

食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発と リスクマネジメントへの応用

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 食品衛生管理部
研究者 山 本 茂 貴

研究要旨 食中毒起因菌について、その病原因子を検討するとともに、その病原因子等をマーカーとし、食品中における当該細菌の存在を特異性高く、高感度かつ迅速に検出する手法の開発に関する研究を行い、その手法を用い、食品におけるリスクマネジメントを検討する。

分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部 五十君静信
- (2) 大阪薬科大学薬学部 天野富美夫
- (3) 東京農工大学農学部 池袋一典
- (4) (株)シーエーエフラボラトリーズ・研究所 大田博昭
- (5) (株)矢内原研究所 矢内原千鶴子

A. 研究目的

食中毒起因菌のサルモネラ、カンピロバクター等の病原因子を検討するとともに、その病原因子等を対象とする高感度迅速に検出する検査法を開発する。食品、環境中あるいは臨床材料から簡便、迅速かつ高感度に菌を検出するとともに、これらの検査法が食品のリスクマネジメントに応用した場合の妥当性を評価することを目的とする。これらの高感度迅速検出法を提供することにより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菌の汚染の拡大防止を図る。

B. 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。SEp22 に対する家兎抗血清を用いてヒトおよび SE 感染鶏組織における SEp22 抗原陽性の

細菌あるいは組織内陽性反応の分布について検討を加えた。SE の新規病原因子 SEp22 を用いた ELISA 測定系の検討は精製した SEp22 とウサギの抗 SEp22 抗体を用いて、ELISA の測定系の作成を試みた。SEp22 の病原性については、KO 株を作成し検討を行った。

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。

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、あるいはクロマト法を応用した簡易検出法を検討した。新規の DNA 標識法として、1 本鎖 DNA 結合タンパク質(SSDBP)と耐熱性グルコース脱水素酵素(SM4GDH)とを架橋させた複合体を調整し、これを用いてプローブ DNA を標識し、電気化学的にハイブリダイゼーションを検出する DNA センサーを構築した。

養鶏場より分離したサルモネラ菌株について、研究班で検討した病原因子の保持状況を

PCR 法にて調べるとともに、それぞれの病原因子の発現状況を RT-PCR 法で mRNA の発現レベルにより調べた。作成した抗体を用いて、タンパクとしての発現をモニターした。

C. 研究成果

病原細菌の選択と抗体の作成に関して、五十君、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ピト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。ヒト腸管由来継代細胞 Caco-2 細胞を用いて、SE の感染に FliC がどの程度かかわるか FliC 特異的抗体を用いて調べた。この抗体は濃度依存的に SE の Caco-2 への侵入をブロックし、細胞への侵入にこの抗原がかかわっていることを示した。

カンピロバクターの菌体に対するモノクローナル抗体の作成を矢内原が行い、鞭毛抗原およびその他の環境抵抗因子と思われるタンパクを認識するモノクローナル抗体を得ることができた。その抗原エピト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、その株が発現している病原関連因子につき検討した。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た。天野は新たに発見した SE の病原性関連因子 SEp22 の病原性の検討、その発現調節機構につき検討を行った。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、SEC115-1 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作出し、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(H₂O₂)に対する抵抗性が欠損していることを確認した。SEp22 の発現していない変異株の全てが、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。SEp22 の発現調節は、培養中の栄養因子によって転写レベルで発現が調節されるだけでなく、菌の増殖に伴って急速に分解されることが示され、菌の生理的な条件が病原性の発現にかかわっていることが示された。

DNA センサーの特性の検討では、SM4GDH の活性に対し、SM4GDH/SSDBP/ssDNA 複合体では、約 3.5 分の 1 に低下した。構築した複合体はピリミジンリッチな配列への結合能を有していた。標的 DNA 濃度の増加に伴い、応答電流値も増加し、その検出限界は 5×10^{-8} M 程度であった。

D. 考察

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。リスクマネジメントにおける細菌のモニターは、短時間で容易であればあるほど実行性が高くなる。約 8 時間以内少なくとも 1 日程度で病原細菌を検出/同定する方法を開発する必要がある。このとき病原因子をターゲットにすれば、直接病原性の高い株をモニターできる。迅速高感度化に用いられる方法としては、タンパク質を対象とする抗体を用いた免疫学的方法と、遺伝子を対象とした PCR 法を応用する検出法が用いられることが多いが、我々はこれらの方法の検討を行うと共に、DNA センサーを用いる方法についても検討を行った。SSDBP を用いてプローブ DNA を標識し、これが特定の標的塩基配列とハイブリダイゼーションで確認された。これまで、酵素標識法として SSDBP を用いた例はなく、新規のプローブ DNA の酵素標識法が開発できた。

SE の病原因子としては、SEp がマウスの致死性にかかわる重要な病原因子であると検討を加えてきたが、この遺伝子産物は、特殊な発現メカニズムを持っており、DNA として遺伝子情報を持っていても発現して強毒株となる株と、発現が全くないか微量であり、弱毒株となる場合がある。従ってこの病原因子を対象とした検出法では、mRNA または、タンパク質を対象とする方法が必須であり、抗体を用いた検出法が必要と思われる。本年度は、この SEp の発現調節について検討し、菌の生理的な増殖条件が、病原性の発現にかかわることを示した。

カンピロバクターのモノクローナル抗体を作成したところ、カンピロバクターの環境抵抗性にかかわるタンパクを認識していることが

わかってきた。この抗体の認識する Peb4/Cbf2 タンパクは、その性質の検討により、カンピロバクターが酸素をはじめとするストレスを受けたとき、ストレスに対する菌の生残や形状の変化に機能しているタンパクであることがわかった。カンピロバクターが大気条件下では増殖できず、微好気培養により増殖するのはこのタンパクの機能が大きく影響している。この性質を解明することにより、食品中のカンピロバクターの生存を制御することに応用が出来る可能性が出てきた。

大田は、養鶏場の現場で、リスクマネジメントに研究班として開発が期待される迅速検査法を応用する準備として、養鶏場周辺のサルモネラおよびカンピロバクター分離菌株につき、その病原因子の保持状況等を調査し、今後のリスクマネジメントの基礎となる情報収集を開始した。

矢内原は、担当している病原因子に対する抗体作成を着々と進めており、ペーパークロマト法による簡便な試験法への応用について検討を進めた。

E. 結論

(1) 病原関連因子を対象とする抗体作成を進めた。

(2) 養鶏場でのリスクマネジメントへの応用をにらみ養鶏場周辺の分離株の性質の調査を開始した。

(3) SSDBPを用いてプローブDNAを標識し、新規のプローブDNAの酵素標識法を開発し、DNAセンサーへの応用の検討を開始した。

(4) サルモネラの病原因子として、FlhC抗原が細胞への侵入因子であることを示した。

(5) マウス致死に関係するサルモネラの SEp22 タンパクについて検討し、病原性の発現と菌の生理的な増殖条件との相関に関する知見を得た。

(6) カンピロバクターの Peb4/Cbf2 タンパクは、菌のストレス応答性に機能しており、カンピロバクターの酸素存在下の生存性にかかわるタンパクであることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Abe K, Saito N, Kasuga F, Yamamoto S. (2004) Prolonged incubation period of salmonellosis associated with low

bacterial doses. J Food Prot. 67:2735-40.

2. Kasuga F, Hirota M, Wada M, Yunokawa T, Toyofuku H, Shibatsuji M, Michino H, Kuwasaki T, Yamamoto S, Kumagai S. (2004) Archiving of food samples from restaurants and caterers--quantitative profiling of outbreaks of foodborne salmonellosis in Japan. J Food Prot. 67:2024-32.
3. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, and Igimi S. (2004) Nationwide survey of *Listeria monocytogenes* infection in Japan. Epidemiol Infect. 132:769-772.
4. Tanaka Y, Takizawa M, Igimi S, and Amano F. (2004) Enhanced Release of Prostaglandin D2 during Re-incubation of RAW 264.7 Macrophage-Like Cells after Treatment of Both Lipopolysaccharide and Non-steroidal Anti-inflammatory. Drugs. Biol. Pharm. Bull. 27(7): 985-991.
5. Yamasaki M, Igimi S, Katayama Y, Yamamoto S and Amano F. (2004) Identification and characterization of an oxidative stress-responsive protein from *Campylobacter jejuni*, homologous to Rubredoxin Oxidoreductase/Rubrerhythrin. FEMS Microbial. Letters. 235(1):57-63.
6. Okutani A, Okada Y, Yamamoto S, Igimi S. (2004) Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. Int J Food Microbiol. 93:131-140.
7. Cheun HI, Kawamoto K, Hiramatsu M, Tamaoki H, Shirahata T, Igimi S and Makino S-I. (2004) Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. J Appl Microbiol. 96:1347-1353.
8. Asakura H, Panutdaporn N, Kawamoto K, Igimi S, Yamamoto S, and Makino S-I. (2004) Isolation of mini-Tn5Km2 Insertion mutants of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg sensitive to NaCl-induced osmotic stress. Microbiol. Immunol. 48(12):981-984.
9. Yamashita K, Shimizu A, Kawano J, Uchida E, Haruna A, Igimi S. (2005) Isolation

and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. J. Vet. Med. Sci. 67(3):263-268.

10. Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S and Igimi S. (2005) An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. Int. J. Food Microbiol. in press. Y
11. 池袋一典, 早出広司。(2004)酸素電極反応を用いた DNA ハイブリダイゼーションの高感度検出。電気化学及び工業物理化学。72号 8巻:594-597.

2. 学会発表

1. 天野富美夫, 寺井志織, 岡本鮎美, 窪田智史, 五十君静信, 山崎学, 奥谷晶子。養鶏場から分離したサルモネラ (*Salmonella* Enteritidis; SE) の、マウスに対する病原性関連因子 SEp22 (Dps) の活性酸素分子種に対する抵抗性と病原性発現機構の研究。日本生化学会近畿支部大会、2004年5月和歌山
2. Fumio Amano and Shiori Terai. Involvement of SEp22, identical to *Salmonella* Dps, in the pathogenicity of orally infected *Salmonella* Enteritidis. 第4回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2004年8月、淡路島
3. Fumio Amano, Hisae Karahashi, Shiori Terai, Takao Toyomura, Keiko Waku, and Satoshi Hasegawa: Correlation between LPS-resistance and the resistance toward cytotoxic effects of *Salmonella* infection in mouse macrophages, 8th Biennial Conference of the International Endotoxin Society, November, 2004, Kyoto
4. Shiori Terai, Manabu Yamasaki, Shizunobu Igimi, and Fumio Amano: Growth phase-dependent expression of a pathogenicity-related SEp22 protein, *Salmonella* Dps, in an environmental

isolate *Salmonella* Enteritidis, 第77

5. 山崎学, 天野富美夫, 山本茂貴, 五十君静信。Campylobacter jejuni の 27kDa タンパク質の好気ストレスに対する応答性。第77回日本細菌学会総会。2004年4月2日。大阪
6. 山崎学, 長谷部保彦, 北村和之, 矢内原千鶴子, 山本茂貴, 五十君静信。Campylobacter jejuni 検出用抗体: 31 kDa タンパク質に対するモノクローナル抗体の検討。第25回日本食品微生物学会。2004.9.29。東京
7. 山崎学, 天野富美夫, 片山葉子, 山本茂貴, 五十君静信。食中毒起因菌 Campylobacter jejuni の coccoid 化における酸素の影響。日本微生物生態学会第20回大会。2004.11.21。仙台
8. 江川智哉, 水本直恵, 天野富美夫, 豊田有樹子, 大田博昭, 馬場栄一郎。SE 噴霧投与による鶏卵管における SE 定着実験モデルを用いた不活化ワクチンの有効性評価。第137回日本獣医学会学術集会。2004年4月。藤沢市
9. 石井啓行, 江川智哉, 豊田有樹子, 大田博昭, 五十君静信, 水本直恵, 馬場栄一郎。SE の FliC フラグメント 9kDa (Sep9) に対する抗 Sep9 抗体の運動阻害作用と増殖抑制作用。第138回日本獣医学会学術集会。2004年9月10-12日
10. 江川智哉, 石井啓行, 豊田有樹子, 五十君静信, 水本直恵, 馬場栄一郎。SE 不活化ワクチン接種系由来卵における抗 SE べん毛抗体価の検討。第25回食品微生物学会学術集会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし