

北里大学大学院獣医学系研究科

博士課程学位論文審査の結果と最終試験の成績

2022年2月18日

学位論文題目

Salmonella Gallinarum による鶏全身感染における病原因子および病原機構に関する研究

氏名 小島 新二郎 所属 獣医学専攻 人獣共通感染症学

審査委員 主査 北里大学 教授 田邊 太志



副査 弘前大学 特任教授 中根 明夫



副査 北里大学 教授 高野 友美



副査 北里大学 教授 角田 勤



審査の結果

合格

最終試験の成績

優

北里大学大学院獣医学系研究科

博士課程学位論文審査の結果と最終試験の成績

2022年2月18日

学位論文題目

Salmonella Gallinarum による鶏全身感染における病原因子および病原機構に関する研究

氏名	小島 新二郎	所属	獣医学専攻 人獣共通感染症学
----	--------	----	----------------

審査委員	主査	北里大学	教授	田邊 太志	印
------	----	------	----	-------	---


	副査	弘前大学	特任教授	中根 明夫	印
--	----	------	------	-------	---

	副査	北里大学	教授	高野 友美	印
--	----	------	----	-------	---

	副査	北里大学	教授	角田 勤	印
--	----	------	----	------	---

審査の結果	_____	最終試験の成績	_____
-------	-------	---------	-------

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	小島 新二郎 (DV18001 人獣共通感染症学)
学位論文題目	<i>Salmonella</i> Gallinarum による鶏全身感染における病原因子および病原機構に関する研究
担当者	主査 北里大学 教授 田邊 太志 
	副査 弘前大学 特任教授 中根 明夫 
	副査 北里大学 教授 高野 友美 
	副査 北里大学 教授 角田 勤 

論文審査の要旨

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (*S. Gallinarum*)は鶏の重篤な全身感染症(家禽チフス)を引き起こす宿主特異的な病原体であり、未だに多くの発展途上国では高い罹患率および死亡率により、養鶏業に深刻なダメージを来たし大きな経済的損失をもたらしている。そのためより安全・有効なワクチンの開発や新たな予防対策が求められているが、*S. Gallinarum* による病原因子とその病原機構について未だ完全には解明されていない。そこで著者は、*S. Gallinarum* による鶏全身感染モデルを確立するとともに、 λ -red homologous recombination 法により特定の遺伝子を欠損株を作製し、確立した鶏全身感染モデルを使いその病原性について解析を行った。さらに鶏由来マクロファージ株化細胞を用い、*S. Gallinarum* の病原機構も検討した。

1. *S. Gallinarum* による鶏全身感染モデルの確立と感染特徴に関する研究

S. Gallinarum は家禽に全身感染を引き起こす宿主特異的病原体である。これまで *S. Gallinarum* による鶏全身感染モデルがなく、本菌の病原因子と感染免疫機構についてはほとんど知られていない。そこで著者は、*S. Gallinarum* の経口感染による鶏全身感染モデルを確立し、鶏体内における細菌の動態および宿主免疫応答を検討した。感染モデルとして褐色採卵鶏であるボリスブラウン 20 日齢メス鶏を用い、各菌数の *S. Gallinarum* を経口感染し、感染後鶏の臨床症状、病理変化、腸管および臓器中の細菌動態、宿主免疫応答を解析した。その結果、 10^8 コロニー形成単位 (CFU) の *S. Gallinarum* を経口接種した鶏が、典型的な家禽チフスの臨床徴候を示した。盲腸返答と盲腸内容物では優位な菌数の経時的変化は観察されなかったが、肝臓および脾臓では感染後 3 日から臓器内菌数が顕著に増加した。一方、感染後 3 日まで肝臓と脾臓には顕著な病理変化と炎症性サイトカインの発現が見られなかった。感染後 4 日から、肝臓では肉眼病変と組織における多くの炎症性細胞の浸潤や壊死像が、また肝臓と脾臓でのインターフェロン(IFN)- γ およびインターロイキン(IL)-12 の発現量が有意に増加した。これらの結果から、家禽チフスの典型的な臨床徴候と病理変化を引き起こす全身感染モデルを確立した。

2. 鶏全身感染における *S. Gallinarum* の *wecB* 遺伝子の病原性とその役割の解明

サルモネラは細胞内寄生細菌であり、貪食されたマクロファージ、樹状細胞内で生存、増殖し宿主の殺菌機構を回避する特徴を有している。その防御機構として腸内細菌共通抗原(ECA)が重要な役割を果たす。*S. Gallinarum* では、これらの研究報告はなく、ECA の役割は未だに解析されていない。そこで著者は、 λ -red homologous recombination 法より ECA 生合成に関わる *wecB* 遺伝子を欠損させた菌株 (*wecB*::Cm) を作製し、ECA の欠損が *S. Gallinarum* の病原性に関

与するかを検討した。*wecB::Cm* は LB 培地上では野生株 (WT) と同程度の増殖を示した。一方、胆汁酸またはナリジクス酸を添加した培地では、WT と比べ増殖が有意に抑制された。鶏感染実験では、WT 感染鶏は家禽チフスの典型的な臨床徴候と病理変化を示し細菌は全身臓器に拡散し、肝臓と脾臓の生菌数が顕著に増加した。一方 *wecB::Cm* 感染鶏は、観察期間中全羽が生存し、典型的な臨床徴候や、肝臓と脾臓での顕著な病理変化などは認められなかった。また、WT と比べ、肝臓・脾臓での生菌数は有意に低く、IL-1 β 、腫瘍壊死因子 (TNF)- α および CXCLi1 の発現量が顕著に低かった。これらの結果から、*wecB* 遺伝子が *S. Gallinarum* による鶏全身感染において重要な病原性因子であることが明らかとなった。*wecB::Cm* 株を投与した鶏は、感染後 20~25 日まで肝臓と脾臓において一定の菌数が持続的に定着し続けその後消失した。感染後 45 日に採取した血清中には抗 *S. Gallinarum* 抗体が検出された。また *wecB::Cm* 株を経口投与 35 日後に、WT 株を接種したところ、全羽が生存し *wecB::Cm* 株は家禽チフスを防御するための弱毒生ワクチン株として応用できる可能性が示唆された。

3. 鶏全身感染における *S. Gallinarum* の *trxB* 遺伝子の役割の検討

trxB 遺伝子にコードされているチオレドキシンレダクターゼは、他のタンパク質のジスルフィド結合を還元・切断することにより、菌体内の様々な酵素活性の制御や酸化ストレスの応答に重要な酸化還元タンパク質である。著者は *S. Gallinarum* の *trxB* 遺伝子欠損株 (*trxB::Cm*) を作製し、*S. Gallinarum* による鶏全身感染における *trxB* 遺伝子の役割を検討した。*trxB::Cm* は WT と比較して、LB 培地上での増殖速度が遅く、培地に添加した H₂O₂ に対する耐性が低下した一方、胆汁酸に対する耐性が増加した。鶏感染実験では、*trxB::Cm* 感染鶏は観察期間中全羽が生存し、顕著な臨床徴候および病理変化は観察されなかった。また、肝

臓・脾臓の生菌数は WT と比べ有意に低下し、肝臓での IL-1 β 、IL-6、IL-12、IFN- γ 、TNF- α および CXCLi1 の発現量はいずれも顕著に低かった。これらの結果から、*trxB* 遺伝子欠損株は病原性が減弱したと共に、サイトカインの産生誘導も低いことが明らかとなり、*trxB* 遺伝子は *S. Gallinarum* による鶏全身感染における病原機構の一端を担っていることが示唆された。

4. 鶏全身感染における SPI-14 の *S. Gallinarum* の病原性への関与

近年、広範な宿主に感染する腸管病原菌 *Salmonella* Typhimurium において、*Salmonella* pathogenicity island 14 (SPI-14) は病原性調節因子であると報告されている。しかし、*S. Gallinarum* においては、SPI-14 の役割と病原性への関与について未だ不明である。そこで著者は、SPI-14 に含まれる SG0835 と SG0836 遺伝子を欠損させ、*S. Gallinarum* の SPI-14 変異株 (mSPI-14) を作製し、mSPI-14 株の病原性について WT と比較検討した。mSPI-14 株は LB 培地上では WT とほぼ同程度の増殖能を示したが、胆汁酸に対する耐性が有意に低下した。鶏感染実験では、mSPI-14 感染鶏は観察期間中全羽が生存し、臓器中の生菌数は WT と比べ有意に低かった。また、肝臓と脾臓では顕著な病理変化は観察されず、肝臓中の IL-1 β 、IL-6、IL-12、IFN- γ 、TNF- α および CXCLi1 の発現量は WT と比べ顕著に低かった。これらの結果から、SPI-14 は *S. Gallinarum* の重要な病原性に関与する因子であることが明らかとなり、本菌による鶏全身感染の病原機構に関与することが示唆された。

5. 鶏由来株化細胞を用いた *S. Gallinarum* の病原機構の解析

S. Gallinarum の病原機構を検討するために、著者は鶏由来マクロファージ株化細胞である HD11 を用いて WT または *wecB::Cm* の感染実験を行い比較検討した。その結果 *wecB::Cm* の細胞内の生残菌数は WT と比較して有意に多かつ

た。また感染後時間の経過とともに両者とも減少傾向を示した。感染早期には *wecB::Cm* は WT より高い細胞傷害性を示した。感染細胞のサイトカイン発現量を測定した結果、WT と *wecB::Cm* はいずれも IL-6 の発現を増強したが、両者の間には有意な差が見られなかった。感染細胞内の細菌の局在を蛍光二重染色により観察した結果、WT と *wecB::Cm* の間では顕著な違いが見られなかった。これらの結果から、*S. Gallinarum* による鶏全身感染では、腸管から全身への伝播過程での細胞内に侵入する以前の段階において *wecB* 遺伝子が病原性因子として関与している可能性が示唆された。

著者は本論文において *S. Gallinarum* の鶏全身感染モデルを確立し、*S. Gallinarum* の *wecB*、*trxB* 遺伝子および SPI-14 が家禽チフスにおける重要な病原因子であることを明らかにした。また *wecB* 遺伝子欠損株は、感染後鶏体内に一定期間に持続的に定着し抗 *S. Gallinarum* 抗体を誘導すること、さらに WT に対する感染防御を誘導することを明らかとし、弱毒生ワクチン候補株として応用できることを示した。本論文で得られた新たな知見が、家禽チフスを制御するための安全で効果的なワクチンの開発に貢献することが期待される。

著者のこれまでの研究に対する真摯な姿勢と高い学識が読み取れ、研究者として十分な資質を備えていると判断された。よって、本論文は博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認め、審査委員一同は合格と判定した。

論文審査の要旨および担当者

学位申請者	小島 新二郎 (DV18001 人獣共通感染症学)
学位論文題目	<i>Salmonella</i> Gallinarum による鶏全身感染における病原因子および病原機構に関する研究
担当者	主査 北里大学 教授 田邊 太志 (印) 副査 弘前大学 特任教授 中根 明夫 (印) 副査 北里大学 教授 高野 友美 (印) 副査 北里大学 教授 角田 勤 (印)

論文審査の要旨

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (*S. Gallinarum*)は鶏の重篤な全身感染症(家禽チフス)を引き起こす宿主特異的な病原体であり、未だに多くの発展途上国では高い罹患率および死亡率により、養鶏業に深刻なダメージを来とし大きな経済的損失をもたらしている。そのためより安全・有効なワクチンの開発や新たな予防対策が求められているが、*S. Gallinarum* による病原因子とその病原機構について未だ完全には解明されていない。そこで著者は、*S. Gallinarum* による鶏全身感染モデルを確立するとともに、 λ -red homologous recombination 法により特定の遺伝子を欠損株を作製し、確立した鶏全身感染モデルを使いその病原性について解析を行った。さらに鶏由来マクロファージ株化細胞を用い、*S. Gallinarum* の病原機構も検討した。

1. *S. Gallinarum* による鶏全身感染モデルの確立と感染特徴に関する研究

S. Gallinarum は家禽に全身感染を引き起こす宿主特異的病原体である。これまで *S. Gallinarum* による鶏全身感染モデルがなく、本菌の病原因子と感染免疫機構についてはほとんど知られていない。そこで著者は、*S. Gallinarum* の経口感染による鶏全身感染モデルを確立し、鶏体内における細菌の動態および宿主免疫応答を検討した。感染モデルとして褐色採卵鶏であるボリスブラウン 20 日齢メス鶏を用い、各菌数の *S. Gallinarum* を経口感染し、感染後鶏の臨床症状、病理変化、腸管および臓器中の細菌動態、宿主免疫応答を解析した。その結果、 10^8 コロニー形成単位 (CFU) の *S. Gallinarum* を経口接種した鶏が、典型的な家禽チフスの臨床徴候を示した。盲腸返答と盲腸内容物では優位な菌数の経時的変化は観察されなかったが、肝臓および脾臓では感染後 3 日から臓器内菌数が顕著に増加した。一方、感染後 3 日まで肝臓と脾臓には顕著な病理変化と炎症性サイトカインの発現が見られなかった。感染後 4 日から、肝臓では肉眼病変と組織における多くの炎症性細胞の浸潤や壊死像が、また肝臓と脾臓でのインターフェロン(IFN)- γ およびインターロイキン(IL)-12 の発現量が有意に増加した。これらの結果から、家禽チフスの典型的な臨床徴候と病理変化を引き起こす全身感染モデルを確立した。

2. 鶏全身感染における *S. Gallinarum* の *wecB* 遺伝子の病原性とその役割の解明

サルモネラは細胞内寄生細菌であり、貪食されたマクロファージ、樹状細胞内で生存、増殖し宿主の殺菌機構を回避する特徴を有している。その防御機構として腸内細菌共通抗原(ECA)が重要な役割を果たす。*S. Gallinarum* では、これらの研究報告はなく、ECA の役割は未だに解析されていない。そこで著者は、 λ -red homologous recombination 法より ECA 生合成に関わる *wecB* 遺伝子を欠損させた菌株 (*wecB*::Cm) を作製し、ECA の欠損が *S. Gallinarum* の病原性に関

与するかを検討した。*wecB::Cm* は LB 培地上では野生株 (WT) と同程度の増殖を示した。一方、胆汁酸またはナリジクス酸を添加した培地では、WT と比べ増殖が有意に抑制された。鶏感染実験では、WT 感染鶏は家禽チフスの典型的な臨床徴候と病理変化を示し細菌は全身臓器に拡散し、肝臓と脾臓の生菌数が顕著に増加した。一方 *wecB::Cm* 感染鶏は、観察期間中全羽が生存し、典型的な臨床徴候や、肝臓と脾臓での顕著な病理変化などは認められなかった。また、WT と比べ、肝臓・脾臓での生菌数は有意に低く、IL-1 β 、腫瘍壊死因子 (TNF)- α および CXCLi1 の発現量が顕著に低かった。これらの結果から、*wecB* 遺伝子が *S. Gallinarum* による鶏全身感染において重要な病原性因子であることが明らかとなった。*wecB::Cm* 株を投与した鶏は、感染後 20~25 日まで肝臓と脾臓において一定の菌数が持続的に定着し続けその後消失した。感染後 45 日に採取した血清中には抗 *S. Gallinarum* 抗体が検出された。また *wecB::Cm* 株を経口投与 35 日後に、WT 株を接種したところ、全羽が生存し *wecB::Cm* 株は家禽チフスを防御するための弱毒生ワクチン株として応用できる可能性が示唆された。

3. 鶏全身感染における *S. Gallinarum* の *trxB* 遺伝子の役割の検討

trxB 遺伝子にコードされているチオレドキシンレダクターゼは、他のタンパク質のジスルフィド結合を還元・切断することにより、菌体内の様々な酵素活性の制御や酸化ストレスの応答に重要な酸化還元タンパク質である。著者は *S. Gallinarum* の *trxB* 遺伝子欠損株 (*trxB::Cm*) を作製し、*S. Gallinarum* による鶏全身感染における *trxB* 遺伝子の役割を検討した。*trxB::Cm* は WT と比較して、LB 培地上での増殖速度が遅く、培地に添加した H₂O₂ に対する耐性が低下した一方、胆汁酸に対する耐性が増加した。鶏感染実験では、*trxB::Cm* 感染鶏は観察期間中全羽が生存し、顕著な臨床徴候および病理変化は観察されなかった。また、肝

臓・脾臓の生菌数は WT と比べ有意に低下し、肝臓での IL-1 β 、IL-6、IL-12、IFN- γ 、TNF- α および CXCLi1 の発現量はいずれも顕著に低かった。これらの結果から、*trxB* 遺伝子欠損株は病原性が減弱したと共に、サイトカインの産生誘導も低いことが明らかとなり、*trxB* 遺伝子は *S. Gallinarum* による鶏全身感染における病原機構の一端を担っていることが示唆された。

4. 鶏全身感染における SPI-14 の *S. Gallinarum* の病原性への関与

近年、広範な宿主に感染する腸管病原菌 *Salmonella* Typhimurium において、*Salmonella* pathogenicity island 14 (SPI-14) は病原性調節因子であると報告されている。しかし、*S. Gallinarum* においては、SPI-14 の役割と病原性への関与について未だ不明である。そこで著者は、SPI-14 に含まれる SG0835 と SG0836 遺伝子を欠損させ、*S. Gallinarum* の SPI-14 変異株 (mSPI-14) を作製し、mSPI-14 株の病原性について WT と比較検討した。mSPI-14 株は LB 培地上では WT とほぼ同程度の増殖能を示したが、胆汁酸に対する耐性が有意に低下した。鶏感染実験では、mSPI-14 感染鶏は観察期間中全羽が生存し、臓器中の生菌数は WT と比べ有意に低かった。また、肝臓と脾臓では顕著な病理変化は観察されず、肝臓中の IL-1 β 、IL-6、IL-12、IFN- γ 、TNF- α および CXCLi1 の発現量は WT と比べ顕著に低かった。これらの結果から、SPI-14 は *S. Gallinarum* の重要な病原性に関与する因子であることが明らかとなり、本菌による鶏全身感染の病原機構に関与することが示唆された。

5. 鶏由来株化細胞を用いた *S. Gallinarum* の病原機構の解析

S. Gallinarum の病原機構を検討するために、著者は鶏由来マクロファージ株化細胞である HD11 を用いて WT または *wecB::Cm* の感染実験を行い比較検討した。その結果 *wecB::Cm* の細胞内の生残菌数は WT と比較して有意に多かつ

た。また感染後時間の経過とともに両者とも減少傾向を示した。感染早期には *wecB::Cm* は WT より高い細胞傷害性を示した。感染細胞のサイトカイン発現量を測定した結果、WT と *wecB::Cm* はいずれも IL-6 の発現を増強したが、両者の間には有意な差が見られなかった。感染細胞内の細菌の局在を蛍光二重染色により観察した結果、WT と *wecB::Cm* の間では顕著な違いが見られなかった。これらの結果から、*S. Gallinarum* による鶏全身感染では、腸管から全身への伝播過程での細胞内に侵入する以前の段階において *wecB* 遺伝子が病原性因子として関与している可能性が示唆された。

著者は本論文において *S. Gallinarum* の鶏全身感染モデルを確立し、*S. Gallinarum* の *wecB*、*trxB* 遺伝子および SPI-14 が家禽チフスにおける重要な病原因子であることを明らかにした。また *wecB* 遺伝子欠損株は、感染後鶏体内に一定期間に持続的に定着し抗 *S. Gallinarum* 抗体を誘導すること、さらに WT に対する感染防御を誘導することを明らかとし、弱毒生ワクチン候補株として応用できることを示した。本論文で得られた新たな知見が、家禽チフスを制御するための安全で効果的なワクチンの開発に貢献することが期待される。

著者のこれまでの研究に対する真摯な姿勢と高い学識が読み取れ、研究者として十分な資質を備えていると判断された。よって、本論文は博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認め、審査委員一同は合格と判定した。