

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：27103

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850093

研究課題名(和文) *C. jejuni* の損傷，VNC化および回復に関する基礎研究研究課題名(英文) Studies on injury, viable but non-culturable state, and recovery of *Campylobacter jejuni*

研究代表者

小林 弘司 (KOBAYASHI, Hiroshi)

福岡女子大学・文理学部・講師

研究者番号：00610255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：*Campylobacter jejuni* の加熱損傷および損傷からの回復に検討を行った。増菌培養した *C. jejuni* 菌体を PBS 10 mL 中に OD₆₆₀ = 0.1 となるように懸濁し、種々の温度および時間加熱し、種々の培地に塗抹し生菌数を測定した結果、50℃、5分間の加熱処理により菌体の99.1%が損傷を受けることを明らかにした。また、この損傷は培地にピルビン酸を添加することにより回復することも明らかとなった。また、損傷からの回復時には、*trxC*、*recA*、*Fur* および *ahpC* など酸化ストレス関連遺伝子が関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Heat injury and recovery from heat injury of *Campylobacter jejuni* was investigated. Heat injured *C. jejuni* cells were reproducibly generated by heating cell suspension (in PBS) of *C. jejuni* at 50 °C for 5 minutes. Healthy cells retained culturability both on mCCDA and nutrient agar supplemented with 0.3% NaCl (NA). On the other hand, heat injured cells formed colonies only on mCCDA. Heat injured cells recovered cultivability on NA supplemented with 0.25 g/L sodium pyruvate. The results suggested that glycolysis of *C. jejuni* had been damaged by non-lethal heating. And the addition of sodium pyruvate would be important for the reliable detection of *C. jejuni* from foods and environments.

研究分野：食品微生物学

キーワード：*Campylobacter jejuni* heat injury recovery

1. 研究開始当初の背景

Campylobacter jejuni を原因物質とする食中毒は近年急増している。平成 23 年の細菌性食中毒の発生状況を見ると、事件数では総事件数 1062 件のうち 336 件で第 1 位、患者数では 10948 名のうち 2341 名と、サルモネラ属菌 (67 件, 3068 名) に次いで患者数が多い。特に牛レバ刺し、鳥刺しを原因食品とする事例が目立っており、牛レバ刺しは平成 24 年 7 月より提供が禁止されるに至った。しかしながら、今度は、牛以外の生肉 (豚レバ刺し、猪レバ刺しなど) を提供する飲食店が出始めている。豚、猪も牛、鶏同様に腸管が *C. jejuni* に汚染されている可能性は高く、今後も *C. jejuni* による食中毒事件は後を絶たないと懸念されている。

C. jejuni に限らず、食品に付着した細菌は、食品の流通、加工などの過程で様々なストレスを受け損傷していると考えられる。損傷した菌体は、すべてが死滅への一路をたどるのではなく、菌体に適した環境になると一部は回復し、通常の増殖を開始する。すなわち、損傷した菌体が存在する場合、食品検査時には陰性の結果が出て、その後菌体が置かれた条件によっては、回復し食中毒を引き起こす可能性が懸念される。このため、菌体の損傷について知ることは、安全な食品を供給するためには非常に重要となる。これまでに、大腸菌やサルモネラ属菌については、遺伝子の発現や代謝の変化など、体系的な研究がなされてきたが、*C. jejuni* に関しては、低温ストレスに曝されると、その形態が通常のらせん状から球状に変化し VNC 化することが報告されているだけである。新しい殺菌法が開発された場合、新しい種類の損傷を受けた菌体も出現してくると考えられるため、菌体の損傷および回復に関する基礎データの意義は大きい。

2. 研究の目的

本研究では、*C. jejuni* の加熱損傷、VNC 化およびこれらの状態からの回復について、1) 加熱損傷 *C. jejuni* 菌体調製法の確立。2) 加熱損傷 *C. jejuni* 菌体回復法の確立。3) 損傷からの回復中に発現している遺伝子の解析を行い、より確実な *C. jejuni* 検出法の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 加熱損傷菌体の調製法

C. jejuni NCTC 11351 をボルトン増菌培地 (oxid) にて 42、48 時間増菌培養した。この菌体を PBS で洗浄後、OD660 = 0.1 となるように PBS 10 ml に懸濁した。菌懸濁液は、25 で 10 分間保温し非損傷菌体とした。その後、同菌懸濁液を 50、55 または 60 の湯浴にて 5、10 または 15 分間静置した後、再び 25 で 10 分間保温し加熱損傷菌体とし

た。非損傷菌体および加熱損傷菌体は、それぞれ 100 μ l を種々の寒天培地 [mCCDA (oxid), 0.3% 塩化ナトリウム添加 Nutrient agar (NA, oxid), *Campylobacter* agar base (oxid), および Blood agar base (oxid)] に塗抹し、42 にて 48 時間後に生じたコロニー数を計測し、加熱前後での生菌数の変化を評価した。

(2) 加熱損傷 *C. jejuni* 菌体の回復法の確立

OD660 = 0.1 に調製した *C. jejuni* 菌懸濁液 (PBS 10 ml) を 50 にて 5 分間加熱処理 (再現よく加熱損傷 *C. jejuni* 菌体を調製できた条件) を行なった後、mCCDA, NA, および 0.3% NaCl 添加 NA に、さらに 0.25 g/L ビルビン酸ナトリウム添加 NA (pNA) に塗抹し、42 にて 48 時間培養後の生菌数を測定し、損傷からの回復を評価した。

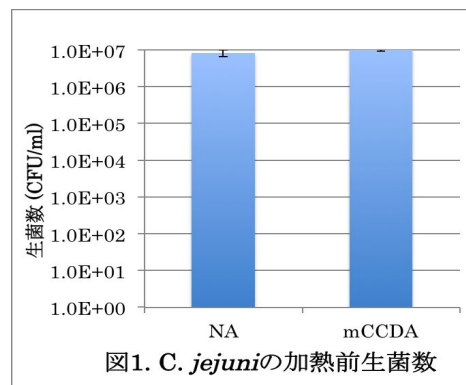
(3) 損傷からの回復に関連する遺伝子の解析

申請者が以前の研究で明らかにした *Salmonella* 属菌の加熱損傷からの回復時に発現が増加していた 19 種の熱ショックタンパク質関連遺伝子 (*clpB*, *clpX*, *degP*, *dnaJ*, *fkpA*, *ftsJ*, *gapA*, *hflB*, *hslJ*, *hslU*, *hslV*, *htpG*, *htrA*, *lon*, *mopA*, *mopB*, *mreB*, *rpoE* and *ppiD*) および 12 種の酸化ストレスにより誘導される遺伝子 (*ahpC*, *ahpF*, *fldB*, *Fur*, *grxA*, *dinF*, *katG*, *mutM*, *recA*, *soxR*, *trxC* and *zwf*) について、*C. jejuni* ゲノムとの相同性を BLAST 検索し、RT-PCR で解析するための遺伝子の候補を絞った。

4. 研究成果

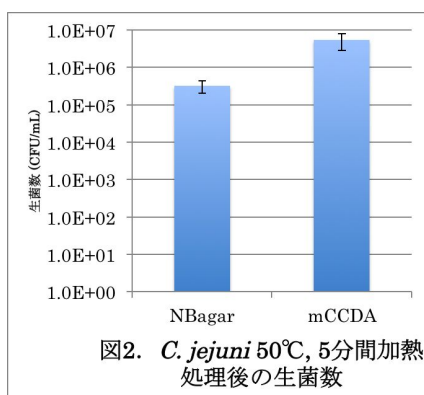
(1) 加熱損傷菌体の調製

C. jejuni OD660 = 0.1 懸濁液の加熱処理前生菌数は、どの培地でも $1.0 (\pm 0.3) \times 10^7$ CFU/mL であった (図 1)。一方、50、5 分間



の加熱処理を行なった場合、選択剤添加 mCCDA での生菌数は $7.0 (\pm 0.3) \times 10^6$ CFU/ml であったが、0.3% NaCl 添加 NA でのコロニー数は、 6.8×10^5 CFU/mL と mCCDA でのコロニー数と比べ、有意に低かった (図 2)。このことから、*C. jejuni* は加熱損傷により mCCDA ではコロニーを形成できるが、0.3% NaCl 添加 NA ではコロニーを形成できなくなる生理状

態になると考えられた。mCCDAには健常菌体と損傷菌体がコロニーを形成し、0.3%NaCl添加NAには健常菌体のみがコロニーを形成すると仮定した場合、今回の加熱処理により、懸濁液中の99.1%の菌体が損傷菌体になることが明らかとなった。Campylobacter agar



base, および Blood agar base 上では、損傷菌体の遊走が激しくコロニー数を計測することが不可能であった。

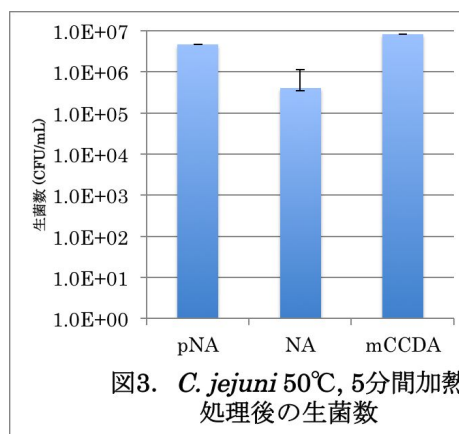
また、50℃, 5分間の加熱処理により調製した損傷菌体について、BaLight bacterial cell viability kit (invitrogen) を用いて菌体の膜透過性、Bacstain CTC rapid staining kit (Dojindo) を用いて菌体の呼吸活性、Bacstain CFDA solution (Dojindo) を用いて菌体内エステラーゼ活性の変化を蛍光顕微鏡観察した結果、損傷菌体の膜透過性、呼吸活性およびエステラーゼ活性は加熱と前と比較して低下していないことが確認された。このため、これらの指標を用いても回復可能な損傷菌体の評価はできないことを明らかにした。

50℃, 5分間より厳しい加熱処理を行なうと、*C. jejuni* のコロニー形成能はどの培地でも著しく低下し、また、損傷率よりも死滅した菌体の割合が多かったため、50℃, 5分間の加熱処理を損傷菌調製の最適条件とした。また、加熱処理中の菌懸濁液の温度変化を測定した結果、今回の処理条件での温度変化は5℃/分であり、菌懸濁液は2分間程度、培養温度より高温に曝されていたこともわかった。

(2) 加熱損傷 *C. jejuni* 菌体の回復法の確立

mCCDAと0.3%NaCl添加NAの培地成分を比較した結果、mCCDA培地のみに含まれる成分として、ピルビン酸ナトリウム (0.25g/L)、デソキシコレート (1.0 g/L)、細菌用炭素 (4 g/L)、硫酸第一鉄 (0.25 g/L) があつた。このなかで、ピルビン酸ナトリウムは、糖代謝の中間体として重要であるため、加熱損傷 *C. jejuni* の回復にも重要であると考えられた。加熱損傷菌体を、pNAに、同様に塗抹し生菌数を測定した結果、生菌数は 6.9×10^6 CFU/mL となり、ピルビン酸添加しない同培地と比べ、生菌数は10倍増加し

た(図3)。このことから、加熱損傷を受けた *C. jejuni* は、特に解糖系関連酵素に障害を受けることが示唆された。



(3) 損傷からの回復に関連する遺伝子の解析
BLASTによる相同性検索の結果、*Salmonella* 酸化ストレス関連遺伝子である、*trxC*, *recA*, *Fur*, および *ahpC* と相同性の高い領域をゲノム配列から見いだした。これらの遺伝子の発現量を調べることにより、損傷からの回復機構が明らかになると期待された。

損傷菌体の生理状態を研究する際に重要なことは、いかに再現よく損傷菌体を調製することができるかである。また、損傷菌体の割合が多くても同時に死菌体を多く生み出すストレス条件では、遺伝子の発現を解析する際に死菌体由来のDNAが夾雑物として存在するため、正確に損傷菌体の遺伝子発現を解析することは難しい。本研究にて決定した50℃, 5分間の加熱処理では、*C. jejuni* は加熱処理により10%程度死滅するが、生存した菌体の99.1%は損傷しているため、最適なストレス条件であると考えられる。また、損傷菌体を含む菌懸濁液の生菌数測定においては、培地中のピルビン酸の有無で生菌数が大きく異なることから、通常のカンピロバクター検査においてもピルビン酸含有の培地を使用することの重要性が確認することができた。今後は、加熱損傷の回復に関与する *trxC*, *recA*, *Fur* および *ahpC* などのストレス関連遺伝子の発現を解析し、さらに、これら遺伝子の発現が誘導される培養条件を検索することにより、より確実な *C. jejuni* の検査法が確立されると期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

発表予定 1 件: 小林弘司, 須田杏子, 岡田朋恵 カンピロバクター・ジェジュニの加熱損傷に関する基礎研究 第 36 回 日本食品微生物学会学術総会 (2015 年 11 月, 川崎市教育文化会館)

〔図書〕(計 0 件)

〔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:
出願年月日:
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

小林 弘司 (Hiroshi KOBAYASHI)
福岡女子大学・国際文理学部・講師
研究者番号: 00610255

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: