

表 題 Salmonella Enteritidis (SE) 不活化ワクチンによる鶏腸管内  
SE 定着軽減メカニズムの検討

論 文 の 区 分 論文博士

著 者 名 石田 祐一

所 属 ワクチノーバ株式会社  
\_\_\_\_\_

2018年 10月 15日申請の学位論文

紹 介 教 員 地域医療学系 専攻 微生物・免疫学 専攻科  
職名・氏名 教授 崔 龍洙 \_\_\_\_\_

## 目次

要旨	-----	1
はじめに	-----	3
材料及び方法	-----	6
結果	-----	15
考察	-----	21
おわりに	-----	25
謝辞	-----	26
利益相反	-----	27
参考文献	-----	28

## ***Salmonella* Enteritidis (SE) 不活化ワクチンによる鶏腸管内 SE 定着軽減メカニズムの検討**

### **要旨**

*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis (SE)は、主に鶏卵や鶏加工品を介してヒトに食中毒を引き起こす病原細菌である。そのため養鶏業界において鶏卵及び鶏加工品の SE 汚染防止はサルモネラ食中毒を予防するための優先課題である。世界的に様々な SE 汚染対策が講じられる中で、最も有効な手段の一つとして鶏用 SE 生ワクチンや SE 不活化ワクチンが開発され実用化されている。しかし、SE 不活化ワクチンに関して実際に使用されているワクチンの作用メカニズムには不明な点が多い。そこで本研究では、現在本邦で用いられている SE 不活化ワクチンの鶏腸管内 SE 定着軽減メカニズムを明らかにすることを目的とした。

まず、SE 不活化ワクチンによる糞便中への SE 排出抑制効果を検討するために、5 週齢鶏に SE 不活化ワクチン接種後、その 4 週後に SE 生菌  $2.9 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$  CFU/mL を経口投与し、さらにその 6 日後に糞便中へ排出された SE 生菌数を測定した。ワクチン接種群では SE の糞便中排出菌数が  $5.5 \times 10^3 \sim 4.6 \times 10^5$  CFU/g であり、ワクチン非接種群の  $2.5 \times 10^5 \sim 3.2 \times 10^6$  CFU/g に対して少なかった ( $p < 0.05$ )。また、SE 不活化ワクチンの持続効果を検証するために、ワクチン接種 10 か月後に SE 生菌を投与したところ、ワクチン接種群の排菌数は少なかった ( $p < 0.05$ )。

次に、SE 不活化ワクチンによる抗体誘導能を検討するために、22 週齢鶏へのワクチン接種 4 週後の血液、小腸粘液及び卵管粘液中の抗 SE-IgG 抗体価及び抗 SE-IgA 抗体価を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) により

測定した。ワクチン接種群はワクチン非接種群と比較して抗 SE-IgG 抗体及び抗 SE-IgA 抗体を有意に産生していた ( $p < 0.05$ )。

最後に、SE 不活化ワクチンによる SE 細胞付着抑制効果を検討した。ワクチン接種 4 週後に得られた血清及び小腸粘液を用いて、SE 菌体の上皮細胞由来 Vero 細胞への付着能を測定した。ワクチン接種した 22 週齢鶏の血清添加によって、Vero 細胞へ付着した SE 菌体数 (平均±標準偏差) がワクチン非接種群と比較して、Vero 細胞 1 個当たり  $18.9 \pm 13.9$  個から  $6.8 \pm 7.4$  個へ減少した。同様に、小腸粘液の場合、ワクチン非接種群の  $11.5 \pm 10.4$  個からワクチン接種群の  $6.5 \pm 8.2$  個へ減少した ( $p < 0.05$ )。

本研究により、血清や小腸粘液と同様に、ワクチン接種鶏の卵管粘液に抗 SE-IgG 抗体と抗 SE-IgA 抗体が存在することが明らかになった。さらに、抗 SE-IgG 抗体と抗 SE-IgA 抗体を含有する小腸粘液によって Vero 細胞への SE 付着が抑制されたことから、SE 生菌がたとえ卵管に到達した場合であっても、卵管上皮細胞への SE 菌体付着の抑制効果があると推測される。つまり、SE 不活化ワクチン接種によって、卵管の汚染が原因で発生するインエッグ汚染の軽減効果も期待できると考えられる。

本研究によって、SE 不活化ワクチンは抗 SE 抗体を誘導し、当該抗体が腸管上皮細胞への SE 付着を抑制することで SE の定着を阻害し、その結果、腸管からの SE 排出が減少することが SE 不活化ワクチンの作用メカニズムの 1 つである可能性が示唆された。本研究は今後有効なワクチン開発の重要な基盤となることが期待される。

## はじめに

サルモネラ属菌は食中毒を引き起こす代表的な病原細菌の1つであり、ヒトや種々の動物に感染し下痢などの症状を引き起こす。また、血液に侵入して敗血症など全身症状を示すという報告もある[1]。ヒトにおけるサルモネラ食中毒の主な感染経路は鶏卵、鶏肉、菓子類などの食品であるが、その中でも主たる原因である鶏卵のサルモネラ汚染による食中毒は世界的にも大きな問題となっている。1986年以降、欧州各国においてサルモネラ属菌に汚染された鶏卵による食中毒が急増し、日本国内においても1999年には約12,000人がサルモネラ食中毒に罹患した。そのサルモネラ食中毒の発生事例数の中でも主要病原細菌として最上位を占めているのが *Salmonella Enteritidis* (SE) である。

SEを含むサルモネラ属菌は腸内細菌科に属するグラム陰性の通性嫌気性桿菌 ( $0.4\sim0.6\times1\sim3\mu\text{m}$ ) であり、一部の例外を除き、周毛性鞭毛を有し運動性を示す。また、菌体表面に多数の微細な線毛がみられることが多い[2]。サルモネラ属菌は普通寒天培地で好気的によく発育し、直径1~2mm程度のやや隆起した円形で、辺縁平滑な光沢のある集落を形成する。生化学性状としては、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性、大部分の菌はブドウ糖を発酵して酸とガスを産生し、炭素源としてクエン酸塩を利用し、インドールを産生しない。Voges-Proskauer (VP)テスト陰性、Methyl Red (MR) テスト陽性、硫化水素を産生し、ウレアーゼ陰性、リジン脱炭酸陽性である[2]。サルモネラ属菌は生物学的性状から *S. enterica*、*S. bongori* 及び *S. subterranea* の3種に分類され、さらに *S. enterica* は6亜種に分類される。また、血清学的には細胞壁リポ多糖体であるO抗原と鞭毛タンパク質であるH抗原との組み合わせで約2,600種類以上に分類され、その約10%が家禽から検出されている[3]。サルモネラ症はサルモネラ属菌に起因する重要な人獣共通感染症であり、家畜伝染病予防法に

おける鶏の法定伝染病であるひな白痢及び家禽チフスの原因菌以外の血清型によって生じるサルモネラ症は鶏パラチフスといわれる。この中で、SE 及び *S. Typhimurium* (ST)に起因するものはサルモネラ症として家畜伝染病予防法における届出伝染病に指定されている。

上記のように、SE はその汚染卵や他の鶏関連汚染製品を介してサルモネラ食中毒を引き起こす主要病原菌とされている。そのため、養鶏業界においては SE 汚染に対する予防対策が全世界的に重要な課題の 1 つであり、SE に対する鶏用ワクチンの研究が多く行われてきた。その結果、SE ワクチンが日本国内外で開発され、国内では 1998 年に SE 不活化ワクチンが初めて製造販売承認された。SE ワクチンには不活化ワクチンと生ワクチンがあり、主として不活化ワクチンが使用されている。そして、日本では不活化ワクチンのみが製造販売されている。

ワクチン開発上、感染機構の理解は重要な観点のひとつである。感染が成立するためには、感染部位への付着及び定着が必要であり、付着阻害は感染及び保菌阻止に重要である。このことは、サルモネラ感染でも指摘されている[4, 5]。*In vitro*における抑制効果について、SE の外膜タンパク質 (outer membrane protein ; OMP) 特異的 IgY による Caco-2 細胞 (ヒト結腸癌由来細胞) へのサルモネラ付着抑制[4]、SE 特異抗体による human epithelial type 2 (HEp-2) 細胞への SE 侵入抑制[6]、抗鶏フィブロネクチン抗体による卵巣顆粒膜細胞への SE 付着抑制[5]などが報告されている。また、Vero 細胞に対するサルモネラ属菌の侵入についての報告がある[7]。

近年では様々なワクチン材料を用いて多方面からの研究も行われている[8]。特に、“bacterial ghost” (BG) ワクチンの有用性が発見され、サルモネラ属菌でも研究されている。BG ワクチンのサルモネラ応用による特異 IgG や IgA の

誘導、細胞性免疫の惹起、鶏卵汚染の低減効果、CD4<sup>+</sup>及び CD8<sup>+</sup>T 細胞の増加などの効果が報告されている[1]。しかし、現在日本で使用されている SE 不活化ワクチンの効能及び効果「種鶏及び採卵鶏の腸管におけるサルモネラ・エンテリティディスの定着の軽減」に対して、その作用機序には不明な点が多い。そこで本研究では、SE 不活化ワクチンの鶏腸管内 SE 定着軽減メカニズムの解明を目的にして、ワクチン接種鶏における SE 生菌の腸管からの排菌抑制効果、血液と小腸粘液及び卵管粘液中の抗体産生、並びに当該血液及び粘液による SE 菌体の上皮細胞付着抑制について検討した。

## 材料及び方法

### 1. 実験動物

実験動物には、白色レグホーン鶏の特定病原体フリー (SPF) 鶏 (Australian SPF Services 社、オーストラリア) 由来の鶏を用い、孵化の時点からアイソレータ内で隔離飼育による 5 週間の馴化検疫期間 (設定温度は孵化時～7 日齢が 34℃、8～14 日齢が 30℃、15～21 日齢が 28℃、21 日齢以降 25℃以下) を設けた。次いで、温度管理下 (設定温度 20℃) でワイヤーケージ内にて個体別に隔離飼育した。ケージ下の糞受けにビニールを敷き、糞尿除去のためそのビニールを 1 週間に 2～3 回の頻度で交換した。検疫期間中、実験前に綿棒で鶏の糞便約 1 g を採取して遠心管 (50 mL ポリプロピレン・コニカルチューブ、FALCON、Corning 社、米国) に入れハーナテトラチオン酸塩基礎培地 (HTT ブロス、栄研化学) で 10 倍 (w/v) 希釈した。次いで、リン酸緩衝食塩液 (PBS, pH7.2) で 10 倍階段希釈したものを 100  $\mu$  L ずつ Deoxycholate-hydrogen sulfide-lactose 寒天培地 (DHL 寒天培地、栄研化学) に塗布して検査したところサルモネラ属菌は検出されなかった。当該 PBS の組成は、1 L 当たり NaCl 8g、KCl 0.2g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 2.9g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g を含むものである。水及び餌 (「鶏元気」ジャパンフィード、「フジマッシュ」鹿島飼料) については不断給水及び不断給餌とした。

本実験は、ワクチノーバ株式会社の動物実験委員会による承認を得、「農林水産省の所管する研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」に準拠した社内規程に従って実施したものである。

### 2. 供試菌株

本実験に用いたリファンピシン耐性 SE ファージタイプ 4 型の HY-1 株[9]は、



本邦の動物用生物学的製剤基準の「鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス）（油性アジュバント加）不活化ワクチン」の「力価試験」において規定されている株であり、中村政幸教授（北里大学、十和田市）から譲渡されたものである。ハートインフージョン培地（HIB、栄研化学）を用いて 37℃で約 6 時間、100 rpm にて振盪培養し、同容量の 10%スキムミルク液を添加（終濃度 5%）後、－80℃にて保存した。使用時にはその保存菌液の凍結表面を適量白金耳で採取して PBS 1 mL に懸濁し、DHL 寒天培地上に白金耳で画線塗抹後、37℃で 24 時間培養した。コロニー 2～3 個を白金耳で採取して HIB 50 mL に接種し 37℃で約 6 時間、100 rpm にて振盪培養し、同容量の HIB を加えて 2 倍に希釈して使用した。

### 3. 供試ワクチン

本実験では、市販の SE 不活化オイルエマルションワクチン「アビプロ SE」（農林水産省指令「19 動薬第 3564 号」、ワクチノーバ株式会社）の異なる 4 ロット（#SE16584G、#SE16587F、#SE16592F 及び#SE16555V）を用いて検討を行った。

### 4. ワクチン接種及び SE 排菌数測定

ワクチンによる SE 排菌数の測定は本邦の動物用生物学的製剤基準の「鶏サルモネラ症（サルモネラ・エンテリティディス）（油性アジュバント加）不活化ワクチン」の「力価試験」で規定される方法に従って実施した。5 週齢鶏に当該ワクチンを接種し、その 4 週後に SE 生菌懸濁液を経口投与し、さらに 6 日後、糞便中に排出された SE 生菌数を測定した。また、当該基準とは別に長期のワクチン持続効果を検証するために、別の 5 週齢鶏に当該ワクチンを接種し、

その 10 か月後に同様に SE 排菌数測定を行った（図 1）。

ワクチンは各 1 羽分 0.25 mL を鶏 10 羽に肩部皮下接種した。SE 生菌懸濁液は  $2.9 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$  CFU/mL をゾンデによって鶏の嗉嚢内へ 1 mL を経口投与した。予め重量測定し半分に切った綿棒を用いて約 1 g の糞便を採取し、予め重量測定した遠心管（50 mL ポリプロピレン・コニカルチューブ）に綿棒ごと入れた。排出された SE 生菌は、コニカルチューブ内の糞便を HTT ブロスで 10 倍（w/v）希釈し、次いで、PBS で 10 倍階段希釈した懸濁液を  $100 \mu\text{g/mL}$  のリファンピシン（和光純薬工業）含有 DHL 寒天培地に  $25 \mu\text{L}$  ずつ塗布した。好氣的条件下で  $37^\circ\text{C}$  にて 24 時間培養後、生育したコロニーを計測して糞便 1 g 当たりに含まれる SE 生菌数（CFU/g）を算出した。ワクチン非接種鶏 10 羽に対しても同様の処理を実施した。

本実験において、ワクチン接種から 4 週後に SE 生菌懸濁液を投与した試験では当該ワクチン 3 ロット（#SE16584G、#SE16587F 及び #SE16592F）についてそれぞれ独立した試験を実施した。すなわち、ワクチン接種群については 1 ロットに対してそれぞれ 10 羽の合計 30 羽、ワクチン非接種群についても同様に各ロット別にそれぞれ 10 羽の合計 30 羽を使用した。また、ワクチン接種から 10 か月後に SE 生菌懸濁液を投与した試験は 1 ロット分（#SE16555V）について実施した。

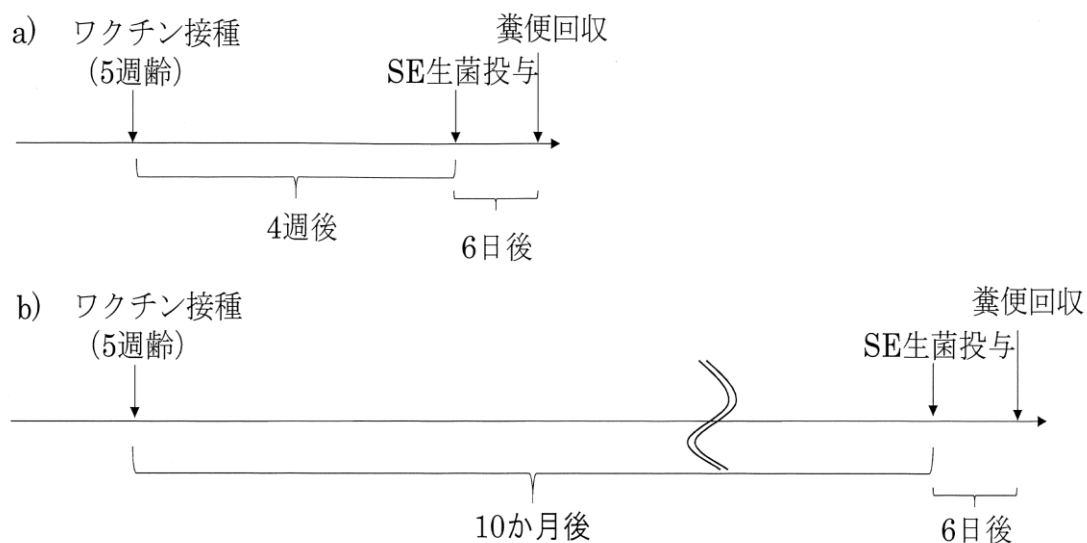


図 1 ワクチン接種及び排菌数測定の実験スケジュール

- a) ワクチン接種から 4 週後に SE 生菌懸濁液を投与した。その 6 日後に糞便を回収し、SE 生菌数を測定した。
- b) ワクチン接種から 10 か月後に SE 生菌懸濁液を投与した。その 6 日後に糞便を回収し、SE 生菌数を測定した。

## 5. 血清、小腸粘液及び卵管粘液採取

抗 SE-IgG 抗体及び抗 SE-IgA 抗体の測定、並びに、Vero 細胞への SE 菌体付着抑制効果の検討のために、当該ワクチン接種鶏及び当該ワクチン非接種鶏から血清、小腸粘液及び卵管粘液を採取した。本試験に関しては、5 週齢鶏では小腸及び卵管、特に卵管が未発達であり粘液採取が困難なため 22 週齢鶏 (5 羽) を用いた。22 週齢鶏に当該ワクチンを接種し、その 4 週後に血清、小腸粘液及び卵管粘液を得た (図 2)。

ワクチンは各 1 羽分 0.25 mL を 22 週齢鶏 5 羽に肩部皮下接種した。血清は 4 週後に上腕静脈から採血して血液凝固促進剤入りの真空採血管 (ネオチューブ、ニプロ) に入れ遠心処理 (約  $1,000 \times g$ 、10 分間) 後に得た。また、小腸粘

液及び卵管粘液の採取方法についてはWithanageらの方法 [10] を一部変更して用いた。すなわち、麻酔下での心臓採血による安楽死処置後、鶏の小腸及び卵管約 10 cm を無菌的に採取し一端を紐で結んだ。シリンジに結合させたシリコンチューブを他端に挿入して紐で結びそれを介して、小腸及び卵管の他端から 0.67%ウシ血清アルブミン (BSA、KPL 社、米国) を含む PBS 5 mL を注入し、PBS の吸引及び注入を緩やかに 10 回繰り返して小腸粘液及び卵管粘液を得た (図 3.1 及び図 3.2)。当採取工程にて約 10 倍希釈された小腸粘液及び卵管粘液を 10 秒間攪拌し、 $5,000 \times g$  ( $m/s^2$ ) にて 10 分間遠心処理して沈殿物を除去した。次いで、夾雑物を除去するために孔径  $1.0 \mu m$  のフィルター処理を行い、以降の実験における粘液サンプルとした。ワクチン非接種鶏群 (5 羽) に対しても同様の操作を施して、血清、小腸粘液及び卵管粘液を得た。

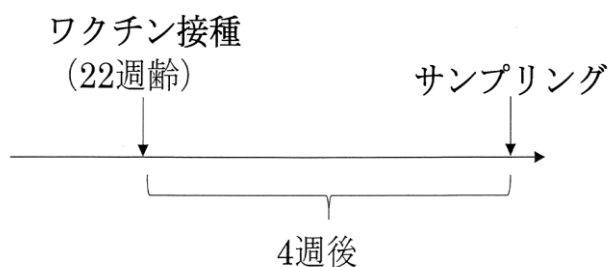


図 2 血清、小腸粘液及び卵管粘液採取のスケジュール



図 3.1 小腸粘液採取



図 3.2 卵管粘液採取

図 3.1 22 週齢鶏にワクチン接種し、4 週後に放血後、小腸を採取した。

小腸粘液を得るために 0.67% BSA 含 PBS を注入した。PBS の吸引及び注入を緩やかに 10 回繰り返した。

図 3.2 卵管、卵管粘液採取について小腸粘液採取と同様の操作を行った。

## 6. SE 特異抗体の検出

ELISA 測定用抗原には不活化 SE 全菌体を用い、Withanage らの方法[10]及び Desmidt らの方法[11]を一部変更して用いた。すなわち、培養した SE 菌液に対して終濃度 1 vol %になるようにホルマリン（和光純薬工業）を添加し常温にて 24 時間攪拌処理を行い、使用時まで 4℃にて保存した。遠心処理（5,000×*g*、15 分間）及び PBS による再浮遊を 3 回繰り返し、最終的に終濃度 0.2 vol %になるようにホルマリンを添加した。波長 660 nm における濁度が OD 1.5 になるように SE 菌液を PBS で調整し、その菌懸濁液 100 μL を平底 96 穴マイクロプレート（NUNC MaxiSorp、Thermo Fisher Scientific 社、米国）へ分注し、4℃にて一晩静置してマイクロプレート表面を SE 菌体でコーティングした。コーティング後、マイクロプレートウォッシャー（Wellwash Versa、Thermo Fisher Scientific 社、米国）を用い PBS 350 μL で 3 回洗浄

した。マイクロプレートに PBS で 1.0%に調整した BSA 溶液（10% BSA 希釈 /ブロッキング溶液、KPL 社、米国）を分注して常温で 6 時間静置しウェル表面をブロッキングした。Wellwash Versa を用い、0.02% Tween20 を含有する 0.002M イミダゾール緩衝食塩液（Wash Solution、KPL 社、米国、350  $\mu$  L）で 3 回洗浄後、「5. 血清、小腸粘液及び卵管粘液採取」に記載の方法で調製した測定サンプル（血清は 0.67% BSA 含有 PBS で 400 倍希釈、粘液はサンプリング時に約 10 倍希釈）100  $\mu$  L をウェルに分注し、37℃にて 2 時間静置した。Wellwash Versa を用い、Wash Solution 350  $\mu$  L で 3 回洗浄後、0.67% BSA 含有 PBS で 20 万倍希釈した Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗鶏 IgG 抗体または同 PBS で 8 万倍希釈した同標識抗鶏 IgA 抗体（ヤギ、Bethyl 社、米国）100  $\mu$  L をウェルに分注し、37℃にて 1 時間静置した。Wellwash Versa を用い、Wash Solution 350 $\mu$ L で 3 回洗浄後、Tetramethylbenzidine (TMB) 溶液 [SureBlue Reserve™ TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component) 、KPL 社、米国] 100  $\mu$  L を分注し、37℃にて 15 分間静置した。TMB 反応停止液（KPL 社、米国）100  $\mu$  L を分注し、常温で 5 分間静置後、マイクロプレートリーダー（Appliskan、Thermo Fisher Scientific 社、米国）を用いて波長 450nm における吸光度（A<sub>450nm</sub>）を測定した。1 つのサンプルについて 3 ウェルを用いて測定を行いその平均値を算出した。

## 7. Vero 細胞に対する熱不活化 SE 菌体の付着測定

初代鶏腎臓細胞は入手可能であったが、当該細胞はそこに付着した SE 菌体の顕微鏡観察が容易なほど平坦でも高光透過性でもなく、また、本実験に適した鶏株化上皮細胞がない。そこで、本実験では SE 菌体の侵襲性が報告[7]され

ており、より観察しやすいアフリカミドリザルの腎臓上皮細胞由来の Vero 細胞を用いた。SE 培養菌液は増殖及び自己凝集を防ぐために不活化処理を施した。具体的には、SE 培養菌液を遠心処理 ( $5,000\times g$ 、10 分間) 及び PBS による再浮遊を 3 回繰り返す、最終的に元の約 10 分の 1 容量になるように調整した。次いで、 $80^{\circ}\text{C}$ にて 10 分間の熱処理によって不活化した。Vero 細胞を、RPMI1640 培地 (和光純薬工業) を用いて細胞培養用ディッシュ ( $\phi 60\times 15\text{mm}$ 、FALCON、Corning 社、米国) 内で  $37^{\circ}\text{C}$ にて 5%  $\text{CO}_2$  条件下で加湿培養し、単層を形成させた。新たな培地 0.5 mL に交換後、波長 660nm における濁度が OD 0.15 になるように同培地で濃度調整した熱不活化 SE 菌液 0.5 mL を上記単層 Vero 細胞に添加し、5%  $\text{CO}_2$  条件下、 $37^{\circ}\text{C}$ にて 30 分間培養した。Vero 細胞を PBS で 2 回洗浄し非付着 SE 菌体を除去後、ライト・ギムザ染色液 (武藤化学) 1 mL を滴下して常温で 2 分間静置、次いで、PBS 1 mL を滴下して常温で 10 分間静置することによって Vero 細胞の固定及び菌体染色を行った。液を除去してから PBS で 2 回洗浄し、乾燥後、50 個の Vero 細胞をランダムに選択し、顕微鏡 (Labophoto-2 顕微鏡、Nikon、1,000 倍) 下で Vero 細胞に付着した SE 菌体数を測定し、Vero 細胞 1 個あたりに付着した SE 菌体数の平均値を算出した。

本実験において、熱不活化 SE 菌体は、「5. 血清、小腸粘液及び卵管粘液採取」に記載したワクチン接種鶏群またはワクチン非接種鶏群由来の血清または小腸粘液と予め反応させた。具体的には、PBS で濁度 OD 0.4 に調整した熱不活化 SE 菌液 0.5 mL と PBS で 100 倍希釈した血清または小腸粘液 (約 10 倍希釈液) 0.5 mL とをコニカルチューブ内で混合し  $37^{\circ}\text{C}$ にて 1 時間静置した。次いで、RPMI 培地 10 mL を添加し、遠心処理 ( $10,000\times g$ 、10 分間) 及び RPMI1640 培地 10 mL による再浮遊を 2 回繰り返す、最終的に

RPMI1640 培地 0.5 mL で再懸濁した。この菌懸濁液全量を単層 Vero 細胞に添加し、上記の通り、5% CO<sub>2</sub> 条件下、37℃にて 30 分間培養した。

血清及び小腸粘液ともにワクチン接種群及びワクチン非接種群由来のサンプルについて試験を行い、それぞれ各 50 個の Vero 細胞に対して SE 菌体付着数を計測した。本付着試験を 3 回繰り返し、それぞれ合計 150 個の Vero 細胞について測定した。

## 8. 統計学的解析

ワクチン接種鶏群及びワクチン非接種鶏群の糞便 1 g 中への SE 生菌排菌数の統計学的解析には、Wilcoxon-Mann-Whitney 検定を用いた。抗 SE 抗体価 (ELISA 値 A<sub>450nm</sub>) 及び Vero 細胞への SE 菌体付着数については、まず F 検定を実施したが等分散ではなかったため、Student の t 検定の改良版である Welch の t 検定 (両側検定) を用いた。



## 結果

### 1. SE 不活化ワクチンによる排菌数の測定

SE 不活化ワクチンによる糞便中への SE 排出抑制効果を検討した。本試験で  
使用した鶏に臨床的な異常は認められなかった。ワクチン接種群において糞便  
中への SE 生菌の排出数は、ワクチン接種から 4 週間後（図 4）及び 10 か月後（図  
5）ともに、ワクチン非接種群と比較して統計学的に有意に少なかった（ $p <$   
 $0.05$ ）。具体的な排菌数の値（平均±標準偏差）として、ワクチン接種から 4  
週間後の場合、ロット#SE16584G でワクチン接種群が  $1.2 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^6$   
CFU/g、ワクチン非接種群が  $6.7 \times 10^6 \pm 9.6 \times 10^6$  CFU/g、ロット#SE16587F  
でワクチン接種群が  $2.3 \times 10^5 \pm 5.1 \times 10^5$  CFU/g、ワクチン非接種群が  $2.7 \times 10^6$   
 $\pm 4.6 \times 10^6$  CFU/g、ロット#SE16592F でワクチン接種群が  $1.7 \times 10^5 \pm 3.7 \times 10^5$   
CFU/g、ワクチン非接種群が  $2.4 \times 10^6 \pm 5.2 \times 10^6$  CFU/g であった。また、ワク  
チン接種から 10 か月後の場合、ワクチン接種群が  $4.3 \times 10^6 \pm 1.0 \times 10^7$  CFU/g、  
ワクチン非接種群が  $4.5 \times 10^8 \pm 1.3 \times 10^9$  CFU/g であった。

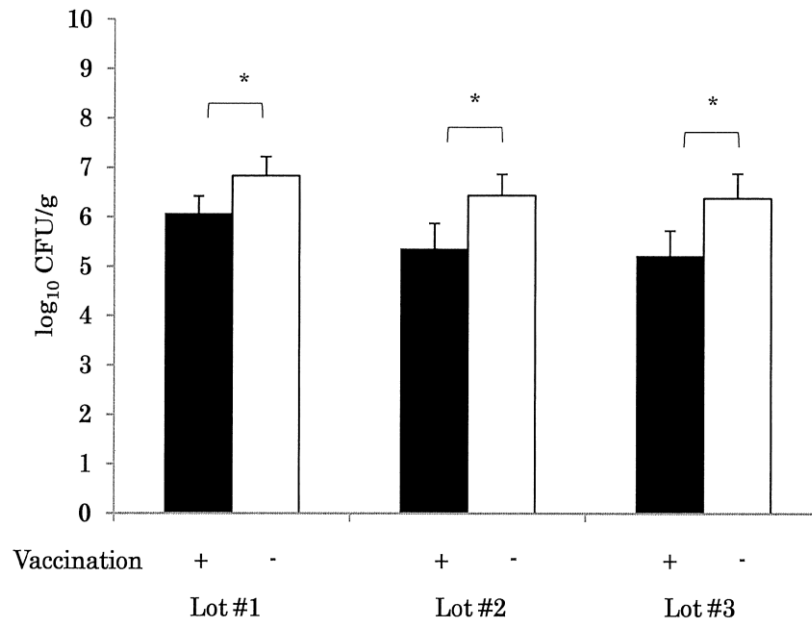


図 4 糞便中の SE 排菌数

ワクチン接種から 4 週後に *Salmonella* Enteritidis (SE) 生菌を経口投与し、6 日後に得られた糞便 1 g 中の SE 排菌数  
 数値は SE 排菌数の平均値±標準偏差 (n=10)

#1 ; #SE16584G、#2 ; #SE16587F、#3 ; #SE16592F

\*  $p < 0.05$

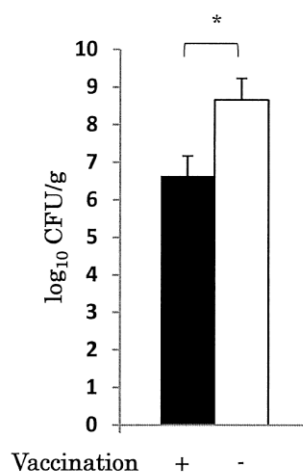


図 5 糞便中の SE 排菌数

ワクチン接種から 10 か月後に *Salmonella* Enteritidis (SE) 生菌を経口投与し、6 日後に得られた糞便 1 g 中の SE 排菌数

数値は SE 排菌数の平均値±標準偏差 (n=10)

Lot #SE16555V、\*  $p < 0.05$

## 2. ワクチン接種の有無による鶏の抗 SE 抗体の比較

ワクチン接種鶏における抗 SE 抗体検出を ELISA により検討した。22 週齢鶏にワクチンを接種し、4 週後に得られた血清並びに小腸粘液及び卵管粘液中の SE 特異抗体を測定したところ全サンプル中において抗 SE-IgG 抗体 (図 6) 及び抗 SE-IgA 抗体 (図 7) が検出された。一方、ワクチン非接種群由来のサンプルからは抗 SE-IgG 抗体、抗 SE-IgA 抗体はともに検出されなかった (図 6 及び図 7)。このとき、両クラスの抗体ともに、ワクチン接種群の ELISA 値はワクチン非接種群と比較して統計学的に有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。

具体的な  $A_{450nm}$  値 (平均±標準誤差) として、まず抗 SE-IgG 抗体については、血清 (400 倍希釈) ではワクチン接種群が  $0.362 \pm 0.013$ 、ワクチン非接種群が  $0.076 \pm 0.002$ 、小腸粘液 (約 10 倍希釈) ではワクチン接種群が  $0.698 \pm 0.129$ 、ワクチン非接種群が  $0.083 \pm 0.005$ 、卵管粘液 (約 10 倍希釈) ではワクチン接種群が  $0.836 \pm 0.022$ 、ワクチン非接種群が  $0.061 \pm 0.003$  であった。次に抗 SE-IgA 抗体については、血清 (400 倍希釈) ではワクチン接種群が  $0.523 \pm 0.058$ 、ワクチン非接種群が  $0.051 \pm 0.001$ 、小腸粘液 (約 10 倍希釈) ではワクチン接種群が  $0.596 \pm 0.069$ 、ワクチン非接種群が  $0.155 \pm 0.009$ 、卵管粘液 (約 10 倍希釈) ではワクチン接種群が  $1.169 \pm 0.238$ 、ワクチン非接種群が  $0.075 \pm 0.002$  であった。

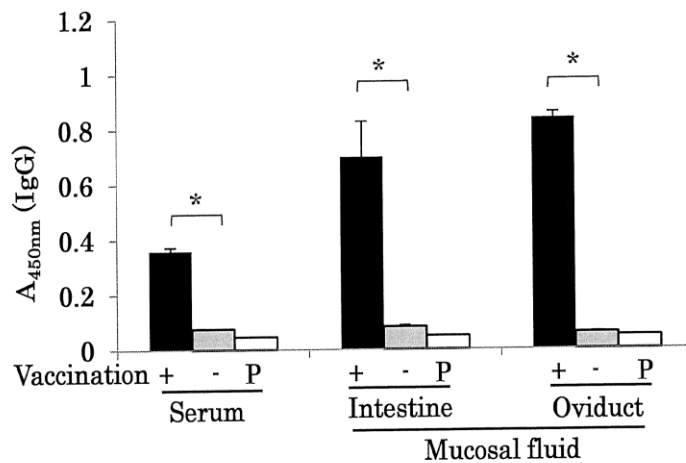


図 6 ELISA 値  $A_{450nm}$  (抗 SE-IgG 抗体)

ワクチン接種から 4 週後における鶏の血清、小腸粘液  
及び卵管粘液中の抗 SE-IgG 抗体 (P ; PBS、ブランク)  
(血清は 400 倍希釈、粘液は約 10 倍希釈)  
値は  $A_{450nm}$  の平均値±標準誤差 (各群 n=5)  
\*  $p < 0.05$

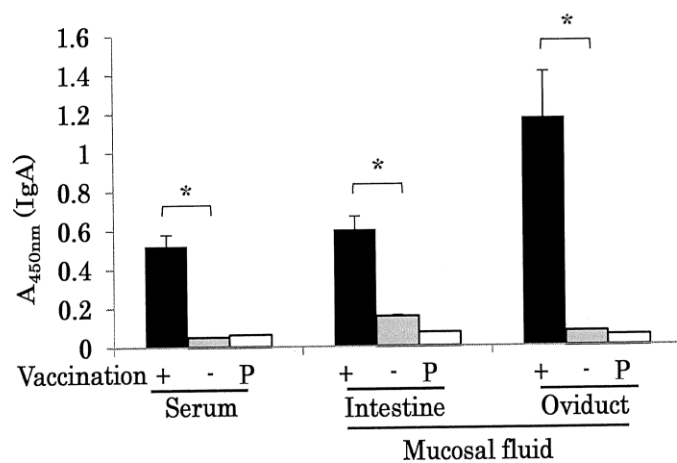


図 7 ELISA 値  $A_{450nm}$  (抗 SE-IgA 抗体)

ワクチン接種から 4 週後における鶏の血清、小腸粘液  
及び卵管粘液中の抗 SE-IgA 抗体 (P ; PBS、ブランク)  
(血清は 400 倍希釈、粘液は約 10 倍希釈)  
値は  $A_{450nm}$  の平均値±標準誤差 (各群 n=5)  
\*  $p < 0.05$

### 3. 上皮細胞への SE 付着に対する免疫血清及び粘膜液の抑制効果

ワクチン接種鶏由来の血清及び小腸粘液について、上皮細胞由来の Vero 細胞への SE 付着に対する抑制効果を検討した。加熱不活化した SE 菌体を、ワクチン接種群またはワクチン非接種群由来の血清（100 倍希釈）または小腸粘液（約 10 倍希釈）と反応させた後、37℃にて 30 分間、Vero 細胞に付着させたとき、ワクチン接種群の場合の SE 菌体付着数は、ワクチン非接種群と比較して統計学的に有意に少なかった（ $p < 0.05$ 、図 8）。具体的には、Vero 細胞 1 個あたりに付着した SE 菌体数（平均±標準偏差）はワクチン接種群由来の血清の場合  $6.8 \pm 7.4$  個、ワクチン非接種群では  $18.9 \pm 13.9$  個、また、ワクチン接種群由来の小腸粘液の場合  $6.5 \pm 8.2$  個、ワクチン非接種群では  $11.5 \pm 10.4$  個であった。なお、本実験は 3 回繰り返し行い、各回（ $n=50$ ）においてワクチン接種群とワクチン非接種群とで統計学的有意差が認められ、さらに、全試験を合計した場合（ $n=150$ ）にも同様に統計学的有意差が認められた。上記の具体的な付着菌体数及び図 8 は全試験を合計した場合（ $n=150$ ）を表したものである。

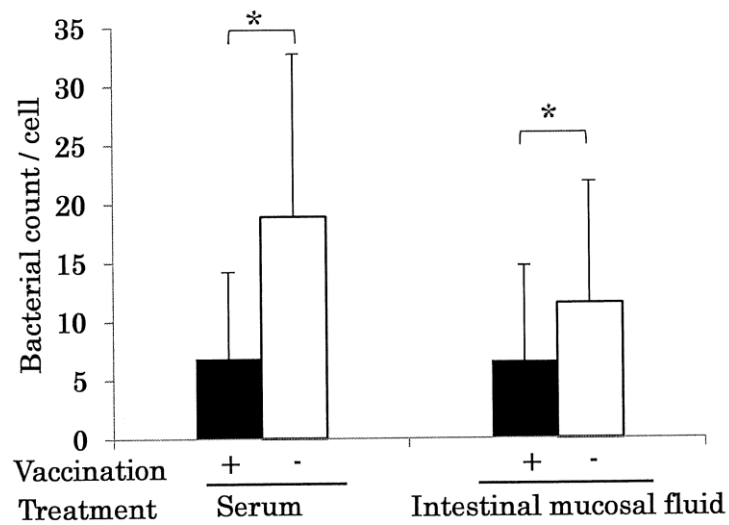


図 8 Vero 細胞への SE 菌体付着数

ワクチン接種から 4 週後における鶏の血清及び  
 小腸粘液による Vero 細胞への SE 付着抑制効果  
 値は Vero 細胞 1 個あたりに付着した SE 菌数の  
 平均値±標準偏差 (n=150)、\* $p < 0.05$

## 考察

本研究では SE 不活化オイルエマルジョンワクチンによる鶏腸管内 SE 菌体の定着軽減について、経口投与した SE 生菌の糞便中への排菌数抑制効果、血液中と小腸粘液中及び卵管粘液中における抗 SE-抗体産生、並びに当該血液（血清）及び小腸粘液による上皮細胞（Vero 細胞）への SE 菌体付着抑制効果を検討した。

糞便中への SE 排菌数抑制試験の結果から、当該ワクチンは鶏の腸管から糞便中への SE 排菌数を軽減させる効果（図 4）、すなわち、腸管内での SE 定着軽減効果を有し、また、その効果は少なくとも 10 か月に渡って持続することが確認された（図 5）。別の市販 SE 不活化ワクチン並びに O9 群、O4 群及び O7 群の生菌を用いた、同様な排菌抑制実験が報告されている[12]。その報告によると、その市販 SE 不活化ワクチンは O9 群の生菌の経口投与に対しては排菌抑制効果を示したが、O4 群の生菌の経口投与に対しては部分的な排菌抑制効果に止まり、O7 群の生菌の経口投与に対しては排菌抑制効果を示さなかった。本研究では O9 抗原を有する SE 生菌に対する排菌抑制効果を検討したが、今後、O4 抗原や O7 抗原を含めた種々の O 抗原を有する多様な血清型のサルモネラ生菌を用いた同様の排菌抑制試験により、当該ワクチンのより広範囲な排菌抑制効果の有無を検討する必要がある。

当該ワクチン接種鶏の血液並びに小腸粘液及び卵管粘液中の抗 SE 抗体を測定したところ、抗 SE-IgA 抗体及び抗 SE-IgG 抗体の存在が認められた（図 6 及び図 7）。この結果から、当該ワクチンの接種により、抗 SE-IgA 抗体と抗 SE-IgG 抗体を誘導できること及び誘導された当該抗体が血液中だけでなく小腸粘液中及び卵管粘液中にも存在することが確認された。IgA 抗体は哺乳類及び鳥類において、病原体に対する粘膜免疫に重要な役割を果たしていることが

多く報告されている[13, 14]。一方、IgG 抗体に関しては、ニューカッスル病不活化オイルエマルションワクチンを鶏に接種した場合、産生された特異 IgG 抗体が気管粘液や腸管粘液中へ滲出すること、さらに、それらの粘膜組織において抗体産生細胞が活性化されて特異 IgG 抗体が産生されることが報告されている[15]。本研究においても小腸粘液中に抗 SE-IgG 抗体の存在が確認されたことは、当該抗体が transcytosis など何らかのメカニズムによって血液中から滲出したこと、腸管粘膜において当該抗体産生細胞が活性化されたことを示唆している。しかし、IgG 抗体の腸管への分泌機構に関しては判然としていない。Yoshida らの研究によると、IgG 抗体の分泌メカニズムはヒトの腸管粘膜における IgA 抗体の分泌メカニズムとは異なること、すなわち、IgA 抗体はポリマー性 Ig 受容体を介して管腔側へ輸送されるのに対して IgG 抗体は neonatal Fc 受容体を介した移動が起こることが報告されている[16]。鶏における当該抗体の分泌メカニズムや産生メカニズム解明を目指し今後、抗 SE-IgA 抗体や抗 SE-IgA 抗体の存在が明らかな血清を SE ワクチン非接種鶏に静脈内投与した場合に当該鶏の腸管粘液からそれらの抗体が検出されるか、当該ワクチン接種鶏の腸管の組織培養を行った場合にその培養液からそれらの抗体が検出されるか等を検討する必要がある。

SE 加熱死菌をワクチン接種鶏由来の血清及び腸管粘液で前処理したところ、当該菌体の Vero 細胞への付着が統計学的に有意に低減された（図 8）。本実験において使用した細胞が鶏腸管上皮細胞ではないため確定的ではないが、この結果はワクチン接種鶏において腸管粘膜への SE 菌体の付着が小腸粘液によって阻害され、その結果として腸管から糞便中への排菌数軽減につながる可能性が示唆された。その付着抑制効果を示す原因因子は明確ではないが、特異抗体によるサルモネラ菌体の上皮細胞への付着抑制について、SE の外膜タンパク



質 (outer membrane protein ; OMP) 特異的 IgY による Caco-2 細胞 (ヒト結腸癌由来細胞) へのサルモネラ付着抑制効果[4]、SE 特異抗体による human epithelial type 2 (HEp-2) 細胞への SE 侵入抑制効果[6]が報告されている。従って本試験においても、当該因子としては抗 SE 抗体が予想される。今後、当該抗 SE-IgA 抗体及び抗 SE-IgG 抗体を予め吸収した小腸粘液を用いて同様の付着抑制実験を行い、当該抗体の寄与を検討する必要がある。

SE 汚染卵は食中毒の原因となることから養鶏産業における経済損失を招く深刻な問題である[17]。卵殻表面が汚染されるオンエッグ汚染卵については鶏卵選別包装施設 (GP センター) での洗卵殺菌、乾燥、検卵により除去できる。一方、卵巣及び卵管を介した卵内容汚染のインエッグ汚染卵については同処理の効果は無効である。本研究においては、ワクチン非接種鶏に対して SE 生菌を経口投与によって人為的に感染させることにより、腸管から大量の SE 生菌が検出されたが卵管から SE 生菌は検出されなかった。このため、卵管での SE 保菌状態への本ワクチンの効果は検討できなかった。中村らの研究グループも本実験と類似した結果を報告している。すなわち、16 週齢鶏に SE 生菌 1 mL ( $10^9$  CFU) を経口投与し、1 週後及び 2 週後に卵巣から SE 生菌の回収を試みたが SE 生菌は検出されなかった[18]。従って、経口的に体内に入った SE 生菌は、腸管で増殖しても卵管には侵入し難いと思われる。一方で、鶏に SE 生菌を静脈内投与によって当該菌体を感染させたとき、卵巣及び卵管から SE 生菌が回収されたことが報告されている[19]。すなわち、菌血症の状態になると SE 生菌は卵巣及び卵管に到達する可能性のあることが示唆されている。

鶏の卵管においては SE に対する液性免疫が SE による卵汚染の防止に重要な役割を果たしており[10]、サルモネラ食中毒の予防に対して重要である。本研究でワクチン接種鶏の卵管粘液からも小腸粘液と同様に、抗 SE-IgG 抗体及

び抗 SE-IgA 抗体の存在が認められた。従って、SE 生菌がたとえ卵管に到達した場合であっても、その部位における SE 菌体付着の抑制効果が期待できる可能性がある。また、ワクチン接種鶏では血液中で抗 SE-IgG 抗体の存在が認められており、SE 菌血症の抑制効果も期待できる可能性がある。本研究の SE 排菌数抑制試験においては、動物用生物学的製剤基準の当該製剤の力価試験の方法に基づいて経口投与による SE 生菌の投与を行った。当該ワクチン接種鶏へ SE 生菌を静脈内投与した場合の卵管における SE 生菌の付着抑制効果を検証することによって、当該ワクチンのさらなる効果が見出される可能性がある。

## おわりに

*Salmonella Enteritidis* はヒトのサルモネラ食中毒の主要病原細菌であり、その主要汚染源である鶏卵や他の鶏加工品の汚染予防対策は、養鶏業界においては世界的に重要な公衆衛生上の課題である。そこで、SE 生ワクチン及び SE 全菌体を用いた不活化ワクチンが開発され実用化されている。現在もワクチン開発は継続されているが、実用化されている不活化ワクチンの作用メカニズムには不明な点が多い。そこで本研究では、現在本邦で用いられている SE 不活化ワクチンの鶏腸管内 SE 定着軽減メカニズムについて検討した。その結果、当該ワクチン接種鶏において、腸管から糞便中へ排出される SE 菌数の軽減、血液並びに小腸粘液及び卵管粘液における抗 SE-IgA 抗体及び抗 SE-IgG 抗体の存在、さらに血液（血清）及び小腸粘液による上皮細胞（Vero 細胞）への SE 付着抑制を確認することができた。

本研究によって、「不活化ワクチンにより誘導された抗 SE 抗体が鶏腸管上皮細胞への SE 付着を抑制し、その結果、腸管からの SE 排菌数の抑制につながる」という一連の作用メカニズムを示唆することができた。本研究は今後有効なワクチン開発の重要な基盤となることが期待される。

## 謝辞

本稿作成にあたり、懇切丁寧にご指導いただきました玉野総合医療専門学校の平井義一校長（自治医科大学細菌学部門前教授）、尚絅大学の下村裕史教授、自治医科大学の崔龍洙教授、渡邊真弥准教授、氣賀恒太郎講師、佐藤祐介助教及び相羽由詞助教に深謝いたしますとともに心より厚く御礼申し上げます。リファンピシン耐性 **SE HY-1** 株を分与していただきました北里大学の中村政幸教授には大変感謝しております。また、**SE** 生菌投与試験並びに鶏小腸液及び卵管液採取試験においてご協力いただいた、ワクチノーバ株式会社品質管理部及び開発統括部の皆さまに深謝いたします。自治医科大学細菌学部門の皆さまには様々な機会にご協力いただき感謝いたします。

## 利益相反

本研究で使用した供試ワクチンは、ワクチノーバ株式会社が本邦にて製造販売承認を有し、同社が本邦にて製造販売している動物用医薬品である。

## 参考文献

- [1] Wei P, Wei S, Lu Y, Huifang L, Shenye Y, Sigou L, Chunlai W, Yuehong C, Zhuo Z, Shouping H, Yanfen D. *Salmonella enteritidis* ghost vaccine induces effective protection against lethal challenge in specific-pathogen-free chicks. *Immunobiology*. **216**: 558-565、2011
- [2] 鶏卵・鶏肉のサルモネラ全書、第1版、鶏病研究会、1998
- [3] 鳥の病気、第8版、鶏病研究会、2014
- [4] Raja C, Andre T, Yves B, Christopher M, Daniel P, Yves-Jacques S. Adhesion and growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium *in vitro*. *Foodborne Pathog Dis*. **6**: 593-604、2009
- [5] Dorairajan T, Mahdi S, John T, Elikplimi A. *In vitro* attachment and invasion of chicken ovarian granulosa cells by *Salmonella enteritidis* phage type 8. *Infect Immun*. **64**: 5015-5021、1996
- [6] Ianko DI, Dragomir PP, Ivan VM, Iana HH, Ivan GM. Lipopolysaccharide-specific but not anti-flagellar immunoglobulin A monoclonal antibodies prevent *Salmonella enterica* serotype Enteritidis invasion and replication within HEp-2 cell monolayers. *Infect Immun*. **70**: 1615-1618、2002
- [7] Barrow PA, Lovell MA. Invasion of Vero cells by *Salmonella* species. *J Med Microbiol*. **28**: 59-67、1989
- [8] Irshad AH, Pervaiz AD, Gayeon W, John HL. Bacterial ghosts as adjuvants: mechanisms and potential. *Vet Res*. **48**: 37、2017
- [9] Nakamura M, Nagamine N, Suzuki S, Norimatsu M, Oishi K, Kijima M,

Tamura Y, Sato S. Long-term shedding of *Salmonella* Enteritidis in chickens which received a contact exposure within 24 hrs of hatching. *J Vet Med Sci.* **55**: 649-653, 1993

[10] Withanage GS, Sasai K, Fukuta T, Miyamoto T, Baba E. Secretion of *Salmonella*-specific antibodies in the oviducts of hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis. *Vet Immunol Immunop.* **67**: 185-193, 1999

[11] Desmidt M, Ducatelle R, Mast J, Goddeeris BM, Kaspers B, Haesebrouck F. Role of the humoral immune system in *Salmonella* Enteritidis phage type four infection in chickens. *Vet Immunol Immunopathol.* **63**: 355-367, 1998

[12] Nakamura M, Nishimura H, Nagata T, Takehara K. The effect of *Salmonella* Enteritidis inactivated vaccine on shedding of O9, O4, O7 serovars of *Salmonella*. *J Jpn Soc Poultry Dis.* **38**: 149-152, 2002

[13] Blutt SE, Miller AD, Salmon SL, Metzger DW, Conner ME. IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection. *Mucosal Immunol.* **5**: 712-719, 2012

[14] Sun Q, Shang Y, She R, Jiang T, Wang D, Ding Y, Yin J. Detection of intestinal intraepithelial lymphocytes, goblet cells and secretory IgA in the intestinal mucosa during Newcastle disease virus infection. *Avian Pathol.* **42**: 541-545, 2013

[15] Zoth SC, Gomez E, Carrillo E, Berinstein A. Locally produced mucosal IgG in chickens immunized with conventional vaccines for Newcastle disease virus. *Braz J Med Biol Res.* **41**: 318-323, 2008

- [16] Yoshida M, Claypool SM, Wagner JS, Mizoguchi E, Mizoguchi A, Roopenian DC, Lencer WI, Blumberg RS. Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity*. **20**: 769-783, 2004
- [17] De BJ, Van IF, Haesebrouck D. A REVIEW Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. *J Appl Microbiol*. **97**: 233-245, 2004
- [18] Nakamura M, Nagamine N, Takahashi T, Suzuki S, Sato S. Evaluation of the efficacy of a bacterin against *Salmonella* enteritidis infection and the effect of stress after vaccination. *Avian Dis*. **38**: 717-724, 1994
- [19] Woodward MJ, Gettinby G, Breslin MF, Corkish JD, Houghton S. The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying hens. *Avian Pathol*. **31**: 383-392, 2002