

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## 食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する 免疫学的高感度検出法に関する研究

所属 国立感染症研究所 食品衛生微生物部  
研究者 五十君 静信

### 分担研究者

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| (1) 国立感染症研究所食品衛生微生物部    | 春日文子   |
| (2) 大阪薬科大学薬学部           | 天野富美夫  |
| (3) 香川医科大学医学部           | 阪本晴彦   |
| (4) 東京農工大学農学部           | 片山薬子   |
| (5) CAF ラボラトリーズ (株) 研究所 | 大田博昭   |
| (6) (株) 矢内原研究所          | 矢内原千鶴子 |
| (7) キッコーマン (株) 研究本部     | 辰巳宏樹   |

### 要旨

食中毒原因菌のサルモネラとカンピロバクターについて、その病原因子を検討するとともに、菌体および病原因子に対する抗体を作出した。これらの抗体を用いて、食品および環境中から病原性のある食中毒菌を迅速・高感度に検出する方法の開発を試みた。

#### 1. 研究目的

食中毒原因菌のサルモネラ、カンピロバクター等を鋭敏に認識する抗体を作成して、食品、環境中あるいは臨床材料から簡便、迅速高感度に菌を検出するとともに、これらの細菌の病原因子を同定しその病原因子に対する抗体を作成し、免疫学的高感度検出法に応用することを目的とする。これらによって食中毒を未然に防ぐとともに、食品および環境中における病原因子の安定性を研究して菌の汚染の拡大防止を図る。

#### 2. 研究方法

- (1) サルモネラ検出用抗体の検討：SEの菌体を対数増殖期と静止期について回収し、ウサギに免疫を行い、免疫抗血清を得た。得られた抗血清を用いて、菌体の抽出物に対してどのような認識があるかをwesternプロット法にて解析した。高感度検出法に適する抗体の検討は、矢内原研究所と共同で、菌に対する凝集価、プロトタイプの簡易検出システムでの検出感度を指標に調べた。一方、SEの病原因子の検討は、細胞を用いたサルモネラの接着侵入試験において、作出した抗血清を用いて、SEの細胞への接着・侵入阻止を調べることにより検討した。これらの作用とwesternプロットによる抗血清の認識するタンパクの比較検討により病原因子の絞り込みを行った。阻止活性の認められる抗血清の認識から最も重要と思われる因子を特定し、末端のアミノ酸解析の結果から、その遺伝子を特定する。
- (2) サルモネラ新規病原因子 SEp22 の精製法の改良、および抗体の作成：鶏卵より分離したサルモネラ (*Salmonella enteritidis*, SE) のうち、マウスに病原性 (致死性) を示した C1#15-1 株を LB 培地中で一晩、振盪しながら培養し、静止期になった菌体を回収した。これを PBS で洗浄後、ガラスビーズ (Fast Prep™, BIO101) で菌を破壊した後、超遠心機で 100000g、60 分間遠心し、上清を菌体抽出液として 0.2 μm のフィルターをろ過して生菌を除いた。これに硫酸を加えて沈殿させ、分画することによって SEp22 を濃縮した。さらに 50 mM TrisHCl/0.1 mM EDTA, pH 7.5 に対して透析を行うことによって硫酸を除去した。精製標品の SEp22 をウサギの皮下にフロイントの complete adjuvant と混和して注射して免疫し、抗血清を得た。抗体は SDS-PAGE/Western 法によってその特異性および力価を判定した。また、精製した SEp22 と抗 SEp22 IgG を用いて ELISA 系を作成した。また、マウスに対しても SEp22

を免疫し、モノクローナル抗体の作成を行った。

- (3) ルシフェールサルモネラを用いた食肉からのサルモネラの高感度迅速検出法：ルシフェールサルモネラ(キッコーマン(株)製)の取扱説明書の指示の培地は、前増菌培地が Buffered peptone water (BPW)、選択増菌培地が Muller-Kauffmann tetrathionate broth (MKTT)と Modified semi-solid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV) であるが、これらの選択増菌培地は日本におけるサルモネラ検査では常用されていない。そこで、日本で汎用されている前増菌培地 EEM ブイヨン(EEM)、選択増菌培地 Tetrathionate broth, Hajna (HTT)と Salmonella enrichment broth acc. to Rappaport and Vassiliadis (RVS)に代替できるか検討した。MKTTおよびMSRVの場合は、キットによる免疫測定に供する前に、抗原の抽出と反応阻害の軽減のため、前者はそのまま、後者は1%コール酸ナトリウムで10倍希釈し、10分間沸騰水中で加熱処理を行う。HTTとRVSにおいて1%コール酸ナトリウムによる希釈操作が必要かどうか調べるために、鶏肉からのサルモネラの検出操作を行い、1%コール酸ナトリウム希釈の有無による免疫測定の反応性の変化を調べた。すなわち、各選択増菌培養液をそのまま、あるいは1%コール酸ナトリウムで10倍希釈し、沸騰水中で10分間加熱処理を行った後、ルシフェールサルモネラによる免疫測定を実施した。免疫測定の手順はキットの取扱説明書に従った。簡潔に示すと、抗体固相化マイクロウェルプレートにビオチン標識抗体40  $\mu$ Lとサンプル100  $\mu$ Lを添加し、室温で1時間反応させた。ウェルを洗浄後、ストレプトアビジンとビオチン化ルシフェラーゼの複合体を100  $\mu$ L添加し、室温で15分間反応させた。洗浄後、各ウェルを分離して専用小試験管に挿入し、ルシフェラーゼの基質液を100  $\mu$ L添加後、ただちにルミノメーター「ルミテスター-C-100(キッコーマン(株)製)にて発光量を測定した。サンプルの発光量が、陰性対照(培地のみ)の発光量より200 RLU(相対発光量)高い場合をサルモネラ陽性と判定した。ルシフェールサルモネラにおいては2種の選択培地(取扱説明書上はMKTTとMSRV)の少なくとも一方で、陽性反応が得られた場合に、その検体をサルモネラ陽性と判定する。一方、市販の鶏肉60検体から従来の培養法とルシフェールサルモネラによりサルモネラの検出を行い、結果を比較した。鶏肉25gを挽肉はそのまま、その他の肉は調理用ハサミで細かく切ってストマッカーバッグに入れて、EEMを225 mL添加してストマッカーで2分間ホモジナイズした。36°Cで21~23時間静置して前増菌培養を行った。前増菌液を、10 mLのHTTに0.5 mL、10 mLのRVSに0.1 mLそれぞれ添加し、42°Cで21~23時間静置して選択増菌培養を行った。従来の培養法においては、2種の選択増菌培地からそれぞれ Xylose lysine tergitol 4 agar (XLT4)と Brilliant green sulfa agar (BGS)に画線し、42°Cで48時間培養した。それぞれの分離寒天培地からサルモネラと疑われるコロニーを3コロニーずつ釣菌し、Triple sugar iron agar (TSI)、Lysine indole motility medium (LIM)、ONPGディスク、0群血清による確認試験を実施した。また、非典型的な反応を示したコロニーについては、さらにIDテストEB-20(日水製薬(株)製)による生化学試験も行って確認した。ルシフェールサルモネラに供するサンプル調製は、HTTおよびRVS選択増菌液各0.1 mLをそれぞれ0.9 mLの0.1%コール酸ナトリウムと混合し、沸騰水中で10分間加熱処理を行った。キットを用いた免疫測定の手順は、キットの取扱説明書に従った。

- (4) 抗体の特異性分析とイムノクロマト法によるサルモネラ簡易迅速検出法の検討：サルモネラ菌体に対する抗血清の抗体力価を、サルモネラ菌体を用いた凝集反応により凝集力価として測定した。すなわち、抗血清原液を0.1%Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>含有PBSで2倍に希釈したものを、PBSにて4段階連続希釈(8倍希釈~8192倍希釈)し、各希釈抗血清6  $\mu$ Lと一晚培養したサルモネラ生菌PBS浮遊液(約10<sup>9</sup>個/mL)2  $\mu$ Lをガラス板上にて混和し、肉眼的に観察される凝集像を判定した。加えて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(SDS-PAGE法)およびウエスタンブロッティング法(WB法)によりサルモネラに対する特異性を分析した。すなわち、サルモネラ菌を物理的に菌体と鞭毛とに分離し、それぞれを抗原としてSDS-PAGE法を実施した。泳動終了後、トランスファー装置によりSDS-PAGE法で分画された抗原をメンブレンに転写した。転写メンブレンと被検抗血清を用いて、酵素免疫反応により被検抗血清と反応した分画バンドを染色した。サルモネラ簡易迅速検出系の検討は、特別な装置・器具を必要とせず、誰でもいつでもどこでも簡単に測定が出来るイムノクロマト法を検討した。イムノクロマト法用の試薬として抗体固定ラテックスと抗体塗布メンブレンの2種類を調製し、サルモネラ菌体浮遊液を検体として測定系の検討を実施した。抗体固定ラテックスは0.05Mリン酸緩衝液(pH7.4)中でサルモネラ抗血清をProtein Aにより精製して得た抗体とラテックスを攪拌混合することにより抗体をラテックス表面上に固定した後、BSAを含むPBSでブロックを行ない、つづいて洗浄により過剰な抗体を除去し、1%BSA含

有 0.05Mリン酸緩衝液に再懸濁し抗体固定ラテックス懸濁液とした。他方、抗体塗布メンブレンはメンブレン上に直線状に抗サルモネラ精製抗体を塗布し乾燥した後、1%BSA含有0.05Mリン酸緩衝液中でブロッキングを行なった。これを乾燥した後、抗体塗布メンブレンとしてサルモネラ菌の検出に用いた。イムノクロマト法によるサルモネラ菌検出試験では検体40 $\mu$ Lと抗体固定ラテックス懸濁液10 $\mu$ Lを混合し、15分後に出現してくる青色バンドの有無で判定を行なった。

- (5) カンピロバクターに対する抗体の作成と病原因子の検討：食中毒患者の糞便および汚染食品から分離された病原性のカンピロバクターを抗原にしてウサギやマウスに免疫して抗体を作成した。とくに、菌の増殖方法、ホルマリン固定や低温殺菌法、菌の増殖期間、遊走性に着目した選択および酸素ストレスをかけた菌体を調製するなど、菌体の培養方法や処理方法を検討し免疫を行った。抗血清を用いた細胞への接着・侵入阻止試験により、病巣より分離された病原性の菌株に共通して発現する病原因子を検討した。
- (6) 食中毒患者の臨床材料における食中毒原因菌および病原因子の免疫学的検出：サルモネラその他の細菌による敗血症発症時および緩解期におけるサルモネラの病原性関連因子SEp22の血中濃度、これらに対する抗体力価を新しく開発された方法により測定し、測定法の信頼性を確認するとともに敗血症の迅速診断法を確立する目的で、臨床的な検討方法の準備を行った。すなわち、例えば、サルモネラの敗血症発症時には血中では病原性関連因子SEp22が陽性となり緩解期にはSEp22に対する抗体が陽性となることが考えられる。そこで、敗血症患者血液より培養により菌株を得るとともに、発症時および発症後約1ヶ月経過後（緩解期）の血清中SEp22の濃度、抗体力価を新しく開発したSandwich ELISA法による方法により測定を試みることにした。尚、本研究に用いられる細菌、血清等の材料は香川医科大学倫理委員会の規定に従って患者の同意の下に集められた。
- (7) 細菌を自然環境中から検出する手法の検討：様々な性質を有する微生物が生息する自然環境において、それらの微生物の動態を把握することは技術的な制約のためブラックボックスとして扱われることが多かった。しかし、すべての生物が持っているリボゾームのRNAの情報(rDNA)を利用することにより、そこに生息する微生物の種類やそれらのポピュレーションの変動についての考察が可能となった。本研究では、一般に難分解性といわれ自然環境において検出される頻度が比較的低いことが予想されるチオシアネート分解細菌を選び、チオシアネート分解酵素に関わるタンパク質およびその遺伝子をターゲットとして、湖水からの検出ならびにこれに関わる細菌の同定を試みた。さらにその結果を従来の16S rDNAに基づく方法を用いて検証を行なった。まず、神奈川県津久井郡にある相模湖表層水を採取し、研究試料とした。湖水にチオシアネート酸カリウムを5mM添加し、30 $^{\circ}$ C、暗所で培養したところ、培養開始後約40時間でチオシアネートは消失し、この系には分解微生物が生息することが確認された。この集積培養系をLS5とした。LS5はTC5 medium (0.5 g of  $K_2HPO_4$ , 0.05 g of  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.01 g of  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ , 0.01 g of  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 1.0 g of  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.1 g of  $KSCN$ , and 10 ml of trace metal solution per liter, pH 7.0)を用いて継代培養を行なった。チオシアネート分解活性を有する細菌を細胞レベルで検出するために、*T. thioparus* THI115から精製されたSCNaseに対するポリクローナル抗体を用いて、蛍光抗体法による検出を行なった。細菌の蛍光抗体法による検出は、従来は細胞表層に存在する抗原物質を用いる場合がほとんどであるが、これでは細胞内に存在するタンパク質を検出するには不向きである。SCNaseは細胞質に存在する可溶性タンパク質であり、抗体を用いてこれを認識するためには外膜、細胞壁さらに細胞膜を抗体が通過した後に、抗原と反応することが必要である。このために通常の蛍光抗体法の反応を行なう前に、前処理として試料をリゾチームおよびDNaseによる処理を行なった。すなわち、試料を50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 5mM  $MgCl_2$ , lysozyme (40 $\mu$ g/ml), DNase I (1mg/ml), gelatin (10 $\mu$ g/ml)中で、37 $^{\circ}$ C、30-60分間おいた後に一次抗体と反応させた。SCNaseは $\alpha$ 、 $\beta$ 、および $\gamma$ の3種のサブユニットから構成されるが、本法には $\alpha$ および $\gamma$ に対する抗体を用いた。総細胞数は4', 6'-diamidino-2-phenylindoleによる染色後に、蛍光顕微鏡による観察を行なった。LS5の細胞を遠心分離し、saline-EDTA (pH 8.0)で洗浄後、ISOPLANT DNA抽出キット(NIPPON GENE)によりDNAを抽出した。SCNaseのサブユニットの中で保存性が高いと予想される部位を選び、PCR用のプライマーを作成した。そして、68番目バリンから194番目プロリンをコードするdegenerateプライマー、5'-GTNGCNMRNGCNTGGBTNGAYCC-3' (フォワードプライマー)、5'-GGICKIWSIGGLADIACNADRTA-3' (リバースプライマー) (B: C, G or T; D: A, G or T; K: G or T; M: A or C; N: A, C, G or T; R: A or G; S: C or G; W: A or T; Y: C or T; I: inosine)を作成し、PCR



果と一致したが、希釈しなかった場合は偽陽性1検体、偽陰性4検体であった。測定値をTable 1に示した。HTTに関しては、市販鶏肉10検体各25gをEEMで36°C、22時間前増菌を行った後、10mLのHTTに0.5mLの前増菌液を加え、42°Cで21時間選択増菌を行った。選択増菌液中のサルモネラの検出は前述と同様に行った。培養法により3検体からサルモネラが検出された。ルシフェールサルモネラによる測定では、HTT増菌液を1%コール酸ナトリウムで10倍希釈した場合には、3検体が陽性となり培養法の結果と一致したが、希釈しなかった場合は陽性1検体、偽陰性2検体であった。なお、前述のRVSにおける検討の際は、前増菌培地にBPWを使用していたため、HTTの実験と並行してEEMで前増菌を行ったRVSでも、10倍希釈処理したもので培養法と結果が一致することを確認した(data not shown)。市販鶏肉60検体からのサルモネラの検出を実施したところ、2種の選択増菌培地の少なくとも片方が陽性の場合をその検体がサルモネラ陽性と判定すると、培養法とルシフェールサルモネラにおいてともに20検体でサルモネラが検出され、100%結果が一致した。選択増菌培地別にまとめてTables 3, 4に示した。RVS培養の場合にはすべて一致していたが、HTT培養のルシフェールサルモネラの場合には、偽陰性が2検体あった。検査時間は、培養法が6日以上必要であったのに対し、ルシフェールサルモネラでは2日間の培養後、操作時間は約2時間であった。

- (4) 抗体の特異性分析とイムノクロマト法によるサルモネラ簡易迅速検出法の検討: サルモネラ菌体を用いた凝集反応により測定したサルモネラ菌体に対する抗血清の抗体力価を別紙に示した。測定した抗血清のうちRY541以外はすべて抗血清128倍希釈以上で凝集を認めた。SDS-PAGE法およびWB法による特異性分析により得られた各抗血清の染色バンドに相当する分子量を調べたところ、RY422以外のすべての被検抗血清が免疫原であるサルモネラ菌の鞭毛に対して抗体活性を有していることが判明した。サルモネラ簡易迅速検出系として今回確立したイムノクロマト法による各抗血清のサルモネラ菌検出感度検定の結果では、27種類の抗血清のうち16種類が免疫原の菌体に対して $1 \times 10^7 + W$ 以上の感度を有していた。
- (5) カンピロバクターに対する抗体の作成と病原因子の検討: カンピロバクターの菌体の増殖ステージを変え通常の培養をした菌体をウサギに免疫したところ、いずれも凝集活性の低い抗血清が得られた。抗血清の認識するタンパクの数は、限られていた。免疫に用いたそれぞれの菌体の状況を形態的に観察すると、培養の長い時間の菌体は、菌型が球菌状であったのに対し、培養の短い菌体は、スパイラル型であった。培養の長い菌体により得られた抗体を用いて、凝集法により、タイターを調べたところいずれの血清型を免疫した抗血清もその値は低かった。一方、短時間培養の菌体の免疫により得られた抗体は、凝集活性では、やや高いタイターを示した。液体培地で6日間増殖させた菌体で免疫し得られた抗血清は、いずれもwesternブロッティングで、認識するタンパクの数は少なかった。平板培地上に1日培養した菌体で免疫した抗血清は、やはり認識するタンパクは少ない。一方、平板培地上で、菌体の遊走性に着目し遊走性の強いコロニーを選んで菌体を回収し、免疫を行ったところ、凝集活性は高い値を示した。さらにwesternブロッティングにより調べたところ、多数のタンパクに認識が認められた。短時間の液体培地での培養菌のマウスへの免疫でも複数のタンパク認識が見られた。これらの抗体を用いて、カンピロバクターの細胞への接着・侵入の阻害を調べたところ、特定の抗血清と菌株の間に弱い接着・侵入の阻害が認められたが、サルモネラに認められるような強い接着阻止は認められなかった。
- (6) 食中毒患者の臨床材料における食中毒原因菌および病原因子の免疫学的検出: 本年度は、敗血症症例を蓄積しているところであり、これまで集められた血清を採取できた症例は8例である。まだ、測定法が確立していないため、測定法が完成したい、細菌の産生しているSEp22、血清中のSEp22およびその他の病原因子に対する抗体の測定を実施する。
- (7) 細菌を自然環境中から検出する手法の検討: 蛍光抗体法によるチオシアネート分解細菌の検出では、湖水の微生物群集をチオシアネートによって集積培養を施したLS5では、全細胞の内93%もの高い割合でチオシアネート分解酵素(SCNase)を有する細胞が検出されたのに対し、オリジナルの湖水ではその割合は0.02%にしか過ぎなかった。細胞質に存在するSCNaseに対する抗SCNase抗体の反応性は、細菌にリゾチーム処理を施すことにより著しく増大し、蛍光顕微鏡下での観察が容易に行なうことが出来た。また、細胞表層に存在する抗原に対する抗体を用いた場合には、細胞の周囲のみがFITC染色では黄緑色に染色されるのに対し、細胞質の抗原に作用する抗体を用いた場合は細胞全体が染色されるので、分解酵素を保有しない細胞との交差反応などを区別することが可能であった。こ

の方法により、環境試水中の特定機能を有する細菌を比較的感度良く検出することが可能であることが示された。SCNase は誘導酵素であるが、湖水には誘導物質であるチオシアネートが検出限界濃度以下にしか存在しないこと、さらにチオシアネート分解微生物の出現頻度が低かったので、チオシアネート分解細菌の検出手法の確認には集積培養系である LS5 を用いて実験を行なった。LS5 の細胞を遠心によって集めその粗抽出液を Western blotting し、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、および  $\gamma$  サブユニットに対する抗体の反応性を見たところ、*T. thioparus* THI115 の SCNase と一致するタンパク質バンドが確認され、蛍光抗体法で観察された微生物細胞には SCNase と共通の抗体反応性を持つタンパク質を含む微生物がいることが明らかとなった。*scnC* 遺伝子を用いたチオシアネート分解細菌の検出では、LS5 の微生物群集細胞から全 DNA を抽出し、そこから SCNase の *scnC* に相当する部分を PCR 反応によって増幅し、その PCR 産物をアガロースゲル電気泳動によって *T. thioparus* のものと比較した。その結果、*T. thioparus* THI115 からの増幅産物に一致する 380 b p の DNA フラグメントが確認された。ゲルからそのバンドを切り出し、シークエンスした結果、*T. thioparus* THI115 の *scnC* に塩基配列では 85%、アミノ酸配列では 96% の高い相同性を示す DNA であることが明らかとなり、目的とする遺伝情報が正しく増幅され、DNA による特定の機能遺伝子を有する細菌の検出に利用可能であることが示された。In situ PCR 法は、細胞内で PCR 反応を行なうことにより特定の遺伝子を増幅し、さらに得られた PCR 産物を標識することによって顕微鏡下で細胞を検出する方法であり、コピー数の少ない遺伝子を標的として特定の細菌を細胞レベルで特異的に検出することが可能となる。SCNase を誘導させた *T. thioparus* THI115 を用いて in situ PCR を行なった。PCR 反応を行なうためには反応に必要な酵素などが細胞内へ入りやすく、しかも PCR 産物は細胞内に留まりやすくすることが最適化にとって重要である。そこで、リゾチーム処理およびプロテナーゼ K 処理の時間を様々に変えることにより検出を試みたが、SCNase タンパク質を誘導しているにも関わらず、検出された細胞は全体の 2% にしか過ぎなかった。ここで採用した方法は、Vero 毒素をコードする遺伝子を標的として腸管出血性 *E. coli* の検出に開発されてきたものである。そこで、その条件下で SCNase 遺伝子を含むプラスミド (pSCN2) によって形質転換した *E. coli* を用いて in situ PCR を行なったところ、全細胞数を 79% が染色され、反応条件さえ最適化することが出来れば、*scnC* の情報を基に検出が可能であることが確認された。16S rDNA に基づく解析では、LS5 の微生物群集に含まれるチオシアネート分解細菌を、系統分類学の視点から情報を得るために、LS5 から抽出した DNA について真正細菌用の 16S rDNA プライマーを用いて、チオシアネート分解細菌の系統解析を試みた。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にかけたところ、620 b p 付近に目的のサイズの DNA が確認された。この DNA を塩基配列の違いにより分離するために DGGE にかけたところ、複数の DNA バンドが確認され、この内最も蛍光強度の高いバンド B は優先種由来のフラグメントであることが予想された。この DNA は *T. thioparus* THI 115 からの DNA フラグメントに移動度が一致し、集積培養のための基質としたチオシアネートの代わりに有機物を用いて培養を経た LS5 では消失していることから、独立栄養性チオシアネート分解細菌に由来するものであることが示唆された。バンド B をゲルから切り出し、塩基配列を決定後、系統解析を行なった。その結果は *Proteobacteria* : subdivision に含まれ、*T. thioparus* に系統的に最も近縁であった (similarity index: 0.984)。これ以外の DNA バンド、A、C、及び D は、それぞれ *Cytophaga johnsonae*, *Aquaspirillum delicatum*, 及び *Rhodanobacter lindaniclasticus* に系統的に近縁であったが、チオシアネート分解についての報告はこれまでなされていない。

#### 4. 考察

- (1) サルモネラ検出用抗体の検討: SE の検出用の抗体としては、一般に全菌体に対する免疫抗血清や鞭毛に対する抗体が用いられてきた。本年度は、矢内原研究所と共同で、増殖ステージや菌の不活化方法を変えたいくつかの菌の調整物を作成し、ウサギに免疫を行った。得られた抗血清について、菌に対する凝集価、プロトタイプの簡易検出システムでの検出感度を指標にそれぞれの抗血清について高感度検出法に適する抗体の検討を加えた。代表的な抗原認識のパターンは、別紙 Fig. 1 に示すように、免疫する菌の増殖ステージの違いにより、得られた免疫抗血清の western プロットでの認識が全く異なるという結果が得られた。SE の対数増殖期菌体を免疫して得られた抗血清 (RY542) と、静止期菌体の免疫により得られた抗血清 (RY422) は、それぞれ、3種と5種のタンパクに強い認識を示した。興味深いのは、免疫に用いた対数期と静止期それぞれの菌の抽出物中には、抗原としてほぼ同様な種類のタ

ンパクが存在するにも関わらず、結果として得られた抗血清の認識が全く異なるのは、興味深く思われた。今回の研究により、菌体に対する抗血清は、免疫する菌体の増殖ステージを変えることにより、全く異なる抗原を認識する抗血清が得られることが示された。従って、菌の状態をいろいろ変化させて免疫し、それぞれの抗血清の特性を詳しく調べることにより、こちらの意図する抗体を選ぶことが重要であると思われる。高感度検出用抗体の調整には、免疫に用いる菌の増殖ステージをコントロールすることが不可欠であり、これにより特性の異なる抗体を作出し、その中から最も適する抗体を選択して行くことが必要であると思われる。静止期菌体の免疫で得られた鞭毛抗原をほとんど認識しない抗血清(RY422)と対数増殖期菌体を免疫して得られた抗血清(RY542)を用いたSEの腸管細胞への接着・侵入阻止試験の結果から、以下の4つが考えられた。1. 抗原性の最も高いと考えられている鞭毛抗原が免疫系に認識されにくい場合がある。2. SEの腸管細胞への接着侵入に鞭毛抗原が関わっている。3. SEの腸管細胞への接着・侵入には、鞭毛抗原に加え、RY422の認識するその他のタンパクが関わっている。4. 鞭毛抗原が含まれない抗血清でも高感度にSEを検出できる。鞭毛抗原を認識するRY542がSEの腸管細胞への接着・侵入を阻害し、SEの感染に鞭毛が関与することが確認された。さらに、静止期菌体の免疫により得られた、鞭毛の認識の弱い抗血清(RY422)が、同様な試験で、強く接着・侵入を阻害したことから、RY422の認識するタンパクに、鞭毛以外のSEの腸管細胞への接着侵入に関わるタンパクが含まれていると推定され、今後、これを特定することにより、SEの病原因子を明らかにすると共に、この病原因子に対する抗体は、SEの検出に重要であると思われた。

- (2) サルモネラ新規病原因子SEp22の精製法の改良、および抗体の作成：本年度の研究の結果、SEp22の大量精製法が確立した。この結果のもたらす意義は非常に大きい。すなわち、分担研究課題のみでなく、本研究班全体にとって大きな成果である。さらに、ウサギを使ったポリクローン抗体の作成に成功し、力価の高い抗血清をまとめて大量に得ることができた。現在、CAFラボラトリーズがこれらの抗血清とSEp22を用いたELISAの測定系を作成している。次に、この抗体を自由に使用出来るようになったため、Westernによる菌体抽出物のSEp22の変化を特異的かつ鋭敏に捉えることができるようになった。今後、この抗体およびSEp22の遺伝子情報をもとに解析を進め、感染症の成立と細菌の病原性の発現におけるSEp22の役割を追求していくことが可能になった。また、サルモネラの増殖によって制御を受けるSEp22が、どのような機構でサルモネラのマウスに対する病原性の発現に関与するのか、また環境中でのこの遺伝子およびタンパク質の発現がいかなる変化をするのか、等について、次年度以降、さらに研究を進展させたい。
- (3) ルシフェールサルモネラを用いた食肉からのサルモネラの高感度迅速検出法：サルモネラ検出法の開発にあたり、今年度は生物発光酵素免疫測定キット「ルシフェールサルモネラ(以下、本免疫測定法と略す)」を用いた鶏肉中のサルモネラの迅速検出を検討した。上記キットは、選択増菌培地として日本では常用されていないMKTTとMSRVの使用を指示しているため、日本で汎用されているHTTとRVSが使用可能か検討した。免疫測定の前処理において1%コール酸ナトリウムで10倍希釈することにより、反応阻害の影響を緩和し、培養法と一致する正常なレスポンスが得られたものと考えられた。選択増菌培地にHTTとRVSを使用し、日本においてはBPWより使用例が多いと考えられるEEMを前増菌培地に用いて、市販鶏肉60検体より培養法と本免疫測定法によるサルモネラ検出を行い比較したところ、2種を選択増菌培地による結果を合わせると、培養法と本免疫測定法ともにサルモネラが20検体から検出され、かつ両方で100%一致していた。選択増菌培地別に見た場合、HTTにおいては本免疫測定法で偽陰性が2検体あったが、混在するサルモネラ以外の菌の影響等によりサルモネラの増殖が十分でなく、本免疫測定法の感度では検出できなかったものと考えられる。今後、さらに培養条件や前処理条件を検討することにより、感度の向上が可能と考えられる。検出に要する時間は、従来の培養法では6日以上必要であるのに対し、本免疫測定法では2日間の培養と2時間の測定操作で、従来の培養法と同等の精度で検出を行うことが出来た。サルモネラの検査は多段階の培養が必要なため非常に時間と労力を要するが、本免疫測定法では培養操作は2段階のみで、それ以降の培地の準備、培養操作が不要なため、大幅な時間短縮と省力化が可能であると考えられた。今後さらに、培養条件、前処理条件を検討することにより、本課題の目標である8時間以内の検査を目指す。
- (4) 抗体の特異性分析とイムノクロマト法によるサルモネラ簡易迅速検出法の検討：免疫原を3つのグループ、すなわち、対数増殖期(Logと略)グループと定常期(Statと略)－Formalinグループ及びStat－Heatedグループに分けて、サルモネラ菌体もちいた凝集反応の結果と合わせて考察すると、Stat－Formalinグループでは4種の抗血清すべ



てで8192倍以上の高い凝集力価を示した。Stat-Heated グループでは4種類中3種類が128から512のやや低めの凝集力価を示し、残りの1種RY542は2048倍と中程度の凝集力価を示した。これらに対して、Log グループでは4種類のうち凝集価が8192倍以上の高いものは2種類の抗血清で、RY543は2048倍の中程度の凝集力価を示し、RY541では8以下とほとんど凝集力価は示さなかった。この結果から、高い抗体力価を得るためには菌体を Stat の状態で採取した後、Formalin 処理したものを免疫に用いることが好ましいと考えられた。SDS-PAGE 法および WB 法による抗体の特異性分析では、この特異性分析を実施した16種類の抗血清中にはサルモネラに特異的な鞭毛に対する抗体がRY422を除き、すべての抗血清中に含まれていた。S. enteritidis では分子量38~40 kDの成分が鞭毛主成分バンドとして染色された。S. typhimurium では分子量33~37 kDの成分が鞭毛主成分バンドとして認められた。ほとんどのケースで鞭毛部分が認識されたことから、鞭毛部の抗原性は高いものと考えられる。各抗血清の染色バンド像については個々まちまちであり、今回の分析ではグループごとの特有なパターンは見出せなかった。サルモネラ簡易迅速検出系の検討では、今回検討したイムノクロマト法による各抗血清の検出感度検定の結果は凝集反応での結果と相関するところがあった。Stat-Formalin グループでは10種類のうち、5種類が $1 \times 10^6$ /ml/+w以上の感度を有し、残りの5種類も $1 \times 10^7$ /mlから $1 \times 10^7$ /ml/+Wの高めの感度であった。Stat-Heated グループでは7種類中1種類のみが $1 \times 10^6$ /mlと高感度を示し、6種類についてはStat-Formalin グループに比較してやや低めの感度であった。これらに対して、Log グループのものでは10種類のうち3種類が $1 \times 10^7$ /mlと高めの感度を示したが、3種類が $1 \times 10^8$ /mlから $1 \times 10^8$ /ml/+Wであり、残りのRY541、RY908、RY909およびRY912の4種類については $1 \times 10^{10}$ /mlの菌体とも反応を呈さない低い感度の結果であった。従って、Logの状態の菌体で免疫をする場合、感度面から、この点を考慮した免疫方法を検討する必要性が示唆された。今回の結果から、イムノクロマト法は研究目的に記載した簡便性、迅速性の両面で極めて合目的な方法であることが明らかになったが、感度の面で更なる検討が必要と考えられる。前培養を実施し、増菌すればそれほど高感度は求めなくてもよいが、その場合も出来るだけ短時間の培養が望まれる。

- (5) カンピロバクターに対する抗体の作成と病原因子の検討：カンピロバクターは、微好気性の菌で、酸素ストレスに弱く、増殖が長くなると菌体に変化して球状になるが、この時その抗原性もスパイラル型の菌型とは異なるようである。従って、高感度検出用の抗体を得るためには、どちらの菌を目的に検出するかにより、菌の増殖のステージを厳密にコントロールし、免疫をする必要がある。長期間の液体培養により得られた菌体を用いて免疫した抗血清では、western blottingで認識される抗原は、あまり多くない。恐らく、カンピロバクターの球状菌体の抗原性は低く、得られる抗血清の認識する抗原に限られるためと思われる。一方、短時間の培養による菌体の免疫でも、やはり認識する抗原の種類は少ない。これは、サルモネラの免疫で得られた劇的な認識の違いとは対照的である。一方、菌の遊走性に着目して、平板培地で増殖させた菌体を免疫して得られた抗血清では、その認識するタンパクが劇的に変わる。認識するタンパクの種類が増加すると共に、それぞれの抗原の認識もはっきりとしており、凝集抗体価も高い値を示した。このようにして得られた抗血清により、菌に特異的なあるいはグループに共通な抗原を選ぶなどと言った手法で、目的とする菌株や菌群の検出に有効な抗体が得られると期待される。しかし、カンピロバクターの免疫により得られる抗血清は、その認識するタンパクの種類が多く、サルモネラの鞭毛のように非常に高い抗原性を持つ抗原が無いため、抗体価のタイターを高く取ることは難しい。従って、高感度の検出に有効な抗体を得るためにはさらなる工夫が必要と考えられた。抗体を用いたカンピロバクターの細胞への接着阻止は弱いながらも認められ、その抗体の認識するタンパクが細胞への接着に関わる因子である可能性が示された。
- (6) 食中毒患者の臨床材料における食中毒原因菌および病原因子の免疫学的検出：これまでに8例の症例の培養細菌とペアー血清を集め、更に症例収集を継続中である。新規病原関連因子であるサルモネラのSEp22は大腸菌のDpsと高いhomologyを持つことが明らかとなっている。また、DpsのhomologyはMRSAや他のstaphylococcusを含む様々な病原性細菌にも存在することが分かっている。そこで本研究においてsalmonella以外の細菌を含む敗血症症例の検討を行うことは、広範な敗血症の診断法を確立できる可能性があり、意義があると考えられる。
- (7) 複数の微生物種から構成される環境中の試料より、特定の機能を有する細菌を高感度に検出するために、ScNaseタンパク質ならびにその遺伝子であるscnCをターゲットとして、解析を行なった。細胞内に存在するタンパク質の検出のためには、従来の蛍光抗体法にさらに前処理を加えることが必要であったが、添加する酵素等の濃度やそ

これらの処理時間は、対象となる細菌の種類やその特性に応じて条件検討を行なうことが必要である。In situ PCR は手法としては個々の細胞を顕微鏡下で識別することが可能であり、有効な手段といえるが、この場合も上記と同様に条件検討、さらに検出感度を上げるための蛍光色素などの選択、少ないコピー数の遺伝子を効率良く増幅するためのPCR 条件など、さらに検討を加えることが必要であると考えられた。

本年度の研究の結果、五十君、矢内原、春日らにより、サルモネラやカンピロバクターの菌体に対する高感度検出用の抗体作成が試みられ、特にサルモネラでは良好な抗体を得ることが出来、カンピロバクターに対する抗体の検討も続いている。大阪薬科大学の天野らがサルモネラの病原性関連因子、SEp22 の大量精製法を確立し、さらにウサギの抗SEp22 抗体を作成して SDS-PAGE/Western によるサルモネラ菌体抽出物からの SEp22 の高感度な検出法を確立した。これによって SEp22 が病原性のサルモネラ菌株に強く発現されていることを確認することができたが、これによって本研究の目的とする免疫学的な高感度迅速測定法への応用のみでなく、SEp22 の分子的な性状の解析が可能になった。現在、CAF ラボラトリーの大田がELISA の測定系の確立に向けて種々の検討を行っているが、その完成を待って、香川医科大学の阪本が集めた敗血症患者血清中のSEp22 および抗SEp22 抗体の検出を行うことが可能になる。さらに、東京農工大学の片山が本年度 *Thiobacillus* を対象にして行った自然環境中における細菌抗原の安定性ならびにその発現調節機構の研究を、次年度以降は、河川水に存在することが確認されている病原性のサルモネラのSEp22 を指標にして検討することが可能になった。また、キッコーマンの辰巳が本年度の研究で改良した高感度迅速検出法によって食品中のサルモネラが検出された場合に、これをSEp22 などの病原因子の検出系と併行して使用し、病原性のサルモネラの診断に応用することも可能である。

## 5. まとめ

- (1) サルモネラの菌の増殖時間をコントロールし免疫を行うことにより、迅速診断に適すると思われる検出用抗体を得ることができた。
- (2) サルモネラ新規病原因子 SEp22 の精製法改良により、大量精製が可能となり、その性質の検討および特異的抗体の作成を行うことができた。
- (3) 生物発光酵素免疫測定法を応用し、従来の培養法では6日以上必要とした検出法を、2日間の培養と2時間の測定操作で、従来の培養法と同等の精度で検出を行うことを可能とした。
- (4) サルモネラ簡易、迅速かつ高感度の検出系としてイムノクロマト法をモデルケースとして検討を進め、サルモネラを簡易迅速に検出することが出来た。
- (5) 遊走性を指標にクローン化することにより、カンピロバクターの多くの抗原に反応する抗体を作成し、この菌が病原性を示すようならせん状の増殖期に選択的に反応する抗原を検出した。
- (6) 敗血症患者の発症期および緩解期のペアー血清、ならびに原因菌を収集した。
- (7) 特定の酵素タンパク質ならびにその遺伝子に注目して、環境試水からの特定細菌の検出を試み、目的の細菌をきわめて精度良く検出する手法を開発した。

## 6. 研究発表

1. Igimi S. Development of the recombinant vaccines with Lactic Acid Bacteria as antigens delivery vehicles for mucosal immunization. *Journal of Intestinal Microbiology*. 14, (2001) 67-73..
2. Tanaka, Y., Igimi, S., Amano, F. Inhibition of prostaglandin synthesis by nitric oxide in RAW 264.7 macrophages. *Arch. Biochem. Biophys.* 391, (2001) 207-217.
3. (Igimi S.). National Institute of Infectious Diseases and Infectious Diseases Control Division. Staphylococcus food poisoning in Japan. *Infectious Agents Surveillance Report*. 22, (2001) 185'-186' .
4. 五十君静信. 21世紀の腸内細菌学. *腸内細菌学雑誌*. (印刷中)
5. Fazil, A., Lanmerding, A. M., Kasuga, F., Ebel, E., Kelly, L., Anderson, W. and Snary, E. : Risk characterization of *Salmonella* in broilers and eggs. MRA 01/02, FAO/WHO (2001)
6. Kasuga, F. and Vose, D. :Modelling of cross-contamination of foodborne pathogen occurring in restaurants and

- home kitchens. Joint FAO/WHO workshop for Development of guidelines on exposure assessment of microbiological hazards in foods, Background documents. (2001) pp. 62 - 69.
7. Kasuga, F., Yamamoto, A., Iwahori, J., Tsutsui, T., Fujikawa, H., Yunokawa, T., Hirota, M., Kumagai, S. and Yamamoto, S.: Risk assessment of *Salmonella* Enteritidis infection associated with raw egg consumption in Japan. Proceedings for UJNR symposium, March 2002. in press.
8. 熊谷進、中村政幸、浅井鉄夫、春日文子、能田健：フィールドとベーシックリサーチの領域横断的ワークショップ①—サルモネラ症を例にして—月刊HACCP、(2001)第71号、pp. 46-48
9. Ikegami, R., Sugimoto, Y., Segi, E., Katsuyama, M., Karahashi, H., Amano, F., Maruyama, T., Yamane, H., Tsuchiya, S., Ichikawa, A. The expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and their different regulation by lipopolysaccharide in C3H/HeN peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **166**, (2001) 4689-4696.
10. Gwakisa P., Yoshihara K., Long To T., Gotoh H., Amano F., Momotani E. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. *Vet Parasitol.* **99**, (2001) 53-61.
11. Ohki, K., Amano, F., Kohashi, O. Lipopolysaccharide (LPS) and zymosan-resistant mutant isolated from a macrophage-like cell line, WEHI-3, with a defective response to LPS under serum-free conditions. *Immunol. Cell Biol.*, **79**, (2001) 462-471.
12. Ishii, Y., Amano, F. Regulation of Sula cleavage by Lon protease at the C-terminal end amino acid, histidine. *Biochem. J.* **358**, (2001) 473-480.
13. 天野富美夫、阪中専二、小西良子 鶏卵卵黄由来シアル酸含有オリゴ糖のサルモネラ感染に及ぼす影響とマクロファージ活性化作用に関する研究. 第15回BACTERIAL ADHERENCE研究会 講演録、(2001)印刷中.
14. Ueno, M., Sakamoto, H., Kanenishi, K., Onodera, M., Akiguchi, I., and Hosokawa, M. Ultrastructural and permeability features of microvessels in the hippocampus, cerebellum and pons of senescence-accelerated mice (SAM). *Neurobiology of Aging.* **22**, (2001) 469-478.
15. Kanenishi, K., Kuwabara, H., Ueno, M., Sakamoto, H., and Hata, T. Change of adrenomedullin concentrations in plasma and amniotic fluid, and human placental adrenomedullin expression with advancing gestation. *Placenta*, **22**, (2001) 244-250.
16. Ueno, M., Sakamoto, H., Kanenishi, K., Onodera, M., Akiguchi, I., and Hosokawa, M. Ultrastructural and permeability features of microvessels in the periventricular area of senescence-accelerated mice (sam). *Microsc Res Tech*, **5**, (2001) 232-238.
17. Yamauchi, A., Tomita, Y., Miwa, H., Sakamoto, H., Sugiyama, H., and Aozasa, K. Clonal evolution of gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Modern Pathology* **14**, (2001) 957-962.
18. Yamasaki, M., Matsushita, Y., Namura, M., Nyunoya, H., and Katayama, Y. Genetic and immunochemical characterization of thiocyanate-degrading bacteria in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, (2002), 942-946.
19. Saito, M., Honna, T., Kanagawa, T., and Katayama, Y. Microbial degradation of carbonyl sulfide in soils. *Microbes and Environ.* (in press).
20. 迫田章義、望月和博、安部郁夫、片山葉子、川井秀一、沢田達郎、棚田成紀、中崎清彦、中村嘉利、藤田晋輔、船岡正光、三浦正勝、吉田孝 ゼロエミッションのための未利用植物バイオマスの資源化 環境科学会誌 **14**, (2001)383-390.
21. 辰巳宏樹 ホタルルシフェラーゼによる微生物迅速判別法「最新酵素利用技術と応用展開」(相澤益男監修) シーエムシー (2001) pp. 298- 307.

#### 7. 知的所有権の取得状況

該当なし

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社