

氏 名 (本籍)	朝 倉 宏 (兵庫県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第134号
学 位 授 与 年 月 日	平成15年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学 位 論 文 題 目	Studies on the Survival Response Mechanisms of <i>Salmonella</i> to NaCl Stress in Foods (食品中におけるサルモネラの食塩ストレス応答に関する研究)
審 査 委 員	主査 帯広畜産大学 教授 白 幡 敏 一 副査 帯広畜産大学 教授 西 村 昌 数 副査 岩 手 大 学 教 授 品 川 邦 汎 副査 東京農工大学 教 授 本 多 英 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 平 井 克 哉

論 文 の 内 容 の 要 旨

1999年、わが国において、乾燥イカ菓子を原因食品とするサルモネラ・オラニエンブルグ/チェスター (*Salmonella* Oranienburg (以下 SO) / *S. Chester*) の混合感染事例が全国的規模で発生した。本事例は、乾燥食品が集団食中毒の原因となった点で、過去に例をみない、稀有な発生例といえる。乾燥イカ菓子は、高濃度の食塩を含む調味液への漬込みとその後の乾燥工程を経て製造されるため、本事例における原因菌の生存性の保持や病原性機序については不明な点が多い。著者は、通常培養で検出困難な状態にある SO の蘇生法と病原性の評価について検討し、さらに高濃度食塩水中での本菌の生存性に関する因子の分子遺伝学的な解析を試みた。

第1章では、原因食品の製造工程を再現し、製造工程 (ストレス環境下) における、患者および食品由来 SO の生存性について、比較・検討した。原因食品および患者から分離された SO 株は、同一のパルスフィールドゲル電気泳動パターンを示した。しかしながら、乾燥工程後の食品由来株は、患者由来株に比べて、有意に高い生存性 (回収率) を示し、この生存性の差異は、食塩暴露に対する抵抗性の差異に起因することが明らかにされた。また、食品および患者由来株のマウスに対する病原性に差異は認められないが、食塩耐性を示す食品由来株は、マウス体内通過に

より、高頻度に食塩感受性へと変化した。一方、高濃度食塩水への暴露により、直接培養ではコロニーを形成しない状態に変化した患者由来株は、蛍光染色により依然として生存活性を有することが示され、適切な増菌培養により蘇生し、培養可能となった。従って、高濃度食塩水への暴露後にみられる SO のコロニー形成能の喪失は、生きているが直接培養できない、いわゆる VNC (viable but non-culturable) 状態に移行したことによると推察された。

第 2 章では、VNC 状態にある SO の蘇生・回収法として、モルヒネ投与マウスの有用性について検討した。モルヒネを投与された BALB/c マウスに、VNC 状態の SO を腹腔内接種したところ、感染後 3 日以内に全例が死亡し、肝臓および脾臓から多数の SO が分離された。他方、食品あるいは患者由来の SO を接種されたモルヒネ非投与のマウスは全てが生残した。従って、モルヒネ投与マウスは、VNC 状態の SO の蘇生を誘起する優れた方法であり、VNC 状態にある他の病原細菌の蘇生や病原性を検討するうえでも有効な手段となりうるものと思われる。

第 3 章では、食品および患者由来 SO の食塩感受性の差異について、分子遺伝学的に検討した。Transposon mutagenesis により、食塩耐性に関連する 7 種の遺伝子群が同定された。しかしながら、相補試験では患者由来株に食塩耐性を付与できず、これらの遺伝子は、2 株間の表現形質の変化に単独では関与しないものと考えられた。次に、RNA polymerase の σ subunit の 1 種で、様々なストレスへの応答因子として知られる RpoS について、食塩暴露に対する食品由来株および患者由来株の応答性を検討したところ、患者由来株で、翻訳段階において、優位な応答が認められた。また、RpoS の翻訳過程を抑制する H-NS (Hisotn-like protein) について、食塩暴露時の発現を Western blot により検討したところ、食品由来株に有意な応答が認められた。さらに、食品および患者由来 SO に plasmid DNA を導入し、その構造変化を観察したところ、食塩暴露に際し、食品由来株の DNA 分子は超螺旋構造を示し、患者由来株ではリラックスした状態を呈していた。hns 遺伝子の相補により、患者由来株の DNA は超螺旋構造を呈し、7% 食塩水中での生菌数は約 100 倍に上昇した。これらの知見から、食品由来 SO は、宿主体内を通過する際に生じる DNA 構造の変化に基づき、食塩感受性へと変化したものと考えられる。

本研究の結果から、*Salmonella* Oranienburg の環境適応機構の一端が分子遺伝学的に明らかにされた。さらに、VNC 状態にある本菌の蘇生・回収の手段や病原性の評価法としてのモルヒネ投与マウスの有用性も明らかにされた。これらの知見は、細菌性食中毒の検査に際し、既存の培養法に固執しない多様な検査法の重要性を提起するとともに、食中毒の疫学調査、診断、予防などに新たな基礎資料を提供した。

審 査 結 果 の 要 旨

1999 年、わが国において、乾燥イカ菓子を原因食品とするサルモネラ・オラニエンブルク／チェスター (*Salmonella* Oranienburg (SO) / *S. Chester*) の混合感染事例が広く認められた。原因食品のイカ菓子は、高濃度の食塩を含む調味液中での漬込みと乾燥工程を経て製造されており、サルモネラにとってストレスと思われる環境下での本菌の生存性や病原性に関し、不明な点が多い。本研究は、サルモネラ・オラニエンブルクの食塩ストレス応答機序を実験的に解析する目的で、高濃度食塩水中での本菌の生存性維持に関わる因子の遺伝学的解析ならびに検出困難な状態からの蘇生と病原性の評価について検討したものである。

第 1 章では、イカ菓子の製造工程における SO の生存性について検討し、患者由来株と食品由来株は食塩水中での生存性が異なることを明らかにした。すなわち、原因食品および患者由来 SO は同一の PFGE パターンを示し、遺伝学的に同一クローンから派生したものであるにもかかわらず、食塩水中で、食品由来株は長時間生存したのに対し、患者由来株は急速にコロニー形成を認めない状態へと移行した。また、食品および患者由来株のマウスに対する病原性に差異は認められないが、食品由来株は、マウス体内通過により、高頻度に食塩感受性へと変化した。しかし、7%食塩水暴露によってコロニーを形成しえない状態へと移行した患者由来株は、蛍光染色により依然として生存活性を保有していること、さらに適切な増菌培養により蘇生可能なことが確認された。これらの知見は、患者由来株は高濃度食塩水への暴露により、生きているが培養できない、いわゆる VNC (viable but non-culturable) 状態に急速に移行することを明らかにした。

第 2 章では、VNC 状態にある SO の蘇生・回収法として、モルヒネ投与マウスの有用性について検討した。SO は、*S. Enteritidis* と異なり、マウスに病原性を示さないため、マウスは SO の病原性評価のモデル系として不適当と思われる。そのため、免疫系に障害を与えることが知られているモルヒネを投与されたマウスを用いて、VNC 菌の病原性評価と蘇生・回収を試みた。モルヒネ投与マウスに VNC 状態の SO を腹腔内接種すると、感染後 3 日以内にすべてのマウスは死亡し、肝臓および脾臓より多数の SO が検出された。従って、モルヒネ投与マウスは、VNC 状態にある SO の蘇生と回収あるいは病原性の評価に優れた動物モデルであると思われる。

第 3 章では、患者および原因食品由来 SO の食塩抵抗性の差異を遺伝学的に検討した。RNA polymerase σ subunit の一種で、静止期に発現し、浸透圧変化や飢餓状態などのストレス時に誘導される RpoS の発現は、食塩存在下で、食品由来株に比べ、患者由来株でより顕著であることが示された。しかし、転写活性に有意差がないため、RpoS 応答の差異は、翻訳段階において生じるものと考えられた。また、DNA 結合蛋白である HNS と食塩抵抗性株の表現形質変化との関連性について検討し、食品由来株では、患者由来株に比べ、有意に HSN を発現していることを明らかにした。HNS の DNA へ

の結合は、DNA 分子に超螺旋構造を引き起こすことから、プラスミド pUC118 を食品および患者由来株に導入し、プラスミド DNA の構造変化について観察した。その結果、食塩暴露に際して、食品由来株では超螺旋構造を、患者由来株ではリラックス状態を呈することを明らかにした。さらに、*hns* 遺伝子の相補により、患者由来株は食塩感受性を変化させ、7% 食塩水中での生存数は約 100 倍に増加し、DNA 構造も食品由来株と同様の超螺旋構造へと変化した。以上の結果から、食品由来株は、生体内通過の際に生じる DNA 構造の変化に基づいて、食塩感受性を増大させるものと推論された。

以上のように、申請者は *Salmonella* Oranienburg の食塩ストレス応答機序について解析し、VNC 状態への移行との関連性を含めて、本菌の環境適応機構の一端を分子遺伝学的に明らかにした。また、VNC 状態にあるサルモネラの生体内および試験管内での蘇生法を検討し、VNC 菌の蘇生・回収手段としてのモルヒネ投与マウスの有用性を明らかにしている。これらの成績は、細菌性食中毒の検査に際し、既存の培養法に加えて、新たな検査法の併用の重要性を提起するとともに、細菌性食中毒の迅速診断の確立、疫学調査、予防・治療法などに基礎資料を提供している。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state
著 者 名 : ASAKURA, Hiroshi MAKINO, Souichi TAKAGI, Tsuyoshi KURI, Asumi KURAZONO, Takayuki WATARAI, Masahisa and SHIRAHATA, Toshikazu
学術雑誌名 : FEMS Microbiology Letters に発表
巻・号・頁・発行年 : 212 (1) : 87~93, 2002
- 2) 題 目 : Viable but nonculturable *Salmonella* species recovery and systemic infection in morphine-treated mice
著 者 名 : ASAKURA, Hiroshi WATARAI, Masahisa SHIRAHATA, Toshikazu and MAKINO, Souichi
学術雑誌名 : Journal of Infectious Disease に発表
巻・号・頁・発行年 : 186 (10) : 1526~1529, 2002

既発表学術論文

- 1) 題 目 : 帯広市における腸管出血性大腸菌 O157 集団感染
一分離菌株の諸性状—
著 者 名 : 牧野壮一, 朝倉 宏, 白幡敏一, 池田徹也, 武士甲一, 長野秀樹,
矢野昭起, 久保田 耐, 藤井暢弘
学術雑誌名 : 感染症学雑誌に発表
巻・号・頁・発行年 : 71 (11) : 1131~1136, 1997
- 2) 題 目 : 帯広市における腸管出血性大腸菌 O157 集団感染
—薬剤感受性およびプラスミドプロファイルについて—
著 者 名 : 牧野壮一, 朝倉 宏, 白幡敏一, 池田徹也, 武士甲一,
久保田 耐, 藤井暢弘
学術雑誌名 : 感染症学雑誌に発表
巻・号・頁・発行年 : 72 (2) : 89~96, 1998 年
- 3) 題 目 : Detection and long-term existence of Shiga toxin (Stx)-
producing *Escherichia coli* in sheep
著 者 名 : ASAKURA, Hiroshi MAKINO, Souichi
SHIRAHATA, Toshikazu TSUKAMOTO, Teizo
KURAZONO, Hisao IKEDA, Tetsuya and TAKESHI, Koichi
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology に発表
巻・号・頁・発行年 : 42 (10) : 683~688, 1998
- 4) 題 目 : Detection and genetical characterization of Shiga toxin-
producing *Escherichia coli* from wild deer
著 者 名 : ASAKURA, Hiroshi MAKINO, Souichi
SHIRAHATA, Toshikazu TSUKAMOTO, Teizo
KURAZONO, Hisao IKEDA, Tetsuya and TAKESHI, Koichi
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology に発表
巻・号・頁・発行年 : 42 (12) : 815~822, 1998
- 5) 題 目 : Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from *Musca domestica*
(Diptera: Muscidae) at a cattle farm in Japan
著 者 名 : IWASA, Mitsuhiro MAKINO, Souichi ASAKURA, Hiroshi
KOBORI, Hideaki and MORIMOTO, Yo
学術雑誌名 : Journal of Medical Entomology に発表
巻・号・頁・発行年 : 36 (1) : 108~112, 1999

- 6) 題 目 : Molecular epidemiological study of a mass outbreak caused by enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H45
著 者 名 : MAKINO, Souichi ASAKURA, Hiroshi SHIRAHATA, Toshikazu IKEDA, Tetsuya TAKESHI, Koichi ARAI, Keisuke NAGASAWA, Motohiro ABE, Tamotsu and SADAMOTO, Terukazu
学術雑誌名 : Microbiology and Immunology に発表
巻・号・頁・発行年 : 43 (4) : 381~384, 1999
- 7) 題 目 : Molecular epidemiological study on tetracycline resistance R plasmids in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7
著 者 名 : MAKINO, Souichi ASAKURA, Hiroshi OBAYASHI, Toshihiro SHIRAHATA, Toshikazu IKEDA, Tetsuya and TAKASHI, Koichi
学術雑誌名 : Epidemiology and Infection に発表
巻・号・頁・発行年 : 123 (1) : 25~30, 1999
- 8) 題 目 : Surface antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae* binds to Gram-positive bacterial cell surfaces
著 者 名 : MAKINO, Souichi YAMAMOTO, Kenshu ASAKURA, Hiroshi and SHIRAHATA, Toshikazu
学術雑誌名 : FEMS Microbiology Letters に発表
巻・号・頁・発行年 : 186 (2) : 313~317, 2000
- 9) 題 目 : Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls
著 者 名 : MAKINO, Souichi KOBORI, Hideaki ASAKURA, Hiroshi WATARAI, Masahisa SHIRAHATA, Toshikazu IKEDA, Tetsuya TAKESHI, Koichi and TSUKAMOTO, Teizo
学術雑誌名 : Epidemiology and Infection に発表
巻・号・頁・発行年 : 125 (1) : 55~61, 2000
- 10) 題 目 : Does enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe?
著 者 名 : MAKINO, Souichi KII, Tsutomu, ASAKURA, Hiroshi SHIRAHATA, Toshikazu IKEDA, Tetsuya TAKESHI, Koichi and ITOH, Kikuji
学術雑誌名 : Applied and Environmental Microbiology に発表
巻・号・頁・発行年 : 66 (12) : 5536~5539, 2000 年

- 11) 題 目 : Phylogenetic diversity and similarity of active sites of Shiga toxin (stx) in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from humans and animals
著 者 名 : ASAKURA, Hiroshi MAKINO, Souichi KOBORI, Hideaki WATRAI, Masahisa SHIRAHATA, Toshikazu IKEDA, Tetsuya and TAKESHI, Koichi
学術雑誌名 : Epidemiology and Infection に発表
巻・号・頁・発行年 : 127 (1) : 27~36, 2001
- 12) 題 目 : *Salmonella enteritidis* FliC (flagella filament protein) induces human β -defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells
著 者 名 : OGUSHI, Kenichi WADA, Akihiro NIIDOME, Takuro MORI, Naoki OISHI, Kazunori NAGATAKE, Tsuyoshi TAKAHASHI, Akira ASAKURA, Hiroshi MAKINO, Souichi HOJO, Hironobu NAKAHARA, Yoshiaki OHSAKI, Mio HATAKEYAMA, Tomomitsu AOYAGI, Haruhiko KURAZONO, Hisao Moss, Joel and HIRAYAMA, Toshiya
学術雑誌名 : Journal of Biological Chemistry に発表
巻・号・頁・発行年 : 27632 : 30521~30526, 2001
- 13) 題 目 : Effects of rearing conditions on the colonization of *Salmonella enteritidis* in the cecum of chicks
著 者 名 : ASAKUR, Hiroshi TAJIMA, Osamu WATARAI, Masahisa SHIRAHATA, Toshikazu KURAZONO, Hisao and MAKINO, Souichi
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medical Science に発表
巻・号・頁・発行年 : 63 (11) : 1221~1224, 2001
- 14) 題 目 : Long-term excretion of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and experimental infection of a sheep with O157
著 者 名 : KIM, Suk ASAKURA, Hiroshi KURI, Asumi WATARAI, Masahisa SHIRAHATA, Toshikazu TAKESHI, Koichi TSUKAMOTO, Teizo and MAKINO, Souichi
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medical Science に発表
巻・号・頁・発行年 : 64 (10) : 927~931, 2002