

氏 名(本籍) 鈴木 木 祥 子

学位の種類 博士 (農 学)

学位記番号 農 第 4 4 8 号

学位授与年月日 平 成 4 年 3 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 Salmonella enteritidis 病原性プラスミドの
遺伝子解析に関する研究

論文審査委員(主 査) 教 授 扇 元 敬 司
教 授 山 岸 敏 宏
教 授 伊 藤 敏 敏

論文内容要旨

緒論

サルモネラ感染症は、人及び家畜における急性ないし慢性の疾病であり、畜産経営上にも本症の発生は経済的な損失が大きく、本症の病原性を解明することは、その予防や防圧に大きく貢献するものである。

近年、人由来サルモネラについてのプラスミド・プロファイリングが、疫学的解析に有用であることが示されている。この迅速かつ簡便なプラスミド・プロファイリングを家畜衛生分野においても応用可能になれば、本症の感染源を究明する上で非常に有力な手段となるが、家畜由来株における応用例は少ない。また、*Salmonella typhimurium*, *S. dublin*, *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. choleraesuis* 等のいくつかの血清型のサルモネラにおいて、血清型特異的な病原性プラスミドの存在が明らかとなっており、その遺伝学的研究も進められているが、*S. enteritidis* については検討がなされていない。

そこで、本研究では、家畜由来サルモネラの疫学的解析にプラスミド・プロファイリングを応用し、その有用性を確認するとともに、*S. enteritidis* において、36Mdプラスミドが血清型特異的に存在することを明らかにした（第一章）。更に、この36Mdプラスミドの機能について検討を行い、病原性に関与することを明らかにするとともに（第二、三、四章）、プラスミド上の病原性領域についても遺伝学的検討を加え、その塩基配列を明らかにした（第五章）。

第一章 わが国の家畜由来サルモネラのプラスミド・プロファイリング

わが国の広範な地域（1道14県）で飼養されている健康な肥育乳用雄子牛（285頭）及び肥育豚（285頭）の直腸便からサルモネラが計10株分離され、一見健康な家畜もサルモネラに汚染されていることが明らかになった。また、これらの分離株10株中9株からプラスミドが検出された。更に、サルモネラ症の発生が認められた特定の地域における罹患子牛より分離された *S. typhimurium* についてプラスミド・プロファイリングを応用したところ、3つのプラスミド・パターン(A, B, C)が認められた。このプラスミド・パターンとサルモネラ症の発生年月日及び子牛の移動について検討したところ、図1に示したように、原因菌の由来が推定できたことから、プラスミド・プロファイリングが家畜衛生分野における疫学的研究において有用であることが示

された。

更に多くのサルモネラ分離株についてプラスミド・プロファイリングを応用したところ、*S. enteritidis* では、アヒル由来の2株を除く全ての株から36Mdプラスミドが検出され(表1)、このプラスミドの制限酵素による切断パターンも同一であったことから、36Mdプラスミドは、*S. enteritidis* に特異的なプラスミドであることを明らかにした。

第二章 *Salmonella enteritidis* 36Md プラスミド

脱落株及び再導入株の作出

S. enteritidis の血清型特異的な36Mdプラスミドの機能を明らかにするために、36Mdプラスミドを保有する *S. enteritidis* AL1190株を親株として、プラスミドをTn1で標識したAL1191株、プラスミド脱落株AL1192及びプラスミド再導入株AL1193を作出した。

これらの派生株と親株AL1190との生化学的性状、抗原性状(表2)、菌体蛋白質及びリポポリサッカライド(表3)などの菌体性状について比較検討したところ、いずれの株間においてもこれらの性状に相違は認められなかった。従って、派生株を作出する際に行った種々の処理は、菌体性状に変異を起さなかったことが明らかとなるとともに、プラスミドがこれらの菌体性状のいずれにも関与していないことを明らかにした。

第三章 36Mdプラスミドと病原性との関係

AL1190株、AL1191株、AL1192株及びAL1193株のマウスに対する致死毒性を検討したところ、AL1191株及びAL1193株はAL1190株とほぼ同等のLD₅₀値を示したが、AL1192株はこれらの株よりも約10³以上高いLD₅₀値を示したことから(表4)、*S. enteritidis* の36Mdプラスミドは、病原性に関与するプラスミドであることが示された。

また、各菌株を経口投与したマウスにおける体重の変化、臓器内菌数の変化(図2)及び病理組織学的変化からも、プラスミド保有株は、マウスに対して強い病原性を示すが、プラスミド脱落株は病原性が低下していることが明らかとなった。

更に、臓器内菌数及び病理組織学的検討の結果より、菌が小腸のパイエル板から侵入した後、腸間膜リンパ節や体内臓器への伝播の過程において36Md

プラスミドが関与していることが明らかとなり、宿主側の生体防御に対する菌の抵抗性にこのプラスミドが機能していることが示唆された。

第四章 36Mdプラスミドの病原性に関わる機能解析

36Mdプラスミドが病原性においてどの様に関わっているのかを検討した。

鉄欠乏培地での増殖性及び血清に対する生存率を、親株AL1190、プラスミド脱落株AL1192及び再導入株AL1193を用いて比較したところ、いずれの株も同様の増殖性あるいは生存率を示したことから、36Mdプラスミドは菌の鉄の取り込み能及び血清抵抗性には関与していないことが明らかとなった。

一方、食細胞機能を低下させたマウスにおけるプラスミド脱落株AL1192の病原性を検討したところ、無処理マウスにおける親株AL1190とほぼ同等の病原性を示したことから（表5、図3）、36Mdプラスミドが菌の食細胞抵抗性に関与することが明らかとなった。更に、その機能を明らかにするために、食細胞による取り込み及び過酸化水素に対する抵抗性について検討したところ、いずれの株にも相違は認められなかった。

従って、36Mdプラスミドは、食細胞（主としてマクロファージ）内殺菌に対する菌側の抵抗性に関与していることを明らかにし、更に、この抵抗性が過酸化水素以外の因子による殺菌に対するものであることを明らかにした。

第五章 36Mdプラスミドにおける病原性領域の遺伝子解析

S. enteritidis の36Mdプラスミドの制限酵素地図を作成し、この地図上の病原性領域をTn λ 挿入変異株の作出及びTn λ 挿入部位の解析により検討した。Tn λ 挿入変異株247株中1株（TA19株）に、プラスミド脱落株と同等の病原性低下が認められ（表6）、その株のプラスミドにおけるTn λ 挿入部位は、*Eco* RI -*Hin* d III 1.4kbフラグメント内に存在した。*S. choleraesuis* の50kbプラスミド上の病原性領域である*Sa* I -*Eco* RI 6.4kb mba領域との相同性を、サザンプロットにより検討したところ、36Mdプラスミドにもmba領域と相同性を示す*Sa* I -*Eco* RI 6.4kbの領域が存在し、TA19株のTn λ が挿入された*Eco* RI -*Hin* d III 1.4kbフラグメントが、この領域内に含まれていることが明らかとなった。

また、36Mdプラスミドの*Sa* I -*Eco* RI 6.4kb領域では、*S. choleraesuis* 50kbプラスミドのmba領域と同様に、32kDa, 32kDa, 70kDa, 29kDaの4つの

蛋白質がコードされていることが、mba 領域にコードされている各蛋白質に対する特異血清を用いたウエスタンブロットにより明らかとなった(図4)。

更に、*Sal* I-*Eco* RI 6.4kb領域の塩基配列を決定したところ、各蛋白質に対応する4つのOpen Reading Frame (ORF)が存在した。各ORFの推定アミノ酸配列は、*S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. choleraesuis*の各病原性プラスミドの病原性領域における推定アミノ酸配列とほぼ90%以上の高い相同性を示した。

従って、*S. enteritidis* 36Mdプラスミドの*Sal* I-*Eco* RI 6.4kb領域は、他のサルモネラの病原性プラスミドと同様に、病原性領域であることを明らかにした。

結 論

家畜由来サルモネラの疫学的解析にプラスミド・プロファイリングを応用し、その有用性を確認するとともに、*S. enteritidis* には、血清型特異的な36Mdプラスミドが存在することを明らかにした。

次に、このプラスミドの機能を解明するために、プラスミド脱落株及び再導入株を作出し、これらの派生株と親株とを用いてその性状を比較検討したところ、36Mdプラスミドは、宿主の生体防御機構の一つである食細胞内での殺菌に対する菌側の抵抗性に関与することによって、菌の致死毒性を増強させていることを明らかにした。

更に、このプラスミド上の病原性領域並びにその塩基配列を、遺伝学的解析により明らかにした。

表 1. 病性鑑定材料由来 *S. enteritidis* のプラスミド・プロファイル

由来	供試株数	プラスミド (Md)
鶏	1	36
アヒル	2	58
豚	1	36
牛	1	120, 36, 1.4
	3	105, 36
	3	103, 36
	4	96, 36, 1.4
	2	96, 36
	5	85, 36
	1	36, 32
	9	36, 5, 6, 3.7
	1	36, 1.5
牛肉	28	36
	1	36, 16.5, 2.0
	1	36

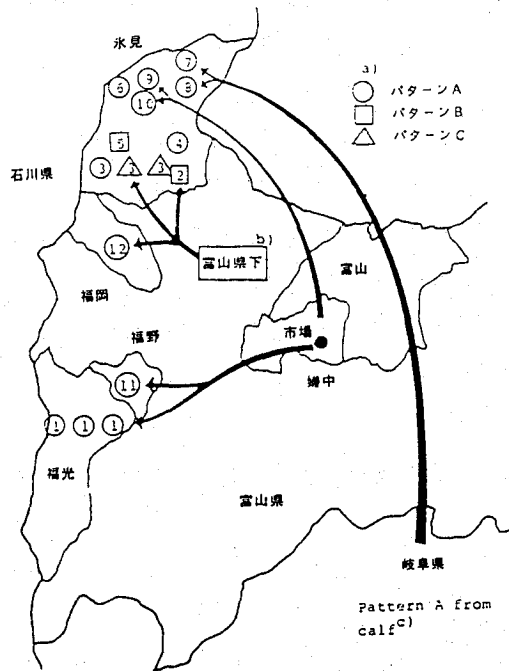


図 1. 子牛の移動と *S. typhimurium* 分離株のプラスミド・パターン
 → : 子牛の移動, a: 農場 No.,
 b: 富山県下のいずれかの場所から子牛を導入,
 c: 岐阜県下の子牛から分離されたプラスミド・パターン A の株

表 2. 抗原性状の比較

菌株	プラスミド	O 抗原性	H 抗原性
AL1190	36Md	1, 9, 12	g, m; -
AL1191	36Md::Tn λ	1, 9, 12	g, m; -
AL1192	-	1, 9, 12	g, m; -
AL1193	36Md::Tn λ	1, 9, 12	g, m; -

表 3. LPS の化学組成の比較

化学組成		菌 株		
		AL1190	AL1192	AL1193
中性糖 ^a	Tyv	0.37 ^f	0.43	0.41
	Rha	0.54	0.72	0.64
	Man	0.52	0.70	0.64
	Gal	0.76	0.93	0.88
	Glc	0.35	0.28	0.26
	Hep	0.21	0.22	0.23
	GlcN ^b	0.35	0.34	0.35
P ^c	0.76	0.72	0.74	
KDO ^d	0.17	0.16	0.16	
3-OHC ₁₄ ^e	0.50	0.49	0.56	

a: Tyv; tyvelose, Rha; rhamnose,

Man; mannose, Gal; galactose,

Glc; glucose,

Hep; L-glycero-D-mannoheptose

b: glucosamine, c: phosphorus

d: 2-keto-3-deoxyoctonic acid

e: 3-hydroxy myristic acid,

f: μ mole/mgLPS

表 4. マウスに対する致死毒性

株	プラスミド	投与経路 ^a	マウス系統	Log LD ₅₀
AL1190	36Md	p. o.	C57BL/6	3.3
AL1191	36Md::Tn/			1.2
AL1192	-			8.3
AL1193	36Md::Tn/			1.8
AL1190	36Md	p. o.	ddY	6.4
AL1191	36Md::Tn/			5.5
AL1192	-			9.8
AL1193	36Md::Tn/			4.6
AL1190	36Md	s. c.	ddY	4.1
AL1191	36Md::Tn/			5.0
AL1192	-			7.3
AL1193	36Md::Tn/			4.4

a : p. o. ; 経口, s. c. ; 皮下

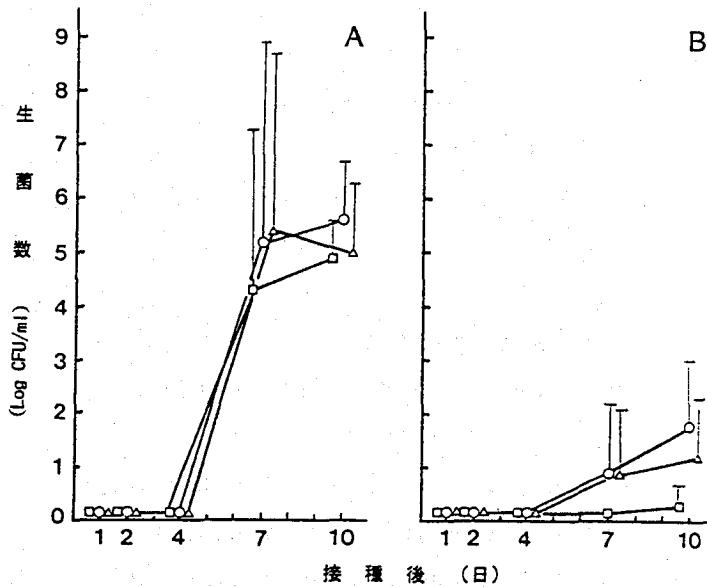


図 2. 経口投与マウスの臓器内菌数
 5週齢♀ C57BL/6 マウスへAL1190株 (A) あるいはAL1192株 (B) を約 10^4 CFU 経口投与。菌数は3匹のマウスの幾何平均±標準偏差
 □ ; 腸間膜リンパ節, ○ ; 脾, △ ; 肝

表5. CY, CG処理マウスにおける致死毒性

株	プラスミド	接種 経路 ^a	処理	Log LD ₅₀	
				1回	連続
AL1190	36Md	s. c.	—	4.2	5.8
			CY	ND	<0.2
			CG	ND	<1.0
AL1192	—	s. c.	—	6.6	7.0
			CY	5.4	<1.4
			CG	5.8	<4.0
AL1193	36Md::Tn/	s. c.	—	ND	5.5
			CY	ND	<0.3
			CG	ND	<1.1
AL1190	36Md	i. p.	—	<2.4	<1.1
			CY	ND	<0.3
			CG	ND	<0.1
AL1192	—	i. p.	—	6.2	5.4
			CY	<5.0	<0.8
			CG	<5.4	<0.5
AL1193	36Md::Tn/	i. p.	—	2.2	ND

a : s. c. ;皮下, i. p. ; 腹腔内
 CYは150mg/kgを菌接種3日前、CGは200mg/kgを
 菌接種1日前に接種
 連続処理の場合は、初回処理後3日毎に接種

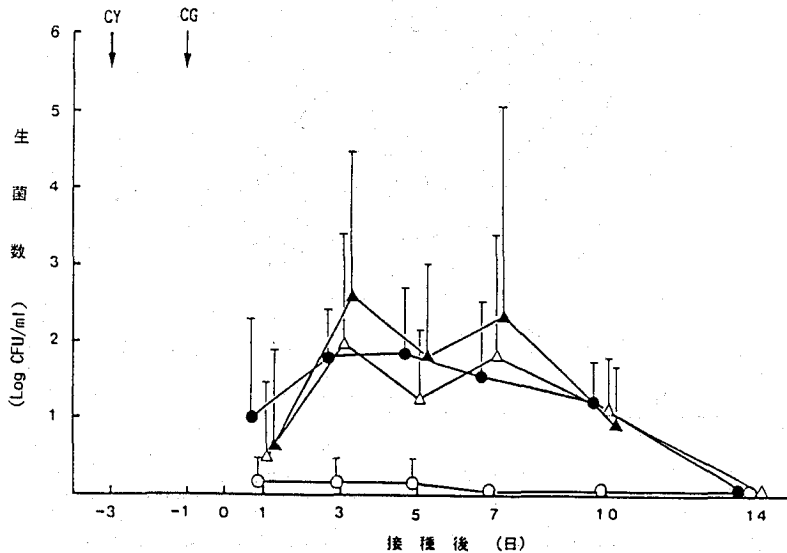


図3. CY, CG1回処理マウスにおける血中菌数の変化
 10⁵ CFU を無処理あるいはCY, CG1回処理マウスに皮下接種
 CYは150mg/kgを菌接種3日前、CGは200mg/kg菌接種1日前に接種
 ● : 無処理マウス-AL1190 ○ : 無処理マウス-AL1192
 ▲ : CY処理マウス-AL1192 △ : CG処理マウス-AL1192

表 6. Tn \int 挿入株のマウスに対する致死毒性

菌株	プラスミド	Log LD ₅₀	
		s. c.	i. p.
TA19	36Md::Tn \int	7.7	5.1
AL1192	—	8.1	6.1
AL1190	36Md	5.6	<2.4

s. c. ; 皮下, i. p. ; 腹腔内

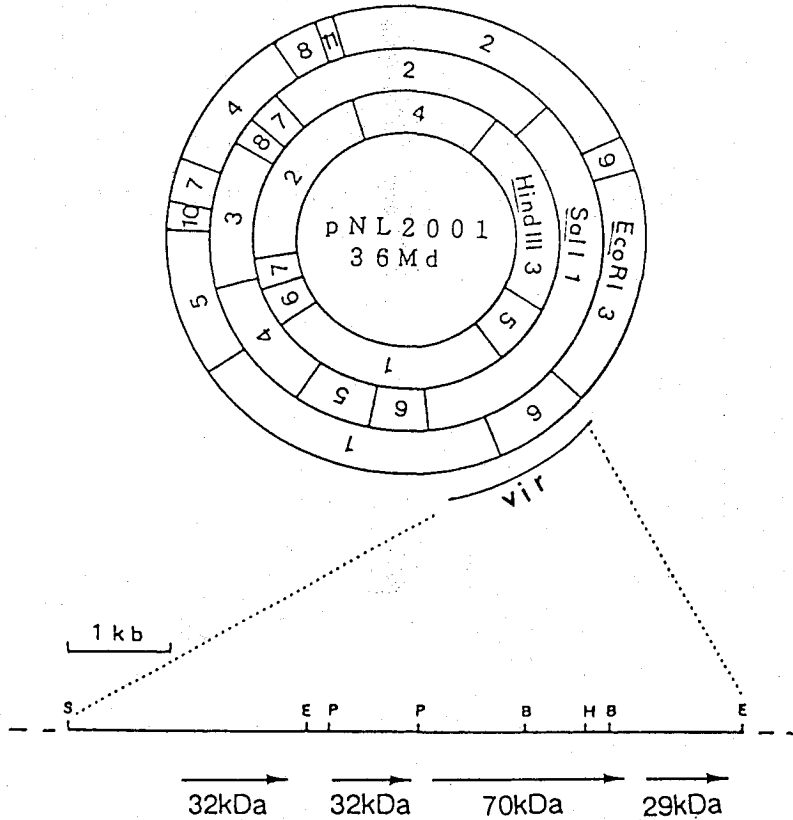


図 4. 36Md プラスミドの病原性領域とその発現蛋白

審査結果の要旨

本論文は、ヒトおよび動物サルモネラ感染症の主要な原因菌として知られている *Salmonella enteritidis* のプラスミド・プロファイリングの疫学的応用および当該菌プラスミド病原性領域に関する研究をおこなったものである。

まず動物由来サルモネラのプラスミド・プロファイリングの疫学的解析からプラスミド・パターンとサルモネラ症発生の因果関係を明らかにした。その検索過程で得られた特異的な36Mdプラスミドは、当該菌の生化学的、免疫学的諸性状、また菌体タンパク質、糖脂質などの菌体構築には関与しないが、マウスにいちじるしい致死毒性を示したことから病原性に関与するものと推定した。一方、菌体の経口投与マウスの生理諸元、臓器内菌数分布、病理組織学的所見、小腸パイエル板侵入、腸間膜リンパ節、その他の臓器への伝播過程などから、この36Mdプラスミド保有株が強い病原性を示すことを示唆する成績を得た。さらに、この36Mdプラスミドは、食細胞内殺菌に対する菌側の抵抗性、とくに過酸化水素以外の因子による殺菌に対する抵抗性に関与していることを明らかにした。ついで制限酵素地図の作成、地図上の病原性領域の解析、病原性領域との相同性の検討をおこない、36Mdプラスミドの *Sal I*-*Eco RI* 6.4kb領域が病原性領域であること、タンパク質コードは4種類であること、塩基配列には、各タンパク質に対応する Open Reading Frame (ORF) が存在しており、ORFの推定アミノ酸配列は、他のサルモネラ菌の病原性プラスミドのそれと高い相同性を示すことを明らかにした。以上のように本研究では、家畜由来サルモネラの疫学的解析にプラスミド・プロファイリングを応用し、その有用性を確認するとともに、*S. enteritidis* には血清型特異的な36Mdプラスミドが存在することを明らかにしたものである。またさらに当該プラスミドの機能解明のためにプラスミド脱落株および再導入株を作出して、これらの派生株と親株の性状を比較検討して、36Mdプラスミドが宿主の生体防御機構の一つである食細胞内での殺菌に対する菌側の抵抗性に関与して菌の致死毒性を増強させていることを初めて解明するとともに、36Mdプラスミド上の病原性領域やその塩基配列を遺伝学的解析によって明らかにした。

これらの知見はヒトと動物に共通な病原菌で、公衆衛生上で重要なサルモネラ菌、とくに *Salmonella enteritidis* の病原性の解明に大きく貢献すると共に、動物微生物科学研究に進歩を与えたものである。よって審査員一同は、本論文提出者が博士（農学）の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認定した。