

## 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 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部  
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           | 片山葉子   |
| (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、複数の検出システムを作出した。

#### 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

サルモネラエンテリティディス(SE)の環境分離株、食品からの分離株および食中毒患者からの臨床分離株をおのおの数株ずつ選び、その中から経口感染させた BALB/c マウスに対する致死毒性の強い株を選択した。これらの全菌体、ホルマリン固定菌体、および生菌体の膜分画を調製してウサギを免疫し、抗体を作成した。また、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を免疫して抗体を作成した。免疫に用いる菌体は、菌の増殖時間を変化、遊走クローンの選択、および酸素ストレスをかけた菌体を調製するなど前処理方法を検討した。それぞれの病原性の菌株に共通して発現する病原因子を検索した。新たに得られた病原因子のアミノ酸配列から特異性の高い領域を選んでペプチドを合成し、マウスに免疫してモノクローナル抗体の作成を試みた。得られた抗体の性質を調べるため、菌との反応性を、凝集活性、Western blotting、ELISA、FACScanにより検証した。また、高感度迅速検出方法の開発のため、既存の抗体あるいは市販の抗体を用いて SE およびカンピロバクターの磁気ビーズを利用した集菌法の改良、あるいは発光を利用した高感度検出法を応用し、菌を含む検体から最終の検出まで8時間程度で完了するような方法を検討した。

### 3. 研究成果

従来、食品あるいは環境中にサルモネラが検出されたことをもって、「病原性のサルモネラの混入（存在）」の判断基準としていた。また、サルモネラの検出は、通例、培養による増菌の過程をへてその後血清型診断、あるいはファージ型別診断をおこなってきたため、診断前に最低3日間あるいはそれ以上の操作を要した。迅速診断ではPCR法による検出があるが、これらは生菌/死菌の別なく遺伝子(DNA)による検出であるので、高感度な検出法ではあるが実際の検体中に存在する生菌数を反映していない。そこで、従来法を改善し、約8時間以内に病原性SEを検出/同定する方法を開発する必要があった。そのために、新たに抗SE抗体を作成し、短時間の前培養の後、固相化ビーズに結合させた抗体でSEを捕集/濃縮し、さらに化学発光法やELISA法を用いて検出を試みた。また新たな病原因子の同定/精製を行い、それに対する抗SE病原因子抗体を作成することにより、従来報告されてきたサルモネラの病原因子の遺伝子(*invA*, *SipB*など)の検出に加え、実際に発現しているタンパク質等の検出によって増殖可能な病原性サルモネラの検出を行うことができるものと期待される。この方法は従来法との組み合わせも可能であり、血清型およびファージ型診断やパルスフィールド電気泳動およびPCRによるDNA診断のための検体を、前培養/濃縮の後に供給することができる。病原細菌の選択と抗体の作成に関して、五十君、春日、矢内原と天野がSEの抗体を数種類作成し、SEの菌株の間で強さが異なる病原性、ならびに菌の増殖状態によって変動する病原性とこれらの抗体が認識する抗原エпитープの関係について解析を行った。その結果、菌体表面のFliCタンパク質の発現が病原性に連動して変化することが示唆された。この他、19、32、39kDaのタンパク質について発現の解析を進めている。また、カンピロバクターの菌体に対する抗体の作成を五十君、天野および矢内原が行い、微好気条件下で培養した菌を前処理して不活化して免疫した結果、Western blottingで使用可能な抗血清を得ることができた。その抗原エпитープと菌の増殖状態や感染性の変化の関連を研究した。

大田は鶏卵および養鶏場の周辺環境(土壌あるいは塵埃等)から多数のSEを分離し、天野、五十君と共同で病原性を検討した。さらに、SEが自然感染したニワトリとサルモネラワクチンを接種したニワトリの血清を解析し、後者で有意に高い認識をする68kDaのタンパク質を同定した。また、天野が新たに発見したSEの病原性関連因子SEp22の病原性の検討を行った。SEp22-KO株を用いたサルモネラの病原性試験では、養鶏場の環境から分離されたサルモネラSEの病原性株、SECI15-1を親株にしてそのSEp22遺伝子を欠損させたサルモネラの変異株を数株、分離し、これらにSEp22タンパク質およびmRNAが発現しないことを確認した。さらに、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)に対する抵抗性が欠損していることを確認し、変異株から独立に4株を選んで、BALB/cマウスに経口感染させた。その結果、用いた変異株の全てが、親株に比べ、マウスに対する致死毒性が著しく低下していた。特に、SECI15-KO5株は、全く致死毒性を示さなかった。以上の結果は、SEp22がマウスに対する病原性に関連した遺伝子産物であることを強く示唆する結果である。これは、本研究の当初の目的の一つである、「食中毒原因菌の病原因子の同定と検出」についての重要な成果であると考えられる。そこで、SEp22のELISAによる検出系を作成する試みを開始した。天野が作成したウサギの抗SEp22ポリクローナル抗体のほか、モノクローナル抗体の作成に着手した。本研究により見いだされたSE由来の新規病原性関連因子SEp22に対する抗体は、食品および環境中における病原性SEの検出とマウスやヒトへの感染機序の解明に有効である。

一方、辰巳はリンフェラーゼを主とする生物発光検出系を用いて、食品に混入したSEを増菌過程を入れて約32時間以内にcfu=10/25mL以上で検出する方法を開発することができ、従来法を約1日短縮した。これをさらに迅速化するための検討を行った。片山と天野、五十君は河川水からの病原性のSEを迅速に検出する方法を開発するため、多摩川の河川水からのSEの分離を短時間でを行う方法を研究し、採取の場所と条件、ならびに分離されたSEの血清型診断および病原性の評価を行った。さらに片山はフィルターに集菌した細菌の細胞内抗原の検出条件を検討した。多種の微生物が混在する環境中の試料から特定の機能のみを有する細菌を高感度に検出する技術を確認するため、自然環境での検出頻度が比較的低いチオシアネート分解細菌を選んで解析を行なった。本菌で発現されるチオシアネート分解酵素(thiocyanate hydrolase: SCNase)は、・(19 kDa)、・(23 kDa)、および・(32 kDa)の3種のサブユニットから構成され、それぞれをコードする遺伝子、*scnA*, *scnB* および *scnC* がクローニングされている。湖水の微生物群集からチオシアネート分解活性を有する細菌を免疫化学的方法によって検出することに成功した。また、SCNaseの活性中心を含むと予想されるサブユニットタンパクをコードする*scnC*に対して、PCR-変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)、in situ

PCR法を使った解析を行い、その遺伝情報を保有する細菌を検出することができた。さらに、細菌の16S rDNAの系統解析によって、その結果の確認を行なった。阪本は敗血症を起こした食中毒患者の血清ならびに原因となった菌株の収集を行い、少数例ではあるが、それぞれの患者の症状と経過についての調査を行った。検体および症例の解析を本研究班の班員と共同で進めている。春日はSEによる食中毒の原因となった食品や食材についての解析を行い、リスクマネジメントと共に、食品からの病原性SEの迅速検出に必要な過程の検討を行った。以上の研究に加えて、基礎研究として、SEp22の発現の変化に関する研究、ならびにカンピロバクターのストレス応答タンパク質の同定に関する研究を行った。

以上の結果については、考察・まとめに明記した。

#### 4. 考察・まとめ

2年間の研究の結果、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ラボラトリーズの大田が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。以上まとめると、

- (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感度で検出を行うことを可能とした。
- (4) サルモネラの簡易、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。

#### 5. 研究発表

1. Sugita-Knishi, Y., Sakanaka, S., Sasaki, K., Raj Juneja, Lekh, Noda, T., and Amano, F. Inhibition of bacterial adhesion and Salmonella infection in BALB/c mice by sialyloligosaccharides and their derivatives from chicken egg yolk. J. Agricul. Food Chem. 50, (2002) 3607-3613.

2. Shinobu, N., Iwamura, T., Yoneyama, M., Yamaguchi, K., Suhara, W., Fukuhara, Y., Amano, F., and Fujita, T. Involvement of TIRAP/MAL in signaling for the activation of interferon regulatory factor 3 by lipopolysaccharide. *FEBS Lett.* 517, (2002) 251-256.
3. Yamasaki, M., Igimi, S., Katayama, Y., Yamamoto, S. and Amano, F. Effects of anaerobic preculture on aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni*. *Biosci. Microflora* 22, (2003) 21-25.
4. Yamasaki, M., Y. Matsushita, M. Namura, H. Nyunoya, and Y. Katayama. Genetic and immunochemical characterization of thiocyanate-degrading bacteria in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, (2002) 942-946.
5. Saito, M., T Honna, T. Kanagawa, and Y. Katayama. Microbial degradation of carbonyl sulfide in soils. *Microbes and Environ.* 17, (2002) 32-38.
6. Katayama, Y., T. Oura, M. Iizuka, I. Orita, K.J. Cho, I. Y. Chung, and M. Okada. Effects of spilled oil on microbial communities in tidal flat. *Marine Pollution Bulletin.* (2003, In press)
7. Ueno, M., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Wakita, H. and Sakamoto, H. Blood-brain barrier disruption in white matter lesions in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion. *J. Cerebr. Blood F Met* 22, (2002) 97-104.
8. Yamauchi, A., Tomita, Y., Takakuwa, T., Hoshida, Y., Nakatsuka, S., Sakamoto, H. and Aozasa, K. Polymerase chain reaction-based clonality analysis in thyroid lymphoma. *Int. J. Mol. Med.* 10 (2002) 113-117.
9. Ueno, M., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Wakita, H., and Sakamoto, H. Blood-brain barrier damage in experimental animal models of cerebral ischemia. *Neuropathology* 22(Suppl.) (2002) A30, 2002.
10. Yamauchi, A., Nakatsuka, S., Miyanaga, I., Hoshida, Y., Sakamoto, H., Aozasa, K., Osaka lymphoma study group: Clonality analysis of follicular lymphoma using laser capture microdissection method *Int J Mol Med* 10 (2002) 649-653.
11. Obana, S., Uda, H., Kuwabara, H. and Sakamoto, H. Two types of lymphatic invasion in lymph node metastasis with special references to the morphology of gastric carcinomas and immunohistology of E-cadherin and b-Catenin. *Kobe J. Med. Sci.* 48 (2002) 43-54.
12. Takahashi T, Yoshida Y, Hatano S, Sugita-Konishi Y, Igimi S, Yajima M, Kojima T, Kanno T, Yonekubo A, Yajima T, and Kuwata T. Reactivity of secretory IgA antibodies in breast milk from 107 Japanese mothers to 20 environmental antigens. *Biology of the Neonate.* 82 (2002)238-242.
13. Ojima M, Toshima Y, Koya E, Ara K, Tokuda H, Kawai S, Kasuga F, Ueda N. Hygiene measures considering actual distributions of microorganisms in Japanese households. *J. Appl. Microbiol.* 93 (2002)800-9
13. 五十君静信. 食品由来耐性菌の問題. *獣医公衆衛生研究* 5 (2002)10-11.
14. 五十君静信. 細菌を抗原運搬体とする経口ワクチンによる腸管感染症の予防. *総合臨床.* 51 (2002)2944-2949.
15. 春日文子. 微生物学的リスクアセスメント - その現状とマネージメントにおける役割. *獣医公衆衛生研究* 5 (2002)4-7.
16. 山本茂貴, 春日文子, 豊福肇. 食品の微生物学的リスクアセスメント. *フードケミカル.* 15 (2002) 34-36.
17. 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.
18. (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' .
19. Fazil, A., Lammerding, 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)

20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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, 71 (2001) 46-48
31. 五十君静信. 組換え乳酸菌を用いた粘膜ワクチンの開発. *腸内細菌学雑誌* 14, (2001) 67-73.
32. 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.
33. 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.

## 6. 知的所有権の取得状況

該当なし