

令和元年6月19日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08080

研究課題名(和文) サルモネラ感染防御に関与する菌体成分を用いた宿主免疫応答の解析

研究課題名(英文) Role of host immune response using bacterial components involved in protection against Salmonella infection

研究代表者

江口 正浩 (Eguchi, Masahiro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・上級研究員

研究者番号：00312215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、サルモネラ感染防御に関与する菌体成分の解析を行い、ワクチン開発に寄与することを目的とする。我々が明らかにしたサルモネラ感染防御に関与する菌体成分は、感染初期にCD11b, CD11c, Gr-1陽性細胞を増加させることを明らかにした。増加したCD11b, CD11c, Gr-1陽性細胞が宿主内でのサルモネラ排除に関与している可能性が考えられた。次に、サルモネラ感染防御に関与する菌体成分の発現の有無を野外分離株で確認したところ、株によってはサルモネラ感染防御に関与する菌体成分の発現が異なることを明らかにした。こうした知見は、野外分離株の疫学的な解析に活用できると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、宿主内のサルモネラの排除機構は完全には解明されていない。本研究で得られたCD11b, CD11c, Gr-1陽性細胞が増加する知見は、サルモネラの排除機構解明の端緒につながるのではないかと考えている。また、株によって、感染防御に関与する菌体成分の発現が異なることが明らかとなり、誘導される感染防御能が株によって異なることが示唆された。得られた知見は、疫学的な解析を展開させることで、ワクチン開発に貢献できると考えている。

本研究で得られた知見は、家畜を用いた臨床試験やワクチン投与により惹起する免疫担当細胞の活性化に必要な免疫賦活剤の検討が可能となり、実用化に向けた工程に寄与できる。

研究成果の概要(英文)： The purpose of this study is to analyze bacterial components involved in protection against Salmonella infection and to contribute to new vaccine development. The bacterial components involved in the protection against Salmonella infection that we clarified that CD11b, CD11c, and Gr-1-positive cells increased at the early stage of infection. It is also possible that increased CD11b, CD11c and Gr-1 positive cells are involved in Salmonella exclusion. In addition, we also clarified that the expression of bacterial components involved in protection against Salmonella infection differs depending on the strain, and we believe that it can be used for epidemiological analysis of field isolates.

研究分野：感染免疫

キーワード：サルモネラ ワクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルモネラは2,600種類以上の血清型に細分されるグラム陰性桿菌である。畜産業におけるサルモネラ症の発生は、経済的損失が極めて大きい。家畜・家きんのサルモネラ症及び家きんサルモネラ感染症は、家畜伝染病予防法に基づき、届出伝染病及び法定伝染病にそれぞれ指定されており、家畜・家きんに対する感染予防対策は重要視されている。しかしながら、科学的手法の限界などから国内の家畜・家きんのサルモネラ症の発生は完全には抑えられていない。サルモネラにおける学術的な研究は、細菌学・免疫学・疫学など多岐にわたり展開されており、宿主細胞への侵入機構、疾病の伝播形式、薬剤耐性機構など感染症対策に対する多くの知見が得られている。しかしながら、サルモネラに対する宿主の免疫応答や菌の排除に関わる免疫担当細胞の同定など未だ解明されていない課題が残されており、安全で有効な成分ワクチンの開発を困難にしている。

2. 研究の目的

我々は、家畜のサルモネラ症制圧のための新規ワクチンの開発を目的とし、これまでに、サルモネラ経口感染防御に関与する菌体成分(防御抗原)の精製に成功した。精製した菌体成分は、新規の有効な成分ワクチンとして利用が期待できる。しかしながら、免疫後の宿主の副反応(安全性)や最適な投与量・投与方法、最良の免疫賦活剤の利用など、実用化に向けて解決しなければならない課題が残されている。そこで、研究実施期間内で、菌体成分免疫後の生体反応の解析及び菌の排除機構を明らかにし、副反応の低減・投与方法の最適化および免疫賦活剤の開発へ向けた基盤的な知見を獲得する。さらに、他の血清型、野外分離株を用いた感染防御試験を実施することで多価ワクチンの開発、家畜を用いた臨床試験へ向けた基盤的な知見を獲得する。

本研究では、サルモネラ経口感染防御に関与する菌体成分を介した感染防御機構を明らかにする。得られた知見は、菌体成分を活用した成分ワクチンの開発に寄与させる。研究実施期間内で、我々が精製した菌体成分を介して惹起されるサルモネラ感染防御に関与する免疫担当細胞の同定、菌の排除機構の解明を目指す。また、野外分離株を用いて、我々が精製した菌体成分の発現の有無を疫学的に調査し、本実験計画で得られた結果を俯瞰的に精査し、ワクチン開発へ向けた基幹的な知見を獲得する。

3. 研究の方法

(1) 感染防御に関与する菌体成分により誘導される免疫担当細胞の解析

BALB/c マウス(雌、7週齢)に感染防御に関与する菌体成分を免疫し、その後、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)を100 LD₅₀ (10⁶ CFU)経口感染させた(農研機構 動物衛生研究部門 動物実験計画書:承認番号 第15-060号)。脾臓および腸間膜リンパ節の各種免疫担当細胞を下記に示す抗体を用いて免疫染色し、FACSにて免疫担当細胞の割合を経時的に解析した。

- PE-conjugate rat anti-mouse CD11b, Clone: M1/70 (eBioscience)
- PE-Cy5-conjugate rat anti-mouse CD11c, Clone: N418 (eBioscience)
- APC-eFluor 780-conjugate rat anti-mouse Ly-6G (GR-1), Clone: RB6-8C5 (eBioscience)

(2) 感染防御に関与する菌体成分により誘導される液性免疫(抗体)の役割

サルモネラ特異的抗体(mAb 449:04 抗原を認識)をBALB/c マウス(雌、7週齢)に200 µg/200 µl 移入し、その後、*S. Typhimurium* 05+株あるいは*S. Typhimurium* 05-株を1~2 x 10⁶ CFU/500 µl 腹腔感染させ、生存率を比較した(農研機構 動物衛生研究部門 動物実験計画書:承認番号 第16-038号)。

(3) 野外分離株(*S. Typhimurium*)が産生する分泌タンパク質の比較

野外から分離された*S. Typhimurium* 11株をそれぞれLB培地にて一晩、37°Cで培養し、培養上清中のタンパク質を抽出した。その後、SDS-PAGEで展開し、クマシー染色を行い、株間で産生する分泌タンパク質を比較した。

4. 研究成果

(1) 感染防御に関与する菌体成分により誘導される免疫担当細胞の解析

S. Typhimurium 感染2日目、5日目、7日目のマウスの脾臓および腸間膜リンパ節内の各種免疫担当細胞の割合を感染防御に関与する菌体成分を免疫したマウスと非免疫マウスで比較した。免疫マウスの脾臓および腸間膜リンパ節内のCD11b, CD11c, Gr-1陽性細胞が感染2日目で優位に増加していることを明らかにした。しかしながら、感染5日目以降は、免疫マウスと非免疫マウスともに、単球などが非感染のマウスに比べて増加した。また、免疫マウスと非免疫マウスでは、CD11b, CD11c, Gr-1陽性細胞の割合の差は認められなかった。

これらの結果から、感染防御に関与する菌体成分によりCD11b, CD11c, Gr-1陽性細胞が感染初期に優位に増加することが示唆された。

(2) 感染防御に関与する菌体成分により誘導される液性免疫（抗体）の役割

04 抗原は、我々が明らかにした感染防御に関与する菌体成分の一つである。S. Typhimurium は、05 抗原保有株 (05+ : 1, 4, 5, 12:i:1, 2) と 0 抗原のアセチル化に関与する *oafA* の変異により 05 抗原を欠いた Copenhagen 型 (05- : 1, 4, 12:i:1, 2) がある。本研究では作製した 04 抗原を認識するモノクローナル抗体 (mAb449) を用いて S. Typhimurium 05+ 株および S. Typhimurium 05- 株に対する感染防御能の比較をマウス *in vivo* レベルで実施した (図 1)。

mAb449 は、S. Typhimurium 05- 株に対しては感染防御能を示したが、S. Typhimurium 05+ 株に対しては、感染防御能を示さなかった。次に、S. Typhimurium 05+ および S. Typhimurium 05- の野外分離株を用いた *in vivo* 感染実験を実施したところ、野外分離株においても同様の結果を示した。以上の結果から、05 抗原の有無により 04 抗体による感染防御能が異なることが示唆された。また、mAb449 を用いた Raw264.7 細胞による *in vitro* 感染実験を実施したところ、S. Typhimurium 05- 株が S. Typhimurium 05+ 株に比べて有意に Raw264.7 細胞内に取り込まれることが明らかとなった。以上の結果から 04 抗原を認識する抗体の反応性は 05 抗原の有無により異なることが示唆された。

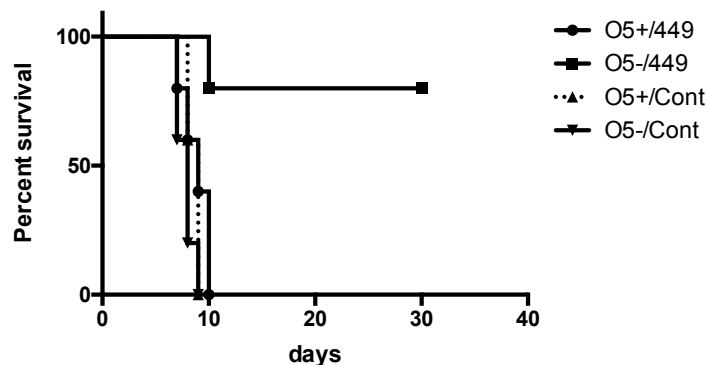


図 1 04 抗体によるサルモネラ感染防御。BALB/c マウスに 04 抗体を 200 μ g 投与し、その後、サルモネラを腹腔内接種した。

(3) 野外分離株 (S. Typhimurium) が産生する分泌タンパク質の比較

分泌タンパク質は我々が明らかにした感染防御に関与する菌体成分の一つである。本研究では、野外分離株が産生する分泌タンパク質を比較するために 11 株の野外分離株を使用した。各野外株由来の分泌タンパク質を 11% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、クマシー染色し、分泌タンパク質のバンドパターンを比較したところ、株間によって異なる分子量の分泌タンパク質が認められた (図 2)。これらの結果より野外分離株においては、産生する分泌タンパク質が異なることが示唆された。

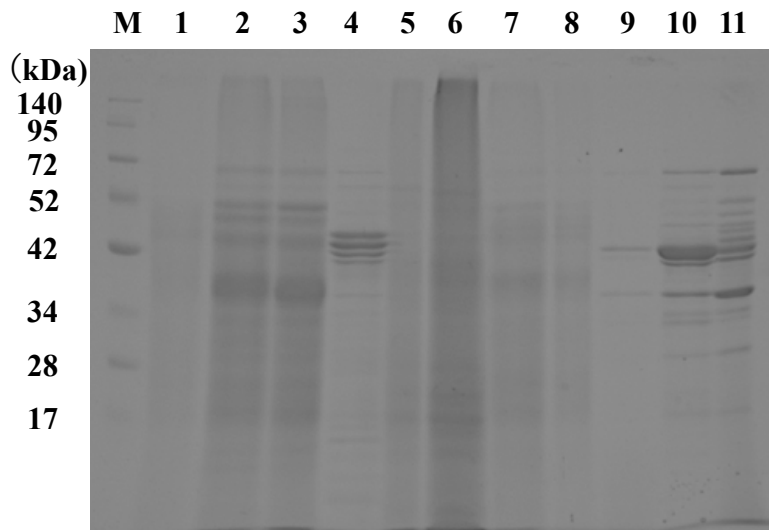


図 2 野外分離株が産生する分泌タンパク質。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Swarnistha Devi ARIBAM, Yumiko MASUKAGAMI, Kazumasa SHIRAIWA, Sayaka NISHIKAWA, Yohsuke OGAWA, Masato AKIBA, Yoshihiro SHIMOJI, Masahiro EGUCHI., Identification of an Antigen Specific to a Protective Salmonella Monoclonal Antibody., Japan Agricultural Research Quarterly., 査読有, 53 (3), 2019, 201-205, 印刷中

- ② Yuka Nakai, Akihisa Ito, Yohsuke Ogawa, Swarmistha Devi Aribam, Marta Elsheimer-Matulova, Kazumasa Shiraiwa, Stevens M.B. Kisaka, Hirokazu Hikono, Sayaka Nishikawa, Masato Akiba, Kazuyoshi Kawahara, Yoshihiro Shimoji, Masahiro Eguchi, Determination of O:4 antigen-antibody affinity level in O:5 antigen positive and negative variants of Salmonella enterica serovar Typhimurium. FEMS Microbiology Letters, 査読有, 364, 2017, fnx062.
doi: 10.1093/femsle/fnx062

[学会発表] (計 5件)

- ① 江口正浩, サルモネラワクチンに向けた取り組み、第 284 回鶏病事例検討会、2018 年
② Marta ELSHEIMER-MATULOVA、柘鏡優美子、白岩和真、西川明芳、小川洋介、下地善弘、江口正浩., サルモネラ O4 抗体による感染防御機構., 第 161 回日本獣医学会学術集会 2018 年
③ Marta ELSHEIMER-MATULOVA, Yumiko MASUKAGAMI, Yohsuke OGAWA, Yoshihiro SHIMOJI. Masahiro EGUCHI., The protective capacity of anti O:4 antigen antibodies against Salmonella infection is influenced by the presence or absence of O:5 antigen., FEBS2018., 2018 年
④ Masahiro EGUCHI Marta ELSHEIMER-MATULOVA, Yumiko MASUKAGAMI, Kazumasa SHIRAIWA, Sayaka NISHIKAWA, Yohsuke OGAWA, Yoshihiro Shimoji. Difference in O4 antibody protection against O5 antigen positive and negative of Salmonella., 第 92 回日本細菌学会総会 2018 年
⑤ Masahiro EGUCHI, Marta Elsheimer-Matulova, Swarmistha Aribam, Yohsuke Ogawa, Yoshihiro Shimoji. IgG and CD8 T cells are essential for protective immunity against Salmonella infection., IUMS2017, 2017.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小川 洋介

ローマ字氏名：Ogawa Yohsuke

所属研究機関名：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

部局名：動物衛生研究部門・細菌・寄生虫研究領域

職名：主任研究員

研究者番号 (8 桁)：10455305