

令和 6 年 5 月 2 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05921

研究課題名（和文）カンピロバクターの鶏皮膚に対する付着因子の探索とその生物学的意義の解明

研究課題名（英文）Research on adhesion factors of *Campylobacter* to chicken skin and their biological significance

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・特別教授

研究者番号：20229678

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：食中毒菌である *Campylobacter jejuni* の保菌鶏が処理場に搬入されると、食鳥が菌に汚染される。そこで、鶏皮膚に対する *C. jejuni* の付着因子の検出を試みた。*C. jejuni* の莢膜（kpsM）、リン脂質（pldA）、鞭毛（flaAB）の発現に関与する遺伝子欠損株の付着性を比較したところ、莢膜欠損株の皮膚への付着菌数が野生株および鞭毛欠損株に比べ有意に減少した。さらに、野生株の精製莢膜を皮膚上皮に添加した後、野生株の付着性を調べると、添加した莢膜の濃度に依存して野生株の付着性は減少した。よって、*C. jejuni* の莢膜が鶏皮膚の付着因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンピロバクターの鶏肉に対する汚染機序として、皮膚と菌体外膜の構成因子間の特異的な付着機序の存在に着目した研究はない。なぜ鶏肉が本菌によって高率に汚染されているかを新たな視点で解明する点が本研究課題の学術的独自性と創造性を有する研究テーマである。さらに、本菌と食鳥と体皮膚の付着機序が明らかにされ、皮膚への付着を制御する技術開発に繋がれば、食鳥処理場のカンピロバクター汚染の低減が期待できる。特に、殺菌剤を用いないカンピロバクターの新たな制御法に繋がる可能性を有している。より安全な食鳥肉の生産に貢献し、ひいてはヒトにおけるカンピロバクター食中毒のリスク低減への寄与が期待できる。

研究成果の概要（英文）：When chickens carrying the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni* are brought into a processing plant, the chickens are contaminated with the bacteria. This research project aims to elucidate non-protein attachment factors on the bacterial side involved in the adhesion of *C. jejuni* to the chicken skin. We compared the adhesion of *C. jejuni* strains deficient in capsules (kpsM), phospholipids (pldA), and flagella (flaAB). The number of bacteria adhering to the skin of the capsular-deficient strain (kpsM- and pldA-) was significantly lower than that of the wild-type strain and non-flagellated mutant. Furthermore, when the adherence of the wild strain was examined after the capsules of the wild strain were applied to the skin, the adherence of the wild strain decreased in a concentration-dependent manner. Thus, it was suggested that the capsules of *C. jejuni* are an adhesion factor for chicken skin.

研究分野：獣医公衆衛生学

キーワード：カンピロバクター 鶏肉 付着因子 食中毒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

食中毒を起こすカンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) は、家畜や家禽などの消化管に生息し、ヒトへは菌に汚染された食品や飲料水を介して感染する。厚生労働省の食中毒統計によると、カンピロバクター食中毒は 2003 年以降、国内での細菌性食中毒発生病数が第一位となっており、その防除法の確立は喫緊の課題である。本食中毒における患者の喫食調査及び施設等の疫学調査結果から、原因食品として重要視されるのは鶏肉とその関連食品で、鶏レバー、ささみなどの刺身、鶏肉のタタキなどの生または加熱不足の調理品が多く認められる。近年、国民の食生活様式の変化に伴い、食鳥肉の生食が一般的に広く普及したことが本食中毒の増加要因と考えられる。

多くのブロイラー鶏は腸管、特に盲腸内に糞便 1g 当たり 10 万～10 億のカンピロバクターを保菌しており、保菌した食鳥が処理場に搬入されると、処理場内では容易に交差汚染が起こる。研究代表者らが実施した調査では、脱羽処理後にと体皮膚から高い菌数のカンピロバクターを分離した。脱羽処理によると体の物理的な圧迫により総排泄腔から腸内容物が漏出し、と体表面に菌が付着したためと考えられた。カンピロバクターが一度鶏皮膚に付着すると、以降の処理工程では汚染菌の排除は困難である。研究代表者らは、食鳥と体皮膚上皮をアルカリ処理すると本菌の皮膚への付着能が低下することを観察した。また、皮膚上皮面を 0.1 M 水酸化ナトリウムで処理した抽出液(皮膚アルカリ抽出画分)に本菌と結合する複数の付着因子の存在を確認し、LC/MS/MS を用いて鶏血清アルブミン (CSA) をはじめとする 5 種類の蛋白質を同定した。さらに *C. jejuni* の外膜蛋白(OMP)画分から、CSA と結合する主要外膜蛋白(PorA) と鞭毛構成蛋白(FliG)を同定した。この成果により、ブロイラーの皮膚アルカリ抽出画分と *C. jejuni* OMP には、特異的に結合する複数の付着因子の存在が確認された。しかしながら、*C. jejuni* の菌体表面に発現するのは、外膜蛋白の他に莢膜やバイオフィーム等の蛋白以外の多糖体や、リン脂質等がある。これらが鶏皮膚の付着因子あるいは付着に影響を与える因子であるかは判明していない。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、カンピロバクターと鶏と体皮膚の付着に関与する、菌体側の非蛋白の付着因子を特定し、これまでに同定した菌体蛋白も含めた皮膚との付着機序とその生物学的意義を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) カンピロバクターの莢膜、リン脂質欠損株の作製

供試菌株は、遺伝子改変技術が確立している *C. jejuni* 81-176 株を用いて研究を進めた。カンピロバクターの外膜に発現する非蛋白の構造物は、莢膜およびリポオリゴ糖 (LOS) である。また、リン脂質は LOS と莢膜を橋渡ししていることが報告されている。遺伝子改変技術を用いた莢膜欠損株の作出は確立されているので、本研究課題では莢膜に焦点を当て、野生株と莢膜欠損株の鶏皮膚に対する付着能を比較した。そして莢膜が付着因子としての機能を有するか評価した。これらの変異株に加え、鞭毛欠損変異株 (*flaA*, *flaB*) を作製し、ブロイラー皮膚への付着性を比較した

#### 2) 食鳥と体皮膚に対する生菌の付着試験

ブロイラーの中抜きと体の背部から 25cm<sup>2</sup> の皮膚を採取し、直径 3cm の円筒の底部に貼りつけて固定した。10<sup>3</sup> cfu/ml に調整した野生株または変異株の菌液 3ml を皮膚表面に添加して 30 分間静置し、その後滅菌 PBS で洗浄し、鶏皮膚に付着した菌数を平板希釈法または最確数

(MPN)法より定量的に測定した。

### 3) 莢膜の鶏皮膚に対する結合性の確認試験

*C. jejuni* 野生株から莢膜を精製し、濃度の異なる莢膜を鶏の皮膚上皮に添加した後に、野生株の皮膚への付着性を調べた。

### 4. 研究成果

変異株のうち、莢膜を欠失した *kpsM* 変異株と *pldA* 変異株の皮膚への付着菌数が野生株およびその他の変異株に比ベ有意に減少した(図1)。一方、*kpsM* および *pldA* 変異株にノックアウトした遺伝子の相補試験を試みたが、遺伝子を補完できなかった。そこで、野生株から莢膜を精製し、得られた莢膜を鶏の皮膚上皮に添加した後に、野生株の皮膚への付着性を調べた。その結果、添加する莢膜の濃度に依存して、野生株の皮膚への付着性は減少した。

以上の結果から、*C. jejuni* の莢膜が鶏皮膚に対する付着因子であることが示唆された。

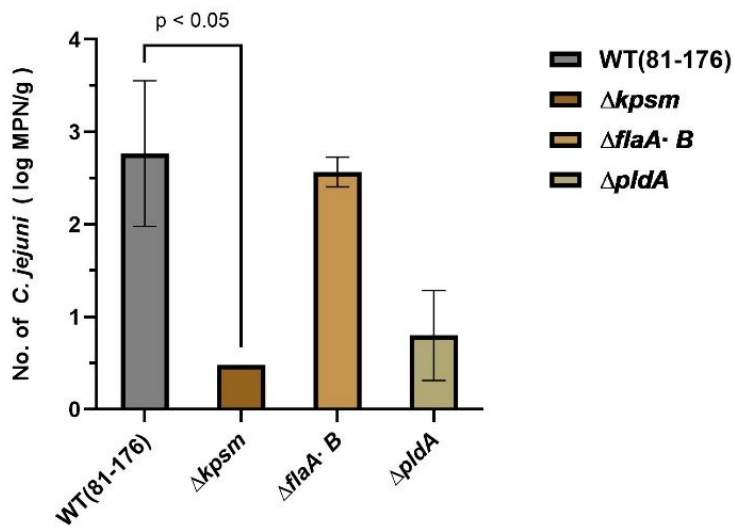


図1 *Campylobacter jejuni* の野生株と変異株の鶏皮膚に対する付着性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Elmonir Walid, Vetchapitak Torrung, Amano Tomoko, Taniguchi Takako, Misawa Naoaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Survival capability of Campylobacter upsaliensis under environmental stresses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13104-022-05919-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Vetchapitak Torrung, Rana Mohammad Shohel, Sasaki Satomi, Taniguchi Takako, Sugiyama Susumu, Soejima Junichiro, Luangtongkum Taradon, Yamaguchi Yuya, Misawa Naoaki	4. 巻 125
2. 論文標題 A new disinfectant technique for Campylobacter jejuni and spoilage bacteria on chicken skin using a high-pressure pulsed jet spray apparatus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Control	6. 最初と最後の頁 107989 - 107989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.foodcont.2021.107989	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Naoaki Misawa, Pongsawat Pornsawan, Torrung Yamaguch, Taradon Luangtongkum
2. 発表標題 New Technologies to Decontaminate Foodborne Pathogens on Chicken Carcasses
3. 学会等名 Chulalongkorn University Veterinary Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------