

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660254

研究課題名(和文)サルモネラ感染を防御するF(ab)2の新たな機能解析

研究課題名(英文)Effects of anti-Salmonella monoclonal antibody on Salmonella Typhimurium

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 細菌・寄生虫研究領域・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) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：サルモネラ感染に対する感染防御は細胞性免疫が優位であると考えられているが、我々を始め複数の研究グループが、液性免疫応答(抗サルモネラ抗体)も感染防御に関与している事を報告している。しかしながら、サルモネラ感染防御における液性免疫応答の機能は不明な点が多い。これまでに、我々はサルモネラ感染防御をマウスに付与できるモノクローナル抗体414の作製に成功した。本研究は、抗体を介した菌の防御機構の解明を目指す。サルモネラに414抗体が結合すると菌体膜の形状が変化した。また、サルモネラに414抗体が結合すると死菌が増加した。その際、アミノ酸代謝系、LPS合成関連遺伝子が関係していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Salmonella enterica subsp. enterica is one of the most common causative agents of gastroenteritis and systemic infections worldwide. It has been shown that both T and B cells might contribute to protective immunity against this pathogen. While CD4 T cell response is generally recognized as crucial, the role of B cells and antibodies in immunity against Salmonella is less clear and often controversial. Therefore we set off to study interactions between Salmonella Typhimurium and a monoclonal antibody mAb414 raised against one of its major antigens, lipopolysaccharide (LPS). The potential of the antibody against Salmonella LPS to protect against the infection is mainly attributed to signaling to leukocytes. Nevertheless, our in vitro experiments suggest that anti-LPS antibody might itself trigger changes on the bacterial surface as well as in metabolic pathways. Further studies will have to clarify, whether these effects are caused by a mere binding of antibody to LPS or by agglutination.

研究分野：細菌学

キーワード：サルモネラ モノクローナル抗体 液性免疫応答

1. 研究開始当初の背景

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く、届出伝染病及び法定伝染病にそれぞれ指定されており、患畜の対処が義務付けられている。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く、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いる。

サルモネラ感染に対する感染防御は細胞性免疫が優位であると考えられているが、我々を始め複数の研究グループがマウスモデルにおいて、液性免疫応答(抗サルモネラ抗体)も感染防御に関与していることを報告している。我々はマウスを用いた腹腔感染モデルにおいて、サルモネラに対し感染防御を誘導するモノクローナル抗体の作製に国内外の研究機関に先駆けて成功した。細菌感染における抗体の役割として、オプソニン化による宿主細胞への貪食促進、補体の活性化、毒素の中和などがある。サルモネラ感染に対する宿主免疫応答は細胞性免疫および液性免疫の両方が惹起されるが、感染防御には細胞性免疫が優位であることが報告されている。一方で、感染防御において、液性免疫応答(抗サルモネラ抗体)の重要性も報告されている。しかしながら、サルモネラ感染防御における液性免疫応答の作用機序は、未だ多くの議論を必要としており、未解明な部分が多い。

2. 研究の目的

サルモネラ感染防御に関与するモノクローナル抗体(lipopolysaccharideを認識)を産生するハイブリドーマの樹立に国内外の研究機関に先駆けて成功した。本研究は抗体の抗原結合部位を介した感染防御機構の解明を目的とし、研究期間内において、サルモネラ感染を防御する機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 抗体が結合した際の菌の影響

主な材料：サルモネラ感染防御に関与するモノクローナル抗体 414, *Salmonella* Typhimurium.

方法：様々な濃度の抗体で菌を処理し、その後、菌を培養し濁度を経時的に測定する。また、LB-Plate に菌を播種し菌数を測定する。

(2) (1) で得られた菌数変化を生化学的

に検討。

主な材料：サルモネラ感染防御に関与するモノクローナル抗体 414, *Salmonella* Typhimurium.

主な試薬：Microbial Viability Assay kit-WST (同仁化学)

方法：(1) で使用した抗体と菌との反応時間、抗体濃度を用いて、生菌、死菌を Microbial Viability Assay kit-WST で解析する。

(3) 抗体反応後の菌の形態観察

主な材料：サルモネラ感染防御に関与するモノクローナル抗体 414, *Salmonella* Typhimurium.

方法：(1) で得られた抗体濃度及び時間で抗体と菌を反応させ、様々な濃度の半流動培地にて培養し、菌の走性、コロニーの形状変化の有無を検討する。

(4) 電子顕微鏡による抗体処理後の菌体観察

主な材料：サルモネラ感染防御に関与するモノクローナル抗体 414, *Salmonella* Typhimurium.

方法：(1) で得られた抗体濃度及び時間で抗体と菌を反応させ、超薄切標本を作製し、菌体表層の形状変化を電子顕微鏡にて経時的に観察する。

(5) 抗体反応後の菌の遺伝学的解析

主な材料：サルモネラ感染防御に関与するモノクローナル抗体 414, *Salmonella* Typhimurium.

方法：(1) で得られた抗体濃度及び時間で抗体と菌を反応させ、DNA アレイを実施し、その際を mRNA の網羅的解析をする

4. 研究成果

(1) 抗体が結合した際の菌の影響

作製したサルモネラ感染防御に関与する抗体を加えた LB 培地と *Salmonella* Typhimurium を 37 で培養し経時的に OD 600 nm で培養液を測定したところ、抗体を加えた群の OD 値が低下することが明らかとなった(図.1)。また、LB-Plate で播種した菌数も抗体で処理すると菌が低下することを明らかにした。

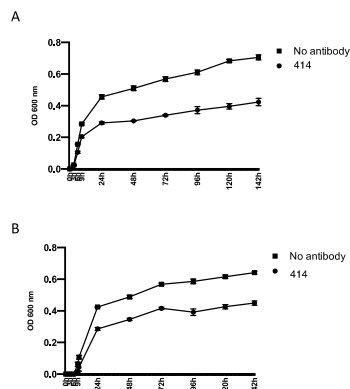


図.1. 抗体で処理した際の菌の増殖。抗サルモネラモノクローナル抗体 414 10 ug と *Salmonella* Typhimurium 10⁵ CFU(A) および 10 CFU(B)を 37 °C, 30 分間処理し、その後 LB 培地で培養した。経時的に OD 値を測定した。

(2) Microbial Viability Assay kit-WST による生菌数の測定

Salmonella Typhimurium を各種濃度の抗サルモネラモノクローナル抗体 414 で処理し生菌数を WST-1 で測定すると抗体で処理した群の生存率が低下した(図. 2)。以上の結果から抗体に菌が結合すると菌が死滅することが示唆された。

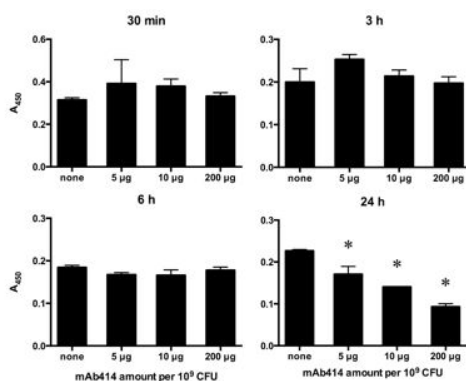


図. 2. 抗サルモネラモノクローナル抗体 414 で処理したサルモネラの生菌数

(3) 抗体反応後の菌の形態観察

抗サルモネラモノクローナル抗体 414 を結合させたサルモネラを電子顕微鏡にて観察した。抗サルモネラモノクローナル抗体 414 を結合させたサルモネラは、無処置のサルモネラに比べて菌体膜の形状が変化した(図. 3)。

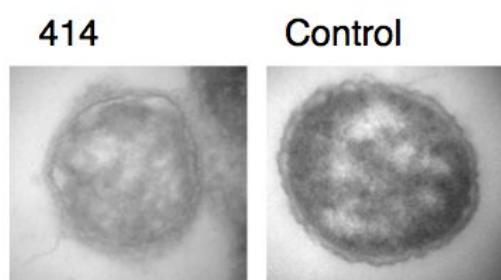
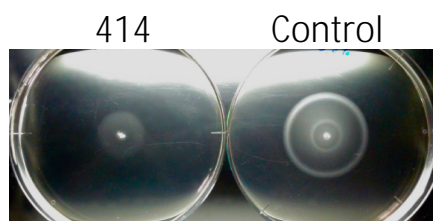


図. 3. 抗サルモネラモノクローナル抗体 414



で結合させたサルモネラの電子顕微鏡写真

図. 4. 0.3%LB 寒天培地によるサルモネラの

走性

また、抗体と菌が結合すると菌の走性が無処置に比べ弱くなることが明らかとなった(図. 4)。

(4) 抗体反応後のサルモネラの遺伝学的解析

各種濃度の抗サルモネラモノクローナル抗体 414 とサルモネラを反応させ、mRNA を網羅的に解析したところ、LPS 合成に關与する遺伝子及びアミノ酸合成に關与する遺伝子が変化することを明らかにした(図. 5)

gene	mAb414 per mL		
	5 µg	10 µg	200 µg
<i>cysP</i>	14.6*	3.6	7.6
<i>cysU</i>	6.6	3.5	4.4
<i>cysJ</i>	8.4	3.0	4.4
<i>fepG</i>	2.7	3.7	3.9
<i>sbp</i>	8.7		3.9
<i>yjiI</i>	-2.3	-2.5	-2.3
0.5 h STM0723	-3.8	-3.5	-4.1
<i>dmsA</i>	-2.3	-2.2	
<i>dmsB</i>	-2.7	-2.4	
<i>bioD</i>	-2.2	-2.2	
STM1497	-2.4	-2.4	
<i>ompW</i>	-2.2	-3.1	
<i>aceK</i>	2.3	2.5	3.1
<i>nadD</i>	2.3	2.1	3.0
<i>iadA</i>	2.6	2.2	
<i>lybG</i>	2.3	2.0	
6 h <i>bolD</i>	2.3		2.2
<i>bisG</i>	2.3		2.3
<i>yfbE (arnB)</i>		2.1	3.6
<i>rfaL</i>		2.0	2.6

図. 5. 抗サルモネラモノクローナル抗体 414 反応後のサルモネラ mRNA の発現

(5) 総括

サルモネラに抗サルモネラモノクローナル抗体 414 が結合すると菌体膜の形状が変化した。また、サルモネラに抗サルモネラモノクローナル抗体 414 が結合すると菌の生菌数が低下した。その際、アミノ酸代謝系、LPS 合成関連遺伝子が関係していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1, Monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies to O:4 Salmonella in the sera of livestock and poultry.

Swarmistha Devi Aribam, Yohsuke Ogawa, Hidenori Matsui, Jiro Hirota, Masashi Okamura, Masato Akiba, Yoshihiro Shimoji, Masahiro Eguchi.

Journal of Microbiological Methods.,

108,1-3., 2015. (査読有)

〔学会発表〕(計 3件)

1, サルモネラ経口感染に対する防御効果の検討

江口正浩、Marta Elsheimer-Matulova、Swarmistha Devi Aribam、白岩和真、小川洋介、下地善弘。

第158回日本獣医学会学術集会

2015年9月7日～2015年9月9日、北里大学獣医学部(青森県青森市)

2, サルモネラ経口感染に対する液性免疫応答の役割

江口正浩、Swarmistha Devi Aribam、小川洋介、下地善弘。

第88回日本細菌学会総会

2015年3月26日～2015年3月28日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

3, サルモネラ感染防御におけるLPSの役割、江口正浩、第23回内毒素・LPS研究会(招待講演)

2014年6月28日、順天堂大学(東京都文京区)

〔その他〕

研修会

1, 抗サルモネラモノクローナル抗体を用いた免疫応答の解析及びサルモネラ検出法の開発

江口正浩、農林水産省家畜衛生研修会

平成27年11月12日

2, 抗サルモネラモノクローナル抗体を用いたサルモネラ検出法の検討

江口正浩、馬防疫検討会

平成27年10月23日

ホームページ

1, サルモネラ04血清群に対する抗体を検出する競合ELISA法の開発

江口正浩、小川洋介、下地善弘

技術の窓、No.2117. 日本政策金融金庫、平成28年2月25日

<https://www.jfc.go.jp/n/finance/keiei/pdf/2117.pdf#search='技術の窓+江口正浩'>

6. 研究組織

(1) 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 細菌・寄生虫研究領域・上級研究員

研究者番号：00312215