

食中毒起因菌 *Campylobacter jejuni* の  
低温損傷に関する分子生物学的研究

麻布大学大学院 獣医学研究科  
獣医学専攻 博士課程 分子生物学  
DV0961 飯田奈都子

# 目次

序文	3
第1章 Duplex SYBR Green real-time PCR 法による食中毒起因菌 16 遺伝子 の一斉検索法の開発	5
第2章 低温 (4°C) 保存による <i>C. jejuni</i> の VBNC 状態の作製	14
第3章 VBNC 状態の <i>C. jejuni</i> の遺伝子発現変化	20
第4章 VBNC 状態の <i>C. jejuni</i> を回復させる条件の検討	27
総括	34
引用文献	39
謝辞	46
図表	47

## 序文

*Campylobacter* spp.は、近年、多くの先進諸国において高頻度に検出される下痢症起因菌である (Mead *et al.* 1999; Coker *et al.* 2002; Adak *et al.* 2005; 厚生労働省 IASR. 2010)。日本においては、1982年に *Campylobacter jejuni* と *Campylobacter coli* が食中毒起因菌として指定され、1983年から厚生労働省の食中毒統計に掲載されるようになった。現在、*C. jejuni* / *C. coli* による食中毒は、細菌性食中毒において全国的に発生件数が最も多い食中毒であり (厚生労働省. 食中毒事件一覧速報; 図 1)、その予防対策を講じることが急務となっている。また、*C. jejuni* は、感染の結果、腸炎や発熱等の症状を引き起こすだけでなく、近年では、手足の麻痺や重症になると呼吸不全を伴うギラン・バレー症候群との関連性が指摘され (Rees *et al.* 1993; McCarthy *et al.* 2001)、発生件数の多さのみならず、病態の深刻さからも重要性が増している細菌である。

*Campylobacter* spp.は、その発育に酸素濃度が 3~15%の微好気条件を必要とする細菌である。そのため、実験的には大気中の酸素濃度では、すみやかに培養不能となる。しかし、*C. jejuni* によるヒトへの感染は、 $10^2$  個程度の少ない菌数でも引き起こされることがあるため (Robinson. 1981; Black *et al.* 1988)、たとえ汚染のレベルが低い場合でも食中毒の発生するリスクは高い。さらに低温下で保存した水や食品中では比較的長期間生存できる特徴がある。これらが、*Campylobacter* 食中毒の発生防止を難しくしている原因として挙げられている (三澤ら. 2005)。

日本において *Campylobacter* 食中毒の原因となる菌種は、主に *C. jejuni* である。原因食品として、鶏肉が疑われる場合が多く、その流通および保存は冷蔵や冷凍といった低温温度帯である。低温は、多くの細菌にとって不都合な環境であり、*C. jejuni* もまた、低温による損傷やストレスを受け、細胞の増殖能力が低下して、生きているが培養できない、いわゆる viable but non-culturable (以下、VBNC) 状態になることが

確認されている。(Lázaro *et al.* 1999; Chaisowwong *et al.* 2012)。

*C. jejuni* の VBNC 状態は、1986 年に Rollins と Colwell によって初めて報告 (Rollins and Colwell 1986) されて以来、pH や低温等の様々なストレス要因によって、この状態に入り込むことが多くの研究者によって報告されている (Lázaro *et al.* 1999; Chaveerach *et al.* 2002; Murphy *et al.* 2006; Jackson *et al.* 2009; Chaisowwong *et al.* 2012)。この状態の *C. jejuni* を、発育鶏卵に接種したり、実験動物に経口投与することにより、培養可能な生菌が回収されたという報告 (Cappelier *et al.* 1999; Baffone *et al.* 2006) があり、VBNC 状態は、食中毒発生の潜在的なリスク因子として食品衛生上の重要性が示唆されている。

*Campylobacter spp.* による食中毒を制御するためには、本菌の特徴に応じた検査法や予防対策が必要である。つまり、培養可能な状態の菌のみならず、VBNC 状態の菌も検出可能な検査法を確立すること、そして、生き延びる温度帯である低温における本菌の生存機構を分子レベルから解明することが非常に重要である。しかし、*Campylobacter spp.* の低温下での損傷および回復に関する分子機構は、ほとんど明らかにはなっていない。

本研究では、まず、*C. jejuni* が低温損傷などによる VBNC の状態にあっても検出可能な方法として、遺伝子検査法である real-time PCR 法を活用した検査法を確立した。その際、食中毒検査は、様々な菌種に応じた煩雑な検出操作と長時間培養を要することから、他の主要な食中毒起因菌も含めて一斉に検索できるシステムを確立し、実際の臨床検体へ導入して検査法の有用性を検討した (第 1 章)。次に、*C. jejuni* を PBS(-) 中に低温 (4°C) で保存することによって、実験的に *C. jejuni* の VBNC 状態を作製した (第 2 章)。そして、VBNC 状態の遺伝子発現を、real-time RT-PCR 法およびマイクロアレイ法を用いて調べ、VBNC 状態への移行に関連する候補遺伝子を推定した (第 3 章)。さらに、VBNC 状態から回復させる条件とその再現性についても検討した (第 4 章)。

# 第 1 章 Duplex SYBR Green real-time PCR 法による食中毒 起因菌 16 遺伝子の一斉検索法の確立

## 序論

食中毒事件が発生した場合、感染拡大防止や危害の未然防止など公衆衛生の観点から、早急な病因物質ならびに原因食品などの究明が求められる。現在、細菌性食中毒の検査では、主に培養法が主体であるが、培養法による検出は、煩雑な操作と長時間培養を伴うだけでなく、原因菌の潜む検体の環境条件にも左右されやすい。すなわち、細菌が低温や低栄養などの環境条件によって、生理活性状態を変化させ、VBNC あるいは死菌の状態、検体に存在している可能性が考えられる。このような場合には、培養法では原因となった菌を分離することは不可能である。

細菌性食中毒の中で、最も発生件数の多い *C. jejuni* 食中毒は、感染源すなわち原因食品を特定することが困難な場合が多い。この原因として、原因食品が残っていないことの他に、細胞が死菌あるいは VBNC 状態にあり、生菌分離が困難であることが推測されている (上野ら, 2009)。特に、検体の凍結・融解によって菌体が損傷を受け、*C. jejuni* の生残性は、著しく減少することが報告されている (三澤ら, 2005)。

細菌を検出する方法には、培地によるコロニー検出や顕微鏡による菌体検出などがあるが、近年では、各種病原細菌に特有の遺伝子配列が解明され、PCR 法などによる遺伝子検出が、感染症の原因究明に広く利用されるようになってきた (Fukushima *et al.* 2003; Matsuki *et al.* 2004; Ott *et al.* 2004)。低温における長期間培養や栄養飢餓の実験では、コロニーの検出が消失した VBNC の状態においても、長期にわたり、検出可能な DNA が菌体に保持されていることが観察されている (Yamamoto *et al.* 1996; Weichart *et al.* 1997; Lázaro *et al.* 1999)。そのため、検体に存在する病原細菌の遺伝子を検出することで、病原細菌の培養が困難な状況でも食中毒の病因物質の特定や食品

の汚染実態の把握に寄与することが可能である。

第1章では、*C. jejuni*などの食中毒起因菌が培養可能な状態の場合のみならず、VBNC状態のような潜在的な菌であっても、包括的かつ迅速に検出する方法として、検体からDNAを抽出し、検体DNA中からreal-time PCR法により食中毒起因菌の遺伝子を検索する検査法を、既報のプライマーの組み合わせを改良して構築した。本検査法の技術は、Fukushimaらが開発したmultiplex SYBR Green real-time PCR法による食中毒起因菌の24遺伝子の一斉スクリーニング法（Fukushima *et al.* 2010）を参考にした。しかし、Fukushimaらの方法は、対象遺伝子が24種類と多いため、その作業は煩雑であり、菌種の同定の要となるPCR増幅産物のT<sub>m</sub>値の差が1℃以上確保されていないために判定に苦慮する場合があるなど、現場への実践的な導入には向いていない。そこで、本研究では、実際の食中毒検査において、より現場の実情に即した検査法とするため、対象を主要な食中毒起因菌の16種類（遺伝子として16種類）に絞り、PCR増幅産物のT<sub>m</sub>値の差をできるだけ大きく確保することにより、作業や判定が容易で、発生頻度の高い食中毒起因菌を一斉に検索して確実に検出できるシステムに改良した。さらに、本検査法を実際の食中毒事件で採取された臨床検体に導入し、方法の有用性について検討した。

## 材料と方法

### 対象微生物

対象とした食中毒起因菌は、過去 10 年間に静岡県で発生した食中毒事件を参考に 16 種類を選定した。すなわち、最も発生件数の多かった *C. jejuni* に加え、*Salmonella* spp.、下痢原性大腸菌 diarrheagenic *Escherichia coli* (腸管出血性大腸菌 (EHEC)、腸管病原性大腸菌 (EPEC)、腸管凝集性大腸菌 (EAEC)、腸管侵入性大腸菌 (EIEC)、毒素原性大腸菌 (ETEC))、*Shigella* spp.、*Bacillus cereus* (emetic toxin producing *B. cereus* and enterotoxigenic *B. cereus*)、*Clostridium perfringens*、*Staphylococcus aureus*、*Vibrio parahaemolyticus*、*Yersinia enterocolitica*、*Y. pseudotuberculosis*、*Listeria monocytogenes* の 16 菌種とした。

### 菌株

菌株は、静岡県環境衛生科学研究所微生物部に保管されている株を各遺伝子につき 3 菌株ずつ選択し、検査法の特異性の確認で使用した。陽性コントロールとしての菌株は、*C. jejuni* ATCC 700819 (*C. jejuni* specific gene)、*Salmonella* Typhimurium ATCC13355 (*invA*)、*E. coli*-EHEC O157:H7 09089 (*stx2*)、*E. coli*-EHEC O26:H11 09009 (*stx1*)、*E. coli*-EPEC 050922 (*eaeA*)、*E. coli*-EAEC 05102 (*astA*)、*E. coli*-EIEC O124:HNM E93254 (*virA*)、*E. coli*-ETEC 2002.10 (*st* および *lt*)、*Bacillus cereus* 04158 (*ces* および *nheB*)、*C. perfringens* 09019 (*cpe*)、*S. aureus* ATCC 6538P (*femB*)、*V. parahaemolyticus* O3:K6 (*tdh*)、*Y. pseudotuberculosis* 08009 (*yadA*)、*L. monocytogenes* ATCC19115 (*hly*) を用いた。

### DNA 抽出

QIAamp DNA Stool Mini kit (QIAGEN)を用い、上記の菌種の純培養液 (200 $\mu$ L) お

よび糞便検体（最大 200mg）から、キット添付のプロトコールに従って DNA 抽出を行い、PCR のテンプレートとした。

## 検出用プライマー

上記の 16 菌種を検出するために標的とした 16 種類の遺伝子および検出用プライマーは、過去の報告（Bubert *et al.* 1997; Fukushima *et al.* 2003; Nguyen *et al.* 2005; Fukushima *et al.* 2009; Fukushima *et al.* 2010）を参考にして、real-time PCR 法に適した短い増幅産物が得られるものを選定した。Duplex PCR 法では、1 つの反応で複数遺伝子が同時に検出される場合を考慮し、反応系には主要な食中毒菌のうち 1 種類ずつを含み、PCR 反応で競合することがないように組み合わせを考えた。さらに、各反応系における 2 種類の PCR 増幅産物の T<sub>m</sub> 値の差を、可能な限り大きく確保した。使用したプライマーの配列および PCR 増幅産物の T<sub>m</sub> 値を表 1 に示した。

## Duplex SYBR Green real-time PCR 反応

表 1 の A~H に示す 8 系列の duplex SYBR Green real-time PCR を、96 穴マイクロプレートおよび ABI7500 Real-Time PCR システムを用いて行った。各系列は、1 列あたり 12well で構成され、陰性コントロール、陽性コントロール（2 種類）、テンプレート DNA サンプルを含む。反応液の組成は、2× SYBR Premix DimerEraser (TaKaRa) 10μL、2 種類のプライマー（10μM）forward および reverse を 0.8μL、ROX Reference Dye II 0.4 μL、滅菌蒸留水 4.4μL およびテンプレート DNA 2μL に調製し、PCR 反応液 20μL を作製した。反応条件は、95°C で 30 秒加熱後、95°C ・ 5 秒、55°C ・ 30 秒、72°C ・ 40 秒を 30 サイクル行った。判定は、融解曲線分析で、陽性コントロールとサンプルの PCR 増幅産物の T<sub>m</sub> 値を比較して確認した。



## 検出限界の測定

検出限界は、各菌株の培養液の菌数（CFU）を測定後、抽出 DNA を 10 倍段階希釈した DNA テンプレートを用い real-time PCR 法を行って、検体 1g あたりの検出限界（CFU/g）を測定した。

## 臨床検体への導入

2009 年～2012 年に、静岡県内で実際に発生した食中毒関連の 12 事例（表 2）の冷凍あるいは冷蔵保存されていた患者糞便検体（200mg 以下）を用いて DNA 抽出を行い、real-time PCR 法を実施し、培養法による分離結果と比較した。なお、本試験で取り扱う対象は人体より採取された検体であるため、「島根県保健環境科学研究所倫理審査委員会」に審議を求めたが、取り扱う対象が行政検査対象物であるため、特に倫理面の問題は生じないと判断され、疫学研究の倫理指針に基づき、「非該当」の承認を得た。

## 結果

### 食中毒起因菌の duplex SYBR Green real-time PCR 法の構築

本研究で構築した duplex SYBR Green real-time PCR 法は、8 反応系で 2 種類ずつの食中毒起因菌の遺伝子の特異的に検出することが可能であり（図 2）、合計で 16 種類の対象遺伝子をそれぞれ特異的に検出することが可能であった。各反応系の組み合わせで、陽性コントロールの  $T_m$  値の差は  $1.9^{\circ}\text{C}$  以上を確保した（表 2）。96 穴マイクロプレートを用いた場合、サンプルは最大 9 検体まで検査可能であった。

### 検出限界の測定

各食中毒起因菌の本検査法での検出限界は、DNA QIAamp DNA Stool Mini Kit（供試検体量は 200mg）で抽出した場合、検体 1g あたりに換算すると約  $10^3\sim 10^6\text{CFU/g}$  であった（表 3）。そのうち、約  $10^3\text{CFU/g}$  は *V. parahaemolyticus* および ETEC、約  $10^6\text{CFU/g}$  は *S. aureus* であり、その他の菌種は約  $10^4\sim 10^5\text{CFU/g}$  であった。*C. jejuni* は約  $10^4\text{CFU/g}$  であった。

### 臨床検体への導入

静岡県で実際に発生した細菌性食中毒関連事例の患者糞便検体の原因菌を特定するため、本検査法を実施したところ、全 12 事例において培養法での分離菌と同じ菌種の遺伝子が検出され（表 2）、培養法と同等の結果を 3~4 時間で得ることが可能であった。全 12 事例の病因物質別の内訳は、*C. jejuni* が 4 事例と最も多く（事例 2、3、7、8）、*C. perfringens* が 3 事例（事例 1、4、9）、*Salmonella* spp. が 2 事例（事例 5、11）で、*V. parahaemolyticus*、*S. aureus*、*Y. pseudotuberculosis* が各 1 事例であった（それぞれ事例 6、12、11）。本検査法は、食中毒の主な原因となった細菌の遺伝子のみならず、複数の遺伝子が検出された事例もあった（事例 2、3、5、6、8、9、11、12）。

臨床検体、特に少量しか残っていない糞便検体を用いた場合に、サンプルの  $T_m$  値が陽性コントロールの  $T_m$  値とは完全に一致しないものの、 $-1^{\circ}\text{C}$ 以内の近似値を示すことがあった。Fukushima らは、融解曲線分析で陽性と判定する場合、陽性コントロールの  $T_m$  値 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以内としていることから、本研究においても同様に判定した。

事例3は *C. jejuni* 食中毒であり、検査した糞便検体7検体 (S1~S7) のうち、培養法では S6 は陰性であり、他の6検体からは *C. jejuni* が検出された。この事例の糞便検体から DNA を抽出し、real-time PCR 法を行ったところ、サンプル S6 を除いた6検体の PCR 増幅産物の  $T_m$  値は *C. jejuni* 陽性コントロールと同値あるいは $-1^{\circ}\text{C}$ 以内の値を示し、*C. jejuni* 陽性と判定された。この検出結果は、培養法での分離結果と一致していた。事例8の *C. jejuni* 食中毒では、培養法により4検体のうち2検体から菌が分離され (S2およびS4)、サンプル S1 および S3 は陰性であった。この事例の real-time PCR 検査では、菌が分離された2検体だけでなく、培養法で *C. jejuni* が検出されなかったサンプル S3 も、融解曲線分析でピークが得られた (図4)。S3 の  $T_m$  値も、 $76.3^{\circ}\text{C}$  と *C. jejuni* の陽性コントロールの  $T_m$  値  $77.0^{\circ}\text{C}$  の $-1^{\circ}\text{C}$ 以内の値を示したことから、*C. jejuni* 陽性と判定され、real-time PCR 法では4検体中3検体から *C. jejuni* の特異的な遺伝子が検出された (表2)。

## 考察

本研究で構築した検査法は、duplex SYBR Green real-time PCR 法を活用することにより、食中毒起因菌の 16 遺伝子をそれぞれ特異的に検出することが可能であった (図 2)。参考とした Fukushima らが開発した方法 (Fukushima *et al.* 2010) も、24 種類の対象遺伝子をそれぞれ検出することは可能である。しかし、multiplex PCR 法とすることで一般的に検出感度は低下し、操作が煩雑となる。さらに、24 種類のうち検出頻度の低い食中毒起因菌も対象とすることは、未だ経験していない病原菌による食中毒にも対応できるが、通常の食中毒検査では検出頻度の高い食中毒起因菌を簡便かつ確実に検出できる方法を望む場合も多い。そのため、Fukushima らの方法は食中毒起因菌の一斉検査として有用な検査法ではあるが、各自治体の現場での検査へ導入するには難しいと考えられた。

本研究の real-time PCR 法は、食中毒検査において、より現場の実情に即した検査法へ改良された。すなわち、主要な食中毒起因菌の 16 遺伝子を対象としたことにより、その操作を簡便にし、PCR 増幅産物の Tm 値の差を 1.9°C 以上確保することによって融解曲線分析での判定を容易にした。検出限界は、約  $10^3 \sim 10^6$  CFU/g であり、食中毒起因菌の菌種間で差が認められた (表 3) が、一般に食中毒等の患者糞便には  $10^6$  CFU/g 以上の病原菌が含まれるため、実用上の一斉迅速スクリーニング法として問題ないと判断した。つまり、本検査法は頻度の高い食中毒起因菌を迅速かつ確実に検出する実用的な方法であると考えられた (Iida *et al.* 2013)。

実際に静岡県内で発生した食中毒関連事例の患者糞便検体を用いて、本研究の real-time PCR 法を実施したところ、全 12 事例で従来の培養法で分離された原因菌と同じ菌種の遺伝子が検出された (表 2)。さらに、培養法では原因菌の特定に、通常では 2~4 日間以上要するところを、本検査法では DNA 抽出も含めて 3~4 時間で原因菌を推定した。特に、長期間培養を要する菌 (*C. jejuni* 等)、毒素産生性等の確認が

必要な菌 (*C. perfringens* や ETEC) についても迅速かつ確実に検出でき、構築した検査法の有用性を証明することができた。さらに、複数の遺伝子が検出された事例では、サンプル中に原因菌以外にも他の食中毒起因菌が含まれていたことが示唆され、重複感染の推定も可能であることが示唆された (Iida *et al.* 2013)。

事例 8 の *C. jejuni* による食中毒事例では、培養法で *C. jejuni* の生菌が分離されなかったサンプル S3 が、本検査法では *C. jejuni* の遺伝子が検出され、陽性と判定された (図 4、表 2)。この理由として、糞便中に含まれる *C. jejuni* が VBNC あるいは死菌の状態であったため、培養法では不検出であったが、遺伝子検査である本検査法では検出されたことが考えられた。このことから、構築した検査法は、VBNC 状態の細胞についても十分検出できる方法であると考えられた。

## 第2章 低温(4°C)保存による *C. jejuni* の VBNC 状態の作製

### 序論

*C. jejuni* はグラム陰性、無芽胞のらせん状桿菌 (0.2~0.8×0.5~5µm) である。両端もしくは一端に、鞘のない極鞭毛を持ち、コルクスクリュー様の回転運動をする。発育には酸素濃度が 3~15%の微好気条件を必要とし、実験的には好気条件下では容易に死滅するが、低温条件では長期間の生存が可能であり、低温ストレスによって、生きているが人工培地で培養できない、Viable but Non-Culturable (VBNC) の状態になることも報告されている (Buswell *et al.* 1998; Lázaro *et al.* 1999; Chan *et al.* 2001; El-Shibiny *et al.* 2009; Chaisowwong *et al.* 2012)。

*C. jejuni* による食中毒の最も重要な媒介物は鶏肉であり (Notermans *et al.* 1992; Corry *et al.* 2001)、その流通および保存は冷蔵や冷凍といった低温温度帯である。*C. jejuni* は、微好気条件かつ 32~45°Cの温度範囲でのみで増殖するため、通常では、本菌が食品中での増殖はないと考えられる。しかし、*C. jejuni* の発症菌数は 10<sup>2</sup> 個程度ともいわれ (Robinson. 1981; Black *et al.* 1988)、食品に付着して冷蔵保存で生き残ったわずかな本菌によって感染が成立する可能性がある。したがって、*C. jejuni* 食中毒の予防策においては、菌の増殖に注意を払うよりも、抵抗性、生残性など本菌の生理学的特徴を念頭においた対策を講じる必要がある。しかし、*C. jejuni* の低温における生存機構等については明らかになっていない。

本研究では、*C. jejuni* を PBS(-)中で低温の 4°Cで保存し、菌の生残性や培養能の経時的変化や菌体の形態変化を調べ、低温保存による VBNC 状態の実験的な作製について検討した。

## 材料と方法

### 菌株および菌液調製

ヒト患者由来株である *C. jejuni* ATCC 700189 (*C. jejuni* NCTC 11168 と同等) を本実験で使用した。保存培地 (−80°C) から 1 白金耳をウマ血液寒天培地 (BD) に接種し、37°C で 48 時間、微好気条件 (5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、85% N<sub>2</sub>) で培養した。培養後、平板上の 1 集落を試験管内の、37°C で 24 時間、微好気培養した。培養液 50 μL を新たな Mueller Hinton Broth (Difco) 5 mL に接種し (16 本)、37°C で 16 時間、微好気培養した。この対数増殖期後期の状態の培養液を 8,000×g で 5 分間遠心した後、沈渣を PBS(-) で再浮遊させた。この操作を再度行った後、4°C に冷却した PBS(-) で *C. jejuni* の最終濃度を約 10<sup>8</sup> CFU/mL に調整し、300 mL の菌液を作製した。その後、菌液を速やかに 14 mL のポリプロピレン ラウンド・チューブ (FALCON) へ 10 mL ずつ分注し、4°C に設定したインキュベータ内で静置保存した。

### 生残性および培養能試験

静置直後および保存後は菌の生残性や培養能の経時的変化をみるため、1 週間毎に 12 週間目まで、全菌数、生存率および培養可能な菌数を測定し、測定項目ごとに平均値を算出した。総菌数はアクリジンオレンジ (和光純薬工業)、生存率は LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability Kits (Molecular Probes) で染色後、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX60、UV フィルター) で測定した。生存率は、1,000 倍で 200~300 の菌数について生菌数 (緑色) と死菌数 (赤色) をカウントし、生菌が占める比率から生存率を算出した。培養可能な菌数は、菌液を PBS(-) で 10 倍段階希釈し、各希釈液の 100 μL を mCCDA 培地 (OXOID) およびウマ血液寒天培地に各 2 枚ずつコンラージ棒を用いて塗抹し、37°C で 48 時間、微好気培養後、平板上の集落数の平均値から菌数を算出した (塗抹平板培養法)。これらの試験は 10 回以上行い、各菌数や生存率の経

時的变化について再現性を確認した。

## 菌体の形態観察

4°Cにおいた静置直後と12週間後の菌液を、蛍光顕微鏡および透過型電子顕微鏡（日本電子、JOEL-1230）で観察した。蛍光顕微鏡では、LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability Kits で染色したものを観察した。また、電子顕微鏡観察では、菌液を2%リンタングステン酸によるネガティブ染色を施し、親水化処理したコロジオン膜貼付メッシュ（日新EM）を用いて観察した。



## 結果

### 生残性および培養能試験

*C. jejuni* を PBS(-)中で 4°C12 週間静置保存したところ、全菌数は期間を通して変化はほとんどなかった。生存率は、最初はほぼ 100%であったが、12 週間後には 70～80%をであった。培養可能な菌数については、mCCDA 培地では 8 週間目以降、血液寒天培地では 11 週間目以降、培地上での集落形成が認められなくなった (図 5)。

### 形態変化

4°Cにおいた静置直後と 12 週間後の菌液を、蛍光顕微鏡で観察したところ、静置直後ではらせん状であった本菌は、12 週間後では多くの菌が球状 (coccoïd form) に変化していた。電子顕微鏡による観察でも、VBNC 状態では球形化した菌体を認め、鞭毛については両端に保持したままであった (図 6)。

## 考察

*Campylobacter* spp.は、高温かつ乾燥状態に弱く、これまで環境に弱い細菌であると考えられていた。しかし、*Campylobacter* spp.は VBNC の存在が明らかになるなど、食品を含む様々な厳しい環境で生存するために必要な環境適応機構を兼ね備えていることが明らかとなってきた（三澤. 2005; Murphy. 2006）。特に、*C. jejuni* の低温における生残性や VBNC 状態等の生理学的特徴は、本菌が汚染した鶏肉が食中毒の主な感染源で、そのような食材が冷蔵状態で流通していることを考慮すると、十分に理解しておく必要がある。

第 2 章では、実験的に *C. jejuni* を鶏肉の保存・流通温度である冷蔵温度（4℃）に静置保存し、その生存率と培養能の変化を経時的に調べ、最終的に VBNC 状態の作製を試みた。その結果、11 週間経過して、非選択性培地である血液寒天培地上で集落形成がみられなくなっても、菌液に含まれる全菌数のうち 70~80% が生存していた（図 5）。本研究で使用した LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits は、細胞膜の構造安定性によって死菌と生菌を判別できる（Haugland. 1996; Boulos *et al.* 1999）。このことから、12 週間保存した場合でも、菌体の細胞膜は安定していることが示唆された。12 週間後の菌体の形態は、多くの菌で本来のらせん状から球状（coccoid form）に変化している様子が確認された（図 6）。このように、*C. jejuni* が低温などのストレスに暴露されることによって、菌の形態が球形化することは、過去の報告（Rollins *et al.* 1986; Lázaro *et al.* 1999; Chaveerach *et al.* 2002; Murphy *et al.* 2006; Jackson *et al.* 2009; Chaisowwong *et al.* 2012）と同様であった。

VBNC 状態とは、「生きているが培養できない」状態である。しかし、どのような培地を使用して「培養できない」状態を VBNC 状態と判定するかについては、明確な定義がない。VBNC に関する研究の多くは、血液寒天培地やトリプケースソイ寒天培地などの非選択性培地を用いて培養能を調べているが、各研究によって定義付ける

必要がある。また、*C. jejuni* が VBNC 状態に至る期間は、菌株によって異なることも報告されている (Jones *et al.* 1991; Terzieva *et al.* 1991; Chan *et al.* 2001)。本研究においては、mCCDA 培地で培養できなくなった 8 週間目の時点では、血液寒天培地ではまだ培養可能であることから、いわゆる“損傷菌”の状態が混在していると推測される。一方で、11 週間目以降では、生きているが非選択性培地の血液寒天培地であっても培養できない状態であり、菌体の形態も球状 (coccoid form) であることを確認した。そこで、本研究では、VBNC 状態の定義を「血液寒天培地で集落形成しない状態」とした。そして、*C. jejuni* を PBS(-)4°C で 12 週間保存して、生きているが血液寒天培地で培養できなくなった状態を“VBNC 状態”、静置直後の培養可能な状態を“通常状態”として、以後の実験を行うこととした。なお、第 2 章で作製した VBNC 状態の *C. jejuni* は、第 1 章で確立した real-time PCR 検査法でも、検出可能であることを確認した (データは示していない)。

## 第3章 *C. jejuni* の VBNC 状態の遺伝子発現変化

### 序論

細菌の VBNC 状態への移行は、細菌が外部刺激によるストレスに適応し、生き延びるために、自らの生理活性状態を変えていることが考えられる。*C. jejuni* が低温で長期間生存することや VBNC に入り込むことは、現象として既に報告されているものの (Buswell *et al.* 1998; Lázaro *et al.* 1999; Chan *et al.* 2001; El-Shibiny *et al.* 2009; Chaisowwong *et al.* 2012)、その分子機構については、ほとんど解明されていない。*C. jejuni* は、32~45°Cの温度範囲で増殖する細菌であるが、最高発育温度付近だけでなく、最低発育温度付近においても、2~3°Cの違いで増殖率が突然低下し、全く増殖しなくなることが報告されている (Hazeleger *et al.* 1998)。さらに、*C. jejuni* は、*E. coli* などの他菌種で報告されている主要な低温ショックタンパク質 (CspA) を保有していないことが、PCR 法、ゲノム解析およびタンパク質の解析から推測されている (Qoronfleh *et al.* 1992; Hazeleger *et al.* 1998; Parkhill *et al.* 2000)。

第3章では、低温による *C. jejuni* の VBNC 状態への移行について分子機構を解明するために、特に遺伝子発現変化に注目した。過去に、5°Cの短時間暴露による *C. jejuni* の遺伝子発現を網羅的に比較解析し、エネルギー代謝に関する遺伝子の発現が増加していたとの報告 (Moen *et al.* 2005) はあるが、低温暴露により VBNC 状態となった菌について、遺伝子発現変化の網羅的な解析に関する報告は見当たらない。そこで、*C. jejuni* を第2章の実験と同様に PBS(-)4°Cで保存し、12週間後の VBNC 状態に至る過程で RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法およびマイクロアレイ法により遺伝子発現を解析することで、通常状態から VBNC 状態への移行に関与する特異的な遺伝子の探索を行った。

## 材料と方法

### RNA 抽出

*C. jejuni* の RNA は、4°C 静置直後（通常状態）、1 週間後（短期間低温状態）および 12 週間後（VBNC 状態）の菌液から抽出した。まず、菌液を 4°C で 8,000×g、5 分間遠心して集菌し、RNAprotect Bacteria Reagent（QIAGEN）を用いて RNA を安定化させた。その後、RNA は NucleoSpin RNA II（MACHERY-NAGEL）を用いて抽出し、RNase-free H<sub>2</sub>O 60μL で RNA を溶出した。ゲノム DNA を分解するため、DNase 処理は、RNase-Free DNase Set（QIAGEN）を用い、最終溶液量を 100μL に調製後、室温（20~25°C）で 10 分間、DNase 反応を行った。その後、NucleoSpin RNA Clean-up XS（MACHERY-NAGEL）で RNA の濃縮と精製を行い、抽出 RNA の濃度と純度を測定した。

### real-time RT-PCR 法

*C. jejuni* のそれぞれの状態の菌液から抽出した RNA について、SuperScript III（invitrogen）を用いて cDNA を合成し 1ng/μL に調製後、SYBR Green を用いた real-time PCR 法で mRNA の発現量を定量解析した。対象遺伝子は、過去に報告されている *V. cholerae* における低温ストレスと VBNC 化に関する研究（Asakura *et al.* 2006）や *C. jejuni* の増殖温度に関する研究（Stintzi. 2003）等を参考に選定し、低温ストレスや VBNC に関与すると推測された 60 遺伝子（表 4）とした。そのプライマーは、フリーソフトの Primer3Plus（<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>）を用いて設計した（表 5）。反応液の組成は、KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2×) Universal（KAPA BIOSYSTEMS）、プライマー各 0.4μM、Rox Reference Dye II 0.4μL、cDNA 溶液（1ng/μL）2μL で、滅菌蒸留水を用いて全量 20μL とした。装置は、7500 Real-Time PCR system を用い、95°C で 30 秒処理後、95°C・5 秒、60°C・40 秒の反応を

40 サイクル繰り返した後、融解曲線分析を行った。結果の解析は、SDS software を用いて行い、 $\Delta\Delta Ct$  法により定量解析した。

## 内部標準遺伝子の検討

内部標準遺伝子は、Ritz らの *C. jejuni* の内部標準遺伝子に関する検討の報告をもとに (Ritz *et al.* 2009)、4 つの候補遺伝子 (*ilvC*、*rpoA*、*slyD*、*thiC*) について検討した。4°C 静置直後 (0h)、4 時間後 (4h)、7 日後 (7d) の各時間の菌液から RNA を抽出し、候補とした 4 種類の各遺伝子について、上記の real-time RT-PCR 法により、それぞれの時間における遺伝子発現を比較した。

## マイクロアレイ法

Filgen 社の DNA マイクロアレイ遺伝子発現受託解析サービスにより、マイクロアレイ実験を行った。比較したサンプルは、4°C 静置直後の通常状態の菌と 12 週間後の VBNC 状態の菌に加え、短期間低温状態の 4°C 静置後 1 週間の菌も加え、3 点での遺伝子発現をそれぞれ比較し、3 通りの解析を行った。実験は、Agilent 2100 Bioanalyzer により total RNA の品質を確認後、T7RNA 増幅を行って Cy5 で標識し、Filgen Array *Campylobacter jejuni* を用いてハイブリダイゼーションを行った。その後、スキャニングおよびデータ解析により数値化し、*C. jejuni* の 1680 遺伝子について解析した。なお、*C. jejuni* のゲノムサイズは、約 1.6Mb であり (Parkhill *et al.* 2000)、今回の解析に用いた 1680 遺伝子は、ほぼすべての遺伝子を網羅している。

## 結果

real-time RT-PCR 法で使用する内部標準遺伝子の検討では、*rpoA* が他の 3 遺伝子と比較して最も安定して発現していることを確認した (図 7)。そのため、以後の実験では *rpoA* を内部標準遺伝子として採用した。

real-time RT-PCR 法によって、静置直後 (0h) の菌と 12 週間後 (12w) の菌について 60 種類の遺伝子発現を比較し、2 倍以上の変化に注目したところ、12 種類 (*cj0909*、*flaC*、*cadF*、*dcuB*、*sdhC*、*pebC*、*cj1371*、*cj0864*、*ciaB*、*cj1541*、*cdtA*、*cj0758*) が確認でき、全て減少した遺伝子であった (表 6A)。顕著に増加した遺伝子はなく、約 1.5 倍ではあるが安定して発現の増加が認められた遺伝子は 5 種類 (*cj0920*、*katA*、*cj0334*、*kgtP*、*cj0358*) であった。

マイクロアレイ法では、*C. jejuni* の 1680 遺伝子について、静置直後 (0h)、1 週間後 (1w)、12 週間後 (12w) の遺伝子発現をそれぞれ比較解析した (12w vs 0h、1w vs 0h、12w vs 1w)。2 倍以上の変化に注目すると、1680 遺伝子の変化の内訳は表 6B の通りであり、各データの ScatterPlot を図 8 に示した。変化のあった遺伝子について、タンパク質の機能と発現変化の比率を表 7 に示した。

*C. jejuni* の VBNC 状態に関与する遺伝子の探索では、VBNC 状態の「培養できない」という状態から、関連する酵素の活性が減少していると推測し、発現の減少した遺伝子に注目した。そして、4°C で静置後 1 週間での発現の減少は、VBNC 状態への移行ではなく、低温に置いたことの影響によると推測し、該当する遺伝子を除外して候補遺伝子を絞り込んだ。すなわち、マイクロアレイ法による結果において、静置直後と 1 週間との比較では 2 倍の変化は確認されなかった 1628 種類の遺伝子に含まれ、なおかつ、1 週間と 12 週間との比較では 0.5 倍以下の減少がみられた遺伝子を候補対象とした。その結果、候補となった遺伝子は *hisI*、*cj0728*、*cj0849*、*sdhC*、*cj0988*、*lola* の 6 種類が確認された。

マイクロアレイ法により候補として挙げられた遺伝子のうち、コハク酸デヒドロゲナーゼサブユニット C (SdhC)をコードする遺伝子は、先に行った real-time RT-PCR 法による結果にも発現の減少する遺伝子として含まれていた。そこで、1 週間目の変化も加えて real-time RT-PCR 法により *sdhC* の発現の定量的解析を実施したところ、マイクロアレイ法による変化と同様に、4°C 静置 1 週間後では減少せず、12 週間後には 0.5 倍以下に減少することを確認した (図 9)。

SdhC は、TCA サイクルに関連する酵素であるコハク酸デヒドロゲナーゼ Sdh を構成するサブユニットである。そこで、Sdh に関連する他のサブユニット A,B をコードする遺伝子 (*sdhA*, *sdhB*) についても注目したところ、マイクロアレイ法では 1 週間から 12 週間の変化では 0.5 倍以上の変化を認めなかったものの (表 9)、*sdhC* と類似したパターンを示していることが明らかとなった。この変化について、real-time RT-PCR 法で確認したところ、*sdhA* および *sdhB* も *sdhC* と同様に 1 週間後の遺伝子発現は変化せず、12 週間で約 0.5 倍に変化することが明らかとなった (図 9)。



## 考察

第3章では、*C. jejuni* の VBNC 状態に関する分子レベルの解析の一つとして遺伝子発現について注目し、real-time RT-PCR 法およびマイクロアレイ法により解析した。

real-time RT-PCR 法では、静置直後（通常状態）と12週間後（VBNC状態）の遺伝子発現を比較した結果、2倍以上の変化は全て減少した遺伝子で、12種類であった（表6A）。この結果より、VBNC状態への移行には、特に減少する遺伝子の関与が推測された。VBNC状態では「培養できない」という状態から、関連する酵素の活性が減少していると推測し、マイクロアレイ法では、*C. jejuni* の VBNC 状態に関与する候補遺伝子の探索方法として、発現の減少した遺伝子に注目することにした。そのうち、4°Cで静置後1週間目に発現の減少した遺伝子は除外することとした。その理由は、静置直後、1週間後、そして12週間後の3点について遺伝子発現を比較し、減少の変化のパターンを見ると、1週間後に遺伝子発現の減少がみられるパターンと、1週間後はあまり変化はないが、12週間後には減少しているパターンの2パターンがあり、1週間という早い段階で発現が減少するパターンは、培養能の低下というよりも、単に低温に置いたことの影響が予想されたためである。培養能の変化は、第2章の培養可能な菌数を測定する実験（図5）から、1週間後はまだ培養が可能な菌が大半で菌数は変化せず、12週間後にまったく培養できない状態になったことから、遺伝子発現でも培養能と同様な減少パターンを示す遺伝子を検索対象とした。その結果、マイクロアレイ法で解析した *C. jejuni* の 1680 遺伝子のうち、検索対象とした遺伝子は、6 遺伝子 (*hisI*、*cj0728*、*cj0849*、*sdhC*、*cj0988*、*lolA*) であり、タンパク質の機能が明らかでない遺伝子は3種類 (*hisI*、*sdhC*、*lolA*) であった。このうち、コハク酸デヒドロゲナーゼサブユニット C (SdhC) をコードする遺伝子の発現は、先に実施した real-time RT-PCR 法による遺伝子発現変化においても減少した遺伝子に含まれていた。そこで、この *sdhC* に注目し、1週間後の変化も加えた3点の real-time RT-PCR 法による *sdhC*

の定量的解析を実施したところ、1週間後にはあまり変化しないが、12週間後には0.5倍以下に減少し、マイクロアレイ法と同様の傾向を示した。さらに、*sdh*に関連する他のサブユニット A、B (*sdhA*、*sdhB*) の遺伝子発現についても、マイクロアレイ法および real-time RT-PCR 法で、*sdhC* と同様の経時的変化を示すことが確認された (図9)。

Sdh は TCA サイクルに関与する酵素であり、Sdh はコハク酸からフマル酸に酸化するとき作用する酵素である (図10)。VBNC 状態でこの酵素をコードする *sdh* の遺伝子発現が有意に減少していた本実験の結果より、この酵素反応の低下や停止が VBNC 状態への移行に関連するのではないかと推測され、*sdh* が VBNC 状態への移行に関連する候補遺伝子の一つとして示唆された。本実験で候補に挙げられた他の遺伝子は、その機能面から VBNC 状態への関与は低いと推測されたため、詳細な解析は実施しなかった。

## 第4章 VBNC 状態の *C. jejuni* を回復させる条件の検討

### 序論

VBNC 状態になることが証明されている病原細菌は、現在のところ、約 50 種に達している (Oliver. 2010)。近年は、これらの細菌の VBNC 状態に関して遺伝子発現解析やプロテオーム解析等の様々な側面から研究が行われ、VBNC 状態の菌の回復についても多くの研究が行われるようになった (Wai *et al.* 1996; Steinert *et al.* 1997; Mizunoe *et al.* 2000; Reissbrodt *et al.* 2002; Gupte *et al.* 2003; Panutdaporn *et al.* 2006)。回復させる方法は様々であり、温度変化によるもの (Wai *et al.* 1996)、アンモニウム塩が存在する培地でヒートショックを加えるもの、カタラーゼやピルビン酸のような過酸化水素除去剤を補足するもの (Mizunoe *et al.* 2000)、アメーバとの共存 (Steinert *et al.* 1997) など、多岐にわたる。

*C. jejuni* においても、VBNC 状態からの回復について過去に検討されている (Cappelier *et al.* 1999; Baffone *et al.* 2006) が、発育鶏卵やマウスを用いた *in vivo* での実験系であり、遺伝子発現解析に基づく実験系は見当たらない。

第4章では、4°Cで作製した VBNC 状態の *C. jejuni* を回復させる方法として、まず、第3章の VBNC 状態で遺伝子発現の低下がみられた *Sdh* の代謝産物であるフマル酸を培地へ添加することで、VBNC 状態から培養可能状態への転換を試みた。さらに、VBNC 状態から回復させる別の方法として、*V. cholerae* や *E. coli* などの他菌種においても検討されている培養細胞との共培養や発育鶏卵接種を本実験においても検討してそれぞれの再現性を確認した。

## 材料と方法

### ①フマル酸の培地への添加

#### 培地作製

培地は、コロンビア寒天培地 (BD) あるいはブルセラ培地 (BD) を使用した。各培地に、フマル酸ナトリウム (和光純薬工業) を 0.25g/L あるいは 1.0g/L を追加で添加し、微生物用シャーレあるいは試験管で培地を作製した。

#### 菌液の接種

VBNC 状態の *C. jejuni*  $10^7$ CFU を、それぞれの培地に接種し、37°C で 48 時間、微好気培養した。液体培地であるブルセラ培地を用いた場合の回復の確認として、培養後の培地 100 $\mu$ L を血液寒天培地にコンラージ棒で塗抹し、37°C で 48 時間、微好気培養した。

### ②培養細胞との共培養

#### 細胞培養

使用した培養細胞は、腸管内に近い環境を用いるため、腸管上皮由来の培養細胞である CACO-2、ECC-4 を使用した。その他に、子宮頸癌由来である HeLa、肝細胞がん由来である HepG2、チャイニーズハムスター卵巣細胞の CHO の計 5 種類の培養細胞を用いた (いずれも RIKEN BRC より購入)。24 穴組織培養用シャーレを用い、コンフルエント状態の各種培養細胞を作製した。

#### 培養細胞との共培養

作製した各種培養細胞に、VBNC 状態の *C. jejuni* を 1well あたり  $10^7$ CFU を添加し、37°C で菌体と培養細胞を接触させ、5%CO<sub>2</sub>、37°C の環境下で共培養した。一

定時間後、菌液を除き、培養細胞用の培地を加えて、さらに細胞を培養（5%CO<sub>2</sub>、37°C）した。陽性対照として、通常状態の *C. jejuni* を用い、同様の処理をした。培養細胞用の培地を除いた後、PBS(-)で3回洗い、細胞溶解のために0.1%のTriton-Xを100μL添加した。ピペッティング後、細胞溶解液をウマ血液寒天培地にコンラージ棒で塗抹し、37°Cで48時間以上、微好気培養した。*C. jejuni* との接触時間や、菌が細胞内に侵入したと仮定して菌液を除去した後の細胞培養時間などの条件を、様々に組み合わせて試験を行った。

### ③発育鶏卵接種

発育鶏卵は、(株)大畑シェーバー孵化場で購入した7日齢の発育鶏卵を使用した。25Gの注射針および1mLのシリンジを用い、鶏卵1個につきVBNC状態の*C. jejuni* 10<sup>7</sup>CFUを卵黄嚢内へ接種した。陽性対照として通常状態の*C. jejuni*、陰性対照としてPBS(-)を用い、同様の処理をした。鶏卵を37°Cで2日間あるいは6日間培養後、卵黄液のみを18Gの注射針および2.5mLのシリンジを用いて無菌的に回収した。卵黄液150μLをウマ血液寒天培地およびmCCDA培地にコンラージ棒で塗抹し、37°Cで48時間以上、微好気培養を行い、集落形成を確認した。

## 結果

VBNC 状態の *C. jejuni* を回復させるために、①フマル酸の培地への添加、②培養細胞との共培養、③発育鶏卵接種の 3 種類の方法を検討した。1 つ目の方法として、Sdh の代謝産物であるフマル酸を 0.25g/L あるいは 1.0g/L の濃度で追加した培地で VBNC 状態の *C. jejuni* を培養したが、血液寒天培地上での集落形成や液体培地中での菌の発育はみられなかった。

2 つ目の方法として、CACO-2、ECC-4、HeLa、HepG2、CHO の 5 種類の培養細胞と共培養した。その結果、48 時間培養した HeLa を用いて、VBNC 状態の *C. jejuni* を 5 時間接触させ、さらに 48 時間、細胞培養した条件の試験において、血液寒天培地上での集落形成が確認された。しかし、再度同じ条件で試験を行ったが、再現性は得られなかった (表 10)。この他に、各種類の培養細胞と VBNC 状態の *C. jejuni* を様々な条件で共培養したが、いずれにおいても寒天培地上での集落形成を認めることはなかった。表 10 には、集落形成の確認された HeLa の他に、代表的な腸管系培養細胞である CaCo-2 を用いた場合の実験条件と結果を示した。

回復させる 3 つ目の方法として、発育鶏卵の卵黄嚢内に VBNC 状態の *C. jejuni* を接種した。接種した VBNC 状態の *C. jejuni* は、培養細胞の試験の時と同じロットを使用し、菌数もほぼ同じ数を接種した。2 回行った試験のうち、1 回目の試験では、接種後 6 日目の鶏卵 6 個中 1 個、2 回目の試験では鶏卵 13 個中 1 個から、VBNC 状態の *C. jejuni* を接種した発育鶏卵の卵黄液から血液寒天培地と mCCDA 培地で *C. jejuni* の発育が検出された (表 11)。一方で、発育鶏卵接種後 2 日目での回収では、培養可能なカンピロバクターは得られなかった。発育鶏卵接種 6 日間の培養による回復率は約 10% であった。

## 考察

VBNC 状態からの回復とは、培養不能性に起因する代謝および生理過程が逆転して、細胞の増殖を支える通常の培地上で増殖する能力を取り戻すことと定義されている (Oliver, 1993)。

第 3 章で遺伝子発現の減少がみられた *sdh* は TCA サイクルのコハク酸からフマル酸に酸化する酵素をコードする遺伝子である。代謝過程で不足していると推測されたフマル酸を培地へ添加して VBNC 状態からの回復を試みたが、培地上での集落形成、すなわち増殖能の回復はみられなかったことから、代謝過程で不足していると思われる物質を単純に培地に添加しただけでは、VBNC 状態の *C. jejuni* は回復しないのかもしれない。今回のフマル酸の添加濃度は、*C. jejuni* の培地である mCCDA 培地やプレストン培地、ボルトン選択増菌培地の組成に含まれる、ピルビン酸ナトリウムや  $\alpha$ -ケトグルタル酸の濃度を参考に決定した。*C. jejuni* の細胞膜において、フマル酸の透過酵素は確認されていないが、*C. jejuni* の培地にフマル酸を添加している研究 (Tangwatcharin *et al.* 2010) もあることから、フマル酸は菌体内への透過するものと思われる。

他の 2 つの方法では、遺伝子発現変化に基づいて行う回復条件の検討とは異なるアプローチで回復条件を検討し、第 2 章で作製した VBNC 状態の *C. jejuni* が、実際に培養可能な状態へ回復するという状況を確認するために行った。

*V. cholerae* においては CACO-2 や HeLa、CHO などの培養細胞との共培養で、VBNC 状態からの回復、すなわち培養可能状態への転換が確認されている (Senoh *et al.* 2012)。そこで、本研究でも同様な実験を検討したところ、HeLa を用いた共培養の 1 試験で 1 集落の出現が確認されたが、再試験では同じ結果が得られず、再現性は得られなかった (表 10)。その他、様々な条件の組み合わせで試験を行ったが、いずれにおいても *C. jejuni* の VBNC 状態においては、回復がみられず、培養細胞との共培養と

いう条件において、今回作製した VBNC 状態の菌が回復する可能性は低いことが考えられた。

さらに、VBNC 状態の細胞を回復させる別の方法として、発育鶏卵接種を検討した。過去の報告 (Cappelier *et al.* 1999) で、高温条件で作製した *C. jejuni* の VBNC 状態の菌が、発育鶏卵の卵黄嚢内に接種することで培養能を回復したとある。そのため、低温条件で VBNC 状態を作製している本研究においても、同様な実験を行って回復するのかを検討した。その結果、検討した 2 回の試験において、VBNC 状態の細胞を接種して 6 日間培養させた発育鶏卵の卵黄液から、培養可能な *C. jejuni* の集落形成が検出された (表 11)。本研究の発育鶏卵接種 6 日間の培養による回復率は約 10% である。これは、Cappelier らが 37°C で作製した VBNC 状態の *C. jejuni* を発育鶏卵に 10<sup>6</sup>CFU 接種し、12 時間から 96 時間培養した場合の回復率が約 80% であったことと比較すると、低い確率である。しかし、2 回の試験で再現性が得られたことより、本研究で作製した VBNC 状態の菌は、生体を通過することによって培養可能状態へと転換する可能性が示唆された。接種した菌液に、培養可能な菌が残っていた可能性は排除することはできないが、培養細胞との共培養では菌の発育がみられなかった一方で、同じロット、同じ菌量を接種した発育鶏卵では菌の増殖がみられた。このことより、本研究で作製した VBNC 状態の菌において回復現象が実際に起こることを、この実験から確かめることができた。

なお、この発育鶏卵接種の実験から得られた *C. jejuni* の回復株について、回復したことによる遺伝子の変異を確かめるために、*C. jejuni* ATCC 700819 の元の菌株と回復株 (HeLa 由来、発育鶏卵由来) からゲノム DNA を抽出して RAPD-PCR 法と次世代シーケンス法を実施した。RAPD-PCR 法では、12 種類のプライマーを用いたが、いずれの場合も 3 菌株の電気泳動のパターンは同様であり、そのうち 6 種類のプライマーを用いた場合の実験結果を図 11 に示した。次世代シーケンス法による全ゲノム解析を実施したところ、本研究で注目していた *sdhA,B,C* の塩基配列は、元の



菌株の配列と一致し、回復したことによる遺伝子変異は認められなかった。また、これら遺伝子の発現は、元の菌株の通常状態と同様であることを確認した。

## 総括

*Campylobacter jejuni* 食中毒は、細菌性食中毒の中で全国的に最も発生件数の多い食中毒であり、その予防対策を講ずることが急務となっている。*C. jejuni* は、食品の保存や流通の温度帯である低温に保存することによって、生きているが培養できない、いわゆる Viable but non-culturable (VBNC) の状態になることが確認されている。そのため、*C. jejuni* 食中毒を制御するためには、VBNC 状態であっても検出できる検査法の確立と低温における生存機構の解明が非常に重要である。

本研究では、まず、*C. jejuni* が VBNC 状態であっても検出可能な方法として、duplex SYBR Green real-time PCR 法を活用し、*C. jejuni* を含む 16 種類の食中毒起因菌を一斉に検査するために、これらを特異的に検出するための 16 遺伝子を既報のプライマーの組み合わせを改良することで検査法を確立した。実際に発生した食中毒関連事例の患者糞便検体から DNA を抽出し、本検査法を実施したところ、3~4 時間で従来の培養法と同等の結果を出すことが可能であり、本検査法の有用性を証明することができた。さらに、培養法では陰性であった検体が real-time PCR 法では陽性と判定された *C. jejuni* 食中毒事例があり、本検査法は、検体中の VBNC あるいは死菌の状態の菌も検出可能であることが分かった (第 1 章)。

次に、*C. jejuni* を低温 (4°C) に保存することによって、実験的に *C. jejuni* の VBNC 状態の作製を試みた。*C. jejuni* ATCC 700819 を使用し、PBS(-)4°C で静置保存したところ、1 週間毎に全菌数、生菌数および培養可能な菌数を測定すると、11 週間目以降は生きているが非選択性培地の血液寒天培地で集落形成がみられなくなり、実験的に VBNC 状態の菌を作製することができた。このことより、本研究では VBNC 状態を「血液寒天培地で培養できない状態」と定義し、PBS(-)4°C で 12 週間静置保存し、生きているが血液寒天培地で培養できなくなった状態を“VBNC 状態”として、以後の実験を行った。この状態の菌体は、蛍光および電子顕微鏡で観察すると、形態が本来

のらせん状から球状 (coccoïd form) に変化していた (第2章)。

*C. jejuni* の VBNC 状態の分子レベルの解析として、遺伝子発現変化に注目した。4°C 静置直後、1 週間後 (短期間低温状態)、12 週間目 (VBNC 状態) の *C. jejuni* からそれぞれ total RNA を抽出し、3 点の遺伝子発現について定量的 real-time RT-PCR 法およびマイクロアレイ法により *C. jejuni* の遺伝子を網羅的に解析したところ、コハク酸デヒドロゲナーゼ (Sdh) をコードする遺伝子の発現が VBNC 状態で減少しており、*sdh* が VBNC 状態への移行に関与する候補遺伝子の一つとして推定された (第3章)。

VBNC 状態で発現の減少がみられた Sdh は TCA サイクルのコハク酸からフマル酸に酸化する酵素である。そこで、フマル酸を培地へ添加し、VBNC 状態の *C. jejuni* を接種したが回復はみられなかった。作製した VBNC 状態の菌が回復することを確認するために、培養細胞との共培養を試みたところ、*V. cholerae* などの他菌種では VBNC 状態からの回復が報告されているものの、*C. jejuni* では確認できなかった。さらに別の方法として、発育鶏卵の卵黄嚢内に VBNC 状態の *C. jejuni* を接種した実験では、回復率が 10% ではあったものの、培養可能状態への転換が認められ、再現性が得られた。このことより、*C. jejuni* の VBNC 状態の菌は生体にとって感染源となることが示唆された (第4章)。

本論文の一部は以下に公表した。

Iida, N., Fukushima, H., Hiroi, M., Yagi, M., Kanda, T., Murakami, M. and Sugiyama, K.: Development of duplex SYBR Green real-time PCR for rapid and simultaneous detection of 16 specific genes of 16 major foodborne bacteria. *Jpn. J. Food Microbiol.*, 30 (2013) 160-164

## General overview

*Campylobacter jejuni*, a Gram-negative microaerobic bacterium, is the most prevalent foodborne bacterial pathogen in Japan. Understanding its resilience is crucial for preventing its spread and the recurrence of food poisoning due to foodborne outbreaks. *C. jejuni* can enter a viable but non-culturable (VBNC) state at low temperatures. Therefore, to control *C. jejuni* foodborne outbreaks, it is important to develop an assay for detecting the pathogen in both the VBNC and culturable states and to elucidate its mechanism of survival at low temperatures.

In Chapter 1, we describe our design of a modified duplex SYBR Green real-time polymerase chain reaction (PCR) assay for simultaneously detecting 16 specific genes of 16 major foodborne bacteria including *C. jejuni* in not only the culturable state, but also the VBNC state. The 16 primer pairs for the 16 target genes were selected based on the findings described in a previous report. The present real-time PCR assay was evaluated to detect the causative bacteria in DNA extracted from the fecal samples of symptomatic patients infected by actual foodborne outbreaks. This assay (DNA extraction from feces and duplex real-time PCR) was performed within approximately 3 to 4 h and the results were consistent with those of culture. This finding shows that the proposed PCR method is useful for rapid identification of the causative pathogens of foodborne outbreaks. Furthermore, a specimen from a patient with food poisoning caused by *C. jejuni* was negative by culture and positive by duplex real-time PCR, indicating the suitability of this method for detecting bacterial cells in both the VBNC and dead states.

In Chapter 2, we present our attempt at experimentally inducing the VBNC state of *C. jejuni* ATCC 700819 by exposing it to cold stress. The *C. jejuni* strain was subjected to cold shock in PBS(-) at 4°C for up to 12 weeks. Then, a portion of the resuspended cells was

assessed each week to enumerate the viable and culturable cells; viability was assessed by BackLight staining and the culturable cells were measured using blood-free *Campylobacter* selective agar (mCCDA) and non-selective blood-containing agar plates. After 11 weeks of cold stress, no *C. jejuni* colonies were detected in the selective agar plates or non-selective blood-containing agar plates, with viability of 70-80%, indicating that *C. jejuni* entered the VBNC state under this condition. The cells in the VBNC state obtained by incubating in PBS(-) at 4°C for 12 weeks were used in subsequent experiments. Fluorescence and electron microscopy revealed changes in the morphology of the VBNC *C. jejuni* cells from the spiral form to the coccoid form.

In Chapter 3, we focus on changes in gene expression to analyze the VBNC state of *C. jejuni* at the molecular level. Total RNA was extracted from *C. jejuni* cells under each condition immediately after incubation at 4°C, after 1 week (short-term incubation state), and after 12 weeks (VBNC state). We analyzed the gene expression of *C. jejuni* by subjecting the total RNA to quantitative real-time reverse-transcription-PCR and microarray assays. In the VBNC state, the expression of *sdh*, the gene encoding succinate dehydrogenase, was significantly downregulated, and the gene was considered a candidate in the transition from the culturable state to the VBNC state.

Sdh is an enzyme that oxidizes succinic acid to fumaric acid in the tricarboxylic acid cycle. Following on from our findings outlined in Chapter 3, Chapter 4 presents our examination of whether addition of fumarate to the culture medium could resuscitate the cold-stressed cells of *C. jejuni* with downregulated *sdh* expression from the VBNC state; however, no recovery was observed. Next, we attempted to resuscitate the VBNC cells produced at 4°C under co-culture conditions with mammalian cultured cells, as reported for other species such as *Vibrio cholera* and *Escherichia coli*. The *C. jejuni* cells could not be resuscitated from the VBNC state even in the presence of several kinds of cultured cells such

as CACO-2 and ECC-4. On the other hand, when *C. jejuni* in the VBNC state was inoculated in the yolk sacs of embryonated eggs, recovered culturable cells were reproducibly detected in approximately 10% of the eggs. The resuscitated cells were genomically identical to the original strain. This observation indicated that *C. jejuni* even in a cold stress-induced VBNC state might be a viable source of infection in humans. Taken together, *C. jejuni* can retain its pathogenicity in the VBNC state because of its potential to be resuscitated in food.

## 引用文献

- Adak, G. K., Meakins, S. M., Yip, H., Lopman, B. A. and O'Brien, S. J.: Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. *Emerg. Infect. Dis.* 11(2005) 365-372
- Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S., Okada, Y., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. *Environ. Microbiol.*, 9 (2007) 869-879.
- Baffone, W., Casaroli, A., Citterio, B., Pierfelici, L., Campana, R., Vittoria, E., Guaglianone, E. and Donelli, G.: *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. *Int. J. Food. Microbiol.*, 107 (2006) 83-89
- Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P. and Blaser, M. J.: Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. Infect. Dis.*, 157 (1988) 472-479
- Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J. and Desjardins, R.: LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods.* 37 (1999) 77-86.
- Bubert, A., Riebe, J., Schnitzler, N., Schönberg, A., Goebel, W. and Schubert, P.: Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies and/or PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 35 (1997) 179-183
- Buswell, C. M., Herlihy, Y. M., Lawrence, L. M., McGiggan, J. T. M., Marsh, P. D., Keevil, C. W. and Leach, S. A.: Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. in water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescent-antibody and-rRNA staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 733-741
- Cappelier, J. M., Minet, J., Magras, C., Colwell, R. R. and Federighi, M.: Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (1999)

5154-5157

- Chaisowwong, W., Kusumoto, A., Hashimoto, M., Harada, T., Maklon, K. and Kawamoto, K.: Physiological characterization of *Campylobacter jejuni* under cold stresses conditions: its potential for public threat. *J. Vet. Med. Sci.*, 74 (2012) 43-50
- Chan, K. F., Tran, H. L., Kanenaka, R. Y. and Kathariou, S.: Survival of clinical and poultry-derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4°C). *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 4186-4191
- Chaveerach, P., ter Huurne, A. A., Lipman, L. J. and van Knapen, F.: Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (2003) 711-714
- Coker, A. O., Isokpehi, R. D., Thomas, B. N., Amisu, K. O. and Obi, C. L.: Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.*, 8 (2002) 237-243
- Corry, J. E. and Atabay, H. I.: Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* 96 (2001) 96S-114S
- El-Shibiny, A., Connerton, P. and Connerton, I.: Survival at refrigeration and freezing temperatures of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* on chicken skin applied as axenic and mixed inoculums. *Int. J. Food Microbiol.* 131 (2009) 197-202
- Fukushima, H., Katsube, K., Tsunomori, Y., Kishi, R., Atsuta, J. and Akiba, Y.: Comprehensive and rapid real-time PCR analysis of 21 foodborne outbreaks, *Int. J. Micro.*, 2009, Article ID 917623 (2009) 13pages
- Fukushima, H., Kawase, J., Etoh, Y., Sugama, K., Yashiro, S., Iida, N. and Yamaguchi, K.: Simultaneous screening of 24 target genes of foodborne pathogens in 35 foodborne outbreaks using multiplex real-time SYBR Green PCR analysis. *Int. J. Micro.*, 2010, Article ID 864817 (2010) 17 pages
- Fukushima, H., Tsunomori, Y. and Seki, R.: Duplex real-time SYBR Green PCR assays for



- detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *J. Clin. Microbiol.*, 41 (2003) 5134-5146
- Gupte, A. R., de Rezende, C. L. E. and Joseph, S. W.: Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 (2003) 6669-6675
- Hazeleger, W. C., Wouters, J. A., Rombouts, F. M. and Abee, T.: Physiological activity of *Campylobacter jejuni* far below the minimal growth temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 3971-3922
- Haugland, R. P.: Handbook of fluorescent probes and research chemicals, Molecular Probes Inc., Eugene, Oreg. (1996)
- Heim, S., Lleo, M., Bonato, B., Guzman, C. A. and Canepari, P.: The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J. Bacteriol.*, 184 (2002) 6739-6745
- Iida, N., Fukushima, H., Hiroi, M., Yagi, M., Kanda, T., Murakami, M. and Sugiyama, K.: Development of duplex SYBR Green real-time PCR for rapid and simultaneous detection of 16 specific genes of 16 major foodborne bacteria. *Jpn. J. Food Microbiol.*, 30 (2013) 160-164
- Jackson, D. N., Davis, B., Tirado, S. M., Duggal, M., van Frankenhuyzen, J. K., Deaville, D., Wijesinghe, M. A., Tessaro, M. and Trevors, J. T.: Survival mechanisms and culturability of *Campylobacter jejuni* under stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 96 (2009) 377-394
- Jones, D. M., Sutcliffe, E. M. and Curry, A.: Recovery of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* 137 (1991) 2477-2482
- 厚生労働省：食中毒事件一覽速報< <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>>
- Lai, C-J., Chen, S-Y., Lin, I-H., Chang, C-H. and Wong, H-C.: Change of protein profiles in

- the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.* 135 (2009) 118-124
- Lázaro, B., Cárcamo, J., Audicana, A., Perales, I. and Fernández-Astorga, A.: Viability and DNA maintenance in nonculturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (1999) 4677-4681
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T. and Tanaka, R.: Use of 16 rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (2004) 7220-7228
- McCarthy, N. and Giesecke, J.: Incidence of Guillan-Barré syndrome following infection with *Campylobacter jejuni*. *Am. J. Epidemiol.* 153 (2001) 610-614
- Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. and Tauxe, R. V.; Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 5 (1999) 607-625
- Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan.: *Campylobacter* enteritis in Japan, 2006-2009. Infectious Agents Surveillance Report 31. <<http://idsc.nih.go.jp/iasr/31/359/tpc359.html>>
- Mizunoe, Y., Wai, S. N., Ishikawa, T., Takade, A. and Yoshida, S.: Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 186 (2000) 115-120
- Moen, B., Oust, A., Langsrud, O., Dorrell, N., Marsden, G. L., Hinds, J., Kohler, A., Wren, B. W. and Rudi, K.: Exploration multifactor approach for investigating global survival mechanisms of *Campylobacter jejuni* under environmental conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71 (2005) 2086-2094
- 三澤尚明: 話題の感染症 カンピロバクター感染症. *モダンメディア*., 51 (2005) 45-52
- Murphy, C., Carroll, C. and Jordan K. N.: Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Microbiol.*, 100 (2006) 623-632

- Nachamkin, I., Szymanski, M. C. and Blaser, J. M.: *Campylobacter* Third Edition. Amer Society for Microbiology., (2008)
- Nguyen, T. V., Van, P. L., Huy, C. L., Gia, K. N. and Weintraub, A.: Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. J. Clin. Microbiol., 43 (2005) 755-760
- Notermans, S. and Hoogenboom-Verdegaal.: Existing and emerging foodborne disease. Int. J. Food Microbiol. 15 (1992) 197-205
- Oliver, J. D.: Formation of viable but nonculturable cells. Plenum Press, New York, N. Y., (1993) 239-272
- Ott, S. J., Musfeldt, M., Ullmann, U., Hampe, J. and Schreiber, S.:Quantification of intestinal Bacterial Populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora, J.Clin. Microbiol., 42 (2004) 2566-2572
- Panutdaporn, N., Kawamoto, K., Asakura, H. and Makino, S.: Resuscitation of the viable but nonculturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella* Typhimurium strain LT2. Int. J. Food Microbiol., 106 (2006) 241-247
- Parkhill, J., Wren, B. W., Mungal, K., Ketley, J. M., Churcher, C., Basham, D., Chillingworth, T., Davies, R.M., Feltwell, T., Holroyd, S., Jagels, K., Karlyshev, A. V., Moule, S., Pallen, M. J., Penn, C. W., Quail, M. A., Rajandream, M. A., Rutherford, K. M., van Vliet, A. H., Whitehead, S. and Barrell, B. G.: The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature, 403 (2000) 665-668
- Qoronfleh, M. W., Debouck, C. and Keller, J.: Identification and characterization of novel low-temperature-inducible promoters of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 174 (1992) 7902-7909

- Rees, J. H., Gregson, N. A., Griffiths, P. L. and Hughes, R. A. C.: *Campylobacter jejuni* and Guillan-Barré syndrome. *Q. J. Med.* 86 (1993) 623-634
- Reissbrodt, R., Rienaeker, I., Romanova, J. M., Freestone, P. P., Haigh, R. D., Lyte, M., Tschäpe, H. and William, P. H.: Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (2002) 4788-4794
- Ritz, M., Garenaux, A., Berge, M. and Federighi, M.: Determination of *rpoA* as the most suitable internal control to study stress response in *C. jejuni* by RT-qPCR and application to oxidative stress. *Journal of Microbiological Methods*, 76 (2009) 196-200
- Robinson, D. A.: Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. *Br. Med. J.*, 282 (1981) 1548
- Rollins, D. M. and Colwell, R. R.: Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52 (1986) 531-538
- Senoh, M., Ghosh-Banerjee, J., Ramamurthy, T., Colwell, R. R., Miyoshi, S., Nair, G. B. and Takeda, Y.: Conversion of viable but nonculturable enteric bacteria to culturable by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiol. Immunol.*, 56 (2012) 342-345
- Steinert, M., Emödy, L., Amann, R. and Hacker, J.: Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (1997) 2047-2053
- Stintzi, A.: Investigation of the *Campylobacter jejuni* cold-shock response by global transcript profiling. *Genome Letters* 2003., 2 (2003) 18-27
- Tangwatcharin, P., Chanthachum, S., Khopaibool, P. and Griffiths, W. M.: Media for aerobic resuscitation of *Campylobacter jejuni* supported by fumarate respiration. *As. J. Food Ag-Ind.*, 3 (2010) 93-107

- Terzieva, S. I. and McFeters, G. A.: Survival and injury of *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, and *Yersinia enterocolitica* in stream water. *Can. J. Microbiol.* 37 (1991) 785-790
- 上野伸広, 上村晃秀, 湯田充典, 蓑田祥子, 吉國謙一郎: 食中毒原因食品からのサルモネラ及びカンピロバクター遺伝子検出法の確立(第 I 報). 鹿児島県環境保健センター所報., 10 (2009) 48-51
- Wai, S. N., Moriya, T., Kondo, K., Misumi, H. and Amako, K.: Resuscitation of *Vibrio cholera* O1 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock. *FEMS Microbiol. Lett.*, 136 (1996) 187-191
- Weichart, D., McDougald, D., Jacobs, D. and Kjelleberg, S.: In situ analysis of nucleic acids in cold-induced nonculturable *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 2754-2758
- Woodall, C. A., Jones, M. A., Barrow, P. A., Hinds, J., Marsden, G. L., Kelly, D. J., Dorrell, N., Wren, B. W. and Maskell, D. J.: *Campylobacter jejuni* gene expression in the chick cecum: evidence for adaptation to a low-oxygen environment. *Infect. Immun.*, 73 (2005) 5278-5285
- Yamamoto, H. Y., Hashimoto, Y. and Ezaki, T.: Study of nonculturable *Legionella pneumophila* cells during multiple nutrient starvation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 20 (1996) 149-154

## 謝辞

本論をまとめるにあたり、終始懇切なる御指導と御助言を賜りました麻布大学食品科学研究室、森田英利教授、微生物学第二研究室、田原口智士教授ならびに麻布大学分子生物学研究室、村上賢教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました麻布大学公衆衛生学第二研究室、加藤行男准教授ならびに麻布大学分子生物学研究室、村上賢教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、多大な御指導と御協力を頂いた分子生物学研究室の皆様、九州大学農学研究院、宮本敬久教授ならびに静岡県環境衛生科学研究所微生物部の皆様に厚く御礼を申し上げます。

最後に、社会人学生としての活動を支えてくれた家族に深く感謝いたします。

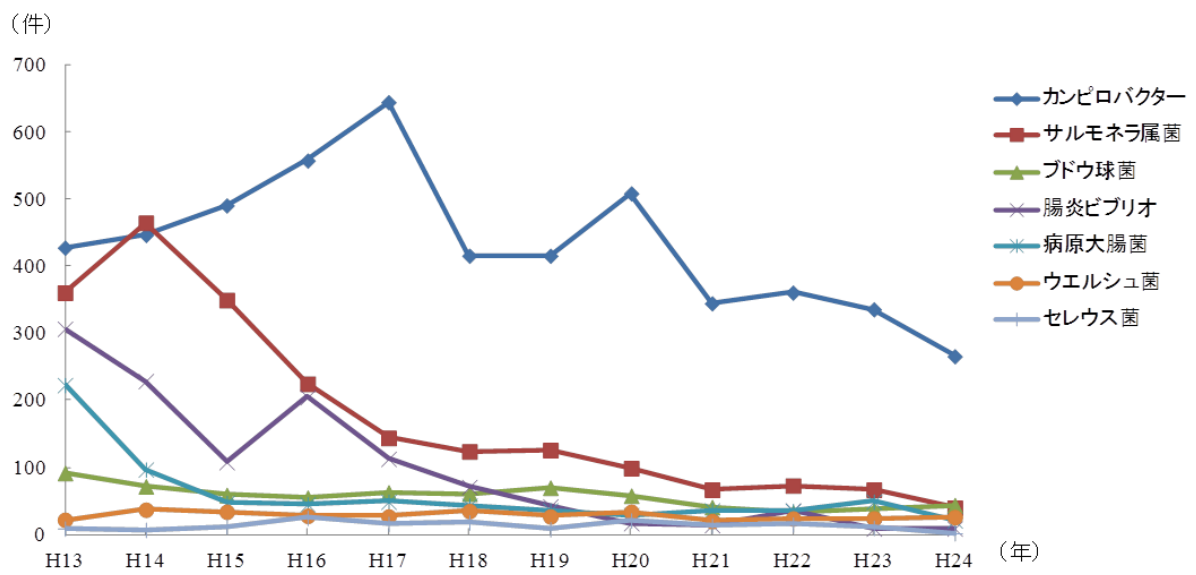


図1 病因物質(主な食中毒起因菌)別にみた食中毒事件数の年次推移(平成13~24年)  
 (参考:厚生労働省「平成24年食中毒発生状況」)

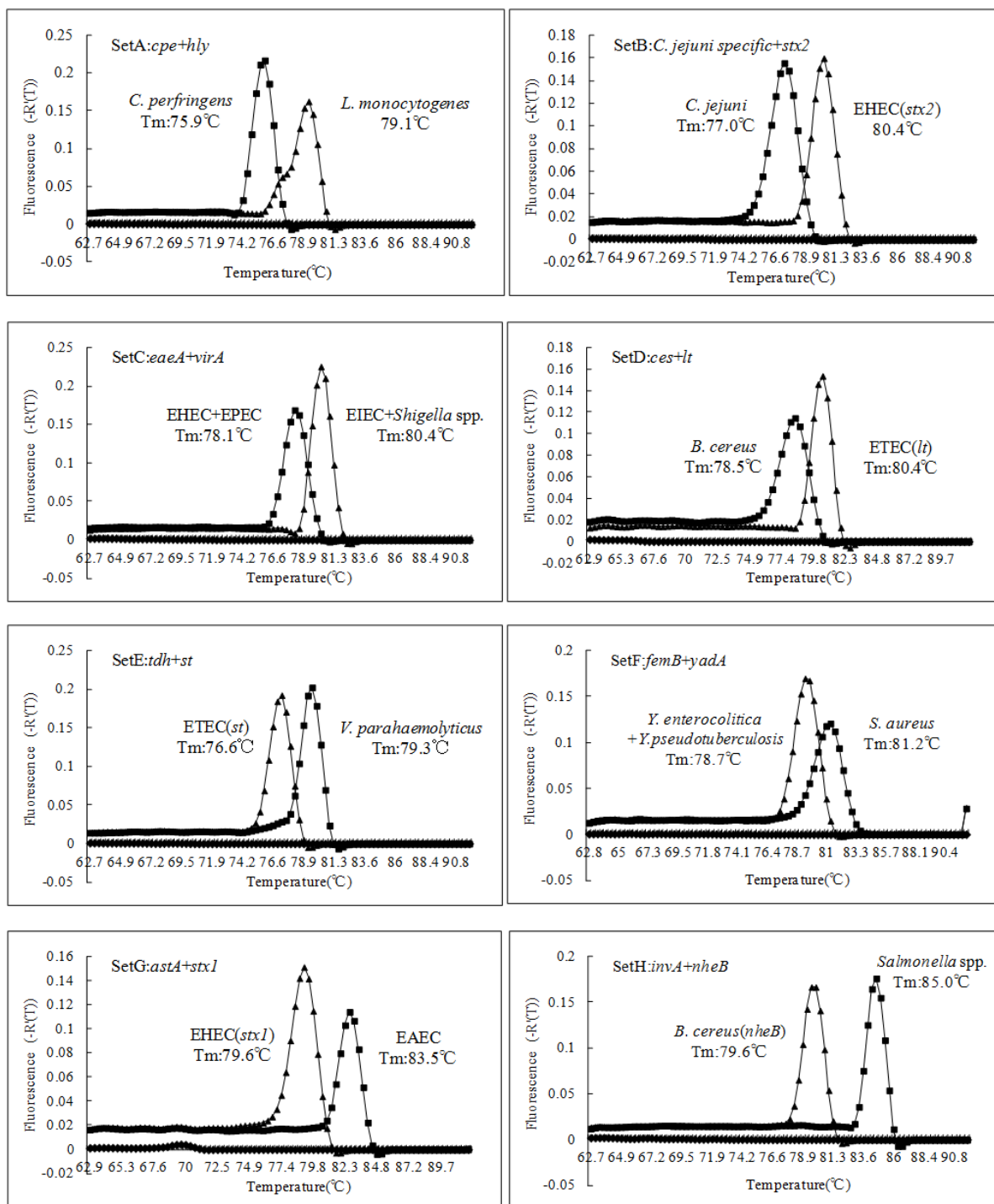


図2 duplex SYBR Green real-time PCRによる8反応系(SetA~H)の融解曲線分析



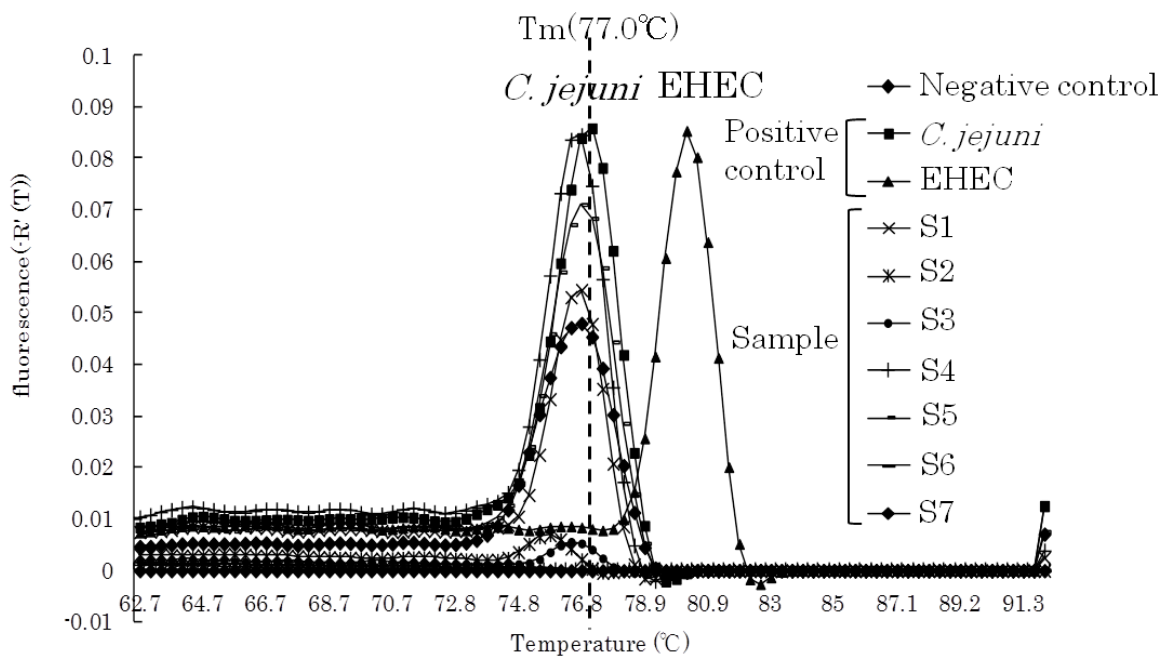


図3 *C. jejuni*食中毒事例(Case 3)の融解曲線分析(Primer Set B)

検体中の菌量が少ない場合は、T<sub>m</sub>値が陽性コントロールより約1°C低くなる。S2とS3は、その範囲内であった。

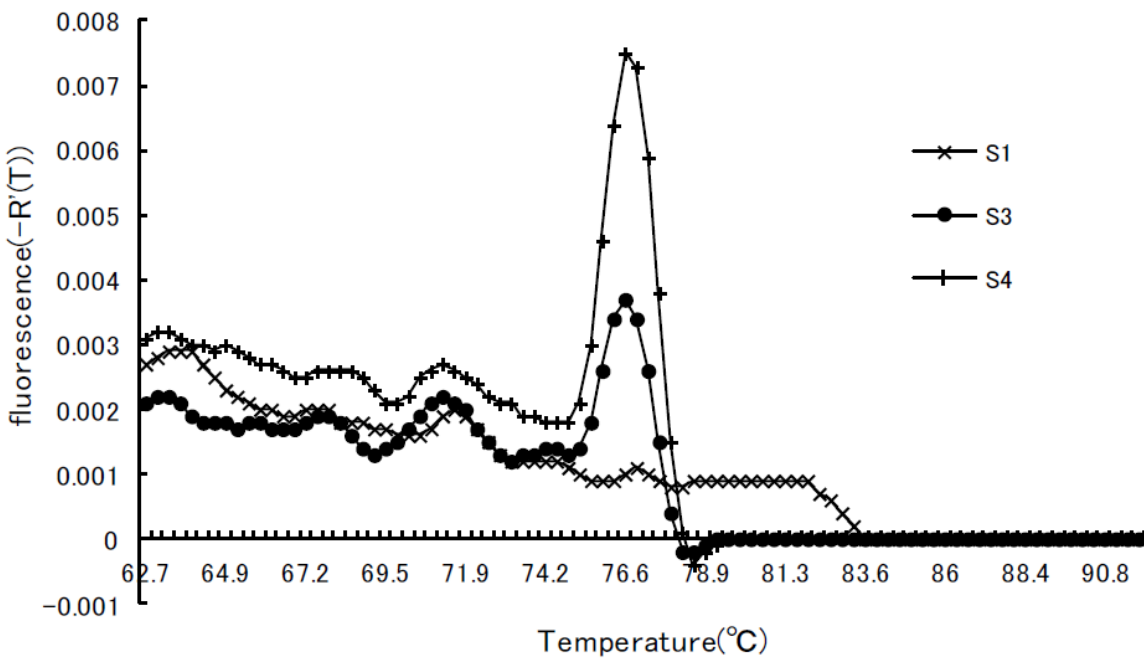
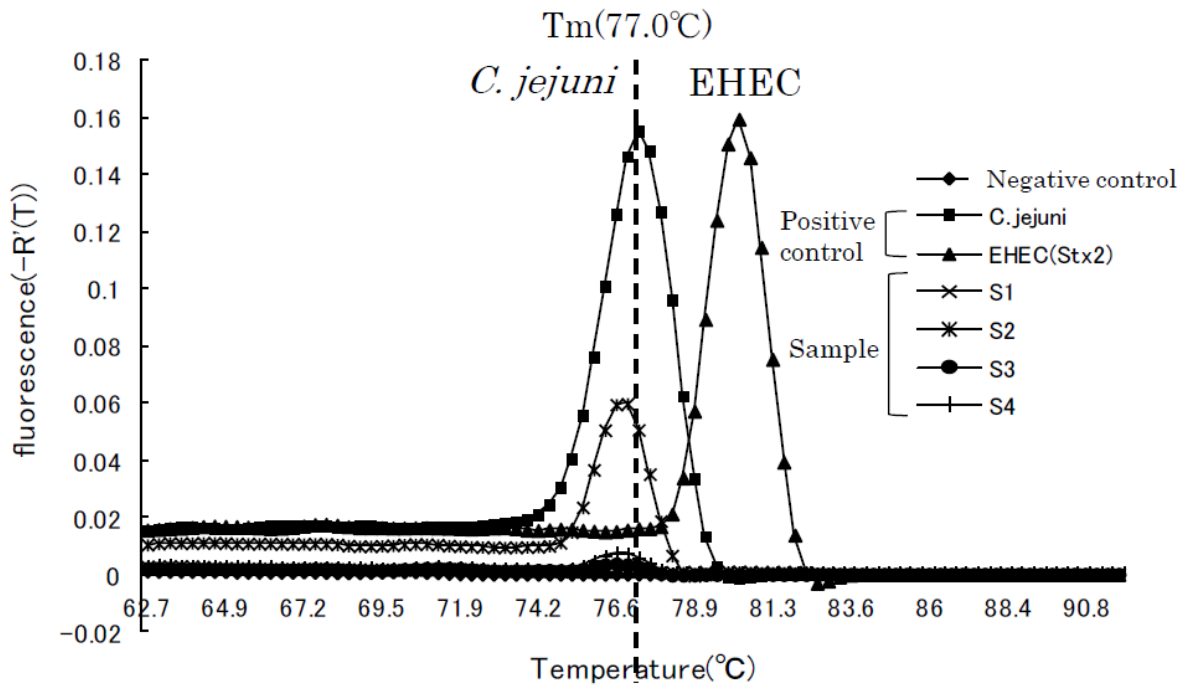


図4 *C. jejuni*食中毒事例(Case 8)の融解曲線分析(Primer Set B)  
 下側に示すグラフでは、カンピロバクターの $T_m$ 値付近の小さいピークを確認するために、S1、S3、S4のみのデータを選択した。

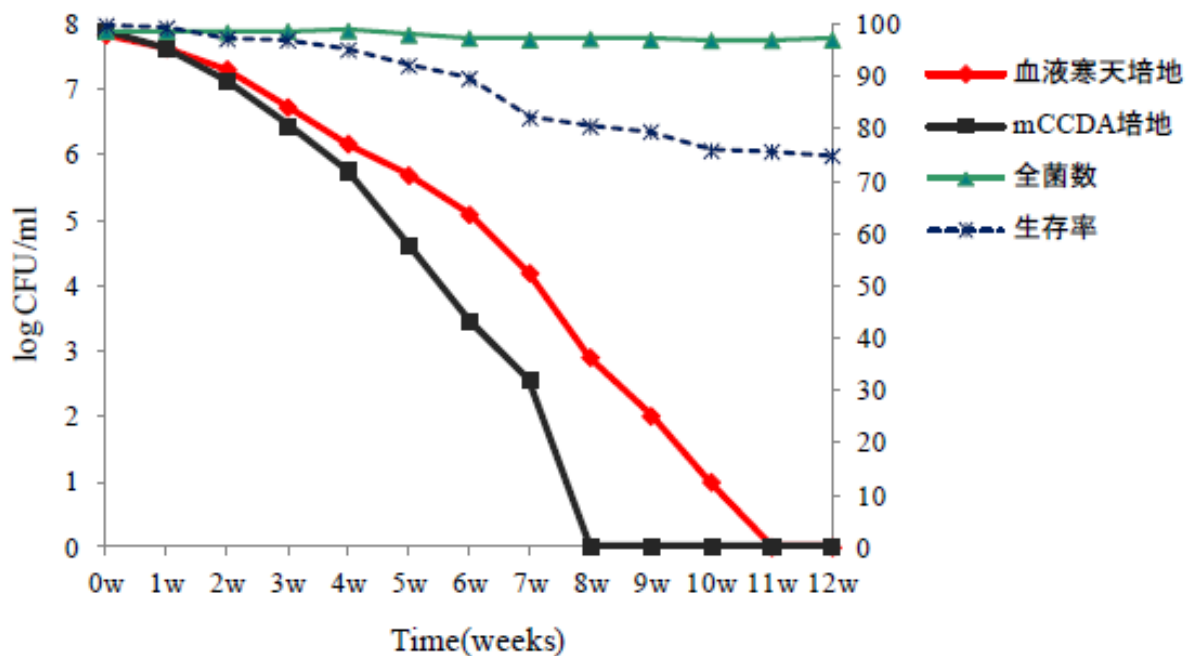
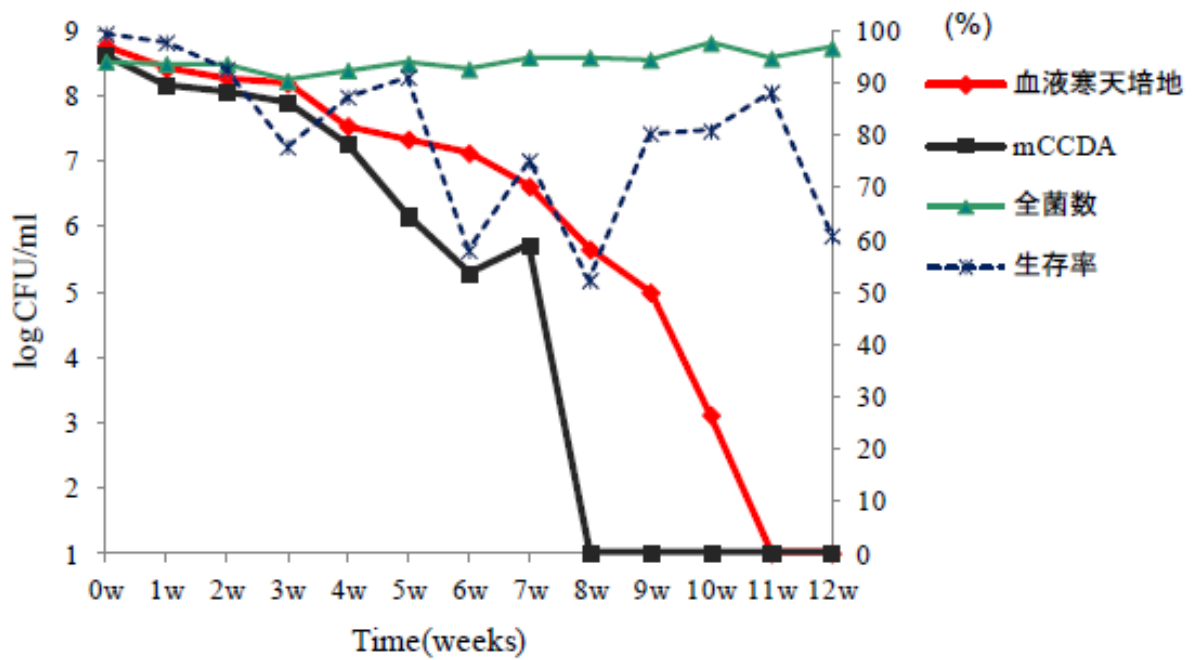


図5 *C. jejuni* ATCC700819の4°C PBS(-)静置保存における生残性  
 実践は、菌数を左側の対数値で表し、破線は生存率を右側のパーセンテージで表す。  
 生存率は、12週間経過してVBNC状態でも70~80%を推移していた。培養能は、  
 mCCDA培地では8週間目以降、血液寒天培地では11週間目以降に消失した。  
 (上段:1回目、下段2回目)

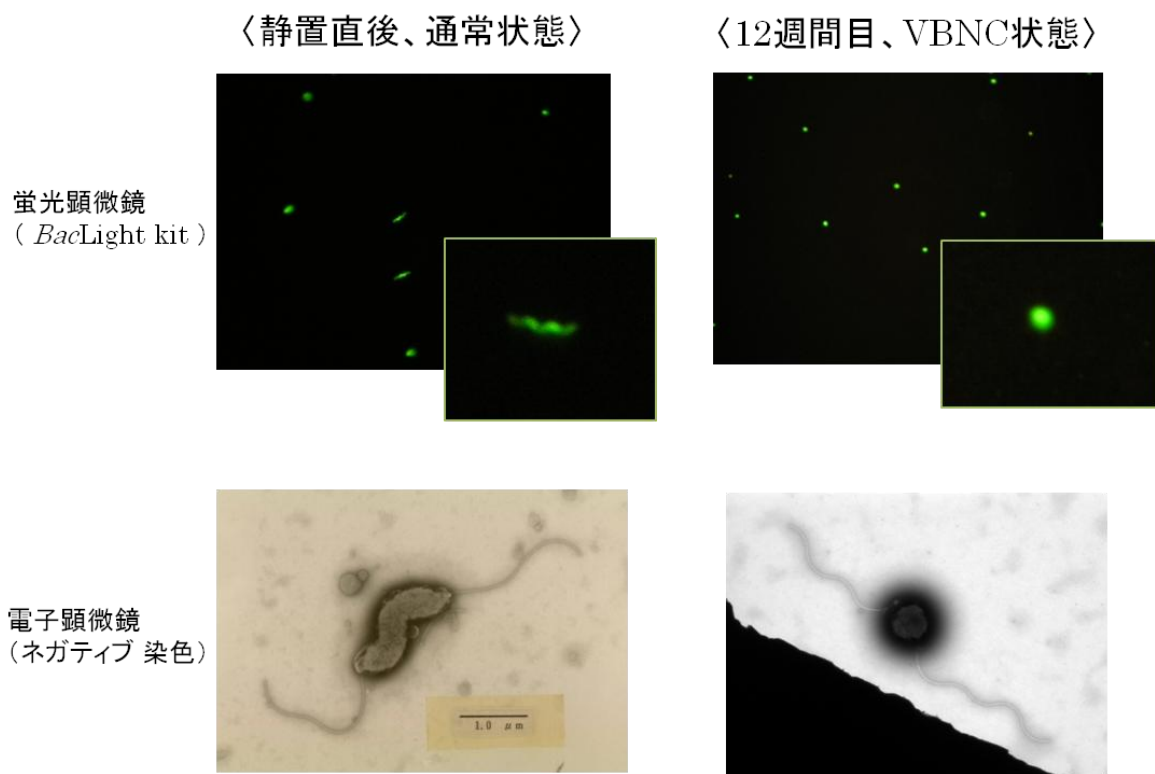


図6 *C. jejuni* ATCC 700819のPBS(-) 4℃静置保存における形態変化

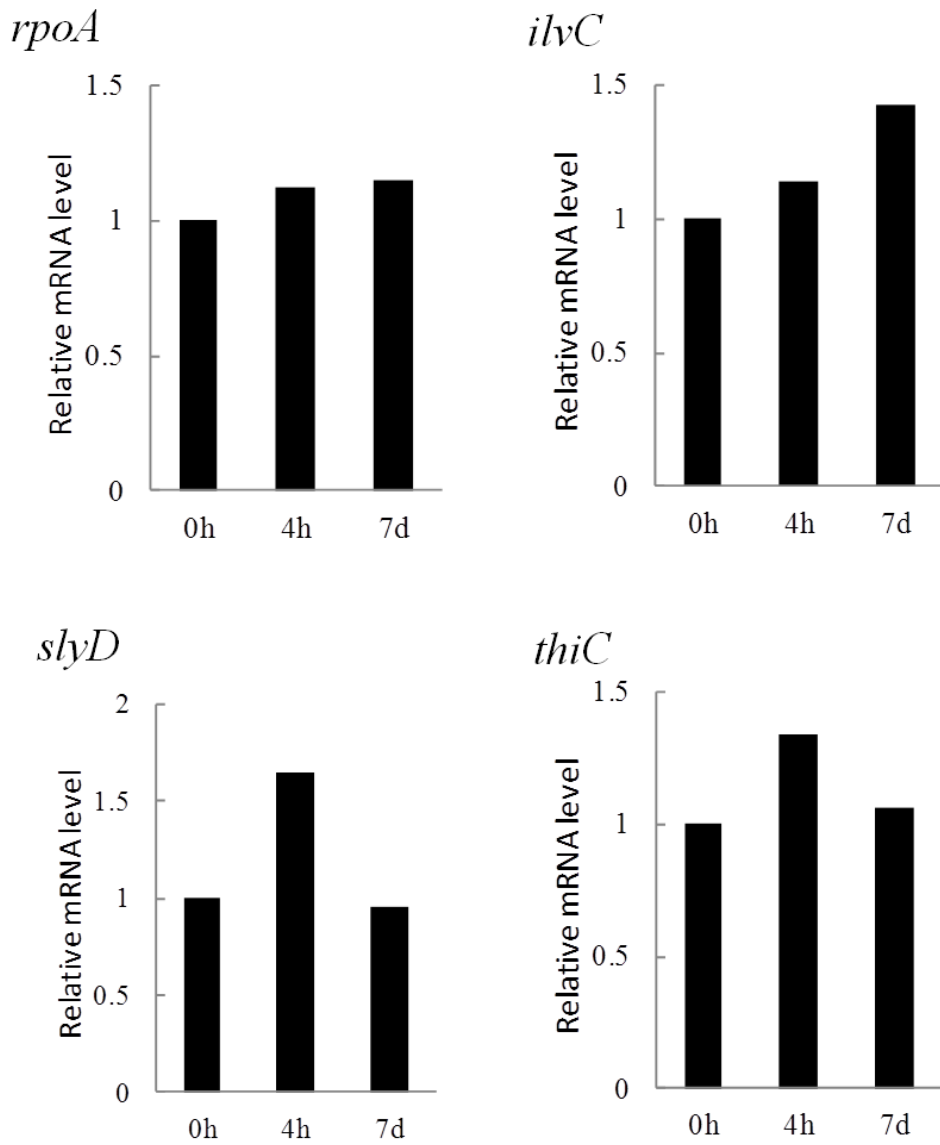


図7 *C. jejuni*における内部標準遺伝子の候補遺伝子の発現変化(real-time RT-PCR法)  
*C. jejuni* ATCC 700819をPBS(-) 4°C中に静置し、0時間(0h)、4時間後(4h)、7日間後(7d)  
 の変化を示した

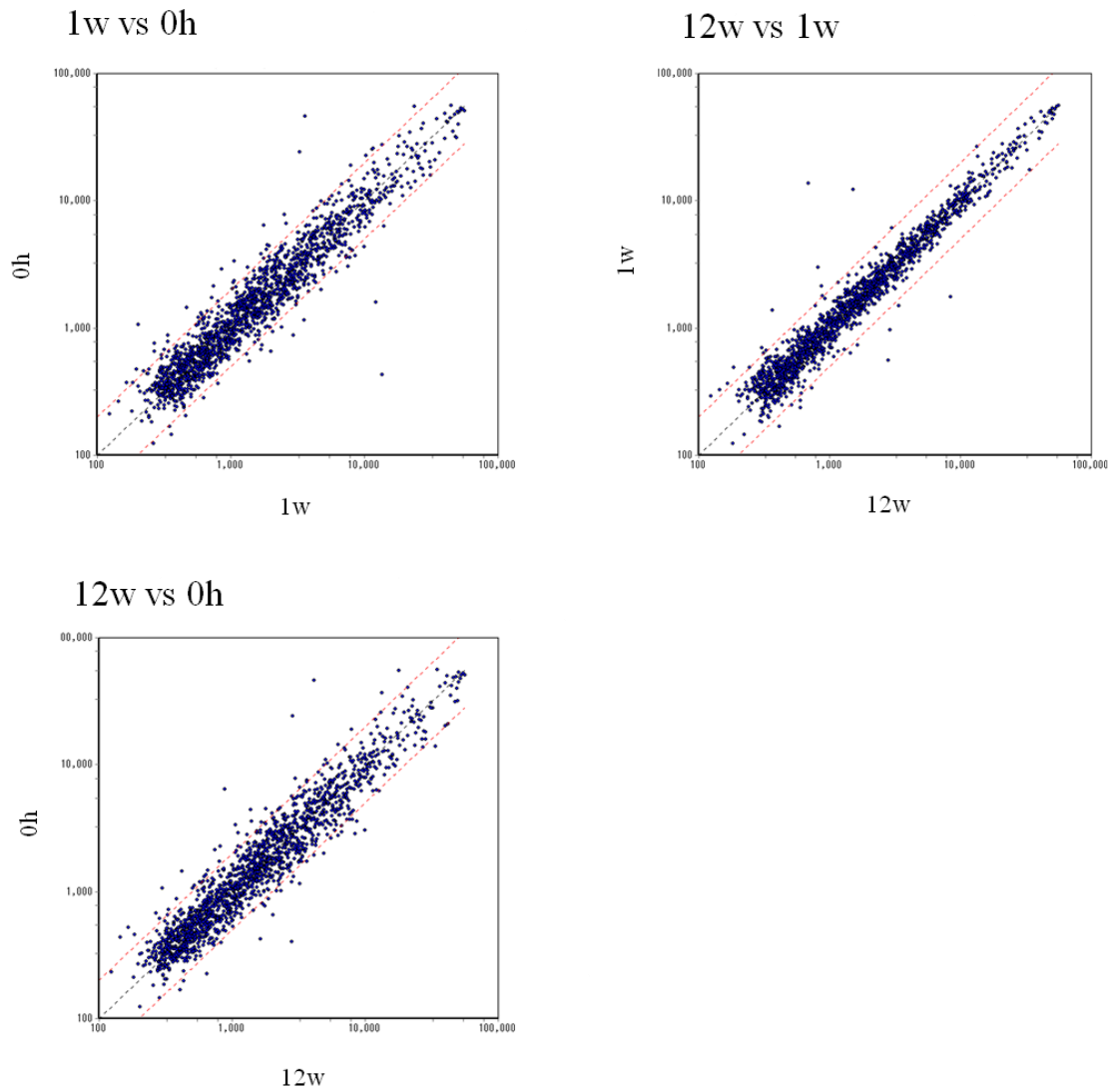


図8 マイクロアレイ法による*C. jejuni*の0時間(0h)、1週間後(1w)、12週間後(12w)の遺伝子発現をそれぞれ比較したScatterPlot  
 図中の青色スポットは各遺伝子を示し、赤線は2倍の減少(上側)あるいは増加(下側)を示す。

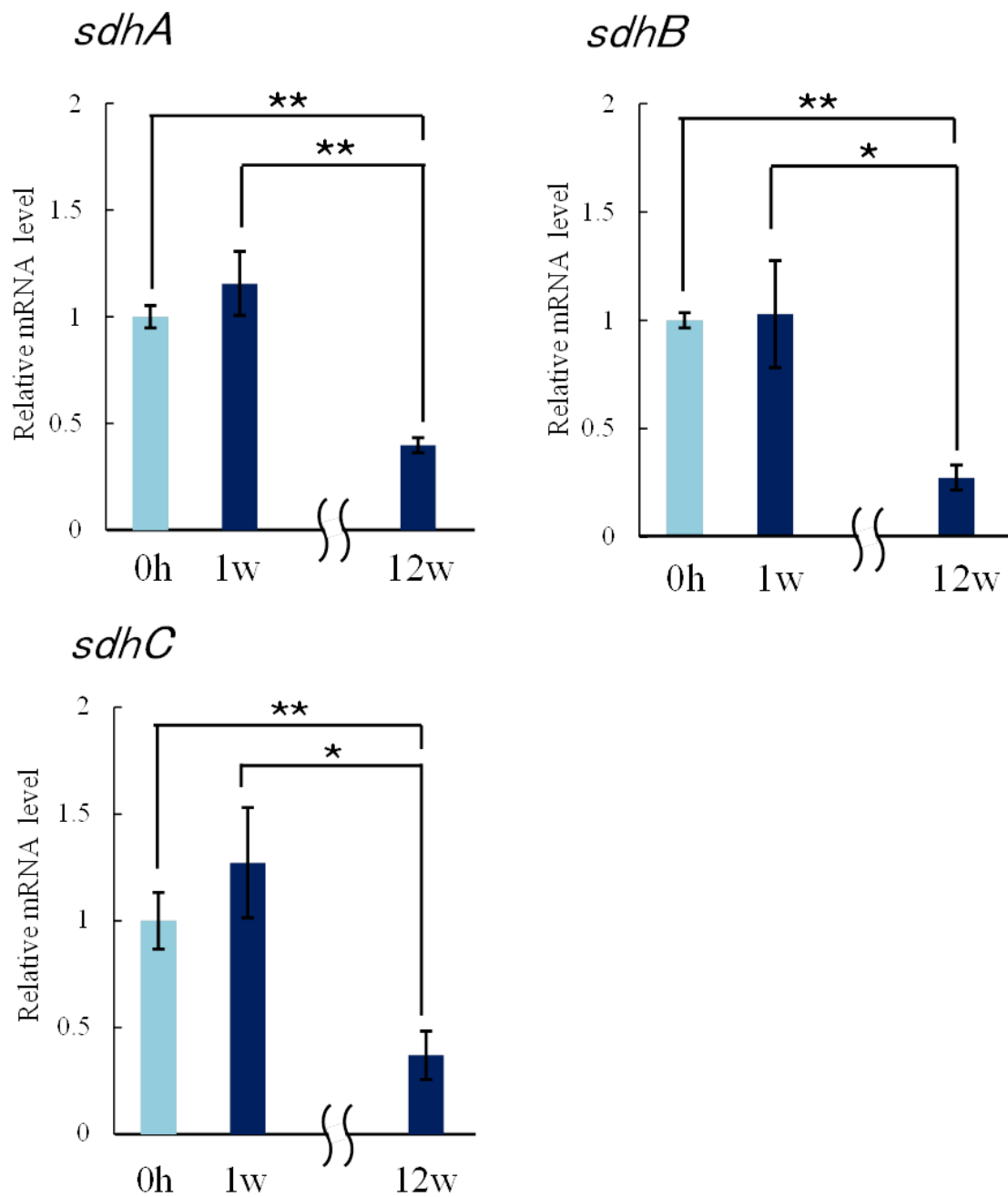


図9 *C. jejuni*の*sdh*の遺伝子発現変化(real-time RT-PCR法)  
 静置直後の0時間(0h)から1週間後(1w)はあまり変化はなかったが、12週間後(12w)には約0.5倍以下に減少し、有意差が認められた(\*:P<0.05 \*\*:P<0.01)

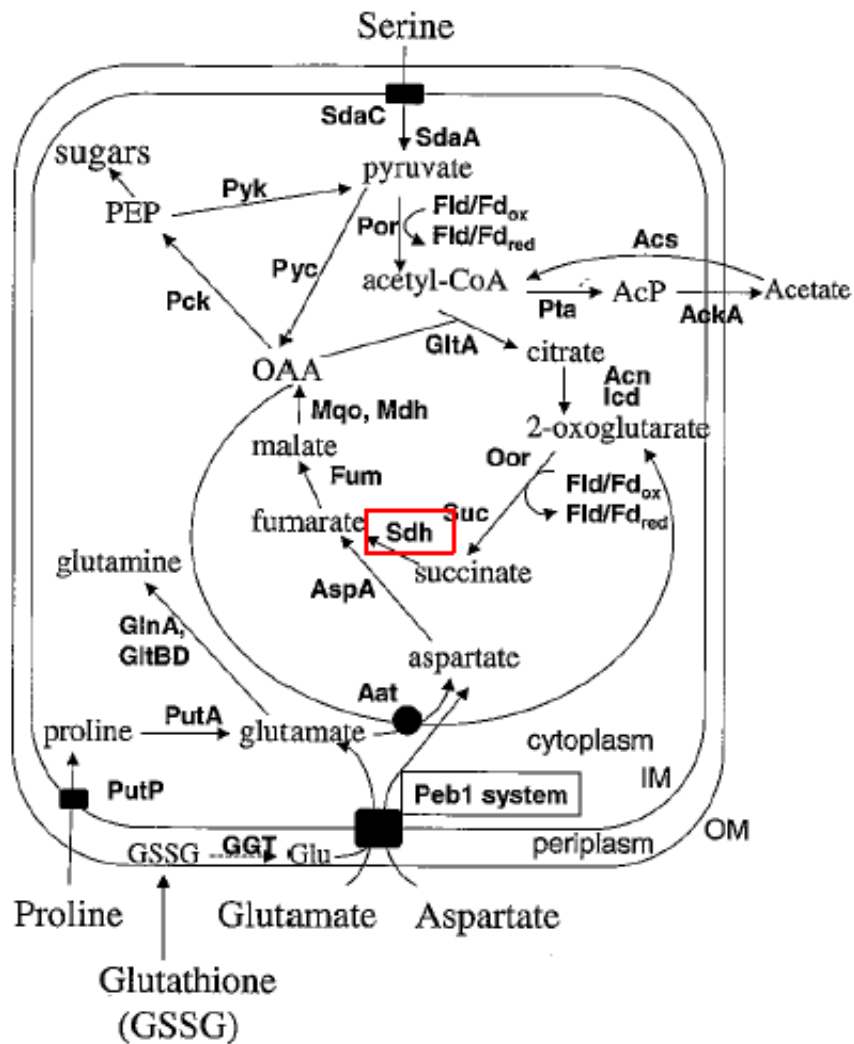


図10 *C. jejuni* の主要な代謝経路および関連酵素  
 (文献: Nachamkin *et al.* 2008より抜粋)  
 Sdh: succinate dehydrogenase



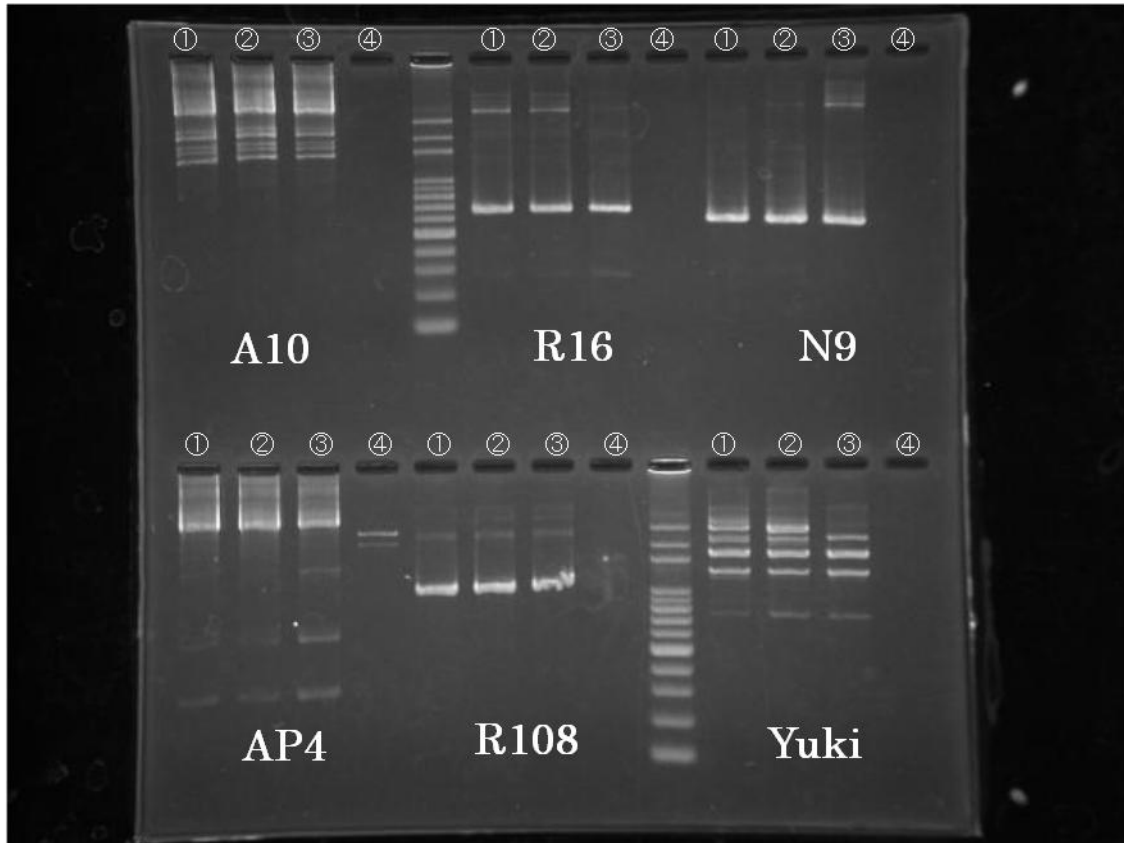


図11 RAPD-PCR法の電気泳動像

① *C. jejuni* ATCC 700819 (original) ② 発育鶏卵から得られた回復株 ③ HeLaから得られた回復株 ④ 陰性コントロール

表1 duplex SYBR Green real-time PCRのプライマーセットA~Hとプライマー配列

Primer set	Species	Target gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	<sup>†b</sup> <i>T</i> <sub>m</sub>	References
A	<sup>†a</sup> 1 <i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpe</i>	GAP-11	GGTTCATTAATTGAAACTGGTG	154	75.9	Fukushima <i>et al.</i> 2010
			GAP-12	AACGCCAATCATATAAATTACAGC			
2	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>hly</i>	LM-hly-1	CGGAGTTCCGCAAAAGATG	234	79.1	Bobert <i>et al.</i> 1997
			LM-hly-2	CCTCCAGAGTGATCGATGTT			
<sup>†a</sup> 3	<i>Campylobacter jejuni</i>	specific	AB-F	CTGAATTTGATACCTTAAGTCAGC	86	77.0	Fukushima <i>et al.</i> 2010
			AB-R	AGGCACGCCCTAAACCTATAGCT			
4	EHEC	<i>stx2</i>	JMS2-F	CGACCCCTCTTGAACATA	108	80.4	Fukushima <i>et al.</i> 2010
			JMS2-R	GATAGACATCAAGCCCTCGT			
<sup>†a</sup> 5	EHEC and EPEC	<i>eaeA</i>	eae-F2	CATTGATCAGGATTTTCTGGTGATA	102	78.1	Fukushima <i>et al.</i> 2010
			eae-R	CTCATGCGGAAATAGCCGTTA			
6	EIEC and <i>Shigella</i> spp.	<i>virA</i>	virA-F	CTGCATTTCTGGCAATCTCTTCACA	215	80.4	Fukushima <i>et al.</i> 2009
			virA-R	TGATGAGCTAACTTCGTAAGCCCTCC			
<sup>†a</sup> 7	<i>Bacillus cereus</i>	<i>ces</i>	ces-TM-F	GATGTTTGGACGATGCAA	65	78.5	Fukushima <i>et al.</i> 2010
			ces-TM-R	CTTTCGGCGTGATACCCATT			
8	ETEC	<i>lt</i>	LT-1	AGCAGGTTTCCACCCGGATCACCA	275	80.4	Fukushima <i>et al.</i> 2010
			LT-2	GTGCTCAGATTCTGGGTCTC			
<sup>†a</sup> 9	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tdh</i>	Tdh199-F	GGTACTAAATGGCTGACATC	251	79.3	Fukushima <i>et al.</i> 2009
			Tdh199-R	CCACTACCACTCTCATATGC			
10	ETEC	<i>st</i>	ST-f	GCTAAACCAGTARGTCTTCAAAA	147	76.6	Nguyen <i>et al.</i> 2005
			ST-r	CCCGGTACARGCAGGATTACAACA			
<sup>†a</sup> 11	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>femB</i>	FemB-fw	AATTAACGAAATGGGCAGAAACA	93	81.2	Fukushima <i>et al.</i> 2010
			FemB-rv	TGCGCAACACACCCTGAACTT			
12	<i>Yersinia enterocolitica</i> and <i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>yadA</i>	yadA-X-F	CCAGAACCCTAAATGCAATGCCT	100	78.7	Fukushima <i>et al.</i> 2009
			yadA-X-R	CTTTAAACAGCTTGTTCAGCCA			
<sup>†a</sup> 13	EAEC	<i>astA</i>	EAST-1-S	GCCATCAACACAGTATATCC	106	83.5	Fukushima <i>et al.</i> 2010
			EAST-1-AS	GAGTGACGGCTTTGTAGTCC			
14	EHEC	<i>stx1</i>	JMS1F	GTCACAGTAACAAAACCGTAACA	95	79.6	Fukushima <i>et al.</i> 2010
			JMS1R	TCGTTGACTACTTCTTATCTGGA			
<sup>†a</sup> 15	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invA</i>	invA139	GTGAAATATCGCCACGTTCCGGCAA	284	85.0	Fukushima <i>et al.</i> 2003
			invA141	TCATCGCACCGTCAAAAGGAACC			
16	<i>B. cereus</i>	<i>nheB</i>	SG-F3	GCACTTATGGCAGTATTGCAGC	152	79.6	Fukushima <i>et al.</i> 2009
			SG-R3	GCATCTTTAAGCCCTCTGGTC			

<sup>†a</sup> Nine main foodborne bacteria

<sup>†b</sup> Melting point temperatures value of PCR products

表2 duplex SYBR Green real-time PCR法によって検査した12食中毒関連事例(2009~2012)

Case No.	Facility	Source of infection	Isolated bacteria	No. of examined samples	Positive detection	
					Conventional culture method	This study (Detected gene)
1	Hospital	Lunch	<i>C. perfringens</i> (TW9)	7	5	5 ( <i>cpe</i> )
2	Restaurant	Supper	<i>C. jejuni</i>	3	1	1 ( <i>C. jejuni</i> specific) 2 ( <i>astA</i> )
3	Restaurant	Supper	<i>C. jejuni</i>	7	6	6 ( <i>C. jejuni</i> specific) 1 ( <i>femB</i> ) 3 ( <i>astA</i> )
4	Restaurant	Lunch	<i>C. perfringens</i> (TW12)	4	3	4 ( <i>cpe</i> )
5	Hospital	Lunch	S. Nagoya	7	7	7 ( <i>invA</i> ) 2 ( <i>femB</i> )
6	Hotel	Supper	<i>V. parahaemolyticus</i>	4	3	3 ( <i>tdh</i> ) 1 ( <i>astA</i> )
7	Restaurant	Catering	<i>C. jejuni</i>	6	3	3 ( <i>C. jejuni</i> specific)
8	Restaurant	Supper	<i>C. jejuni</i>	4	2	3 ( <i>C. jejuni</i> specific) 1 ( <i>astA</i> )
9	School	Unknown	<i>C. perfringens</i> (TW78)	9	8	6 ( <i>cpe</i> ) 1 ( <i>astA</i> )
10	School	Unknown	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 5a	5	2	2 ( <i>yadA</i> )
11	Caterer	Catering	S. Enteritidis	5	5	3 ( <i>invA</i> ) 2 ( <i>astA</i> )
12	Caterer	Catering	<i>S. aureus</i>	8	8	4 ( <i>femB</i> ) 2 ( <i>eaeA</i> )

**表3 duplex SYBR Green real-time PCR法による各病原菌の検出限界**

Pathogen (target gene)	Detection Limit per g
<i>Campylobacter jejuni</i> (specific)	10 <sup>4</sup> CFU
<i>Salmonella</i> spp. ( <i>invA</i> )	10 <sup>4</sup> CFU
<i>Escherichia coli</i> -EHEC ( <i>stx1</i> )	10 <sup>5</sup> CFU
<i>E. coli</i> -EHEC ( <i>stx2</i> )	10 <sup>5</sup> CFU
<i>E. coli</i> -EPEC ( <i>eaeA</i> )	10 <sup>4</sup> CFU
<i>E. coli</i> -EAEC ( <i>astA</i> )	10 <sup>4</sup> CFU
<i>E. coli</i> -EIEC ( <i>virA</i> )	10 <sup>4</sup> CFU
<i>E. coli</i> -ETEC ( <i>st</i> )	10 <sup>4</sup> CFU
<i>E. coli</i> -ETEC ( <i>lt</i> )	10 <sup>3</sup> CFU
<i>Bacillus cereus</i> ( <i>ces</i> )	10 <sup>4</sup> CFU
<i>B. cereus</i> ( <i>nheB</i> )	10 <sup>4</sup> CFU
<i>Clostridium perfringens</i> ( <i>cpe</i> )	10 <sup>4</sup> CFU
<i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>femB</i> )	10 <sup>6</sup> CFU
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ( <i>tdh</i> )	10 <sup>3</sup> CFU
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ( <i>yadA</i> )	10 <sup>5</sup> CFU
<i>Listeria monocytogenes</i> ( <i>hly</i> )	10 <sup>5</sup> CFU

表4 real-time RT-PCR法による*C. jejuni*の遺伝子発現解析で対象とした遺伝子とタンパク質の機能 (GeneBank accession number NC\_002163)

Gene name or locus	Identified / predicted protein function
<i>cj0021c</i>	hypothetical protein Cj0021c
<i>nrdA</i>	ribonucleoside-diphosphate reductase alpha chain
<i>cj0037c</i>	putative cytochrome c
<i>cj0073c</i>	hypothetical protein Cj0073c
<i>cdtC</i>	cytolethal distending toxin C
<i>cdtB</i>	cytolethal distending toxin B
<i>cdtA</i>	cytolethal distending toxin A
<i>cj0118</i>	hypothetical protein Cj0118
<i>cj0129c</i>	outer membrane protein
<i>sodB</i>	superoxide dismutase (Fe)
<i>cj0203</i>	putative transmembrane transport protein
<i>mreB</i>	homolog of <i>E. coli</i> rod shape-determining protein
<i>perR</i>	peroxide stress regulator
<i>ahpC</i>	alkyl hydroperoxide reductase
<i>cj0355c</i>	two-component regulator
<i>cj0358</i>	putative cytochrome C551 peroxidase
<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit
<i>sdhB</i>	putative succinate dehydrogenase iron-sulfur protein
<i>sdhC</i>	putative succinate dehydrogenase subunit C
<i>cj0448c</i>	putative MCP-type signal transduction protein
<i>cj0467</i>	amino-acid ABC transporter integral membrane protein
<i>fusA</i>	elongation factor G
<i>cj0552</i>	hydrophobic protein
<i>cj0604</i>	hypothetical protein Cj0604
<i>cft</i>	ferritin
<i>dcuB</i>	putative anaerobic C4-dicarboxylate transporter
<i>flaC</i>	flagellin
<i>grpE</i>	heat shock protein grpE
<i>dnaK</i>	heat shock protein dnaK
<i>cj0864</i>	putative periplasmic protein
<i>acnB</i>	aconitate hydratase
<i>cj0909</i>	putative periplasmic protein
<i>ciaB</i>	CiaB protein
<i>cstA</i>	carbon starvation protein A homolog
<i>cj0920c</i>	putative ABC-type amino-acid transporter permease protein
<i>peb1A</i>	probable ABC-type amino-acid transporter periplasmic solute-binding protein
<i>pebC</i>	ABC-type amino-acid transporter ATP-binding protein
<i>secA</i>	preprotein translocase SECA subunit

<i>cj1190c</i>	putative MCP-domain signal transduction protein
<i>groEL</i>	60 kD chaperonin (cpn60)
<i>cj1226c</i>	putative two-component sensor
<i>htrA</i>	serine protease (protease DO)
<i>amiA</i>	putative N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
<i>spoT</i>	putative guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase
<i>cj1316c</i>	hypothetical protein Cj1316c
<i>flaB</i>	flagellin B
<i>flaA</i>	flagellin A
<i>ppk</i>	polyphosphate kinase
<i>cj1371</i>	putative periplasmic protein (vacJ homolog)
<i>cj1374c</i>	hypothetical protein Cj1374c
<i>fldA</i>	flavodoxin
<i>kata</i>	catalase
<i>cj1419c</i>	possible methyltransferase
<i>cadF</i>	outer membrane fibronectin-binding protein
<i>putA</i>	putative proline dehydrogenase/delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase
<i>cj1534</i>	possible bacterioferritin
<i>cj1541</i>	hypothetical protein Cj1541
<i>kgtP</i>	alpha-ketoglutarate permease
<i>recA</i>	recA protein
<i>gltA</i>	citrate synthase

---

表5 real-time RT-PCR法による遺伝子発現の定量的解析で使したプライマーの配列  
(GeneBank accession number NC\_002163)

Gene	Oligonucleotide (5'-3')	
	Forward primer	Reverse primer
<i>cj0021c</i>	AGGTGGATTTAACCCCATACCT	GTCAATGATGAACTACGCCAAA
<i>nrdA</i>	AATTGGAGCAAGGGGATTTT	GCAATGGCCATCAAATAACC
<i>cj0037c</i>	CAAAAGGCATGGCTGATTT	CGAACAAGGTAGCGGACATT
<i>cj0073c</i>	TGCAAAGTTTAGGTGCAAGG	TTCCATCATTACGCAAGA
<i>cdtC</i>	GCTGAAAGTTGTTGTTGGCATT	GCTGATGAACTTCCTTTTGGTT
<i>cdtB</i>	ATCCCTGCTATCATCCAGTTA	TGCAAGCTGAAGAAGTGATTGT
<i>cdtA</i>	GCGATATAAAGGTTTTGCGGTA	CTATGAGCAATACAGCGGTTCA
<i>cj0118</i>	ATTTTTCGAGAATGCGTCGT	CCGCGTTTGCTTTGATAAAAT
<i>cj0129c</i>	ACTATCAAGAACGCGTGGATT	GCTATGGATCAAGCGATGGTAT
<i>sodB</i>	CAAGCGGCACTAGAAAAAGAAT	CTAACCAAACCATCCTGAACC
<i>cj0203</i>	GTTTTAGATCGTGCAAGTGCTG	AGCGCCTAAATAATCTGGAACA
<i>mreB</i>	CCTTCTGTTGTGGCAGTTGA	AGCTTCGATATTGCTGGAG
<i>perR</i>	CCAAATGTGGTGGTATAGAGGA	GACAGATGATTGACGAGATTGC
<i>ahpC</i>	AACCGCGGTATTGAAGTAATTG	CCTGACCAATACCACCTTGATT
<i>cj0355c</i>	ATAACATTGGTTCCGCCAAG	TTGAAAGCTGGAGCTGATGA
<i>cj0358</i>	ATGGCATGGTAAAAACTCCAAC	TAATGCCAAGTTGCACACTACC
<i>sdhA</i>	AACTCCTTTTATTGCCACAGGA	CATAAAACGCTCACCACGATTA
<i>sdhB</i>	TTTTACCGCCTCTGTCAATCT	GAAGGTTCCCAATCCACAATTA
<i>sdhC</i>	GTGGGAGCTTTATGAGGATTTG	TACCGAAAGCATCTTCAGGTCT
<i>cj0448c</i>	CTTACTTCATCGGCAACAAC	GTTGCAGGAACATTGCATAGAA
<i>cj0467</i>	TTAGCTCAAGCTCCTGCTTTTT	CGGTGGAATTTGCTCTAAATGT
<i>fusA</i>	CTGTTGCAGTTGAGCCAAA	TGCAACTCACCCATACCTGA
<i>cj0552</i>	GTTGCCAGTACAGGACGAAT	GCCATAGGGGCTATTAAGGTC
<i>cj0604</i>	GAACCGGTTATGGGTTTTTGTA	ATTGTTTAAGTGGATCGCTTCG
<i>cft</i>	GGCTGTTTTACTTCTTGAAGCTC	AGCTGGAGCCTTCTTGTTTG
<i>dcuB</i>	AGCATCCTTGGACTTATGCTGT	TAGCCAAATCGCTTGGATAAGT
<i>flaC</i>	TATGCGTGTTGCTTCTGTTCTTA	ATGCACAAAAAGCTAGCGATAAAA
<i>grpE</i>	GATTGTCAAATTCACCGTCA	ACATCTTCGCCCAAAAACCTG
<i>dnaK</i>	CAAAAGAAGCGGGAACGATA	ACATTAATCGCCGTTTCAAG
<i>cj0864</i>	AAGTGCTAGCGCATTAAGTGAA	TTTAAAAGCTCTGCAGCCTCTG
<i>acnB</i>	AAACGATTAAGCCAAGAGTGGA	AGCTGCGTATCCAAAAGTAAGC
<i>cj0909</i>	TGCTGTAAATCTTTGGGCTGTT	ACTGATATCGCTTTTGGCACTT

<i>ciaB</i>	TAATGCCACCGCATGAGTATAA	ATAAAAAGCTTGGCAAGAAGCTG
<i>cstA</i>	CATCTCGCCAAGACTTCTACCT	TGGGATATTTGCCTTCTATG
<i>cj0920c</i>	TTGTAGCCATAACTCCGCCTAT	GTATAAGCCCTTTTGCGGTATG
<i>peb1A</i>	AGCTAGCAATTTGGCAACATCT	TGCTAATGCAGCAGAAGGTAAA
<i>pebC</i>	ATTTTCGTGTGTAACAACCACC	GTTTATCCAGCAACCCTTTCA
<i>secA</i>	CCACGCCAACACTAAAACCT	TAAATGCCATGAGTGGCAAA
<i>cj1190c</i>	TCGCGTATTACTTCAACCACTG	TGTAAATTTCAGCAAGGAGACA
<i>groEL</i>	AGGTGCAAATCCTATCGAGGTA	TTTTCATCAGAGTTGGCTGAGA
<i>cj1226c</i>	TTGCACAAACCCATCTTCAG	GCAATGCGAGATGATAGCAA
<i>htrA</i>	AGCAAAGTCGCAAAAACCATT	TCTGGTTTCCAAGAGGGTGA
<i>amiA</i>	TGCTGCGTTAGCATGTATAG	TACAAATCAGGAAAGCTTGTGGT
<i>spoT</i>	CCTCGTCTTGATTGGCTTACAG	GCCCTACTTTGGTATGCACTTC
<i>cj1316c</i>	TCTCCCCAGATGATCAAAGG	TCCATATCAAGCGTGATCCA
<i>flaB</i>	ACCTGAACCTGAAGAAAATCCA	TGATGCTAATATCGCTGATGCT
<i>flaA</i>	CGGCTGCAAAGTCTACATCAG	TCAAATCAGAGCCGACATTG
<i>ppk</i>	AAAGCGCATCCTGAACTTGT	TTTCTTCTGCGTGTGATGG
<i>cj1371</i>	TCATGGGTTTTGGTGGACTT	TGAAAACCGCTTCCTACACC
<i>cj1374c</i>	AAGCTGGGCTAAGGTTTTATCA	AGGTTTGATGGGGGAATTTAGT
<i>fldA</i>	CGCCACAAAAAGTGTGAGAA	TTCAACTGGGGGAAGTGGTG
<i>katA</i>	GGAATTCCTGCAAGTTATCGTC	GCAGCTTCTTGGTTGGTAAGAT
<i>cj1419c</i>	CTATCCCGATCTCACGCATC	GATATCGGTGCAGGAACTGG
<i>cadF</i>	TTGCCACCAAACCAAAACT	AGCGGTGGATTTGGACATTA
<i>putA</i>	CCGCTATTGCTAAAAGCAGAAT	TCCAACCTTGCTTTTAAGTGCT
<i>cj1534</i>	AGCGCCTATCATCCAAAGAC	TGCTTTACTCCGCTTGAAGTC
<i>cj1541</i>	GATCCTTGTGTGATGGATGAAA	GCAAAGCCAAATAAAGCTCCTA
<i>kgpP</i>	TCTTGGCTTTTTGGCTCTTTAG	ATAGCAAGATCGCCCACTGTAT
<i>recA</i>	GAAAACCACGCACCACTTTT	GCTCCTCCATTCAGACAAGC
<i>gltA</i>	TTGTTTTAGCAAGCCACTCTA	ATGAGGGCTTGACTTCTACAGC

---



表6 real-time RT-PCR法(A)およびマイクロアレイ法(B)による解析で遺伝子発現に変化が認められた遺伝子数

A: real-time RT-PCR法

Relative expression ratio	Number of gene	
	0h → 12w	
down regulated ( $\leq 0.5$ )	12	<i>cj0909</i> , <i>flaC</i> , <i>cadF</i> , <i>dcuB</i> , <i>sdhC</i> , <i>pebC</i> , <i>cj1371</i> , <i>cj0864</i> , <i>ciaB</i> , <i>cj1541</i> , <i>cdtA</i> , <i>cj0758</i>
no change ( $>0.5$ , $<2$ )	48	

B: マイクロアレイ法

Relative expression ratio	Number of gene		
	0h → 1w	1w → 12w	0h → 12w
down regulated ( $\leq 0.5$ )	32	6 *	34
up regulated ( $\geq 2$ )	20	6	31
no change ( $>0.5$ , $<2$ )	1628	1668	1615

\* *hisI*, *cj0728*, *cj0849*, *sdhC*, *cj0988*, *lolA*

表7 マイクロアレイ法により0.5倍以下の遺伝子発現変化が確認された遺伝子と変化率

Gene name or locus	Identified/ predicted protein function	Ratio
<u>1w vs 0h</u>		
<i>cj0168c</i>	periplasmic protein	0.45
<i>mfd</i>	transcription-repair coupling factor	0.36
<i>peb3</i>	major antigenic peptide PEB3	0.48
<i>lctP</i>	L-lactate permease	0.50
<i>pglJ</i>	GalNAc transferase	0.48
<i>oorB</i>	2-oxoglutarate-acceptor oxidoreductase subunit OorB	0.50
<i>bioD</i>	dethiobiotin synthetase	0.43
<i>tonB1</i>	TonB transport protein	0.08
<i>cj1075</i>	flagellar assembly protein FliW	0.49
<i>selB</i>	selenocysteine-specific elongation factor	0.38
<i>cj0873c</i>	hypothetical protein	0.35
<i>fdhA</i>	formate dehydrogenase large subunit	0.43
<i>cj1613c</i>	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	0.46
<i>neuB2</i>	N-acetylneuraminic acid synthetase	0.45
<i>cj0248</i>	hypothetical protein	0.14
<i>hypD</i>	hydrogenase isoenzymes formation protein	0.44
<i>fabZ</i>	(3R)-hydroxymyristoyl-ACP dehydratase	0.45
<i>frdC</i>	fumarate reductase cytochrome b-556 subunit	0.44
<i>thiG</i>	thiazole synthase	0.45
<i>cj1513c</i>	periplasmic protein	0.45
<i>cj1356c</i>	integral membrane protein	0.48
<i>pbpB</i>	penicillin-binding protein	0.43
<i>fdhB</i>	formate dehydrogenase iron-sulfur subunit	0.32
<i>pheT</i>	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	0.46
<i>cj0016</i>	transcriptional regulatory protein	0.50
<i>proC</i>	pyrroline-5-carboxylate reductase	0.19
<i>cj1427c</i>	sugar-nucleotide epimerase/dehydratase	0.45
<i>cj0362</i>	integral membrane protein	0.42
<i>fliI</i>	flagellum-specific ATP synthase	0.33
<i>cj1562</i>	hypothetical protein	0.47
<i>cj1723c</i>	periplasmic protein	0.40
<i>cj1164c</i>	hypothetical protein	0.32
<u>12w vs 1w</u>		
<i>hisI</i>	bifunctional phosphoribosyl-AMP cyclohydrolase/phosphoribosyl-ATP pyrophosphatase	0.44
<i>cj0728</i>	periplasmic protein	0.50
<i>cj0849c</i>	hypothetical protein	0.50
<i>sdhC</i>	succinate dehydrogenase subunit C	0.49
<i>cj0988c</i>	hypothetical protein	0.50
<i>lolA</i>	outer-membrane lipoprotein carrier protein	0.41

### 12w vs 0h

<i>bioD</i>	dethiobiotin synthetase	0.33
<i>sdaA</i>	L-serine dehydratase	0.47
<i>tonB1</i>	TonB transport protein	0.09
<i>fixA</i>	ferredoxin	0.49
<i>leuA</i>	2-isopropylmalate synthase	0.46
<i>selB</i>	selenocysteine-specific elongation factor	0.43
<i>cj0873c</i>	hypothetical protein	0.35
<i>fdhA</i>	formate dehydrogenase large subunit	0.42
<i>cj0208</i>	DNA modification methylase	0.47
<i>cj0850c</i>	MFS transport protein	0.48
<i>cj1613c</i>	pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	0.36
<i>cj0248</i>	hypothetical protein	0.12
<i>hypD</i>	hydrogenase isoenzymes formation protein	0.31
<i>putP</i>	sodium/proline symporter	0.47
<i>cj1486c</i>	periplasmic protein	0.39
<i>cj0200c</i>	periplasmic protein	0.50
<i>cj1722c</i>	hypothetical protein	0.44
<i>cj1356c</i>	integral membrane protein	0.50
<i>fdhB</i>	formate dehydrogenase iron-sulfur subunit	0.39
<i>thiJ</i>	4-methyl-5(beta-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate synthesis protein	0.46
<i>pheT</i>	phenylalanyl-tRNA synthetase subunit beta	0.47
<i>cj0016</i>	transcriptional regulatory protein	0.47
<i>proC</i>	pyrroline-5-carboxylate reductase	0.28
<i>cj1427c</i>	sugar-nucleotide epimerase/dehydratase	0.49
<i>cj0362</i>	integral membrane protein	0.40
<i>fliI</i>	flagellum-specific ATP synthase	0.29
<i>cj1562</i>	hypothetical protein	0.39
<i>cj1216c</i>	hypothetical protein	0.50
<i>ilvD</i>	dihydroxy-acid dehydratase	0.49
<i>cj0022c</i>	ribosomal pseudouridine synthase	0.45
<i>cj1656c</i>	hypothetical protein	0.37
<i>cj1723c</i>	periplasmic protein	0.49
<i>cj1164c</i>	hypothetical protein	0.32

---

表8 マイクロアレイ法により2倍以上の遺伝子発現変化が確認された遺伝子と変化率

Gene name or locus	Identified/ predicted protein function	Ratio
<u>1w vs 0h</u>		
<i>cj0708</i>	ribosomal pseudouridine synthase	2.17
<i>flgL</i>	lagellar hook-associated protein FlgL	2.51
<i>cj1122c</i>	integral membrane protein	2.34
<i>cetA</i>	bipartate energy taxis response protein CetA	2.39
<i>hldE</i>	D-beta-D-heptose 7-phosphate kinase/D-beta-D-heptose 1-phosphate adenylyltransferase	2.39
<i>hrcA</i>	heat-inducible transcription repressor	2.32
<i>cj0154c</i>	tetrapyrrole methylase family protein	3.07
<i>cj1421c</i>	sugar transferase	2.02
<i>cj1483c</i>	lipoprotein	2.22
<i>cj0331c</i>	hypothetical protein	2.01
<i>cj0040</i>	hypothetical protein	2.35
<i>cj1602</i>	hypothetical protein	2.02
<i>cj0934c</i>	sodium:amino-acid symporter family protein	2.11
<i>cj0728</i>	periplasmic protein	2.25
<i>prmA</i>	ribosomal protein L11 methyltransferase	2.03
<i>cj0417</i>	hypothetical protein	2.23
<i>cj0648</i>	hypothetical protein	3.13
<i>cj0939c</i>	hypothetical protein	2.25
<i>cj1432c</i>	sugar transferase	2.25
<i>cj0900c</i>	hypothetical protein	2.50
<u>12w vs 1w</u>		
<i>ffh</i>	signal recognition particle protein	2.18
<i>mfd</i>	transcription-repair coupling factor	2.24
<i>ctsT</i>	periplasmic protein	2.06
<i>cj1000</i>	transcriptional regulator	2.28
<i>cj0058</i>	peptidase C39 family protein	2.54
<i>cj0747</i>	hypothetical protein	4.82

## 12w vs 0h

<i>cj0708</i>	ribosomal pseudouridine synthase	2.41
<i>cj1122c</i>	integral membrane protein	2.00
<i>cetA</i>	bipartate energy taxis response protein CetA	2.32
<i>hldE</i>	D-beta-D-heptose 7-phosphate kinase/D-beta-D-heptose 1-phosphate adenylyltransferase	2.49
<i>galU</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	2.10
<i>cj0154c</i>	tetrapyrrole methylase family protein	3.13
<i>cj0160c</i>	radical SAM domain protein	2.32
<i>cj1310c</i>	hypothetical protein	2.13
<i>cj1602</i>	hypothetical protein	2.09
<i>cj0694</i>	periplasmic protein	2.13
<i>rplR</i>	50S ribosomal protein L18	2.44
<i>cj0648</i>	hypothetical protein	2.85
<i>cj0399</i>	colicin V production protein	2.00
<i>cj0939c</i>	hypothetical protein	2.28
<i>ispH</i>	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	2.17
<i>nsrR</i>	transcriptional regulator	2.36
<i>cheA</i>	chemotaxis histidine kinase	2.27
<i>cj1539c</i>	anion-uptake ABC-transport system permease	2.14
<i>cj1000</i>	transcriptional regulator	2.04
<i>cj0908</i>	periplasmic protein	2.08
<i>cj1275c</i>	peptidase M23 family protein	2.16
<i>cj1397</i>	ferrous iron transport protein	2.02
<i>rimM</i>	16S rRNA processing protein	2.01
<i>ctsP</i>	ATP/GTP-binding protein	2.86
<i>cj0412</i>	ATP/GTP binding protein	2.12
<i>serB</i>	phosphoserine phosphatase	2.19
<i>cj0747</i>	hypothetical protein	2.97
<i>lpxA</i>	UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase	2.01
<i>cj0900c</i>	hypothetical protein	3.33
<i>dccR</i>	two-component regulator	2.03
<i>cj1168c</i>	integral membrane protein	2.07

---

表9 Sdhをコードする遺伝子の発現変化(マイクロアレイ法)

Gene	Identified/ predicted protein function	Ratio	
		1w vs 0h (cont)	12w vs 1w (cont)
<i>sdhA</i>	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	1.76	0.62
<i>sdhB</i>	succinate dehydrogenase iron-sulfur protein	0.93	0.70
<i>sdhC</i>	succinate dehydrogenase subunit C	1.44	0.49

表10 培養細胞との共培養の結果の一部（左：HeLa, 右：CACO-2）

細胞の 培養時間(h)	<i>C. jejuni</i> 接触時間(h)	細胞内 培養時間(h)	結果	細胞の 培養時間(h)	<i>C. jejuni</i> 接触時間(h)	細胞内 培養時間(h)	結果
48	2.5	0	-	48	2.5	0	-
48	5	48	+ (1 colony)*	48	2.5	0	-
48	5	72	-	48	4	0	-
24	5	24	-	48	5	48	-
24	5	48	-	48	5	72	-
24	5	72	-	24	5	24	-
48	5	24	-	24	5	48	-
48	5	48	-*	24	5	72	-
48	5	72	-	24	5	24	-
48	2.5	0	-	24	5	48	-
0	5	24	-	24	5	72	-
0	5	48	-	0	5	24	-
0	5	72	-	0	5	48	-
0	24	24	-	0	5	72	-
0	24	48	-	0	24	72	-
0	24	72	-	0	24	48	-
48	24	48**	-	0	24	96	-
48	24	96**	-	48	24	48**	-
				48	24	96**	-

\* 同条件であるが、再現性は得られなかった

\*\* 血清無