

学位論文要旨

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

Studies on the virulence factors and pathogenic mechanism of *Salmonella Gallinarum*-induced systemic infection of chickens

北里大学大学院獣医学系研究科

獣医学専攻 博士課程

小島 新二郎

Shinjiro Ojima

指導教授 胡 東良

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し大きな経済的損失をもたらしている。家禽チフスを制御するため、これまで *S. Gallinarum* の弱毒生ワクチンの開発が行われてきたが、生ワクチン株は病原性が完全に失われておらず、予防効果も十分ではないのが現状である。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* による鶏全身感染における病原因子とその病原機構について未だ解明されていない。そこで本研究では、まず *S. Gallinarum* による鶏全身感染モデルを確立し、鶏全身感染時の特徴を明らかにした。また、*S. Gallinarum* の *wecB* と *trxB* 遺伝子および *Salmonella* pathogenicity island 14 (SPI-14) の欠損株をそれぞれ作製し、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* の病原機構を検討した。

第1章 *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な病原体である。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。第1章では、*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。ボリスブラウン 20 日齢メス鶏を用いて、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)で感染した鶏は、家禽チフスの典型的な臨床徴候を示した。盲腸扁桃と盲腸内容物では有意な菌数の経時的変化が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、死亡直前まで増加を続けた。一方、感染後 3 日まで肝臓と脾臓に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が、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観察された。また、肝臓と脾臓でのイ

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、経口感染した *S. Gallinarum* が腸管から侵入し、全身臓器に伝播した鶏全身感染モデルを確立することができた。また、感染早期に宿主の炎症反応と免疫応答の遅れが本菌の全身感染成立の一因であることが示唆された。

第2章 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

本章では、*S. Gallinarum* の腸内細菌共通抗原(ECA)を合成する UDP-N-アセチルグルコサミン-1-リン酸トランスフェラーゼをコードする *wecB* 遺伝子の病原性とその役割について検討した。まずは、野生株(WT)から *wecB* 遺伝子欠損株(*wecB*::Cm)を作製し、各培養条件での増殖能と形態的特徴を検討した。次に、鶏に *wecB*::Cm と WT をそれぞれ経口感染し、感染後の鶏の臨床徴候、臓器中の生菌数、組織の病理変化および炎症性サイトカイン・ケモカインの発現について比較検討した。その結果、*wecB*::Cm は LB 培地では 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、高い感受性を示した。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。これらに対し、*wecB*::Cm 感染鶏は、典型的な臨床徴候が見られず、肝臓と脾臓は顕著な病理変化が認められなかった。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。一方、病原性が減弱した *wecB*::Cm 株は、感染後 20～25 日まで鶏の肝臓と脾臓において少数の菌が持続的に定着し続けた。また、感染後 45 日では血液中に抗 *S. Gallinarum* 抗体が検出された。このことから、*wecB*::Cm 株は病原性を示さないが、宿主の免疫応答を誘導できることが明らかとなった。本変異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ことが期待される。

第3章 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。本章では、*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 培地での増殖速度が遅く、培地に添加した H_2O_2 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* 感染鶏は顕著な臨床徴候および病理変化が観察されなかった。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かったことを明らかにした。*trxB* 遺伝子は *S. Gallinarum* による鶏全身感染における病原機構に役割を果たしているとし唆された。

第4章 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ことが報告されている。しかし、宿主特異的な鶏全身性感染起因菌 *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。本章では、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 感染鶏は生存率が高く、臓器中の生菌数は有意に低かった。また、肝臓と脾臓では病理変化が観察されず、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* の病原遺伝子であり、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。

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

本章では、さらに *S. Gallinarum* の病原機構を検討するために、鶏由来マクロファージ株化細胞の HD11 を用いて細胞感染実験を行った。WT と *wecB::Cm* をそれぞれ細胞に感染し、細胞内生残菌数を経時的に測定した。その結果 *wecB::Cm* の生残菌数は WT と比較して有意に多かったが、両者とも経時的な減少傾向を示した。また、感染早期には *wecB::Cm* の細胞傷害性が WT より高かった。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、細胞内侵入する前に、腸管から全身への伝播過程において *wecB* 遺伝子が病原性を発揮することが示唆された。

本研究は、*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 は鶏全身感染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、作製した *wecB* 遺伝子欠損株が病原性の減弱のみならず、鶏体内に一定期間に持続的定着し、抗 *S. Gallinarum* 抗体を産生誘導できることから、弱毒生ワクチン候補株として応用できることを提示した。本研究で得られた新たな知見が、家禽チフス制御のためより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。