

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24760431

研究課題名(和文) 環境水中のカンピロバクター存在実態とギラン・バレー症候群に関連する抗原構造の解明

研究課題名(英文) Occurrence of Campylobacter in water environment and structure analysis of Campylobacter antigen associated with Guillain-Barré syndrome

研究代表者

浅田 安廣 (Asada, Yasuhiro)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60610524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：水道原水となる河川水に対してCampylobacter jejuni濃度を調査し、次に環境水中C. jejuniに対してGBS発症に関連するリポオリゴ糖(LOS)構造の保有状況を把握した。

河川水中C. jejuni濃度は0.011～1.5 MPN/Lの濃度範囲で変動し、夏季、冬季に高い濃度上昇が見られた。河川水中C. jejuni分離菌株のLOSに対して、LC-MS/MS(リニアイオントラップ型)を用いて、GBS発症に関連するシアル酸含有LOSの存在を確認した。その結果、シアル酸含有LOSを保有している菌株が確認され、これらをGBS発症関連菌株であると推定した。

研究成果の概要(英文)：The numbers of Campylobacter jejuni in water source were measured. C. jejuni in water source contains 0.011-1.5 MPN/L and is frequently abundant in summer and winter. Next, C. jejuni associated with GBS in water source was surveyed. The presence of sialic acid on C. jejuni lipooligosaccharide (LOS) is considered a risk factor for developing GBS. The LOS extracts of isolated C. jejuni were analyzed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). C. jejuni with sialylated LOS was regarded as the C. jejuni associated with GBS. Some C. jejuni strains isolated from water source had sialylated LOS. These C. jejuni strains were considered as C. jejuni associated with GBS.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木環境システム

キーワード：健康関連微生物 上水道工学 リスク評価 カンピロバクター ギラン・バレー症候群 リポオリゴ糖
シアル酸

1. 研究開始当初の背景

消毒副生成物による健康影響問題や水道水の異臭味による水道離れの問題を解決するために、残留塩素濃度を最小化した次世代型水道システムに関する検討が進められているが、残留塩素濃度の低減は微生物リスクの増大に直結してしまう。そのため、微生物リスク管理の高度化が必要となり、病原微生物が引き起こす健康影響に基づいた微生物リスクの指標として障害調整生存年数 (Disability Adjusted Life Years: DALYs) が新たに着目されている。

Campylobacter jejuni は水系感染症において主要な原因菌の一つである。そのため塩素注入量を低減した水道システムでは、*C. jejuni* 感染リスクが上がるのが懸念される。*Campylobacter* 感染症は下痢症を引き起こすのみでなく、続発症としてギラン・バレー症候群 (GBS) や反応性関節炎を引き起こすことが知られている。そして、DALYs を用いることで下痢症のみならず続発症までの健康影響を統合的に評価可能である。しかし、DALYs を用いて対象病原微生物に対する健康影響を評価する場合、様々な不確実性因子が存在している。そのため、DALYs を評価するためには、不確実性を小さくし、より精度の高い評価を行っていく必要がある。

Campylobacter 感染症の DALYs 評価において、不確実性が高い因子として GBS 発症率が報告されている。GBS 発症には、*C. jejuni* の血清型やリポオリゴ糖 (LOS) 構造が大きく関わっている。しかし、*C. jejuni* 血清型および LOS 構造は株ごとに異なっており、多くの種類が存在する。その中で特に日本は、GBS 患者から分離した *C. jejuni* の血清型で O19 型が多く検出されている。また *C. jejuni* の LOS 構造は、糖脂質の一種であるガングリオシドの糖部分に類似した構造を持つ株が存在しており、GBS 発症に大きく関わっている。そしてこれらの特性をもつ *C. jejuni* を曝露するか否かで、GBS 発症率が変化し、それに伴い DALYs 評価が変動すると考えられる。そのため、水道原水である環境水中における *C. jejuni* の血清型や LOS 構造分布を把握することが *C. jejuni* 感染による DALYs の評価において必要不可欠なステップである。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえて、本研究では環境水中 *C. jejuni* 菌株の血清型及び GBS 発症に関連する LOS 構造の保有状況を把握し、GBS 発症リスクの有無を明らかにすることを目的とする。

本研究では、今まで皆無であった環境水中の *C. jejuni* に関する定量および定性データを取得するために、環境水中の *C. jejuni* 定量及び分離を行う。そして、河川水から分離した *C. jejuni* 菌株に対して GBS に関連する血清型を調査すると同時に、液体クロマトグラ

フ・タンデム質量分析計 (LC-MS/MS (リニアイオントラップ型)) を用いた糖鎖構造解析を行い、GBS 発症に関連する LOS を保有する菌株の存在を確認した。

3. 研究の方法

(1) *Campylobacter jejuni* の定量

調査対象として、*C. jejuni* 汚染源の一つである下水処理水 (A 下水処理場) とその放流先の河川水を選定した。なお検水の接種量は、下水処理水の場合、0.1 mL ~ 1 L の 5 段階とし、河川水は試料 3 L を 30 本分 (90 L) とした。10 mL 以上の試料については滅菌した孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターを用いて加圧ろ過を行った後、Bolton 培地 (OXOID) に浸けて、37 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間微好気培養を行った。24 時間培養後、培養液 2 mL を Preston 培地 (OXOID) 10 mL に添加し、42 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間微好気培養した。増菌培養後に培養液 1 mL を DNA 抽出し、*C. jejuni* に特異的な *mapA* 遺伝子のプライマーを用いて PCR により *C. jejuni* の検出を行い、MPN 法により最確数を求めた (MPN-PCR 法)。

(2) *Campylobacter jejuni* の分離

C. jejuni の分離方法として、免疫磁気ビーズによる分離方法とメンブレンフィルターによる分離方法を検討した。

免疫磁気ビーズによる分離方法では、まず増菌培養液を 1 mL 採り、洗菌・集菌した後 PBS (pH 7.4、塩濃度 0.88%) 1 mL を用いて再懸濁した。次に作成した免疫磁気ビーズを濃度が 1.2×10^7 Beads/mL になるように添加し、サンプルミキサーを用いて回転数 15 rpm で混和させながら室温で 1 時間反応させた。免疫磁気ビーズ反応後、PBS で 5 回洗浄し、200 μL の PBS で再懸濁した。このサンプルを CCDA 寒天培地 (Oxoid) に塗布し、42 $^{\circ}\text{C}$ で 48 時間、微好気培養した。

メンブレンフィルター分離方法では、CCDA 寒天培地上に乗せたニトロセルロースメンブレンフィルター (孔径 0.45 μm 、Whatman) に培養液 200 μL を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間培養した。培養後、メンブレンフィルターを取り除き、そのまま 42 $^{\circ}\text{C}$ で 48 時間、微好気培養した。

両分離方法とともに、CCDA 寒天培地に分離されたコロニーから疑わしい集落を全て釣菌し、PBS (pH 7.4) に懸濁した後、CCDA 寒天培地 2 枚に同量添加した。1 枚ずつ好気条件、微好気条件で 42 $^{\circ}\text{C}$ 、48 時間培養し、微好気条件のみで生えたコロニーに対して DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出した。以降の PCR による *C. jejuni* 判定操作は定量方法と同様である。

(3) *Campylobacter jejuni* 分離菌株の血清型調査

C. jejuni 分離菌株を 5% ヒツジ脱繊維血液 (コスモバイオ) を含有したコロンビア血液寒天培地 (BD) を用いて、37 $^{\circ}\text{C}$ で 48 時間培養し、

形成したコロニーを全て回収し、血清型判定に供した。市販のカンピロバクター免疫血清（デンカ生研）のプロトコルに従い、分離菌株の Penner 血清型を判定した。

(4) LC-MS/MS による *Campylobacter jejuni* 菌株に対するシアル酸含有 LOS の保有実態把握

河川水から分離した *C. jejuni* 菌株をニュートリエント No.2 培地(OXOID)で増菌培養し、温水-フェノール法で LOS を抽出した。次に LC-MS/MS を用いて、プレカーサーイオンスキャンを行い、シアル酸を持つ可能性がある構造を示すシグナルを抽出した。シアル酸のシグナルは、ネガティブモードで $m/z=290$ に出現することが確認されていることから、プレカーサーイオンスキャンでは $m/z=290$ のフラグメントイオンをターゲットイオンと設定した。得られたシグナルに対して、プロダクトイオンスキャンを行い、得られたプロダクトイオンのスペクトル情報から、シアル酸含有 LOS を保有する *C. jejuni* 菌株を推定した。そしてそれらの菌株を GBS 発症関連菌株として判定し、GBS 発症関連菌株の存在を把握した。

4. 研究成果

河川水、下水処理水の *C. jejuni* 定量結果は、河川水では、0.011~1.5 MPN/L の濃度範囲で変動し、8月、12月に高い濃度上昇が見られた。一方、下水処理水では 7.4~1.2×10⁴ MPN/L の濃度範囲で変動し、特に7~8月と冬季に 10⁴ MPN/L を越える濃度上昇が見られた。今回のサンプリング地点は、下水処理水放流口から距離があまりないことから、温度による影響で *C. jejuni* が死滅あるいは VBNC 状態まで至らなかった可能性が高い。そのため、夏季に他の時期と比較して高濃度の *C. jejuni* を含む下水処理水が放流されることが影響して、河川水の *C. jejuni* 濃度が上昇している可能性がある。

続いて、下水処理水からの *C. jejuni* 分離結果を表1に示す。各分離方法を比較すると、下水処理水に関しては免疫磁気ビーズによる分離とメンブレンフィルターによる分離ともに有効であることが示された。しかし、*C. jejuni* 濃度が高いケースにおいても免疫磁気ビーズによる分離が困難である状況が見られた。その原因として夾雑細菌に対する *C. jejuni* の存在比が小さくなった可能性が考えられる。PCR により *C. jejuni* を検出する場合は、ある程度夾雑細菌を抑制し、十分に *C. jejuni* を増殖させれば検出可能となる。しかし、分離に関しては免疫磁気ビーズにポリクローナル抗体を用いていることから、今回作製した免疫磁気ビーズに非特異的に結合可能な細菌が結合した場合に、寒天培地上で *C. jejuni* のコロニー形成を抑えて、夾雑細菌のコロニーを形成してしまう危険性がある。

二段階増菌培養では、最初に回復培養とし

表 1 下水処理水に対する各分離方法の *C. jejuni* 分離状況

採水回	免疫磁気ビーズ	メンブレンフィルター	<i>C. jejuni</i> (MPN/L)
1回目	○	×	>2.4×10 ³
2回目	○	○	1.1×10 ⁴
3回目	○	○	93
4回目	×	○	36
5回目	○	○	2.4×10 ²
6回目	×	○	24
7回目	×	○	1.2×10 ²
8回目	○	○	1.1×10 ⁴

表 2 河川水に対する各分離方法の *C. jejuni* 分離状況

採水回	免疫磁気ビーズ	メンブレンフィルター	<i>C. jejuni</i> (MPN/L)
1回目	×	○	0.75
2回目	×	×	3.6×10 ⁻²
3回目	×	○	0.15
4回目	×	×	<3.0×10 ⁻²
5回目	×	○	1.1×10 ⁻²

てボルトン培地による培養を組み込んで行うことから、ボルトン培地の培養で死滅せず増殖してしまった夾雑細菌が、プレストン培地でも死滅することができず、免疫磁気ビーズに結合している可能性が挙げられる。

桂川河川水からの *C. jejuni* 分離結果を表2に示す。この結果から河川水においては免疫磁気ビーズでの *C. jejuni* 分離ができず、メンブレンフィルターによる分離のみが有用であることが示された。

河川水自体は一つのフィルターに対して 3 L あるいは 3.5 L のサンプルをろ過していることから、初期の段階でかなりの量の夾雑細菌が存在していると予想できる。そのため、免疫磁気ビーズに結合してしまう夾雑細菌を抑制できなかった可能性が高い。一方で、メンブレンフィルターによる分離に関しては安定的に分離可能であることから、河川水といったような *C. jejuni* の存在量が少なく損傷菌として存在している割合が高い環境水から *C. jejuni* を分離する際は、メンブレンフィルターによる分離が有用であると言える。

分離した *C. jejuni* 菌株の Penner 血清型の調査結果を表3に示す。血清型調査を行った *C. jejuni* 菌株は、河川水から分離した 76 株である。血清型調査の結果から D 群(HS:4、

表 3 *C. jejuni* 分離菌株に対する血清型調査結果

血清型	河川水	
	分離数 n=76	出現頻度 全7回
D	5(6.6)	2
J	13(17.1)	4
L	4(5.3)	1
U	1(1.3)	1
Y	5(6.6)	1
Z4	1(1.3)	1
UT	33(43.4)	3
D,J	11(14.5)	4
D,L	3(3.9)	1

注：0内は、分離菌株数全体に対する割合(%)

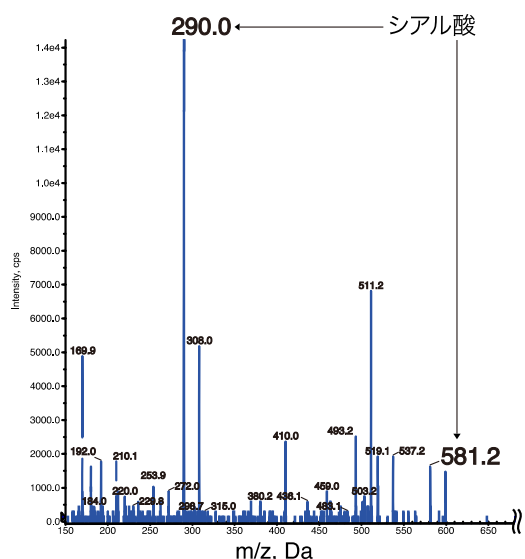


図1 m/z=599 のプロダクトイオンスキャン結果

13、16、43、50 型) と J 群(HS:11 型) の複合型をもつ菌株が高い頻度で確認され、UT 群に関しても多く存在することが確認できた。しかし、偏りなど特徴ある傾向は確認できなかった。

最後に河川水から分離した *C. jejuni* 分離菌株全 76 株に対して、LC-MS/MS による LOS の構造分析を行った。

m/z=290 をターゲットとしたプレカーサーイオンスキャンによりシアル酸含有 LOS の有無を調べた結果、m/z=599、696 の 2 つのシグナルが確認され、これらのシグナルが確認できた菌株は合計で 9 株あった。続いて m/z=599、696 に対して、プロダクトイオンスキャンを行い、LOS 構造推定を試みた。ここでは、m/z=696 のシグナルに対するプロダクトイオンスキャン結果でシアル酸のシグナルが確認できなかったため、m/z=599 のプロダクトイオンスキャンを行った結果のみを図 1 に示す。

m/z=599 のシグナルに対するプロダクトイオンスキャン結果では m/z=290 のシグナルが存在し、シアル酸の存在が確認された。また、m/z=290 以外にシアル酸に関連する可能性があるシグナルとして m/z=581 が確認された。m/z=581 は、シアル酸が二個結合している構造を示すシグナルであることが確認されている。そのため、検討している菌株の LOS にはシアル酸が 2 個結合した構造を含んでいる可能性が考えられる。以上から、m/z=599 のシグナルをシアル酸含有 LOS 構造のシグナルと判断した。そして、m/z=599 のシグナルが確認できた 9 株全てで、プロダクトイオンスキャンにより m/z=290 あるいは 581、図 1 に示した主要ピークが確認できた。そのため、これらの菌株は全て同様の構造を保有していると判断した。

本研究で確認されたシグナルはシアル酸を 2 個含んでいることから、LC-MS/MS によ

る LOS 構造分析では、GD3、GT1a 様構造をベースとしたコア糖鎖構造が検出した可能性が考えられ、これらを GBS 発症関連菌株であると推定した。以上から、河川水を水道原水とした場合、*C. jejuni* による GBS 発症のリスクが存在すると判断した。

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 2 件)

浅田安麿, 大河内由美子, 伊藤禎彦: 環境水中の *Campylobacter jejuni* 存在実態解明に向けた分離および定量手法の確立, 環境衛生工学研究, Vol.26, No.3, pp.144-147, 2012. 査読なし

浅田安麿, 大河内由美子, 越後信哉, 伊藤禎彦: 糖鎖構造解析に基づいた河川水中 *Campylobacter jejuni* のシアル酸含有リポオリゴ糖保有実態, 環境衛生工学研究, Vol.27, No.3, pp.208-211, 2013. 査読なし

〔学会発表〕(計 6 件)

浅田安麿, 大河内由美子, 伊藤禎彦: 環境水中に存在する *Campylobacter jejuni* に対する分離方法の探索ならびに血清型調査, 第 5 回日本カンピロバクター研究会, 2012 年 11 月 30 日-12 月 1 日, 大阪府立りんくうキャンパス.

浅田安麿, 大河内由美子, 伊藤禎彦: 環境水中に存在する *Campylobacter jejuni* の定量における増菌培養法の比較, 第 47 回日本水環境学会年会, 2013 年 3 月 11-13 日, 大阪工業大学大宮キャンパス.

Asada, Y., Ohkouchi, Y. and Itoh, S.: Investigation of methods for isolation and quantitation of *Campylobacter jejuni* in water environment, 22th KKN symposium, 2013 年 7 月 2-3 日, 韓国・ソウル.

Asada, Y., Ohkouchi, Y., Matudate, K., Echigo, S. and Itoh, S.: Structure Analysis of *Campylobacter jejuni* Lipooligosaccharide Associated with Guillain-Barre Syndrome in Source Water For Estimating Disability Adjusted Life Years, The 17th International Symposium on Health-Related Water Microbiology, 2013 年 9 月 15-20 日, ブラジル・フロリアノポリス.

浅田安麿, 大河内由美子, 松館圭太, 伊藤禎彦: 障害調整生存年数推定を目的とした河川水中 *Campylobacter jejuni* の実態調査, 2013 年 11 月 9-10 日, 琉球大学.

浅田安麿, 大河内由美子, 越後信哉, 伊藤禎彦: 河川水中 *Campylobacter jejuni* に対するギラン・バレー症候群発症関連菌株の推定, 2013 年 11 月 19-21 日, 北海道大学.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浅田 安廣 (Yasuhiro ASADA)

京都大学大学院 工学研究科 助教

研究者番号 : 60610524