
カンピロバクターのバイオフィルム形成機構と
その生物学的機能に関する研究

16580250

平成16年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成18年4月

研究代表者 三澤 尚明
宮崎大学 農学部 助教授

目 次

第1章 概 要

1. 研究の背景と目的..... 3
2. 研究組織と予算配分額..... 4
3. 研究発表..... 4
 3. 1 学会誌等発表
 3. 2 口頭発表
 3. 3 出版物
4. 研究成果による工業所有権の出願・取得状況..... 5
5. 英文要約..... 6

第2章 本 論

1. 各論
 1. 1 バイオフィルム形成関連遺伝子の検索..... 9
 1. 1. 1 バイオフィルム形成能の定量的評価
 1. 1. 2 ノックアウトミュータントの作製
 1. 1. 3 変異株のバイオフィルム形成能
 1. 2 バイオフィルの生物学的機能に関する研究..... 19
 1. 2. 1 乾燥抵抗性との関連性について
 1. 2. 2 熱抵抗性との関連性について
 1. 2. 3 消毒薬抵抗性との関連性について
 1. 2. 4 抗生物質感受性との関連性について
 1. 2. 5 鳥肉（皮）への付着性との関連性について
 1. 3 バイオフィルムの構成成分に関する研究..... 36
 1. 3. 1 バイオフィルム形成に影響を及ぼす因子
 1. 3. 1 バイオフィルムの構成成分の解析（多糖の検出）
 2. 参考文献..... 42
 3. 総括..... 48
 4. 謝辞..... 49
- 付 論文別刷

第 1 章 概 要

第1章 概要

1. 研究の背景と目的

食中毒細菌の一種であるカンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*)はグラム陰性、微好気性のラセン桿菌で、家禽、家畜、伴侶動物および野生動物の消化管内に広く分布し、主に菌に汚染された食品や飲料水を媒介する間接伝播と保菌動物の糞便による直接伝播によってヒトに感染する。したがってカンピロバクター感染症は人獣共通感染症 (Zoonosis) として公衆衛生上重要なテーマの一つになっている。特にわが国では牛肉、鶏肉、レバー等の生食の食習慣があるため、カンピロバクターに感染する危険性が高く、公衆衛生上深刻な問題となっている。

カンピロバクター感染症の増加傾向は先進諸国において 1990 年以降顕著に認められ、人口 10 万人に対する罹患率 (1997 年) は、米国 25 人、デンマーク 51 人、イギリス 100 人となっており、サルモネラ症の患者数を上回っている。このような世界各国における増加傾向は単に検査技術が向上したためによることだけではないと考えられる。わが国においても 1982 年に *C. jejuni* と *C. coli* が食中毒細菌に指定されてから、本菌による集団食中毒は毎年概ね 20 例以上の発生があり、散發性下痢においてはサルモネラの検出率よりも高い傾向が見られる。厚生労働省の食中毒統計によると、平成 13 年 15 年および 16 年の *C. jejuni/coli* の発生件数はサルモネラのそれを上回り、第 1 位となっている。日本における増加傾向は、平成 10 年より食中毒統計の中に 1 人患者事例を入れたことによるところが大きく、散發事例が非常に多いことを示している。

C. jejuni は、実験的には 30°C 以下の温度では増殖できず、大気中の酸素濃度で速やかに死滅するため、食品等の環境は動物の腸管内よりも厳しい生存環境であると考えられる。しかしながら、本菌は低温保存などのある条件下では食品中で長期間生存することが知られており、河川や下水からも分離されることから、このような環境に適応して生存するための戦略を兼ね備えていると考えられる。従って、多様に変化する環境要因に応答する遺伝子を検索し、それらの発現や調節機構が菌の環境中での生存様式とどのように関連しているかを明らかにすることは、本菌による食中毒発症機序を理解する上で重要である。

Campylobacter jejuni の細胞壁外側には糖衣あるいはスライムと呼ばれる有機ポリマーが付着し、液体培地中で培養すると容器として用いたガラスやプラスチックの表面に付着して、いわゆるバイオフィルムを形成することを我々は観察してきた。バイオフィルムの形成は多くの細菌で認められ、外部環境から菌体自身を保護したり、化学療法剤や宿主免疫機構に抵抗性を示すこと等が知

られている。平成14年度～15年度における科学研究費補助金〔基盤研究（C）（2）（課題番号14560268）〕研究では、*Campylobacter*のバイオフィルムの形成過程を形態学的に観察した。その結果、バイオフィルム形成初期には菌体が自己の運動性によって互いに集合して微細集落を作り、それらが徐々に成長して融合することが分かった。電子顕微鏡によってバイオフィルムの微細構造を観察すると、鞭毛は菌体同士を接着する架橋構造をとるための役割を果たしていた。さらに、バイオフィルムの超薄切片をルテニウムレッドで染色すると、菌体表層に電子密度の高い部分が認められ、多糖が構成成分に含まれることが示唆された。

本研究ではこれまでの研究成果を踏まえ、バイオフィルムの形成に関与する遺伝子群の検索を行うとともに、構成成分の化学的分析を行った。さらに、バイオフィルムの生物学的機能について明らかにすることを目的として、環境中における生存性や消毒薬剤に対する抵抗性などにおける役割について調べた。

2. 研究組織と予算配分額

2. 1 研究組織

研究代表者：三澤尚明（宮崎大学・農学部・助教授）

研究分担者：天野憲一（秋田大学・バイオサイエンス教育・研究センター・助教授）

（海外研究協力者：Edward Taboada）

2. 2 交付決定額(配分額)

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	1,900,000	0	1,900,000
平成17年度	1,700,000	0	1,700,000
平成 年度			
平成 年度			
平成 年度			
総計	3,600,000	0	3,600,000

3. 研究発表

3. 1 学会誌等(発表者名、テーマ名、学会誌名、巻号、ページ、年)

- 1) 三澤尚明, カンピロバクター感染症(総説), モダンメディア, 51(3): 45-52, 2005.

3. 2 口頭発表(発表者名、演題名、学会等名、開催地、発表年月)

- 1) 榎本麻衣子、三澤尚明、塩化セチルピリジニウムの鶏肉汚染カンピロバクターに対する殺菌効果について、日本獣医学会、札幌、2004年、9月.
- 2) 三澤尚明、野本 竜平、伊丹 利明、吉田 照豊、ブリ属魚類において初めて確認された Lancefield C 群連鎖球菌感染症、日本獣医学会、札幌、2004年、9月.
- 3) 三澤尚明、矢野貴久、天野憲一、*Campylobacter jejuni* の酸抽出画分に認められる鶏血清および卵白成分への親和性、日本細菌学会、東京、2005年、4月
- 4) 天野憲一、斉藤志保子、八柳潤、三澤尚明、*Campylobacter jejuni* LPS に含まれるガングリオシド構造の検索、日本細菌学会、東京、2005年、4月.
- 5) Misawa, N. and Amano, T. Survival of *Campylobacter upsaliensis* strains from companion animals in different materials including feces and pet foods, 13th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms. Gold Coast, Australia, 2005. 9月.
- 6) Amano, K., Saito, S., Yatsuyanagi J., Misawa, N., Reactivity of anti-gangliosides to *Campylobacter jejuni* LPS, 13th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms. Gold Coast, Australia, 2005. 9月.
- 7) Datta, S., Jeon, B., Misawa, N., Itoh, K., Role of *pldA* gene in the invasion of *Campylobacter jejuni* into INT-407 cells, 13th International Workshop on *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Organisms. Gold Coast, Australia, 2005. 9月.
- 8) 三澤尚明、桐生直哉、竹内茜、近藤房生、動物介在活動に参加するイヌの糞便に検出された主要な腸管病原細菌の保菌調査、日本獣医公衆衛生学会、鹿児島、2005年、9月.
- 9) キョウキョウ・モー、三澤尚明、六車三治男、近藤房生、豚赤痢病変部からの *Brachyspira hyodysenteriae* の定量的検出と PCR による診断法

の検討、日本産業動物学会、鹿児島、2005年、9月。

- 1 0) 竹内茜、近藤房生、三澤尚明、犬より分離された *Helicobacter* 属菌の 16S rRNA 塩基配列に基づく系統分類学的解析、日本小動物学会、鹿児島、2005年、9月。
- 1 1) 山上良子、橋本喜泰、三角一浩、三澤尚明、乳牛の趾乳頭腫症の細菌学のおよび分子生物学的検査、日本産業動物学会、鹿児島、2005年、9月。
- 1 2) 三澤尚明、カンピロバクターの生存様式と病原性、北海道大学大学院 G P 講義、札幌、2006年、2月
- 1 3) 三澤尚明、H A C C P (ブロイラー編)、平成 17 年度 H A C C P 講習会、宮崎、2006年、3月。

3. 3 出版物

- 1) 食中毒検査・診療のコツと落とし穴(共著), 中山書店(東京), pp. 64-65, 2006
- 2) 共通感染症ハンドブック(共著), カンピロバクター症, (社) 日本獣医師会(東京), pp. 120-121, 2004.

4. 研究成果による工業所有権の出願・取得状況

工業所有権の名称、発明者名、権利者名、工業所有権の種類、番号、出願年月日、取得年月日等

該当なし

5. 英文要約

We observed that *Campylobacter jejuni* strain 81-176, a strong slime producer, showed spreading and highly mucoid colonies on blood agar plates, and formed biofilm on the bottom of a glass flask after stationary cultivation in Brucella broth. The present study was performed to determine the genes associated with biofilm formation, eight mutants were constructed from strain 81-176 by natural transformation-mediated allelic exchange. As aflagellate (*flaA⁻B⁻* and *flbA⁻*) and flagellate but nonmotile (*pflA⁻* and *motA⁻*) mutants did not form a biofilm exhibited by the wild type strain even though capsular-like polysaccharide was expressed on the cell surface. In contrast, *kpsM* and *peb1* mutants which lack capsular-like polysaccharide and an outer membrane protein, respectively, retained the ability of biofilm formation. Furthermore, *luxS* and *cheY* mutants which were associated with cell to cell signaling and chemotaxis, respectively,

did not affect the ability of biofilm formation. These findings suggest that flagella-mediated motility is required for biofilm formation *in vitro*.

Survival of *C. jejuni* in the environment under non-growth conditions was examined using a biofilm-forming strain and its lacked mutant (*motA*⁻) or planktonic cells. The organisms were spiked on pulp disks or treated with heat, sanitizers, or antibiotics. Survival was determined by the number of culturable cells on non-selective blood agar plates. In all the experiments, biofilm forming cells of *C. jejuni* can survive longer than biofilm non-forming mutant or planktonik cells, suggesting that biofilm formation is important to survive under environment conditions without hosts.

Keywords: *C. jejuni*, biofilm, Survival, Slime

第2章 本 論

第2章 本論

1. 各論

1. 1. 1 バイオフィルム形成能の定量的評価

(1) 目的

バイオフィルム形成能に関与する遺伝子を検索するには、バイオフィルム系性能を定量的に評価する必要がある。そのため、これまでに報告されている方法について検討した。

(2) 方法

バイオフィルム形成能を有する *C. jejuni* 81-176 株を使用し、比較対照として後述するバイオフィルム形成能を失った鞭毛欠損変異株 (Δ *flaAB*) 98-248 株を供試した。菌は Brucella Broth (Becton, Dickinson) に 1.5% の Bacto agar (Difco) を添加した平板 (ブルセラアーカー) に塗抹し、37°C 微好気条件下 (CO₂ 10%、O₂ 5%、H₂ 5%、N₂ 80%) で培養した。

1) クリスタルバイオレット染色による吸光度測定

菌株をブルセラアーカーにて 37°C、24 時間微好気培養後、ブルセラブロスにて 550nm の吸光度を 0.3 に調整した菌液を作製し、平底の滅菌した 96 well microplate (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD) に菌液を各ウェル当たり 150 μ l ずつ分注し、42°C で 24~72 時間微好気培養した。培養後、菌液をマイクロピペットで吸い取り、ウェルを滅菌蒸留水 200 μ l で洗浄し、その後 1% クリスタルバイオレット 200 μ l を分注して 30 分間染色した。染色後、滅菌蒸留水 200 μ l を加え、マイクロピペットで静かに 3 回洗浄した。次に、100% エタノール 200 μ l を各ウェルに加えて 30 分間脱色し、別の 96 well Microplate のウェルにそれぞれの色素抽出液 100 μ l を移した後、マイクロプレートリーダー (BioRad) で 550nm の吸光度を測定した。同一サンプルにつき 3 回試験を行った。

2) 24 well マイクロプレートを用いた方法

C. jejuni 菌液を上述したように調整し、24 well マイクロプレートに菌液 500 μ l を各ウェルに分注した。37°C で 24~72 時間微好気培養した後、プレート壁面に接着していない菌液をマイクロピペットで吸い取り、各ウェルに滅菌 PBS を 500 μ l 加え、ピペッティング操作によって接着した菌を遊離させた後、マイクロプレートリーダーで 550nm の

吸光度を測定した。

3) カバースリップを用いた方法

C. jejuni 菌液を上述したように調整し、24 well マイクロプレートに菌液各 800 μ l ずつ分注した。同時に、各 well にカバースリップ(Iwaki, 直径 12mm type) をウェルの底に設置し、37°C 微好気で 24~72 時間培養した。培養後、カバースリップをピンセットで取り出し、別の 24well マイクロプレートのウェルに移し、滅菌 PBS 1ml を加えてピペッティングし、カバースリップに接着している菌を物理的に剥がした後、カバースリップを取り除き、マイクロプレートリーダーで 550nm の吸光度を測定した。

4) ガラスコルベンを用いた方法

C. jejuni 菌液を上述したように調整し、50ml のガラス製コルベンに 10ml 分注して 37°C 微好気培養し、48 および 96 時間後に壁面に接着していない菌を培養液とともに除去し、コルベンの壁面に接着した菌を 1ml の滅菌 PBS にて物理的に剥がし、キュベットを用いて 50nm の吸光度を分光光度計 (Shimazu) にて測定した。

(結果)

96 ウェルマイクロプレートを用い、クリスタルバイオレットで染色する方法では、野生株のバイオフィームはウェルの底面と培養液の境界面に固着していた。一方、変異株ではウェルの底面にはバイオフィームは形成されず、培養液の境界面にのみ菌が付着していた。ウェルの底面に形成されたバイオフィームは洗浄の過程で除去され、培養液の境界面に固着した菌のみが残っていた。この方法では培養後 72 時間の野生株でのみ高い吸光度を示した。一方、変異株でも野生株と比較すると吸光度は低かったが、72 時間培養で最も高い値を示した (Fig. 1.1.1-1)。24 ウェルマイクロプレートを用いた方法では、96 ウェルマイクロプレート同様、野生株はウェルの底面と培養液の境界面にバイオフィームを形成し、変異株では培養液の境界面でのみフィルを形成した。カバースリップの設置いかんにかかわらず、72 時間の培養期間中、野生株は変異株よりも高い吸光度を示した (Fig. 1.1.1-2、Fig. 1.1.1-3)。一方、コルベンを用いた方法では、野生株のバイオフィームが 48 時間培養ではガラス底面から剥離しやすく、低い吸光度を示した (Fig. 1.1.1-4)。

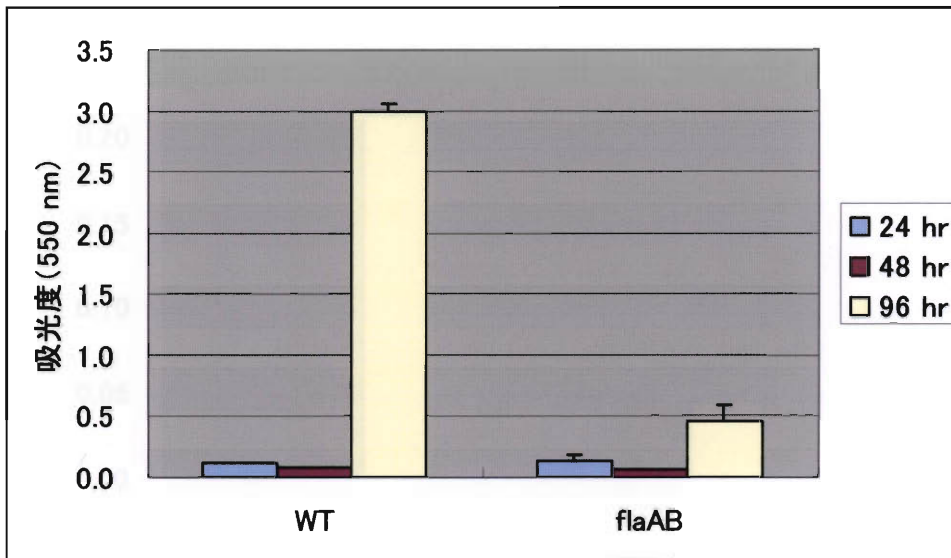


Fig. 1.1.1-1 96 ウェルマイクロプレートを用いたクリスタルバイオレット染色法

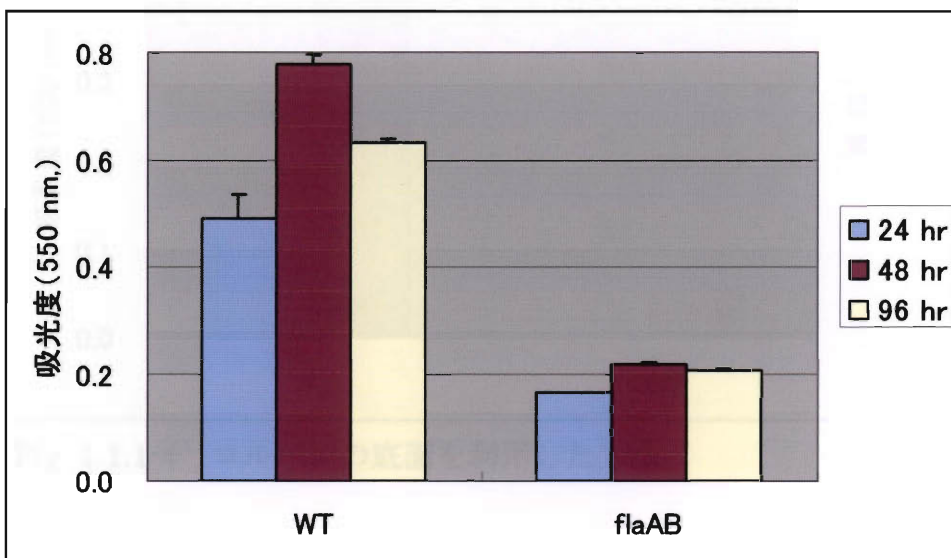


Fig. 1.1.1-2 24 ウェルマイクロプレートのウェルの底面を用いた方法

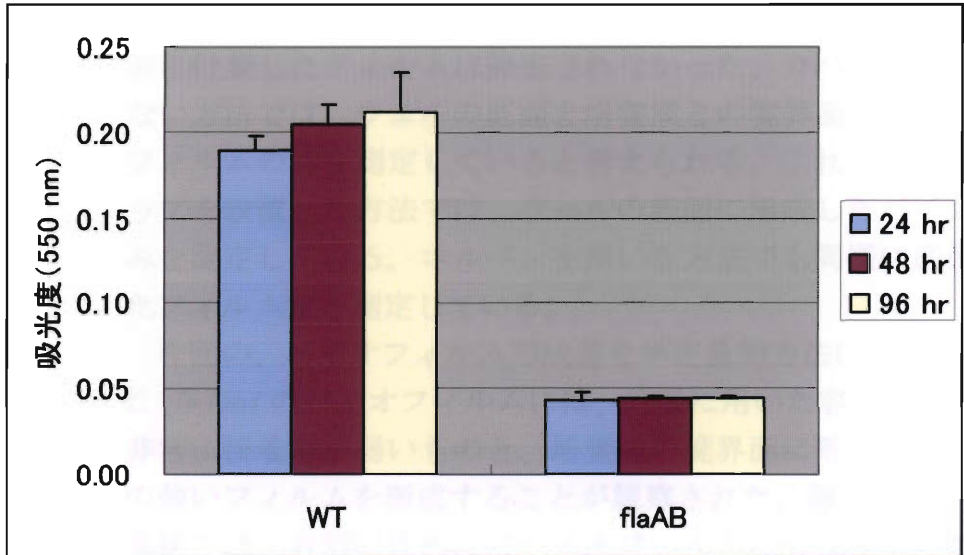


Fig. 1.1.1-3 24 ウェルマイクロプレートにカバースリップを設置した方法

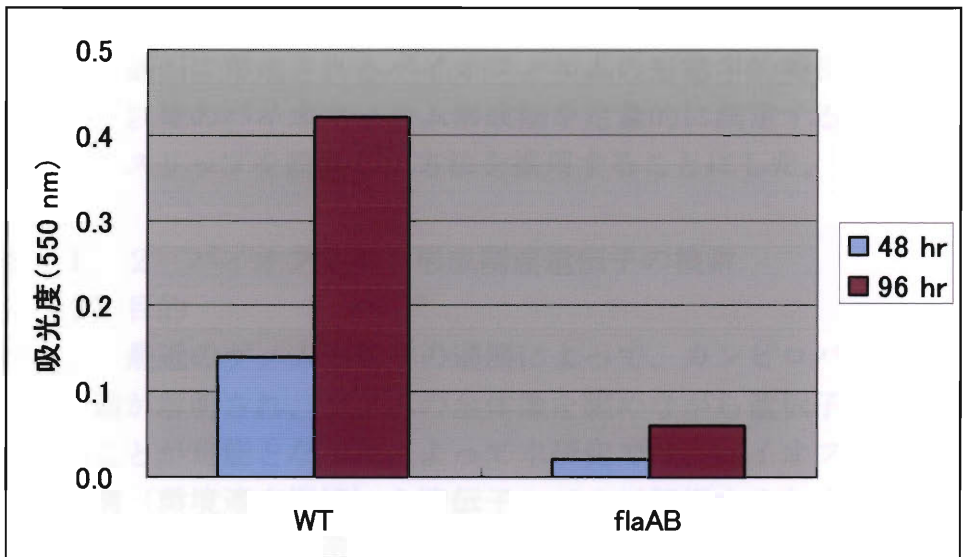


Fig. 1.1.1-4 コルベンの底面を利用した方法

(考察)

96 ウェルマイクロプレートを用いた方法では、培養後各ウェルの非接着細菌を除去するために洗浄操作を行っているため、ほとんどのバイオフィームはこの操作中にウェルの壁面から菌が剥離し、除去され

てしまった。したがって、この実験で検出されたものは、培養液の境界面に形成したフィルム形成量を見ていることになる。一方、24ウェルマイクロプレートを用いた方法では洗浄操作は行わず、ウェルに固着していない菌のみを培養液とともに静かに吸引しているため、底面に付着したフィルムは除去されなかった。カバースリップを設置しない方法では、ウェルの底面と培養液との境界面に形成されたバイオフィルムの量を測定していると考えられる。これに対してカバースリップを設置した方法では、ウェルの底面に形成したバイオフィルムのみを測定している。コルベンを用いた方法でも同様に底面に形成されたフィルム量を測定している。

今回の、バイオフィルム形成量を半定量的方法によって比較したが、*C. jejuni* のバイオフィルムには、培養に用いた容器の底面に形成する非常に接着力が弱いものと、培養液の境界面に形成する比較的接着力の強いフィルムを形成することが観察された。鞭毛を欠いた *flaAB* 変異株では、容器の底面にはバイオフィルムは形成せず、培養液の境界面にのみ形成した。境界面に形成されるフィルムは、菌の運動性は関与しないもので、スライムを介した親水性の結合というよりはむしろ疎水結合を主体とする物理的な接着であるのかもしれない。

これまでの *C. jejuni* のバイオフィルムに関する研究では、容器の底面に形成されるバイオフィルムの形態学的特長を観察してきており、以後のバイオフィルム形成能を定量的に測定する方法として、カバースリップを設置した方法を採用することにした。

1. 1. 2 バイオフィルム形成関連遺伝子の検索

(1) 目的

最近のゲノム生物学の進展によって、カンピロバクターの全ゲノム構造が解明され、ゲノムの全体像を眺めながら遺伝子のレベルで理解することが可能となった。よって本研究では、バイオフィルム形成の制御機構（環境適応機構）を遺伝子レベルで解析するため、得られた観察結果に基づいて関連遺伝子をゲノム情報から検索し、それらのノックアウトミュータントを作製して、バイオフィルム形成能を調べた。

(2) 方法

C. jejuni のバイオフィルムの形成過程の形態学的観察結果から、鞭毛形成と運動性が重要である事が分かったため、これらの関連遺伝子の塩基配列に関する情報をデータベースから入手した。これに加え、他の病原細菌におけるバイオフィルム形成に関与すると考えられる遺伝子群を

C. jejuni の全ゲノムのデータベースから検索した。候補として挙げられた遺伝子のリストは表 1.1.2-1 に示した。候補遺伝子がバイオフィルムの形成に関連しているかどうかを調べるため、各遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子を挿入したノックアウトミュータントを定法によって作製した。

図 1.1.2-1 には変異株の作製方法を示した。まず目的の遺伝子を PCR で増幅した後、pT7 Blue vector (TaKaRa, Tokyo, Japan) にクローニングした。次に、クローニングしたフラグメント内にカナマイシン耐性遺伝子を挿入し、これを野生株にトランスフォームして組み換え体をカナマイシン含有平板培地上で選択した。目的の遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されたことを、PCR ならびにサザンハイブリダイゼーションによって確認した。

得られた変異株の発現形質について、鞭毛の形状は透過型電顕で、運動性はソフトアージャー法で、莢膜多糖の有無はウエスタンブロットティング法で、コロニーの性状は血液寒天平板培養でそれぞれ調べた。

表 1.1.2-1

菌 株	遺 伝 子	遺 伝 子 機 能
98-248	<i>flaA, flaB</i>	Flagellin subunit
98-255	<i>flbA</i>	Export apparatus
03-368	<i>pflA</i>	Motor switch and energizing protein
03-369	<i>motA</i>	Motor rotation
01-948	<i>kpsM</i>	Putative capsule polysaccharide export system inner membrane protein
98-311	<i>peb1</i>	Outer membrane protein
03-370	<i>cheY</i>	Chemotaxis
03-371	<i>luxS</i>	Cell to cell signaling

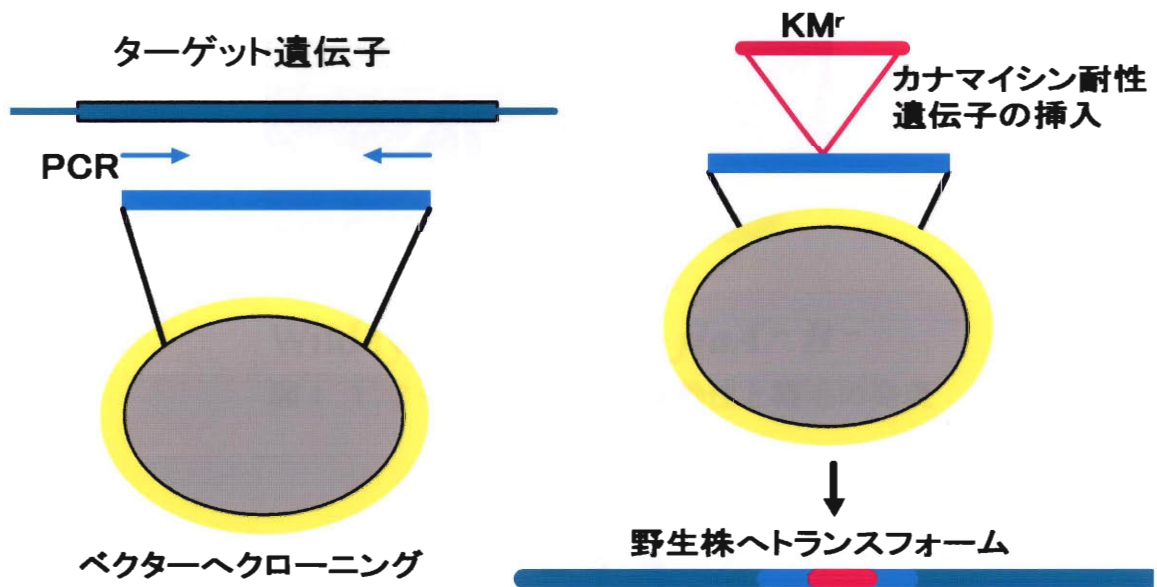
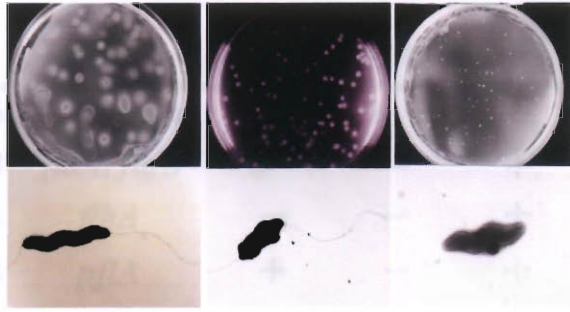


図 1.1.2-1 変異株の作製法

(3) 結果

変異株作製において、8種類の遺伝子をそれぞれ破壊した変異株を得ることができた。*flaA*、*flaB* 変異株は、*flaA* 遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子が挿入され、*flaB* が自発的に欠失した変異株だった。変異株の性状として、鞭毛の発現、運動性、莢膜多糖、コロニー性状について調べた。その結果、*flaA,B*と *flbA* ミュータントには鞭毛が認められなかった。一方、*pflA*と *motA* ミュータントには、鞭毛は野生株と同様に認められたが、運動性がなかった。*kpsM* ミュータントは、莢膜多糖が欠失し、野生株よりも弱い運動性を示した。さらに運動性を欠くか、弱い変異株は、ムコイド様のコロニー性状を示さなかった。その他の変異株は、それぞれの破壊した遺伝子の形質は失われていたが、鞭毛の形状、運動性は野生株と変わらなかった。変異株のバイオフィーム形成能を野生株と比較したところ、 $\Delta flaAflaB$ 、 $\Delta flbA$ 、 $\Delta pflA$ 及び $\Delta motA$ のバイオフィーム形成能は培養後72時間まで有意に低かった。一方、 $\Delta kpsM$ をはじめとするその他の変異株の形成能は72時間以上培養した場合、野生株と有意差は認められなかった。



Wild type *kpsM*⁻ *flaA*⁻ *B*⁻

図 1.1.2-2 変異株の運動性と鞭毛の発現

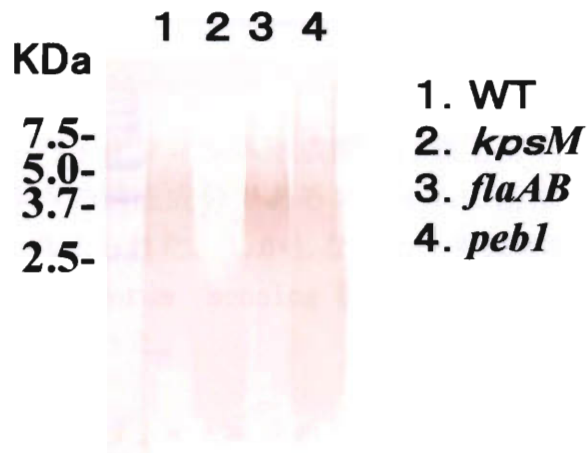


図 1.1.2-3 ウェスタンブロッティングによる莢膜多糖の検出

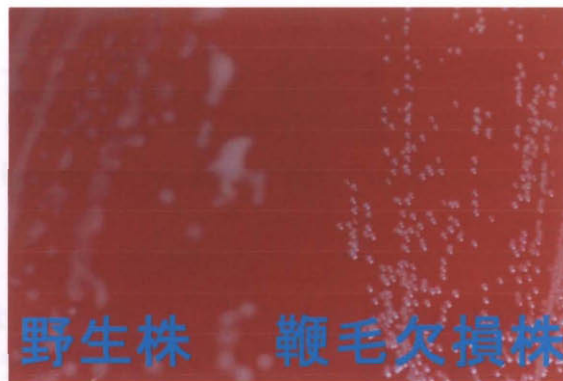


図 1.1.2-4 野生株と鞭毛欠損株のコロニー性状の比較
表 1.1.2-2 変異株の性状

菌株	遺伝子	鞭毛	運動性	莢膜多糖	ムコイドコロニー
81-176	Wild type	+	++	+	+
98-248	<i>flaA, flaB</i>	-	-	+	-
98-255	<i>flbA</i>	-	-	+	-
03-368	<i>pflA</i>	+	-	+	-
03-369	<i>motA</i>	+	-	+	-
01-948	<i>kpsM</i>	+	+	-	-
98-311	<i>peb1</i>	+	++	+	+
03-370	<i>cheY</i>	+	++	+	+
03-371	<i>luxS</i>	+	++	+	+

(4) 考察

以上の結果から、バイオフィルム形成能には鞭毛による運動性が必要条件であり、フィルムの構成成分であるスライムの菌体外への放出と密接に関連していると考えられた。しかしながら、莢膜多糖や PEB1 外膜蛋白、さらには走化性や quorum sensing 制御系はフィルム形成には関与していないことが示唆された。

1. 1. 3 変異株のバイオフィルム形成能

(1) 目的

バイオフィルム形成過程の観察結果に基づいた、フィルム形成に関連する遺伝子の変異株を作製した。これらのバイオフィルム形成能を野生株と比較するため、定量的検査法を検討し野生株と比較した。

(2) 方法

24穴マイクロプレートの各ウェル内にカバースリップを置き、これに一定濃度に調整した菌液をウェル内に接種して一定時間培養後、カバースリップに付着した菌を一定量の PBS ではがして、その菌液の吸光度を測定した。

(3) 結果

図 1.1.3-1 には、培養後 24、48 及び 72 時間後のカバースリップに付着した菌量を棒グラフで示している。その結果、鞭毛欠損株の *flaAflaB* と *flbA* ミュータント、鞭毛は発現しているが運動性を欠いた *pflA* と *motA* ミュータントのバイオフィルム形成能は、培養 72 時間後においても野生株と比較し、有意に低い値を示した。一方、莢膜多糖を欠き、運

動性の弱い *kpsM* をはじめとするその他のミュータントでは、培養時間とともに付着細菌量が増加し、72 時間後では野生株と有意差は認められなかった。*flaAflaB* ミュータントと野生株の三角フラスコ内でのバイオフィーム形成能を図 1.1.3-2 に示した。

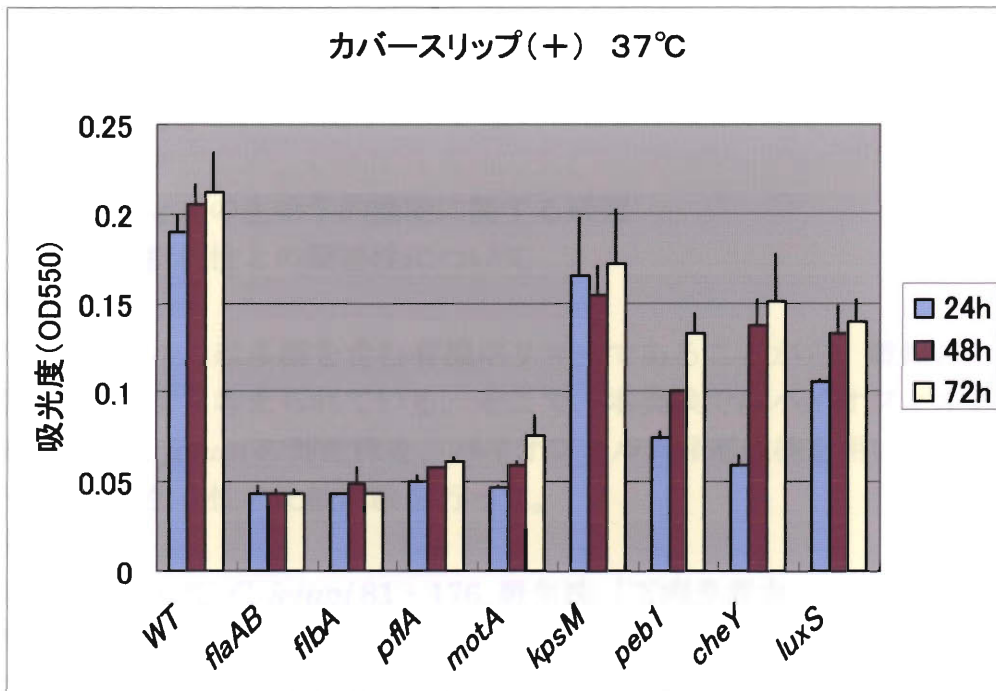


図 1.1.3-1 野生株と変異株のバイオフィーム形成能の比較

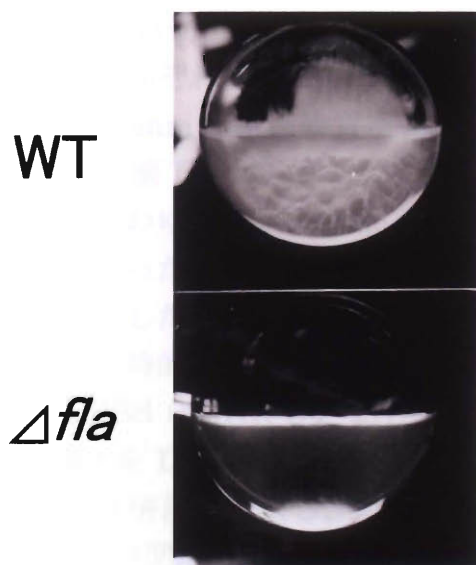


図 1.1.3-2 三角コルベン内における野生株と鞭毛欠損株 (Δ *fla*) のバイオフィーム形成能の比較

(4) 考察

以上の結果から、バイオフィーム形成には鞭毛自身ではなく、鞭毛による運動性が必要であることが明らかにされた。また、菌体表層の PEB1 蛋白、莢膜多糖はバイオフィーム形成には関与していないことが示唆された。さらに、緑膿菌や大腸菌などでバイオフィーム形成には重要とされる、走化性や細菌の密度調節に関与する Cell to cell signaling system の機構は *C. jejuni* には関与していないことが示唆された。

1. 2 バイオフィームの生物学的機能に関する研究

1. 2. 1 乾燥抵抗性との関連性について

(1) 目的

バイオフィームは多糖を含む有機ポリマーであることから、乾燥に対して抵抗性を示すと考えられている。そこで、本実験ではバイオフィーム形成株として *C. jejuni* の野生株を、バイオフィーム非形成株を用いて乾燥条件下における生存性の比較試験を行った。

(2) 方法

供試菌株として *C. jejuni* 81 - 176 野生株（下痢患者由来）と鞭毛のモーターに関する遺伝子をノックアウトした変異株 ($\Delta motA$) を用いた。野生株及び変異株を血液寒天培地で、37°C・24 時間微好気培養した後、Brucella Broth に浮遊させ、吸光度計で OD₅₅₀=0.5 に調整した。調整した菌液をそれぞれ 50ml の小コルベンに 10ml ずつ分注し、37°C で 72 時間、微好気培養を行った。72 時間後、変異株は菌液を、野生株は、底面に付着したバイオフィームをそれぞれ 50 μ l ずつマイクロピペットで採取し、シャーレ内に並べた直径 10mm の抗菌物質検査用ペーパーディスク (Tokyo Roshi Co. Ltd, Tokyo) に滴下した。さらに、野生株のバイオフィームをピペッティングにより、いわゆる planktonic cell として、パルプディスクに滴下し、同様の実験を行った。それらをシャーレごと好気条件下で 4°C のインキュベーターで保存した。1,3,5,7,9 日後にディスクを取り出し、重量を計測し、乾燥による経時的な重量変化を観察した。その後、パルプディスクを滅菌した 1mM PBS (NaH₂PO₄・2H₂O : 0.436g、NaH₂PO₄(無水) : 1.022g、NaCl : 8.766g を DW1 に溶解) 450 μ l でボルテックス処理を行い、さらに PBS で 10 倍段階希釈し、血液寒天培地に接種した。37°C のインキュベーターで 48 時間培養後、菌数を測定し、パルプディスクあたりの生残菌数を算出した。実験はいずれも 3 回行った。

(3) 結果

菌液を滴下したパルプディスクを 4°C のインキュベーターで保存した結

果、変異株は 7 日後に、野生株 (biofilm) は 9 日後に回収不能となった (Fig1.2.1-1)。パルプディスクの重量は、変異株で平均 5.1mg/day、野生株 (planktonic) で 5.2mg/day、野生株 (biofilm) で 4.5mg/day 減少した。パルプディスクのみの重量は 34~38mg であり、いずれも培養 9 日目には、ほぼ全ての水分が乾燥した (Fig1.2.1-2)。5 日後には変異株で 6.3×10^2 、野生株 (planktonic) では回収不能となったが、野生株 (biofilm) では、 3.6×10^5 の菌数を維持していた。また、biofilm では、変異株および planktonic が回収不能となった 7 日後でも、 5.0×10^2 の菌数が確認された。

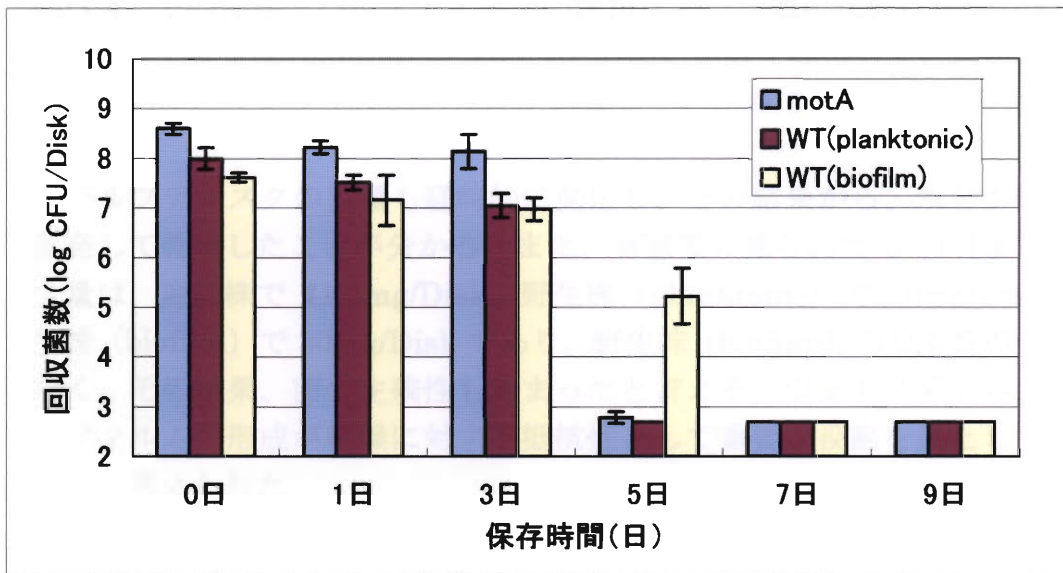


Fig. 1.2.1-1 パルプディスクでの乾燥抵抗性試験

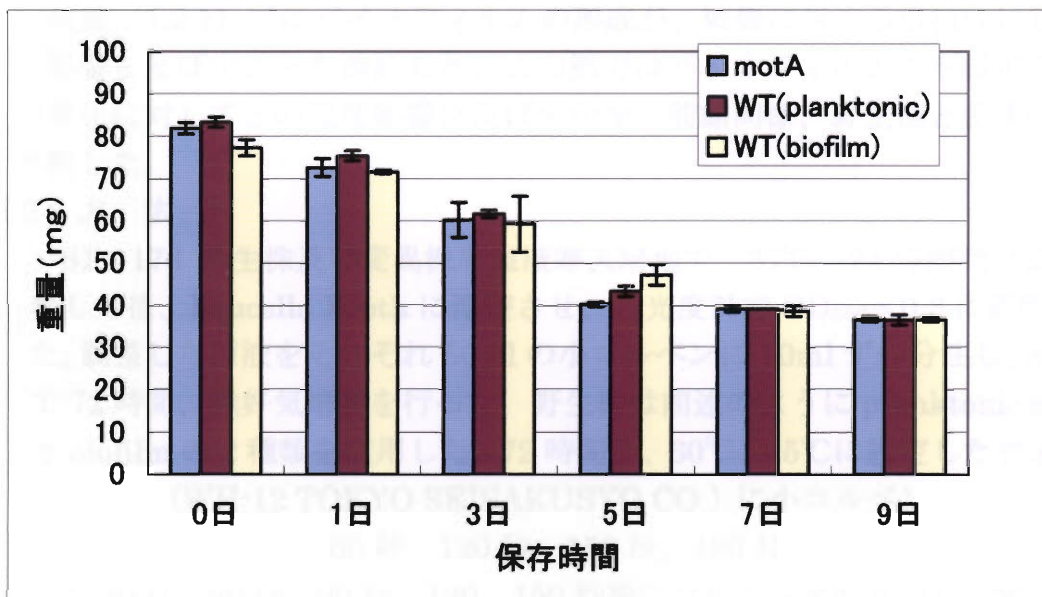


Fig. 1.2.1-2 パルプディスクの重量変化

(4) 考 察

本実験の結果、バイオフィルムを形成した野生株の方が変異株よりも乾燥抵抗性が強いことが示された。また、野生株の planktonic cell と比較しても同様の結果となった。この結果を考慮すると、バイオフィルムの形成が乾燥に対して抵抗性を示し、ひいては菌の生存性をも高めた、ということが推察される。

過去に、ステンレスの表面に付着させた *C.jejuni* の乾燥に対する生残性についての報告があり、室温では約 4 時間後に検出限界値を下回った。今回は 4°C での保存、パルプディスクの使用など、一概に比較は出来ないが、5 日目まで野生株 (biofilm) が 3.6×10^5 の高い菌数を維持していたことは、少なからずバイオフィルムの存在が影響していたのではないかと考えられた。

パルプディスクの重量も経時的に測定し、その結果から、水分が徐々に蒸発して乾燥したことが分かる。また、有意差の見られた 5 日目までの減少量は、変異株で 41.7mg/Disk、野生株 (planktonic) で 40mg/Disk、野生株 (biofilm) で 30mg/Disk であり、野生株 (biofilm) の減少量が一番少なく、その結果、菌の生残性も高まったと言える。以上の結果から、バイオフィルムの形成が乾燥に対する抵抗性として重要な役割を果たしていることが考えられた。

1. 2. 2 加熱抵抗性との関連性について

(1) 目 的

前節 (1.2.1) ではバイオフィルムの形成が、乾燥に対する抵抗性に重要な影響を及ぼすことを確認した。この節ではバイオフィルムの形成が温度の変化に対してどの程度影響を及ぼすかを、前節同様、野生株と変異株で比較した。

(2) 方 法

81 - 176 野生株及び変異株を血液寒天培地で、37°C・24 時間微好気培養した後、Brucella Broth に浮遊させ、吸光度計で OD₅₅₀=0.3 に調整した。調整した菌液をそれぞれ 50ml の小コルベンに 10ml ずつ分注し、37°C で 72 時間、微好気培養を行った。野生株は前述のように planktonic cell と biofilm の 2 種類を使用した。72 時間後、60°C、65°C に設定したウォーターバス (WH-12 TOKYO SEISAKUSYO CO.) に小コルベングと入れて加熱した。60°C では 60 秒、120 秒、150 秒、180 秒、240 秒後に、65°C では 30 秒、60 秒、90 秒、120、150 秒後にコルベンを取り出し、すぐに水中に移し、5 分以上静置した。その後、コルベンをボルテックスにかけ、

コルベン中の菌液を滅菌 PBS で 10 倍段階希釈し、血液寒天培地に接種した。37℃のインキュベーターで 48 時間培養後、培養可能な菌数を測定した。実験はいずれも 3 回行った。

(3) 結果

60℃における加熱抵抗性試験の結果を Fig.1.2.2-1 に、65℃における結果を Fig.1.2.2-1 に示す。バイオフィルムを形成させた菌において、長時間、高温の感作に抵抗性を示し、60℃では、150 秒、180 秒で、65℃では、90 秒、120 秒でバイオフィルムを形成させた菌の生残数が最も多かった。

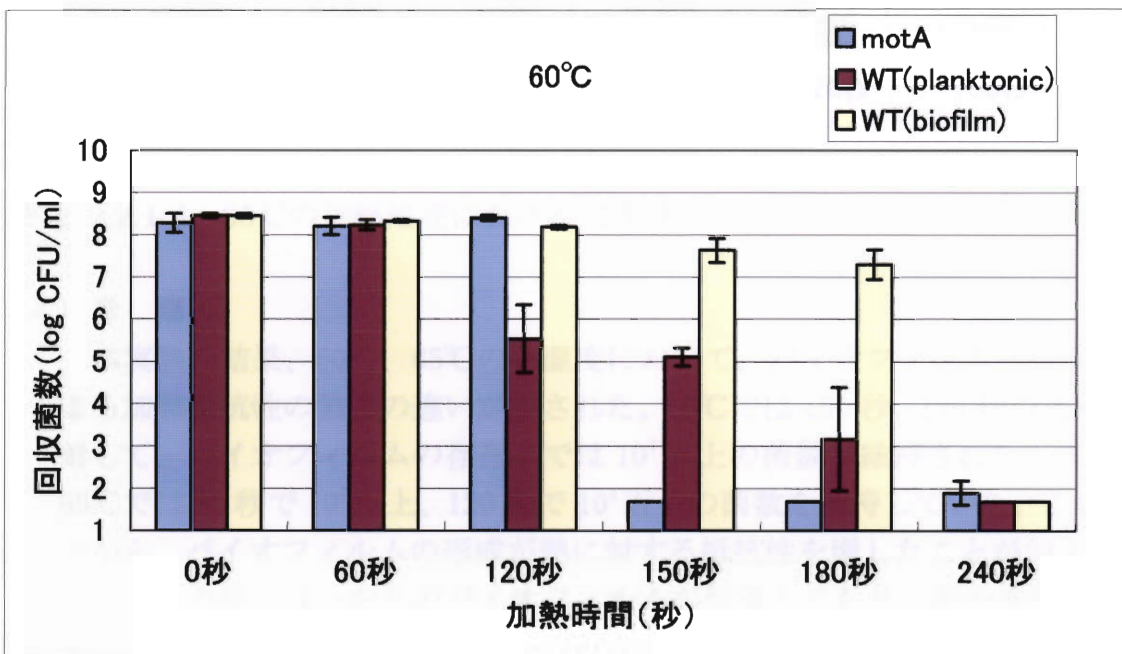


Fig. 2.2.1-3 60℃の加熱処理における生残性

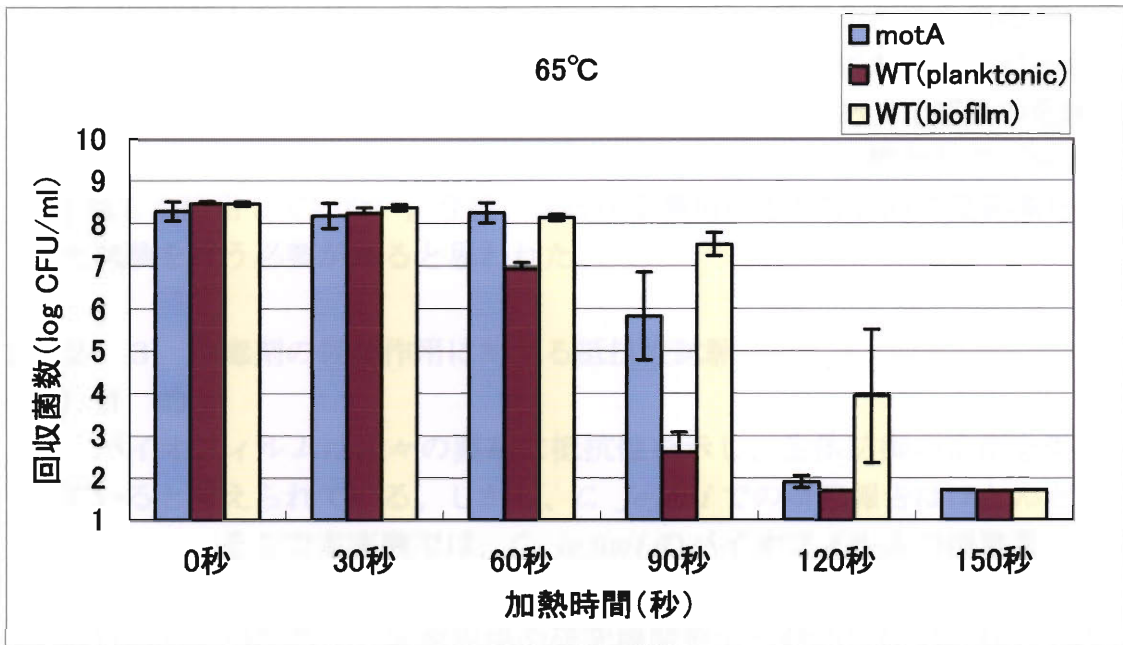


Fig. 2.2.1-4 65°Cの加熱処理における生残性

(4) 考 察

本実験の結果、60°C、65°Cの各温度において、バイオフィルムの有無による加熱抵抗性の強さの違いが示された。60°Cでは150秒、180秒の加熱に対して、バイオフィルムの存在下では 10^7 以上の菌数が維持された。また、65°Cでは90秒で 10^7 以上、120秒で 10^4 近くの菌数を維持していた。このことから、バイオフィルムの形成が熱に対する抵抗性を増したことが伺える。コルベンの底にはかなりのバイオフィルムが付着しており、菌の生存性を高めたと思われる。*Salmonella enterica*によるバイオフィルムは70°C・5分の感作においても 10^4 以上の菌が生残したとの報告もあるが、実験方法などの違いから、一概に比較は出来ないように思われる。微生物の耐熱性を表す方法としてD値があり、これは「一定温度で微生物を加熱した時にその生残数を10分の1に減少させるために必要な時間(分)」と定義されている。D値は高温で小さく、低温で大きくなる。*C. jejuni*のD値の報告はいくつかあり、ペプトン水に浮遊させた*C. jejuni*のD値は51°Cで4.9分、57°Cで0.25分、牛乳中に浮遊させた*C. jejuni*のD値は56°Cで0.3~0.9分という報告がある。今回の実験では、60°Cの*motA*で0.45分、planktonic cellで0.53分、biofilmで0.73分、65°Cの*motA*で0.33分、planktonic cellで0.30分、biofilmで0.37分であり、biofilmを形成させた菌でその値が大きかった。過去の報告とは、実験時の条件が異なるため、一概に比較はできないが、やはりD値は大きい値を示した。1. 2. 1節で行った乾燥

抵抗性試験と合わせ、バイオフィルムの形成が、菌の生存性を高めているということが示唆された。このことから、自然環境中においてもバイオフィルム存在下では、より長時間生存している可能性があり、感染の危険性が増すと考えられる。本実験ではバイオフィルム非形成株として $\Delta motA$ の1種しか使用していない。今後、さらなる裏付けとして、他の変異株を用いた試験を行う必要があると思われた。

1. 2. 3 消毒剤の殺菌作用に対する抵抗性試験

(1) 目的

バイオフィルムは種々の薬剤に抵抗性を示し、生体防御の役割を果たしていると考えられている。しかし、*C. jejuni*での研究報告はほとんど見当たらない。そこで本実験では、*C. jejuni*のバイオフィルムの消毒薬に対する抵抗性について検討を行った。また、同時に変異株 ($\Delta motA$) との比較も行った。消毒薬は、医療現場や研究機関等で一般的に使用されているアルコールと、口腔内の消毒に使用されている塩化セチルピリジニウムの2種を用いた。

(2) 方法

$OD_{550}=0.1$ に調整した菌液を 96well のマイクロプレート (TISSUE CULTURE TEST PLATES 96F) に $100\mu l$ ずつ分注し、 $37^{\circ}C$ で 48 時間好気培養を行った。48 時間後、菌液を入れた well に、滅菌 DW で濃度を調整した各消毒薬 (アルコール・塩化セチルピリジニウム) を接種した。それぞれ、10分・20分・30分間作用させた。作用後、残留消毒薬の影響を排除するため、滅菌 PBS で希釈した後、血液寒天培地に接種した。その後、 $37^{\circ}C$ のインキュベーターで 48 時間好気培養し、培養可能菌数をカウントした。また、各実験において、ネガティブコントロールとして消毒薬の代わりに滅菌 PBS を用いて同様の実験を行った。

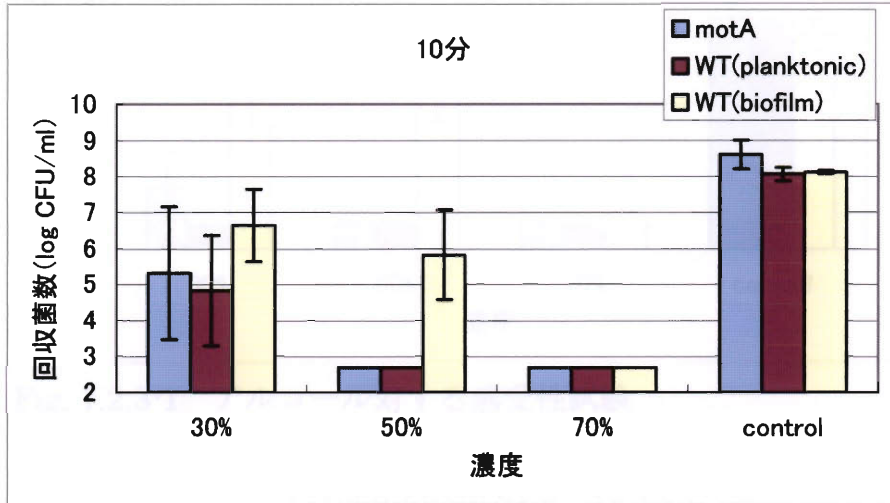
(3) 結果

各濃度のエタノール及び塩化セチルピリジニウムを一定時間作用させた時の各菌株の生残菌数をそれぞれ Fig. 1. 2. 3-1, Fig. 1. 2. 3-2 に示した。

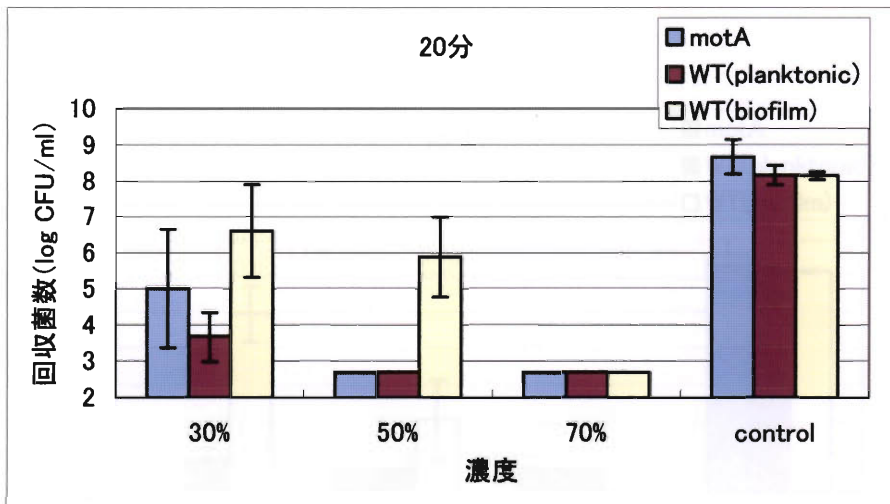
エタノールでは 30%、50%濃度の 10分、20分、30分の作用において、バイオフィルムを形成した菌の生残数が最も多く認められた。また、*motA*、WT (planktonic) では 50%・10分の作用で検出限界値を下回ったが、バイオフィルム形成菌では 3.9×10^6 CFU/ml の菌が検出された。また、塩化セチルピリジニウムでは、0.1mg/ml の 10分、20分、30分、0.3mg/ml の 10分の作用において、バイオフィルムを形成した菌の生残数が最も多く、*motA*、WT (planktonic) では、0.3mg/ml の 10分の作用で検出限界値を下回ったが

バイオフィーム形成菌では 8.7×10^4 CFU/ml の菌が検出された。

A. 10分後



B. 20分後



C. 30分後

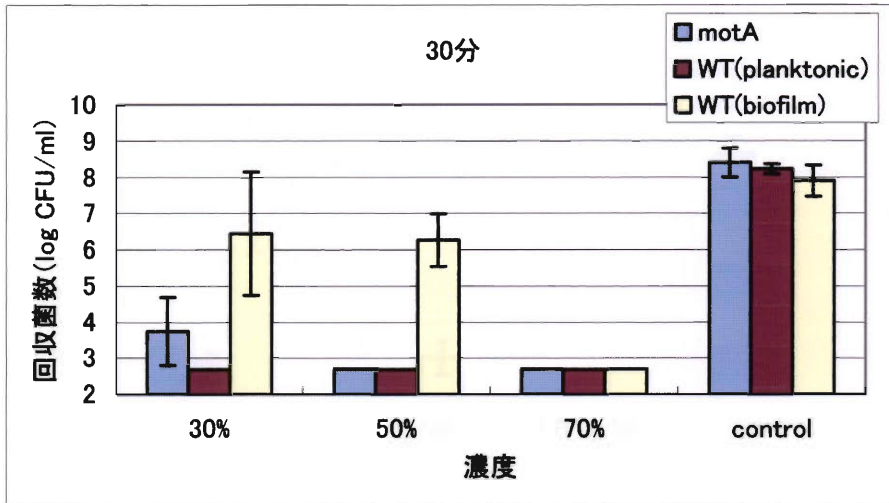
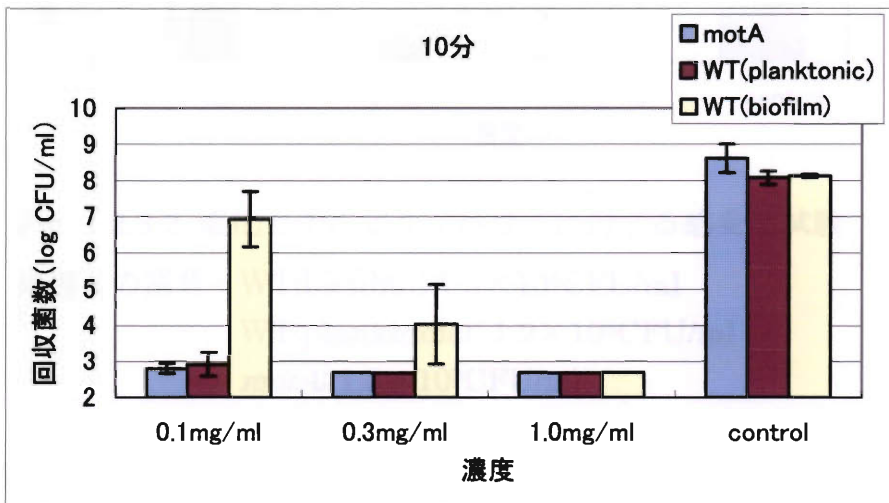


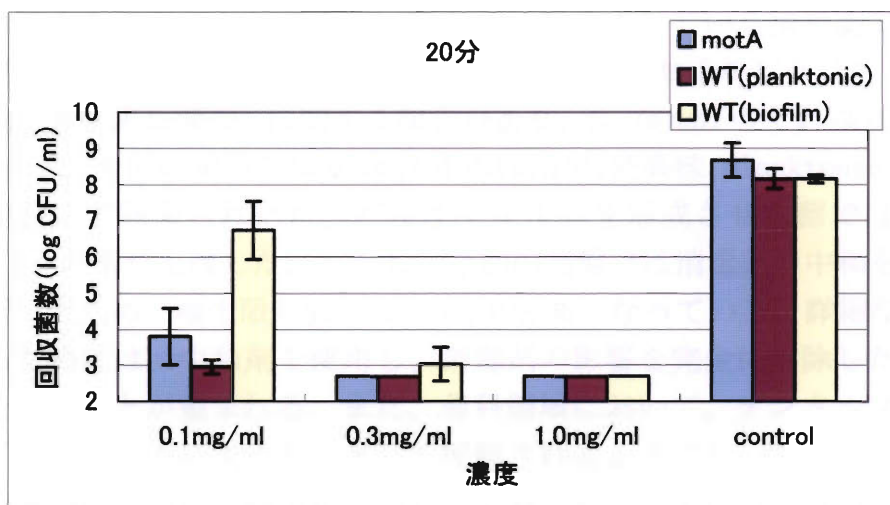
Fig. 1.2.3-1 アルコールに対する感受性試験

処理前の菌数 : WT(biofilm); 1.9×10^8 CFU/ml、
 WT(planktonic); 1.9×10^8 CFU/ml、
motA; 1.8×10^9 CFU/ml

A. 10分後



B. 20分後



C. 30分後

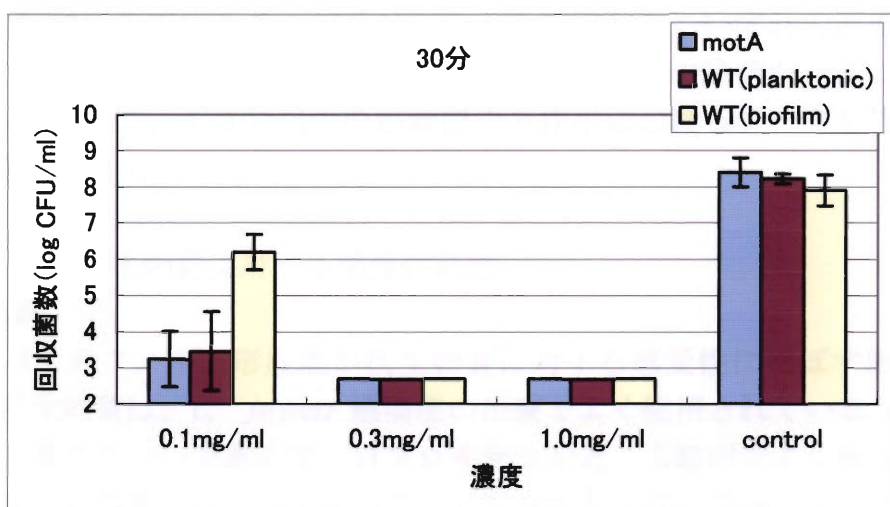


Fig. 1.2.3-2 塩化セチルピリジニウムに対する感受性試験

処理前の菌数 : WT(biofilm); 1.9×10^8 CFU/ml

WT(planktonic); 1.9×10^8 CFU/ml

motA; 1.8×10^9 CFU/ml

(4) 考 察

いずれの消毒薬に対しても、バイオフィームはその殺菌作用に対して抵抗性を示したことから、バイオフィームの存在が消毒剤に対して抵抗性を示すことが示唆された。本実験で使用したアルコールは実験室内や病院等でよく使用される消毒薬である。通常使用される濃度は70%である。過去に、*C. jejuni* を70%アルコールの1分間の作用で死滅したという報告がある。今回は10分以上の作用で行ったため、バイオフィームを形成させた菌を

70%・1分で作用させての検討が望まれる。また、塩化セチルピリジニウムは口腔内の殺菌剤としてうがい薬などに配合されている消毒薬である。通常使用される濃度は2.5mg/mlである。過去に塩化セチルピリジニウムのMIC（最小発育阻止濃度）に関する報告があり、*C. jejuni*のそれは0.136mg/mlであった。今回の実験では0.1mg/mlの作用で、変異株、planktonicは $10^2 \sim 10^4$ の範囲まで除菌されたが、バイオフィルムを形成させた菌では同濃度で $10^6 \sim 10^7$ の菌が生残した。しかし、今回の実験では消毒薬の中和を希釈により行ったため、検出限界値が 5.5×10^2 と高くなっている。詳細なデータを得るためには、中和剤を使用し、消毒剤の影響を完全に排除した後、本実験を行うことが望まれる。また、歯科領域において、デンタルプラークがバイオフィルムによるものとして理解されるようになってきた。重度歯周炎や慢性根尖病巣の難治化要因としてもバイオフィルム形成の関与が報告されている。これらのことから、今回の実験では口腔内の殺菌剤として使用されている塩化セチルピリジニウムを選択した。いずれの消毒剤とも、バイオフィルム形成菌に対しても通常使用濃度での除菌が可能であると言える。さらに、10分以内の短時間での作用におけるデータを得ることも必要であろう。

1. 2. 4 抗生物質に対する感受性試験

(1) 目的

バイオフィルム形成能が抗生物質に対する感受性に及ぼす影響を調べた。抗生物質は、*C. jejuni*感染症の治療でよく使用されているニューキノロン系薬剤の一つであるエンロフロキサシンと、広範囲でよく使われているペニシリン系薬剤の一つであるアンピシリンを今回の実験で使用した。

(2) 方法

$OD_{550} = 0.1$ に調整した菌液を96wellのマイクロプレート（TISSUE CULTURE TEST PLATES 96F）に100 μ lずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで48時間微好気培養を行った。48時間後、菌液を入れたwellに、濃度を調整した各抗生剤（1、4、16、64 μ g/ml）を接種した。接種後、24時間微好気培養を行った。作用後、残留抗生物質の影響を排除するため、滅菌PBSで希釈した後、血液寒天培地に接種した。その後、37 $^{\circ}$ Cのインキュベーターで48時間微好気培養し、培養可能菌数をカウントした。また、各実験において、陰性対照として抗生物質の代わりに滅菌PBSを用いて同様の実験を行った。抗生物質を接種する時の各菌株のwell内の状態は前節と同様である。

(3) 結果

各濃度の各種抗生物質を作用させた時の各菌株の培養可能菌数を抗生物

質の種類別にそれぞれ Fig. 1.2.4-1 および Fig. 1.2.4-2 に示す。
 エンロフロキサシンの $1\mu\text{g/ml}$ の濃度を除いた全ての濃度でバイオフィーム形成菌の生残数が最も多く認められた。

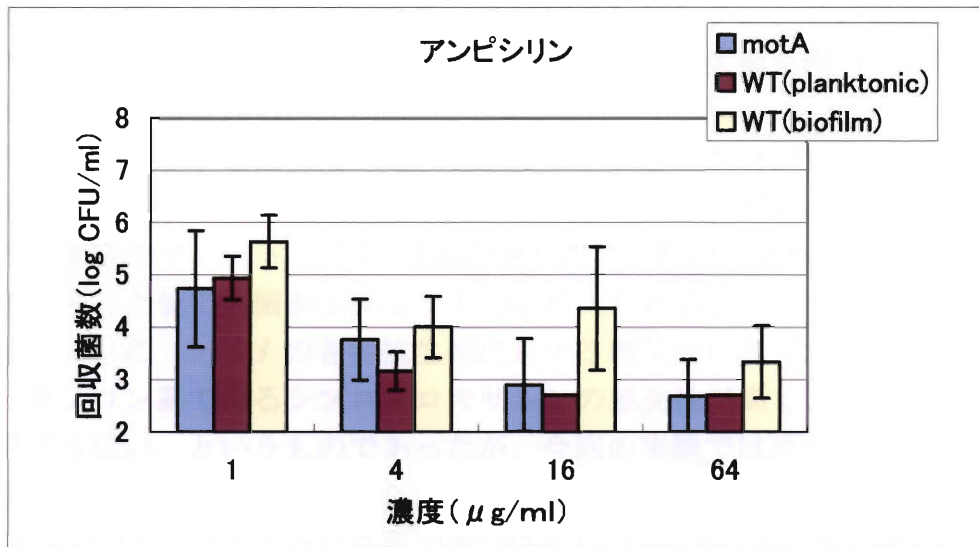


Fig.1.2.4-1 アンピシリンに対する感受性試験

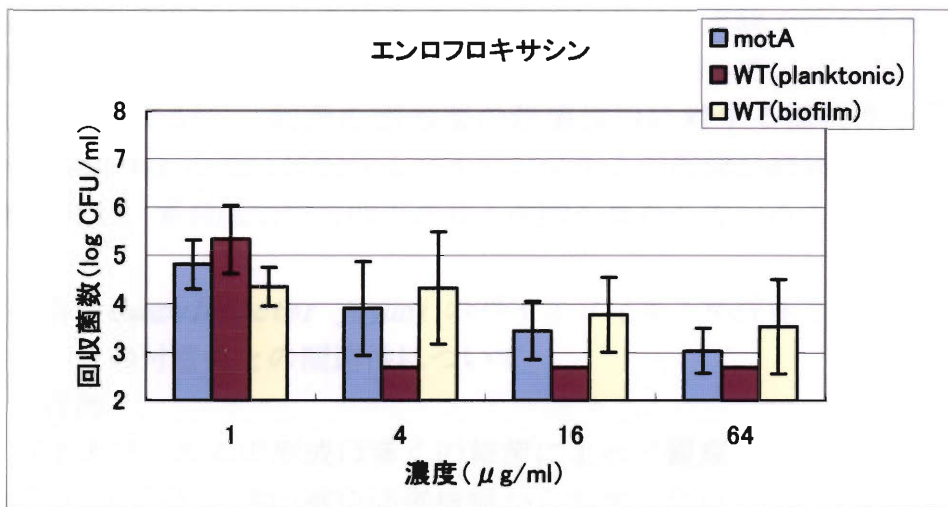


Fig.1.2.4-2 エンロフロキサシンに対する感受性試験

(4) 考察

本実験の結果、いずれの抗生物質に対してもバイオフィーム形成菌ではそ

の感受性が低下した。アンピシリンでは全ての濃度においてバイオフィーム形成菌の生存数が非形成菌のそれを上回った。特に $16\mu\text{g/ml}$ の濃度において顕著な差が認められた。また、エンロフロキサシンでは 1mg/ml の濃度ではバイオフィームの影響は見られなかったが、その他の濃度ではバイオフィームによる感受性の低下が伺えた。今回はアンピシリンとエンロフロキサシンの2種類の抗生剤で検討したが、もっと多種の抗生剤を使って、同様に検討することが望まれる。

今回の実験をするにあたって、アンピシリンとエンロフロキサシンの MIC を計測した（それぞれ $0.5\mu\text{g/ml}$ 、 $0.125\mu\text{g/ml}$ ）が、バイオフィームの形成のため菌液をプレート上で 48 時間培養した後、薬剤を投与したため、MIC の値を上回った値でも菌が生存したものと考えられる。

過去に、*C. jejuni* の各種抗生剤に対する感受性を調べた報告があり、ニューキノロン系であるシプロフロキサシンの感受性が高く、アンピシリンの感受性は低い、というものであったが、今回の実験では両者の感受性に対する顕著な差は認められなかった。また、主なグラム陰性菌の planktonic および biofilm に対する抗生物質の感受性に関する報告³²⁾では、*Pasteurella multocida*、*Haemophilus somnus* などでは、エンロフロキサシン、アンピシリンともに $2\sim 8\mu\text{g/ml}$ の低濃度でバイオフィームの形成が阻害されたという報告がある。また、*Aeromonas hydrophila* における同様の実験報告ではエンロフロキサシンの MIC が $0.03\mu\text{g/ml}$ であり、バイオフィーム形成後ではその4倍濃度で根絶した。今回の *C. jejuni* における実験ではバイオフィームを形成させた菌に関して、いずれの値も大きく上回っていた。

以上の結果から、前節の消毒薬の殺菌作用に対する抵抗性と併せて、*Campylobacter jejuni* におけるバイオフィームの形成が細菌への薬剤透過性を減少させ、薬剤感受性を低下させる役割を果たしていることが示唆された。

1. 2. 5 *Campylobacter jejuni* のバイオフィーム形成能と市販鶏肉皮膚への付着性との関連性について

(1) 目的

バイオフィームの形成は多くの細菌によって観察されており、環境中における生存性や宿主の感染防御機構からのエスケープ、さらには抗生物質や消毒剤に対する抵抗性等に重要な役割を演じていると考えられているが、*C. jejuni* のバイオフィームの機能については明らかにされていない。本研究では、*C. jejuni* のバイオフィーム形成能と市販鶏肉の皮膚への付着性との関連性を調べるため、バイオフィーム形成能を欠いた変異株を作製し、野生株と変異株の付着性を比較した。

(2) 方法

1) 変異株の作製

C. jejuni 81-176 株から変異株を作製するに当たり、鞭毛関連遺伝子として *flaA* (鞭毛蛋白) と *pflA* (鞭毛の運動性) を、多糖合成遺伝子として *kpsM* をそれぞれ選択した (Table 1.2.5-1)。PCR で増幅した当該遺伝子をベクターにクローニングし、カナマイシン耐性遺伝子を挿入した後、野生株に形質転換して相同組み換えによる変異株を作製した。目的の遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子が挿入されていることを、PCR とサザンハイブリダイゼーション法により確認した。得られた変異株の形質発現について、透過型電子顕微鏡による鞭毛の形態学的観察、ソフトアーガー法による運動性、ウェスタンブロッティング法による莢膜多糖体の確認をそれぞれ実施した。

Table 1.2.5-1 変異株作製リスト

遺伝子	遺伝子機能
<i>flaA</i>	鞭毛蛋白
<i>pflA</i>	鞭毛の運動
<i>kpsM</i>	多糖の輸送系

2) バイオフィーム形成能の定量的測定

バイオフィーム形成能を定量的に測定するため、24 ウェルマイクロプレート内の各ウェル内にカバースリップを置き、これにブルセラブロスで一定の濁度 ($OD_{550}=0.1$) に調整した菌液 1ml をウェル内に接種して 37°C で一定時間培養後、カバースリップを新しいウェル内に移し、付着した菌を 1ml の PBS ではがして菌液の吸光度 (OD_{550}) を測定した。

3) 市販鶏肉の皮膚に対する付着性試験

i) 鶏もも肉

皮・骨付きももフレッシュ肉を食肉販売店より購入し、実験に供試した。

ii) 供試菌株

C. jejuni 81-176 株 (食中毒患者由来) とこれから作製した変異株を 3 株用いた (98-255 株; \triangle *flaA*, 03-368 株; \triangle *pflA*, 01-948 株; \triangle *kpsM*)。供試菌株は使用するまで -80°C で保存した。

iii) 付着試験

-80°C で保存していた菌をプレストン寒天平板培地上に塗抹して

37°C24 時間微好氣的に培養した菌を平板上からかきとり、ブルセラブロス中に浮遊させ 550nm の吸光度を 0.1 に調整し、1 菌株につき 2 枚の直径 35mm のプラスチックシャーレに各 2ml 入れ、37°C、48 時間微好気培養した。バイオフィルムの形成を肉眼で観察した後、培養菌液を均一にしてからブルセラブロスで希釈し、再度 550nm の吸光度を 0.1 に調整したものを 2ml を 198ml の PBS へ添加して総量 200ml の供試菌液を作製した。これを鶏もも肉 2 本とともにストマッカー袋へ入れてシーラーで密閉し、皮膚表面に菌液が馴染むように 30 秒間手でマッサージした。次にもも肉をストマッカー袋から取り出し、ペーパータオル上に置いて余分な液を拭き取った。もも肉 2 本中 1 本について、はさみを用いて剥皮し、100 cm² の大きさの皮を 2 枚採取した。残りのもも肉 1 本については、新しいストマッカー袋内で氷上で低温に保った 200ml の滅菌蒸留水中に 30 分間浸漬洗浄してからペーパータオルで余分な水分をふき取った後、上記と同様に皮を 2 枚採取した。皮 1 枚につき 100ml のプレストン液体培地を用意し、皮とともにストマッカー袋へ入れて 30 秒間ストマッキング処理を行い、細菌検査試料を作製した。試料乳剤の 10 倍段階希釈液列を作製し、各希釈液から 100 μ l ずつプレストン平板培地に塗抹して 37°C48 時間微好気培養後、発育集落数を計測し、皮 100 cm² 当たりの付着菌数を算出した。

分離回収された菌が接種菌であるか確認するため、野生株については RAPD-PCR を、変異株では PCR を実施した。平板培地から回収された菌のうち、希釈倍数の最も高い区画から 3 つのコロニーを分離し、DNA を抽出した。野生株を用いた試験では、ランダムプライマーを用いた RAPD-PCR のバンドパターンを接種菌と回収された菌とで比較した。変異株を用いた試験では、回収された菌から DNA を抽出し、カナマイシン耐性遺伝子の挿入された遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を認識するプライマーを用いた PCR を実施した。

(3) 結果

1) 変異株の性状

変異株作製において 3 種類の遺伝子をそれぞれ破壊した変異株を得ることができた。98-255 株 (Δ *flaA*) は鞭毛欠損株であり、*flaA* 遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子が挿入され、*flaB* 遺伝子が自発的に欠失していた。03-368 株 (Δ *pf1A*) は、鞭毛は野生株と同様に認められたが運動性が認められなかった。一方、01-948 株 (Δ *kpsM*) は莢膜多糖 (O 抗原) が欠失しており、鞭毛は野生株と同様に認められるものの運動性が弱かった (Table 1.2.5-2)。いずれの変異株も血液寒天平板上では野生株が

示すムコイド状のコロニー性状は示さなかった。

Table 1.2.5-2 変異株の性状

菌株	鞭毛	運動性	ムコイドコロニー
81-176(wild type)	+	+	+
98-255($\Delta flaA$)	-	-	-
03-368($\Delta pflA$)	+	-	-
01-948($\Delta kpsM$)	+	+	-

2) バイオフィルム形成能

変異株のバイオフィルム形成能を野生株と比較したところ、 $\Delta flaA$ 及び $\Delta pflA$ のバイオフィルム形成能は培養 72 時間後まで有意に低かった。一方、 $\Delta kpsM$ の形成能は 48 時間以上培養した場合に野生株との有意差は認められなかった (Fig. 1.2.5-1)。

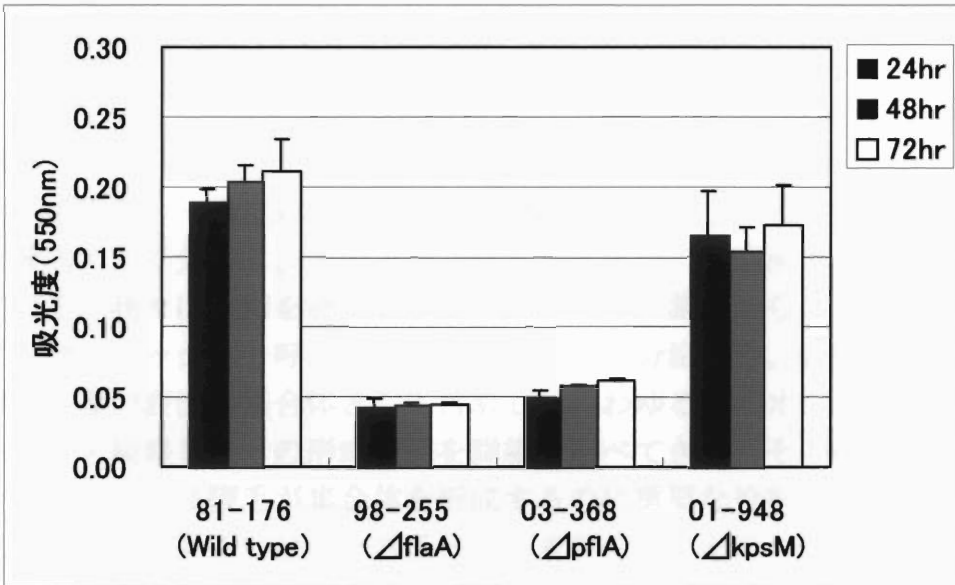


Fig. 1.2.5-1 *C. jejuni* 81-176 株と変異株のバイオフィルム形成能の定量的測定

3) 鶏肉皮膚への付着性

バイオフィルム形成能を持つ 81-176 株 (野生株) と 01-948 株 ($\Delta kpsM$)、バイオフィルム形成能を失った 98-255 株 ($\Delta flaA$) と 03-368 株 ($\Delta pflA$)

を用いて鶏もも肉の皮膚への付着能を比較した。付着菌数は鶏もも肉を菌液 ($10^5 \sim 10^6$ cfu/ml) に浸漬させた後、滅菌蒸留水で洗浄する前と後で比較した。その結果、蒸留水による洗浄前の付着菌数はいずれの供試株において 10^5 cfu/100cm² で、バイオフィーム形成能に関わらず差は認められなかった。蒸留水による洗浄後の付着菌数は、洗浄前に比べると 1/2 ~ 1/3 に減少したが、野生株とバイオフィーム形成能を失った変異株の間に差は認められなかった (Table 1.2.5-3)。回収された菌は、RAPD-PCR または PCR により接種菌と確認された。

Table 1.2.5-3 鶏もも肉皮膚への付着菌数

菌 株	接種菌数	付着菌数 (cfu/100cm ²)	
	(cfu/ml)	洗浄前	洗浄後
81-176(wild type)	5.4×10^5	4.8×10^5	1.4×10^5
98-255($\Delta flaA$)	1.8×10^6	9.9×10^5	4.3×10^5
03-368($\Delta pflA$)	1.6×10^6	5.7×10^5	4.8×10^5
01-948($\Delta kpsM$)	1.9×10^5	1.4×10^5	5.8×10^4

(4) 考察

食中毒細菌の一種である *Campylobacter jejuni* は、家畜や野生動物等の消化管内に広く分布し、人の主要な食水系感染症の起因菌として重要視されている。我々は本菌を液体培地中で培養すると菌体からスライムあるいはグリコカリックスと呼ばれる有機ポリマーが分泌され、容器として用いたガラス等の表面に集合体として付着し、いわゆるバイオフィームを形成することを観察し、その形成過程を詳細に調べてきた。その結果、バイオフィーム形成には鞭毛が集合体を形成するのに重要な役割を持つこと、さらに菌体同士、あるいはガラス面への接着剤の働きを持つ物質は多糖体を含んでいることを明らかにした。そこで、これまでの観察結果を基に *C. jejuni* のゲノム情報から関連遺伝子を検索し、各遺伝子のノックアウトミュータントを作製し、バイオフィーム形成能と市販鶏肉の皮への付着性との関連性を調べた。*C. jejuni* 81-176 株を用い、鞭毛関連遺伝子として *flaA* (鞭毛蛋白) と *pflA* (鞭毛の運動性) を、多糖合成遺伝子として *kpsM* 遺伝子をそれぞれ選択して変異株を作製してバイオフィーム形成能を定量的に調べた結果、鞭毛を欠いた $\Delta flaA$ 及び鞭毛は発現するが運動性を欠いた $\Delta pflA$ のフィルム形成能は失われたが、 $\Delta kpsM$ は野生株と有意差は認められ

なかった。したがって、本菌のバイオフィーム形成には鞭毛自身ではなく、鞭毛による運動性が重要であること、菌体表層に発現されている莢膜多糖体はバイオフィーム形成に関与していないことが示唆された。

細菌のバイオフィーム形成能は食品衛生分野において、パイプダクト内に菌の集合体を形成したり、容器・包装等へ接着して食品への汚染源となることが報告されている。しかしながら *C. jejuni* のバイオフィーム形成能が、食品衛生分野においてどのような問題を生じるのかについては全く判っていない。*C. jejuni* は 30℃以下の温度では増殖できず、微好気性細菌であるため、食鳥処理場内の環境では菌自身が増殖してバイオフィームを形成することはできない。したがって、本菌がスライムを産生してバイオフィームを形成できるのは宿主消化管内であると考えられ、腸管内容物に由来する本菌による鶏肉の汚染が食品衛生上深刻な問題となっており、食鳥処理場における処置工程において、菌の汚染拡大にバイオフィームがどのような影響を持つのか調べることは重要である。今回、バイオフィーム形成能をもつ野外株からバイオフィーム形成能を失った変異株を作出し、鶏もも肉の皮膚への付着能を比較した。今回の実験ではモモ肉を菌液に浸漬した後、皮膚表面の余分な菌液をふき取り、さらに滅菌蒸留水中で 30 分間静置した。しかしながらこの過程では、皮膚に付着した菌はバイオフィーム形成能に関わらず、ほとんど減少することはなかった。今回の実験は、食鳥肉の処理工程で消化管内容物に由来する本菌によってと体皮膚表面が汚染されたことを想定し、チラー水処理後の付着菌数に変化が見られるかを評価しようとするものであった。今回の結果から、バイオフィーム形成能と鶏肉皮膚への菌の付着との関連性は低いものと考えられるが、結果に影響を与えるいくつかの要因についても考慮する必要がある。加えて、菌の皮膚への付着には、菌体側と皮膚側の要因に分けて考えなければならない。*C. jejuni* の付着因子としては、鞭毛、菌体外膜蛋白などが報告されており、培養細胞への付着や菌体同士が凝集する自発凝集活性として観察され、これらは菌体表層の疎水結合能によって付着する機序であると考えられている。さらに、リポ多糖のような親水性の付着因子もあり、バイオフィームも親水性の付着因子であると考えられる。鞭毛欠損株ではバイオフィーム形成能が失われるだけでなく、培養細胞への付着能が低下し、自発凝集活性や疎水結合能も野生株と比べて著しく低下する。しかしながら鞭毛欠損株の鶏肉皮膚への付着菌数は野生株と変わらなかったことから、菌体が鶏肉皮膚表層へ付着するのは単純なメカニズムによるものではないことが推察された。次に、皮膚側の要因として、非特異的に菌を付着させるとこのできる皮膚の物理的構造や、接着物質の存在などが考えられる。蛍

光マーカーで標識した *C. jejuni* の菌液に鶏のと体を浸漬して菌の存在する部位を調べると、皮膚表面の微小な凹凸のくぼみや毛包内に菌が観察されている。このように菌体側の複数の付着因子と皮膚側の様々な要因との相互作用の結果として付着作用が起こると考えられ、バイオフィルムの鶏肉皮膚への付着能を単純に評価するのは困難であると思われた。さらに、今回の実験実施方法では洗浄が不十分であったことも考えられ、洗浄回数や洗浄方法をさらに検討することが必要と思われた。

1. 3 バイオフィルムの構成成分に関する研究

1. 3. 1 バイオフィルム形成阻害因子の検討

(1) 目的

多くの細菌のバイオフィルムは多糖体で構成されていると考えられている。緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ではアルギン酸、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) では γ -ポリグルタミン酸 (γ -PGA) がその主な構成成分であることがこれまでの研究で明らかになっている。しかし、*Campylobacter* に関してはその研究報告はなく、未だ解明されていない。そこでこの節では *C. jejuni* の野生株を用いて、バイオフィルムの構成成分を調べる足がかりとして、種々の酵素処理を行い、バイオフィルム形成を阻害する要因を調べ、その構成成分の検討を試みた。

(2) 方法

81 - 176 野生株を血液寒天培地で、37°C・24 時間微好気培養した後、Brucella Broth に浮遊させ、吸光度計で $OD_{550}=0.15$ に調整した。調整した菌液を小コルベンに 15ml ずつ分注し、37°C で 72 時間、微好気培養を行った。72 時間後、各コルベンに、5mg/ml の濃度に調整したトリプシン、プロテナーゼ K、リパーゼを 1ml 入れ、37°C で 1 時間反応させた (微好気培養)。酵素を入れていない未処理の検体をネガティブコントロールとした。1 時間後、バイオフィルムをはがさないようにマイクロピペットで菌液を除去した。その後、底面に付着したバイオフィルムに 1ml の DW を加え、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。実験はいずれも 3 回行った。

(3) 結果

各酵素処理におけるバイオフィルムの吸光度を (Fig. 1. 3. 1-1) に示す。リパーゼ処理においてのみ、バイオフィルムの形成が阻害された。

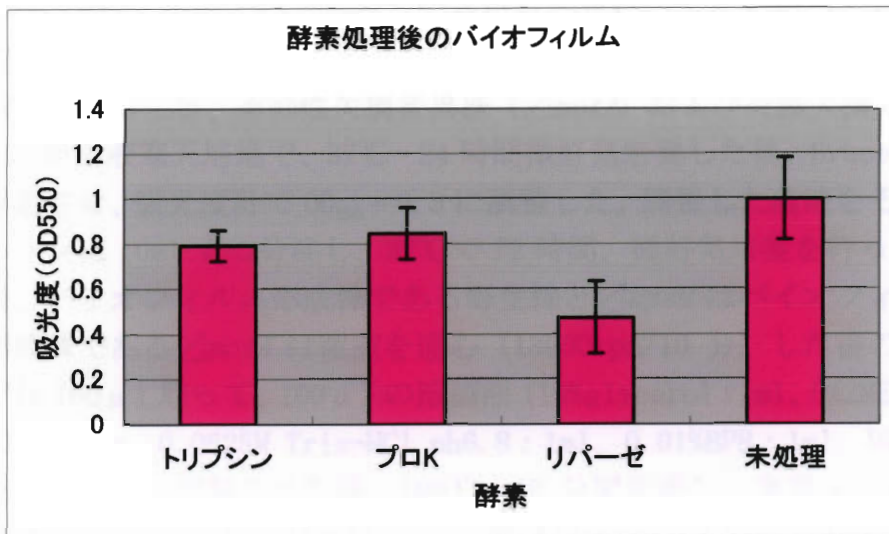


Fig.1.3.1-1 バイオフィルム形成に及ぼす酵素処理の影響

(4) 考察

いずれの酵素処理においても未処理群のバイオフィルムよりも形成が阻害されたが、特にリパーゼの処理においてその傾向が強く認められた。トリプシン、プロテナーゼKはタンパク分解酵素、リパーゼは脂質の分解酵素である。この実験の結果から *C. jejuni* のバイオフィルムの構成成分には脂質が含まれている可能性が示唆された。しかしながら、今回の実験では3種類の酵素しか使用していないため、さらにもっと別の酵素を加えてバイオフィルムを構成している成分の分析が望まれる。また、今回は各酵素の処理時間を1時間で行ったため、さらに処理時間を増やし、消化することで、他の酵素による影響も現れる可能性があることからさらなる検討が必要である。さらに、バイオフィルム形成後の酵素処理しか行っていないため、形成前の処理も行い比較検討を行うことが望まれる。

3. 1. 2 多糖体に対する染色性の比較検討

(1) 目的

前節で、*C. jejuni* のバイオフィルムには脂質が含まれている可能性が示唆された。この節では *C. jejuni* のバイオフィルムに多糖体が含まれているかどうかを調べるため、一般に糖の染色に用いられる、銀、アルシアン

ブルー、PAS、ルテニウムレッドの各染色法を行って比較検討した。

(2) 方法

81 - 176 野生株、運動性欠損変異株 ($\Delta motA$) および莢膜欠損変異株 ($\Delta kpsM$) を血液寒天培地で、37°C・24 時間微好気培養した後、Brucella Broth に浮遊させ、吸光度計で $OD_{550}=0.3$ に調整した。調整した菌液をそれぞれ小コルベンに 10ml ずつ分注し、37°C で 72 時間、微好気培養を行った。72 時間後、バイオフィーム形成株である野生株と $\Delta kpsM$ はバイオフィームを、非形成株である $\Delta motA$ は菌液を遠心 (13000rpm/10 分) した後の上清をそれぞれ 100 μ l 取って、100 μ l の溶菌液 (10%glycerol : 1ml、5%2ME : 0.5ml、3%SDS : 0.3g、0.0625M Tris-HCl pH6.8 : 1ml、0.01%BPB : 1ml、DW : 6.2ml) に懸濁させた。溶解させた後、100°C、10 分間煮沸し、室温まで冷却した。冷却後、100 μ l のサンプルに 10 μ l のプロテナーゼ K を入れ、37°C・24h 反応させた。反応後、65°C・1.5h 静置し、その後、SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE 後、各染色法によりゲルを染色した。各染色法のプロトコールは以下に示す。

[銀染色] ナカライテスク社の電気泳動用高感度銀染色液キットを使用

- ① ゲルを洗浄液 I (99%エタノール : 20ml、酢酸 : 4ml、DW : 16ml) に 30 分以上浸す (時々振盪させる)。
- ② 30 分後、洗浄液 II (99%エタノール : 4ml、酢酸 : 2ml、DW : 34ml) に浸し 20 分間振盪させる。
- ③ 増感液 (増感液 : 4ml、DW : 36ml) に 10 分浸し、振盪させる。
- ④ DW で軽くすすぎ (10 秒間)、新しい DW に 5 分間浸す (4 回)
- ⑤ 銀溶液 (銀溶液 A 液、銀溶液 B 液を 4ml ずつ、DW : 32ml) に 15 分間浸し、振盪させる。
- ⑥ DW に 2 分間浸す (3 回)
- ⑦ 現像液 (現像液 : 2ml、DW : 38ml) に浸し、振盪
- ⑧ 反応停止液 (酢酸 : 2ml、DW : 38ml) に浸す。
- ⑨ DW で軽く洗浄し、観察

[アルシアンブルー染色]

- ① ゲルを 0.1%アルシアンブルー溶液 (エタノール : 40ml、酢酸 : 5ml、アルシアンブルー<SIGMA> : 0.1g、DW : 55ml) に浸し、1 時間振盪させる。

- ② その後、1 晩静置する。
- ③ 染色後、DW に 1~2h 浸し、脱色した後、観察する。

[ルテニウムレッド]

- ① ゲルを 0.02%ルテニウムレッド溶液（ルテニウムレッド<ナカライテスク>：0.1g、DW：500ml）に浸し、1 時間振盪させる。
- ② その後、1 晩静置する。
- ③ 染色後、DW に 1~2h 浸し、脱色した後、観察する。

[PAS 染色]

- ① ゲルを 2 分間水洗する。
- ② 過ヨウ素酸水溶液に 5 分浸す
- ③ 5 分間水洗する。
- ④ シッフ試薬（ナカライテスク）に 15 分間浸す。
- ⑤ 亜硫酸水に 3 分間浸す（3 回）
- ⑥ 10 分間 DW に浸し、発色させる。

(3) 結果

各染色法による染色結果を Fig. 1. 3. 1-1 に示す。高分子量の成分は検出されなかったが、*C. jejuni* のリポオリゴ糖（LOS）とは異なる低分子領域部位に各染色法で染まるバンドが認められた。

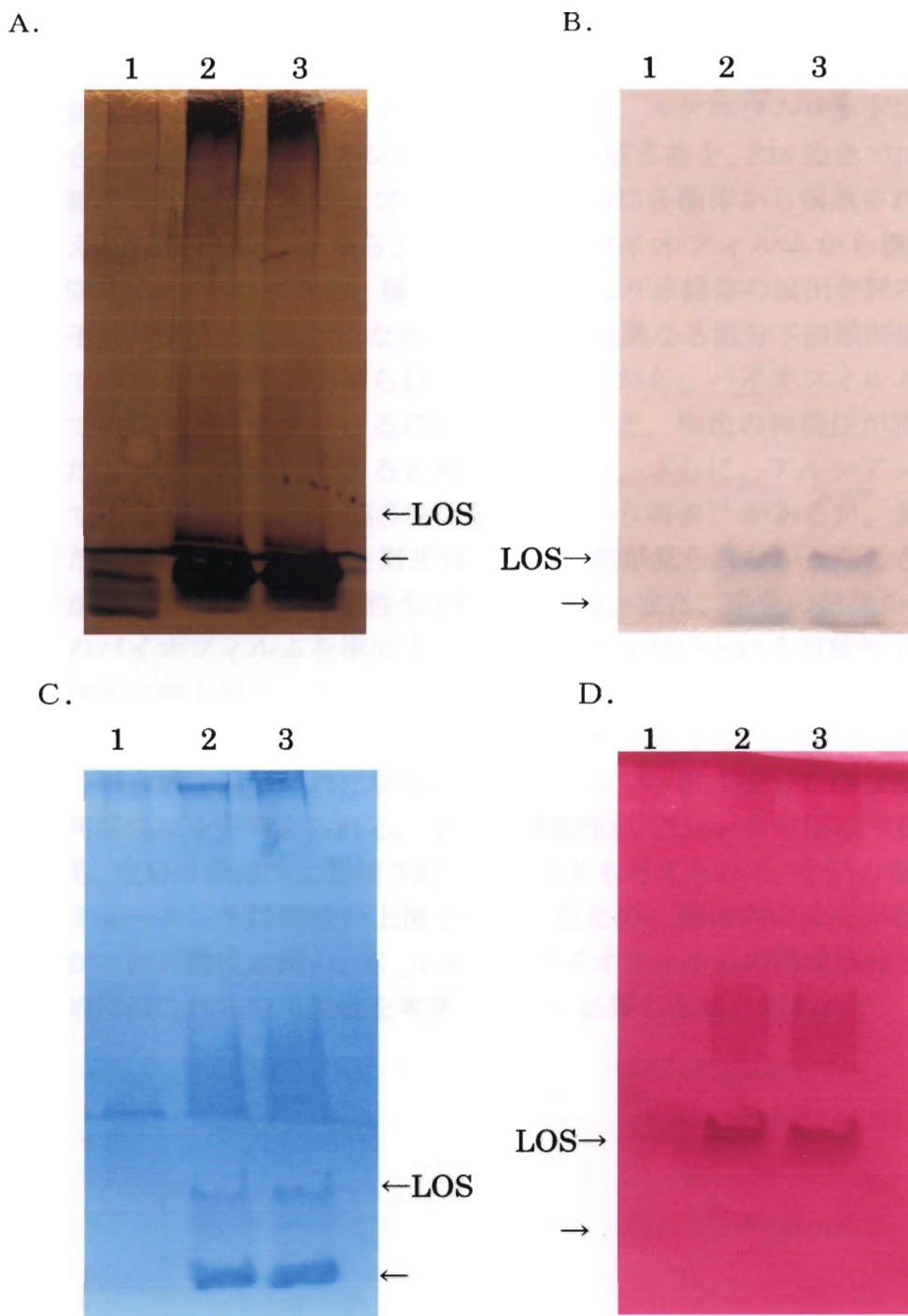


Fig. 1.3.1-1 バイオフィルムの SDS-PAGE 分画後の糖染色

Lane; 1 ; *motA*, 2 ; *kpsM*, 3 ; WT

A ; 銀染色、B ; ルテニウムレッド染色、C ; アルシャンブルー染色、

D ; PAS 染色

(4) 考察

今回行った各染色はいずれも多糖を染色する際に用いられる方法である。銀染色は主に、タンパク・糖タンパクを、ルテニウムレッドはある種の複合多糖体を、アルシアンブルーは酸性粘液多糖を、PAS 染色では中性粘液多糖を染色する。バイオフィームは一般的に多糖体から構成されていると考えられていることから、本実験ではバイオフィームから糖を抽出し、SDS-PAGE を行った後、種々の染色法により多糖体の検出を試みたが、高分子量の成分は検出されなかった。LOS とは異なる低分子領域部位に各染色法で染まるバンドが認められた。しかしながら、バイオフィームの構成成分であることを決定付けるには至らなかった。染色の再現性が得られなかったことが主な原因であると考えられたが、さらに、アルシアンブルー染色では *C. jejuni* の莢膜多糖が染まるという報告³⁾があるが、莢膜を欠損した *kpsM* ミュータントと野生株との間で差が見られなかったことなども染色が不完全であった可能性を示唆している。また、染色の結果から *C. jejuni* のバイオフィームを構成する成分は糖ではないという可能性も考えられる。確実に糖を抽出する方法の確立とともに、糖以外の成分を検索する必要性もあると思われる。さらに、*motA* ミュータントは、バイオフィームそのものの合成を阻害された変異株ではないので、構成成分自体は産生している可能性は十分考えられる。また、運動性が Slime の分泌には重要であっても、成分は菌体内に蓄積されていることも考えられる。今回の実験では *motA* ミュータントは菌液の上清を使用したため、菌体内の成分が含まれていなかった可能性が高い。*C. jejuni* のバイオフィームの構成成分を検討するためにはこれらの可能性を考慮しておく必要もあると思われる。

2. 参考文献

1. Albert, J., Lastovica and Martin, B., Skirrow Clinical Significance of *Campylobacter* and Related Species Other than *Campylobacter jejuni* and *C.coli*. *Campylobacter* edited by Irving Nachamkin, Martin J. Blaser. 2nd ed. P.89-120
2. Allos, B. M. 1998 *Campylobacter jejuni* infection as a cause of the Guillain-Barre syndrome. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 12: 173-184
3. Andrey V. K, and Brendan W. W. 2001. Detection and Initial Characterization of Novel Capsular Polysaccharide among Diverse *Campylobacter jejuni* Strains Using Alcian Blue Dye. *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 39(1):279-84
4. Baehni, P. C., Takeuchi, Y. 2003. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis.* 9 Suppl 1: 23-9. Review.
5. Baserisalehi, M., Al-Mahdi, A. Y., Kapadnis, B. P. 2005. Antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* spp. isolated from environmental samples. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23:1: 48-51
6. Black, R. E., Levine, M. M., Clements, M. L., Hughes, T. P. and Blaser, M. J. 1988. Experimental *Campylobacter jejuni* infection in humans. *J. infect. Dis.* 157: 472-479
7. Blankenship, L. C., and S.E. Craven. 1982. *Campylobacter jejuni* survival in chicken meat as a function of temperature. *Appl Environ Microbiol* 44:88-92
8. Buck, G. E., Parshall KA, Davis CP. 1983. Electron microscopy of the coccoid form of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 18:420-1
9. Butzler, J.-P. e. a. Related vibrios. stools. *J. Pediat* 82: 493-495
10. Chart, H., Frost, J. A., Oza, A., Thwaites, R., Gillanders, S. and Rowe, B. 1996. Heatstable serotyping antigens expressed by strains of *Campylobacter jejuni* are probably capsular and not long-chain lipopolysaccharide. *J. Appl. Bacteriol* 81:635-640
11. Cheng, A. C., Thielman, N. M. 2002. Update on Traveler's Diarrhea.

12. Corry, J. E., Atabay, H. I. 2001 Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol. 96S-114S
13. Costerton, J. W., Irvin, R. T., Cheng, K. J. 1981. The role of bacterial surface structures in pathogenesis. Crit Rev Microbiol 8:303-38
14. David J. B., Christine M. S., Don H. B., Richard A. A. and Patricia Guerry. 2001. A phase-variable capsule is involved in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. Molecular Microbiology. 40(3);769-777
15. Friedman, C.R., Neimann, J., Wegener, H.C., Tauxe, R.V. 2000 Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. In: Nachamkin I, Blaser MJ (eds) *Campylobacter*, 2nd edn. Washington DC, ASM Press.: 121-138
16. Froeliger, E. H., Fives-Taylor, P. 2001. Streptococcus parasanguis fimbria-associated adhesion fap 1 is required for biofilm formation. Infect Immun. Apr;69(4): 2512-9
17. Gallison, D. 2003. The Biofilm Matrix: Biofouling. Vol 19(2), p139-150
18. Gill, C. O and Harris, L. M. 1982 Survival and growth of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on meat and in cooked foods. Appl. Environ. Microbiol 44:259-63
19. Gill, K. P. W. and Landr, K. P. 1981. The effect of pasteurization on the survival of *Campylobacter* species in milk. Br. Vet. J 137:578-84
20. Goddard, E. A., A. J. Lastovica, and A. C. Argent. 1997. *Campylobacter* O:41 isolation in Guillain-Barre syndrome. Arch Dis Child 76: 526-528
21. Goossens, H., B. A. Giesendorf, P. Vandamme, L. Vlaes, C. Van den Borre, A. Koeken, W. G. Quint, W. Blomme, P. Hanicq, D. S. Koster, and et al. 1995. Investigation of an outbreak of *Campylobacter upsaliensis* in day care centers in Brussels: analysis of relationships among isolates by phenotypic and genotypic typing methods. J Infect Dis 172: 1298-305
22. Gugnani, H. C. 1999 Some emerging food and water borne pathogens. J. Commun. Dis. 31: 65-72

23. Helen, M. Dalton and Paul, E. March. 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Current Opinion in Biotechnology*. 9: 252-255
24. Jendresen, M. D., Glantz, P. O. 1981. Clinical adhesiveness of selected dental materials. An in-vivo study. *Acta Odontol Scand* 39: 39-45
25. Jeon B, Itoh K, Misawa N, Ryu S. 2003. Effects of Quorum sensing on *flaA* Transcription and Autoagglutination in *Campylobacter jejuni*. *Microbiol Immunol* 47:833-9
26. Karlyshev AV , Linton D, Gregson NA, Lastovica AJ, Wren BW. 2000. Genetic and biochemical evidence of a *Campylobacter jejuni* capsular polysaccharide that accounts for Penner serotype specificity. *Mol Microbiol* 35:529-41
27. Keren S, Ute R, and Sima Y. 2005. Effect of Heat, Acidification, and Chlorination on *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Cells in a Biofilm Formed at the Air-Liquid Interface. *Appl. Environ. Microbiol.* Mar. 71(3):1163-68
28. King, E. O. 1957. Human infection with *Vibrio fetus* and a closely related *Vibrio*. *J. Infect. Dis* 101:119-128
29. Kusumaningrum, H.D., Riboldi, G., Hazeleger, W.C., Beumer, R.R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*; 85:227-236
30. Levy, A. J. 1946. A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine vibrio. *Yale J. Boil. Med.* 18: 243-258
31. Marsh, P. D. 2004. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res.* 38:204-11
32. Merle, E.O., Howard, C., Douglas, W., Andre, G., Buret, R., Ronald, R.R. 2002. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *The Canadian Journal of Veterinary Research.* 66:86-92
33. Millward, T. A., Wilson, M. 1989. The effect of chlorhexidine on *Streptococcus sanguis* biofilms. *Microbios* 58: 155-64.

34. Misawa N, Blaser M.J. 2000. Detection and characterization of autoagglutination activity by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 68:6168-75.
35. Monzon, M., Garcia-Alvarez, F., Lacleriga, A., Amorena, B. 2002. Evaluation of four experimental osteomyelitis infection models by using precolonized implants and bacterial suspensions. *Acta Orthop Scand. Jan;73(1): 11-9*
36. Morten H, Gail M. T, Grant J. B, Arne H, Soren M, Michael G, Matthew R. P. 2001. Alginate Overproduction Affects *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Structure and Function. *Journal of Bacteriology*, Sept. 183(18):5395-5401
37. Nachamkin, I., Allos, B. M., Ho, T. 1998. *Clin Microbiol Rev.* 11: 555-567
38. Nicola R, Stanley and Beth A. Lazazzera. 2005. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly- γ -DL-glutamic acid production and biofilm formation. *Molecular Microbiology* 57(4),1143-58
39. Osamu, K. Pathogenesis and therapy of airway biofilm diseases. In *Modern media.* vol.41, no.6: 213-220.
40. Preston, A., Mandrell, R. E., Gibson, B. W., Apicella, M. A. 1996. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 22:139-80
41. Read, I., Chatzinikolaou, I., Chaiban, G., Hanna, H., Hachem, R., Dvoral, T., Cook, G., Costerton, W. 2003. In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. *Antimicrob Agents Chemother.* Nov;47(11): 3580-5
42. Skirrow, M. B. 1977. *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br Med J* 2:9-11
43. Skirrow, M. B. and Blaser, M. J. 2000. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. In *Campylobacter*, 2nd Edition. Nachamkin, I. and Blaser, M. J. (ed.). pp. 69-88. ASM Press, Washington, D. C.
44. Smith, K. E., Bender, J. B., Osterholm, M. T. 2000. Antimicrobial

- resistance in animals and relevance to human infections. In *Campylobacter*, 2nd Edition. Nachamkin, I., Blaser, M. J.,(ed.). pp.483-495. ASM Press, Washington, D. C.
45. **Stefan, B., Tanja, V., Manfred, K.** 1999. Susceptibility in vitro of *Helicobacter pylori* to cetylpyridium chloride. *FEMS Immunology and Med Microbiol.* 24:189-192
 46. **Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., Svabic-Vlahovic, M.** 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology.* 38:428-32
 47. **Thien-Fah, C., Mah and Gerrge A.O' Toole.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiology.* Jan. 9(1):34-38
 48. **Vandamme, P.** 2002. Taxonomy of Family Campylobacteriaceae. *Campylobacter*, 2nd Edition. Nachamkin, I. and Blaser, M. J.(ed.).pp. 3-26. ASM Press Washington, D.C.
 49. **Van Houdt R, Aertsen A, Jansen A, Quintana A. L and Michiels C. W.** 2004. Biofilm formation and cell to cell signaling in Gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. *Journal of applied microbiology* 96(1):177-84
 50. **Warren, J. R., Marshall, B. J.** 1983 Unidentified curved bacilli of gastric epithelium in acutive chronic gastritis. *Lancet.* 1: 1273-1275
 51. **Wen-Lan, L.W., Bradley, W.P., Nancy, W. L and Martin, J. Blaser.** 1983. Effects of Disinfectants on *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiol* Apr. 45(4):1202-1205
 52. **Weterman, S. C.** 1982. The heat-sensitivity of *Campylobacter jejuni* in milk. *J Hyg(Lond)* 88:529-33
 53. **Willison, H. J., O' Hanlon, G. M.** 1999. The immunopathogenesis of Miller Fisher Syndrome. *J Neuroimmunol* 100:3-12
 54. **Yao R, Burr DH, Doig P, Trust TJ, Niu H, Guerry P.** 1994. Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*. the role of motility in adherence and invasion of eukaryotic cells. *Mol*

Microbiol 14:883-93

55. **Yuki, N. et al.** 1993. A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barre Syndrome has a GM1 ganglioside-like structure. *J. Exp. Med.* 178: 1771-1775
56. **Zhang J, Lu C.** 2003. Effects of *Aeromonas hydrophila* biofilm on the drug resistance. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* Aug; 43 (4) :498-502

3. 総括

カンピロバクターは微好気性細菌であるので、実験的には大気中の酸素濃度では容易に死滅するが、低温下で保存した水や食品中では比較的長期間生存することができる。したがって、食品や飲料水を介した感染が成立するためには、菌にとって厳しい生存環境に適応して生存するための戦略を兼ね備えていなければならない。このような観点から、*C. jejuni* の生存様式は2つに分けることができる。一つは活動期で、菌は宿主腸管内を鞭毛により活発に運動し、宿主粘膜上皮に付着する能力を持つ。またこの活動期には毒素を産生したり、上皮細胞内に侵入あるいは貫通して菌血症を呈することがある。一方、菌体表層が莢膜様多糖で覆われ、鞭毛蛋白やリポオリゴ糖 (LOS) がシアル酸で修飾されたり表層抗原の相変異が起こるのは、宿主の免疫応答から逃れるために重要な働きを持つと考えられる。第2の生存様式は休止期で、増殖した菌体が運動を止め、お互いに接着して集合体（自発凝集性およびバイオフィーム）を形成したり、環境の変化に応じて菌形態がらせん状から球状に変化することが観察されている。さらに外界では、生きてはいるが人工培地で培養できない、いわゆるVBNC (Viable But Non Culturable) と呼ばれる仮死状態となる。前者は宿主の腸管内で共生関係を構築したり病原性を発揮する状態にあり、後者は厳しい環境中で生存するために必要な生存様式であると考えられる。したがって、カンピロバクター感染症を防除するためには、宿主内での発症機序だけでなく、食品を含む多様に变化する様々な環境中での生存様式（環境適応機構）を理解することも重要である。

本研究では、バイオフィームの形成に関与する遺伝子群の検索を行うとともに、構成成分の化学的分析を行った。さらに、バイオフィームの生物学的機能について明らかにすることを目的として、環境中における生存性や消毒薬剤に対する抵抗性などにおける役割について調べた。

変異株作製において8種類の遺伝子をそれぞれ破壊した変異株を得ることができた。変異株のバイオフィーム形成能を野生株と比較したところ、 $\Delta flaAflaB$ 、 $\Delta flbA$ 、 $\Delta pflA$ 及び $\Delta motA$ のバイオフィーム形成能は培養後72時間まで有意に低かった。一方、 $\Delta kpsM$ をはじめとするその他の変異株の形成能は72時間以上培養した場合、野生株と有意差は認められなかった。以上の結果から、バイオフィーム形成能には鞭毛による運動性が必要条件であり、フィルム構成成分であるスライムの菌体外への放出と密接に関連していると考えられた。しかしながら、莢膜多糖やPEB1外膜蛋白、さらには走化性やquorum sensing制御系はフィルム形成には関与していないことが示唆された。

乾燥抵抗性試験では5日目において、*motA* ミュータント及び planktonic な状態ではほとんど死滅したのに対し、バイオフィーム形成菌では多くの菌が生残

していた。加熱抵抗性試験ではバイオフィーム形成菌の方がより高温、長時間の感作において生残していた。消毒剤の殺菌作用に対する抵抗性試験では供試したアルコール、塩化セチルピリジニウムともに、バイオフィーム形成時の方が高濃度、長時間の作用に抵抗性を示した。また抗生物質の感受性試験においても、バイオフィームによる菌体への感受性低下が認められた。このように *C. jejuni* が形成するバイオフィームは種々の物理化学的処理に対して抵抗性を示すことから、集合体を形成することで環境中における生残性や薬剤抵抗性に重要な役割を持つことが示唆された。また、トリプシン、プロテナーゼ K、リパーゼの各酵素の処理実験では、リパーゼ処理でのみバイオフィームの形成が阻害されたことから、バイオフィーム形成に関与する構成成分には脂質を含んでいる可能性が考えられた。SDS-PAGE 後に糖を検出する種々の染色法を行ったが、高分子量の成分は検出されなかった。一方、リポオリゴ糖 (LOS) とは異なる低分子領域部位に各染色法で染まるバンドが認められが、バイオフィームの構成成分であることを決定付けるには至らなかった。

4. 謝辞

本研究は、宮崎大学農学部獣医学科獣医公衆衛生学講座に所属した、大西貴弘君、三村純一郎君、和気友哉君の協力の下に行われた。ここに深謝の意を表します。