

サルモネラの診断・予防法の開発

課題番号 H11-新興-7

平成11-13年度 厚生科学研究費補助金
(新興・再興感染症研究事業)

平成14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11-13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 岡山大学医学部保健衛生学科 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11-13年度 厚生科学研究費補助金

(新興・再興感染症研究事業)

サルモネラ の問題	1
平成11年-13年度の 総括概要	2
平成13年度分担報告	
サルモネラのヒト特異的な接着・侵入因子の解析	9
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	15
倉園久生 岡山大学医学部保健衛生学科	
遺伝子ノックアウト法を使った <i>Salmonella</i> の病原性解析および MicroPCR 法の開発	26
江崎孝行 岐阜大学医学部	
サ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	43
中山周一 国立感染症研究所細菌部	
サルモネラの食品内における食塩抵抗性と VNC 状態への移行に関する 研究	47
牧野壮一 帯広畜産大学畜産学部	

サルモネラ症と *Salmonella* の問題点

サルモネラはヒトに感染し、敗血症型の全身感染症と限局性の腸炎型の感染症を起こす。全身感染症として腸チフスの場合、原因菌は小腸上皮のパイエル板のM細胞に侵入ないし貪食され、マクロファージ内で増殖し、肝臓などの網内系をフォーカスとして、敗血症を惹起すると考えられている。快復後は *Salmonella* Typhi に対する血清凝集抗体価が上昇し、強い感染防御免疫を獲得すると言われている。一方、食中毒などの限局性の腸炎を起こす場合にはその病原因子が特定できず、獲得免疫の強弱などもはっきりしていない。

細菌の問題としては、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、その血清型もヒト以外の動物などを宿主としており、同じ血清型菌でも宿主により病状が異なる。典型的な例は、*S. Typhimurium* はヒトには限局性の腸炎を主症状とするがネズミでは敗血症を起こし、*S. Chleraesuis* はブタにおいて然りである。サルモネラの病原因子として、現在約50—100種類の遺伝子が候補に挙げられているが、その多くは菌の染色体上(ゲノム)に Pathogenicity Island を構成し、現時点で5種類の Island が認知され、これらは水平伝播している。また、これらの遺伝子の発現には同時に寄生するプラスミドとの相互作用がありそうである。

サルモネラの病原因子遺伝子は環境条件によりその発現が巧妙に調節されており、生体内でのみ、あるいは細胞内でのみ発現するものがあり、試験管内で病原性を検定することがかなり困難である。

このように *Salmonella* がヒトに感染症を惹起する要件は、菌側にも宿主側にも不特定多数の条件があり、病原性が特定し難い。それがこの細菌による感染症発症の予防・対策を困難にしていると考えられる。

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) *Salmonella* はヒトのどのような受容体と環境条件を認知しているか。
 - (2) 病原因子となる物質・分子およびその遺伝子を特定する。
 - (3) 血清型およびファージ型—外膜多糖体分子構造—の多様性と病原性との関連性
 - (4) 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)
- 本研究では、このような問題点を解明しながら、迅速に、簡便に、正確に環境や食品、患者検体などから、起因サルモネラを同定する方法を開発することを志向した。

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
平成11年－13年度（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

研究の要旨

自然界に普遍的に分布する *Salmonella* 属の中から、ヒトに特異的に病原性を発揮する菌株を迅速・簡便・正確に同定する方法を開発し、これを用いて、食品や経口摂取する可能性のある物品などを定期的、あるいはルーチンな作業として検査し、大規模な経口感染を予知・防止するために役立てることを目的とした。本研究により以下の点が実用可能となり、問題点が明らかになった。

同定・診断法・分子疫学解析の指標

1. 通常の PCR 法で、*invA* 遺伝子、*stn* 遺伝子を指標にしたプライマーで食品・臨床検体から、*Salmonella* 属は精度よく検出できる。(1、2、13、および江崎報告)
2. *Salmonella* 属の検出には、*invA* 遺伝子、*stn* 遺伝子を、*Salmonella enteritidis* の検出には *rfbE* 遺伝子と *fliC* の *gmp* 抗原遺伝子を指標としてプライマーを用い、Real Time Capillary PCR 法 (384 well) で1時間以内に推定同定ができる。(江崎報告)
3. 血清型の迅速診断法として、O 抗原合成遺伝子群から 11 種を選び、その Primer セットを利用して 384Well を用いた Real Time Capillary PCR 法を開発した。この方法では食品などに混入した菌の存否を1時間以内で、血清型の予測は2時間程度で可能になる。(江崎報告)
4. この結果をさらに確認する場合には、別に作製した約 600 種類の遺伝子の DNA チップを用い、増幅した DNA 断片の遺伝子確認が可能であるが、更に半日を要する点にやや難点がある。(江崎報告)
5. いか菓子が原因食品となった、*S. oranienburg* の分離株および他所で分離された株について、PFGE 法、ERIC1、2 PDR 法、Ribotyping および Plasmid のプロフィールについて解析した。PFGE 法、ERIC1、2 PDR 法は血清型間の識別に有用であり、Plasmid のプロフィールは同種菌・同血清型で、しかも同時期に流行した菌株でも異なる型を示すことがわかった。(13)
6. エンテロトキシンのエピトープを指標にした、ELISA 法を開発・試作した。サンドウィッチ法で分離株について検定したところ、特異性は明らかであったが、菌種によりエンテロトキシンの発現量が異なり、均一な検出はできなかった。しかしこの検出法で未だ性状の解明されていない、サルモネラ・エンテロトキシンの精製が可能になった。(倉園報告)

7. 北海道で1977年から1999年までに家畜から分離された *S. Typhimurium*、103株について、Fluorescent amplified-fragment polymorphism (FAFLP)と Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)により分子疫学的な解析をした。FAFLPにより A、B、C、D の4型に、PFGEにより I、II、III の3型にわかれた。この方法は *S. Typhimurium* の分子疫学解析のために良好な指標となる。(12)

病原性、病原因子の解析

1. Vi 抗原欠損株は血中では、正常血清中に存在する殺菌因子により殺菌され増殖しない。すなわち Vi 抗原は血中に棲息し、マクロファージなどの貪食細胞内で増殖するためには必須因子であり、敗血症の主要な病原因子となる。(江崎報告)
2. 高浸透圧下では Vi 抗原の発現は抑制され、鞭毛抗原や SipC (分泌タンパク)が多量に産生される。この菌を2週間にわたって静脈栄養で飼育したラットに経口摂取すると、腸管の Peyer's Patch が速やかに傷害され出血斑が生じた。すなわち、鞭毛抗原や SipC は上皮細胞への侵入と、機能障害には必須であることが判明した。しかし、SipC の変異株は貪食細胞内では野生株以上に増殖することから、SipC は細胞内増殖能には関与しないことがわかった。(江崎報告)
3. 各種変異株の解析から、いわゆる教育用に安全な *Salmonella* の作製を試みた。その結果、*vi*、*invA*、*invB*、*rpoS* の4遺伝子を破壊すれば、殆ど病原性は欠落することがわかり、これを教育用菌株として利用することを提唱した。(江崎報告)
4. *Salmonella enteritidis* の鞭毛抗原 FilC はヒトの大腸癌株化細胞 CaCo-2 細胞に作用し、NF- κ B を活性化し、 β -デフェンシン-2の産生を促進する。(9.10)
5. 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。

病原因子の発現調節 (15)

1. *Salmonella* の線毛 (Pili) は培養条件により発現が変化する。特に接着する細胞により、さらに侵入時、侵入後にその発現は変化することを明らかにした。(14)
2. 浸透圧や pH により病原遺伝子群の発現は制御されるが、2成分制御系の *cpxR-cpxA* 系と侵入因子と見なされる *hilA* について pH6 と pH8 の影響をしらべた。(中山報告)
3. 約 600 種類の遺伝子断片で DNA チップを作製した。これを用いて Homologous Recombination 法で変異株を作製し、各遺伝子機能を解析した。OmpR 変異株の解析から、低浸透圧では多くのタンパク合成系 (mRNA として) が抑制されるが、高浸透圧では野生株は速やかに各種のタンパク合成が上昇するものの、変異株では遅れて合成が起こることがわかった。すなわち、浸透圧感受性調節

機構には Omp 系以外の調節系があることが示唆された。この DNA チップは今後病原遺伝子の機能解析にきわめて有用である。(江崎報告)

4. *S. oranienburg* に食塩濃度、乾燥などのストレスを付加したところ、食品由来菌株は CFU で比較すると患者由来のものに比して抵抗性をしめした。しかし、患者由来菌の懸濁液にストレスを付加し、BacLight LIVE/DEAD cell viability kit で蛍光染色すると、この菌株は VNC (Viable but non-culturable) 状態にあることがわかった。VNC 状態が原因菌の検出・同定の障害となっている可能性があり、これを含めて検出する方法の開発が必要である。(牧野報告)

分担研究者

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

A. 研究目的

Salmonella 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ている。そのなかの幾種類かは食品や調理器具などにより、ヒトへ感染し、しばしば集団的に疾病を惹起する。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細胞壁の糖鎖の抗原により 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ヒトに特有な感染を起こすがその病原因子はまだ特定されていない。そのために、食品精製工程などで、いわゆる HACCP によるルチーンなモニタリングが実行されにくく、感染症の発症を未然に防止する特異的な方策が実施されにくい。

Salmonella は自然界では、は虫類、家畜、その他の野生動物を宿主としているが、ヒトへの感染は経口感染であり、何らかの経路で食品など経口摂取するものへ混入し、感染する。したがってこの感染経路さえ遮断すれば、この感染症を征圧することが可

能である。食品やヒトの保菌者を定期的に、簡便に検査するために、ヒトに特異的な病原因子(接着因子、毒素、侵入因子、抗食菌因子など)を指標として、菌株の迅速な検出法を開発する必要がある。さらにこれを利用して病原菌株の混入を未然に防止する方策および伝播経路を遮断する方策を策定することが可能になると期待される。

Salmonella の発症病理について、その病原因子を特定し、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も本研究の目的である。具体的には以下の点に集約して研究した。

(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
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. *Salmonella* 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. *Salmonella* 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. *Salmonella* 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) *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った。

(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

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（食後）における発現遺伝子の相違の探索

Salmonella 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

Salmonella 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、ドットブロット法、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標としら ELISA 法を作製する。

C. 研究結果

研究結果の概略は要旨に記述し、詳細は各分担研究者の報告にあるので、この項は省略する。

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的として、本研究を遂行した。*Salmonella* Typhi 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、これらの構造物の組成・構造などは環境条件により大きな影響を受けている。どのような環境条件が菌体のどのような情報伝達系へ各個的に作用しているのか、あるいはネットワークを形成しているかは、現在なお鋭意検討が続い

ている。*Salmonella* の病原因子とその発現調節機構についての最近の知見をまとめた(15)。さらの全ゲノム構造の解析が国際的に進展し、その情報はリアルタイムで公表されている。腸内細菌科に共通していることであるが、病原因子は Pathogenicity Island を構成し、また大型のプラスミドが病原因子に関与している。*Salmonella* の SPI は現時点で SPI-1 SPI-5 が認められており、これらが菌株間を移動していることが明らかになっている。しかし、やはりなお、ヒトに特異的に寄生する因子、病原性を発揮する因子の正体はボンヤリとしてしか把握できていない。

Salmonella の検出・診断法としては、PCR 法が普及し、さらに簡便化・迅速化された。ここで報告した方法はそれなりの設備と施設を備えた研究室で行うものである。しかし、このような設備・機器を備えた検査室は、各県に一カ所ないし数カ所に設置できる規模であり、決して実用化は困難ではない。行政検査機関へリアルタイムによる PCR 法を設置するように要望したい。

エンテロトキシンの抗体を作製し、これを利用して感度の高いサンドウイッチ 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

ヒトに特異的に寄生する因子と病原性因子の遺伝子および遺伝子産物を特定し、それを指標とした、正確・簡便・迅速な検出方法の創出を試みてきた。現時点では遺伝子診断法がもっとも実用可能な方法であると思われる。同時に、地道に、ヒトに特異的に寄生する因子と病原性因子の遺伝子および遺伝子産物を探索し特定する研究を深めることも必要である。

F. 研究発表

I 論文発表 (発表予定を含む)

1. S. Makino, H. Kurazono, M. Chongsauguam, H. Hayashi, H. Cheun, S. Suzuki and 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
2. P. Tapchaisri, 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.
3. E. Yabuuchi 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*. Int. J. System. Evolt. Microbiol. 50, 1693-1694.
4. T. Ezaki, 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. System. Evolt. Microbiol. 50. 941-944.
6. T. Ezaki, 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. System. Evolt. Microbiol. 50. 945-947
7. K. Sakamoto, H. Hirose, T. Ezaki, Y. Kawamura, A. Onizuka, M. Hayashi, T. Yamada and T. Saga. 2000. Translocation of *Salmonella typhimurium* in rats; effect of enteral and parental nutrition. Eur. J. Surg. 166, 814-817.
8. L. Zhao, Y. Kawamura and T. Ezaki. 2001. Construction of virulent defective mutants of *Salmonella typhi* and their phenotypic description as candidates for educational usage. Microbiol. Cult. coll. 17, 13-21.
9. L. Zao, 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.

10. A. Takahashi, A. Wada, K. Ogushi, K. Maeda, T. Kawamura, K. Mawatari, H. Kurazono, J. Moss, T. Hirayama and Y. Nakaya. 2001. Production of b-defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by *Salmonella enteritidis* flagella filament structural protein. FEBS Letters. 508, 484-488.
 11. K. Ogushi, A. Wada, T. Niidime, N. Mori, K. Oishi, T. Nagatake, A. Takahashi, H. Asakura. S. Makino, H. Hojo, Y. Nakahara, M. Ohsaki, T. Hatakeyama, H. Aoyagi, H. Kurazono, J. Moss and T. Hirayama. 2001. *Salmonella enteritidis* FliC (flagella filament protein) induces human b-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. J. Biol. Chem. 276, 30521-30526.
 12. Sonjai, K., R. Soisangwan, Y. Sakolvaree, H. Kurazono, M. Chongsauguan, P. Tapchaisri, Y. Mahakunkijcharoen, G.B. Nair, H. hayashi and W. Chaicumpa. 2001. Validation of *Salmonella* and Shigellosis diagnostic kits at a provincial hospital in Thailand. Asian. Pac. J. Allergy. Immunol. 19. 115-127.
 13. Y. Tamada, Y. Nakaoka, K. Nishimori, A. Doi, T. Kumaki, N. Uemura, K. Tanaka, S. Makino, T. Sameshima, M. Akiba, M. Nakazawa and I. Uchida. 2001. Molecular Typing and Epidemiological Study of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolates from Cattle by Fluorescent Amplified-Fragment Length Polymorphism Fingerprinting and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J.Clinical.Microbiology. 1057-1066
 14. T. Kumao, W. Ba-Thein, H. Hayashi. Molecular subtyping methods for detection of *Salmonella oranienburg* outbreaks. Revised version-JCM1469-01.
 15. W. Ba-Thein, T. Kumao, M. Obata-Yasuoka, H. Hayashi. 2002. Cell-dependent serovar-specific expression of *Salmonella* fimbriae.
 16. W. Ba-Thein, and H. Hayashi. 2002
- 参考 (和文)**
1. 江崎 孝行、趙 立成、1999、チフス、Medicina、36、1898-1901
 2. 江崎 孝行、河村 好章、2000、遺伝子検査による迅速な薬剤耐性検査法、医学のあゆみ、195、295-301
 3. 波多 宏幸、市村 禎宏、江崎 孝行、2001、DNAマイクロアレイを用いた細菌の検出および同定、臨床検査、45、776-778
 4. 江崎 孝行、2001、ゲノム解析と臨床微生物への利用、臨床と微生物、28、735-743
 5. 林 英生、サルモネラ症 1999 竹田・五十嵐・小島編「エマージングディーズ」pp9-15
 6. 林 英生、病原微生物のゲノム解析 2001、蛋白質・核酸・酵素、46、2400-2406.
- II. 学会発表
各分担研究者の項参照
- G. 知的所有権の獲得状況**
- 研究班としては現時点では特に取得や申請をしていないが、分担研究者の一部は特許を申請している。

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 のヒト特異的な接着・侵入因子の解析

分担研究者 林 英生 筑波大学基礎医学系教授
(ウイリアム バテイン、熊王俊男)

Salmonella の感染初期段階で宿主細胞へ接着・侵入するためにどのようなフィンブリエが産生（発現）されるかについて検討した。*Salmonella* のフィンブリエ関連遺伝子の内、5種類を選択し、その遺伝子の分布を血清型別に調べた。PCR法では、血清型別菌株間でフィンブリエ関連遺伝子の存否には特異性はみられなかった。*S. Paratyphi C* と *S. Enteritidis* は LB 培地と DMEM 培地では発現するフィンブリエが異なっていた。培養した菌 (*S. Typhi*, *S. Paratyphi*, *S. Paratyphi C*, *S. Oranienburg*, *S. Choleraesuis* and *S. Enteritidis*) を CaCo2, HeLa, U937 培養細胞へ 15 分間接着し、フィンブリエの発現をノザンプロットで解析したところ、菌株と細胞の種類により、発現する遺伝子が異なっていた。*Salmonella* が感染の各段階でその環境条件を感知し、それに素早く対応して、宿主細胞へ接着し引き続き侵入などをしていることが明らかとなった。

目的

サルモネラは 2000 種類以上の血清型に分けられ、自然環境中に広く生息し、両生類からヒトまで広範囲な動物宿主に寄生しチフス疾患を惹起する。しかしヒトに疾病を惹起する菌株はヒトに特異的な接着・定着因子をもち、ヒトに特有な病原因子をもっている^{1,2)}。*S. Typhi* はヒトにのみ敗血症・腸チフスを惹起し、動物には感染しないし、*S. Typhimurium* はネズミに敗血症を起こすがヒトには限局性の腸炎を起こす。このような特異性は何らかの分子により発揮されるはずであるが、血清型と病原性の関係、病原性と宿主特異性を決める分子や遺伝子の関係などはまだ明瞭には特定されていない。現在、世界で 9 種の菌株の全ゲノム解析が進展しており、病原因子遺伝子については病原遺伝子群 (Pathogenicity Island) が水平伝播していることは明らかに

されているが、病態の特異性についてたなお不明である³⁾。また、サルモネラは生育する環境に対応して、必要な病原因子や抗食ないし抗抗菌因子を産生し、環境適応能力が高い^{4,5,6)}。このような複雑な調節機構がサルモネラの病原性を修飾していると考えられる。

ここでは、感染の初期段階でサルモネラが宿主細胞へ接着・侵入するために宿主細胞からどのような情報を得て、どのようなフィンブリエを発現させるかについて検討し、*Salmonella* の感染初期における応答機構を解析した。

材料・方法

研究室で保存している *Salmonella Typhi*, *S. Enteritidis*, *S. Paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. Typhimurium*, および茨城県における食中毒事例の分離株 *S. Oranienburg* を供試した。培養

株細胞は、CaCo2、HaLa、および U937 細胞を使用した。接着および侵入性の測定は常法によった。すなわち、コンフルエントに生育した細胞へ 10^6 /ml の菌液を添加し 15 分間接着させ、浮遊細菌を洗浄・除去後、顕微鏡観察とともに、CFU を測定し、接着菌数とした。接着後 3 時間培養後、表層へ接着した菌をゲンタマイシンで殺菌後、細胞を低張液に破裂させ、寒天培地で培養し生き残った細菌数を CFU で測定し、これを細胞侵入菌数とした。

菌のフィンブリエ遺伝子の検索は関連遺伝子の特定領域を選定しプライマーを設計し、Multiplex PCR 法で行った (表 — 1)。フィンブリエの発現は菌体の mRNA をノザン法で検出・測定した。すなわち、細胞に接着した菌を集菌し、素早く全 RNA を抽出し、標識したプローブ DNA で検出した。対象としたフィンブリエは Type-I fim *fimA*、Thin agg fim *agfA*、*S. enteritidis* fim *sefA*、Long polar fim *lpfA* Plas encoded fim *pefA* である。

結果

作製した Multiplex PCR の検出精度は図 — 1 に示す通りである。作製した Multiplex PCR は 5 種類のフィンブリエを精確に分別し検出していることを示している。図 — 1 で使用した菌株は *S. Oranienburg*、*S. Paratyphi B*、*S. Enteritidis*、*S. Typhi*、および *S. Paratyphi C* であり、それぞれ Thin agg. Fim, *agfA* および Type 1 fim *fimA* を共通して保持するが他のフィンブリエは菌株により異なったものを保有している。この検出系を用いて他の血清型のフィンブリエの保有分布を調べたのが表 — 2 である。*SefA* は *S. Enteritidis* が特異的に保有しており、*pefA* は *S. cholerasuis* *S. Paratyphi C* のみが保有している。ヒトに適応した血清型は特異なフィンブリエ遺伝子を持ち、それにより細胞へ接着している可能性がある。

これらのフィンブリエの遺伝子発現に、

培養条件がどのような影響を与えるかを調べたのが、表 — 3 である。LB 培地 と DMEM 培地とでは、菌種により発現するフィンブリエが異なるものがある。特に *S. Paratyphi B* と *S. Paratyphi C* では発現しないものがある。これを、培養細胞接着後 15 分の時点で調べると、接着させる細胞の種類により顕著に異なる (図 — 3)。*S. Oranienburg* では細胞を選ばないが、*S. Typhi*、*S. Paratyphi* 等は接着細胞によりフィンブリエの発現が異なっている。現時点では発現調節の法則性はまだ確実ではないが、*Salmonella* はフィンブリエの発現については素早く環境条件を感知し、対応していることが明らかである。

考察

Salmonella の病原性は多種・多様であるが、その一因は菌が広い範囲の環境適応性を有し、環境の変化に応じて必要な遺伝子を発現し、宿主細胞へ親和し、傷害を与えることにある¹⁾。図 — 2 は *Salmonella* が腸上皮から侵入し、限局性の腸炎を起こす機序と全身感染 (敗血症) へ進展する経路とを表したものである。菌は上皮に接着し、貪食され、細胞内食胞内で生息するが、この各段階で菌は自己防御に必要な遺伝子を発現している (表 — 4)。本研究では、その初期段階の菌が上皮細胞へ接着した場合にどのような接着因子を産生するか、また菌種・株によりどのように異なるかを調べた。さらに、これに引き続き細胞内へ侵入した場合の接着因子の産生をしらべると、迅速に発現を変化させていることがわかりつつある (未発表データ)。

Salmonella は特異な Pathogenicity Island を持ち、その種類も 4—5 種類に及んでおり、さらに新たなものが発見される可能性が高い²⁾。現時点で世界で 7 種類 9 株の全ゲノム構造解析が進展しているので³⁾、これが公表されれば病原性ないし病原因子のさらに新しい情報が得られると期待される。

発表論文

1. T. Kumao, W. Ba-Thein, H. Hayashi. Molecular subtyping methods for detection of *Salmonella* oranienburg outbreaks. Revised version-JCM,1469-01.
2. W. Ba-Thein, T. Kumaoh, M. Obata-Yasuoka, H. Hayashi. 2002. Cell-dependent serovar-specific expression of *Salmonella* fimbriae.
3. W. Ba-Thein, and H. Hayashi. 2002

学会発表

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

参考文献

- 1) Cotter, PA. and DiRita, VJ. Annu. Bacterial virulence gene regulation: An evolutionary perspective. Rev. Microbiol. 54. 519-565. 2000
- 2) Komoriya, K., Shibano, N., Higano, T., Azuma, N., Yamaguchi, S., and Aizawa, S. Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella typhimurium*. Molecular Microbiology 34. 769-779. 1999
- 3) Marcus, SL., Brumell, JH., Pfeifer, CG and Brett, B. *Salmopnella* pathogenicity islands : big virulence in small packages. Microbes and

Infection 2. 145-156. 2000

4) Ohl, M. E., and Miller S. *Salmonella*: A model for bacterial pathogenesis. Annu. Rev. Med 52. 259-274. 2001

5) Schaechter, M. and the view from here group. *Escherichia coli* and *Salmonella* 2000. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65. 119-130, 2001

6) Zhao, L., Ezaki, T., Li, Z.Y, Kawamura, Y., Hirose, K. and Watanabe, H. Vi-suppressed wild strain *Salmonella typhi* cultured in high osmolarity is hyperinvasive toward epithelial cells and destructive of Peyer's patches. Microbiol. Immunol. 45. 149-158. 2001

7) TIGR

<http://www.tigr.org/tdb/CMR/gmy/htmls/splash>
NIBI

www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/Genome/org.html
Sanger center

www.sanger.ac.uk/Prohects/Microbes

Institut Pasteur

www.pasteur.fr/recherche/banques/

<http://www.salmonella.org/>

表—1 Multiplex PCR for *Salmonella* fimbriae

Fimbrial operons (source)	Gene	Primer	Nucleotide sequence (5'—3')	PCR product (bp)
Type I fim. (<i>S. typhimurium</i>)	<i>fimA</i>	fim-f fim-r	CAAACGGAGCCGACAGGATA CTTCCCTGGCGTTCCCTG AC	663
Thin agg. fim. (<i>S. enteritidis</i>)	<i>agfA</i>	agf-f agf-r	CAGCATTTCGCAGCAATCGTA CCAACCTGACGCACCATTAC	403
<i>S. enteritidis</i> fim. (<i>S. enteritidis</i>)	<i>sefA</i>	sef-f sef-r	GGTTCAGGCAGCGGTTACTA CAGGGACATTTAGCGTTTCT	332
Long polar fim. (<i>S. typhimurium</i>)	<i>lpfA</i>	lpf-f lpf-r	TGCCGGCACCATTAAATTCA CAGTGTCGCATCGTCTGTAT	235
Plas. encoded fim. (<i>S. typhimurium</i>)	<i>pefA</i>	pef-f pef-r	GCAACCAGCGGTACAGCTAC ACTGCGAAAGCTGCCACAGA	197

表—2 Fimbrial genes distribution

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

表—3 Expression of *Salmonella* fimbriae

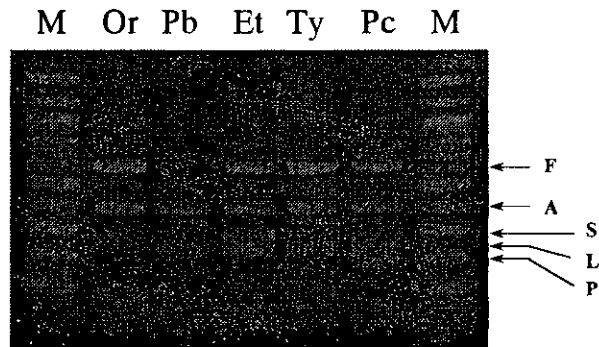
	<i>S. typhi</i>	<i>S. para B</i>	<i>S. para C</i>	<i>S. orn</i>	<i>S. chol</i>	<i>S. ent</i>
Fim. genes	F A - L -	F A - L -	F A - L P	F A - - -	F A - L P	F A S L -
<i>Medium-dept.</i>						
LB med.	F A - L -	- A - L -	F A - L -	F A - - -	F A - L P	F A - - -
DMEM	F A - L -	- A - L -	- A - - -	F A - - -	F A - L P	F - S - -
<i>Cell-dept.</i>						
CaCo2	F - - - -	- A - - -	- A - - -	F A - - -	- A - - -	F A - - -
HeLa	F A - L -	F - - - -	F - - - -	F A - - -	F - - - -	F A S - -
U937	F - - - -	F A - - -	F - - - -	F A - - -	F A - L -	F - - - -

F: fimA, A: agfA, S: sefA, L: lpfA, P:pefA

表—4 Infection site specific expression of virulence genes of *Salmonella*

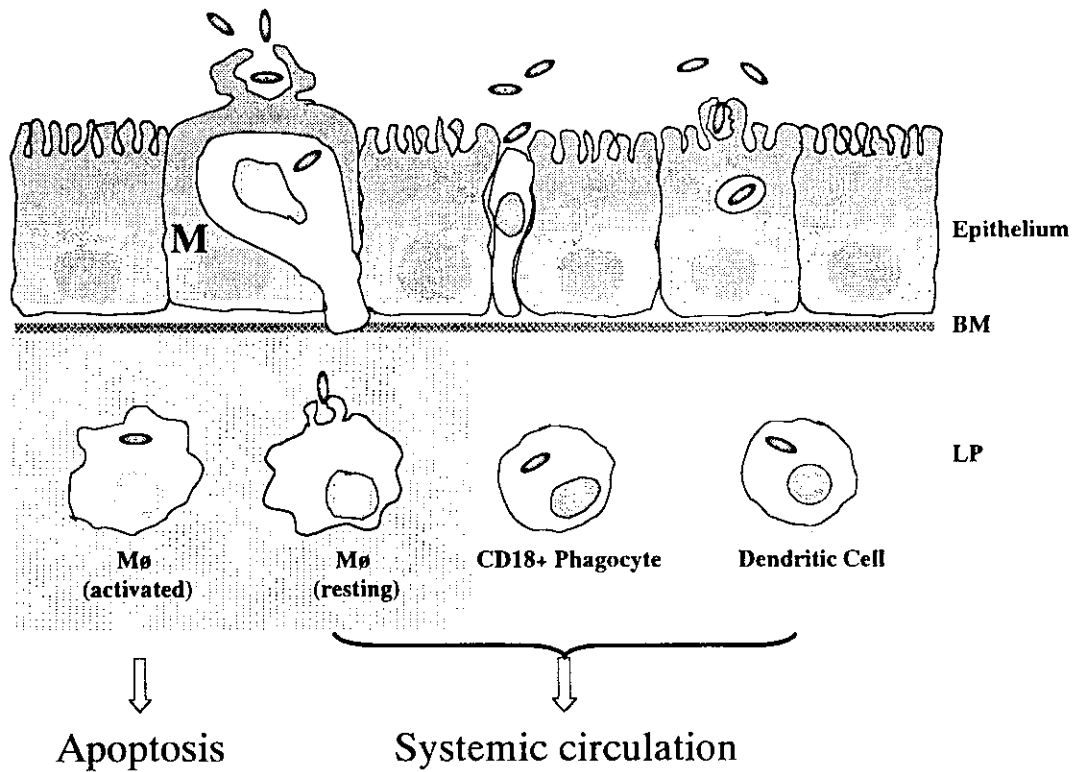
Location	Host defense	Interactions	Virulence genes/proteins [regulators]
<i>Stomach</i>	acid pH	log-phase acid tolerance response	<i>atr</i> genes [Fur, RpoS] {PhoPQ}
<i>Small intestine</i>			
(lumen)	AMP Bile salt Limited iron Others (O ₂ , Osmolarity, Pi levels, cations, growth phase)	modification of lipid A structure resistance to bile iron uptake	<i>pmrE, F, G; pagP</i> [PmrA/B] {PhoPQ} bile resistance genes [PhoPQ] <i>entF</i> [Fur]
(epithelium)	Enterocytes/M cells	adherence	<i>fimAICDHF</i> (type1 fim) [FimZ] <i>agfBAC</i> (thin agg. fim) [AgfD] <i>sefABCD</i> (<i>S. enteritidis</i> fim) <i>lpfABCDE</i> (long polar fim) <i>pefBACD</i> (plasmid encoded fim)
		plasma memb, ruffling macropinocytosis	SopE2 SipA, SipC (cytoskeleton rearrangement) SptP (recovery of plasma membrane)
		chemokines/ PGs secretion proinflam. cytokines secretion	?intracellular Sops SopE → IL-8 (basolateral surface) ? → PEEC (apical surface) → transepithelial migration
		intestinal secretion/inflammation	SopB → lipid dephosphorylation → Cl ⁻ secretion ?(SopD, SopA); PipA, PipB, PipD [SPI-5]
		shedding of enterocytes	?
(lamina propria)	Intraepithelial cells (CD8 ⁺ /CD4 ⁺ lymphocytes; plasma cells; Mø) Transmigrated cells (PMNs, CD18 ⁺ cells, Dendritic cells) Activated Mø Resting Mø	apoptosis macropinocytosis phagolysome fusion Mg ²⁺ uptake resistance to ROIs resistance to killing intraMø replication survival	SipB(SPI-1) → activation of caspase-1 SPI-1 (TTSS) SpiC → influence on intracellular trafficking of SCV; SseC <i>mgtA; mgtCB</i> (SPI-3) [PhoPQ] ?SlyA Gifsy-2 SPI-2 [PhoPQ, SsrAB, EnvZ/OmpR] SPI-2 (<i>slyA, pagC, pagD, ?pagP, mgtA, mgtCB, SpiC, pmrE, pmrF, spvR, spvABCD</i>) [PhoPQ]
	Dendritic cells; (CD8 ⁺ /CD4 ⁺ T lymphocytes); B lymphocytes; PMN		

图-1 Multiplex PCR for *Salmonella* fimbriae



Or = Oranienburg; Pb = Paratyphi B; Et = Enteritidis;
Ty = Typhi; Pc = Paratyphi C; M = 100-bp marker

图-2 Pathogenicity of Salmonella



厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
最終分担研究報告書

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。我が国でも、厚生労働省統計情報部の食中毒統計年報によると病因物質別ではサルモネラ属菌が第一位を占めている。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）の遺伝学的及び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った。

I. サルモネラ属菌に対する遺伝学的迅速診断法の確立

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。サルモネラ・エンテロトキシン遺伝子（*stn*）は、コレラ毒素及び毒素原性大腸菌の産生する易熱性毒素（LT）の毒素活性を担うAサブユニットとの相似性から同定された遺伝子で、その全塩基配列は既に決定されている。しかし、その下痢原性は *in vitro* でも *in vivo* でも証明されていない。本研究では、この *stn* 遺伝子に対する PCR 法を用いた迅速診断法を確立し、サルモネラ属菌における *stn* 遺伝子の分布を調査する。

B. 研究方法

1. *stn* 遺伝子に対する特異的プライマーの構築：Chopra 等により報告された *stn* 遺伝子の全塩基配列から 15 組のプライマーを作成した。
2. 1 で構築した 15 組のプライマーから最も特異性の高い組み合わせを選定するために、46 血清型 174 株の食中毒由来サルモネラ属菌を対象にその特異性を検討した。
3. 2 で選定した最も特異性の高いプライマー対を用いて、タイ王国で分離された 58 血清型 563 株のサルモネラ属菌（臨床分離株；432 株、食肉由来株；131 株）に対して *stn* 遺伝子の分布を検討した。なお、陰性コントロールとしては、*Citrobacter*、大腸菌、*Klebsiella* 等 224 株を用いた。

C. 研究結果

1. *stn* 遺伝子に対する特異的なプライマー対の選定；構築した 15 組のプライマーの特

異性を 46 血清型 174 株の食中毒由来サルモネラ属菌を対象に検討した結果、5'末端から数えて 144 番目から 164 番目の upstream primer

(5'-CTTTGGTCGTAAAATAAGGCG-3')と 384 番目から 403 番目の down stream primer (5'-TGCCCAAAGCAG AGAGATTC-3') (図 1) が最も高い特異性を示した。なお、PCR の条件は、Denature (94 °C)、Annealing (55 °C)、Extension (72 °C)をそれぞれ 1.0 分間ずつ 30 サイクル行い、PCR 産物 (260 bp)は 2.0%アガロース電気泳動で観察した後、*stn* 遺伝子に対する特異的な oligo primer (図 1) による Southern hybridization 試験で確認した。

2. 構築した遺伝学的診断法を用いた *stn* 遺伝子のサルモネラ属菌における分布の検討：タイ王国で分離された 58 血清型 563 株のサルモネラ属菌 (臨床分離株；432 株、食肉由来株；131 株) に対して構築した PCR 法で *stn* 遺伝子の分布を調べたところ、563 株全てがこの遺伝子を持っていた (表 1)。これに対して陰性コントロール (*Citrobacter*、大腸菌、*Klebsiella* 等) の 224 株は全て陰性を示した (表 1)。

D. 考察と結論

今回、構築した遺伝学的迅速診断法 (*stn* 遺伝子に対する特異的なプライマー対を用いた PCR 法) を用いる事により、サルモネラ属菌を高感度に特異的に検出することができた。これは使用した 58 血清型 563 株のサルモネラ属菌は全て陽性で、224 株の陰性コントロールが全て陰性であった事より明らかである。更に、この方法はアガロース電気泳動を含めた全行程が約 3 時間しかかからない事より、その迅速性も高い。以上の点から、今回、構築した遺伝学的迅速診断法は、特異性、迅速性、簡便性等から臨床或いは食品流通のあらゆる分野で広範に使用できるものである。

II. I で構築した遺伝学的迅速診断法の臨床応用

A. 研究目的

I で構築した遺伝学的迅速診断法の臨床応用を検討した。まず、家畜、畜舎、食肉処理場から分離したサルモネラ属菌に対するこの遺伝学的迅速診断法の特異性を検討した。更に、糞便およびミンチ肉に一定量のサルモネラ属菌を添加し、これらのサンプルに対するこの遺伝学的迅速診断法の特異性を検討した。

B. 研究方法

1. 野外分離株に対する遺伝学的迅速診断法の特異性の検討：20 血清型 89 株の野外分離株 (牛由来の 62 株；52 株は糞便由来、3 株は農場由来、3 株は臓器由来、1 株は牛乳由来、及び食肉検査所の鶏由来の 27 株) (表 2) に対して PCR 法により検査した。

2. ミンチ肉および牛糞便からのサルモネラ属菌の検出：ミンチ肉および牛糞便にそれぞれ 1.0 グラム当たり、0、1、10、或いは 100 個のサルモネラ属菌を添加した。これらのサンプルを 2 回増菌培養*して、それぞれのサンプルに対して PCR 法による *stn* 遺伝子の検出を行った。

*：①；1 回目の増菌培養；サルモネラ属菌を添加したミンチ肉および牛糞便 1.0 グラムを 10 ml の TSB 培地に接種し、37 °C で 16 時間振盪培養した。②；2 回目の増菌培養；①の培養液 0.1 ml をサルモネラ増菌培地 (Hajna tetrathionate broth) に接種し、37 °C で 16 時間振盪培養した。

C. 実験結果

1. 野外分離株に対する遺伝学的迅速診断法の特異性の検討：I の結果と同様に、全ての野外株 (20 血清型 89 株) が *stn* 遺伝子を保有していた (図 2-A)。

2. ミンチ肉および牛糞便からのサルモネラ

属菌の検出：ミンチ肉のサンプル全てで *stn* 遺伝子が検出された (図 2-B)。この結果より、1.0 グラムのミンチ肉に 1 個のサルモネラ属菌がいれば、この方法で検出する事が分かった。一方、牛糞便サンプルでは 2 回目の増菌培養のサンプルのみから *stn* 遺伝子が検出された (図 2-B)。

D. 考察と結論

本研究で構築した PCR 法による遺伝学的迅速診断法を用いる事で、研究室の保存株のみならず新たに分離した野外株からも *stn* 遺伝子を特異的に検出できる事が分かった。

更に、この方法は単離された分離菌に対してだけでなく、糞便やミンチ肉に潜むサルモネラ属菌の検出にも有効である事 (ミンチ肉 1.0 グラム当たり 1 個のサルモネラ属菌の検出が可能) より、厚生行政上、非常に有効である事が分かった。ミンチ肉に比べて糞便サンプルは増菌培養を 2 回行わなければ、*stn* 遺伝子を検出する事が出来なかった。PCR 法による糞便サンプルからの病原遺伝子の検出において、糞便に含まれる阻害物質によりその検出が妨げられる事は良く知られている。これを防ぐには、サンプルを希釈して阻害物質の濃度をできるだけ下げる事であるので、今後、糞便サンプルに対する実験条件の検討が必要である。

今回、構築した遺伝学的迅速診断法は海外でも高く評価され、ヨーロッパ食中毒情報 (<http://www.pcr.dk/>) にも掲載・公開されている。

III. *Stn*に対する免疫学的診断法の確立

A. 研究目的

I 及び II の結果より、*stn* 遺伝子は全サルモネラ属菌に特異的に存在する事が分かった。本研究の目的の一つは厚生行政に関係する全ての検査機関で、サルモネラ属菌の検出を可

能にする事である。このためには、遺伝学的診断法だけではなく、免疫学的診断法の開発を行う事で、選択の幅を広げることが肝要である。更に、*stn* 遺伝子は非常に特異的にサルモネラ属菌に分布する事は本研究により明らかになったが、今だその病原性の解明はできていない。このため、まず免疫学的診断法を構築し、臨床応用を目指すと共に、この方法を用いて *Stn* を精製してその詳細な病原性を明らかにする事で、サルモネラ症に対する新しい治療・予防法の確立を目指した。

B. 実験方法

stn 遺伝子は通常の発現方法で強発現させると宿主を殺してしまう事が分かった。そこで、*stn* 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列から 2 種類のエピトープを決定し、これらのペプチドに対する家兎抗血清を調整した。これらの抗血清を使ってサンドイッチ ELISA の系を構築し、サルモネラ属菌に対する免疫学的迅速診断の確立を目指した。

1. 家兎抗ペプチド血清の作成 ; *stn* 遺伝子の塩基配列から推定されるアミノ酸配列から 2 種類のエピトープ (QPDSKDRAFTLNT: P1 及び ALG KVFRQPFDR ER: P2) (図 3) の 2 種類のペプチドを F-Moc 法により合成して家兎を免疫して、2 種類の抗ペプチド家兎血清を作成した。

2. 抗ペプチド特異家兎 IgG の調整 : 各々の合成ペプチドを FMP 活性化セルロフィンカラムに固定し、作成した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 (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-Link™ NHS-Biotin で P2-IgG を Biotin 化した。

3. Sandwich ELISA の構築 (図 4) :

① P1-IgG を PBS で 20 μ g/ml の濃度に希釈