

称号及び氏名	博士（獣医学）水本 直恵
学位授与の日付	平成18年2月20日
論文名	「 <i>Salmonella</i> Enteritidis food poisoning: Tropism of <i>S. Enteritidis</i> to the avian oviduct and development of screening measures for infected farm flocks」 ( <i>Salmonella</i> Enteritidis 食中毒に関する研究： <i>S. Enteritidis</i> の卵管向性と感染鶏群スクリーニング法の開発)
論文審査委員	主査 馬場 栄一郎 副査 小崎 俊司 副査 山崎 伸二

## 論文要旨

### はじめに

1980年代ヨーロッパを中心に台頭してきた *Salmonella* Enteritidis による食中毒は、1990年代には世界中で発生件数が急増し、ヒトのサルモネラ食中毒における最も優勢な血清型となった。2,500種以上ある血清型のなかでも特に *S. Enteritidis* 食中毒が増加した原因のひとつとして、*S. Enteritidis* 感染鶏および汚染卵の検出が困難なことが挙げられる。*S. Enteritidis* に感染した鶏は明らかな症状を示さないまま経過し、散発的に *S. Enteritidis* 汚染卵を産出する。*S. Enteritidis* 食中毒の原因食材は主に卵あるいは卵製品であることが指摘されているが、*S. Enteritidis* による鶏卵汚染のメカニズムには不明な点が多い。本研究では、年間数千人規模に及ぶ *S. Enteritidis* 食中毒の防遏に資することを目的として以下の試験を実施した。なぜ *S. Enteritidis* が鶏卵汚染において優勢になるのかを解明するために、鶏卵汚染に関わる *S. Enteritidis* のもつ卵管への特異的な親和性を調べた。また一方で、産卵養鶏現場における *S. Enteritidis* 汚染の現状を把握するために、*S. Enteritidis* 感染鶏および感染鶏群の早期発見に有効な方法の確立を目指した。

### 第1章：*Salmonella* Enteritidis の卵管腔部上皮親和性

汚染卵を産出する鶏の生殖器から *S. Enteritidis* が頻繁に分離されることから、*S. Enteritidis* の鶏卵汚染における生殖器感染の関連が強く示唆されている。特にクロアカから卵管への上行感染は、卵殻汚染に結びつく要因の一つと考えられる。本章では、卵管下部とくに卵管腔部上皮への *S. Enteritidis* 接着性を、鶏卵より高頻度に分離される *S. Enteritidis* と、鶏から高頻度に分離されるにもかかわらず鶏卵汚染がほとんど認められない他の血清型との間で比較した。

採卵鶏より分離した卵巣と卵管腔部から、排卵前卵胞と卵管腔部組織エクスプラントを作成し、*S. Enteritidis*または*S. Typhimurium*の菌液  $10^3$ CFU/mlを接種した。4℃または 37℃で 90 分培養後、外卵胞膜、卵管腔部上皮へ接着した菌数を測定した。いずれの培養温度においても、卵管腔部に接着した*S. Enteritidis*がその他の実験群に比べ高い値を示した。

次に、*S. Enteritidis*、*S. Agona*、*S. Infantis*、*S. Hadar*、*S. Heidelberg*、*S. Montevideo*、*S. Typhimurium*各々複数菌株を用いて、上記と同様の方法で作成した卵管腔部組織エクスプラントに菌液  $10^3$ CFU/mlを接種し37℃で90分培養した。ホルマリン固定後凍結切片を作製して、サルモネラの細胞壁外膜を構成するlipopolysaccharide (LPS)に対する免疫染色により、卵管腔部上皮二次絨毛 1 つ当たりの接着、侵入菌数を測定した。卵管腔部上皮細胞への接着・侵入菌数はそのLPS型によりO9 (*S. Enteritidis*)、O4 (*S. Agona*、*S. Typhimurium*、*S. Heidelberg*)、O7 (*S. Montevideo*、*S. Infantis*)およびO8 (*S. Hadar*)の順に高く、また、食中毒患者の糞便由来のサルモネラ株に比較的高い侵入性がみられた。

以上の結果から、*S. Enteritidis* は他の血清型に比べ鶏生殖器のなかでも特に卵管腔部上皮への親和性が高く、その親和性には LPS が関わっていることが明らかとなった。この親和性の順位が汚染卵によるサルモネラ食中毒発生頻度と一致することから、この親和性が *S. Enteritidis* による鶏卵汚染に結びつく重要な因子である可能性が示唆された。

## 第 2 章: 鶏卵管精子貯蔵嚢への *Salmonella Enteritidis* 定着

鳥類の卵管子宮腔移行部 (uterovaginal junction: UVJ) には固有層に管状構造を呈する精子貯蔵嚢 (sperm-storage tubules: SST) が分布し、ここで精子は長期間生存することができる。汚染精子が雌鶏への *S. Enteritidis* 感染を媒介することが報告されていることから、本章では、*S. Enteritidis* の卵管への定着、散発的な汚染卵の産出における SST の役割について検討した。

採卵鶏に*S. Enteritidis*または*S. Typhimurium*菌液  $10^8$ CFU/羽を卵管内に投与し、1 日後および1、2、3 週後に剖検して全生殖器を摘出した。分離したUVJはホルマリン固定後凍結切片を作製して、LPSに対する免疫染色によりUVJ、SST各上皮約 500 $\mu$ m当たりの付着または侵入菌数を測定した。また、卵巣、卵管各部、形成中卵、クロアカスワブ、菌投与後産出された全ての卵からサルモネラの検出を行った。

UVJ および SST ともに上皮に接着・侵入した *S. Enteritidis* は *S. Typhimurium* に比べ高い侵入性を示した。UVJ 上皮に接着・侵入した *S. Enteritidis* は試験期間中ほぼ一定の値を示したのに対し、SST 上皮では約 5 倍に増加した。産出卵、卵管各部からのサルモネラの検出率は、*S. Enteritidis* 投与鶏が *S. Typhimurium* 投与鶏に比べ高い傾向を示したが、クロアカスワブにおいては両群に差は見られなかった。

以上の結果から、*S. Enteritidis* は UVJ および SST 上皮に高い向性を持ち、これらの上皮に侵入したのち少なくとも3週間定着することが明らかとなった。*S. Enteritidis* 投与鶏の汚染卵産出率が非常に高いことから、SST への定着と卵管腔への放出により *S. Enteritidis* が長期間にわたり散発的に鶏卵汚染を引き起こす可能性が示唆された。

### 第3章: *Salmonella Enteritidis* 特異抗原を用いたスクリーニング法の開発

*S. Enteritidis* 食中毒の発生を未然に防ぐには、*S. Enteritidis* 感染鶏群の早期発見が重要である。しかし、*S. Enteritidis* はクロアカの汚染を伴わずに卵管組織内に定着、増殖するため、糞便からの菌検出が困難である。また、近年のワクチンの導入により、従来の血清学的手法によるワクチンと感染の区別が難しくなっている。本章では、2種類の *S. Enteritidis* 抗原、deflagellated *Salmonella Enteritidis* whole cell (DEWC)、*Salmonella Enteritidis* FliC-specific 9kDa polypeptide (SEP9)を用いて、*S. Enteritidis* 対策に有効なスクリーニング法の確立を目指した。

以下の3シリーズの *S. Enteritidis* 感染試験を行い、血清または卵黄中のDEWC、SEP9に対する特異抗体価をELISA法により測定し、卵、クロアカスワブ、糞便からのサルモネラ検出率との関連を調べた。(1)採卵鶏に *S. Enteritidis* 培養菌液  $10^{10}$ CFU/羽を2日連続で経口投与し非投与群と比較した。DEWC特異抗体価は血清、卵黄ともに *S. Enteritidis* 投与群で試験期間中を通じて高かったが、SEP9 特異抗体価は両群とも低く差がみられなかった。*S. Enteritidis* 投与群では不定期にクロアカスワブや卵殻外面から菌が分離された。(2)採卵鶏に *S. Enteritidis* 不活化ワクチンを皮下接種後 *S. Enteritidis* 培養菌液  $10^8$ CFU/羽を2日連続で経口投与し、同様に *S. Enteritidis* を投与したワクチン非接種鶏と比較した。ワクチン接種群は両特異抗体価とも非常に高く、菌が分離されたのは投与1週間のみであった。ワクチン非接種群の特異抗体価は試験(1)の *S. Enteritidis* 投与群と同様の傾向がみられ、不定期にクロアカスワブや卵殻外面から菌が分離された。(3)2週齢ヒナに *S. Enteritidis* 培養菌液  $10^{10}$ CFU/羽を1回経口投与、あるいは、アインレータにて10羽当たり  $10^{12}$ CFUを1回噴霧投与した。産卵鶏と異なり経口投与群にDEWC特異抗体価の上昇が見られず、一方、噴霧投与群では両特異抗体価ともに上昇していた。

以上の結果から、SEP9 特異抗体はワクチンの皮下接種や噴霧投与といった非経口的に *S. Enteritidis* 抗原が体内に入った場合にのみ作られ、通常の経口感染ルートでは作られないことが明らかとなった。一方、*S. Enteritidis* 感染により菌排出の有無に関わらず DEWC 特異抗体価の上昇がみられたことから、DEWC は *S. Enteritidis* 不顕性感染鶏群の検出に有用であると考えられる。

### 第4章: 日本の養鶏場における *Salmonella Enteritidis* 汚染状況

日本の養鶏場単位での *S. Enteritidis* 汚染実態は不明瞭であり、有効な *S. Enteritidis* 食中毒防止対策を立てるためには、養鶏場あるいは鶏舎単位の *S. Enteritidis* 汚染状況を全国レベルで把握することが急務である。そこで、2種類の *S. Enteritidis* 抗原、DEWC、SEP9を用いて市販卵の卵黄移行抗体を測定することにより、養鶏場単位での汚染状況を調査した。

調査に先立ち、日齢、ワクチンプログラムの異なる3養鶏場の9鶏群で生産された卵のDEWCおよびSEP9特異抗体価をELISA法により測定した。両特異抗体価はワクチン非接種鶏群に比べいずれのワクチン接種鶏群でも高く、それらは加齢により徐々に低下するものの690日齢まで高い抗体価が保持されていた。これらの鶏群から定期的な細菌学的検査でサルモネラが検出されていないことから、両抗体の保有によりワクチンの有効性が維持されることが確認された。

日本国内を対象に、10万羽以上飼育している養鶏場の中から197養鶏場の201鶏群で生産された市販パック卵をそれぞれ40個ずつ購入し、上記と同様にして特異抗体価を測定した。全鶏群の22.3%が両特異抗体価とも高い値を示し、ワクチン接種を受けていたと考えられる。また、ワクチン購入歴の確認されたのは30養鶏場でその86.7%でワクチンの有効性が認められた。一方、全鶏群の34.3%がDEWC特異抗体価のみ高い値を示し、*S. Enteritidis*感染の可能性が示唆された。この調査により日本の養鶏場単位の*S. Enteritidis*抗体保有率が初めて明らかとなり、ワクチン接種を含め*S. Enteritidis*対策が不十分であることが判明した。*S. Enteritidis*食中毒防止のためには、*S. Enteritidis*感染鶏群の検出、*S. Enteritidis*ワクチン効果のモニターリングが重要であり、本研究で開発した測定法は養鶏場における汚染状況を把握するための有効な手段になると考えられる。

## まとめ

*S. Enteritidis*による散発的な鶏卵汚染に関して以下のような結論を得た。

1. *S. Enteritidis*は、他の血清型に比べて、鶏生殖器のなかでも特に卵管腔部上皮への親和性が高いことを証明した。
2. 卵管子宮腔移行部にある精子貯蔵嚢に侵入した*S. Enteritidis*はそこで長期間定着し、この定着と卵管腔への放出が*S. Enteritidis*による散発的な鶏卵汚染に結びつく重要な因子であることが示唆された。
3. 通常の*S. Enteritidis*感染ではSEP9に対する抗体が作られないこと、*S. Enteritidis*感染の指標としてDEWC特異抗体が有用であることを証明し、これらを併用した*S. Enteritidis*対策に有効なスクリーニング法を開発した。
4. 2種類の*S. Enteritidis*特異抗体を検出する方法により、日本の養鶏場単位の*S. Enteritidis*抗体保有率が初めて明らかとなり、ワクチン接種を含め*S. Enteritidis*対策が不十分であることが判明した。

## 審査結果の要旨

腸炎菌(*Salmonella Enteritidis*)による食中毒は1990年代に入って世界中で発生が急増し、大きな社会問題となった。この食中毒の原因食材が主に鶏卵であることは判っているが、*S. Enteritidis*による鶏卵汚染のメカニズムや、流通している鶏卵あるいは養鶏場の汚染状況についての情報はきわめて少ない。*S. Enteritidis*食中毒が一向に減少しない理由として、*S. Enteritidis*感染鶏および汚染卵の検出が困難なことが挙げられる。*S. Enteritidis*に感染した鶏は明らかな症状を示さないまま経過し、散発的に*S. Enteritidis*汚染卵を産出する。

申請者は、年間数千人規模に及ぶ*S. Enteritidis*食中毒の防遏に資することを目的として、2,500

種以上にも及ぶサルモネラ血清型のなかで *S. Enteritidis* が鶏卵汚染において優勢になる機序を解明するために、*S. Enteritidis* の持つ鶏卵管への親和性を調べ、また一方で、日本の産卵養鶏現場における *S. Enteritidis* 汚染の現状を把握するために、*S. Enteritidis* 感染鶏および感染鶏群の早期発見に有効な方法の確立を目指した。

第 1 章では、汚染卵を産出する鶏の生殖器から菌が頻繁に分離されることから、鶏卵から高頻度に分離される *S. Enteritidis* と鶏卵汚染頻度が低い他の血清型との間で卵管下部とくに卵管腔部上皮への接着性を比較した。その結果、サルモネラの細胞壁外膜の型により、O9 (*Enteritidis*)、O4 (*Agona*, *Typhimurium*, *Heidelberg*)、O7 (*Montevideo*, *Infantis*) および O8 (*Hadar*) の順に卵管腔部上皮への親和性が高く、この親和性の順位が汚染卵によるサルモネラ食中毒発生頻度と一致することから、卵管腔部上皮への親和性が *S. Enteritidis* による鶏卵汚染に結びつく重要な因子である可能性を示唆した。

第 2 章では、卵管子宮腔移行部 (UVJ) 固有層に分布する精子貯蔵嚢 (SST) に着目し、*S. Enteritidis* の卵管への定着や長期にわたる散発的な汚染卵の産出における SST の役割について検討した。*S. Enteritidis* または *S. Typhimurium* を卵管内に投与し、UVJ と SST への接着・侵入、産出卵や卵管各部の検出率を調べたところ、*S. Enteritidis* は UVJ および SST 上皮に高い向性を持ち、少なくとも 3 週間定着することを明らかにした。*S. Enteritidis* 投与鶏の汚染卵産出率が非常に高かったことから、この UVJ および SST への定着と卵管腔への放出が、長期間にわたる散発的な鶏卵汚染を引き起こす原因のひとつである可能性を示唆した。

第 3 章では、*S. Enteritidis* の経口投与、噴霧投与、あるいは不活化ワクチン接種した鶏について deflagellated whole cell (DEWC) および FliC-specific 9kDa polypeptide (SEP9) に対する特異抗体価の推移と菌検出率を比較し、*S. Enteritidis* 汚染対策に有効なスクリーニング法の確立を目指した。その結果、SEP9 抗体はワクチン接種や噴霧投与によって抗原が体内に入った場合にのみ作られ、通常の経口感染ルートでは作られないことを明らかにした。これらの結果から DEWC 抗体価と SEP9 抗体価を組み合わせることにより、*S. Enteritidis* 感染鶏とワクチン接種鶏を区別する方法を開発した。

第 4 章では、前章で開発した方法を用いて、日本における養鶏場単位の *S. Enteritidis* 汚染実態とワクチン使用状況を調査した。まず、ワクチンプログラムの異なる 9 鶏群で生産された鶏卵の抗体価を測定し、SEP9 抗体価の保有によりワクチンの有効性が維持されることを確かめた。次に、10 万羽以上飼育している日本の養鶏場の中から、197 養鶏場の 201 鶏群で生産された市販パック卵を

購入し、DEWC および SEP9 抗体価を測定したところ、全鶏群の 22.3%がワクチン接種を受けていたと考えられ、一方、34.3%が *S. Enteritidis* 感染あるいは前歴をもつ可能性を示した。これらの結果から、日本における養鶏場単位の *S. Enteritidis* 抗体保有率が初めて明らかとなり、ワクチン接種を含め *S. Enteritidis* 対策が不十分であることを示唆した。

以上の結果は、日本における主要な細菌性食中毒原因菌である *S. Enteritidis* の汚染対策にとって重要な情報を提供し、また、本研究で開発した疫学的手法は実践獣医学に大いに貢献するものである。一方で、病原体の宿主・部位特異性の解明に示唆を与える内容であり、感染症に関わる学問分野に寄与するところが大きい。したがって、本論文の審査および学力確認の結果とあわせて博士(獣医学)の学位を授与することを適当と認める。