

低温状態における *Campylobacter jejuni* のストレス応答

Warangkhan Chaisowwong

畜産学研究科畜産衛生学専攻食品有害微生物学講座（博士後期課程1年）

1. 目 的

Campylobacter spp. はグラム陰性、らせん状の形態で、微好気性の細菌で、世界中で人の食中毒の主要な原因菌である。本菌が汚染した鶏肉が主たる感染源で、そのような食材は冷蔵状態で流通されている。しかし、本菌の低温下での生残性についての詳細は不明である。そこで、低温状態での本菌のストレス応答について実験を行った。

2. 方 法

2.1. 培養

C. jejuni は Bolton broth で37℃もしくは4℃で培養した。培養後、生菌数と総菌数を通常の方法で計測した。

2.2. 病原性に関する遺伝子転写について

リアルタイム RT-PCR を行うためにトータル RNA を抽出した。*flaA*, *flaB*, *ciaB*, *cadF*, *cdtA*, *cdtB* と *cdtC* などの病原因子の発現レベルを定量化するために、インターナルコントロールとして *rpoA* 遺伝子を用いた。

2.3. 細胞侵入試験

Caco2細胞を *C. jejuni* と混合し、37℃で2時間培養した後、細胞外の *C. jejuni* を gentamicin で殺し、24, 48そして72時間毎に細胞を溶解し、細胞内に侵入した *C. jejuni* 数を計測した。

2.4. 細胞表層への付着細菌と細胞内の細菌を区別するための免疫染色

C. jejuni を感染させた Caco2細胞を paraformaldehyde で固定し、細胞表層に付着した *C. jejuni* は抗体で初めに反応させて、その抗原抗体複合体を red fluorescent で標識した羊 IgG で染色した。細胞内の *C. jejuni* は膜の透過性を高めた処理をした後、抗体で反応後、green fluorescent で標識した羊 IgG で染色した。最終的に細胞核を DAPI で染色して、顕微鏡観察を行った。

3. 結 果

4℃の低温に暴露すると、*C. jejuni* は、細菌のストレス応答の一つである生きているが培養できない状態（viable but non-culturable state：VBNC）に入り込んでいた（Figures 1と2）。VBNC 状態では、細菌は増殖が止まり、集落形成が見られなくなる（Figure 1）。また、この状態で、菌体の形態が変化する。大半の VBNC 細菌はもともとのらせん状から桿菌状に変化し、約20%が

coccoid 状に変化していた。VBNC 細菌の病原遺伝子 (*flaA*, *flaB*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *cadF* および *ciaB*) の発現は、減少していた (Figure 3)。特に, *flaA* と *cadF* の発現はもっとも抑制されていた。しかしながら, 図 4 で示すように, VBNC 細菌は Caco2細胞に吸着でき, 同時に細胞内に侵入していた (細胞内細菌はオレンジに, 細胞吸着細菌は緑に染色されている)。更に, 細胞内 *C. jejuni* は蘇生し, 感染後72時間には寒天平板上に集落を形成した。VBNC 状態の *C. jejuni* が MEM の影響で蘇生する可能性を否定するために, VBNC 状態の *C. jejuni* を10% FBS 添加 MEM 中で培養したが, 感染後24, 48, 72時間でも寒天平板上に集落形成は観察されなかった。(データは示さず)。

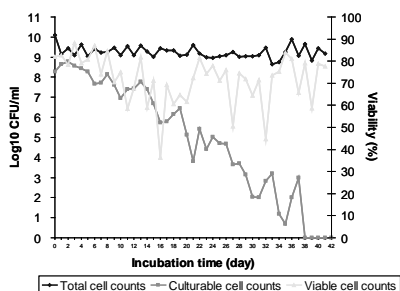


Figure 1 Survival of *C. jejuni* ATCC8488 at 4°C

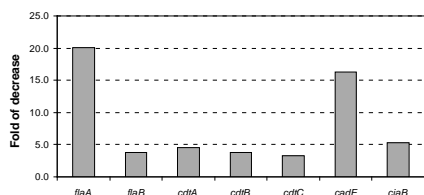


Figure 3 Fold of decrease of gene expression compared with non-stress exposed *C. jejuni* cells

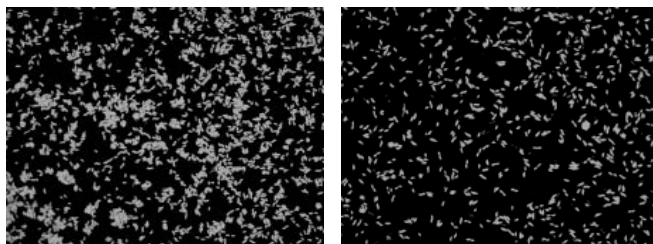


Figure 2a Viability at day0 of incubation Figure 2b Viability at day40 of incubation

Figure 2a and 2b the morphology and viability of *C. jejuni* cells at normal condition and at VBNC state

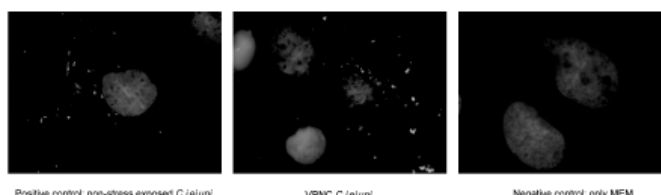


Figure 4 Immunostaining for extracellular and intracellular bacteria in Caco-2 cells.

4. 考 察

今回の研究では, *C. jejuni* が低温下で VBNC 状態に入り込むことが示された。さらに, それらの VBNC 細菌は Caco2細胞内に侵入後, 蘇生することも in vitro の侵入試験で明らかになった。蘇生された細菌の数は低かったが, VBNC 状態の *C. jejuni* が明らかに培養可能な状態になった。この発見のあらかず意味は, VBNC 状態の *Campylobacter* は公衆衛生上危害となり, 人の健康を害する可能性があることであり, カンピロバクターの人への発症菌数が少ないことを考えると, VBNC 状態の *C. jejuni* がカンピロバクター感染症の主要な要因をなしている可能性が考えられた。

今回の研究で病原遺伝子の発現を調べた。その結果, 全ての調べた病原遺伝子の発現は VBNC 状態で抑制され, 特に *flaA* と *cadF* 遺伝子の発現が強く抑制された。カンピロバクターの鞭毛は運動性や細胞への付着に重要な役割を持っている。FlaA 蛋白は鞭毛の主要な構成蛋白であり, マイナーな構成蛋白 FlaB と共に鞭毛の繊維を形成している。*flaA* 遺伝子は, 鞭毛特異的なシグマ因子である σ^{28} に調節されており, *flaB* 遺伝子は, 鞭毛の基幹部分の遺伝子を調節しているシグマ因子 σ^{54} 依存のプロモーターに調節されている。我々は, VBNC 状態の *C. jejuni* では, *flaA* 遺伝子の抑

制が *flaB* の抑制よりも5.28倍高いことを見出し、このことは、鞭毛形成が抑制されていると考えられた。宿主細胞の細胞外マトリックスを構成する fibronectin へのカンピロバクターの吸着は外膜蛋白の CadF により行われている。cadF 遺伝子の発現抑制は宿主細胞への吸着能が減少すると考えられる。しかしながら、今回の研究で、VBNC 状態の *C. jejuni* は細胞への吸着や侵入能が失われていないことを明らかに示していた。すなわち、VBNC 現象は、細菌の生き残り策として、多くのエネルギーを必要とする運動性などの生残性に不必要な活動を減少させるように働いているのかもしれない。病原性を発現するよりも生き残るために、細菌は不必要な遺伝子群の発現を抑えているのかもしれない。VBNC 状態の *C. jejuni* は、生き残りのためにエネルギー消費を最小限にしていると思われ、病原因子の発現を完全に止めているのではなく、宿主細胞内に侵入する機会を多分待っているのであろうと思われる。一度 VBNC 状態の *C. jejuni* が汚染食品などを介して人に感染すると、人の腸管に付着し侵入して発症させるのであろう。さらなる研究を通じて、VBNC 状態の *C. jejuni* が食品加工や保存中に出現する可能性を調べ、VBNC や蘇生の機構を明らかにして VBNC 状態の細菌を検出できる系を確立する必要があるだろう。

5. 謝 辞

本研究の遂行にあたり、実験補助等の御協力をいただいた、大動物特殊疾病研究センター原田俊彦博士（研究機関研究員）及び楠本晃子博士（AGH 助教）並びに、ご指導助言を賜った大動物特殊疾病研究センター牧野壮一教授と川本恵子准教授に対しまして感謝申し上げます。

キーワード： *Campylobacter jejuni*, ストレス応答, VBNC