

令和元年6月25日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08022

研究課題名(和文)動物及び食品由来カンピロバクター株におけるギランバレー症候群発症リスク因子の分析

研究課題名(英文) Analysis of bacterial risk factors for the development of Guillain-Barré Syndrome among *Campylobacter jejuni* strains isolated from animal and food sources

研究代表者

三澤 尚明 (Misawa, Naoaki)

宮崎大学・産業動物防疫リサーチセンター・教授

研究者番号：20229678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Campylobacter jejuniに起因するギランバレー症候群(GBS)の発症機序は、菌体リポオリゴ糖(LOS)がガングリオシド様糖鎖構造を持つことによる自己免疫疾患と考えられている。そこで、家畜由来C. jejuniのGBS発症のリスク因子の分布を調べ、それらを有する菌株の分布状況を明らかにした。国内市販鶏肉、ブロイラー、地鶏、牛及び下痢患者由来C. jejuni計496株を供試し、血清型、LOS合成遺伝子オペロン型、MLST型、LOSにおけるシアル酸及びガングリオシドGM1エピトープの発現を決定した。その結果、GBSの発症リスク因子を保有する株が家畜に分布していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国内の細菌性食中毒の約60%はカンピロバクターによるもので、発症件数はこの数年間第1位となっている。GBSの発症頻度は人口10万人当たり1.2名程度で、国内では年間2000人程度の発症が認められている。GBSの約30%はカンピロバクターの合併症として起こることから、本研究で食中毒の感染源となるカンピロバクターの中にどの程度GBS発症に関連するリスク因子を保有しているのか、また自然界における分布を明らかにしたことは、GBS発症リスク因子を保有する菌株を迅速に検出できる診断法に繋げる事が可能となり、GBS発症を未然に防ぐことができる成果として公衆衛生上の意義は高い。

研究成果の概要(英文)：Guillain-Barré Syndrome (GBS), a neurologic disease characterized by acute paralysis, is frequently preceded by *Campylobacter jejuni* infection. Among the diverse lipooligosaccharide (LOS) molecules of *C. jejuni* strains, some structures closely resemble human gangliosides, suggesting that molecular mimicry could trigger the neuronal injury observed in GBS. The present study was performed to investigate prevalence of *C. jejuni* strains isolated from animals with risk factors for development of GBS in Japan. A total of 496 *C. jejuni* strains from animals and human enteritis were analyzed for serotyping, LOS typing, MLST typing, and expression of sialic acid and GM1 epitope on the LOS. Our study concluded that only small numbers of *C. jejuni* isolates from animal origins have been proved for the presence of ganglioside-like epitopes with sialic acid, suggesting that *C. jejuni* strains showing bacterial risk factors for development of GBS exist among animal isolates.

研究分野：獣医公衆衛生学

キーワード：カンピロバクター ギランバレー症候群 食中毒 リポオリゴサッカライド シアル酸 ガングリオシド 分子疫学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) カンピロバクター食中毒と合併症

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) は、人の主要な食中毒の起因菌として世界各国で重要視されている。カンピロバクター食中毒は増加傾向にあり、日本人は食肉や肝臓を生や不完全加熱調理のまま食べる食習慣があるため、感染するリスクは高い。カンピロバクター食中毒の症状は、2~7日の潜伏期の後、腹痛、頭痛、悪寒、発熱、悪心、嘔吐、倦怠感などが見られ、水様性あるいは粘血性の下痢が認められる (Skirrow; Br. Med. J., 1977)。さらにギランバレー症候群 (Guillain-Barré syndrome; GBS) は本食中毒の合併症で、重篤な後遺症や死に至る場合がある (Allos; Infect. Dis. Clin. North. Am., 1998) ことから、その防除対策を講じることが喫緊の課題となっている。

(2) ギランバレー症候群の発症機序

GBSは急性の運動麻痺を主徴とする末梢神経疾患で、四肢筋力低下や深部腱反射の消失を主徴とする。日本では年間2000人の発症が推定されており、重度の後遺症を残す例や十分な治療を施したとしても、患者の5%程度が死亡している (Yuki & Hartung; N. Engl. J. Med., 2012)。これまでの疫学調査によると GBS 患者の少なくとも約30%が *C. jejuni* の先行感染を受けていると推定されている (Allos; Infect. Dis. Clin. North. Am., 1998)。 *C. jejuni* が関与する GBS の発症機序はすべて解明されたわけではないが、本菌のある血清型のリポオリゴ糖 (LOS) の糖鎖と人のガングリオシド糖鎖の分子相同性が確認され、このことが GBS の発症機序を説明するための最も有力な科学的証拠となっている。即ち、ガングリオシド様構造を有する *C. jejuni* の感染によって生じた抗体がガングリオシドに自己抗体として働き、末梢神経組織の病変形成に関与することが示唆されている (Yuki et al.; J. Exp. Med., 1993)。興味深いことに、日本で *C. jejuni* 感染が認められた GBS 患者より分離された菌の血清型を調べると、約80%は HS:19 型によるものであった (Kuroki, et al.; Ann. Neurol., 1993)。しかしながら諸外国ではそのような傾向は見られない。

(3) GBS 患者由来カンピロバクターに関する国内外の研究動向

カンピロバクターが関与する GBS の発症機序を糖鎖構造の相同性の観点から提唱したのは日本人研究者 (結城博士) であり、GBS 患者の病態解析や GBS の動物モデルの開発を先駆的に行っている (Yuki et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004)。一方、海外では菌のゲノム情報を活用し、シアル酸の生合成や糖鎖への転移に関する遺伝子解析が行われている。現在、 *C. jejuni* の LOS 合成に関連する遺伝子群 (LOS オペロン) の解析から、LOS オペロンのタイピングが提唱され、A~S 型に分類されている (Gilbert et al.; J. Clin. Microbiol., 2008)。さらに、GBS 患者由来株の LOS オペロンの構成遺伝子群の特徴をベースにしたリスク因子が提唱されている (Koga et al.; J. Infect. Dis., 2006)。しかしながら、これらの解析は、人から分離された菌株に限定されており、動物や環境由来の菌株での解析は行われておらず、自然界における分布状況は不明のままである。

2. 研究の目的

家畜、家禽、野生動物、食品等から広く菌株を収集し、GBS 患者由来 *C. jejuni* 株に特徴的な LOS 糖鎖と遺伝子をベースとして、Penner 血清型、LOS 型及び MLST 型を決定し、GBS のリスク因子となる LOS に発現するガングリオシド様糖鎖構造を分子生物学的、生化学的に解析すると共に、菌体の抗ガングリオシド抗体の産生能力を動物実験で評価し、GBS 発症能力を有する菌株のリスク因子の解明と自然界での分布状況を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株

供試した鶏肉及び動物由来 *C. jejuni* 株は、国内市販鶏肉(119株)、宮崎県内で飼育されているブロイラー(93株)、地鶏(76株)、牛(74株)の362株で、これに県内の下痢患者由来94株を加えた。さらに対照として、GBS 患者由来12菌株と血清型が HS19 の下痢患者由来株を10株供試した。

(2) Penner 血清型の決定

市販の血清型別キット (受身血球凝集反応) により、菌体の耐熱性抗原を指標とした血清型を決定した。

(3) LOS 型の決定

Godschalk らの方法(Godschalk et al; J. clin. Invest. 2004)に準じ、LOS オペロン内に存在するシアル酸転移酵素をコードする *cstII* または *cstIII* 遺伝子の有無と、その他の遺伝子の組み合わせにより、PCR 法によって A~S の型別を行った。

(4) MLST 型の決定

Multi Locus Sequencing Typing (MLST) 法(Maiden, M. C., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 3140-3145, 1998)による分離菌株のゲノムタイピングを行った。7つのハウスキーピング遺伝子領域 (*aspA*, *glnA*, *gltA*, *glyA*, *pgm*, *tkt*, *uncA*) のそれぞれ 400 塩基程度の配列を決定し、菌株ごとに複数遺伝子の配列の差異をパターン化して、それらを統合遺伝子解析ソフトにより総合的に解析した。

(5) *cstII* 遺伝子多型の検査

LOS オペロンにある *cst* 遺伝子の 51 番目のコドンがアスパラギンであるかスレオニンであるかによって、LOS に付加されるシアル酸の数や位置が変わるという報告がある(Gilbert et al.; J. Biol. Chem., 2002)。51 番目のコドンがスレオニンであると、LOS 糖鎖にガングリオシド GM1 または GD1a に類似した構造が発現され、アスパラギンであると、ガングリオシド GT1a または GT1c に類似した構造が発現される。供試菌株の *cstII* 遺伝子の塩基配列を決定し、51 番目のコドンを決定した。

(6) シアル酸合成関連遺伝子の検出

LOS オペロン内には、シアル酸の生合成に関連する遺伝子である *cgtA*, *cgtB*, *cstII*, *cstIII*, *neuA*, *neuB1*, *neuC1* が、動物由来株や環境・食品由来株にこれらの遺伝子がコードされているか、PCR 法によって決定した。

(7) 菌体 LOS からのシアル酸の検出

LOS 糖鎖にシアル酸が発現しているかを確認するため、菌体から LOS をホットフェノール・ウォーター法により精製し、高速液体クロマトグラフィー・質量分析装置 (LC/MSD/MS) によりシアル酸のスペクトルを確認した。

(8) 菌体 LOS の精製とガングリオシド GM1 様エピトープの検出

コレラ毒素の B サブユニットのレセプターがガングリオシド GM1 であることを利用して、ペルオキシダーゼ標識コレラ毒素の B サブユニットを用い、ニトロセルロース膜上に固定した LOS 糖鎖と酵素標識コレラ毒素の B サブユニットを反応させ、発色基質による発色の有無によりガングリオシド GM1 様エピトープの発現を確認した。

(9) GM1 エピトープを有する動物由来カンピロバクター株の動物実験における免疫応答

菌体から精製した LOS 糖鎖にガングリオシド GM1 エピトープが発現していれば、免疫動物に抗 GM1 抗体が産生されるはずである。高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS/MS) やコレラ毒素 B サブユニットのリガンドが GM1 であることを利用した結合試験により、シアル酸を含む GM1 エピトープを持つ株と持たない株を決定し、それぞれを Balb/c マウスに接種し、血中の抗 GM1 抗体を定量的に測定した。

4 . 研究成果

(1) 供試株の血清型の分布

供試した鶏肉及び動物由来 362 株は、22 の血清型に分類された。最も高頻度に検出されたのは、HS:4-complex で、続いて HS:2 及び HS:37 であった。日本で GBS 患者から最も高頻度に検出される HS:19 型は、プロイラーと牛から 8 株 (2.2%) が分離された。

(2) LOS 型および MLST 型の分布

LOS 合成関連遺伝子オペロンの型別を調べたところ、プロイラー、牛及び下痢患者由来株ではクラス B が、国内市販鶏肉と地鶏ではクラス E が最も優勢で、GBS 由来株に優勢なクラス A は、家畜由来株で 9 株 (2.3%) と低かった。MLST 型別では、鶏肉及び動物由来 362 株は、18 の clonal complexes (CCs) に分類され、最も優勢な CCs は CC-353 で、続いて CC-464、CC-21、CC-607 であった。一方、下痢患者由来株で優勢だったのは CC-21 で、GBS 由来株では CC-22 だった。

(3) *cstII* 遺伝子多型

cst- 遺伝子の 51 番目のコドンを調べたところ、菌株の由来や LOS 型との間に関連性は認められなかった。21

(4) シアル酸合成関連遺伝子の検出

cstII, *cgtA*, *cgtB*, and *neuB1* 遺伝子は、プロイラー及び牛由来株で検出率が有意に高く、*neuC1* 遺伝子は牛由来株で最も高い検出率を示した。鶏肉及び動物由来株におけるこれらの各遺伝子

の検出率は、GBS 由来株での検出率とほぼ同じであった。

(5) 菌体 LOS からのシアル酸の検出

供試した 54 株のうち 35 株の LOS からシアル酸が検出された。シアル酸の生成に関連する遺伝子からなる LOS オペロンを保有する菌株 33 株のうち 32 株からシアル酸が検出されたが、LOS オペロンを保有しない 3 株からもシアル酸が検出された。

(6) 菌体 LOS の精製とガングリオシド GM1 様エпитオプの検出

コレラ毒素 B サブユニットと LOS との結合試験を行ったところ、LOS クラス別で ABC に属する菌株は 33 株中 32 株が結合し、ABC に属さない株では 21 株中 3 株のみ結合した。また、シアル酸の検出結果と一致しないものが 4 株認められた。

(7) GM1 エピトプを有する動物由来カンピロバクター株の動物実験における免疫応答

コレラ毒素 B サブユニット結合試験で陽性と陰性を示した株をマウスに免疫し、抗 GM1 及び抗 GD1 抗体を測定した結果、LOS クラス別で ABC に属する菌株で免疫したマウス血清からは全て抗 GM1 抗体が検出されたが、ABC に属さない株では、LOS からシアル酸が検出された株であっても抗 GM1 抗体は検出されなかった。一方、抗 GD1 抗体は、LOS クラス別で ABC に属する GBS 由来及び鶏肉由来の各 1 株の免疫血清から検出された。

以上の結果から、日本国内で鶏肉及び牛、鶏から分路された *C. jejuni* 株は、GBS 発症に関連するリスクファクターを保有している事が明らかにされた。さらに、国内の GBS 患者から高頻度で分離される血清型 HS:19 に属する菌株は、由来に関わらず遺伝的に均一なポピュレーションであることが示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件 : 査読有)

1. Latt, K. M., Urata, A., Shinki, T., Sasaki, S., Taniguchi, T., Misawa, N. Effect of morphological changes in feather follicles of chicken carcasses after defeathering and chilling on the degree of skin contamination by *Campylobacter* species. *J. Vet. Med. Sci.* (2018) 80 (1):49-54 doi: 10.1292/jvms.
2. Yamazaki, W., Uemura, R., Sekiguchi, S., Dong, J.-B., Watanabe, S., Kirino, Y., Mekata, H., Nonaka, N., Norimine, J., Sueyoshi, M., Goto, Y., Horii, Y., Kurogi, M., Yoshino, S., Misawa, N. *Campylobacter* and *Salmonella* are prevalent in broiler farms in Kyushu, Japan: results of a 2-year distribution and circulation dynamics audit. *J. Appl. Microbiol.*, (2016) 120, 1711-1722.

[学会発表] (計 5 件)

1. 三澤 尚明, 平成 30 年度全国食肉衛生検査所協議会近畿ブロック会議および技術研修会. カンピロバクターのリスクプロファイルについて. 2018 年 10 月 (京都)
2. 三澤 尚明, 第 15 回食の安全と安心フォーラム. カンピロバクター食中毒のリスク低減に立ちはだかる課題. 2018 年 7 月 (東京)
3. 三澤尚明, カンピロバクター食中毒とその対策 肉の生食にひそむ危険 . 第 45 回宮崎県食品衛生推進大会. 2017 年 11 月 (宮崎)
4. 三澤 尚明, カンピロバクター食中毒とその制御 . 第 160 回日本獣医学会学術集会・食肉シンポジウム . 2017 年 9 月 (鹿児島)
5. 谷口喬子, Latt, K. M., 三澤尚明, 由来の異なる *Campylobacter jejuni* の好気耐性能の比較. 第 160 回日本獣医学会学術集会. 2017 年 9 月 (鹿児島)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況（計 0 件）

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。