

た。図1に見られるように、2倍希釈まで両者の間には有意の差が見られ、今回、構築した Sandwich ELISA の特異性を証明した。

2) サルモネラ属菌の Stn 産生に対する Sandwich ELISA を用いた検討：1) で今回、構築した Sandwich ELISA の特異性が証明できたので、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の大腸菌 MC1061 株から調整したサンプルに対して Sandwich ELISA を行い、その反応性を比較検討した。その結果、サルモネラ属菌のうち1株 (*S. Choleraesuis*) を除く4株は、大腸菌 MC1061 株と比較して、有為の差を示した (図2)。

D. 考察と結論

今回、構築した Sandwich ELISA は陰性コントロールである大腸菌 MC1061 株と比較して、特異的に Stn を検出できることが分かった。平成11年度に報告した同じ家兎抗ペプチド特異 IgG を用いた Western blotting 法に比べ、Sandwich ELISA は一度に多数の検体を処理でき、末端の検査所の設備でも直ぐに対応が可能である。サルモネラ属菌の1株 (*S. Choleraesuis*) で Stn の検出が出来なかった。この株は平成11年度で報告した Stn 遺伝子に対する特異的な PCR 法で Stn 遺伝子の存在が確認されている。現在、約300株の Stn 遺伝子 (+) サルモネラ属菌の

Stn 産生性を Sandwich ELISA で検討中であるので、この株を含めた ELISA (-) については詳細な検討を行う予定である。

サルモネラ属菌の汚染は恒常的に起こっており、臨床の現場ばかりではなく生産や流通の現場でも簡便に検査が行われる必要がある。今回、Stn に対する特異的な免疫学的同定法を確立できたことで、Stn のホロ毒素を精製する際に不可欠な検査法を手に入れることが出来た。このシステムを用いて、現在、Stn のホロ毒素の精製を行っている。次年度は Stn のホロ毒素の精製を完了して、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、更にどのような場所でも、Stn の検出が可能な迅速診断法の確立を目指す。

E. 研究発表

1. 論文発表

論文作成中である。

2. 学会発表

平成13年の日米医学協力会コレラおよび関連下痢症専門部会で発表。

遺伝子ノックアウト法を使った *Salmonella* の病原性の解析
および Micro PCR 法の開発

分担研究者 江崎孝行 岐阜大学医学部微生物学講座

研究要旨 *Salmonella* は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メカニズムについて解析した。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った。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。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。

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。我々は次の項目を明らかにするこ

とを本研究の目的とした。

1. チフス菌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。このために様々な遺伝子欠損株を作成し解析する実験法を確立する。
2. 侵入及び、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。この成果は将来のワクチン開発の基礎データを提供することが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 capillary PCR 法、及び 384 well を使用した微量で迅速な検出方法を作製する。

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 600 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な 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。この primer を使用して Real time PCR を 384 well で実施し微量化と迅速化を図る方法を作成した。

C. 研究結果

1. チフス菌は環境の変化を認識してその表面抗原を巧みに変化させ病原性を発揮している。環境指標として食塩濃度を選択して、食塩濃度の違いによってどのようにチフス菌が病原因子の発現をコントロールしているかを解析した。食塩濃度がやすい環境でチフス菌は病原因子である Vi きょう膜抗原を発現させた。それと同時に鞭毛抗原の発現量を減少させ、さらに分泌蛋白量を減少させていた。塩濃度が低い環境では培地中に分泌される蛋白のほとんどは鞭毛抗原で占められていた。一方食塩濃度を 200 mM まで増やすと Vi 抗原の発現は抑制され、逆に鞭毛抗原の量が増加した。さらに分泌蛋白の量も著しく増加していた。分泌蛋白量を定量するために侵入に必要な SipC の分泌量を western で確認した。分泌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とされているが、高い食塩濃度の環境で培養すると上皮細胞との接触とは無関係に SipC 蛋白を大量に分泌していた。この環境で培養したチフス菌は組織侵入性が高まっていた。ラットは本来、チフス菌には抵抗性で一億個の細菌を腸管に投与しても何の変化も起きず感染しない。ところが 2 週間静脈栄養を行ったラットに 200 mM 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 細胞から侵入した。約 30 分後には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も破壊され点状出血が肉眼で確認できるまで出血が拡大した。

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（文献 1）。

この研究を通じて作成した様々な病原因子の欠損変異株を作成した。変異株の作成には基本的には遺伝子をノックアウトさせた株を作成したため double, あるいは triple の遺伝子ノックアウトが容易に実施できる。そのため将来、ワクチン株の候補になる可能性を持った株が作成できた。また医師の教育や臨床検査の標準株として安全に使用できるため、各方面で利用できる。（文献 2）

2. 昨年度の研究で作成した primer を使用してサルモネラのマイクロアレイを作成した。今年度は各種条件で培養したチフス菌の mRNA の発現を定量的に見る実験を中心に実施する計画でいる。

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。現在一般に行われている 96 well での PCR を 384 well で微量化するための実験を行った、この方法をとれば 10 種類の primer を使用しても従来の一本分に相当するコスト 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。増幅産物の確認には二つの可能性を検討した、一つは real time PCR でもう一つは増幅産物を DNA マイクロアレイに固定し、増幅産物をマイクロアレイで確認する方法を作成した。

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。Capillary PCR 法では sample 中の Salmonella の量も real time 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

論文

1. 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. Licheng Zhao, Yoshiaki Kawamura, Takayuki Ezaki. Construction of virulent defective mutants of *Salmonella typhi* and their phenotypic description as candidates for educational purpose (submitted)

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 国立感染症研究所細菌部

研究要旨

Salmonella において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った。*cpxR* 変異株では野生株との差異は検出できなかった。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 *sipBCD* は *ipaBCD* に相同性を示す。また、*sipBCD* 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*、*sipBCD* 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、まず、*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* 翻訳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、前記各変異株と野生株とで侵入に直接関与する遺伝子産物の1つ、SipC の培養上清中の量を上清を TCA 沈澱させたものをサンプルとして、SipC 抗体を用いたウエスタン法で観察した。この実験でも pH6.0 と pH8.0 の培養後のサンプルを使用した。また、各遺伝子変異株の実際の細胞侵入度をヒト上皮由来の培養細胞、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 Inoculum 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 40 分の 1 程度にまで低下した。pH8.0 では野生株、cpxR 変異株に対して約 4 分の 1 程度までの発現量低下にとどまった。cpxR 変異株では野生株との差が見られなかった。

研究目的の項で述べたように、HilA 産物は invF を通じて sipBCD 発現を活性化するので、上記の結果から、cpxA 変異株では SipBCD 産物量が低下することが予想される。そこで、SipC に対するウエスタンハイブリダイゼーションを行なったところ、pH6.0 で SipC が検出限界以下まで減少していた。pH8.0 では野生株と同程度のシグナルが観察され、HilA 産物の 4 分の 1 程度までの減少では SipC 発現には大きく影響しないことが示唆された。また、hilA 発現測定の結果から予想できるように、cpxR 変異は SipC 産物量に影響していなかった。

SipBCD は宿主細胞侵入の直接のエフェクターであることから、上記の結果は、cpxA 変異が細胞侵入に影響することを予

想させる。培養細胞 INT407 を用いた MOI=10 のアッセイ系で、pH6.0 での培養後の cpxA 変異株の細胞侵入能は野生株や cpxR 変異株の約 10 分の 1 まで低下した。また、SipC ウエスタンの結果から予想されるように pH8.0 での培養後は、侵入能低下は観察されなかった。cpxR 変異株では野生株との差は認められず、hilA 発現、SipC 産物量測定の結果と良く一致している。

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 sipBCD 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。また、cpxA と cognate pair をなすレギュレーターと考えた 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 以外のものであると考えられ、それを同定することが次なる課題となった。現在、この目的のため、cpxA 変異株の表現型を相補するマルチコピーサプレッサーのクローニングを試行しており、すでに 1 つの領域については塩基配列決定を行なった。塩基配列の解析を行なったところ、染色体上 96min. 付近にマップされる新規 AraC type の転写因子をコードする遺伝子を発見した。分類上、2 成分制御系レギュレーターではない転写因子であるが、この遺伝子の発現が目的とするレギュレーターの支

配下にある可能性がある。この遺伝子産物のアミノ酸配列は、既に hilA 発現の Activator として報告のある HilD と有為な相同性を示した。

現在、この新規遺伝子が実際に hilA 発現制御に関与するかを確認するため、染色体上の当該遺伝子の破壊を試行中である。また、この遺伝子の発現が cpxA によって制御されているかの検討も行なう予定である。

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

1. 論文発表

Genotypic variations of Shiga toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. Ro Osawa, Sunao Iyoda, Shu-ichi Nakayama, Akihito Wada, Shiro Yamai, and Haruo Watanabe (2000) *J. Med. Microbiol.* 49, 565-574

2. 学会発表

cpxA, but not cpxR is required for full activation of the hilA expression and the consequent phenotype of invasiveness in *Salmonella enterica*

serovar Typhimurium. Shu-ichi Nakayama, Akira Kushiro, Kensuke Shimizu, Ryu-ichiro Tanaka, Lan Hu, Dennis J. Kopecko, and Haruo Watanabe (2001) The 36th Joint Conference of U.S.-Japan cooperative medical science program Cholera and other bacterial enteric infection panel. Jan. 2001, Osaka

中山周一、清水健介、久代 明、田中隆一郎、渡辺治雄 2000
Salmonella Typhimurium の cpxR, cpxA 変異株の作製とキャラクターゼーション
日本細菌学会雑誌 55:

中山周一、久代 明、朝原 崇、田中隆一郎、渡辺治雄 2001
Salmonella Typhimurium cpxA 変異株を相補するマルチコピーサプレッサーの解析
日本細菌学会雑誌 56:

G. 知的所有権の取得状況

特許申請

二成分制御系遺伝子、ポリペプチド、組み換えベクター及びエルシニア属細菌感染症の予防・治療剤の選別法
(渡辺治雄, 中山周一, ヤクルト研究所)

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 *Salmonella enteritidis* の卵汚染は、近年ヒトのサルモネラ症の原因として大きな社会問題となっているとともに、世界的な広がりを見せている。*S. enteritidis* の卵汚染を減少させて、衛生的な卵を生産することは食の安全にとって重要なことである。本年度は、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かとなった。

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。その中でも *S. enteritidis* による卵を介したヒトへの感染が世界

中で大きな問題となっている。そのため、*S. enteritidis* を卵から排除することは食品衛生条重要な課題である。しかし、*S. enteritidis* によるニワトリへの汚染に着目して、どのようにして定着するのかを明らかにすることは今後のサルモネラ対策に重要なテーマである。*S. enteritidis* による卵汚染は、産卵の際に卵の殻に

菌が付着する on-egg と、卵管を経て菌が上向き結果的に産卵の際には内部にサルモネラが汚染されている in-egg の2種類の汚染経路が報告されており、複雑な様相を呈している。しかし、糞便中に *S. enteritidis* が排泄される結果生じる現象であるため、糞便汚染を制御する方法が最も適確な措置であろうと考えられる。そのためには、*S. enteritidis* 汚染の今年度はニワトリのサルモネラ汚染、特に *S. enteritidis* 汚染にかかわる環境要因を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

S. enteritidis および腸管出血性大腸菌 (EHEC) O157 を用いた。菌株は L-broth の一夜培養液の 0.1ml を用い、初生雛に経口カテーテルにより 1羽ずつ経口感染を行った。飼料は、抗菌物質が全く添加されていない日本配合飼料製造の初生雛用標準試料 SDL No.1 および成鶏用標準飼料 No.4 を用いた。感染後、脾臓、肝臓、盲腸が採材され、それらの中の菌数を計測した。選択培地はサルモネラ用に DHL 寒天平板と EHEC O157 用にソルビトールマッコンキー培地を用いた。

1) 飼育環境とサルモネラ保菌

7.0×10^4 個の *S. enteritidis* を 110 羽の初生雛に経口接種した。雛は 10

羽ずつ衛生的な 8 ゲージと不衛生的な 3 ゲージに分けて飼育した。衛生的なゲージはゲージの底部がメッシュ製で、メッシュを毎日朝晩に交換した。不衛生的なゲージでは、底部の交換をしないので常に糞便と接する環境になっている。両者の 3 ゲージを用い、接種後 1 週間ごとにサンプルを採取し、生菌数を計測した。感染後一週間目に、残りの飼育していた不衛生的な 5 つのゲージ中の 50 羽に関して、ゲージから取り出して、感染させていない初生雛を新たに 10 羽ずつ導入した。そのうち 3 ゲージに関しては、導入後一週間ごとに 3 回サンプリングした。更に導入後一週間目に、20 羽が衛生的なゲージに移され 1 週間ごとに 2 回サンプリングが行われた。

2) 飼育密度とサルモネラ保菌

8.0×10^4 個の *S. enteritidis* を 70 羽の初生雛に経口接種した。それらは 5 羽ずつの 6 群と 10 羽ずつの 4 群に分けられた。5 羽ずつの 3 群は不衛生的なゲージで飼育され、他の 5 羽ずつの 3 群は衛生的なゲージで飼育された。10 羽ずつの 4 群は全て衛生的なゲージで飼育された。10 羽飼育していた 1 ゲージを除いて、全てのゲージが、感染後 1 週間目に、毎週盲腸内菌数が測定された。残りの 10 羽は感染後 1 週間目に 5 羽ずつ 2 つの衛生的なゲージに分けられて、1 週間

ごとに盲腸内菌数が測定された。

3) 卵管や卵巣からサルモネラの検出

8.0×10^4 個の *S. enteritidis* を 25 羽の初生雛に経口接種した。それらは 5 羽ずつ 5 つの衛生的なゲージで飼育された。感染後 2、5、6 および 7 週後にそれぞれのゲージ柄 5 羽から肝臓、卵管および卵巣を採取して、細断後サルモネラの検出を試みた。それらは、100 mg は 10 ml の Hajna Tetrathionate broth (HTB) に接種して 37°C で 48 時間培養後、0.1 ml を DHL 培地上に塗抹してサルモネラの分離を試みた。同時に、盲腸内の *S. enteritidis* の菌数を測定した。

残りの 5 羽は、感染後 7 週目から個別のゲージ内で更に 30 週間飼育された。この間、新鮮な産卵や盲腸便から *S. enteritidis* の分離が試みられた。卵の内容物は等量の trypticase soy broth (TSB) と混合し、37°C で 24 時間増菌培養した。更に、その培養液の 1 ml を 10 ml の HTB に接種して、37°C で 24 時間 2 回目の増菌培養を行った。そして、その増菌培養液の 1 ml を 10 ml の TSB に接種して、37°C で 24 時間 3 回目の増菌培養を行い、その 1 ml は昨年度報告したサルモネラ特異的 PCR によりサルモネラの検出を試みた。同時に、全ての増菌培養液の 0.1 ml を DHL 平板に塗抹してサルモネラの検出を試みた。感染後、37 週目に、全てのニワトリ

の盲腸、肝臓、脾臓、血液から *S. enteritidis* を検出を試みた。

4) 抗菌物質の使用のサルモネラ保菌への影響

現在一般的に成長促進のために広く使用されている抗菌物質の使用が盲腸内の *S. enteritidis* 保菌に及ぼす影響を明らかにするために、8 種類の抗菌剤, avilamycin (AVM), enramycin (ER), efrotomycin (EFM), lasalocid (LS), monensin (MN), nosiheptide (NHT), salinomycin (SLM), and virginiamycin (VGM) を初生雛用標準試料 SDL No.1 と、それぞれ 10, 5, 6, 75, 80, 5, 50 および 75 ppm の濃度で混合し 30 匹の雛に与えた。これらの濃度は一般的に使用されているものである。30 匹の雛は衛生的な 3 ゲージ内で飼育し、それぞれ 9.0×10^4 個の *S. enteritidis* を経口感染させた。この際、生後すぐに抗菌物質添加飼料および *S. enteritidis* を与えた。その後 3 週間、盲腸内のサルモネラ菌数を、抗菌剤を与えない場合と比較した。

次に、80 匹の雛を衛生的な 8 ゲージに分けて飼育し、そのうち 40 匹には 3 週間 AVM (10 ppm) 添加飼料を与え、次の 2 週間は抗菌剤を含まない飼料を与えて飼育した。飼い初めて 1 週間目に 6.0×10^4 個の *S. enteritidis* を経口接種した。その後

4週間毎週盲腸内菌数を測定した。

C. 研究結果

1) 臓器および盲腸内菌数

S. enteritidis と EHEC O157 の菌数を図ると、EHEC O157 は3週間目には盲腸内から分離することは出来なかったが、*S. enteritidis* では徐々に増加する傾向があった(図1)。しかし、脾臓、肝臓および血液からは両菌とも分離できなかった。

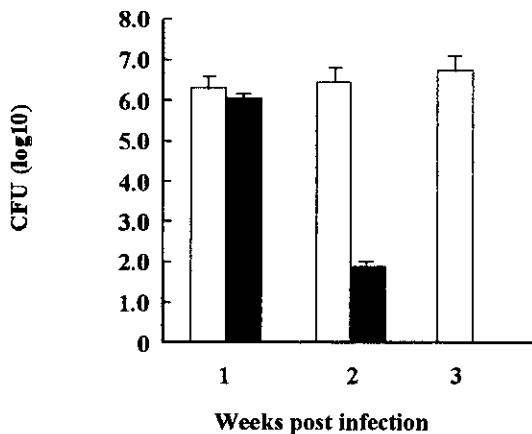


図1. *S. enteritidis* と EHEC O157 の菌数
白棒が *S. enteritidis*、白抜きが EHEC O157 の菌数である。

2) 飼育環境とサルモネラ保菌

まず衛生的なゲージと不衛生なゲージ内で飼育された雛のサルモネラ保菌を調べた。その結果、不衛生なゲージの方が衛生的なゲージよりサルモネラ保菌数が高かった(図2)。また、雛を飼育していた不衛生なゲージ内に、未接種の雛を新たに導入すると、経口感染させた雛と同じよ

うなサルモネラ保菌の増加が観察された(図2)が、それらを1週間後に新しい衛生的なゲージに導入するとサルモネラの保菌数は減少した(図2)。

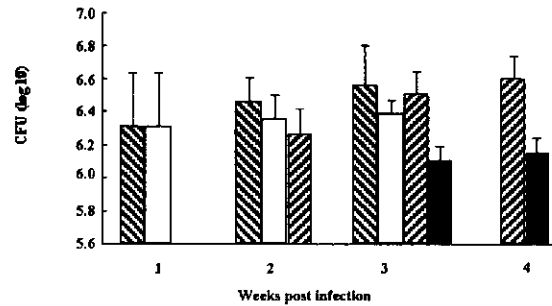


Fig. 2. Influences of the breeding environments on the *Salmonella* colonization in the ceca. Chickens were fed in the sanitary (□) and unsanitary (▨) cages. Fresh newborn chickens were fed in the unsanitary cages including excretory feces from the infected chickens (▧), but at 1 week post introduction, the chickens were transferred into new sanitary cages (■).

次に飼育密度の影響を調べた。10羽を1ゲージ内で飼育する方が、5羽飼育するよりも菌数が有意に高かった。また、5羽の飼育であっても、不衛生な状態の方が菌数が高かった。更に、10羽飼育していた状態から、5羽間引きして飼育を続けた場合、菌数の減少が顕著になった(図3)。

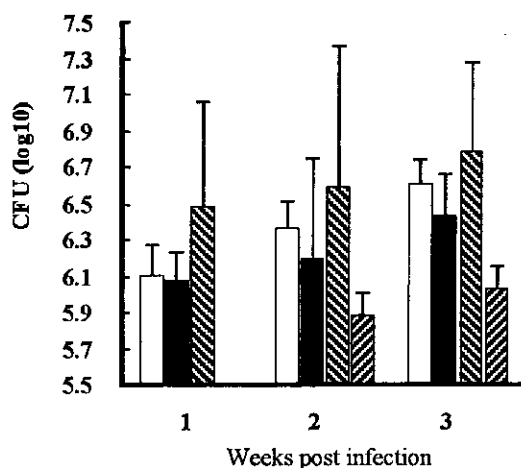


Fig. 3. Influence of the number of chickens in a cage on *S. enteritidis* colonization in the intestine.

A total of 70 chickens divided into six groups of 5 chickens and four groups of 10 chickens. Three unsanitary (□) and three sanitary (■) cages of 5 chickens were prepared and the CFU of *S. enteritidis* in the ceca of all chickens in each cage were measured weekly. Four sanitary cages of 10 chickens were also prepared, and the CFU of *S. enteritidis* in the ceca of all chickens in each cage of these three cages were measured weekly (▨). Ten chickens in the remaining one cage were divided into two groups of 5 chickens in 2 new sanitary cages at 1 wai, and the CFU in the ceca were measured weekly (▩).

3) 卵巣、卵管および卵のサルモネラ保菌

S. enteritidis を感染させた雌の初生雛のサルモネラ保菌を長期間調べた。7 週間の間盲腸内からはコンスタントに *S. enteritidis* が分離できたが、卵管や卵巣、肝臓、脾臓、血液からは全く検出できなかった (表 1)。さらに、22~35 週飼育すると、新鮮盲

腸便からはコンスタントに *S. enteritidis* が分離できたが、増菌培養や PCR 法によっても産卵直後の卵からは一切サルモネラは分離できなかった (表 1)。

4) 抗菌剤のサルモネラ保菌への影響

成長促進の目的で一般的に使用されている抗菌剤を 8 種類飼料に添加して、サルモネラ保菌への影響を調べた。ER, VGM, NM, SLM および LS 添加飼料の場合、盲腸内の *S. enteritidis* 菌数は抗菌剤無添加飼料で飼育したコントロール雛と比べ、ほとんど差が無かった (図 4)。しかしながら、AVM, NHT および EFM 添加飼料を用いた場合、*S. enteritidis* の盲腸内菌数はコントロールに比べ有意に高かった (図 5)。

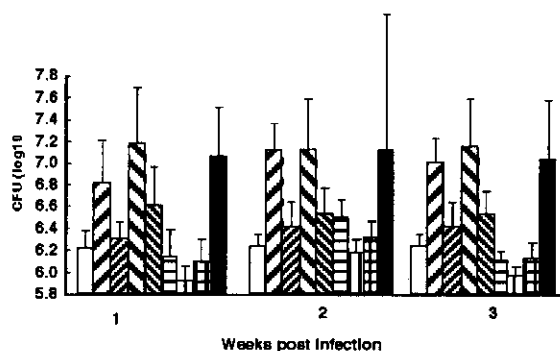


Fig. 4. Influence of antimicrobial agents on *S. enteritidis* colonization in the intestine. □, Control; ■, AVM; ▨, ER; ▧, NHT; ▩, VGM; ▪, MN; ▫, SLM; ▬, LS; ■, EFM.

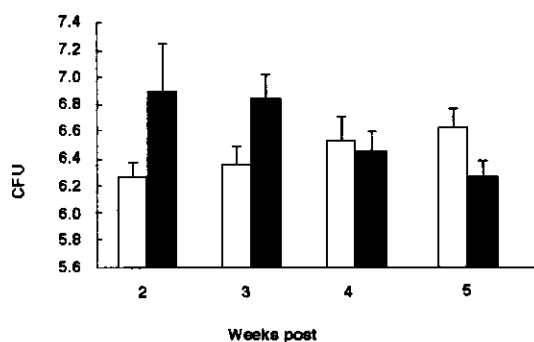


Fig. 5. Influence of antimicrobial agents on *S. enteritidis* colonization in the intestine. A total of 80 newborn chickens were divided into 8 sanitary cages. Feed without an antibiotic agent was given to 40 chickens in 4 cages as controls (□). Feed with AVM was given during the first 3 weeks to the remaining 40 chickens, and then during the next 2 weeks feed without antibiotic agents was given to them (■). At 1 week after feeding, *S. enteritidis* was inoculated orally into all chickens, and the CFU of *S. enteritidis* in the ceca of all chickens in each cage were measured weekly.

上記の実験は抗菌剤添加飼料投与と *S. enteritidis* 接種が同時であったため、抗菌剤の影響無しに盲腸内に菌の定着が起こった可能性が示唆された。そこで、抗菌剤添加飼料投与後1週間目に *S. enteritidis* の接種を行い、更に、抗菌剤無添加飼料に園に週間後に切り替えて保菌状態を観察した。AVM (10 ppm) を飼料に添加して実験を行ったところ、常に無添加群より有意に高い菌数が盲腸内に定着していたが、抗菌剤無添加の状態にすると菌数は急激に減少した (図5)。

D. 考察

S. enteritidis の卵汚染は深刻な問題になってきているが、その制御に関してはワクチン接種が有力視されているが、飼養管理への配慮が少ない。そこで本年度は、卵汚染に及ぼす飼養管理、衛生管理について、特に成長促進用に用いられている抗菌剤のサルモネラ保菌に与える影響を調べた。その結果、大腸菌 O157 は急激に体内から排除されるにもかかわらず、*S. enteritidis* は一度保菌すると5ヶ月以上盲腸内に保菌され、恒常的に排菌していることが明らかとなった。更には、宿主には全く影響を顕さず、他臓器からは *S. enteritidis* は分離されなかった。これは、雛の段階で、*S. enteritidis* に以下に暴露されないように飼育するかが、その後の *S. enteritidis* 保菌に大きく影響することを示している。同時に、先進国で一般的になっているニワトリの多頭羽飼育は *S. enteritidis* 保菌の増加を助長していること、しかも不衛生状態で飼育することが更に助長していることを示した。その大きな原因は初生雛が本能的に持つ親鳥の糞便を啄ばみ、いわば食糞によって正常細菌叢を獲得する性質が大きく関与していると考えられた。一般に、ヒナが正常細菌叢を形成するためには2~4週を要す

るとされている¹²⁾。しかし、近代養鶏ではヒナは親鳥から隔絶されており、外界の環境から徐々に取り込んだ細菌で独自に正常細菌叢を構築しなければならない。そこで近年、初生ヒナに成鶏の盲腸内細菌叢を人工的に与えて、速やかに盲腸内細菌叢を確立させることによりサルモネラの定着を防ぐ競合排除 (competitive exclusion : CE) 法が考案実用化されている。

今回の実験では、*S. enteritidis* 実験感染鶏の卵巣および卵管から *S. enteritidis* の検出は認められず、卵からの検出も陰性であった。これは感染鶏であっても産卵される全ての卵に *S. enteritidis* が移行するものではなく、ごく低頻度 (0.8%ほど) で検出されるという報告を裏付けている。また卵中の汚染菌数も、自然保菌鶏では卵中の *S. enteritidis* 菌数は産卵後、室温で7日間以内の保存条件であるならば、20個/卵未満と少ないことも知られており、今回、*S. enteritidis* を検出できなかった一因と考えられる。しかし、感染鶏の盲腸便からは *S. enteritidis* が経常的に検出されるため、on-egg による汚染卵が、in-egg よりも頻度が高く起こりうる可能性があるかもしれない。卵は 41.9℃という高温で産み落とされるため、室温にさらされて急激に冷える時に圧力勾配が生じ、菌の侵入

を容易にしているとされている。

わが国では産卵鶏の原種鶏や種鶏は、そのほとんどが英国や米国などから輸入されており、in-egg による汚染防止には、輸入時にこれらの種鶏の *S. enteritidis* 保菌状況をチェックし、陽性ヒナを排除することが重要である。1989年以降にわが国で *S. enteritidis* による食中毒が著しく増加した原因の一つは、1988年以降に英国から輸入した *S. enteritidis* の保菌鶏であると言われている。さらに、各ファームでの原種鶏・種鶏場および孵卵場の *S. enteritidis* 防止のための衛生管理も大切である。

次に、*S. enteritidis* の定着や排菌に及ぼす抗菌性飼料添加物の影響については、抗生物質の種類によって、有意に菌数が高いグループと対照と変わらないグループとに分かれた。これは、抗コクシジウム剤であるモネンシン、サリノマイシン、ラサロシドにおいてはコクシジウム原虫の初期スポロゾイトの腸管侵入阻止というもので、サルモネラに関しては直接的に作用していないためと考えられる。一方、成長促進目的で使用されているアピラマイシン、エンラマイシン、ノシヘプタイド、バージニアマイシン、エフロトマイシンではアピラマイシン、ノシヘプタイド、エフロトマイシンで有意に菌数が高かった。これらの抗生物質は全て、

主としてグラム陽性菌に抗菌力を有し、グラム陽性腸内細菌を減少させた結果、サルモネラにとって増殖しやすい環境をつくってしまった可能性が考えられる。しかし、同じグラム陽性菌に対する抗菌作用を示すエンラマイシンとバージニアマイシンでは、*S. enteritidis* 保菌は対照とほとんど変わらなかった。これら 2 種の抗生物質は、20 年以上前から使用されているので、耐性菌が増え、抗菌力が弱まった可能性も考えられる。実際アピラマイシンでは、飼料の添加濃度を低下させたところ、有意な菌数の減少が認められ、ニワトリの *S. enteritidis* 保菌状況に影響を及ぼすことが示唆された。これらのことから、抗菌性飼料添加物の一部に *S. enteritidis* に対して憂慮すべき点が認められた。しかし、それらの抗生物質は有益な成長促進効果をもつため、*S. enteritidis* に対して悪影響を与えたとしても、それらを直ちに制限することは實際上、困難である。

E. 結論

近年、サルモネラによる食中毒が増加傾向を示し、なかでも卵および卵加工品による *S. enteritidis* 食中毒が急増している。そこでまず、初生雛に SE を感染させると、盲腸内容物から経時的に SE が検出され、その菌数も経時的に軽微ながら増加傾向

を示した。これらは、衛生状態を改善し、更に飼養密度を低くすると改善された。また、卵への *S. enteritidis* の移行は観察できなかった。このことは on-egg による汚染卵が低頻度ではあるが、起こりうる可能性を示唆した。また、成長促進の目的で使用されている抗菌性飼料添加物の *S. enteritidis* への定着や排菌に及ぼす影響について調べた結果、一部の抗生物質で *S. enteritidis* の保菌を助長する傾向が見られた。種々のサルモネラ対策が講じられているが、飼育管理の改善がサルモネラ食中毒を減少させる基本であると結論された。

F. 研究発表

現在投稿、審査中。

Table 1. Detection of *S. enteritidis* cells from organs and feces.

	Weeks post infection					
	2	5	6	7	22~36	37
Ovary	0	0	0	0	NT	0
Fallopian tube	0	0	0	0	NT	0
Egg	NT	NT	NT	NT	0	0
Liver	0	0	0	0	NT	0
Cecum content	2.4× 10 ⁶	5.3× 10 ⁶	1.2× 10 ⁶	2.3× 10 ⁶	NT	1.9× 10 ⁶
Cecum feces	NT	NT	NT	NT	0.5~2.0× 10 ⁶	NT

NT, not tested.

20000533

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」

Vi-Suppressed wild strain Salmonella typhi cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer's patches.
Zhao L, Ezak T, Li ZY, Kawamura Y, Hirose K, Watanabe H.
Microbiol Immunol 2001;45(2):149-58