

(別紙様式 14)

---

カンピロバクターのバイオフィルム形成能と  
食品中における生存性に関する研究

---

14560268

平成14年度～平成15年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成16年4月

研究代表者

(宮崎大学農学部)

三澤 尚明

## 目 次

### 第1章 概 要

1. 目的と目標..... 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
1. 研究成果による工業所有権の出願・取得状況..... 5
2. 英文要約..... 6

### 第2章 本 論

1. 各論
  1. 1 バイオフィルの形態学的観察..... 7
  1. 2 バイオフィルム形成関連遺伝子の検索と変異株の作製..... 11
  1. 3 変異株の性状とバイオフィルム形成能..... 15
2. 総括..... 16

### 付 論文別刷

# 第1章 概 要

## 第1章 概要

### 1. 目的と目標

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介して人に感染する。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。*C. jejuni*は、実験的には30℃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探索し、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。そこで本研究では、*Campylobacter*の環境・食品中での生存性におけるバイオフィルムの役割を明らかにするため、バイオフィルムの形成過程を形態学的に観察し、バイオフィルムの形成に関与すると考えられる遺伝子群をゲノム情報から推定し、これらのノックアウトミュータントを作製してそれらの機能を調べた。

## 2. 研究組織と予算配分額

### 研究組織

研究代表者：三 澤 尚 明 （宮崎大学農学部）

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	300	0	300
平成15年度	300	0	300
平成 年度			
平成 年度			
平成 年度			
総計	600	0	600

交付決定額(配分額)

(金額単位：千円)

## 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の新展開 (総説), *日本食品微生物学会雑誌*, 20(3): 91-97, 2003.
- 2) Jeon, B., Itoh, K., Misawa, N., Ryu, S. Effects of quorum sensing on *flaA* transcription and autoagglutination in *Campylobacter jejuni*. *Microbiol. Immunol.*, 47(11): 833-839, 2003.
- 3) 三澤尚明, 伊藤喜久治, カンピロバクター属 (ジェジュニ/コリ) (総説), *日本臨床*, 61 (増刊号 3) :727-731, 2003.
- 4) 三澤尚明、近藤房生、後藤公吉、斎藤志保子、川森文彦、小野一晃、重茂克彦、品川邦汎、人および鶏肉由来 *Campylobacter jejuni* HS:2 および HS:19 血清型株の PCR-RFLP 法による遺伝子解析、*日獣会誌*, 56(7): 471-475, 2003.
- 5) Misawa, N., Kawashima, K., Kondo, F., Kushima, E., Kushima, K., Vandamme, P., Isolation and characterization of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Anaerobiospirillum* strains from a puppy with bloody diarrhea. *Vet. Microbiol.*, 87(4):353-364, 2002.

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) 三村純一郎、三澤尚明、*Campylobacter jejuni* のバイオフィルム形成における鞭毛、莢膜多糖、外膜蛋白の役割、日本細菌学会、熊本市、2003. 4月
  - 2) Naoaki Misawa, Junichiro Mimura, Fusao Kondo, Biofilm formation on smooth surfaces by *Campylobacter jejuni* required for flagella and motility but not for capsular-like polysaccharide, 12th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms*, Aarhus Denmark, 2003. 9月
  - 3) Maiko Enokimoto, Meiko Kubo, Yoshinobu Bozono, Yoshiko Mieno, Fusao Kondo, Naoaki Misawa, Quantitative detection of *Campylobacter* from liver and bile in cattle after slaughtering, 12th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms*, Aarhus Denmark, 2003. 9月
  - 4) Tomoko Amano, Fusao Kondo, Naoaki Misawa, Influence of medium pH of TSI on the detection of hydrogen sulfide by *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, 12th International Workshop on *Campylobacter, Helicobacter, and Related Organisms*, Aarhus Denmark, 2003. 9月
  - 5) 三澤尚明、宇根有美、チーター胃粘膜由来 *Helicobacter* 属菌のマウス胃内での継代と凍結保存方法の検討、日本獣医学会、青森市、2003. 10月
  - 6) 高木昌美、小野一晃、三澤尚明、重茂克彦、品川邦汎、食中毒由来 *Campylobacter jejuni* の鶏腸管内における増殖性、日本食品微生物学会、盛岡市、2003. 10月
  - 7) 三村純一郎、三澤尚明、近藤房生、*Campylobacter hyointestinalis* の TSI 培地を用いた硫化水素検出に及ぼす培地 pH の影響について、日本獣医公衆衛生学会九州地区大会、宮崎市、2003. 10月
  - 8) 榎本麻衣子、三澤尚明、近藤房生、牛胆汁からの *Campylobacter* 属菌の定量的検出と胆嚢への移行ルートの検索、日本獣医公衆衛生学会九州地区大会、宮崎市、2003. 10月
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 examine the mode of *C. jejuni* adherence to a smooth surface. When bacterial suspensions in Brucella broth were incubated in a microplate well, microcolonies were formed on the coverslip by 2 h after incubation. The microcolonies gradually grew and formed a biofilm of net-like connections by 6 h. Transmission electron microscopy indicated that massive amounts of extracellular material were masking the cell surface and bound ruthenium red, suggesting the presence of a polysaccharide moiety. Scanning electron microscopy indicated that the flagella acted as bridges, forming a net-like connection between the organisms. To determine the genes associated with biofilm formation, several mutants were constructed from strain 81-176 by natural transformation-mediated allelic exchange. As aflagellate (*flaA* and *flaB*) 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. These findings suggest that flagella-mediated motility but not capsular-like polysaccharide and PEB1 protein is needed for biofilm formation *in vitro*.

**Keywords:** *C. jejuni*, biofilm, flagellar, motility, capsular-like polysaccharide

## 第2章 本 論



## 第2章 本 論

### 1. 各論

#### 1. 1 バイオフィルムの形態学的観察

##### (1) 目的

*C. jejuni* は、液体培地に接種して培養すると、その容器として用いたガラスやプラスチックの底面にバイオフィルムを形成する（図1-1）。そこで、本菌のバイオフィルムの形成過程を形態学的に詳細に調べることを目的とした実験を行った。

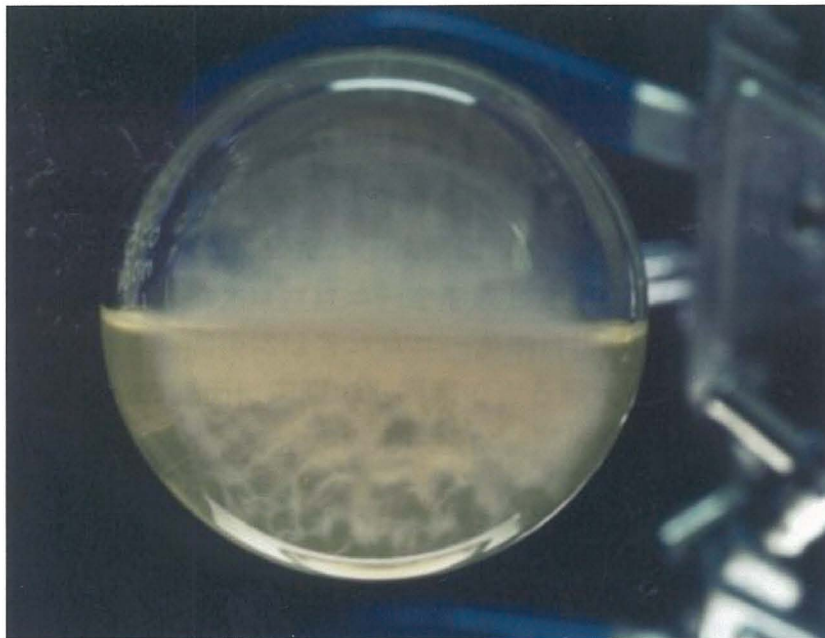


図1-1 三角フラスコ底面に形成したバイオフィルム

##### (2) 方法

###### 1) 供試菌株

人下痢患者由来 *C. jejuni* 81-176 株を供試菌株として用いた。菌株は10%ジメチルスルフォキシド添加ブルセラブロスに懸濁して $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。菌株を使用する際は、0.3%寒天を含むブルセラ寒天培地内で運動性のあることを確認してから供試した。

###### 2) バイオフィルムの経時的観察

24 ウェルマイクロプレートに1mlのブルセラブロスを入れ、そこに *C. jejuni* 81-176 株を  $10^8\text{cfu/ml}$  となるように接種し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、微好気条件下で培養し、経時的に倒立顕微鏡で観察した。

###### 3) 透過型電子顕微鏡による観察

24 ウェルマイクロプレートの底面に  $37^{\circ}\text{C}$ 、48 時間培養して形成した

バイオフィルムをかきとり、100mM カコジル酸緩衝液(pH7.4)で調整した 2.5%グルタルアルデヒド溶液内で 4℃、2 時間固定した。洗浄後、2%オスミウ四酢酸で 20℃、3 時間固定し、Queto1812 樹脂に包埋して超薄切片を作成し、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色して透過型電子顕微鏡(日立 H-800MU)で観察した。菌体外多糖を検出する目的で、固定液には 0.005% ルテニウムレッドを添加した。

#### 4) 走査型電子顕微鏡による観察

24 ウェルマイクロプレートの底面にカバーガラスを置き、菌液を培養した。カバーガラス上に形成されたバイオフィルムを洗浄、固定、脱水し、定法に従い白金パラジウムを蒸着させ、走査型電子顕微鏡(日立 S-4000)で観察した。

#### (3) 結果

バイオフィルム形成過程を経時的に観察すると、培養開始時に菌体はウェル内を活発に遊泳していたが、次第に求心的に集合し、培養 2 時間後に直径 2~5 $\mu\text{m}$  のマイクロコロニーを形成した。さらに培養を続けるとコロニーは増大し、4 時間後には各コロニーが網目状に結合し、培養開始 6 時間後には、ウェルの底面に肉眼でも観察できる膜状のバイオフィルムを形成した(図 1-2)。バイオフィルム形成後は、遊泳する菌体は観察されなかった。

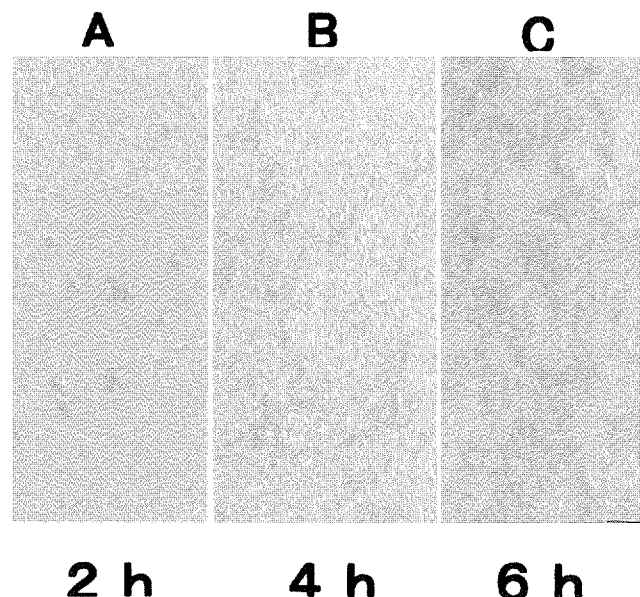


図 1-2 位相差倒立顕微鏡によるカバースリップ上のバイオフィルムの経時的観察

バイオフィーム形成菌を透過型電子顕微鏡で観察すると、菌体周囲に電子密度の高い物質が覆い、鞭毛同士が接着している像が観察された(図1-3)。さらに、走査型電子顕微鏡による観察では、鞭毛が架橋構造をとり、菌体間の結合に重要な役割を果していることが分かった(図1-4 A、B)。さらに、バイオフィームをルテニウムレッドで染色した超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察すると、菌体周囲の電子密度が高く、菌体外物質にルテニウムレッドが結合していることが確認された(図1-5)。よって、菌体外多糖がバイオフィームを形成する構成成分であると考えられた。

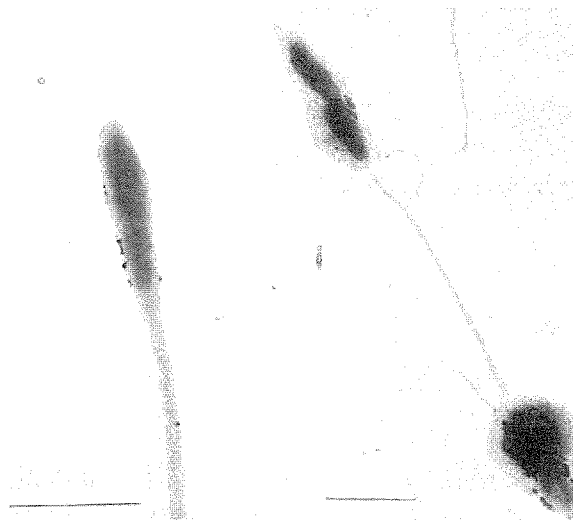


図1-3 透過型電子顕微鏡によるバイオフィームの観察

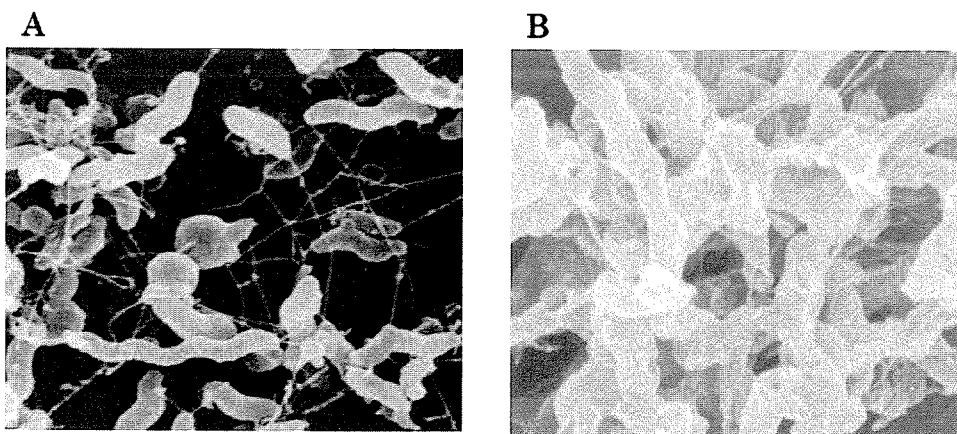


図1-4 カバースリップ上に形成されたバイオフィームの走査型電子顕微鏡による観察 (A; 2時間培養、B; 6時間培養)

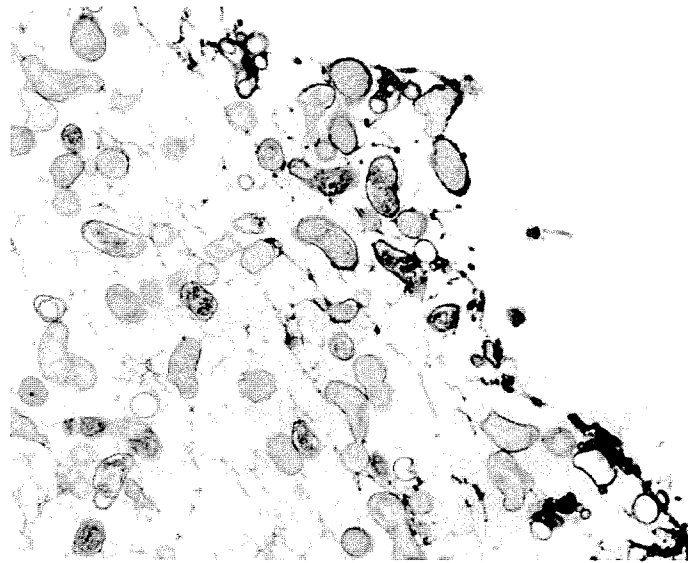


図1-5 バイオフィルム超薄切片のルテニウムレッド染色

#### (4) 考察

*C. jejuni* 81-176 株を用いてバイオフィルムの形成過程を観察した。バイオフィルム形成初期においては、菌が活発に運動し、求心的に集合してマイクロコロニーを形成した後、それらが徐々に大きくなり、融合してフィルム状の集合体を形成した。この観察結果から、鞭毛による運動性が重要な役割を演じていると考えられた。さらに、走査型電子顕微鏡による観察では鞭毛が架橋構造をなし、菌体間の接着にも関与している像が観察された。透過型電子顕微鏡による観察では、菌体周囲に電子密度のやや高い無構造の物質が覆い、菌体や鞭毛間を接着するような像が認められた。さらに、この物質はルテニウムレッドに染色されることから、多糖体を含んでいることが示唆された。以上の観察結果を基に、バイオフィルム形成に関与すると考えられる遺伝子を検索することにした。

### 1. 2 バイオフィルム形成関連遺伝子の検索と変異株の作製

#### (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

バイオフィルムの形成に関与すると考えられる遺伝子をゲノム情報より推定し、それぞれの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作製した。破壊した遺伝子は、多糖体合成関連遺伝子 (*kpsM*)、鞭毛遺伝子 (*flaA*, *flaB*)、鞭毛の組み立てに関する遺伝子 (*flbA*)、運動性に関する遺伝子 (*motA*, *pflA*)、走化性に関する遺伝子 (*cheY*)、細胞間シグナル伝達に関する遺伝子 (*luxS*)、外膜蛋白遺伝子 (*peb1*) である (表 2-1)。

図 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、ベクター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 2-1

菌 株	遺 伝 子	遺 伝 子 機 能
98-248	<i>flaA</i> , <i>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

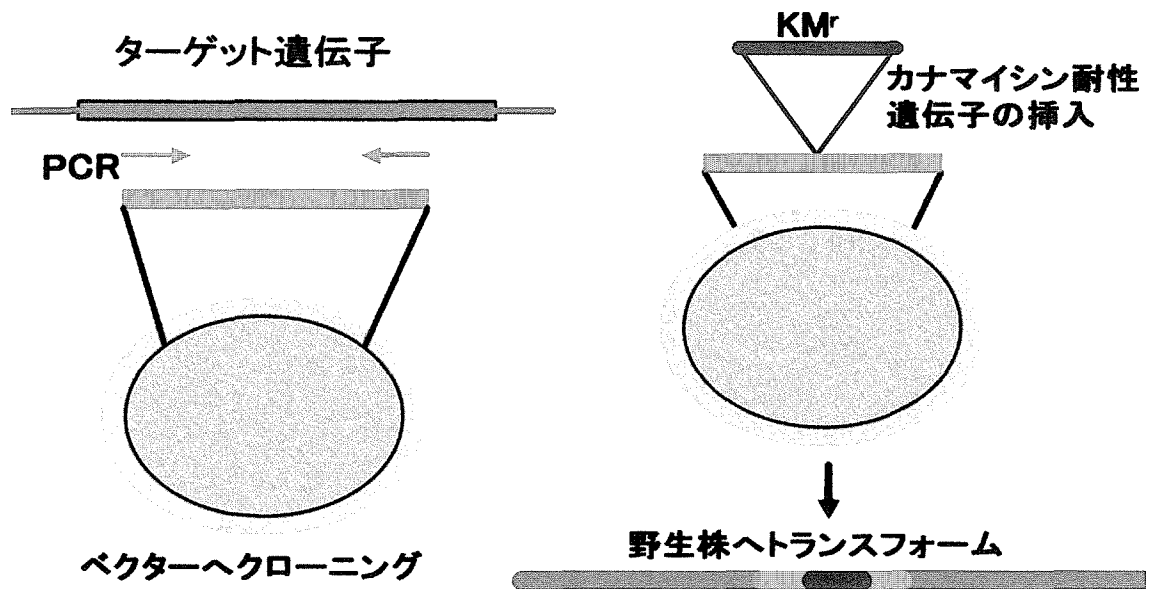
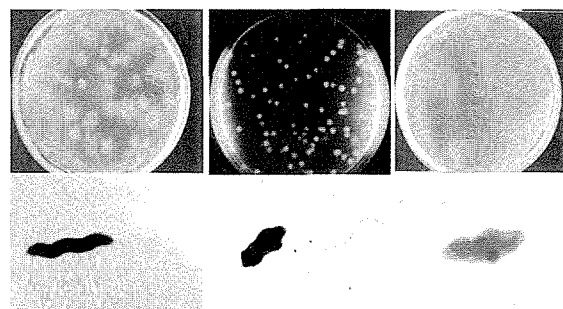


図 2 - 1 変異株の作製法

(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。



Wild type *kpsM*<sup>-</sup> *flaA*<sup>-</sup> *B*<sup>-</sup>

図 2 - 2 変異株の運動性と鞭毛の発現

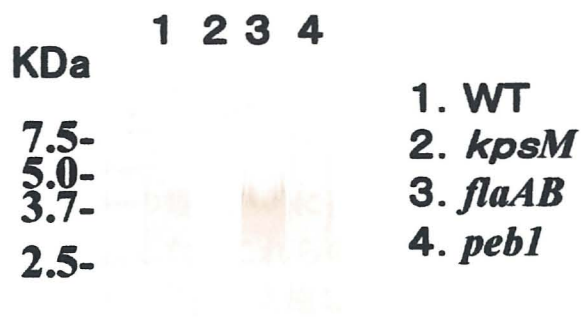


図 2-3 ウェスタンブロッティングによる莢膜多糖の検出

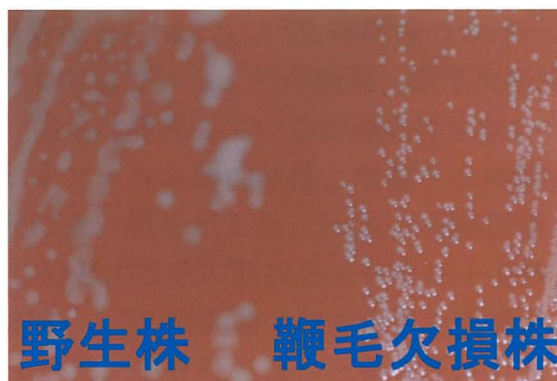


図 2-4 野生株と鞭毛欠損株のコロニー性状の比較

表 2-1 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

### 1. 3 変異株のバイオフィーム形成能

#### (1) 目的

バイオフィー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ーム形成能を野生株と比較するため、定量的検査法を実施した。

#### (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ーム形成能は、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3-2に示した。

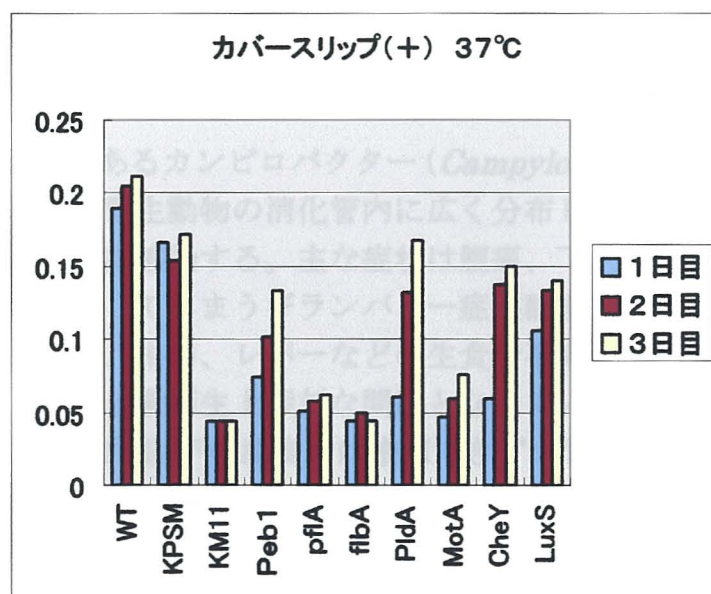


図3-1 野生株と変異株のバイオフィーム形成能の比較



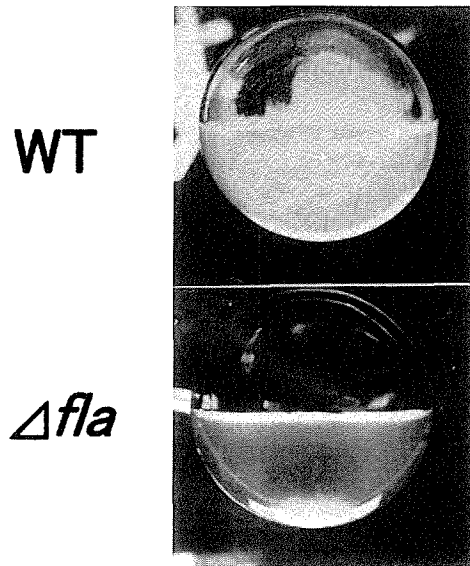


図3-2 三角コルベン内における野生株と鞭毛欠損株 ( $\Delta fla$ ) のバイオフィルム形成能の比較

#### (4) 考察

以上の結果から、バイオフィル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ル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ル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。

## 2. 総括

食中毒細菌の一種であるカンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) は、家畜、伴侶動物および野生動物の消化管内に広く分布し、菌に汚染された食品や飲料水を介して人に感染する。主な症状は腹痛、下痢であるが、稀に手足や全身の筋肉が麻痺してしまうギランバレー症候群を合併することもある。特にわが国では、鶏肉、牛肉、レバーなどの生食や不完全加熱調理品を食べる食習慣があるため、公衆衛生上深刻な問題となっている。カンピロバクターは、試験管内では 30℃以下の温度では増殖できず大気中の酸素濃度ですぐに死滅するが、冷蔵した食品の中では比較的長期間生存することが知られている。したがって、食品等の環境は菌にとって決して快適な環境とは言えないが、厳しい環境変化にも適応して生存するための様々な戦略を兼ね備えていると考えられる。

本研究ではカンピロバクターのバイオフィルム形成能に着目し、食品中における生存性との関連性を調べるのが目的である。バイオフィルムの形成過程を詳細に観察したところ、鞭毛による運動性が重要であり、菌体表層を多糖体を含む構造物が覆っていることから、それらの関連している遺伝子をゲノム情報から検索し、それらの変異株（ミュータント）を人工的に作ってバイオフィルムを比較した。その結果、運動性を欠いた変異株では鞭毛が発現されていてもバイオフィルム形成能がなかった。運動性自体がバイオフィルムの主要な構成成分である多糖体の菌体外への分泌にも関与していると考えられた。今回は、バイオフィルムの主要な構成成分と考えられる多糖体スライムの生合成に関連する遺伝子を検出することはできなかったが、鞭毛による運動性とスライムの発現が連動して制御されていることが明らかとなり、今後バイオフィルム形成能を失った変異株と野生株の遺伝子発現の差をDNA マイクロアレイで比較解析することにより、それらの関連する遺伝子を特定することが可能であると思われる。