

氏名(本籍)	マナス チョングサ グアン (タイ)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第1538号		
学位授与年月日	平成11年5月31日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	Detection of <i>Salmonella</i> in foods and in clinical samples by cell wall antigen ELISA and by enterotoxin gene probe PCR (細胞壁を抗原とした酵素抗体法およびエンテロトキシン遺伝子の増幅法による食品および臨床検査検体からのサルモネラの検出)		
主査	筑波大学教授	医学博士	渡邊 照 男
副査	筑波大学併任教授	医学博士	竹 田 美 文 (国立国際医療センター研究所所長)
副査	筑波大学教授	医学博士	長 澤 俊 郎
副査	筑波大学教授	獣医学博士	八 神 健 一
副査	筑波大学助教授	医学博士	清 水 徹

### 論文の内容の要旨

サルモネラによる感染症はその発生頻度が国際的に増加しており、タイ国においても、特に食品による感染、いわゆる食中毒が深刻な問題となっている。その予防・対策には早期に感染源を特定し、迅速に感染経路を遮断することが最も肝要な方策である。サルモネラ属には約2000種の血清型があり、血清型の違いにより病型が異なる。S.Typhiなどはヒトに敗血症を惹起し、S.Enteritidis(本表記法は慣用的に用いられている血清型の表記法である)などは腸炎型の感染を起こす。サルモネラは爬虫類からは乳類の広い範囲の宿主に分布しているが、起病性には宿主の特異性がある。しかし、宿主特異的な病原因子についてはまだ特定されているものは少ない。このために、食中毒などの原因菌の特定には、従来の培養法で原因菌を分離同定しなければならない。

本研究では、ヒトに特異的な病原因子を迅速に検出する方法を開発した。ヒトにのみ病原性があるS.Typhiの表層抗原を指標に、サルモネラを検出・同定する方法として、酵素抗体法を開発し、またヒトに腸炎を起こす原因とみなされるエンテロトキシン(stn)と侵入因子(invA)を指標として、その遺伝子を検出する遺伝子増幅法(PCR)の開発を試み、それらの特異性、精度、感度を検定した。

#### (材料と方法)

使用した分離菌株はすべてタイ国内で分離・同定されたものを供した。臨床検査検体、とくに臨床的にチフス症と診断された患者の血液・尿・骨髄は特定のキャンプないし病院から入手した。供試した鶏肉、豚肉は市内の店頭から採取ないし購入し、研究室で処理し、実験に供した。

単クローン抗体作製の抗原としては、S.Typhi 0901株の細胞壁蛋白(Barber抗原)とリポ多糖体(LPS)を分離・精製して用いた。単クローン抗体は感作したマウスの脾臓細胞とSp2/0骨髄腫細胞とのハイブリドーマを作製し、限界希釈法により単クローンを分離し、そのクローンを大量培養して回収した。得られた抗体の標識はペルオキシダーゼにより行った。酵素抗体法にはサンドウィッチ法(マイクロタイタープレートにあらかじめ抗体を塗布

し、検体を加えて反応させ、これに標識抗体を加え発色させる)と3重サンドウィッチ法(抗体で処理したプレートに検体を反応させた後さらに抗体と反応させ、酵素標識した抗ウサギIgG抗体で発色させる)およびドットブロット法を用いた。陽性・陰性の判定および検定にはGelenらの方式を採用した。

PCR用のプライマーは既報のエンテロトキシンあるいは侵入因子の遺伝子塩基配列から特異部位を選定し、両方向のプライマーを合成した。PCRは常法により行い、その特異性はオリゴプローブを用いたサザンハイブリダイゼーション法により確認した。クローン化したエンテロトキシンの産物を同定するために、エンテロトキシン遺伝子から推察されたアミノ酸配列の特定配列(ペプチド)を合成し、これを抗原としてウサギに免疫し抗体を作製した。

#### (結果)

S.Typhiから純度の高いBarber抗体とLPS抗原がえられ、これを抗原としてマウスを免疫し、102, 157, 204, 205, 250と名付けた5株の抗体産生細胞を分離できた。これらの特異性を検定したところ、157, 204, 205はS.Typhiのみ特異的に反応し、102は全てのサルモネラ(サルモネラ属の全て)と反応したが、他の腸内細菌群とは交差性は認められなかった。250はS.TyphiとS.Paratyphiと反応し、他のサルモネラ血清型とは反応しなかった。204はIgG3であり、102はIgG2bで、いずれもK型のL鎖で構成されていた。

204抗体はS.Typhiに特異的に反応するので、これを用いてチフス症と臨床診断された患者の血液、尿、骨髄からS.Typhiの検出同定を行い、従来の培養法と比較した。その結果、培養法で陽性のものはほとんど酵素抗体法でも陽性と判定された。培養法で陰性のものの中に1例のみ偽陽性があった。

102抗体は全てのサルモネラが共通して保有する表層抗原と反応し、他の腸内細菌群とは反応しないので、これを酵素標識し、ドットブロット法により市販食品のサルモネラ汚染の状況を調べた。その結果、鶏肉・豚肉では約21-37%に汚染が検出され、培養法による検出率よりやや感度がよく、結果判定までに1時間しかかからなかった。

ヒトの病原因子を特定するためにエンテロトキシン遺伝子と侵入因子遺伝子を指標にしたPCR法を試作した。これにより各種のサルモネラおよび腸内細菌科について調べたところ、全てのサルモネラに陽性となり、他の腸内細菌科ではエロモナスの1株を除き全て陰性であった。この遺伝子産物を抗体で検出することを試み、ウエスタンブロット法により相当産物を同定することが出来た。この抗体を用い、酵素抗体法によりコロニーのドットブロット法で相当産物の検出の可否を調べたが、コロニーから直接検出することはできなかった。

#### (考察)

臨床検査検体や食品などから迅速にかつ簡便にサルモネラの汚染を検出する方法を開発し、その有用性について検討した。サルモネラの表層抗原は病原因子としての特異性・共通性についてはなお議論の多い問題であるが、すくなくとも204抗体はS.Typhiのみを特異的に認識するので、腸チフスの早期診断に有用であることがわかった。102抗体はおそらくサルモネラ属に特異的な細胞壁のコア多糖を認識するもので、検体中のサルモネラ汚染の有無の検定に有用な手段であり、すでに一部では実用化した。これらの抗体は単に抗原検出に有用だけでなく、サルモネラの表層抗原と病原性の関係を解析するために有用な手段となる。ヒトに腸炎を起こす特異的病原因子として、エンテロトキシンと侵入因子を指標として他の腸内細菌を対照として調べたところ、これらの遺伝子は他の腸内細菌には存在しないが、サルモネラの全ての菌種がこれらの遺伝子を共通して保有していることがわかり、サルモネラの検出や混入検査法として実用的であることが示唆された。ELISA法はPCR法より簡便であるので、stn遺伝子産物に対する抗体を試作し検出を試みた。ウエスタンブロット法ではサルモネラ特異的に産生されることが確認できたが、より実用的な方法として、全菌体を用いたドットブロット法を試みたが、この場合には検出できなかった。おそらく全菌体では混在細胞成分が多く、また遺伝子産物が極めて少量であるためであろう。

単クローン抗体ないし力価を上げた精製IgG画分の抗体を作製できれば検出可能であるかもしれない。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

著者は病原細菌であるサルモネラ属の簡便かつ迅速な検出・同定法を開発し、臨床検査検体と食肉からの検出を試行している。チフス菌の菌体表層の特異抗原を認識する抗体を用いた方法では患者尿から菌を検出でき、さらにサルモネラの共通抗原を認識する単クローン抗体を用いて食品からの短時間での検出を可能にしている。また、サルモネラ属に特異的な遺伝子診断法の開発も試行し、実用可能な結果を得ている。食品の細菌汚染、特に食中毒などの原因細菌を簡便かつ迅速に検出できる方法を開発した意義ある論文である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。