

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870869

研究課題名(和文) 鶏腸管におけるカンピロバクター感染動態のゆらぎに関する研究

研究課題名(英文) Study on the dynamics of chicken intestinal responses following *Campylobacter* infection

研究代表者

朝倉 宏 (ASAKURA, Hiroshi)

国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部第一室・室長

研究者番号：40370936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：C. jejuni感染に伴う鶏盲腸内菌叢変動として、感染群では非感染群に比べFaecalibacterium属の占有率増加を認めた。感染群・非感染群共に、血中Tregの数的比率は日齢間で著変を認めなかったが、偽好酸球の盲腸集簇は感染初期に増加した。鶏マクロファージ様細胞HD-11細胞内で本菌は48時間以上生残したが、ヒトやマウス由来マクロファージ様細胞に比べ顕著に低い傾向を示した。HD-11細胞はC. jejuni感染に伴い速やかなNO産生を示し上記形質との関連性が示唆された。本菌感染に対するHD-11細胞の遺伝子発現応答として、TLR2/4/9遺伝子群の発現亢進が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study examined dynamics of microbiota in chicken caecum upon *C. jejuni* infection. Clostridia was mostly dominant at 2 weeks-age chickens, and *C. jejuni* infected birds exhibited spatiotemporal increase in the yields of *Faecalibacterium* spp. The qPCR and FISH approaches then verified this genetic dynamics. Infiltration of Heterophiles toward caecum were significantly increased at early course of *C. jejuni* infection. Corroborating, chicken macrophage-like cell line HD-11 exhibited increased NO responses upon *C. jejuni* infection. *C. jejuni* also stimulated expression of several inflammatory-related genes such as TLR2/4/9.

研究分野：獣医公衆衛生学

キーワード：Campylobacter jejuni Chicken microbiota

### 1. 研究開始当初の背景

カンピロバクター感染症は、世界的に現在最も注視される食品媒介性細菌感染症である。本症は、汚染鶏肉の喫食を介した事例が最も多いため、養鶏農場における制御策の構築が最も根源的とされる。

ヒトや動物の腸管内には、多種多様な細菌叢が分布し、Cjを含む病原細菌の感染・定着を正負両面で変動させる。こうした菌叢動態は宿主免疫応答とも深く相互作用を示す。ニワトリ腸管内には多岐にわたる粘膜免疫応答機構が介在しているが、その恒常性維持には腸内細菌叢が重要な役割を担うとされる。飼料摂取と腸内細菌叢構築が開始される生後4-7日齢には盲腸内でIL-8等の炎症性サイトカイン産生が活性化される。その後、生後約2週齢迄は移行抗体による液性免疫を通じてCj感染に一定の抵抗性を示すが、生後2~3週齢をピークとしてCj感染感受性を急激に亢進させる。その後、換羽を迎える生後4週齢以降は再び同感受性を鈍化させる。こうした発育期によるCj感染感受性変化は、宿主免疫動態がCj感染性と深くかかわることを示している。これまで、Cj感染と腸管粘膜免疫の間の相互作用については、ヒト・ニワトリ宿主間でのCj感染に伴う病態発現の差異を中心に検討されてきた。すなわち、二宿主間での病態の差は、Cj感染に伴う腸管上皮細胞のIL-8産生及び付随する粘膜組織への偽好酸球遊走と病理組織学的に高い相関性を示し、偽好酸球の $\beta$ -defensin (gallinacin-6)分泌に波及する。より近年では、Cj感受性の異なる2系統の鶏群間では、制御性T細胞(Treg)活性が免疫学的差異として特徴づけられる。末梢血やリンパ節に少数分布するTregはIL-8等の炎症性サイトカインの分泌を抑制的に制御するため、Cjのニワトリ感染・定

着過程における初発性の宿主免疫制御を担うと想定された。

### 2. 研究の目的

ヒト・カンピロバクター感染症は主に汚染鶏肉の喫食を介して成立するため、鶏宿主における本菌汚染制御はヒト感染予防に資する根源的な対策と目される。しかしながら、本菌が顕す同宿主内での感染動態に関しては未だ十分な知見が累積されていない。本研究では、カンピロバクター感染に伴い、鶏宿主内での顕著な変動が想定される腸内細菌叢及び腸管免疫応答の動態に着目し、同宿主の発育過程或いは本菌感染に伴うこれら要素の相互作用を包括的に捉えることで、鶏宿主におけるカンピロバクターの感染と持続定着に係る分子基盤を理解することを目的とする。本研究により得られる学術的知見は、感染動態の”ゆらぎ”に関する基礎理解を深めると共に、鶏における本菌汚染制御手法の開発評価を通じて、ヒトへの感染予防へと波及することが期待される。

### 3. 研究の方法

本研究では発育鶏卵を導入し、Cj感染群・非感染群に区分後、発育期毎に腸管内容をサンプリングし、16S rRNA pyrosequencing法により、発育過程・Cj感染に伴う腸内細菌叢構成動態を把握した。またこれらの要因に伴う腸管免疫動態を捉えるため、各個体より末梢血及び腸管組織を採取し、前者からは制御性T細胞活性と炎症性サイトカイン定量、後者からは偽好酸球のCj感染部位集簇等を評価した。更に制御性T細胞と偽好酸球について、遺伝子発現プロファイル・細胞内リン酸化シグナル動態を把握し、当該細胞の応答機序に係る分子基盤の解明

を行う。これらの基礎知見を統合的に踏まえた上で、Cj・腸内細菌叢・腸内免疫の3要因側から想定されるCj 定着制御に資する応用的手法の評価を行い、鶏宿主でのCj 感染動態を裏付ける相互作用の包括的分子解明を行うこととした。

#### 4 . 研究成果

鶏生体を用いた感染実験を行い、16S rRNA pyrosequencing 法を用いて腸内細菌叢の感染に伴う変動に着目した比較解析を実施した。供試鶏雛（2週令）では、*Clostridia*の優勢が認められたが、生育につれて感染群では非感染群に比べて、*Faecalibacterium*属の占有率増加を示した。盲腸内容における本属菌の占有率増加については、定量PCR法及びFISH法により確認することができた。感染群および非感染群間において、血中のCD4+/CD25+細胞の数的比率は6週令を除き、日齢間で著変が認められなかった。一方、盲腸内壁における偽好酸球の集簇性は、感染群において感染初期に増加を認めた。鶏マクロファージ様細胞であるHD - 11細胞を用いた感染実験を通じ、本菌は48時間以上生残したが、同数値はヒト或いはマウス由来マクロファージ様細胞（THP-1 , J774等）に比べ、顕著に低く、また細胞生残時間も低い傾向を示した。HD-11細胞は*C. jejuni*感染に伴い、極めて速やかなNO産生を示し、当該形質との関連性が示唆された。*C. jejuni*感染に対するHD-11細胞の遺伝子発現応答として、TLR2/4/9 遺伝子群の発現亢進が明らかとなった。

#### 5 . 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Momose Y, Asakura H, Kitamura M, Okada Y, Ueda Y, Hanabara Y, Sakamoto T,

Matsumura T, Iwaki M, Kato H, Shibayama K, Igimi S. (2014) Food-borne botulism in Japan in March 2012. *Int J Infect Dis.* 24: 20-2.  
Shyaka A, Kusumoto A, Asakura H, Kawamoto K. (2015) Whole-genome sequences of eight *Campylobacter jejuni* isolates from wild birds. *Genome Announc.* 3(2): e00315-15.  
Masuda K, Yamamoto S, Kubota K, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S, Asakura H. (2015) Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture. *J Food Safety.* 35(4): 458-465.  
Pascoe B, Meric G, Murray S, Yahara K, Mageiros L, Bowen R, Jones NH, Jeeves RE, Lappin-Scott HM, Asakura H, Sheppard SK. (2015) Enhanced biofilm formation and multi-host transmission evolved in divergent genetic backgrounds in *Campylobacter jejuni*. *Environ Microbiol.* 17: 4779-4789.  
Asakura H, Kawamoto K, Murakami S, Tachibana M, Kurazono H, Makino S, Yamamoto S, Igimi S. (2016) *Ex vivo* proteomics of *Campylobacter jejuni* 81-176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut. *Res Microbiol.* 167: 63-71.  
Asakura H, Tachibana M, Taguchi M, Hiroi T, Kurazono H, Makino S, Kasuga F, Igimi S. (2016) Seasonal and growth-dependent dynamics of bacterial community in radish sprouts. *J Food Safety.* In press.

〔学会発表〕(計 4 件)

朝倉宏、橘理人、廣井豊子、川本恵子、

倉園久生、山本茂貴、五十君静信 . 農場におけるカンピロバクター・ジェジュニの地理・時系列別汚染分布の変動 . 第 88 回日本細菌学会学術総会 . 2015 年 3 月 , 岐阜 .  
五十君静信、朝倉宏 . なかなか減らないカンピロバクター食中毒 . 第 88 回日本細菌学会学術総会 2015 年 3 月 , 岐阜 .  
木村浩紀、蓮沼愛弓、山谷郁子、朝倉宏、村上覚史 . 鶏盲腸内での時系列的 *Campylobacter jejuni* の定着動態と盲腸菌叢変動要因の探索に関する検討 第 8 回日本カンピロバクター研究会総会 . 2015 年 12 月 , 京都 .  
Asakura H, Kawamoto K, Tachibana M, Murakami S, Kurazono H, Igimi S. *Campylobacter FabG* affects fatty acid composition to alter growth fitness in chicken gut. 第 89 回日本細菌学会学術総会 . 2016 年 3 月 , 大阪 .

〔図書〕(計 2 件)

Pascoe B, Kappin-Scott H, Sheppard SK, Asakura H. A chapter of “ Does biofilm formation aid colonization and infection in *Campylobacter*? ” in a book of “ *Campylobacter* Ecology and Evolution ” .

Tachibana M, Asakura H, Watarai M. (2016) A chapter of “ Widespread distribution of *Legionella pneumophila* in aquatic environments ” in a book of “ Advances in Medicine and Biology. Vol 97 ” . Nova Science Publishers. In press.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

朝倉 宏 ( ASAKURA, Hiroshi )  
国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・室長  
研究者番号 : 40370936

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし