

## 8. 千葉県内で分離された *Salmonella* Infantis の感染性に関する研究

○ 石嶋 希（旧所属 千葉県衛生研究所，現所属 国立感染症研究所）

### 【研究目的】

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis (*S. Infantis*) は、ヒトおよび養鶏から多く分離される血清型のひとつである。しかしながら、本血清型の病原性についてはほとんど研究されていない。本研究の目的は、千葉県内で分離された *S. Infantis* 菌株を用いて、本血清型の感染性を評価することである。

### 【研究の必要性】

養鶏場を取り巻く環境にはサルモネラ属菌汚染の危険性があり、鶏はサルモネラ属菌を高頻度で保有している(1,2)。このことから鶏肉はヒトにおけるサルモネラ症の原因食品として重要であると考えられており、中でも養鶏環境や鶏肉から特に多く分離される血清型として *S. Infantis* が挙げられる(1,3)。本邦で平成 11 年から 20 年に行われたサルモネラ属菌汚染実態調査の報告では、市販鶏肉から検出されたサルモネラ属菌数の 67.6%が *S. Infantis* であり、突出して多かった。それに対してヒトでは、健康保菌者を含むヒトから分離されたサルモネラ属菌の中で、*S. Infantis* は *S. Enteritidis* に次いで多かったが（平成 21 年から 25 年の調査）、食中毒患者由来株ではわずか 5.4%であった（平成 12 年から 21 年の調査）。食中毒患者由来サルモネラ属菌数の 48.5%を占める *S. Enteritidis* が、市販鶏肉由来菌数の 10.5%に留まることと比較すると、*S. Infantis* 汚染鶏肉を原因としたサルモネラ食中毒は発生しにくいものと思われる。しかし一方では、ヒト由来と鶏肉由来の *S. Infantis* をパルスフィールドゲル電気泳動法および Amplified fragment length polymorphism (AFLP)法で解析し、鶏肉がヒトへの *S. Infantis* 感染の原因であることを検証した報告もある(3)。また、2012 年、アメリカでのドライドッグフードを感染源とする大規模なヒト *S. Infantis* 感染事例(4)や、2010 年にオーストラリアで起きた老人ケア施設における *S. Infantis* 食中毒死亡例(5)から、時に甚大な感染性・病原性を呈する血清型である側面も見える。以上のことから、*S. Infantis* は、菌株によって感染性が異なり、病原性が多様であることが推察された。これまでほとんど注目されていなかった *S. Infantis* の感染性について解明することは、ヒトの *S. Infantis* 感染、特に感染鶏を介する食中毒リスクを低減するためのみならず、広く医学、獣医学、食品衛生学上、重要であると考えている。

## 【材料・方法】

### 菌株の収集

千葉県衛生研究所で分離あるいは搬入されたサルモネラ属菌を疑う菌株について、生化学性状試験によるサルモネラ同定および血清型試験を行い、*S. Infantis* 菌株を収集した。

### 細胞侵入性試験

任意に選択した *S. Infantis* 7 株について、病原性の重要な指標である細胞侵入性を調べるため、Gentamycin Protection Assay を次のとおりに行った。ヒト子宮頸癌由来細胞 HeLa 細胞を Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)-10% Fetal calf serum (FCS) 培地を用いて 24 ウェルプレートで 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境で 1 晩培養した。サルモネラ属菌は、LB 培地で 37°C、1 晩震盪培養にて前培養した。本培養は、前培養液を 50 倍希釈し、OD<sub>600</sub>=0.6 まで 37°C で震盪培養した。HeLa 細胞に Multiplicity of Infection 100 で菌を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で 10 分間静置後、PBS で 3 回洗浄し、さらに 20 分感染させた。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で 1 回洗浄後、培地を 200µg/ml Gentamycin 含有 DMEM-10% FCS 培地に交換、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 20 分間静置し、細胞内に侵入していない菌を殺菌した。細胞を PBS で 3 回洗浄後、0.5% TritonX-100 含有 PBS を 500 µl 添加し、細胞を溶解した。セルスクレイパーで細胞を掻き取って細胞溶解液とし、生理食塩水を用いて 10 倍階段希釈した。各希釈液を LB 寒天培地に 50 µl ずつ塗布し、37°C で 1 晩培養後にコロニー数を計測した。

### 細胞付着性試験

次の作業工程前後は細胞侵入性試験と同様に行った。菌液を細胞へ添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で 10 分間静置後、PBS で 3 回洗浄し 0.5% TritonX-100 含有 PBS を 500 µl 添加した。

### III型分泌装置 (TTSS)変異株の作製

サルモネラ属菌において、III型分泌装置 (TTSS)は病原性発揮に重要な役割を担っていると考えられている。*S. Infantis* における TTSS の機能を確認するため、Datsenko ら (6) の方法に従って TTSS 構成成分である InvA をコードする *invA* 遺伝子を欠損させ、TTSS 変異株を作製した。

## 【結果】

### HeLa 細胞への細胞侵入性

サルモネラ属菌にとって、宿主細胞への侵入が病原性発揮の発端となると考えられている。これまでにサルモネラ属菌の細胞あるいは組織への侵入性を調べた論文は複数存在している。しかしそれらの多くは *S. Typhimurium* 等のヒトへの高病原性が明らかになって

いる血清型を対象にしており(7,8,9)、*S. Infantis* は細胞侵入性の低い血清型として言及されているに過ぎない。また、鶏への経口感染実験により、腸粘膜への組織侵入性をほとんど持たない *S. Infantis* が報告されている(10)。そこで、本研究では、収集した *S. Infantis* 株から任意に抽出した 7 株について細胞侵入性試験を実施した。*S. Infantis* の HeLa 細胞に対する細胞侵入性は一律ではなく、菌株によって異なることが示唆された (図 1)。

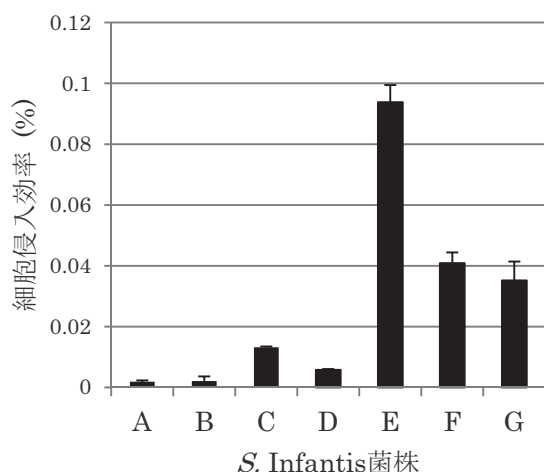


図 1. *S. Infantis* の細胞侵入性

細胞侵入性試験を実施し、A から G の各菌株について HeLa 細胞への侵入効率を算出した。縦軸は細胞侵入効率を示しており、細胞侵入菌数/添加菌数×100 の算出結果である。データは平均±標準誤差で示す。

#### 細胞付着性の比較および細胞付着性と細胞付着性に TTSS が及ぼす影響の評価

細胞侵入性試験の結果、低侵入性と高侵入性を示した A 株と E 株を代表株とし、次の実験に用いた。菌の細胞内侵入には、その前段階として細胞表面への付着効率の影響が考えられる。そこで、これら 2 株について、細胞付着性に差異があるか否かを調べた。また、一般的にサルモネラ属菌の細胞侵入に寄与することが知られている TTSS の影響を *S. Infantis* についても検証するため、E 株の TTSS 変異株として *invA* 欠損株( $\Delta invA$ )を作製し、株および株野生株と細胞侵入性と細胞付着性を比較した (図 2)。

A 株と E 株野生株を比較すると、細胞付着効率については、E 株は A 株の約 9.2 倍高く、細胞侵入効率は約 16.2 倍高かった。いずれもその差は有意であった。E 株野生株と  $\Delta invA$  株を比較すると、細胞侵入能は TTSS 変異によりほぼ完全に消失した。この結果から、E 株は、侵入性のみならず付着性も A 株より高いこと、本菌株の HeLa 細胞への侵入性は TTSS に大部分を依存していることが示された。

#### 【考察】

本研究では、①*S. Infantis* の上皮細胞への侵入性は菌株により多様であること、②A 株と E 株には、細胞付着性・侵入性共に差があること、③*S. Infantis* の細胞侵入性は

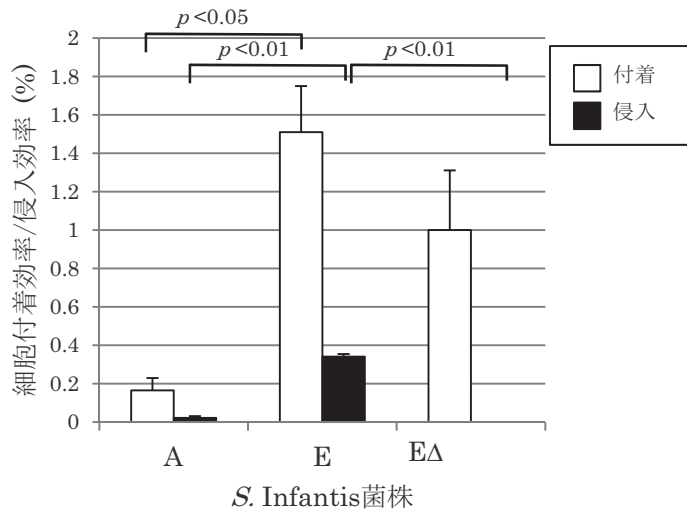


図 2. HeLa 細胞における細胞付着性および細胞侵入性

HeLa 細胞を用いて細胞侵入性試験および細胞付着性試験を実施した。縦軸は細胞付着効率および細胞侵入効率を示す。白色カラムは細胞付着効率、黒色カラムは細胞侵入効率を表し、それぞれ細胞付着菌数/添加菌数×100 と細胞侵入菌数/添加菌数×100 の算出結果である。データは平均±標準誤差で示す。

TTSS に依存すること、を明らかにした。これらの知見は、本血清型が他の血清型と同様に宿主に TTSS 依存的な炎症反応を惹起させ得ること、宿主における病原性が菌株によって異なることを示唆している。

*S. Infantis* は、ヒトおよび鶏から多く分離される代表的な血清型であることから、今後の研究課題として、ヒトと鶏に対する病原性の差異の検証を計画している。本血清型の各宿主における感染メカニズムの解明により発症率が異なる理由が明らかになると共に、感染制御に有効な鶏ワクチンの開発の上で重要な手がかりとなることを期待している。

#### 【参考文献】

1. Iwabuchi, E, Maruyama, N., Hara, A., Nishimura, M., Muramatsu, M., Ochiai, T, Hirai, K. *J Food Prot.* 2010.73(11): 1993-2000.
2. Murase, T., Senjyu, K., Maeda, T., Tanaka, M., Sakae, H., Matsumoto, Y., Kaneda, Y., Ito, T., Otsuki, K. *J Food Prot.* 2001. 64(12): 1912-1916.
3. Noda, T., Murakami, K., Ishiguro, Y., Asai, T. *Foodborne Pathog Dis.* 2010. 7(6): 727-735.
4. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2012. 61(23): 436.
5. Najjar, Z., Furlong, C., Stephens, N., Shadbolt, C., Maywood, P., Conaty, S., Hogg, G. *Epidemiol Infect.* 140(12): 2264-2272.
6. Datsenko, K. A., Wanner, B. L. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000. 97(12): 6640-6645.
7. Martin, G. D., Chart, H., Threlfall, E. J., Morgan, E., Lodge, J. M., Brown, N. L.,

Stephen, J. *J Med Microbiol.* 2000.49 (11): 1011-1021.

8. Kaiser, P., Rothwell, L., Edouard E. Galyov, Paul A. Barrow, Joan Burnside, Wigley, P. *Microbiology.* 2000. 146 (12): 3217-3226.
9. Mizumoto, N., Sasai, K., Tani, H., Baba, E. *Vet Microbiol.* 2005. 111: 99-105.
10. Berndt, A., Wilhelm, A., Jugert, C., Pieper, J., Sachse, K., Methner, U. *Infect Immun.* 2007. 75 (12): 5993-6007.

【謝辞】

本研究を実施するにあたり、研究助成をいただきました公益財団法人 大同生命厚生事業団に厚く御礼申し上げます。

【研究成果発表】

1. 石嶋 希. 第 155 回日本獣医学会学術集会. 2013. ヒトおよび鶏肉から分離された *Salmonella* *Infantis* の細胞侵入性の検討.
2. 石嶋 希. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013. ヒトおよび鶏肉から分離された *Salmonella* *Infantis* の細胞侵入性の検討.

【経費使途明細】

品名	金額
プラスチックピペット	74,970
遠心チューブ	16,065
マルチウェルプレート	5,796
細胞培養用フラスコ	11,550
シリンジフィルター	7,581
脱脂綿	1,092
マイクロピペット	22,932
ボルテックスミキサー	19,908
サルモネラ免疫血清	5,712
パソコンソフト	134,358
通信費等	420
合計	300,384