

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06422

研究課題名（和文）サルモネラ分泌系タンパク質を利用した新規のサルモネラ検出法の開発

研究課題名（英文）Development of Salmonella detection method using a secreted Salmonella protein.

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・グループ長補佐

研究者番号：00312215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：サルモネラ汚染を評価する対策として抗体検査が利用されているが、既存の抗体検査では、不活化ワクチンを接種した個体と感染個体との区別がつかなくなるといった科学的な難点が生じてしまう。本研究は、不活化ワクチンを接種した個体と感染した個体を判別できるエライザの開発を目的とする。申請期間内にエライザに利用する抗原の探索を行なった。また、探索した抗原の検証をニワトリ感染モデルにおいて実施した。サルモネラタンパク質SsaKおよびBamAを固相化抗原としエライザを実施したところ、マウスおよびニワトリにおいて、不活化ワクチンを接種した個体と感染個体を区別できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルモネラ症が発症した場合の対応は、発症頭数、農場の規模などを考慮しながら、治療あるいは淘汰を実施する。臨床症状が治まった後も、家畜、環境中から菌が検出されなくなるまで、家畜の血清抗体検査、菌の保菌状況などを検査する必要がある。治療は、抗菌剤、生菌剤を使用するほか、場合によってはワクチンを投与する。ワクチン投与は、感染拡大を防ぐ最善の防止策であるが、その後の抗体測定による検査において、感染している個体とワクチン投与した個体の区別が難しくなる。本研究で明らかにした、固相化抗原は感染している個体とワクチン投与した個体の区別が可能であり、新たなエライザ法として利用できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to identify antigens that can discriminate between vaccinated and infected livestock/poultry against Salmonella, and to contribute to the development of new antibody test. Within the application period, we searched for target antigens that can be used for the ELISA to discriminate between inactivated vaccinated individuals and infected individuals. Furthermore, it was verified using chickens for which inactivated vaccines are used in Japan. ELISA was performed using Salmonella SsaK and BamA as a coating antigen to develop a SsaK-based or BamA-based ELISA for detecting Salmonella infection. There are clarified that the use of SsaK and BamA as antigens in mice and chickens can distinguish infected individuals from those vaccinated with inactivated vaccines.

研究分野：感染免疫学

キーワード：サルモネラ エライザ 抗体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

サルモネラ症は、ヒトおよび家畜・家きんの人獣共通感染症であり、先進国、開発途上国を問わず発生している。国内の家畜・家きんのサルモネラ症対策は、予防対策・抑制対策・汚染評価であり、行政機関が農場に対して取り組みを働きかけている。サルモネラ症(家畜・家きん)および家きんサルモネラ感染症は、家畜伝染病予防法に基づく、法定伝染病および届出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外の家畜・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。また、サルモネラ症が発生した農場では、菌の清浄化に難渋する場合がある。菌の清浄化に向けた取り組みとして、宿主からの菌の分離培養や血清中の抗体測定によるモニタリングが実施されている。血清中の抗体を定期的に測定することで、感染時期を推定することができるため、適切な感染対策措置を講じることが可能となる。一方、農場において、サルモネラ症が発生した場合、感染拡大を防ぐ目的として、ワクチンを投与する場合がある。現在、国内で牛および鶏に使用されているサルモネラワクチンは、菌体をホルマリン処理により不活化(死菌)したものである。

サルモネラ症が発症した場合の対応は、発症頭数、農場の規模などを考慮しながら、治療あるいは淘汰を実施する。臨床症状が治まった後も、家畜、環境中から菌が検出されなくなるまで、家畜の血清抗体検査、菌の保菌状況などを検査する必要がある。治療は、抗菌剤、生菌剤を使用するほか、場合によってはワクチンを投与する。ワクチン投与は、感染拡大を防ぐ最善の防止策であるが、その後の抗体測定による検査において、感染している個体とワクチン投与した個体の区別が難しくなる。近年のワクチンは、ワクチン接種動物と感染動物の区別する DIVA (differentiating infected from vaccinated animals) 理念に基づき開発されているが、サルモネラの不活化ワクチンは DIVA 理念が提唱される以前に開発されたものである。こうした事例に対して、DIVA 理念に基づく対策の推進方策は見通しが立っておらず、新たな戦略を講じる必要があった。我々は、DIVA 理念に基づいた抗体検査に用いる新規の抗原として、サルモネラが宿主に感染した際に産生されるタンパク質に着目した。宿主に感染したサルモネラは、マクロファージ内に侵入あるいは貪食し、マクロファージ内で生存・増殖する。これまでに、マクロファージ内で生存・増殖をするために必要なサルモネラの様々な因子(タンパク質)が報告されている。我々は、マクロファージ内で生存・増殖するために必要なタンパク質に着目し、こうしたタンパク質が DIVA 理念に基づいた抗体検査の抗原として利用できるかどうかを検証した。

### 2. 研究の目的

本研究は、ワクチンを接種した家畜・家きんと感染した家畜・家きんを判別可能にする抗原を同定し、新規の抗体検査法の開発に寄与させることを目的とする。申請期間内にエライザ法に利用可能な不活化ワクチン接種個体と感染個体を識別できる標的抗原を探索した。さらに、国内で不活化ワクチンが利用されているニワトリを用いて、探索した標的抗原が DIVA 理念に基づいた抗体検査の抗原として利用できるかどうかを検証した。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. エライザの固相化に用いる抗原の精製

サルモネラタンパク質を大腸菌にてクローニングし、ニッケルカラムを用いて溶出した。対照抗原は、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)由来 Lipopolysaccharide (LPS)を使用した。LPS は、*S. Typhimurium* を LB 培地で培養後に菌を回収し、100 度で 10 分煮沸滅菌し、その後 LPS 抽出キットにて精製した。

#### 3-2. 血清サンプル

死菌(不活化ワクチン)免疫と生菌(感染)を投与した 6 週令の BALB/c マウス(メス)および生後 7 日目の白色レグホンの血清を使用した。死菌(不活化ワクチン)と生菌(感染)は *S. Typhimurium* を  $5 \times 10^5$  CFU/0.2 ml PBS にて調整した。死菌の調整は 100、15 分間煮沸し *S. Typhimurium* を死滅させた。死菌免疫と生菌感染は、初回免疫/感染の後、2 週間後に再び免疫および感染を行った。血清サンプルは、2 度目の免疫/感染からおよそ 2 週間後に採取した血液から分離した。対照血清は非感染の個体の血清を使用した。

#### 3-3. エライザ法

3-1 で調整した固相化抗原をそれぞれ 5  $\mu$ g/ml に調整し 50  $\mu$ l/well にて 96 ウェルエライザプレートに 37、1 時間反応させ抗原を固相化した。次に、感染血清または死菌免疫血清を 50  $\mu$ l/well にて 37、1 時間反応後、horseradish peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体で 37、1 時間反応させた。その後、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine 発色基質にて発色させ、1M  $H_3PO_4$  にて反応を停止させた後に吸光プレートリーダー(450 nm)にて定量した。なお、血清は 100 倍、200 倍、400 倍希釈した。HRP 標識 2 次抗体は、マウスは goat anti mouse IgG、ニワトリは goat anti chicken IgY を使用した。

#### 4. 研究成果

##### 4-1. 不活化ワクチンを接種した個体と感染個体との区別ができる新規エライザ用固相化タンパク質の探索

*S. Typhimurium* のタンパク質、SsaK, SseG, SseF, ProQ, PefC, BamA を固相化用抗原としたエライザをマウス血清を用いて実施した。図1に示すとおり、抗原として用いたすべてのタンパク質において、感染血清中の抗体価が死菌免疫（不活化ワクチン）血清中の抗体価に比べ高くなることを明らかにした。一方で、LPS を抗原としたエライザは感染血清と死菌免疫（不活化ワクチン）血清の間で抗体価の差は認められなかった。また、BamA および SsaK は感染後2週間で抗体(IgG)が検出可能であった。一方で、LPS に対する抗体は感染後2週間では検出できなかった。以上の結果から BamA および SsaK を用いたエライザは LPS を抗原としたエライザよりも検出可能な時期が早いことを明らかにした。

次に、ワクチン接種後に感染した個体の血清について判別可能かどうか検証したところ BamA において、感染初期に限り優位に判別できることが確認できた。

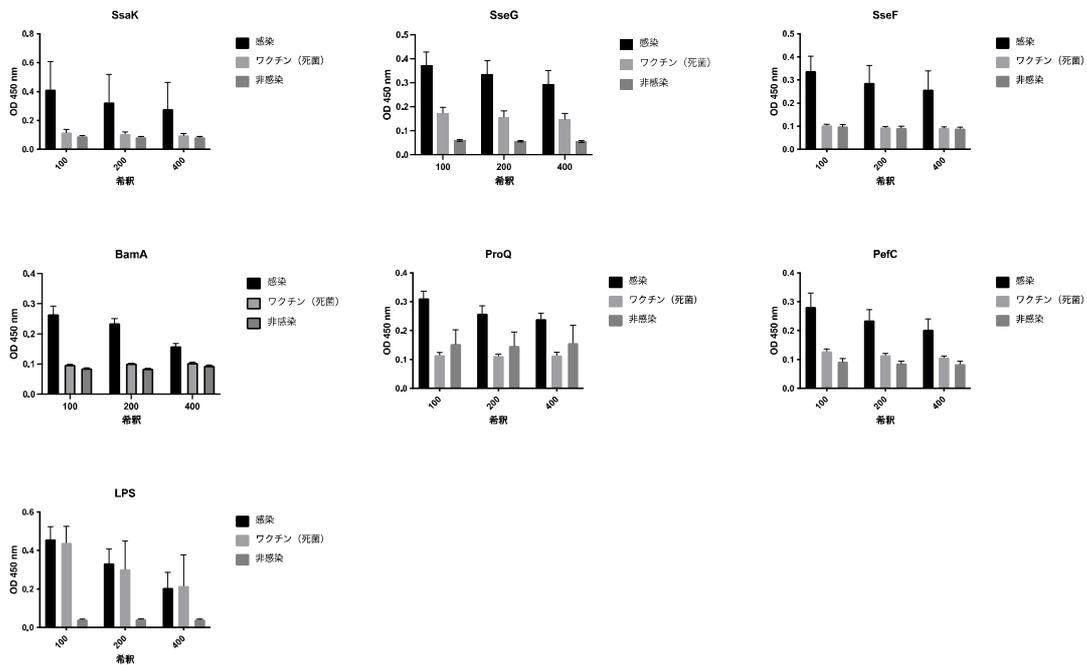


図1 サルモネラタンパク質を抗原とした *S. Typhimurium* 感染マウス血清およびワクチン(死菌)免疫マウス血清を用いた抗サルモネラ抗体検出のためのエライザ

##### 4-2. ニワトリ血清による新規の固相化タンパク質を用いたエライザ

ニワトリ血清を用いて、4-1と同様の実験を実施した。SsaK および BamA を固相化用抗原としたエライザは、感染血清中の抗体価が死菌免疫（不活化ワクチン）血清中の抗体価に比べて高くなることを明らかにした（図2）。一方で、LPS を固相化用抗原としたエライザは、感染血清と死菌免疫（不活化ワクチン）血清の間で抗体価の差は認められなかった。また、マウスモデル（4-1）で探索した SseG, SseF, ProQ, PefC についてはニワトリ血清では感染個体と不活化ワクチン接種個体の区別がつかなかった。

以上の結果からサルモネラタンパク質 SsaK および BamA を抗原として用いることで、不活化ワクチンを接種した個体と感染個体を区別できることを明らかにした。

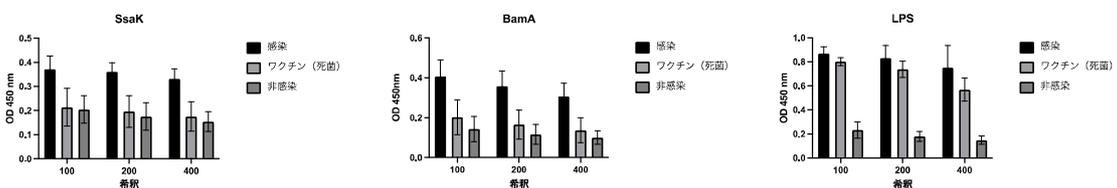


図2 SsaK および BamA を抗原とした *S. Typhimurium* 感染マウス血清およびワクチン(死菌)免疫ニワトリ血清を用いた抗サルモネラ抗体検出のためのエライザ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Swarmistha Devi Aribam, Momoko Nakayama, Satoki Ichimura, Kyori Tokuyama, Yuka Hara, Yohsuke Ogawa, Yoshihiro Shimoji, Masahiro Eguchi	4. 巻 209
2. 論文標題 Differentiation of Salmonella vaccinated and infected animals by serological detection of antibody to T3SS effector SsaK in an indirect ELISA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of microbiological methods	6. 最初と最後の頁 106729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2023.106729	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江口正浩、中山ももこ、Swarmistha Devi Aribam、小川洋介、下地善弘
2. 発表標題 感染個体と不活化ワクチン接種個体を識別できる新規サルモネラ症血清学的検査法
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 SsaKタンパク質を利用したサルモネラ属菌感染の検出方法	発明者 江口正浩、他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-172591	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 BamAタンパク質を利用したサルモネラ属菌感染の検出方法	発明者 江口正浩、他	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-172590	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------