

|         |  |
|---------|--|
| 氏名(本籍)  | 飯田 奈都子(静岡県)  |
| 学位の種類   | 博士(獣医学)  |
| 学位記番号   | 甲第 133 号   |
| 学位授与年月日 | 平成 25 年 9 月 30 日                                     |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 3 条第 2 項該当                                     |
| 学位論文題名  | 食中毒起因菌 <i>Campylobacter jejuni</i> の低温損傷に関する分子生物学的研究 |
| 論文審査委員  | (主査) 村 上 賢<br>(副査) 森 田 英 利<br>田原口 智 士                |

## 論文内容の要旨

*Campylobacter jejuni* による食中毒は、現在、細菌性食中毒の中で全国的に発生件数が最も多い食中毒であり、その予防対策を講じることが急務となっている。*C. jejuni* は、発育に酸素濃度が 3~15% の好気条件を必要とし、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、低温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り、*C. jejuni* 食中毒の発生防止を難しくしている理由の一つと考えられている。日本における *C. jejuni* 食中毒の原因食品としては、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る。そして、菌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おり、VBNC 状態の菌は、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。*C. jejuni* 食中毒を制御するためには、菌の特徴に応じた検査法や予防対策が必要であり、培養可能な菌のみならず、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解明することが非常に重要である。しかし、*C. jejuni* の低温下での損傷および回復に関する分子機構は、ほとんど明らかになっていない。本研究では、まず、*C. jejuni* が VBNC 状態でも検出可能な方法を、遺伝子検査法である real-time PCR 法を活用して確立した。その際、煩雑な食中毒検査の実情を考慮し、他の主要な食中毒起因菌も一斉に検索できるシステムに改良し、臨床検体で検査法の有用性を検討した(第 1 章)。次に、*C. jejuni* を低温(4℃)で保存し、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調べ、VBNC 状態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

対象微生物は *C. jejuni* を含む 16 種類の主要な食中毒起因菌とし、これらを検出するための 16 遺伝子を一斉に検索できるよう、既報のプライマーの組み合わせを改良して検査法を確立した。方法は、8 系列の duplex SYBR Green real-time PCR を、96 穴マイクロプレートを用いて行った。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）およびサンプル（9 検体）を含む。判定は、融解曲線分析で陽性コントロールとサンプルの  $T_m$  値を比較して確認した。その結果、本検査法は 16 遺伝子の特異的に検出することが可能であり、検出限界は QIAamp DNA Stool Mini Kit を用いて DNA 抽出した場合、グラム (g) 換算で  $10^3 \sim 10^6$ CFU であった。*C. jejuni* では  $10^4$ CFU/g であった。食中毒関連 12 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、従来の培養法と同等の結果が 3~4 時間で得られ、本検査法の有用性を証明することができた。*C. jejuni* 食中毒 4 事例中 1 事例において、培養法では陰性であった検体が本検査法では陽性と判定された。これは、検体中の *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。

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

*C. jejuni* ATCC700819 株を使用し、PBS (-) で約  $10^8$  CFU/mL に調製した菌液を 4℃で静置保存した。全菌数はアクリジンオレンジ、生存率および生菌数は LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits で染色後、蛍光顕微鏡観察により測定した。培養可能な菌数は、*C. jejuni* の選択培地である mCCDA 培地および非選択培地である血液寒天培地で測定した。経時的变化をみるため、1 週間毎に 12 週間目まで各菌数を測定したところ、全菌数は期間を通して変化はほとんどなく、生存率は 12 週間目まで約 70~80%程度を推移していた。一方、培養可能な菌数は、時間経過とともに減少がみられ、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、集落形成がみられなくなった。8 週間目の時点では、血液寒天培地での培養はまだ可能であるが、11 週間目の *C. jejuni* は、「生きていますが培養できない状態」であり、本実験で実験的に VBNC 状態を作製することが可能であった。そこで、本研究では、*C. jejuni* を PBS (-) 4℃で 12 週間静置保存し、生きていますが血液寒天培地で培養できなくなった状態を“VBNC 状態”、一方で、4℃静置直後の培養可能な状態を“通常状態”と定義し、以後の実験を行った。*C. jejuni* の形態を、蛍光および電子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 週間目の VBNC 状態では多くが球状 (coccoïd) に変化していた。作製した VBNC 状態の菌は、第 1 章で確立した検査法で検出可能であった。

### 【第3章】VBNC 状態の *C. jejuni* の遺伝子発現変化

4℃静置直後（通常状態）および 12 週間目（VBNC 状態）の *C. jejuni* から Total RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法によって遺伝子発現変化について調べた。低温ストレスに関連すると推測される 60 遺伝子について解析した結果、12 遺伝子に約 2 倍以上の減少の変化がみられ、*C. jejuni* の VBNC

状態への移行に、遺伝子発現の関与が推測された。そこで、次に、マイクロアレイ法により、*C. jejuni* のほぼ全遺伝子である 1680 遺伝子について、4℃ 静置直後（通常状態）、1 週間目（短期間低温状態）および 12 週間目（VBNC 状態）の 3 点を比較解析した。VBNC 状態に関与する候補遺伝子として、VBNC 状態の「培養できない」という状態から、何らかの酵素活性が減少していると推測し、発現の 2 倍以上減少した遺伝子に注目した。さらに、第 2 章の培養可能な菌数を測定する実験における培養能は、4℃、1 週間目では変化しなかったことから、1 週間目に発現の減少した遺伝子は、単に低温による影響と推測して除外した。その結果、候補遺伝子は 6 遺伝子に絞り込まれ、そのうち、特に機能面から 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サブユニット C (SdhC) をコードする遺伝子に注目した。これは、先に行った real-time RT-PCR 法においても、発現の減少した遺伝子に含まれており、さらに 1 週間目では遺伝子発現は減少せず、12 週間目では 2 倍以上の減少があることを定量的 real-time RT-PCR により確認した。Sdh を構成する他のサブユニット (SdhA,B) の遺伝子発現も同様の経時的変化を示し、このことから、Sdh が VBNC 状態への移行に関連する候補遺伝子の一つと推測された。

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

VBNC 状態で遺伝子発現の減少がみられた SdhA, B, C は、TCA サイクルでコハク酸をフマル酸に酸化するときに作用する酵素である。そこで、フマル酸を培地へ添加し、TCA サイクルの反応を活性化することで VBNC 状態からの回復を試みた。コロンビア寒天培地へフマル酸を添加して培地を調製後、VBNC 状態の菌を  $10^7$ CFU 接種して微好気培養した。しかし、期待された集落形成は認められなかった。そこで、作製した VBNC 状態の *C. jejuni* が、実際に培養可能状態へ転換することを確認することにした。まず、他菌種で検討されている培養細胞との共培養を試みた。VBNC 状態の *C. jejuni* と、CACO-2 や HeLa 等の上皮系培養細胞と共培養し、*C. jejuni* との接触時間や細胞培養時間等について様々な組み合わせを検討した。その結果、HeLa を用いた 1 試験でのみ血液寒天培地上での集落形成を認めたものの、再現性を得ることはできなかった。次に、高温条件で作製した *C. jejuni* の VBNC 状態の菌は、発育鶏卵の卵黄嚢に接種することで培養能を回復するとの報告があり、本研究の低温条件で作製した VBNC 状態の菌も同様に、発育鶏卵接種によって回復するのか検討した。その結果、1 回目は 6 日目に鶏卵 6 個中 1 個、2 回目は 6 日目に鶏卵 13 個中 1 個と、極めて少ない数であるが、VBNC 状態の *C. jejuni* を接種した鶏卵の卵黄液から血液寒天培地ならびに mCCDA 培地上で培養可能な *C. jejuni* が検出された。鶏卵接種後 2 日目での回収では、培養可能な *C. jejuni* 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%と低かったものの、再現性が得られ、本研究で作製した VBNC 状態は、生体を通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。回復株の全ゲノム解析をしたところ、今回注目した 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も元の菌株の通常状態と同様であることを確認した。

以上、本研究により、*C. jejuni*をはじめ主要な食中毒起因菌が VBNC の状態であっても検出できる遺伝子検査法を確立した。そして、低温（4℃）に保存することで *C. jejuni* の VBNC 状態を実験的に作製できた。遺伝子発現を解析した結果、*SdhA, B, C* の発現が減少しており、VBNC 状態への移行に関与する候補遺伝子の一つと推測された。*Sdh* の代謝産物であるフマル酸の培地への添加および培養細胞との共培養では、VBNC 状態からの回復はみられなかったが、発育鶏卵接種によって低温条件下で作製した VBNC 状態からの回復が確認された。このことから、*C. jejuni* の VBNC 状態の菌は生体の感染源となる可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

*Campylobacter jejuni* は、現在、細菌性食中毒の中で全国的に発生件数が最も多い食中毒の起因菌であり、その予防対策を講じることが急務となっている。*C. jejuni* の発育には微好気条件（酸素濃度が 3～15%）を必要とし、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、低温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り、*C. jejuni* 食中毒の発生防止を難しくしていると考えられている。日本における *C. jejuni* 食中毒の原因食品としては、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。低温状態では、他の菌と同様に *C. jejuni* も、損傷やストレスを受け、菌の増殖能力が低下して、生きてはいるが培養できない、いわゆる VBNC (viable but non-culturable) 状態になることが確認されている。VBNC 状態の菌は、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。*C. jejuni* 食中毒を制御するためには、培養可能な菌のみならず VBNC 状態の菌も検出可能な検査法を確立すること、そして、低温における本菌の生存機構を解明することが非常に重要である。そこで、本研究では、まず *C. jejuni* が VBNC 状態でも検出可能な方法として real-time PCR 法を活用して実用的で信頼性の高い検査方法を構築した。次に、これまでほとんど明らかになっていない *C. jejuni* の低温下での損傷および回復に関する分子機構の解明に取り組んだ。即ち、*C. jejuni* を低温（4℃）で保存し、実験的に VBNC 状態を作製した。続いて、VBNC 状態に関連する候補遺伝子の網羅的検索及び発現解析を実施し、VBNC 状態から回復させる条件の検討をした。本論文は、4 章で構成されており、各章の成績は以下のように要約できる。

#### 【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

著者は、現場での有用な食中毒検査法を考慮し、*C. jejuni* を含む 16 種類の主要な食中毒起因菌を一斉に検索できるように、これら菌の 16 遺伝子を検出する既報のプライマーの組合せを改良して検査法を構築した。96 穴マイクロプレートを用いた 8 系列の duplex SYBR Green real-time PCR 法であり、一度に 9 検体の検索が可能である。融解曲線分析による  $T_m$  値から、16 遺伝子の特異的に検出することが可能であり、それから起因菌を信頼性高く判定している。*C. jejuni* の検出限界は、QIAamp DNA Stool Mini Kit を用いて抽出した DNA の場合、 $10^4$ CFU/g 糞便であった。本検査法を食中毒関連 12

事例の患者糞便検体で実施したところ、従来の培養法と同等の結果が3~4時間で得られ、本検査法の有用性を示した。*C. jejuni* 食中毒4事例中1事例において、培養法では陰性であった検体を本検査法では陽性と判定することができ、検体中の *C. jejuni* が VBNC (あるいは死菌の状態) であっても、本検査法では検出できることを示していると考えられた。

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

*C. jejuni* ATCC700819 株の約  $10^8$  CFU/mL-PBS (-) 菌液を 4℃で12週間静置保存した。1週間毎に全菌数、生存率および生菌数 (LIVE/DEAD *BacLight* Bacterial Viability Kits による染色) を蛍光顕微鏡観察により測定した。培養可能な菌数は、*C. jejuni* の選択培地である mCCDA 培地および非選択培地である血液寒天培地で測定した。12週間全期間を通して、全菌数はほとんど変化がなく、生存率は約70~80%程度を推移していた。一方、培養可能な菌数は、時間経過とともに減少がみられ、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、集落形成がみられなくなった。8週間目では、血液寒天培地での培養はまだ可能であるが、11週間目では、「生きていますが培養できない状態」であり、実験的に VBNC 状態を作製することができた。これら *C. jejuni* の形態を、蛍光および電子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週間目の VBNC 状態では球状 (coccoid) に変化していることを確認した。本研究では、PBS(-)中で4℃、12週間静置保存し、生きていますが血液寒天培地で培養できなくなった *C. jejuni* を “VBNC 状態” と定義し、以後の実験を行った。なお、作製した VBNC 状態の菌は、第1章で確立した検査法で検出可能であることを確認した。

## 【第3章】VBNC 状態の *C. jejuni* の遺伝子発現変化

4℃静置直後 (通常状態) および12週間目 (VBNC 状態) の *C. jejuni* から Total RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法によって、低温ストレスに関連すると推測される60遺伝子について遺伝子発現変化を調べた。その結果、12遺伝子に約2倍以上の減少の変化がみられ、*C. jejuni* の VBNC 状態における遺伝子発現の関与が推測された。次に、マイクロアレイ法により、*C. jejuni* (ゲノムサイズ約1.6Mbp) のほぼ全遺伝子である1680遺伝子の発現について、4℃静置直後、4℃静置1週間目 (短期間低温状態) および12週間目の3点で網羅的に比較解析した。第2章の培養能の結果を考慮して、短期間低温状態では通常状態と比べ発現は変化せず (短期間低温状態で発現の減少した遺伝子は、単に低温による影響と推測して除外した)、VBNC 状態で mRNA 発現が2倍以上減少した遺伝子に注目したところ、6遺伝子が VBNC 状態に関与する候補遺伝子として挙げられた。そのうち、機能面から、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サブユニット C (SdhC) をコードする遺伝子に注目した。この遺伝子の発現変化を再度、定量的 real-time RT-PCR でも確認した。また、Sdh を構成する他のサブユニット (SdhA, B) の遺伝子発現も同様の経時的変化を示し、このことから、Sdh が VBNC 状態への移行に関連する有力な候補遺伝子の一つと推測した。

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

第3章のVBNC状態で遺伝子発現が減少した SdhA, B, C は、TCA サイクルでコハク酸をフマル酸に酸化するときに作用する酵素である。そこで、フマル酸を培地へ添加し、TCA サイクルの反応を活性化することでVBNC状態からの回復を試みた。コロンビア寒天培地へフマル酸を添加し、VBNC状態の菌を  $10^7$ CFU 接種して微好気培養したが、期待された集落形成は認められなかった。作製したVBNC状態の *C. jejuni* が、実際に培養可能状態へ回復することを確認するため、他菌種で検討されている培養細胞との共培養を試みた。VBNC状態の *C. jejuni* と、CACO-2 や HeLa 等の上皮系培養細胞と共培養し、*C. jejuni* との接触時間や細胞培養時間等について様々な組み合わせを検討した。その結果、HeLa を用いた1試験でのみ血液寒天培地上での集落形成を認めたものの、再現性を得ることはできなかった。次に、高温条件で作製した *C. jejuni* のVBNC状態の菌は、発育鶏卵の卵黄嚢に接種することで培養能を回復するとの報告があり、本研究の低温条件で作製したVBNC状態の菌も同様に、発育鶏卵接種によって回復するのか検討した。その結果、10%程度と低い確率ではあるが、VBNC状態の *C. jejuni* を接種した6日目の鶏卵の卵黄液から血液寒天培地ならびに mCCDA 培地上で培養可能な *C. jejuni* が、再現性をもって検出された。本研究で作製したVBNC状態は、生体を通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。回復株の全ゲノム解析をしたところ、今回注目した 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も元の菌株の通常状態と同様であることを確認した。

以上、本研究により、主要な食中毒起因菌を含め *C. jejuni* がVBNCの状態であっても検出できる遺伝子検査法を構築した。そして、低温(4°C)に長期間保存することで球状(cocoid)となった *C. jejuni* のVBNC状態を実験的に作製することができた。この遺伝子発現をマイクロアレイ法及び定量的 real-time RT-PCR 法を用いて網羅的に解析した結果、VBNC状態への移行に関与する有力な候補遺伝子の一つとしてコハク酸デヒドロゲナーゼ(Sdh)を推測した。また、Sdhの代謝産物であるフマル酸の培地への添加および培養細胞との共培養では、VBNC状態からの回復はみられなかったが、発育鶏卵接種によって低温条件で作製したVBNC状態からの回復が確認でき、VBNC状態の *C. jejuni* は生体の感染源となる可能性を示唆した。

本研究で得られた食中毒起因菌 *C. jejuni* の低温損傷(VBNC状態)に関する知見は、食品衛生上、獣医学上意義ある業績として評価できることから、博士(獣医学)の学位を授与するのにふさわしい研究と判定した。