

<平成18年度>

特異的抗体の飼料添加によるサルモネラ食中毒の制圧

笹井和美

(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科教授)

1. 緒言

Salmonella Enteritidis (SE) は、サルモネラ食中毒事例で最も検出頻度が高く、鶏卵・鶏肉が感染の主要な原因食材であると報告されている。SEの鶏に対する病原性は弱く、人を含めたホ乳類で強い病原性を示すため、キャリアとなった鶏から自然界へのSEの排出が起こり、サルモネラ食中毒が発生する。したがって、人のサルモネラ由来食中毒を抑制するためには感染源である鶏のサルモネラ感染およびサルモネラの野外環境への排出を抑制することが重要である。

現在、鶏に対するサルモネラ予防ワクチンは、日本国内では予防効果の低い不活化ワクチンが、また、海外では弱毒生ワクチンが使用されているが、弱毒化したサルモネラの野外での強毒化等の危険性が高く、ワクチンの使用には限界がある。

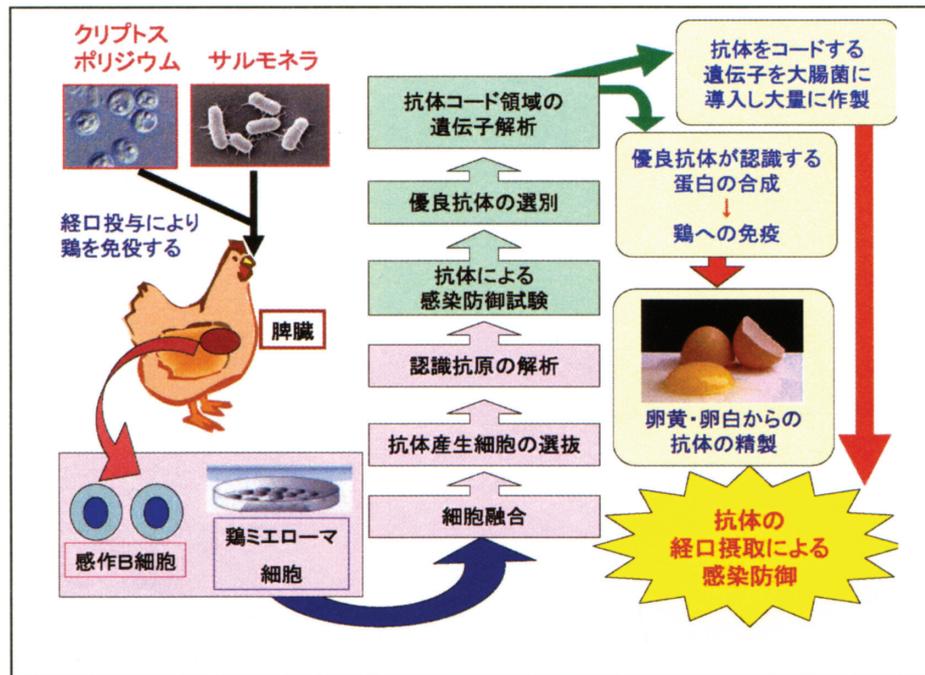
そこで、抗体による経口受動免疫に着目し、予防効果の高い抗体の作製を試みた。

人のサルモネラ食中毒の最大の汚染源である鶏は、卵や糞便中へ長期にサルモネラを排泄するが、鶏自身は不顕性感染状態で、臨床症状を示さず、長期にわたり環境を汚染する。そこで申請者のグループは、サルモネラ感染時（特に、*Salmonella* Enteritidis, 以下SE）におけるの鶏のサルモネラ防御機構を中心に解析を行ってきた。その内訳は、SE感染鶏の脾臓と胸腺の役割（Sasai K. 1997.）および、鶏に特異的な腸管リンパ節である盲腸扁桃における免疫の役割（Sasai K. 2000）

などのリンパ組織での免疫動態の研究、また、正常産卵鶏の生殖器における免疫細胞の動態に関する研究（Winthanage G.S.K., 1997.）および、サルモネラ感染時の生殖器における免疫細胞の動態（Winthanage G.S.K., 1998.）特に、T細胞とマクロファージの動態（Winthanage G.S.K., 2003.）等である。さらに、鶏のモノクローナル抗体系を用いて鶏消化管寄生原虫に対するモノクローナル抗体を作製してきた実績があり、新たに備品を購入することなく、研究を遂行できる（Sasai K., 1998.）。また、世界各地のサルモネラ由来食中毒において、SEが他のサルモネラ血清型に比較してその原因菌となる可能性の高いことから、サルモネラの血清型と鶏卵・鶏肉への汚染の原因を究明する目的で、サルモネラの腸管への定着の血清型による違い（Okamura M., 2001a.）および、サルモネラの鶏生殖器への定着の違い（Okamura M., 2001b.）を検討し、SEが鶏消化管や生殖器に親和性が高いことを証明した。更に、サルモネラ絨毛に対する鶏免疫系の感受性（Mizumoto N., 2004.）が自然感染と不活化ワクチン接種で異なることを証明した。そこで、抗体による経口受動免疫に着目し、予防効果の高い抗体の作製を試みた。

2. 材料と方法

従来の研究結果をふまえ、図による研究計画を実施した。即ち、(1)サルモネラの鶏への免疫、(2)免疫したニワトリのサルモネラに対する抗体価の測定 (3)サルモネラに感作されたニワトリ



を用いた抗体産生ハイブリドーマの作製，(4) 体産生ハイブリドーマの選別，(5) (1) から (4) の過程，および，既に申請者の研究室にて作製した抗体産生ハイブリドーマの抗体可変領域をコードする cDNA の単離，(6) 抗体の重鎖および軽鎖を連結させた一本鎖可変領域 (scFv) DNA の作製，(7) 抗サルモネラ組換え抗体発現プラスミドの調整，(8) 組換え抗体の大腸菌で作製までの行程を実施した。申請では (9)～(10) までの行程を更に実施し，最終的には食物，あるいは飼料への抗体の添加によりサルモネラにより発生する食中毒を経口受動免疫を用いた手法により制圧することを試みるとともに，本研究から得た知見を他の病原微生物による食中毒制圧の基礎的研究の一助とする

既存設備を用いて行い。抗体作製は笹井が中心となり，分子生物学的実験は谷が，感染実験は松林が中心となり研究を遂行する。

2.1 供試菌株について

大阪府立公衆衛生研究所から分与された，SE，SHa，SM，SI，SHe の 5 血清型を用いた。

2.2 供試モノクローナル抗体について

1) ハイブリドーマの作製法

White Leghorn 種鶏，20 日齢，雄に 1×10^6 CFU の phage4 型 SE Y-24 株を経口投与し，さらにその 13 日後に 1×10^9 CFU の同菌株を経口投与した。その 3 日後に鶏の脾臓を摘出し，得られた脾臓細胞と鶏のミエローマ細胞株 R27H4 株を融合させた。

2) 限界希釈法によるクローニング

融合後，培養細胞を HAT 添加した 10% FCS を含む Iscove's modified Dulbecco's (IMDM-10) 中に懸濁し，96 穴のマイクロプレート中に細胞 1 個 / ウェルで培養した。数日後，ウェルの培養細胞をとり，ELISA 法によるスクリーニングでハイブリドーマ上清の抗体産生の有無を確認し，陽性のハイブリドーマを再度クローニングした。ELISA 法でスクリーニング後細胞が確認されたウェルの HAT 上清が全て陽性であるとクローン化されたとし，モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを選択した。これらのモノクローナル抗体のアイソタイプは全て IgG であった。

2.3 スクリーニング

再クローニングしたモノクローナル抗体のスク

リーニングは免疫蛍光染色法で行った。

1) 菌液

供試菌を 20ml のトリプトソイブイオン (ニッスイ) で 37°C, 20 時間静止培養した後, PBS で 3 回, 15 分間の遠心 (4,528 × g, HITACHI) 洗浄し, 10%ホルマリンを加えた。その後 3 回洗浄した後, 20ml の PBS に懸濁し, 10¹⁰CFU/ml の菌液とした。

2) 免疫蛍光染色によるスクリーニング

20μl の菌液をスライドガラス上で乾燥し, 50μl のモノクローナル抗体と 30 分反応させた。その後, PBS で 3 回 5 分間洗浄した後, 二次抗体として 50μl の 150 倍希釈した fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗鶏 IgG (Sigma) と 30 分間反応させた。その後, 同様に洗浄した後, 無蛍光のグリセリンを滴下し, カバーガラスをのせ, 蛍光顕微鏡 (OPTIPHOT, Nikon) にて鏡検した。なお, 陰性コントロールには一次抗体の代わりに normal chicken IgG (10μg/ml) を含む IMDM-10 (以下 IMDM-10-Neg) を用い, 陽性コントロールには一次抗体としてサルモネラ O4, O7, O8, O9 群抗血清 (デンカ生研) の 100 倍希釈液を, 二次抗体として FITC 標識抗ウサギ IgG (Sigma) を用いた。なお, 免疫蛍光染色は同一の手技を 3 回繰り返し行うことで再現性を確認した。

2.4 二次元電気泳動 (2-dimensional electrophoresis : 2-DE) による抗原解析

1) 等電点電気泳動 (iso electric focusing : IEF)

(1) サンプル調製 (可溶性)

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で行ったサンプルと同様に処置後, -80°C で冷凍していたサンプルを溶解し, 一次元膨潤/サンプルバッファー (UREA8M, Bio-Lyte3/10 (0.2%), 2% CHAPS, 0.001%

bromophenol blue, 50mM dithiothreitol : DTT を加えて調整) を 1 : 99 の希釈濃度で加え, 攪拌後蛋白を変性させるため, 10 分室温でインキュベートした。

(2) サンプルの膨潤と一次元目の泳動

調製したサンプルをフォーカシングトレイの電極線内に入れ, -20°C に冷凍していた Ready Strip (3/10) (Bio-Rad) のカバーをはがし, ゲル面をバッファーに均一に浸らせフォーカシングトレイのレーンの中に置いた。ストリップ全体がバッファーで均一に濡れたら乾燥防止のためミネラルオイルで静かに重層し, フォーカシングトレイにカバーを被せて PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad) の本体にセットし, 以下の条件を本体に記憶させ, 2 日間かけて定電圧泳動を行った。(初めに 12 時間の膨潤終了後, ステップ 1 : 250V を 20 分, ステップ 2 : 4,000V を 2 時間, ステップ 3 : 1,500V で 10,000Vhr になるまで, ステップ 4 : 500V 24 時間)

(3) SDS 平衡化と二次元目の泳動

Laemmli 法に基づいて 1.0mm 厚のガラスプレートで二次元目の SDS-PAGE 用のゲルを作製した (Laemmli, UK, 1970)。1 レーン当たり 1ml の平衡化バッファー (6MUREA, 2% SDS, 0.375M Tris-HCl · pH6.8, 20 % グリセロール, 130mMDTT) の入った膨潤トレイに一次元目の泳動が終わったストリップのミネラルオイルを拭き取り, ゲル面を上にして静かに沈め, 振とうしながら 8 分の平衡化を 2 回行った。その後, 同様に平衡化バッファー II (6MUREA, 2% SDS, 0.375M Tris-HCl · pH6.8, 20 % グリセロール, 135mM ヨードアセトアミド) 中にゲル面を上にして静かに沈め, 振とうしながら 8 分の平衡化を 2 回行った。作製しておいた 1%アガロース含泳動バッファー (1%ローメルトアガロース (Bio-Rad), 泳動バッファー 5ml, 0.001%

bromophenol blue) をゲルのウェルに入れた後、両端を 5mm ずつカットしたストリップを入れ、10 分間アガロースを固めた。凝固後、レディーゲルにセットし、泳動バッファーを満たし Protein Standard をアプライし、プレランとして 20V20 分泳動後、200V, 45 分泳動した。

2) 二次元泳動後の Western blotting

PVDF メンブレンへの蛋白の転写はポリアクリドアミドゲル電気泳動後の Western blotting と同様の方法で行った。転写後よく乾燥させたメンブレンに供試モノクローナル抗体を 2ml 室温で 1 時間インキュベートし、0.05% tween-20 添加 PBS で 3 回洗浄した。二次抗体にビオチン標識抗鶏 IgG 抗体 (Sigma) を 2ml (1% BSA-PBS で 2,000 倍に希釈) 室温で 1 時間インキュベートし、0.05% tween-20 添加 PBS で 2 回洗浄した。その後、10,000 倍希釈したアビジンペルオキシダーゼ (Sigma) を 2ml 室温で 1 時間インキュベートし、0.05% tween-20 添加 PBS で 2 回洗浄した。発色試薬 diaminobenzidine (DAB: Sigma) を調製し、メンブレンを試薬の中に入れ、室温で遮光し、20 分間反応させた。検出されたスポットは、molecular standard と比較し、分子量の測定を行った。

3. 結果と考察

本研究において実験 (1)~(8) までを実施して下記の結果を得た。(1) サルモネラの鶏への免疫、(2) 免疫したニワトリのサルモネラに対する抗体価の測定 (3) サルモネラに感作されたニワトリを用いた抗体産生ハイブリドーマの作製、(4) 体産生ハイブリドーマの選別、(5) (1) から (4) の過程、および、既に申請者の研究室にて作製した抗体産生ハイブリドーマの抗体可変領域をコードする cDNA の単離、(6) 抗体の重鎖および軽鎖を連結させた一本鎖可変領域 (scFv) DNA の

作製、(7) 抗サルモネラ組換え抗体発現プラスミドの調整、(8) 組換え抗体の大腸菌で作製までの行程を実施した。

実験 (1)~(4) までの結果を下記に示す。

- (1) 限界希釈法による再クローニング 限界希釈法による再クローニングを行い、ハイブリドーマのクローン化を行った。ELISA 法による一次スクリーニングと免疫蛍光染色法による二次スクリーニングにより発色した 3 種類のモノクローナル抗体を選び出した。
- (2) 二次元電気泳動, Western blotting 法による抗原蛋白の性状解析 選抜したモノクローナル抗体を用いて二次元電気泳動, Western blotting 法より抗原を解析した結果、モノクローナル抗体 A1 と A3 はどの抗原スポットも認識しなかったが、A2 は pH5.9, 約 88kDa の特異的なスポットを認識した。

その後、二次元電気泳動法にて抗原解析を実施した抗体について、モノクローナル抗体を産生する鶏ハイブリドーマの抗体可変領域をコードすると思われる部分遺伝子を増幅後 (VH と VL), 増幅した VH と VL をリンカーで結合した cDNA を作製し、EK1 認定宿主プラスミドベクター系を用いて大腸菌にて発現を試みたが、可変領域をコードする遺伝子の導入がうまくゆかず、最終的な抗体の産生には至らなかった。

文 献

- 1) Survey of Japanese layer farms for *Salmonella enteritidis* with vaccination- and infection-specific antigens for egg yolk antibodies. Mizumoto N, Toyota-Hanatani Y, Sasai K, Tani H, Ekawa T, Ohta H, Baba E. J Food Prot. 2006 69 (1) : 17-21.
- 2) Differential responses of macrophages to *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium. Okamura M, Lillehoj HS, Raybourne RB, Babu US, Heckert RA,

- Tani H, Sasai K, Baba E, Lillehoj EP., Vet Immunol Immunopathol. 2005 107 (3-4) : 327-35.
- 3) Increased lymphocyte subpopulations and macrophages in the ovaries and oviducts of laying hens infected Specific adhesion and invasion of Salmonella Enteritidis in the vagina of laying hens. Withanage GS, Sasai K, Fukata T, Miyamoto T, Lillehoj HS, Baba E. Vet Microbiol. 2005 111 (1-2) : 99-105.
- 4) Proliferative responses to canine thyroglobulin of peripheral blood mononuclear cells from hypothyroid dogs. Tani H, Nabetani T, Sasai K, Baba E. J Vet Med Sci. 2005 Apr;67 (4) : 363-8.
- 5) Recognition pattern of thyroglobulin autoantibody from hypothyroid dogs to tryptic peptides of canine thyroglobulin. Tani H, Shimizu R, Sasai K, Baba E. J Vet Med Sci. 2003 65 (10) : 1049-56.
- 6) Infectivity of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* to laboratory mice. Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M, Hajiri T, Tani H, Sasai K, Baba E. Vet Parasitol. 2005 129 (1-2) : 165-8.
- 7) Subgenotype analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from humans and animals in Japan using the 60-kDa glycoprotein gene sequences. Abe N, Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M. Parasitol Res. 2006 99 (3) : 303-5.
- 8) The detection of a novel type of *Cryptosporidium andersoni* oocyst in cattle in Japan. Matsubayashi M, Kimata I, Abe N, Tani H, Sasai K. Parasitol Res. 2004 93 (6) : 504-6.
- 9) Cross-reactivities with *Cryptosporidium spp.* by chicken monoclonal antibodies that recognize avian *Eimeria* spp. Matsubayashi M, Kimata I, Iseki M, Lillehoj HS, Matsuda H, Nakanishi T, Tani H, Sasai K, Baba E. Vet Parasitol. 2005 128 (1-2) : 47-57.
- 10) Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680-5.
- 11) Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (9) : 4350-4.

Specific antibody therapy for Salmonella food poisoning

Kazumi Sasai

(Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Department of Veterinary Sciences,
Graduate School of Life & Environmental Sciences, Osaka Prefecture University)

In Japan, inactivation vaccine with lower the protective efficacy is used as *Salmonella* prevention vaccine for the chicken now.

However attenuated live vaccine is used abroad, the *Salmonella* vaccine stock which we attenuated is at great risk of making it virulent in the outdoors, and there is limit for use of the vaccine. Therefore we paid our attention to oral passive immunity by the antibody and tried the manufacture of the antibody of the high-protective efficacy.

At first, we performed a re-cloning by the limiting dilution methods and cloned the hybridoma. We picked three kinds of monoclonal antibodies according to the data of Elisa and IFA. As a result of two dimensional electrophoresis, property analysis of the antigen protein by Western blotting method, we selected three kinds of monoclonal antibodies. As a result of having analyzed an antigen than two dimensional electrophoresis, Western blotting method, no antigen spot recognized monoclonal antibody A1 and A3, but A2 recognized a specific spot of about 88kDa, pH 5.9.

Using the antibody which performed antigen analysis by two-dimensional electrophoresis, we amplified the part gene that it seemed that we encoded an antibody variable region of the chicken hybridoma which produced a monoclonal antibody afterwards. We made the cDNA which connected VH and VL which we amplified in a linker and tried manifestation in *E. coli* using EK1 plasmid vector system, but were careless for the production of a definitive antibody without succeeding in genetic induction to encode a variable region.