、課題の結果

いか菓子¹⁾を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* の内、培養細胞への侵入性の強い菌株についてその責任遺伝子の同定を試みた。Genomic Subtractive Hybridization 法 (GSH 法) で、チフス菌を指標に検出したところ、*S. oranienburg* に特異的な約 2 kb の遺伝子断片が検出された。この遺伝子の特性を検定している。

Salmonella の侵入能を担う産物と *Shigella* のそのの相同性、その遺伝子発現

制御様式の類似性に着目、Shigellaにおいて侵入性遺伝子群を活性化する2成分制御系遺伝子 *cpxR-cpxA* の相同遺伝子が、*Salmonella* においても同じ役割を持つか検討した。*Salmonella* の *cpxR*、*cpxA* それぞれの遺伝子破壊株を作製した。これら野生株、及び各破壊株で、1) 侵入能を担う産物の正の制御因子である *hilA* の発現レベル、2) 侵入能産物の1つ SipC 産物の(タンパク)量、3) 哺乳類培養細胞への侵入能、を培養 pH を変化させて測定、比較した。結果、*cpxA* 変異株において pH6.0 培養後にいずれも大きな低下が見られた。pH8.0 培養後は *hilA* 発現レベルで若干の低下が見られた以外、野生株との差は検出できなかつた。*cpxR* 変異株では野生株との差異は検出できなかつた。以上より、*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侵入能産物発現、最終的には細胞侵入能の活性化に強く関与すること、これに対し、*cpxR* はそれらに関与しないことが分かつた。

宿主接着因子である線毛抗原、*fimA*、*agfA*、*sefA*、*lpfA* および *pefA* について菌株間で比較解析した。しかし、菌株による相違は明らかではなかつた。培養細胞へ接着するとき、これらの線毛が形成されることから、菌を CaCo2, HeLa, U937 培養細胞へ接着する段階と細胞内侵入後における線毛の発現を mRNA の発現レベルで検討した。*S. ornienburg*, *S. entritidis* では細胞接着とともに、*fimA* と *agfA* が発現するが、*sefA*、*lpfA*、*pefA* は発現しない。現在さらに、この検出方法を確立し再

現性の精度を挙げる検討をしている。

培養液中の塩濃度の違いにより病原因子の発現が異なる。すなわち、低塩濃度では病原因子である Vi 莢膜抗原を強く発現し、鞭毛抗原と分泌蛋白 (SipC 蛋白) の発現量を減少させる。逆に高い塩濃度では Vi 抗原の発現は抑制され、鞭毛抗原と分泌蛋白の量が増加した。SipC 蛋白はチフス菌が腸管で上皮細胞に接触した際に分泌されるが、高塩濃度環境でも SipC 蛋白が大量に分泌され組織侵入性が高まっていた。ラットに高塩環境で培養したチフス菌を培養液と一緒に投与すると 15 分で明らかにパイエル板の M 細胞から侵入し、約 30 分後にはパイエル板の構造を破壊し、基底膜も点状出血が肉眼で確認できるまで拡大した。食細胞内で野生株は 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せず、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つた。すなわち、細胞侵入には SipC 蛋白が必須であり、細胞内増殖には Vi 抗原が必須であることが明らかとなった

(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。

1. エンテロトキシンを指標とした酵素抗体法の開発

サルモネラの病原因子であるエンテロトキシン (Stn) のアミノ酸配列からエピトープと考えられる 2ヶ所を選び、これらのペプチド (QPDSKDR AFTLNTF 及び ALGKVFRQPFDGRER) を合成し、それぞれに対する家兎抗ペプチド抗体を調整し

た。これらの抗体から Affinity Chromatography によりペプチド特異 IgG をそれぞれ精製し、これらの IgG を用いた Western blotting 法により約 3.3 KDa (Stn のアミノ酸配列から推定される分子量と一致する) のサルモネラ属菌に特異的なバンドを検出することが出来た。しかし、Western blotting 法は一度に多数のサンプルを検査するには不向きであるので、Dot blotting 法を試みたが background が高く使用できないことが判明した。これら 2 種類の抗ペプチド抗体を用いた Sandwich ELISA の系を構築した。今回、構築した Sandwich ELISA の系はサルモネラ属菌に対して特異的で、かつ多数のサンプルを同時に検査できると期待される。

2. 迅速 PCR 法による血清型の同定

菌の血清型を遺伝子から同定する方法を作製した。血清型決定遺伝子からプライマーを設計し、特定の血清型では特定の DNA 断片を特異的に増幅することが確認された。InvA および Enterotoxin の primer は Salmonella 全体の検出に、rfbE 遺伝子と fliC の gmp 抗原のプライマーでは *S. enteritidis* が特異的に同定された。増幅産物の確認には real time PCR とマイクロアレイ法で確認した。これにより Salmonella の同定・診断がより迅速に行える可能性が見えてきた。

(4) 上記の方法を一般食材の簡易検査法として応用し、その有用性を調べる。

本項目についての成果は次年度に繰り越すことになった。

(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モデル動物の作製にはなお時間を要する。

(6) *Salmonella* 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、鶏の *Salmonella* の感染予防ないしワクチンの開発を試みる。

1. in-egg の感染の可能性について

2. 鶏舎の清潔度と飼育密度の管理

サルモネラの汚染を減少させるために、ニワトリの飼育形態がサルモネラにどのように影響を与えるのかに関して研究を行った。実際には、人工的に *S. enteritidis* を生まれたばかりの雛に経口接種して、使用衛生や飼育密度を変化させてサルモネラの保菌状況の変化を調べた。*S. enteritidis* を成功接種しても、雛の肝臓、脾臓、血液等からは実験期間中まったく *S. enteritidis* は分離できなかった。しかし、盲腸内からはコンスタントに実験期間中分離できた。その保菌状況は、飼育箱の衛生状況を劣悪にすれば、衛生的に飼育した時より多くの *S. enteritidis* を保菌することが明らかになり、密飼いをしたときも、同様であった。一般的にサルモネラの卵汚染は in-egg と on-egg が知られているが、in-egg を証明するために、卵管、卵巣、卵からのサルモネラの分離を試みたが、分離できなかった。また抗菌物質の投与が成長促進の目的で雛に一般的に用いられているが、一部の抗菌物質にサルモネラの定着を助長する結果を得た。サルモネラの定着は、ワクチンなどの開発もさることながら、飼育環境に大きく影響されることが明らかとなった。

D. 考察

サルモネラのヒト特異的な病原因子を指標にした診断法とそれを利用して伝播経路を遮断する予防法を開発することを目指して研究を遂行している。チフス菌の病原性はVi抗原と密接に関連していることが明らかになり、その関連遺伝子の発現は環境状況により影響を受けることが明らかとなった。菌の宿主への接着ないし侵入は菌体表層構造物、線毛やO抗原、が主要な働きをする。しかし、これらの構造物も環境因子により大きな影響を受けていることが明らかとなった。どのような環境条件が菌体の情報伝達系へ作用しているのかは現在なお鋭意検討している。診断法は、PCR法による検出法が実用化が可能であり、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。エンテロトキシン抗体制作製し、これを利用して感度の高いサンドウィッチELISAの測定系を作製した。今後はこれを商業化できるか否かを検定し、一般への普及を試みる予定である。

サルモネラの感染伝播はニワトリによるものが多く特に *S. enteritidis* は鶏卵によることが多い。その予防策を検証するために、サルモネラ感染ニワトリの飼育環境との関連を調べたところ、ケージ当たりの飼育数が少ないほど、また汚物処理を速やかに行うほど、感染率は低下した。感染ニワトリの卵内感染の可能性を実験的に調べた

が、卵内の汚染の可能性は極めて低いことがわかった。しかし、試料に添加される発育促進剤（抗生物質）は、各種細菌に耐性を付与するのみならず、菌の定着性を促進するような作用があることがわかった。

食品汚染の深刻な原因細菌であるサルモネラのヒト特異的な病原因子を特定し、これを流通食品のHACCP検査に応用することで、病原サルモネラの伝播が早期に遮断できると確信し、今後もさらに高感度で特異性の高いサルモネラの検出法を模索する。

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

1. 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. 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)

3. 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)
4. 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*.
IJSEMA50, in press.
5. 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)
6. 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. 2001
7. Zao, L., T. Ezaki, Z. Li, Y. Kawamura, K. Hirose and H. Watanabe: 2001
Vi-suppressed wild strain *Salmonella typhi* cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer's patches.
Microbiol. Immunol. 42:149-158
8. 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
1. 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
2. Makino, S, Chongsanguan, M, Kurazono, H, and Hayashi H 1999
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.
3. 熊王俊男、ウィリアム バ テイン、林英生 2000
茨城県内で分離された *Salmonella oranienburg* の分子生物学的解析
日本細菌学雑誌 55:356
4. ウィリアム バ テイン、熊王俊男、林英生 2001
宿主細胞への付着および侵入時に発現され

る Salmonella 病原因子の解析

日本細菌学雑誌 56:196

5. 熊王俊男、ウィリアム バ テイン、

宮崎淳、安岡真奈、林英生 2001

Genome subtraction による Salmonella
oranienburg の遺伝子解析

日本細菌学雑誌 56:198

6. 波多広幸、川村好章、江崎孝行 2001

DNA マイクロアレイを用いた細菌同定法
の開発

日本細菌学雑誌 56:118

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

サルモネラのヒト特異的な病原因子の解析

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。

本研究では、食中毒事例から分離された *S. oranienburg* の病原因子を探索し、他のサルモネラと比較し本菌株特有の遺伝子断片を2個分離した。ヒト特異的に発現する遺伝子を探索するために、培養細胞に接着した時点、細胞内へ侵入した時点での mRNA を抽出し differential display 法に準じて発現の差違を調べた。まだ顕著な発現因子を同定できていないが、*S. typhit* との比較で、線毛の発現に差が認められている。genome subtraction 法を確立して、さらに確実にヒトに感染する特有な物質とその遺伝子を同定することに焦点を絞って研究を進展している。

A. 研究目的

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因子（接着因子、毒素、侵入因子、抗食菌因子など）を同定し、それを指標として、病原菌株の食品への混入を早期に発見し防止する方策および伝播経路を遮断する方策を探索する。さら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

S. oranienburg の病原因子の検索
茨城県で発生した事例から分離された70株の PFGE パターンとプラスミドパター

ンを常法により解析した。

各菌株の細胞侵入性は培養細胞、Hela、CaCo2、U937 を用いて測定した。コンフルエントの生育した細胞へ 10^{6-7} /ml の菌を添加し、15分間接着し、未付着の菌体を洗浄・除去して、さらに3時間培養した（図-1）。その時点で接着した細胞はゲンタミシンで処理し死滅させた後洗浄除去した。この時点で培養細胞を低浸透圧で破裂させて菌を回収し、寒天培地で培養し CFU を測定した。この各時点で回収した菌から RNAm を抽出し各遺伝子プローブで発現を探索した。

Genome Subtraction 法は図-2 に示す方法でおこなった。

線毛の種類については各相当遺伝子のプライマーを作製し、PCR法で検索した。

C. 研究結果

いか菓子を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* の内、培養細胞への侵入性の強い菌株についてその責任遺伝子の同定を試みた。

Genomic Subtractive Hybridization (GSH法) で、チフス菌を指標に検出したところ、*S. oranienburg* に特異的な約 2 kb の遺伝子断片が検出された (図-3.4) この遺伝子の特性は現在解析中である。

宿主接着因子である線毛抗原、*fimA*、*agfA*、*sefA*、*lpfA* および *pefA* について菌株間で比較解析した (表-1)。しかし、菌株による相違は明らかではなかった。培養細胞へ接着するとき、これらの線毛が形成されることから、菌を CaCo2、HeLa、U937 培養細胞へ接着する段階と細胞内侵入後における線毛の発現を mRNA の発現レベルで検討した (表-2、表-3)。*S. oranienburg*、*S. enteritidis* では細胞接着とともに、*fimA* と *agfA* が発現するが、*sefA*、*lpfA*、*pefA* は発現しない。現在さらに、この検出方法を確立し再現性の精度を挙げる検討をしている。

D. 考察

サルモネラのヒト特異的な病原因子を探索している。

S. typhi、*S. tyhimurium*、*S. enteritidis* の全ゲノム配列は世界3箇所解析されているがまだ公表されていない。しかし、大腸菌やコレラ菌などのプロテオバクテリアでは染色体の遺伝子群は極めて多様性にとみ、かつ外来遺伝子群が病原遺伝子群

[Pathogenicity Island] を形成し、ゲノム構造を複雑化している。サルモネラの病原因子と見なされる遺伝子は PI-1、2、3 の Pathogenicity Island があり、それぞれ type III の膜輸送系を持っている。これまでに明らかにサルモネラに特異的と見なされる病原遺伝子は 13-15 個が同定されているが、なお全容は明らかではない。多様な病態を呈する細菌であり、多様な血清型と多様な病原因子を産生する細菌である。病原大腸菌が病原因子によりかなり明瞭に分類・同定され、赤痢菌は特異な侵入因子と志賀毒素を産生することと比較すれば、サルモネラの病原因子を一元的に決定することはなお困難である。また、宿主域の広いこともさらに菌の特性を掴みにくいものとしている。病原因子を一つづ明らかにすることがその問題解決の方法であると確信し、研究を展開している。

F. 研究発表

1. 熊王俊男、ウイリアム バ テイン、林英生 2000
茨城県内で分離された *Salmonella oranienburg* の分子生物学的解析
日本細菌学雑誌 55:356
2. ウイリアム バ テイン、熊王俊男、林英生 2001
宿主細胞への付着および侵入時に発現される *Salmonella* 病原因子の解析
日本細菌学雑誌 56:196
3. 熊王俊男、ウイリアム バ テイン、宮崎淳、安岡真奈、林英生 2001
Genome subtraction による *Salmonella oranienburg* の遺伝子解析
日本細菌学雑誌 56:198

☒ - 1 Preparation of CAB- and ICB-cDNA Libraries

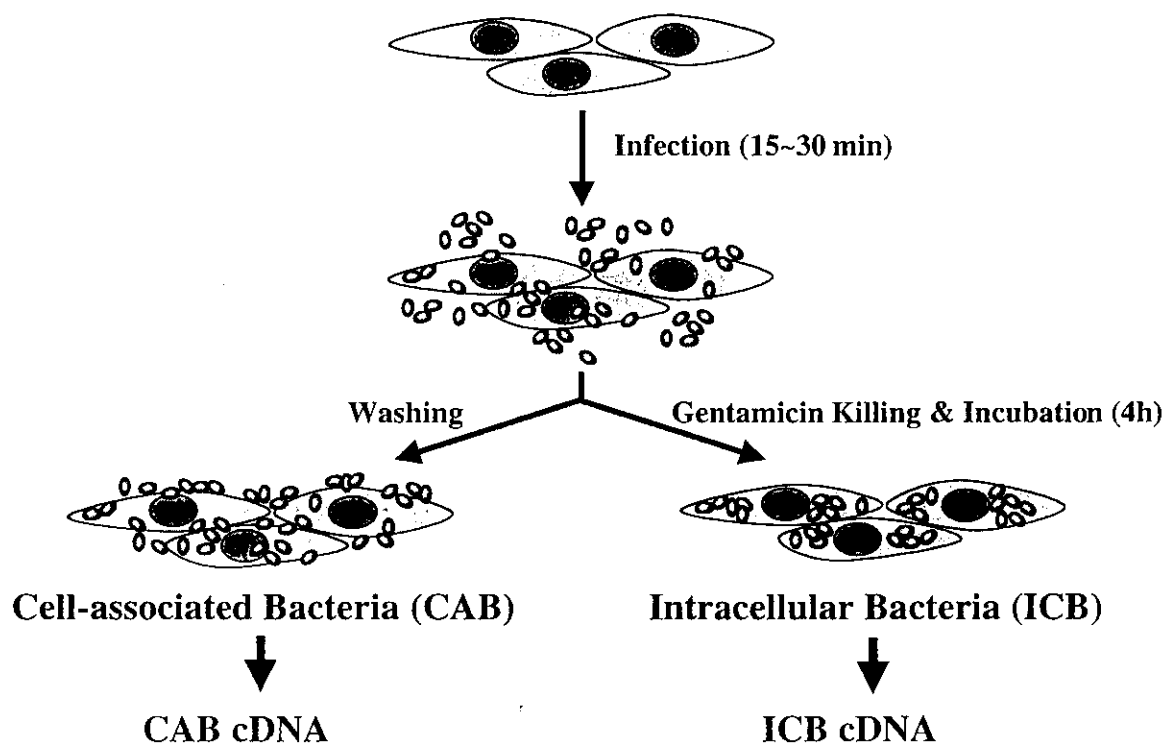
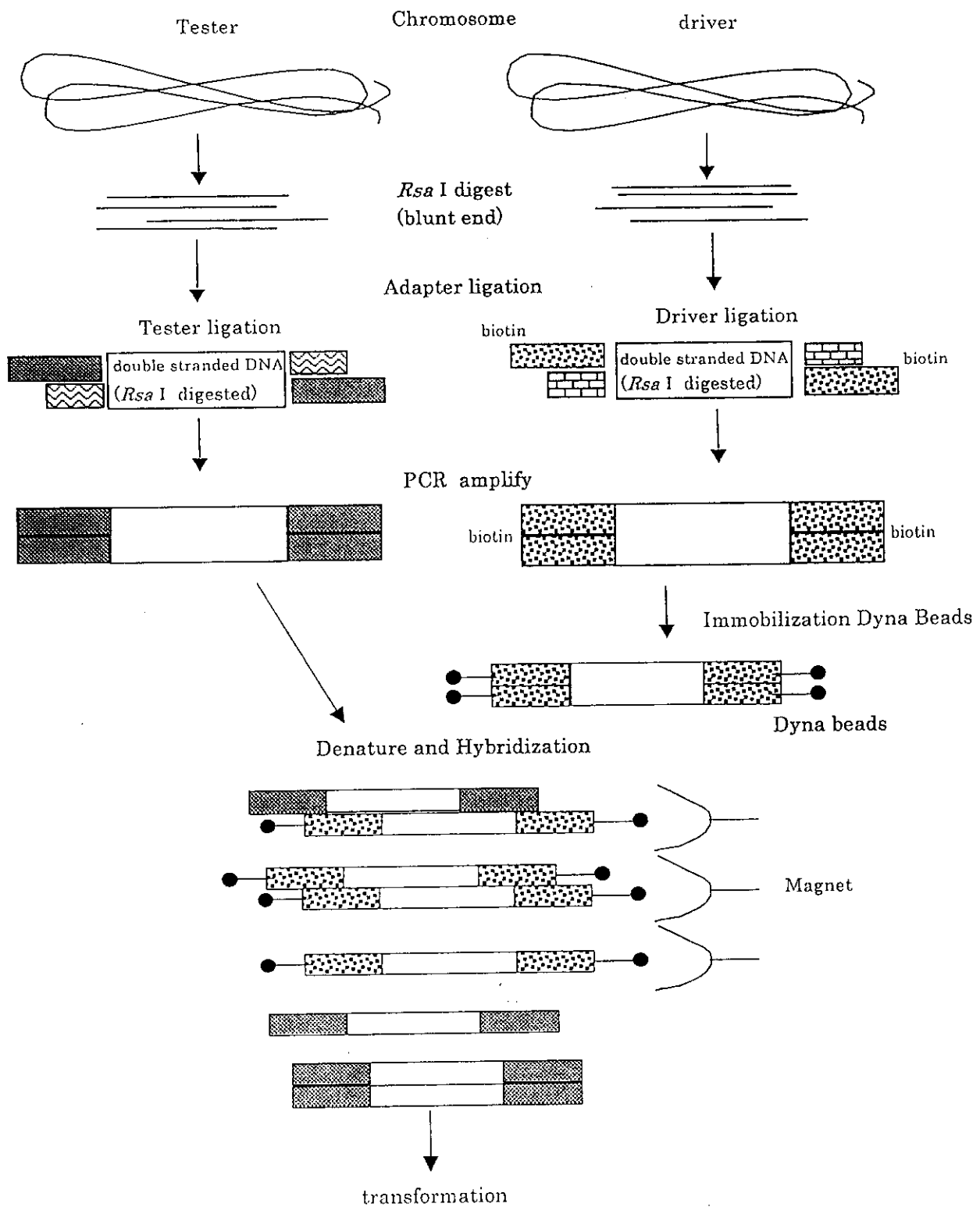


図-2 Genomic subtractive hybridisation 法



遺伝子レベルでの2菌種間の差異について調べるため、*S. oranienburg*および*S. typhi*でGenomic subtractionを行い、*S. oranienburg*の特異的遺伝子の検索を試みた。*S. oranienburg*(Tester strain)と*S. typhi*(Driver strain)の染色体を抽出し、*Rsa* Iで切断した。TesterおよびDriverのDNA断片にそれぞれ異なったadapterをligationし、PCRで増幅させhybridizationを行った。hybridizationされないTesterに特異的なDNA断片をクローニングおよびその塩基配列の解析を行った。

GSH法で検出された*S. oranienburg*に特異的な遺伝子断片

Homology (-)	Homology (+)		
	<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella spp.</i>	その他(<i>E. coli</i> など)
9	44	4	1

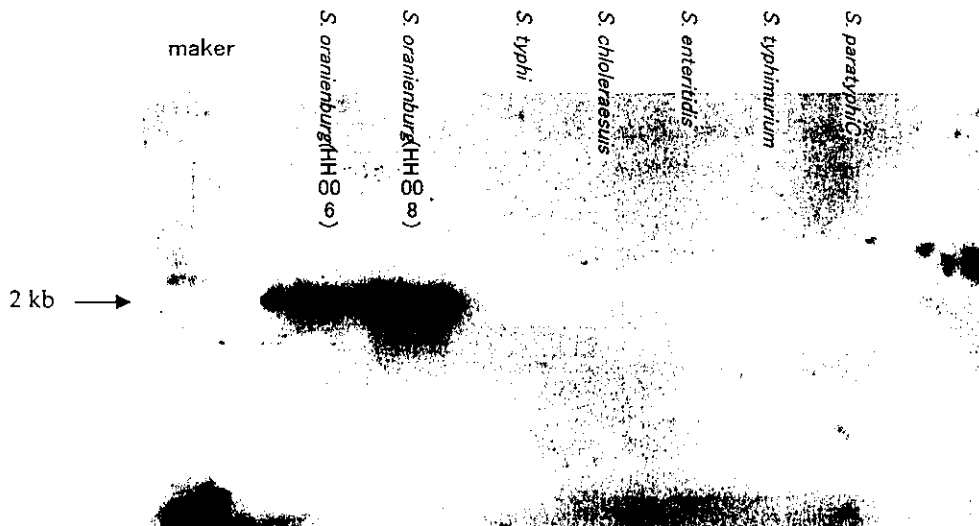


図-3 各 *Salmonella* DNAへのhybridisation

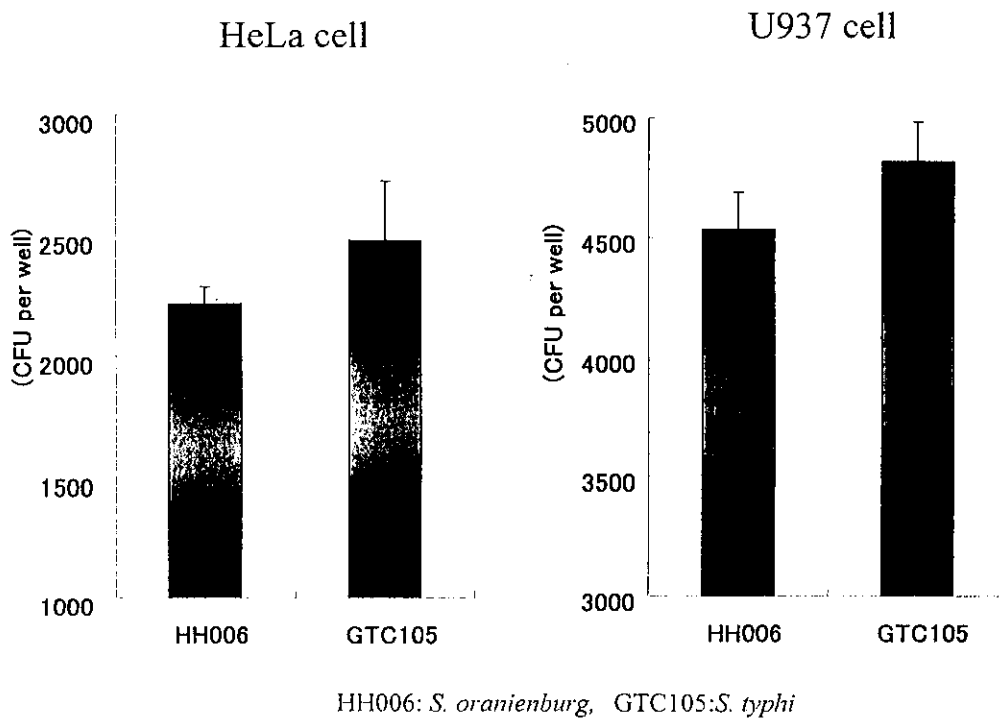


図-4 *S. oranienburg*と*S. typhi*のHeLa cellとU937への侵入度

細胞数はHeLa cell, 2.0×10^5 、U937 cell, 4.0×10^4 で侵入した生菌数(cfu)で示した。

表 - 1 Fimbrial Genes Distribution Among *Salmonella* Serovars

Serovars	Type I fim (<i>fimA</i>)	Thin agg. fim (<i>agfA</i>)	<i>S. ent</i> fim (<i>sefA</i>)	Long polar fim (<i>lpfA</i>)	Plas. encod. fim (<i>pefA</i>)
Aberdeen	+	+	-	+	-
Agona	+	+	-	+	-
Amsterdam	+	+	-	-	-
Bareilly	+	+	-	+	-
Blockley	+	+	-	+	-
Braenderup	+	+	-	+	-
Bredency	+	+	-	-	-
Cholerasuis	+	+	-	+	+
Dessau	+	+	-	+	-
Enteritidis	+	+	+	+	-
Hadar	+	+	-	+	-
Havana	+	+	-	+	-
Infantis	+	+	-	+	-
Litchfield	+	+	-	+	-
Livingstone	+	+	-	-	-
London	+	+	-	+	-
Narashino	+	+	-	+	-
Newport	+	+	-	+	-
Oranienburg	+	+	-	-	-
Paratyphi B	-	+	-	+	-
Paratyphi C	+	+	-	+	+
Pomona	+	+	-	-	-
Postdam	+	+	-	+	-
Singapore	+	+	-	+	-
Typhi	+	+	-	+	-
Typhimurium	+	+	-	+	-
Weltevreden	+	+	-	-	-

Fimbrial genes were detected by Multiplex Fimbrial-PCR using genomic DNA or boiled culture supernatant .

表 - 2 Expression of Fimbrial Genes in Human-Adapted *Salmonellae*

Serovars	Fimbriae [‡]	Environmental conditions		
		F A S L P [§]	LB Medium	DMEM
<i>S. typhi</i>	F A - L -	F A - L -	F A - L -	F - - - -
<i>S. paratyphi B</i>	- A - L -	- A - L -	- A - L -	- A - - - -
<i>S. paratyphi C</i>	F A - L -	F A - L -	- A - - - -	- A - - - -
<i>S. oranienburg</i>	F A - - - -	F A - - - -	F A - - - -	F A - - - -
<i>S. cholerasuis</i>	F A - L P	F A - L P	F A - L P	- A - - - -
<i>S. enteritidis</i>	F A S L -	F A S L -	F A S L -	F A - - - -
<i>S. typhimurium</i>	F A - L -	F A - L -	F A - L -	F A - - - -

[§] F= *fimA* (type 1 fim); A= *agfA* (thin agg. fim.); S= *sefA* (*S. enteritidis* fim.); L= *lpfA* (long polar fim.); P= *pefA* (plasmid encoded fim.).

[‡] Fimbrial genes and their expression were detected by Mx Fim-PCR and Fim RT-PCR, respectively.

表 - 3 Expression of *Salmonella* Fimbrial Genes Under Cell-Associated Condition

Fimbriae		<i>S. typhi</i>			<i>S. oranienburg</i>			<i>S. enteritidis</i>		
		CaCo2	HeLa	U937	CaCo2	HeLa	U937	CaCo2	HeLa	U937
Type I Fim.	(<i>fimA</i>)	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Thin Agg. Fim.	(<i>agfA</i>)	-	+	-	++	+	+	++	+	+
<i>S. ent.</i> Fim.	(<i>sefA</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Long Polar Fim.	(<i>lpfA</i>)	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Plas. Enc. Fim.	(<i>pefA</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

++, high level of expression; +, low level of expression

Fimbrial genes' expression was detected by Multiplex Fim RT-PCR using cell-associated bacterial ss cDNA.

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 (Stn) 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。平成 11 年度に Stn のアミノ酸配列からエピトープと考えられる 2 ケ所を選び、これらのペプチド (QPDSKDR AFTLNTF 及び ALGKVFRQPFDRER) を合成し、それぞれに対する家兎抗ペプチド抗体を調整した。これらの抗体から Affinity Chromatography によりペプチド特異 IgG をそれぞれ精製し、これらの IgG を用いた Western blotting 法により約 3.3 KDa (Stn のアミノ酸配列から推定される分子量と一致する) のサルモネラ属菌に特異的なバンドを検出することが出来た。しかし、Western blotting 法は一度に多数のサンプルを検査するには不向きであるので、Dot blotting 法を試みたが background が高く使用できないことが判明した。本研究の第一の目的は、Stn に対する簡便かつ迅速な検出法の確立であるので、今回、これら 2 種類の抗ペプチド抗体を用いた Sandwich ELISA の系を構築した。今回、構築した Sandwich ELISA の系はサルモネラ属菌に対して特異的で、かつ多数のサンプルを同時に検査できる。

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

平成 11 年度に調整した、QPDSKDR AFTLNT: P1) 及び ALGKVFRQPF DGER: P2) の 2 種類のペプチドに対する家兔抗血清から抗ペプチド特異家兔 IgG を調整し、Sandwich ELISA の系を構築し、その特異性を検討した。

1) 抗ペプチド特異家兔 IgG の調整：各々の合成ペプチドを FMP 活性化セルロファイナラムに固定し、平成 11 年度に作成したそれぞれの抗ペプチド家兔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 (以下、P1-IgG および P2-IgG と呼ぶ) を調整した。

2) P2-IgG の Biotin 化：Pierce 社の EZ-LinkTMNHS-Biotin で P2-IgG を Biotin 化した。

3) 供試菌株：サルモネラ属菌 5 株 (*Salmonella* Anatum, *S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis*、*S. Typhi*、*S. Typhimurium*) と陰性コントロールとして大腸菌 MC1061 株を用いた。

4) サンプル調整：各菌株をそれぞれ LB 培地に接種し、37℃で一昼夜振盪培養した。遠心集菌後、菌体を蒸留水に懸濁して超音波破碎し、これらの遠心上清を検査サンプ

ルとした。

6) Sandwich ELISA：

① P1-IgG を PBS で 20 μ g/ml の濃度に希釈し、37℃で 1 時間、96 穴プレートに coating した。

② プレートを蒸留水で 3 回洗浄後、0.1% BSA で blocking した。

③ プレートを蒸留水で 3 回洗浄後、希釈した上記各サンプルをプレートに加え、37℃で 1 時間 incubate した。④ プレートを蒸留水で 3 回洗浄後、Biotin 化した P2-IgG (5 μ g/ml) をプレートに加え、37℃で 1 時間 incubate した。

⑤ プレートを蒸留水で 3 回洗浄後、Vector 社の Alkaline phosphatase streptoavidin を加え、室温で 1 時間 incubate した。

⑥ プレートを蒸留水で 3 回洗浄後、substrate (Sigma 社、FAST p-nitrophenyl phosphate tablet set) をプレートに加えて発色させ、405 nm の吸光度を測定した。

(環境への配慮)

菌株の取り扱い、培養およびサンプル調整は全て P2 実験室で行い、汚染物は全てオートクレーブによる滅菌を施し、環境への汚染を排除した。

C. 研究結果

1) 構築した Sandwich ELISA の特異性の検討：*S. Enteritidis* 363 株 (陽性コントロール) と大腸菌 MC1061 株のサンプルを段階希釈して、その反応性を比較検討し