

称号及び氏名	博士（獣医学） 花谷 有樹子
学位授与の日付	平成23年2月20日
論文名	An Assessment on Inactivated <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis (SE) Vaccine in Shell eggs, and Its Effective Antigen (鶏卵への <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) 汚染に対する SE 不活化ワクチンの有効性評価、及び有効性成分に関する研究)
論文審査委員	主査 笹井 和美 副査 三宅 眞実 副査 山崎 伸二

論文要旨

緒言

Salmonella Enteritidis (SE)は1980年代の後半から欧米諸国で食中毒の原因菌として注目され、その後1990年代半ばまで患者数が増加した。日本ではSEによる食中毒患者は1996年が最も多く、全ての細菌性食中毒の中でトップとなり、1万人を超えた。食中毒患者が増加した1980年後半から1990年の初め、SEによる食中毒の主要な原因食品・食材は鶏卵であることが各国の遡り調査で明らかとなり、鶏卵の最大のリスク要因がSE汚染であることが証明された。1990年代、国内を含め世界各国において採卵鶏用のSEワクチンの使用が許可され、現在国内では約3割の採卵鶏にワクチンが使用されていると推計されている。また、さまざまな衛生対策が開始され、SEによる食中毒患者数は減少した。

一方、1990年代に入り、食品・食材は巨大な生産地で大量に生産され、地球規模で流通・消費されるようになり、国際獣疫機関(OIE)や農業食料機関(FAO)、及び世界保健機構(WHO)において、生産・流通及び消費の各段階における衛生管理手法やその評価に対する国際的な規格の統一を図る動きが盛んになり、国際的な基準として「食品安全リスク分析」という概念が確立された。日本では「食品安全基本法」としてすでに実施し、化学的リスク要因に関する評価方法はすでに定められ「ポジティブリスト制度」として運用されている。微生物学的リスク要因に関する危害分析に

については具体的な数値による各要因によるリスク評価を行うことが望ましいとされており、なかでも SE 汚染鶏卵については様々な国際機関で発生頻度や食中毒との関係などについて研究が続けられている。FAO および WHO による疫学的調査において、ニワトリにワクチン接種を行っている国では、糞便からの SE 分離頻度が 75%減少しているとのリスク分析成績が報告されているが、鶏卵からの SE 分離頻度についてのリスク分析はまだなされていない。

現在日本国内で市販されている SE ワクチンは不活化ワクチンのみであり、この SE 不活化ワクチンは SE の全菌体をホルマリンで不活化し、アジュバントを加えたワクチンであるため、副作用として接種ストレスにより増体重の低下などを引き起こすことが知られ、ワクチンの改良が求められていた。この副作用は、SE の菌体内毒素が原因と考えられており、SE 不活化ワクチンとして有効な成分のみで構成された副作用の少ないサブユニットワクチンの開発が求められている。サブユニットワクチンの抗原候補として絨毛抗原や鞭毛抗原、あるいは菌体膜抗原 (LPS) が検討されてきた。しかし、現在まで有効な抗原候補の報告はあるが、これらの抗原を用いた試作ワクチン接種鶏の腸管内での SE 定着抑制に関する有効性評価についての報告はない。

本研究では SE 汚染農場における SE 不活化ワクチンによる SE 汚染鶏卵産出リスク軽減効果の評価を行った。さらに、現在市販されている SE 不活化ワクチンの有効成分について検討し、副作用の少ないサブユニットワクチン抗原の候補について検討した。

第1章 大型採卵農場における SE 不活化ワクチン接種による鶏卵への SE 汚染抑制効果

SE 不活化ワクチンの効果に関しては、鶏体内のサルモネラの動態や血中抗体価の推移に関する観点から多くの研究が行われてきたが、鶏卵への SE 汚染抑制効果について「食品安全リスク分析」の観点から野外の採卵農場において長期間に渡った調査研究がなされた報告はない。そこで本章では、平成9年から12年の間に行われた野外の4養鶏農場(37鶏舎、飼育総羽数230万羽)の鶏卵を材料とした液卵からの SE 分離記録について解析を行った。これらの養鶏場では、解析開始前の平成8年に一部の鶏群にのみ試験的に SE 不活化ワクチンが接種されていたが、平成12年当初には全ての鶏群に接種されていた。

解析開始後3年間についてのワクチン非接種鶏群からのサンプル数は40で SE 分離菌数は、 $<2 \sim >1,600$ (最確数:MPN/100ml)、MPNの平均値 \pm 標準誤差は 674.8 ± 162.9 であり、分離頻度は25%(分離回数/検査回数:10/40)であった。一方ワクチン接種群の場合は、サンプル数は571で MPN は <2 から 8 (MPN/100ml)、平均値 \pm 標準誤差は 2.5 ± 0.1 であり、個々のサンプルからの分離菌数に有意性は認められなかったが、平均分離菌数は有意に減少していた($p < 0.01$)。分離頻度に関してはワクチン接種群で571検体中14検体から SE が分離され、分離頻度2.45%と非ワクチン接種群の分離頻度の約10分の1に有意に抑制されていた($p < 0.01$)。さらに、全ての鶏群がワクチン接種済みとなった4年目には、SE は分離されなかった(257検体中0検体)。

以上の成績より、採卵農場における SE 不活化ワクチン使用は、SE 汚染鶏卵からの SE 分離菌

数、及び分離頻度を有意に抑制することが明らかとなった。

第2章 SE Fli C の g.m.抗原部位 (SEp 9) のワクチン効果について

SE の鞭毛は主に Fli C と呼ばれる分子量 53kDa のポリペプチドで構成されており、Fli C の中では SE H 抗原の型別に用いられる抗原部位 (g.m.抗原) がワクチン候補抗原の一つとして良く知られている。また g.m.抗原については、鶏に抗原として認識される最小単位は 273 塩基対でコードされるポリペプチド (9kDa ポリペプチド: 以下 SEp 9) であることがすでに報告されている。本研究では SE サブユニットワクチンの抗原候補として大腸菌発現組み換え Fli C あるいは SEp 9 を鶏に接種し、接種部位における組織学的な反応からワクチンとしての有効性を検討した。

検討に当たり、すでに報告のある市販の SE 不活化ワクチン接種による組織学的反応をもとに、類上皮細胞の出現により示される細胞性免疫反応像を Indicator 1(①)、リンパ球の集積により示される液性免疫反応像を Indicator 2(②)、非特異的免疫反応像を Indicator 3(③)の3種類に分類し、不活化ワクチンに免疫賦与剤として用いられるアジュバント接種による組織学的反応が③のみであることも考慮し、上記抗原を接種した時の組織学的反応の検討を行った。

SE 不活化ワクチン接種後には①～③、一方アジュバント接種後には③のみの組織学的反応が認められる。これらの指標を用いて、Fli C 及び SEp 9 の鶏への接種時の組織反応と SEp 9 に対する抗体産生能について評価した。組み換え Fli C あるいは SEp 9 をタンパク量で 50 μ g/0.5mL/羽となるよう等量のフロイントインコンプリートアジュバントとよく混合後鶏の肩部皮下に接種し、28 日後に接種部位を採材し組織学的な検討と SEp 9 に対する血中抗体産生能について検討した。

その結果、SEp 9 接種鶏、SE Fli C 接種鶏では①～③の組織像が認められ、ともに細胞性免疫誘導の可能性が示唆され、SEp 9 に対する特異抗体の産生も認められた。以上の成績から、SE Fli C のみならず SEp 9 も SE サブユニットワクチンの抗原候補になりうる可能性が示唆された。

第3章 SEp 9 を抗原としたサブユニット SE 試作ワクチン接種鶏の抗体応答と攻撃試験について

前章において SEp 9 は Fli C と比較して接種反応が少ない SE サブユニットワクチンの抗原に成りうる可能性が示唆された。そこで本章では、SEp 9 のサブユニットワクチン抗原としての有用性を検討するために攻撃試験を実施し、抗体産生誘導能と腸管内 SE 菌数の動態を検討した。

SEp 9 をタンパク量で 100 μ g/0.5mL/羽となるようアジュバントとともに鶏の肩部皮下に 2 回接種し、4 週後に SE (10⁷CFU/羽) を経口的に投与し盲腸内菌数を測定した。同時に血中及び小腸内容中の SE 菌体と SEp 9 に対する特異抗体を測定した。また、対照として、燐酸緩衝液とアジュバントとの混合液の接種群を設定した。

SEp 9 接種鶏群においては SE 投与後の盲腸内菌数は陰性対照群と比較して、1 週間及び 3 週後に有意 ($p < 0.01$) に減少した。血中の SEp 9 に対する特異抗体価が SE 投与 3 週後に上昇し

たが、腸管内の SEp 9 に対する特異抗体は検出できなかった。

以上の成績から、SEp 9 は腸管内での SE の定着を抑制することが示唆された。

総括

1. SE 汚染大型養鶏場における SE 不活化ワクチンの適切な使用により、SE の分離菌数、分離頻度が抑制されることが判明した。
2. SEp 9 を抗原とした SE サブユニットワクチン接種鶏では、接種部位において市販の SE 不活化ワクチン接種時と同様に類上皮細胞の出現と囲管性のリンパ球の集積像（液性免疫の成立）が観察された。さらに血中では SEp 9 に対する特異抗体の産生が認められた。
3. SEp 9 を抗原とした SE サブユニットワクチン接種鶏を用いた SE 攻撃試験において消化管内の SE 菌数を有意に軽減できることが明らかとなった。

審査結果の要旨

Salmonella Enteritidis (SE) は 1980 年代の後半から欧米諸国で食中毒の原因菌として注目され、その後 1990 年代半ばまで患者数が増加した。日本では SE による食中毒患者は 1996 年が最も多く、全ての細菌性食中毒の中でトップとなり、1 万人を超えた。FAO および WHO による疫学的調査において、鶏にワクチン接種を行っている国では、糞便からの SE 分離頻度が 75% 減少しているとのリスク分析成績が報告されているが、鶏卵からの SE 分離頻度についてのリスク分析は未だなされていない。現在日本国内で市販されている SE ワクチンは不活化ワクチンのみであり、この SE 不活化ワクチンは SE の全菌体をホルマリンで不活化し、アジュバントを加えたものである。接種ストレスにより増体重の低下などの副作用を引き起こすことからワクチンの改良が求められていた。この副作用は SE の菌体内毒素が原因と考えられており、SE 不活化ワクチンとして有効な成分のみで構成された副作用の少ないサブユニットワクチンの開発が求められている。サブユニットワクチンの抗原候補として繊毛抗原や鞭毛抗原、あるいは菌体膜抗原 (LPS) が検討されてきた。しかし、現在まで有効な抗原候補の報告はあるが、これらの抗原を用いた試作ワクチン接種鶏の腸管内での SE 定着抑制に関する有効性評価についての報告はなかった。本研究では SE 汚染農場における SE 不活化ワクチンによる SE 汚染鶏卵産出リスク軽減効果の評価を行った。さらに、現在市販されている SE 不活化ワクチンの有効成分についても検討し、副作用の少ないサブユニットワクチン抗原の候補について以下の結果を得た。

第 1 章では、平成 9 年から平成 12 年の間に行われた野外の 4 養鶏農場 (37 鶏舎、飼育総羽数 230 万

羽)の鶏卵を材料とした液卵からの SE 分離記録について解析を行った。これらの養鶏場では、解析開始前の平成 8 年に一部の鶏群にのみ試験的に SE 不活化ワクチンが接種されていたが、平成 12 年当初には全ての鶏群に接種されていた。解析の結果、SE 汚染大型養鶏場における SE 不活化ワクチンの適切な使用により、SE の分離菌数、分離頻度が低下することが判明した。

SE の鞭毛は主に FliC と呼ばれる分子量 53kDa のポリペプチドで構成されており、FliC の中では SE H 抗原の型別に用いられる抗原部位 (g.m. 抗原) がワクチン候補抗原の一つとして良く知られている。また g.m. 抗原については、鶏に抗原として認識される最小単位は 273 塩基対でコードされるポリペプチド (9kDa ポリペプチド: 以下 SEp 9) であることがすでに報告されている。第 2 章では、SE サブユニットワクチンの抗原候補として大腸菌で発現させた組み換え FliC あるいは SEp 9 を鶏に接種し、接種部位における組織学的解析からワクチンとしての有効性を検討した。その結果、SEp 9 を抗原とした SE サブユニットワクチン接種鶏では、接種部位において市販の SE 不活化ワクチン接種時と同様に類上皮細胞の出現と血管性のリンパ球の集積像 (液性免疫の成立) が観察された。さらに血中では SEp 9 に対する特異抗体の産生が認められた。

第 3 章では、前章において SEp 9 は FliC と比較して接種反応が少ない SE サブユニットワクチンの抗原に成りうる可能性が示唆されたことから、SEp 9 のサブユニットワクチン抗原としての有用性を検討した。鶏に攻撃試験を実施し、抗体産生誘導能と腸管内 SE 菌数の動態を検討した。その結果、SEp 9 を抗原とした SE サブユニットワクチン接種鶏を用いた SE 攻撃試験において消化管内の SE 菌数を有意に軽減できることが明らかとなった。これらの成果は SE による食中毒の制御に寄与するとともに、感染症学および防疫学に多大な貢献をすると考えられる。従って、学力確認の結果と併せて、博士 (獣医学) の学位を授与することを適当と認める。