

研究課題名 (研究項目名)	<i>Campylobacter jejuni</i> における未解明な環境適応機構に対する新しいアプローチの確立（課題番号：JPCAFSC20222205） （(4)鶏肉中のカンピロバクターのリスク評価手法に関する研究①VBNC(Viable But Non Culturable)状態、環境ストレスへの抵抗性等の菌の環境適応機構に関する知見）
主任研究者	研究者名：山本 章治 所属機関：国立感染症研究所

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

令和4年度～令和5年度（2年間）

2 研究目的

カンピロバクター (*Campylobacter jejuni/coli*) は主要な食中毒起因菌であり、本菌に感染後、稀にギラン・バレー症候群 (GBS) を引き起こす。そのゲノムが解読されて以降、病原性や環境適応のメカニズムについて急速に研究が進められてきたが、未解明な問題も数多く残されている。このうち phase variation (PV) と viable but non-culturable (VBNC) は潜在的な感染リスク因子として挙げられているものの、方法論的に困難なために研究が進んでいない。

カンピロバクターのゲノムは超可変リピート配列 polyG/C が挿入された遺伝子 (PV 遺伝子) を多数コードしている。PolyG/C での複製エラーによるスリッページによって ORF のずれが可逆的に起こり、蛋白質が発現する phase (ON) と発現しない phase (OFF) を交互に生じる (図1)。PV による多様性はゲノムあたりの PV 遺伝子数 (n) が増えるにつれて増大し、理論的には 2^n 通りの ON/OFF の組み合わせ (PV 型) がつくられる。カンピロバクターは宿主内外での様々な環境に迅速に適応するために、PV によって莫大な多様性を常に獲得し続けていると考えられる。しかしながら、PV による表現型の不安定性や組み合わせ論的な複雑性がリスク評価を困難にしている。本研究では PV を安定的に解析するための系を確立し、動物モデルを用いて PV のリスクを顕在化する (図 1)。*C. jejuni* はゲノムあたり 18～39 個の PV 遺伝子を保有しており、その大部分が表層抗原の修飾遺伝子に分布している。PV は表層構造を巧みに変化させ、宿主免疫系からの回避および宿主内外の多様な環境への適応に重要な役割を担っていると考えられているが、現在知られている PV 型は *C. jejuni* が潜在的に生み出すことができる莫大な数の型のうちごく僅かである。本研究は今まで潜んでいた PV のリスクを炙り出すために必要である。*C. jejuni* の鶏腸管定着における PV の役割を検証することにより、本菌による鶏肉汚染を低減するための新しい手がかりが得られる可能性がある。また、マウスの腸炎モデルを用いた解析は、PV に起因する感染リスクについて理解するために重要であり、それに付随した細菌学的特性を明らかにすることによって、食品に潜むリスクを低減するための知見が得られるものと期待される。

VBNC 状態の菌は通常の培養法では増殖を停止しているが、環境条件を整えば増殖を再開するため、食品衛生的に問題である。通常カンピロバクターを VBNC 化するためには様々なストレス下に長時間暴露することが必要だが、本菌を数十分間高圧処理するだけで VBNC 状態に移行することが示唆されている。本研究では、1) 高圧化による簡易的 VBNC 化法の確立、2) 高圧殺菌における感染リスクの残存性の検証、3) VBNC から増殖型への復帰法の確立とリスク評価系への応用を試みる。高圧処理は加熱処理に比べて食品の変性が少ないため、菌汚染を低減する上で有用であると考えられる。しかしながら、カンピロバクターは高圧処理によ

って VBNC 化する恐れがあるため、そのリスクを評価することは重要であり、本殺菌技術の実用化に向けた有益な知見となる。また、VBNC 状態からの復帰法を確立し、食品に潜む菌を従来よりも高頻度に検出することが可能になれば、カンピロバクターのリスク評価の精度が高まるものと期待される。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
Phase variation (PV) の全ゲノム解析系の確立と動物モデルにおけるライブラリースクリーニングおよびPV型の解析	全ゲノムPVを固定した菌集団からなるライブラリーの作製とその評価系の確立	山本 章治 (国立感染症研究所)
	<i>In vitro</i> における全ゲノムPV解析系の概念実証	山本 章治 (国立感染症研究所)
	鶏を用いた感染実験の条件検討	岡村 雅史 (帯広畜産大学)
	鶏を用いたライブラリースクリーニングの実施	岡村 雅史 (帯広畜産大学)
	マウスを用いた感染実験の条件検討	三戸部 治郎 (杏林大学)
	マウスを用いたライブラリースクリーニングの実施	三戸部 治郎 (杏林大学)
	鶏もしくはマウスへの適応能を付与するPV型の解析	山本 章治 (国立感染症研究所)
	鶏とマウスへの適応を担う遺伝子の同定とそのリスク評価	山本 章治 (国立感染症研究所)、岡村 雅史 (帯広畜産大学)、三戸部 治郎 (杏林大学)
	感染リスクが高いバリエーションのストレス感受性の検証	山本 章治 (国立感染症研究所)
高圧処理による VBNC 化機構とその感染リスクの解析、VBNC 状態からの復帰処理法の確立とその応用	VBNC誘発高圧処理条件の検討	河原井 武人 (日本大学)
	既知ストレス処理VBNC化との比較解析	河原井 武人 (日本大学)
	<i>C. jejuni</i> における普遍性の検証	河原井 武人 (日本大学)
	高圧処理によるVBNC化に関わる遺伝子の同定	河原井 武人 (日本大学)
	高圧処理による <i>C. jejuni</i> の感染リスクへの影響	河原井 武人 (日本大学)
	復帰処理が市販鶏肉からのカンピロバクター検出頻度に及ぼす影響	河原井 武人 (日本大学)

4 倫理面への配慮について

人権擁護上の配慮、不利益・危険性を生じる研究は含まれない。動物実験については該当機関（帯広畜産大学、杏林大学）にて倫理審査を受け、承認済みである。

II 研究内容及び成果等

1 研究項目

研究項目1: Phase variation (PV) の全ゲノム解析系の確立と動物モデルにおけるライブラリースクリーニングおよび PV 型の解析

1) 個別課題: 全ゲノム PV を固定した菌集団からなるライブラリーの作製とその評価系の確立 (山本 章治 (国立感染症研究所)、協力者: 李 謙一 (国立感染症研究所))

[研究内容・方法]

① ライブラリーの作製

主任研究者らが確立したゲノム編集法“MuGENT-SSR” (Multiplex Genome Editing by Natural Transformation against Simple Sequence Repeats, *mBio* 2021 e0140121) を用いて腸炎患者由来の *C. jejuni* 株 81-176 と NCTC11168 のゲノムにコードされた全ての PV 遺伝子 (それぞれ 15 個と 23 個) についてランダムに ON もしくは OFF のどちらかの phase に固定し、多様でかつ安定な菌集団からなるライブラリーを作製する (図 1)。なお、NCTC11168 の PV 遺伝子の一つである *11168_PV3* は ClpX プロテアーゼサブユニットをコードしており、42°C での生育に必須であることから (*Appl Environ Microbiol* 2007 73: 7803-7813)、常に ON の phase に固定された。MuGENT-SSR は co-transformation と呼ばれる DNA 取り込み能を利用したマルチプレックスゲノム編集法であり、基本的には selected DNA (PV 遺伝子以外の部位に薬剤耐性遺伝子を導入するための DNA) と unselected DNA (複数の PV 遺伝子に変異を導入するための DNA セット) を用いる。これらの DNA を BHI broth で培養した菌 (A600 = 約 0.15) と混合して取り込ませた後に selected DNA のマーカー薬剤 (カナマイシンもしくはクロラムフェニコール) を含む mCCDA 選択培地で選択した場合、耐性が獲得されると同時に unselected DNA にコードされた変異が高い効率で導入される。各 PV 遺伝子の phase を ON もしくは OFF のどちらかに固定する目的で、unselected DNA には polyG/C のスリッページを阻害する変異を付与する (polyG の例: GGG GGG GGG → GGC GGA GGG (locked_ON 変異) もしくは GGA GGC GG (locked_OFF 変異)) (図 1)。まず、フラジェリン遺伝子 *flaA* を標的とする selected DNA とともに、locked_OFF 変異を有する unselected DNA のセット (81-176 では 15 種類、NCTC11168 では *11168_PV3* を除く 22 種類) を用いてゲノム上に存在する PV 遺伝子の phase を全て OFF に固定する。次に、locked_ON 変異をもつ unselected DNA のセット (locked_OFF 変異の unselected DNA と同数) を用いて OFF に固定済みの PV 遺伝子をランダムに ON に改変する。この操作を繰り返すことによって全 PV 遺伝子の ON/OFF phase の組み合わせ型 (PV 型) の多様性を増加させる。理論的には、81-176 では最大 2^{15} 通り、NCTC11168 では最大 2^{22} 通りの PV 型をもつバリエーションがつけられることになる。

② ライブラリーの評価系の確立

まず、全 PV 遺伝子に導入された locked_ON 変異と locked_OFF 変異のシーケンスリード数の比 (ON/OFF 比) を算出するために、李 謙一 (国立感染症研究所) とともに BLAST ベースのプログラム“Camp_PV_Finder”を構築する。次に、MuGENT-SSR によって得られた 20,000~30,000 個のコロニーを含む懸濁液からゲノム DNA を抽出し、シーケンスを行う。Camp_PV_Finder を用いてシーケンスデータを基に全 PV 遺伝子の ON/OFF 比を算出する。ON/OFF 比が 1 に近いほど ON と OFF の個体が同数存在することになり、多様性が高い。その一方で、ON/OFF 比が ∞ に近いほど ON の個体が優勢に、逆に ON/OFF 比が 0 に近いほど OFF の個体が優勢になると考えられる。本解析から得られるデータを“phasevariome”と呼び、各遺伝子の ON/OFF 比が 1 に近いものをライブラリーに採用する。なお、MuGENT-SSR を行なった直後のライブラリー候補は selected DNA にコードされた薬剤耐性遺伝子によって *flaA* が破壊されており、病原性に重要な役割を果たす運動性をもたない。このため、野生型の *flaA* に修復することによって運動性を回復させたものを本研究で用いる。

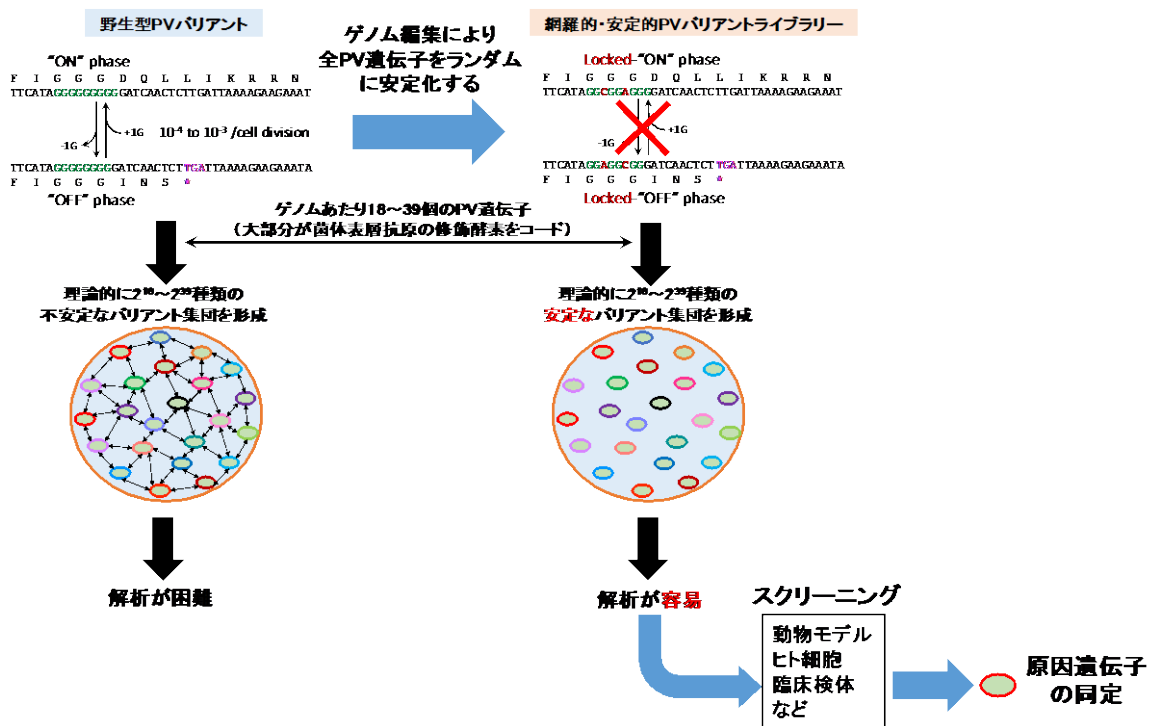


図1:本研究項目の概念図。ゲノム編集法MuGENT-SSRによって全PV遺伝子を固定し、多様でかつ安定なバリエント集団からなるライブラリーを作製する。また、特定の選択圧下で適応性を有するバリエントをライブラリーの中からスクリーニングするとともに、その原因となる遺伝子を明らかにするための全ゲノム解析系を確立し、PVによって隠されたリスクを炙り出す。

[成果]

81-176 においては OFF に固定済みの PV 遺伝子をランダムに ON に改変するサイクルを 5 回行った。Camp_PV_Finder を用いて各回の phasevariome を解析したところ、いずれの遺伝子においても回数を経るたびに ON/OFF 比が変化したものの、変化率にばらつきがあり、3 回目で早くも 1 近くになる遺伝子もあれば、5 回目でも 0.3 を下回る遺伝子もあった(図 2)。研究期間の制約を考慮して 5 回目の菌集団をライブラリー“81-176PL”として採用した(約 20,000 個のバリエントを含む)。NCTC11168 については当初は 11168_PV3 を除いた PV 遺伝子を全て OFF に固定した株を作製する予定だったが、途中で予想外のゲノム再編成が起こったため中止した。そこで、全遺伝子を一旦 ON に固定した後にランダムに OFF に改変するという、81-176PL の作製時とは逆のアプローチを行った。このサイクルを 5 回行った後に phasevariome を調べたところ、いずれの遺伝子においても回数を経るたびに ON/OFF 比が変化したものの、変化率にばらつきがあり、5 回目で 0.3 を下回る遺伝子や 1 を超える遺伝子が多数みられた(図 3)。研究期間の制約を考慮して 5 回目の菌集団をライブラリー“NCTC11168PL”とした(約 30,000 個のバリエントを含む)。なお、81-176PL と NCTC11168PL を分担研究者に輸送する場合は Amies transport medium(rmbio)に懸濁した。

PV遺伝子	ゲノム編集の各サイクルにおけるON/OFF比					
	0	1	2	3	4	5
81176_PV1	0	0.10	0.12	0.17	0.23	0.27
81176_PV2	0	0.20	0.30	0.34	0.40	0.44
81176_PV3	0	0.08	0.12	0.16	0.13	0.27
81176_PV4	0	0.17	0.18	0.25	0.33	0.38
81176_PV5	0	0.09	0.15	0.17	0.21	0.32
81176_PV6	0	0.24	0.31	0.91	1.01	1.50
81176_PV7	0	0.11	0.10	0.12	0.19	0.35
81176_PV8	0	0.20	0.21	0.29	0.55	0.41
81176_PV9	0	0.14	0.19	0.34	0.40	0.52
81176_PV10	0	0.06	0.12	0.15	0.26	0.23
81176_PV11	0	0.15	0.14	0.69	0.62	1.08
81176_PV12	0	0.05	0.02	0.07	0.15	0.23
81176_PV13	0	0.33	0.48	0.74	1.97	0.93
81176_PV14	0	0.27	0.32	0.51	0.53	0.31
81176_PV15	0	0.08	0.10	0.56	0.36	0.91

図2:81-176のライブラリー作製過程におけるphasevariome。

PV遺伝子	ゲノム編集の各サイクルにおけるON/OFF比					
	0	1	2	3	4	5
11168_PV1	∞	43.58	14.92	10.37	0.19	0.15
11168_PV2	∞	32.80	12.71	13.40	5.05	2.35
11168_PV3	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON
11168_PV4	∞	44.56	1.26	1.22	0.41	0.16
11168_PV5	∞	66.13	26.18	4.51	1.24	3.95
11168_PV6	∞	35.60	13.78	2.37	4.96	3.12
11168_PV7	∞	17.33	4.96	4.98	6.69	3.29
11168_PV8	∞	58.67	25.00	267.00	6.69	4.55
11168_PV9	∞	26.89	37.79	27.29	11.33	4.17
11168_PV10	∞	19.39	25.77	13.81	2.05	2.73
11168_PV11	∞	26.53	32.57	7.24	0.82	0.19
11168_PV12	∞	11.82	4.28	9.58	5.13	2.86
11168_PV13	∞	20.00	14.97	62.00	4.00	5.62
11168_PV14	∞	23.30	8.68	14.43	5.64	2.93
11168_PV15	∞	26.53	36.64	28.31	27.88	3.74
11168_PV16	∞	39.73	13.94	14.63	0.71	0.21
11168_PV17	∞	23.81	6.12	3.74	4.66	4.83
11168_PV18	∞	50.70	12.97	23.92	11.67	2.33
11168_PV19	∞	13.16	14.57	3.11	9.92	3.28
11168_PV20	∞	17.89	16.96	11.83	6.06	1.26
11168_PV21	∞	24.65	20.54	40.47	6.19	5.06
11168_PV22	∞	28.35	21.62	25.89	11.22	2.12
11168_PV23	∞	13.00	21.73	17.10	1.34	2.73

図3:NCTC11168のライブラリー作製過程におけるphasevariome。11168_PV3のみONのphaseに固定された。

[考察及び今後の課題]

理想的なライブラリーの条件としては、全 PV 遺伝子の ON/OFF 比が 1 になることであるが、現実的には一定しておらず、短期間で理想型に近づけるには難しいことがわかった。原因としては個々の unselected DNA の取り込みや組換えにおける効率の違いが考えられるため、初回から MuGENT-SSR 後の phasevariome をモニターしつつ、それに応じて次回の条件を微調整 (個々の unselected DNA の濃度や MuGENT-SSR の回数の変更) することが必要であろう。

2) 個別課題: *In vitro* における全ゲノム PV 解析系の概念実証(山本 章治(国立感染症研究所)、協力者: 窪村 亜希子(国立感染症研究所))

[研究内容・方法]

特定の選択圧に対して抵抗性をもつバリエントをスクリーニングし、得られたバリエントの PV 型を解析するま

での一連の過程、すなわち全ゲノム PV 解析系の概念を実証するために、*in vitro* の選択圧下において検証を行なった。*C. jejuni* はヒト血清や抗菌ペプチドに対する耐性を有しており、これには菌体表層抗原(莢膜多糖 CPS (capsular polysaccharide) やリポオリゴ糖 LOS (lipooligosaccharide) 等)が重要な役割を担う (*Virulence* 2011 2:30-40)。また、ギラン・バレー症候群をはじめとした自己免疫性疾患や下痢を起こすために重要なステップであると考えられている腸管上皮細胞への侵入にも表層抗原の関与が示唆されている (*感染症学雑誌* 2003 77:418-422; *J Microbiol Methods* 2013 95:8-23)。*C. jejuni* の表層抗原は著しい PV によって莫大な構造多様性を形成することから、その潜在的な疾病リスクを明らかにする必要がある。そこで、本研究で作製したライブラリー (81-176PL および NCTC11168PL) の中から、血清に対する耐性をもつバリエント、抗菌ペプチドに対する耐性をもつバリエントおよび細胞侵入性が高いバリエントをスクリーニングし、それぞれの表現型の原因となる遺伝子の同定を試みる。

① ヒト血清耐性を有するバリエントのスクリーニングと原因遺伝子の同定

3×10^8 CFU/mL の 81-176PL もしくは NCTC11168PL の培養液 (input) を 11.25% のヒト補体血清 (Sigma) に 37°C で 60 分間暴露させた後、mCCDA 選択培地に塗抹した。生育したコロニーのうち、1,000~5,000 個をまとめて回収する (output)。Input と output から抽出したゲノム DNA のシーケンスデータを基にして phasevariome を解析する。Output の菌液を血清曝露の input に用いて引き続き同様な操作を繰り返し、各 PV 遺伝子が ON もしくは OFF のどちらかにシフトした特異的な PV 型が出現するようであれば、phase が ON の遺伝子を OFF に固定した変異株を構築し、血清耐性に及ぼす影響を再解析することによって原因遺伝子の同定を試みる。81-176 については、本研究で同定された遺伝子と既報の遺伝子 (*J Bacteriol* 2017 e00027-17) を比較する。

② ヒト抗菌ペプチド耐性を有するバリエントのスクリーニングと原因遺伝子の同定

1×10^8 CFU/mL の 81-176PL もしくは NCTC11168PL の培養液 (input) を 5 μ g/mL のヒト産生性抗菌ペプチド LL-37 (フナコシ) に 37°C で 30 分間暴露させた後、血清耐性バリエントのスクリーニングと同様な手順で生き残った菌を回収し (output)、input と output の phasevariome を解析する。このサイクルを繰り返すにつれて特異的な PV 型が出現するようであれば、phase が ON の遺伝子を OFF に固定した変異株を構築し、LL-37 耐性に及ぼす影響を調べることによって原因遺伝子の同定を試みる。

③ ヒト細胞侵入性が高いバリエントのスクリーニングと原因遺伝子の同定

1×10^6 CFU/mL の 81-176PL もしくは NCTC11168PL の培養液 (input) を 1.5×10^5 個の HeLa 細胞に感染させ、37°C で 2 時間インキュベートする。細胞外に残った菌をゲンタマイシンによって殺菌した後、細胞内に侵入した菌を 0.1% のトリトン X 処理によって抽出し、mCCDA 選択培地に塗抹する。生育したコロニーのうち、1,000~5,000 個をまとめて回収し (output)、上述したスクリーニングの場合と同様に input と output の phasevariome を解析する。このサイクルを繰り返すにつれて特異的な PV 型が出現する場合には、phase が ON の遺伝子を OFF に固定した変異株を構築し、細胞侵入に及ぼす影響を調べることによって原因遺伝子の同定を試みる。なお、細胞侵入性の評価は窪村亜希子 (国立感染症研究所・細菌第一部) の協力を得て行う。

[成果]

① ヒト血清耐性を有するバリエントのスクリーニングと原因遺伝子の同定

血清曝露後の菌の耐性率 (%: $100 \times \text{output の菌数} / \text{input の菌数}$) はサイクル数を経るごとに増加し、81-176PL が曝露 3 回目、NCTC11168PL が曝露 5 回目で最大となった (図 4: それぞれ曝露 1 回目に比べて 33 倍、17 倍に増加した)。この結果より、曝露回数を経るごとに血清という選択圧に対して耐性をもつバリエントが濃縮されていることがうかがえた。

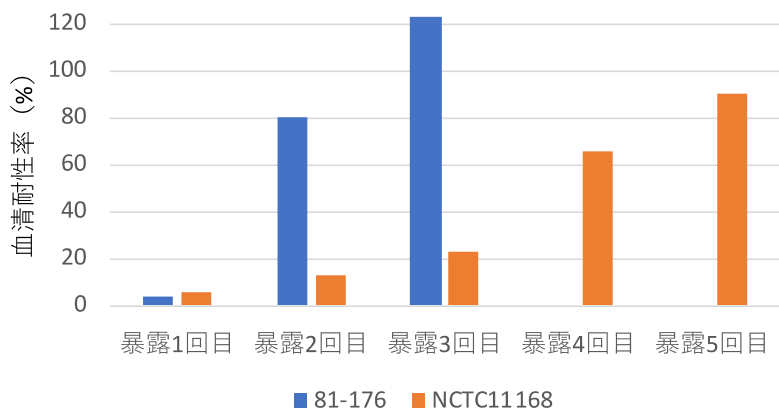


図4:81-176PLおよびNCTC11168PLからのヒト血清に耐性をもつバリエントのスクリーニング。耐性率は、 $100 \times \text{outputの菌数} / \text{inputの菌数} (\%)$ で示した。なお、81-176PLについては4回目以降の暴露を行わなかった。

スクリーニング過程における PV 遺伝子群の phase の変化を phasevariome によってモニターしたところ、最終的に 81-176PL については 15 遺伝子のうち、*81176_PV5*、*81176_PV11*、*81176_PV12*、*81176_PV15* が ON に、*81176_PV13* が OFF にシフトした(図 5)。その一方で NCTC11168PL では 23 遺伝子のほとんどが ON もしくは OFF のどちらかにシフトした(図 6)。81-176PL では暴露 3 回目の output から 10 個のシングルコロニーを単離し、PV 型の決定ならびに血清耐性試験を行った結果、4 種類の PV 型が得られ(171、1211、4263、9397 :PV 型は各 PV 遺伝子の ON(1)もしくは OFF(0) phase の 2 進法表記を 10 進法表記に変換したもの)、このうち 1211 と 9397 は高い耐性を示した(図 7)。

81-176 PV遺伝子	ON/OFF比			
	初回input	output		
		暴露1回目	暴露2回目	暴露3回目
<i>81176_PV1</i>	0.25	0.17	0.12	0.10
<i>81176_PV2</i>	0.32	0.32	0.35	0.42
<i>81176_PV3</i>	0.31	0.39	0.15	0.09
<i>81176_PV4</i>	0.29	0.38	0.12	0.06
<i>81176_PV5</i>	0.30	1.44	6.53	7.98
<i>81176_PV6</i>	0.06	0.17	0.12	0.06
<i>81176_PV7</i>	0.23	0.22	0.10	0.09
<i>81176_PV8</i>	24.13	8.47	15.79	23.63
<i>81176_PV9</i>	0.19	0.38	0.09	0.08
<i>81176_PV10</i>	27.15	7.72	10.94	22.63
<i>81176_PV11</i>	0.06	4.47	24.62	28.04
<i>81176_PV12</i>	0.08	3.21	4.33	2.73
<i>81176_PV13</i>	7.01	0.46	0.34	0.41
<i>81176_PV14</i>	0.36	0.82	1.43	1.49
<i>81176_PV15</i>	0.13	1.92	10.56	56.50

図5:81-176PLからの血清耐性バリエントのスクリーニング過程におけるphasevariome。初回inputのON/OFF比に比べて10倍以上増加した遺伝子と10倍以上低下した遺伝子をそれぞれ橙色と青色で示す。

81-176 の PV 型 9397 をベースにして phase が ON の遺伝子のみを OFF に改変し、血清耐性試験を行ったところ、CPS 生合成遺伝子領域にコードされた *81176_PV11*、*81176_PV13* 及び *81176_PV15* の 3 遺伝子のみが ON phase であれば高い耐性をもつことがわかった(図 7:PV 型 21)。*81176_PV15* は CPS 糖鎖ユニットの特定部位を MeOPN(O-メチルホスホロアミダート)修飾する酵素をコードしており、過去の論文で報告済みの遺伝子と同一であった(*J Bacteriol* 2017 e00027-17)。*81176_PV11* は CPS 糖鎖ユニットのメチル化修飾に関わると推定されるが、詳細は不明である。*81176_PV13* は *C. jejuni* に保存されている遺伝子ではあるものの、機能は明らかにされていない。ただし、PV 型 1211 では *81176_PV13* が OFF phase に固定されているにも関わらず高い血清耐性を示したことから(図 7)、その欠損を補う遺伝子が ON phase に固定された遺伝子の中に存在するものと考えられる。NCTC11168 株についても同様なアプローチによって血清耐性を担う遺伝子の同定を進めている。

NCTC11168 PV遺伝子	ON/OFF比					
	初回input	output				
		暴露1回目	暴露2回目	暴露3回目	暴露4回目	暴露5回目
<i>11168_PV1</i>	0.08	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
<i>11168_PV2</i>	2.29	1.45	5.99	2.18	26.96	612.00
<i>11168_PV3</i>	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON
<i>11168_PV4</i>	0.10	0.38	1.87	1.87	11.83	20.76
<i>11168_PV5</i>	3.05	2.04	0.63	0.30	0.09	0.01
<i>11168_PV6</i>	3.58	3.16	1.27	0.56	0.14	0.05
<i>11168_PV7</i>	3.53	0.97	0.73	0.13	0.13	0.05
<i>11168_PV8</i>	7.78	5.73	15.88	63.00	264.00	∞
<i>11168_PV9</i>	4.82	9.75	6.75	3.83	50.92	∞
<i>11168_PV10</i>	2.51	3.33	3.06	3.72	17.97	72.43
<i>11168_PV11</i>	0.29	0.09	0.18	0.25	0.04	0.02
<i>11168_PV12</i>	3.22	6.27	10.25	74.00	91.88	∞
<i>11168_PV13</i>	7.30	54.73	9.05	∞	85.78	337.00
<i>11168_PV14</i>	3.30	8.43	12.62	59.80	∞	∞
<i>11168_PV15</i>	2.75	8.73	12.84	∞	179.75	∞
<i>11168_PV16</i>	0.27	0.55	2.38	1.76	12.98	23.38
<i>11168_PV17</i>	5.04	8.96	10.95	∞	57.82	∞
<i>11168_PV18</i>	2.66	1.61	0.74	0.33	0.10	0.07
<i>11168_PV19</i>	4.04	27.50	∞	∞	∞	∞
<i>11168_PV20</i>	1.09	0.71	0.32	0.09	0.04	0.02
<i>11168_PV21</i>	5.68	1.19	0.42	0.19	0.10	0.07
<i>11168_PV22</i>	2.04	7.56	9.65	∞	109.33	∞
<i>11168_PV23</i>	2.75	32.53	19.82	∞	241.00	∞

図6:NCTC11168PLからの血清耐性バリエーションのスクリーニング過程における *phasevariome*。初回inputのON/OFF比に比べて10倍以上増加した遺伝子と10倍以上低下した遺伝子をそれぞれ橙色と青色で示す。なお、PV#3は菌の増殖に重要な役割を果たすため、常にONに固定してある。

81-176 PV遺伝子	PV型 (2進法)									
	SC#1	SC#2	SC#3	SC#4	SC#5	SC#6	SC#7	SC#8	SC#9	SC#10
<i>81176_PV1</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>81176_PV2</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>81176_PV3</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>81176_PV4</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>81176_PV5</i>	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>81176_PV6</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>81176_PV7</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>81176_PV8</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>81176_PV9</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>81176_PV10</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>81176_PV11</i>	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>81176_PV12</i>	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
<i>81176_PV13</i>	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>81176_PV14</i>	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
<i>81176_PV15</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PV型 (10進法)	4263	4263	1211	1211	1211	1211	9397	1211	171	9397
血清耐性 (%)	33	57	129	93	115	78	121	72	47	146

図7:81-176における血清耐性バリエーションのPV型の同定。暴露3回目のoutputから10個のシングルコロニー(SC #1~SC#10)を単離し、それらのゲノム配列を基にPV型を決定するとともに、血清耐性試験を行った。各遺伝子のphaseはONを1、OFFを0で表記した2進法で示す。また、PV型は2進法から10進法にも変換された。

81-176 PV遺伝子	PV型 (2進法)					
	SC#7	SC#7_V1	SC#7_V2	SC#7_V3	SC#7_V4	SC#7_V5
81176_PV1	0	0	0	0	0	0
81176_PV2	1	0	0	0	0	0
81176_PV3	0	0	0	0	0	0
81176_PV4	0	0	0	0	0	0
81176_PV5	1	0	0	0	0	0
81176_PV6	0	0	0	0	0	0
81176_PV7	0	0	0	0	0	0
81176_PV8	1	0	0	0	0	0
81176_PV9	0	0	0	0	0	0
81176_PV10	1	0	0	0	0	0
81176_PV11	1	1	0	1	1	0
81176_PV12	0	0	0	0	0	0
81176_PV13	1	1	1	0	1	0
81176_PV14	0	0	0	0	0	0
81176_PV15	1	1	1	1	0	0
PV型 (10進法)	9397	21	5	17	20	0
血清耐性 (%)	121	96	0	0	0	0

図8:81-176における血清耐性に関わる遺伝子の同定。PV型9397(図6のSC#7株)をベースにして様々な変異株を構築し(SC#7_V1~SC#7_V5)、血清耐性試験を行った。

② ヒト抗菌ペプチド耐性を有するバリエーションのスクリーニングと原因遺伝子の同定

81-176PL については LL-37 暴露後の菌の耐性率(%: $100 \times \text{outputの菌数}/\text{inputの菌数}$)がサイクル数を経るごとに増加し、暴露3回目で最大となったが(図9:暴露1回目に比べて37倍に増加)、NCTC11168PL については顕著な増加がみられなかった。この結果より 81-176PL からは LL-37 耐性をもつバリエーションがスクリーニングされたと判断し、解析を進めることにした。なお、 α -ディフェンシン-5 については 81-176PL と NCTC11168PL の両方に対して殺菌作用を示さなかったため、以降の解析を中止した。

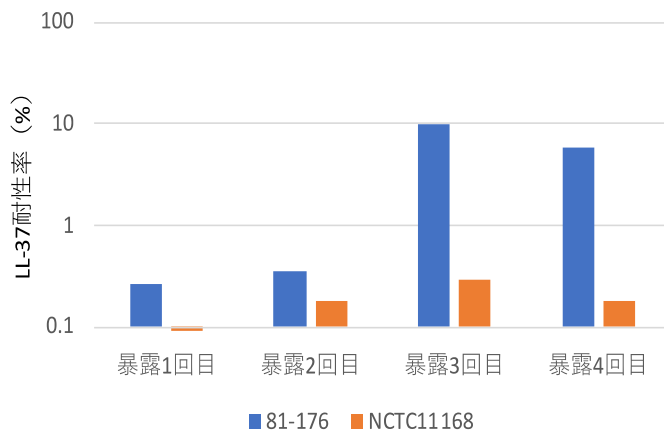


図9:81-176PLおよびNCTC11168PLからの抗菌ペプチドLL-37に耐性をもつバリエーションのスクリーニング。耐性率は、 $100 \times \text{outputの菌数}/\text{inputの菌数}$ (%) で示した。

スクリーニングの過程を phasevariome 解析によってモニターしたところ、最終的に 81-176 の 15 遺伝子のうち、81176_PV4、81176_PV6、81176_PV11、81176_PV15 が ON に、81176_PV5、81176_PV10、81176_PV12、81176_PV13が OFF にシフトした(図10)。暴露3回目の output から5個のシングルコロニーを単離し、PV型の決定ならびに LL-37 耐性試験を行った。結果的に3種類の PV型が得られ(2577、10310、30787)、全て高い耐性を示した(図11)。現在、PV型10310をベースにして phase が ON に固定された遺伝子のみを OFF に改変し、LL-37 耐性に及ぼす影響を解析することによって耐性を担う遺伝子の同定を進めている。

81-176 PV遺伝子	ON/OFF				
	初回input	output			
		暴露1回目	暴露2回目	暴露3回目	暴露4回目
81176_PV1	0.39	0.34	0.25	0.15	0.15
81176_PV2	0.42	0.44	0.34	0.13	0.18
81176_PV3	0.57	0.56	0.37	0.10	0.21
81176_PV4	0.69	0.93	1.97	45.50	71.80
81176_PV5	0.62	0.38	0.36	0.01	0.00
81176_PV6	0.34	0.83	1.28	45.47	112.71
81176_PV7	0.44	0.43	0.34	0.11	0.14
81176_PV8	0.48	0.68	0.50	0.09	0.14
81176_PV9	0.59	0.79	0.60	0.12	0.18
81176_PV10	0.33	0.33	0.22	0.01	0.00
81176_PV11	0.49	0.94	1.15	9.03	8.22
81176_PV12	0.42	0.48	0.40	0.01	0.01
81176_PV13	2.42	2.09	1.16	0.20	0.16
81176_PV14	0.97	1.16	0.76	0.14	0.16
81176_PV15	0.25	0.28	0.55	8.14	6.45

図10:81-176PLからのLL-37耐性バリエーションのスクリーニング過程におけるphasevariome。初回inputのON/OFF比に比べて10倍以上増加した遺伝子と10倍以上低下した遺伝子をそれぞれ橙色と青色で示す。

81-176 PV遺伝子	PV型 (2進法)				
	SC#1	SC#2	SC#3	SC#4	SC#5
81176_PV1	0	0	0	0	1
81176_PV2	0	1	1	0	1
81176_PV3	0	0	0	0	1
81176_PV4	1	1	1	1	1
81176_PV5	0	0	0	0	0
81176_PV6	1	0	0	1	0
81176_PV7	0	0	0	0	0
81176_PV8	0	0	0	0	0
81176_PV9	0	1	1	0	1
81176_PV10	0	0	0	0	0
81176_PV11	1	0	0	1	0
81176_PV12	0	0	0	0	0
81176_PV13	0	1	1	0	0
81176_PV14	0	1	1	0	1
81176_PV15	1	0	0	1	1
PV型 (10進法)	2577	10310	10310	2577	30787
LL-37耐性 (%)	5.61	20.5	4.56	5.49	7.5

図11:81-176におけるLL-37耐性バリエーションのPV型の同定。暴露4回目のoutputから5個のシングルコロニー(SC#1~SC#5)を単離し、それらのゲノム配列を基にPV型を決定するとともに、LL-37耐性試験を行った。

③ ヒト細胞侵入性が高いバリエーションのスクリーニングと原因遺伝子の同定

NCTC11168PL については HeLa 細胞内への侵入率(%: $100 \times \text{outputの菌数} / \text{inputの菌数}$)がサイクル数を経るごとに増加し、暴露5回目で最大となったが(図12:感染1回目に比べて50倍に増加)、81-176PL については顕著な増加がみられなかった。そこで本研究では NCTC11168PL からスクリーニングされたバリエーションについて解析を進めることにした。

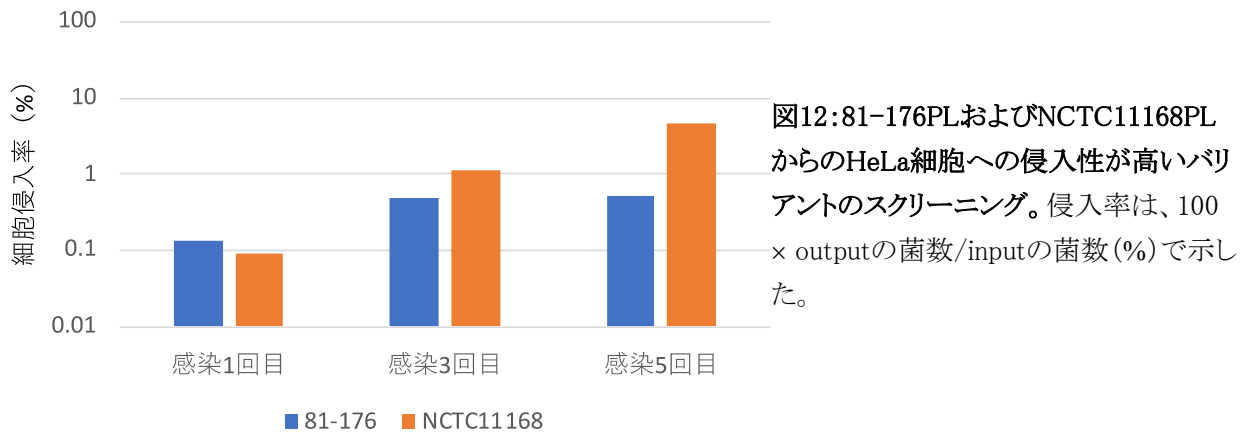


図12:81-176PLおよびNCTC11168PLからのHeLa細胞への侵入性が高いバリエーションのスクリーニング。侵入率は、 $100 \times \text{outputの菌数}/\text{inputの菌数}(\%)$ で示した。

スクリーニングの過程の phasevariome を調べたところ、感染 5 回目で NCTC11168 の 23 遺伝子のうち、7 遺伝子が ON に、5 遺伝子が OFF に 10 倍以上シフトした(図 13)。感染 5 回目の output から 5 個のシングルコロニーを単離し、PV 型の決定ならびに細胞侵入性試験を行ったところ、全て PV 型 1502844 であり、感染 1 回目に比べて 37 倍から 81 倍高い侵入性を示した(図 14)。PV 型 1502844 では 13 個の PV 遺伝子が ON、残り 10 個の遺伝子が OFF であった(図 14)。次に、高い細胞侵入性の原因となる遺伝子を同定するために、PV 型 1502844 において phase が ON に固定されている 13 個の遺伝子のみをランダムに OFF に改変して得られた変異株のうち、5 株について細胞侵入性試験を行ったところ、11168_PV18 と 11168_PV21 が OFF に改変された株(SC#1_V5:PV 型 1502808)は親株と同等の表現型を維持していたが、残り 4 株は親株に比べて 1/10 以下に低下した(図 15)。したがって、13 個の PV 遺伝子のうち、少なくとも 11168_PV18 と 11168_PV21 の関与は除外される。現在残り 11 個(11168_PV5、11168_PV6、11168_PV8、11168_PV9、11168_PV10、11168_PV12、11168_PV13、11168_PV14、11168_PV17、11168_PV19、11168_PV20)のうち、高い細胞侵入性を担う遺伝子の同定を進めている。

NCTC11168 PV遺伝子	ON/OFF比			
	初回input	output		
		感染1回目	感染3回目	感染5回目
11168_PV1	0.08	0.07	0.00	0.00
11168_PV2	2.29	1.26	0.45	0.11
11168_PV3	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON
11168_PV4	0.10	0.13	0.03	0.00
11168_PV5	3.05	13.27	65.38	246.50
11168_PV6	3.58	6.63	100.25	∞
11168_PV7	3.53	6.86	1.34	0.16
11168_PV8	7.78	4.66	155.00	222.00
11168_PV9	4.82	8.81	∞	∞
11168_PV10	2.51	4.34	5.27	18.83
11168_PV11	0.29	0.23	0.71	0.17
11168_PV12	3.22	4.20	16.93	23.00
11168_PV13	7.30	10.40	6.26	16.68
11168_PV14	3.30	3.95	6.98	7.58
11168_PV15	2.75	4.00	1.89	0.29
11168_PV16	0.27	0.12	0.03	0.00
11168_PV17	5.04	6.97	20.20	266.50
11168_PV18	2.66	3.85	177.33	283.50
11168_PV19	4.04	5.55	18.43	62.11
11168_PV20	1.09	1.27	1.71	9.30
11168_PV21	5.68	1.88	1.66	9.18
11168_PV22	2.04	2.80	1.57	0.24
11168_PV23	2.75	4.07	0.98	0.13

図13:NCTC11168PLからの高細胞侵入性バリエーションのスクリーニング過程におけるphasevariome。初回inputのON/OFF比に比べて10倍以上増加した遺伝子と10倍以上低下した遺伝子をそれぞれ橙色と青色で示す。

NCTC11168 PV遺伝子	PV型 (2進法)				
	SC#1	SC#2	SC#3	SC#4	SC#5
11168_PV1	0	0	0	0	0
11168_PV2	0	0	0	0	0
11168_PV3	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON
11168_PV4	0	0	0	0	0
11168_PV5	1	1	1	1	1
11168_PV6	1	1	1	1	1
11168_PV7	0	0	0	0	0
11168_PV8	1	1	1	1	1
11168_PV9	1	1	1	1	1
11168_PV10	1	1	1	1	1
11168_PV11	0	0	0	0	0
11168_PV12	1	1	1	1	1
11168_PV13	1	1	1	1	1
11168_PV14	1	1	1	1	1
11168_PV15	0	0	0	0	0
11168_PV16	0	0	0	0	0
11168_PV17	1	1	1	1	1
11168_PV18	1	1	1	1	1
11168_PV19	1	1	1	1	1
11168_PV20	1	1	1	1	1
11168_PV21	1	1	1	1	1
11168_PV22	0	0	0	0	0
11168_PV23	0	0	0	0	0
PV型 (10進法)	1502844	1502844	1502844	1502844	1502844
細胞侵入率 (%)	7.31	3.33	7.2	6.67	5.1

図14:NCTC11168における高細胞侵入性に関わるPV型の同定。感染5回目のoutputから5個のシングルコロニー(SC#1~SC#5)を単離し、それらのゲノム配列を基にPV型を決定するとともに、HeLa細胞への侵入性試験を行った。

NCTC11168 PV遺伝子	PV型 (2進法)					
	SC#1	SC#_V1	SC#_V2	SC#_V3	SC#_V4	SC#_V5
11168_PV1	0	0	0	0	0	0
11168_PV2	0	0	0	0	0	0
11168_PV3	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON	locked-ON
11168_PV4	0	0	0	0	0	0
11168_PV5	1	0	1	1	1	1
11168_PV6	1	1	0	1	1	1
11168_PV7	0	0	0	0	0	0
11168_PV8	1	1	1	1	1	1
11168_PV9	1	1	0	1	1	1
11168_PV10	1	1	0	1	1	1
11168_PV11	0	0	0	0	0	0
11168_PV12	1	1	0	1	1	1
11168_PV13	1	1	1	1	1	1
11168_PV14	1	1	1	0	1	1
11168_PV15	0	0	0	0	0	0
11168_PV16	0	0	0	0	0	0
11168_PV17	1	1	1	0	1	1
11168_PV18	1	1	1	1	1	0
11168_PV19	1	1	1	1	0	1
11168_PV20	1	1	1	1	0	1
11168_PV21	1	1	1	1	1	0
11168_PV22	0	0	0	0	0	0
11168_PV23	0	0	0	0	0	0
PV型 (10進法)	1502844	120700	1345148	1501244	1470052	1502808
細胞侵入率 (%)	2.46	0.20	0.16	0.27	0.15	2.34

図15:NCTC11168における高細胞侵入性に関わる遺伝子の解析。PV型1502844(図14のSC#1株)をベースにして様々な変異株を構築し(SC#1_V1~SC#1_V5)、HeLa細胞への侵入性試験を行った。

[考察及び今後の課題]

以上のように、数例の *in vitro* 選択圧下でライブラリーからのスクリーニングを行ったところ、それぞれの選択圧に対して適応能をもつバリエントを濃縮することに成功し、それらの表現型を支配するPV型や遺伝子を解明するための全ゲノム解析系を確立することができた。特に、血清耐性については既知の遺伝子(81176_PV15)が関わることを実証するだけでなく、新しい遺伝子(81176_PV11 と 81176_PV13)を炙り出すことに成功した。LL-37 耐性や高細胞侵入性については原因遺伝子を同定するまでには至らなかったため、今後とも解析を続ける予定である。なお、ライブラリーによっては選択圧に適応したバリエントを取得できなかったケースもあった(図 9、図 12)。この原因が単にライブラリーの中に目的の表現型を示すバリエントが含まれていなか

ったためなのか、菌株自体が内因的に特定の適応能を欠くためなのかはわからなかった。今後は、さらに多様性が高いライブラリーを構築する、スクリーニングに用いる選択圧下での野生株の適応能を事前に確認する、などの対策が必要である。

3) 個別課題: 鶏を用いた感染実験の条件検討(岡村雅史(帯広畜産大学))

[研究内容・方法]

本研究で作製したライブラリー(81-176PL および NCTC11168PL)から鶏に適応したバリエーションのスクリーニングを開始するにあたり、*Infect Immun* 2004 72:3769-3776 に報告された手法を参考にして *C. jejuni* を鶏の消化管に定着させるための条件検討を行う。

① 接種菌液の作製

Brucella broth(BB)に2%の寒天とCCDA supplement(Oxoid)を加えた選択培地(BBAS)に-80℃でストックされた菌を塗抹し、37℃で48時間微好気培養を行った。鶏への感染実験にはBBASで生育した適当な数のコロニーをPBSに懸濁したものを用いる。また、コロニーを運動性培地(BBに0.3%の寒天を加えたもの)に接種し、運動性をもつことを確認する。

② 鶏感染実験モデルの作製

カンピロバクター汚染が問題になっているのは基本的に肉用鶏(ブロイラー)であることから、関連の研究には肉用鶏がよく使用されてきた。しかしながら、肉用鶏は7週齢で体重3kgに達するため、現状の飼育器材のサイズを考慮すると長期間の飼育には適さない。したがって、本研究では採卵鶏を用いて条件検討を進める。

通常、農場において鶏におけるカンピロバクターの定着が確認できるのは2~3週齢以降である(*Int J Food Microbiol* 1996 32:35-47)と報告されていることから、2週齢の採卵鶏(ボリスブラウン、カンピロバクター陰性)を用いる。適当な菌数を経口接種した後、数週間にわたって盲腸便を採取する。PBSに懸濁した便をBASSに塗抹し、42℃で48時間微好気培養を行った後、生育したコロニー数をカウントする。以上の操作を行い、菌の腸内定着が最大になる時期を決定する。

[成果]

予備実験として野生株81-176の菌液を2週齢の個別飼育された採卵鶏に約 10^7 CFU/羽で経口接種した後、週に1回の頻度で盲腸便に含まれる菌数をモニターした。その結果、予想外にも1週後すでに $8.67 \pm 0.46 \log_{10}$ CFU/g、2週後も $8.11 \pm 0.45 \log_{10}$ CFU/gと接種後高く推移しており、条件を見直す必要が出てきた。

[考察及び今後の課題]

以上の成果を踏まえて、1)接種菌数を 10^3 、 10^4 および 10^5 CFU/羽と低くすること、2)菌を接種する日齢を早めること、3)採材頻度を上げることなどの条件変更を行い、スクリーニングに適した感染実験モデルを確立する。また、クロアカ(総排泄口)スワブは盲腸便、通常便、盲腸内容物と同程度の高い検出率を示し(*Avian Dis* 52:680-684, 2008; *Avian Pathol* 44:102-105, 2015)、クロアカスワブからの菌の検出率は盲腸便や通常便における菌数の指標になることから(*J Appl Poult Res* 27:223-227)、次回以降の実験ではクロアカスワブも採材することも検討する。ライブラリーを用いたスクリーニングに最適な実験系を確立するためには、接種菌数や鶏週齢を低くするなどの詳細な条件検討を行う必要がある。また、NCTC11168についても同様な検討を行う。

4) 鶏を用いたライブラリースクリーニングの実施(岡村 雅史(帯広畜産大学)、協力者:相川 知宏(帯広畜産大学))

[研究内容・方法]

スクリーニングに最適な条件が確立されていない状態であったが、研究期間の制約を考慮してライブラリー

(81-176PL)からスクリーニングを実施する。

① 接種菌液の作製

主任研究者から分与された 81-176PL の懸濁液 1 mL を適当な数のチューブに分注して -80°C でストックした後、実際に経口感染させるための菌液を調製する。ストックされた懸濁液の一部を BASS に塗抹した後、生育した約 10,000~20,000 個のコロニーを 20 mL の PBS に懸濁し、含まれる菌数をカウントする。

② 鶏におけるスクリーニング

約 $10^4\sim 10^5$ CFU の 81-176PL 菌液(input)を 6~29 日齢の個別飼育された採卵鶏(ボリスブラウン、カンピロバクター陰性)に経口接種した後、3 週間程度を目安に盲腸便を採取する。盲腸便の PBS 懸濁液を BASS に塗抹し、生育したコロニー数をカウントするとともに、約 10,000~20,000 個のコロニーを Amies transport medium に懸濁する(output)。Output を主任研究者に発送して phasevariome 解析を依頼した。残りの output を次回感染の input に用いて鶏に接種し、再度 output を回収する。以降、鶏での感染を繰り返す毎にスクリーニングされた output を主任研究者に発送する。

[成果]

ストックされた 81-176PL の懸濁液に含まれる菌の濃度は $10^6\sim 10^7$ CFU/mL であった。この一部を BASS で培養して得られたコロニーのうち、約 20,000 個を PBS に懸濁して菌数をカウントしたところ、 10^9 CFU/mL であった。PBS 懸濁液を 10^5 倍希釈し、1羽あたり少なくとも 10^4 CFU 以上を鶏に接種した。以下のように鶏への感染を 3 回行い、鶏に定着したものを output として回収した。Output は phasevariome を解析するために主任研究者に発送するとともに、次回の感染の input として用いた。

感染 1 回目:81-176 を用いた予備実験の結果を受けて鶏の週齢や接種する菌数を低く設定したところ(6 日齢時に 1 羽あたり約 10^4 CFU の 81-176PL を接種)、予想外にも盲腸便からの菌の検出数が低かった(3 羽から接種 7 日後 $2.6 \times 10^4\sim 8.0 \times 10^4$ CFU/g;接種 15 日後 $0\sim 8.0 \times 10^2$ CFU/g)。そこで 27 日齢に達した時点で 1 羽あたり 4×10^5 CFU の 81-176PL を追加接種した。その後、5 羽の盲腸便からは平均 10^7 CFU/g を超える菌が継続的に回収された(追加接種 7 日後 2.88×10^7 CFU/g;追加接種 19 日後 1.02×10^8 CFU/g)。そこで、追加接種 19 日後の盲腸便を BASS に塗抹し、生育したコロニー数をカウントした。このうち鶏#3、鶏#4 および鶏#5 の 3 羽から得られたそれぞれ約 10,000~20,000 個のコロニーを Amies transport medium に懸濁し、output とした(ck#3_1、ck#4_1 および ck#5_1)。

感染 2 回目:約 10^4 CFU の ck#3_1 あるいは ck#4_1 を含む菌液を 23 日齢の鶏に1羽ずつ経口接種した。また、29 日齢で約 10^5 CFU の ck#5_1 を 1 羽に経口接種した。その後、いずれの鶏からも計 2 回採取した盲腸便からは 10^7 CFU/g を超える菌が回収された(ck#3_1:接種 13 日後 6.16×10^7 CFU/g、接種 22 日後 2.04×10^7 CFU/g;ck#4_1:接種 13 日後 2.04×10^7 CFU/g、接種 22 日後 1.82×10^7 CFU/g;ck#5_1:接種 7 日後 3.02×10^7 CFU/g、接種 14 日後 9.55×10^6 CFU/g)。そこで、ck#3_1 および ck#4_1 については接種 22 日後、ck#5_1 については接種 14 日後に解剖して盲腸内容物を BASS に塗抹した後、生育したコロニー数をカウントした。また、約 10,000~20,000 個のコロニーを Amies transport medium に懸濁して output とした(ck#3_2、ck#4_2 および ck#5_2)

感染 3 回目:鶏 10 羽を 3 羽あるいは 4 羽ずつ 3 ケージで飼育し、19 日齢時に約 $10^4\sim 10^5$ CFU の ck#3_2 (4 羽)、ck#4_2 (3 羽)あるいは ck#5_2 (3 羽)を1羽ずつ経口接種した。その後、接種 16 日後の各群の盲腸便をプールしたサンプルからは 10^6 CFU/g を超える菌が回収され(ck#3_2:平均 7.59×10^6 CFU/g;ck#4_2:平均 4.79×10^6 CFU/g;ck#5_2:平均 3.02×10^6 CFU/g)、45 日齢時(接種 26 日後)の 10 羽の各群の盲腸便からは 10^8 CFU/g を超える菌が回収された(ck#3_2:平均 3.80×10^8 CFU/g;ck#4_2:平均 5.12×10^8 CFU/g;ck#5_2:平均 3.89×10^8 CFU/g)。接種 26 日後に解剖して盲腸内容物を BASS に塗抹した後、生育したコロニー数をカウントした。このうち、約 10,000~20,000 個のコロニーを Amies transport medium に懸濁して output

とした(ck#3_3、ck#4_3 および ck#5_3)。

[考察及び今後の課題]

接種菌数についてはストックしたバリエーション数をカバーする 10^4 CFU/羽に固定した。この場合、6 日齢での接種では十分な腸への定着が得られなかった。そこで、21 日齢前後で接種を行うと、接種 7 日後以降継続して 10^7 CFU/g 盲腸便以上が検出された(図 16)。以上の成果を踏まえて、当初想定していた「接種後に盲腸定着菌数が徐々に増加していく」モデルで菌の腸内定着が最大になる時期の菌の phasevariome を調べるのではなく、「接種後長期間(3 週間以上)にわたって盲腸に定着する」モデルで腸内環境に適応した phasevariome を調べるという考え方でモデルを確立できた。また、最終的には接種 21 日齢以降に解剖して盲腸内容物を採取することで、盲腸便よりも新鮮かつ大量のサンプルを確実に得られることから、継代を確実に行うことが可能となった。

81-176 PV遺伝子	ON/OFF比									
	初回input	感染1回目鶏#3由来output			感染1回目鶏#4由来output			感染1回目鶏#5由来output		
		感染1回目 (ck#3_1)	感染2回目 (ck#3_2)	感染3回目 (ck#3_3)	感染1回目 (ck#4_1)	感染2回目 (ck#4_2)	感染3回目 (ck#4_3)	感染1回目 (ck#5_1)	感染2回目 (ck#5_2)	感染3回目 (ck#5_3)
81176_PV1	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.12	∞	∞
81176_PV2	0.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	∞
81176_PV3	0.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.26	0.00	0.00
81176_PV4	0.69	0.00	0.06	0.00	∞	497.00	∞	157.00	∞	∞
81176_PV5	0.54	∞	22.35	483.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	∞
81176_PV6	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	372.00	2652.95
81176_PV7	0.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	∞	∞	∞
81176_PV8	0.52	∞	11.74	109.00	0.00	0.00	0.00	6.36	0.00	0.00
81176_PV9	0.69	∞	21.28	249.50	0.00	0.00	0.00	0.15	∞	∞
81176_PV10	0.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	∞
81176_PV11	0.56	∞	∞	∞	0.00	0.02	0.00	0.14	∞	∞
81176_PV12	0.20	∞	101.00	∞	No data	No data	No data	0.13	41.50	332.00
81176_PV13	2.18	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞
81176_PV14	0.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	7.40	0.00	0.00
81176_PV15	0.53	0.00	∞	∞	No data	No data	No data	∞	∞	∞
盲腸便菌数 (CFU/g)		1.00×10^8	2.04×10^7	3.80×10^8	1.32×10^8	1.8×10^8	5.12×10^8	9.68×10^7	9.55×10^6	3.89×10^8

図16:81-176PLを鶏に感染させた後に回収された盲腸便由来の菌数とphasevariome。菌を接種して14~26日後の盲腸便に含まれる菌数をカウントするとともに、phasevariomeを調べた。初回inputのON/OFF比に比べて10倍以上増加した遺伝子と10倍以上低下した遺伝子をそれぞれ橙色と青色で示す。なお、感染1回目の鶏#4に由来するoutputからはいずれも81176_PV12と81176_PV15のシークエンスリードが得られなかった。

5) 個別課題: マウスを用いた感染実験の条件検討(三戸部 治郎(杏林大学)、協力者: 大崎 敬子(杏林大学)、北条 史(杏林大学))

[研究内容・方法]

本研究で作製したライブラリー(81-176PL および NCTC11168PL)からマウスに適応したバリエーションのスクリーニングを開始するにあたり、*Infect Immun* 2007 75:1099-1115 を参考にしてマウスの消化管に *C. jejuni* を定着させるための条件検討を行う。

① 接種菌液の作製

-80°Cでストックされた菌を TSA-5%ヒツジ脱繊維血寒天培地(TSA-SBA)に塗抹し、37°Cで 48 時間微好気培養する。成育したコロニーの運動性を確認するとともに、コロニーをPBSに懸濁して接種菌液とする。

② マウス感染実験モデルの作製

マウス腸管に定着する条件と腸炎を誘導する条件について、C57BL/6 IL-10 遺伝子欠損マウス(IL-10^{-/-}マウス、カンピロバクター陰性)を用いて検討する。遺伝子欠損マウスを米国ジャクソン研究所から輸入した後、杏林大学動物実験施設の SPF 区域で繁殖を行う。約 10⁸もしくは約 10¹⁰ CFU の菌を 10~17 週齢のマウス(オス)に経管を介して胃に接種し、その後 7 日ごとに臨床症状(下痢、体重減少、食欲不振、活動不振等)を診断するとともに、盲腸もしくは糞便中の菌を採取する。PBS に懸濁した盲腸内容物もしくは糞便を mCCDA 選択培地に塗抹し、37°C で 48 時間好気培養を行った後、生育したコロニー数をカウントする。なお、IL-10(-/-)マウスは繁殖力や健康の面で問題があり、飼育することが困難なため、野生型 C57BL/6 マウス(野生型マウス)を用いた実験についても検討する。

[成果]

NCTC11168 と 81-176 の菌液を IL-10^{-/-}マウスに接種した後(接種群あたり 2 もしくは 3 匹)、盲腸や糞便に含まれる菌数をカウントした。NCTC11168 の接種 7 日後の便培養では 10¹⁰ CFU/匹の接種群で 3 匹とも菌が検出されたが(6.4×10⁵ CFU/g、1.4×10⁶ CFU /g、1.4×10⁷ CFU /g)、10⁸ CFU/匹の接種群ではいずれのマウスにおいても検出されなかった。検出数が多かった1匹は下痢症状と運動性低下が認められ、14 日後の観察で死亡が確認されたが、下痢症状が死因かどうかは不明であった。接種 21 日後においては残り 2 匹からの糞便から菌が検出されたが、接種 7 日後の菌数から 1 オーダー程度低下していた(1.1×10⁵ CFU、4×10⁴ CFU /g)。接種 28 日後にはこの 2 匹を解剖し、消化管の肉眼的観察および糞便・盲腸粘膜スワブ・盲腸内容物の菌数をカウントしたところ、いずれの検体からも菌が検出された(5.2×10⁵ CFU、1.4×10⁴ CFU /糞便 g、5.9×10⁶ CFU、5.8×10⁵ CFU /盲腸 1g、4.0×10⁶ CFU、1.7×10⁶ CFU /盲腸内容物 1g)。81-176 では接種 7 日後の糞便のみを調べたところ、10¹⁰ CFU 接種群(3 匹)では少なくとも 10⁴ CFU/g を超える菌が検出されたものの(1.6 × 10⁴ CFU/g、2.3 × 10⁵ CFU /g、3.2 × 10⁷ CFU /g)、10⁸ CFU 接種群(2 匹)では検出菌数が減少傾向にあった(10² CFU/g、1.2 × 10⁴ CFU /g)。以上の結果から、IL-10^{-/-}マウスへの接種菌数は 10¹⁰ CFU が両株ともに適しており、接種 7 日後の糞便に含まれる菌数を調べることによって、簡易的に消化管への定着をモニターできることがわかった。なお、81-176 については 3.6 × 10⁹ CFU の菌を野生型マウスに 3 匹に接種したところ、少なくとも 7 日後にはいずれのマウスの糞便からも菌が検出されず、健康状態も良好であった。

[考察及び今後の課題]

宿主であるIL-10(-/-)遺伝子欠損マウスは実際に飼育を行うと繁殖効率が極度に低く、実験用の個体数の安定的な確保は困難であった。供給元への問い合わせた時点では、繁殖に問題があるという報告はなく、10年近く前に全く同じ系統を飼育していた別の研究者の情報でも問題なかったとのことで、繁殖効率が低下する何らかの遺伝的変異が蓄積した可能性が考えられた。

今後の課題として、同系統は他の感染実験やカンピロバクターによる GBS のモデル系として利用できることもあり、野生型 C57BL6 マウスとの戻し交配を行っている。当然ながらヘテロ系統は繁殖効率が改善しており、数世代の戻し交配を経た後に繁殖効率が良いホモ系統を選別する予定である。また、系統保存、個体数の確保の基礎技術として令和 5 年度にマウス生殖工学の実技講習を財団法人・実験動物中央研究所で受講し、初代ホモ系統の受精卵と精子の保存を行った。

6) 個別課題: マウスを用いたライブラリースクリーニングの実施(三戸部 治郎(杏林大学)、協力者:大崎 敬子(杏林大学)、北条 史(杏林大学))

[研究内容・方法]

スクリーニングに最適な条件が確立されていない状態であったが、研究期間の制約を考慮してライブラリー(81-176PL と NCTC11168PL)からスクリーニングを実施する。

① 接種菌液の作製

主任研究者から分与された 81-176PL と NCTC11168PL の懸濁液 1 mL をそれぞれ適当な数のチューブに分注して -80°C でストックした後、実際に感染させるための菌液を調製する。ストックされた懸濁液の一部を TSA-SBA に塗抹した後、生育した約 10,000 個のコロニーを 20 mL の PBS に懸濁し、含まれる菌数をカウントする。

② マウスにおけるスクリーニング

3.0×10^8 CFU の 81-176PL 菌液 (input) を IL-10^{-/-}マウス 3 匹に接種し、7 日後に臨床症状を診断するとともに、糞便や盲腸内容物を採取した。PBS に懸濁した糞便もしくは盲腸内容物を mCCDA 選択培地に塗抹し、 37°C で 48 時間微好気培養を行った後、生育したコロニー数をカウントした。3 匹分の盲腸由来のコロニーを Amies transport medium に懸濁し (output)、phasevariome を解析するために主任研究者に発送する。また、IL-10(-/-)マウスは繁殖力や健康の面で問題があり、飼育することが困難なため、野生型マウスを用いた感染実験についても検討する。野生型マウスにおいては約 10 倍の input (2.8×10^9 CFU) を用いて感染実験を行う。

NCTC11168PL については 5.8×10^8 CFU の菌液を input に用いて野生型マウス 3 匹に接種する。接種後は上記と同様に糞便・盲腸由来の菌数をカウントするとともに、3 匹分のコロニーを Amies transport medium に懸濁して (output) 主任研究者に発送する。残りの output を次回感染の input に用いて野生型マウスに接種し、再度 output を回収する。以降、野生型マウスでの感染を繰り返す毎にスクリーニングされた output を主任研究者に発送し、phasevariome を行う。

[成果]

81-176PL を input として IL-10^{-/-}マウス 3 匹に接種したところ、7 日後に糞便からは 1.1×10^8 CFU/g から 6.7×10^8 CFU/g、盲腸内容物からは 9.0×10^8 CFU/g から 1.1×10^9 CFU/g の菌が検出され、81-176PL に含まれるバリエーションが定着することを確認した (図 17)。一方、約 10 倍の input を用いて野生型マウス 3 匹に接種したが、7 日後に糞便、盲腸ともに菌は検出されなかった。IL-10^{-/-}マウスに感染後の盲腸由来のコロニーを output として回収し、input とともに主任研究者に発送した。なお、IL-10(-/-)マウスでは菌の感染に伴って結腸で炎症を生じることを確認したが、抗炎症サイトカイン IL-10 遺伝子欠損による炎症性腸疾患の病態が顕在化した結果とも考えられるため、感染に依存した腸炎であるかどうかは判定できなかった。

NCTC11168PL を input に用いて野生型マウス 3 匹に接種したところ、7 日後の糞便からは 1.5×10^3 CFU/g から 1.9×10^4 CFU/g、盲腸内容物からは 5.4×10^3 CFU/g から 5.2×10^4 CFU/g の菌が検出され、NCTC11168PL に含まれるバリエーションが定着することを確認したが (図 18)、特にマウスの健康状態について異常はみられなかった。盲腸内容物から回収された output とともに、input を主任研究者に発送した。残りの output (1.2×10^9 CFU) を野生型マウスに再度感染させたところ、糞便からは 80 CFU/g から 2×10^2 CFU/g、盲腸内容物からは 8.0×10^2 CFU/g から 6.6×10^3 CFU/g の菌が検出された (図 18)。盲腸内容物から回収された output をプールして主任研究者に発送した。

[考察及び今後の課題]

C. jejuni は C57BL/6 野生型マウスの消化管へ定着能が低い (あるいは定着能がない) ことは以前から知られていた。しかしながら予想外にも NCTC11168PL は十分な定着能を有しており、本マウスは定着能が高い個体のスクリーニングを行うにあたっては有用な系になり得るかもしれない。ただし、少なくとも感染 1 週間後の時点では肉眼的な腸炎の発症は認められなかったため、感染の時期や免疫応答と腸炎の関連性について詳細な病理組織解析等が必要であると考えられる。一方、81-176PL は野生型マウスには定着がみられなかったが、IL-10^{-/-}マウスには定着することができた。今後は IL-10^{-/-}マウスに定着した output の定着能が増強されているかどうかを野生型マウスを用いて解析する予定である。

7) 個別課題: 鶏もしくはマウスへの適応能を付与する PV 型の解析 (山本 章治 (国立感染症研究所))

[研究内容・方法]

鶏もしくはマウスを用いたライブラリースクリーニングから得られた output を分担研究者から提供を受け、ゲノム DNA 抽出・シーケンスを行う。得られたデータから Camp_PV_Finder を用いて phasevariome を解析する。

[成果]

① 鶏から得られた output の解析

81-176PL を 3 羽の鶏 (ck#3, ck#4, ck#4) に感染させる前の input と感染させた後に得られた output (1 回目: ck#3_1, ck#4_1, ck#5_1; 2 回目: ck#3_2, ck#4_2, ck#5_2; 3 回目: ck#3_3, ck#4_3, ck#5_3) の phasevariome を調べた。ck#4 では 81176_PV12 と 81176_PV15 のシーケンスリードが得られなかったため、解析から除外した (図 16)。ck#3 と ck#5 についてはたった 1 回の感染で全ての遺伝子の ON/OFF 比が劇的にシフトしていたが、そのパターンは異なっていた。ck#3 と ck#5 では共通して 6 遺伝子 (81176_PV5, 81176_PV9, 81176_PV11, 81176_PV12, 81176_PV13, 81176_PV15) が ON にシフトする一方で、2 遺伝子 (81176_PV3, 81176_PV14) が OFF にシフトしていた (図 16)。ON にシフトした遺伝子のうち、81176_PV5 はペリプラズム蛋白質、81176_PV9 は炭酸脱水酵素をコードしていることが推定される。また、81176_PV12 は CPS 糖鎖ユニットへの MeOPN 修飾への関与が推測されており、81176_PV11, 81176_PV13, 81176_PV15 については先述の通り CPS の生合成だけでなく、血清耐性にも寄与しているものと考えられる。(図 7, *J Bacteriol* 2017 e00027-17)。なお、ON にシフトした 81176_PV3 は炭酸脱水酵素、81176_PV14 は CPS のガラクトース転移酵素をコードしていることが推測される。

② マウスから得られた output の解析

81-176PL を IL-10(-/-)マウス 3 匹に感染させた場合の phasevariome を解析したところ、たった 1 回の感染で 3 匹とも全ての遺伝子の ON/OFF 比が同じパターンで劇的にシフトしていた。81-176 の 15 遺伝子のうち、81176_PV7, 81176_PV11, 81176_PV12, 81176_PV13 が ON に、その他の遺伝子が全て OFF にシフトしており、異なるコロニーが混在したクルードなサンプルに由来するデータにも関わらず PV 型が 284 と判定できるほどであった (図 17)。実際に output から 10 個のシングルコロニーを単離し、PV 型を決定したところ、全て PV 型 284 であった。PV 型 284 で phase が ON の 4 遺伝子のうち、81176_PV11, 81176_PV12 および 81176_PV13 は CPS 生合成遺伝子領域に存在しており、このうち 81176_PV11 と 81176_PV13 は血清耐性にも関わることが示唆されている (図 8, *J Bacteriol* 2017 e00027-17)。また、81176_PV7 はフラジェリンのプソイダミン酸修飾への関与が推測されている。

NCTC11168PL を野生型マウスに感染させた場合の phasevariome についても解析したところ、感染 2 回目の時点で 11168_PV3 を除いた 22 遺伝子のうち、12 遺伝子 (11168_PV2, 11168_PV8, 11168_PV9, 11168_PV10, 11168_PV12, 11168_PV13, 11168_PV15, 11168_PV17, 11168_PV18, 11168_PV19, 11168_PV22, 11168_PV23) が ON、4 遺伝子 (11168_PV1, 11168_PV11, 11168_PV16, 11168_PV21) が OFF にシフトしており、6 遺伝子 (11168_PV4, 11168_PV5, 11168_PV6, 11168_PV7, 11168_PV14, 11168_PV20) は ON と OFF の phase が共存していた (図 18)。ON にシフトした遺伝子のうち、11168_PV18 (メチル基転移酵素、81176_PV11 のオーソログ)、11168_PV19 (MeOPN 転移酵素、81176_PV12 と 81176_PV15 のオーソログ)、11168_PV22 (81176_PV13 のオーソログ)、11168_PV23 (アミノ基転移酵素) は CPS 生合成遺伝子領域にコードされており、CPS の修飾に関わることを示唆されている。なお、NCTC11168 を IL-10(-/-)マウスに感染後に全 PV 遺伝子の phase を解析した研究では (*PLoS One* 2011 24 6:e16399)、11168_PV2 (メチル基転移酵素)、11168_PV9 (アミノペプチダーゼ)、11168_PV10 (アミノグリコシドアセチル基転移酵素)、11168_PV17 (炭酸脱水酵素) および 11168_PV22 については本研究と同様に ON にシフトしていた。

[考察及び今後の課題]

本研究では動物モデルにおける *in vivo* の選択圧下でのライブラリースクリーニングを初めて試みたが、いずれの場合でも感染後には全てあるいは大部分の PV 遺伝子が特定の phasevariome に収束し、宿主環境に適応したことが示唆された。特に、CPS の生合成に関わる遺伝子群の phasevariome が劇的に変化しており、宿主内のストレスに対する抵抗性あるいは宿主細胞との相互作用などに寄与しているものと考えられる。CPS 遺伝子群の PV 型の違いが各種バクテリオファージに対する耐性を決定しているという報告もあり (*Front Cell Infect Microbiol* 2012 20:11)、鶏とマウスに感染後の phasevariome の違いは宿主特異性を示している可能性がある (図 16、図 17)。今後の課題としては、1) 各動物において定着に関わる遺伝子の絞り込み、2) 血清耐性や細胞侵入性に関わる遺伝子との比較、3) データベースに登録済みの *C. jejuni* ゲノム情報を用いた当該遺伝子の保有状況の解析、4) 3) の知見と疫学情報との関連性の把握、5) 以上の知見を用いたヒトへの感染リスクの類推、が必要である。また、IL-10(-/-)マウスを用いた実験が困難な状況にあることと、81-176PL を IL-10(-/-)マウスに感染させた後に得られた output の定着能が高い可能性があることから、野生型マウスを用いた感染実験に移行するなど、ライブラリースクリーニング系の変更も予定している。

81-176 PV遺伝子	ON/OFF比			
	初回input	マウス#30	マウス#31	マウス#48
81176_PV1	0.29	0.00	0.00	0.00
81176_PV2	0.46	0.01	0.01	0.09
81176_PV3	0.53	0.00	0.00	0.01
81176_PV4	0.71	0.01	0.00	0.06
81176_PV5	0.43	0.00	0.00	0.00
81176_PV6	0.42	0.00	0.00	0.01
81176_PV7	0.45	268.50	620.00	12.61
81176_PV8	0.69	0.00	0.00	0.00
81176_PV9	0.67	0.00	0.00	0.01
81176_PV10	0.35	0.00	0.01	0.00
81176_PV11	0.77	321.75	639.50	13.19
81176_PV12	0.49	67.67	104.00	21.75
81176_PV13	2.26	205.40	189.00	130.00
81176_PV14	0.94	0.00	0.00	0.00
81176_PV15	0.19	0.00	0.00	0.00
盲腸内菌数 (CFU/g)		1×10^9	9×10^8	1.1×10^9

図17:81-176PLのIL-10(-/-)マウスに感染させた後に回収された盲腸の菌数とphasevariomeの解析。感染後に各マウスの盲腸から回収した菌をプールしたものをoutputとした。初回inputのON/OFF比に比べて10倍以上増加した遺伝子と10倍以上低下した遺伝子をそれぞれ橙色と青色で示す。

NCTC11168 PV遺伝子	ON/OFF比		
	初回Input	Output	
		感染1回目	感染2回目
11168_PV1	0.11	0.00	0.00
11168_PV2	4.20	12.07	∞
11168_PV3	locked-ON	locked-ON	locked-ON
11168_PV4	0.17	1.03	1.03
11168_PV5	0.86	5.69	2.41
11168_PV6	3.22	4.99	2.35
11168_PV7	4.22	5.33	1.89
11168_PV8	6.80	182.50	∞
11168_PV9	6.10	∞	∞
11168_PV10	1.24	8.86	∞
11168_PV11	0.75	0.05	0.00
11168_PV12	4.23	134.00	∞
11168_PV13	9.30	502.50	∞
11168_PV14	4.25	1.22	1.40
11168_PV15	3.72	126.40	∞
11168_PV16	0.43	0.08	0.00
11168_PV17	5.69	14.35	∞
11168_PV18	2.44	∞	∞
11168_PV19	4.57	∞	∞
11168_PV20	1.21	3.88	2.29
11168_PV21	7.85	0.15	0.58
11168_PV22	3.24	105.88	∞
11168_PV23	3.07	23.63	∞
盲腸内菌数 (n=3 平均値CFU/g)		2.2×10^7	3.7×10^8

図18:NCTC11168PLの野生型マウスに感染させた後に回収された盲腸の菌数とphasevariomeの解析。感染後に3匹のマウスの盲腸から回収した菌をプールしたものをoutputとした。初回inputのON/OFF比に比べて10倍以上増加した遺伝子と10倍以上低下した遺伝子をそれぞれ橙色と青色で示す。盲腸内菌数はマウス3匹の平均値を示す。

8) 個別課題: 鶏とマウスへの適応を担う遺伝子の同定とそのリスク評価(山本 章治(国立感染症研究所)、岡村雅史(帯広畜産大学)、三戸部 治郎(杏林大学)、協力者:相川 知宏(帯広畜産大学)、大崎 敬子(杏林大学)、北条 史(杏林大学))

[研究内容・方法]

① 遺伝子の同定

各宿主動物への適応能を付与する PV 型が明らかにされた場合には、その原因遺伝子を絞り込む。宿主特異的な PV 型を構成する遺伝子のうち、ON に固定された遺伝子から発現する蛋白質のいずれかが宿主への適応に必要な機能を担っているものと考えられる。そこで、その PV 型の ON に固定された遺伝子をランダムに OFF に改変したライブラリーを新たに作製し、これを分担研究者に発送してスクリーニングを依頼する。スクリーニング後に得られた output を解析し、ON の phase を維持している遺伝子を探索する。さらに、output の PV 型をベースにして上記と同様な OFF 改変ライブラリーを作製し、分担研究者に再度スクリーニングを依頼する。このサイクルを繰り返すことにより候補遺伝子を絞り込み、最終的にはその中から宿主適応に関わる遺伝子(*hapC* 遺伝子: host-adaptive phase-variable *Campylobacter* gene)を同定する。なお、*hapC* 遺伝子は1個ではなく、複数存在する可能性も考えられる。

② *hapC* 遺伝子を保有するカンピロバクター株のリスク評価

データベースに登録済みのカンピロバクター株のゲノム情報を用いて *hapC* 遺伝子の分布を調べるとともに、その情報を種もしくは遺伝系統ごとに整理する。以上のデータに加えて株の疫学情報(臨床症状や分離された宿主動物等)を考慮することにより、*hapC* 遺伝子を保有する株のヒトへの感染リスクを類推する。

[成果]

研究期間内に着手することができなかった。

9) 個別課題: 感染リスクが高いバリエーションのストレス感受性の検証(山本 章治(国立感染症研究所))

[研究内容・方法]

マウス適応型の PV 型にロックされたバリエーション(あるいは *hapC* 遺伝子が ON に固定化されたバリエーション)の物理的(温度、pH、圧力等)・化学的(化学物質、薬剤等)ストレスに対する感受性を検証する。得られた知見を

基にして、鶏肉に含まれる当該バリエントを排除するための手法を提案する。

[成果]

研究期間内に着手することができなかった。

研究項目2: 高圧処理による VBNC 化機構とその感染リスクの解析、VBNC 状態からの復帰処理法の確立とその応用

1) 個別課題: VBNC 誘発高圧処理条件の検討(河原井 武人(日本大学))

[研究内容・方法]

① VBNC 誘発高圧処理条件の検討

ゲノム解読株である *C. jejuni* NCTC11168 と 81-176 を用いる。VBNC 細胞は、コロニー形成能を失っているが呼吸活性を維持している細胞として、生菌数測定および CTC/DAPI 染色(有呼吸活性細胞数測定)により検出する(*Vet Res* 1997 28:547-555、VBNC 細胞の定義については図 19 を参照)。まず、緩衝液および液体培地中で高圧処理した細胞の再培養液を経時的にサンプリングし、上記解析生菌数測定および CTC/DAPI 染色を行うことで、安定的に VBNC 化を誘発する処理条件および VBNC 化を誘発しない処理条件を確定する。また、VBNC 化のもう一つの指標として、球菌化細胞の出現する高圧処理後の培養時間および頻度を、微好気下でのプレパレート培養によるリアルタイム顕微鏡観察により解析する。VBNC 化が低頻度であった場合、VBNC 細胞の分離を試みる。*C. jejuni* における球菌化細胞は VBNC 状態にあることから、通常のらせん型細胞と球菌化細胞の粒子径の違いを利用し、フローサイトメトリー(*Curr Microbiol* 2020 77:2093-2103)、孔径の異なるメンブレンフィルター(*Biol Pharm Bull* 2008 31:1327-1332)をベースにして球菌化細胞の選別分取を試みる。分取できた場合、球菌化細胞の呼吸活性およびコロニー形成能を確認する。また、実用環境を想定し、市販鶏肉および鶏内臓へ *C. jejuni* 株を接種した検体を高圧処理する。処理後保存検体を経時的にサンプリングし、生菌数測定および CTC/DAPI 染色により VBNC 細胞の出現を確認し、緩衝液および液体培地中で処理した際と比較解析する。

VBNC細胞:呼吸活性を有するが、コロニー形成能を失った細胞

生菌数: *Brucella agar*でのコロニー形成

有呼吸活性細胞率: CTC / DAPI二重染色

全菌数: 血球計算盤

VBNC細胞 = 有呼吸活性細胞数 - 生菌数

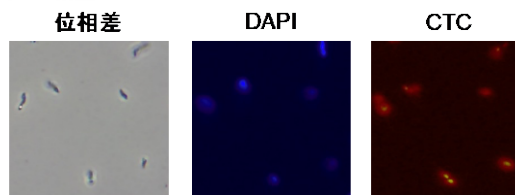


図19: VBNC細胞の検出法。

② 既知ストレス処理 VBNC 化との比較解析

既知の VBNC 誘導ストレスである低温(*Appl Environ Microbiol* 1995 61:2713-2719)、低 pH(*Appl Environ Microbiol* 2003 69:711-714)、酸化(*front Microbiol* 2015 6:1-8)、飢餓(*Appl Environ Microbiol* 1999 65:1110-1116)などを対照として上記と同様の解析を行い、VBNC の出現パターンを比較解析することで、高圧処理による VBNC 化の特異性と共通性を明らかにする。

③ *C. jejuni* における普遍性の検証

上記で得られた結果を基に、標準菌(ATCC 33560)および研究室保有の鶏肉分離株を用いて、緩衝液、

液体培地、市販鶏肉および鶏内臓中での高圧処理後に生菌数測定および CTC/DAPI 染色を行うことで現象の普遍性を確認する。

[成果]

① VBNC 誘発高圧処理条件の検討

供試菌株(NCTC11168と81-176)をBBにおいて二代継代培養した(微好気下、37℃、24時間)。二代培養菌液を遠心分離(7,000 × g、20分間、2回)し0.2 Mリン酸緩衝液[pH7.2]を用いて菌体を洗浄した後、0.2 Mリン酸緩衝液[pH 7.2]、BBにて 10^8 CFU/ml程度になるよう調製した。この菌液を450 MPa、10分間、25℃にて高圧処理した。高圧処理後の菌液をBBで、微好気下、37℃条件にて再培養した。処理直後および再培養24時間後にサンプリングし、全菌数測定、生菌数測定およびCTC/DAPI染色を行った。生菌数測定は、菌液を適宜希釈し *Brucella* 寒天培地(BBA)表面に塗布した後、微好気下、37℃、72時間培養後にコロニーカウントして生菌数を算出した。CTC/DAPI染色は、有呼吸活性細胞/全細胞を検鏡により算出する蛍光染色法であり、Bacstain-Bacterial Viability Detection Kit-CTC/DAPI(DOJINDO社製)を用いた。サンプリングした菌液を遠心分離(7,000 × g、20分間、2回)し0.2 Mリン酸緩衝液[pH7.2]に置換した後、CTC溶液および終濃度5 mg/mlピルビン酸を添加し、微好気下にて2時間染色した。CTC染色後、DAPI溶液を添加し5分間二重染色した。染色後、蛍光顕微鏡にて形態観察および細胞数をカウントした。また、全菌数は血球計算盤を用いて計測した。

未処理細胞においては、全菌数、有呼吸活性細胞数および生菌数の間に有意差は認められず、99%以上がらせん状細胞であった(図20)。一方、高圧処理直後細胞においては、全菌数と有呼吸活性細胞数との間に有意差は認められなかったが、生菌数は検出限界以下(< 1 CFU/ml)であり、99%以上がらせん状細胞であった(図20)。しかしながら、処理後再培養24時間細胞においては、全菌数と有呼吸活性細胞数との間に有意差は認められなかったものの、生菌数は全菌数の1/100程度しか検出されず、70~80%が球状細胞であった(図20)。そこで、球状細胞の分離を試みた。その結果、孔径の異なる滅菌フィルターを複数組み合わせることにより分離に成功した(図21)。分離した球状細胞のコロニー形成能をBBAにより確認したところ、微好気下、37℃、72時間培養後のコロニー形成は認められなかった(< 1 CFU/ml)。一方、分離後の球状細胞においてもCTCによる染色が確認された(図21)。また、供試した両菌株は同様の傾向を示し、圧力媒体(0.2 Mリン酸緩衝液[pH 7.2]、BB)による違いも認められなかった(図20)。

圧力媒体: 0.2 Mリン酸バッファ [pH7.2]

* 1 > CFU/ml

		未処理				高圧処理 (450 MPa, 10 min, 25°C)			
		全菌数 (log cells/ml)	有呼吸活性 細胞率 (%)	生菌数 (log CFU/ml)	球菌化率 (%)	全菌数 (log cells/ml)	有呼吸活性 細胞率 (%)	生菌数 (log CFU/ml)	球菌化率 (%)
81-176	直後	8.50 ± 0.12	100	8.40 ± 0.10	0.86 ± 0.57	8.20 ± 0.19	100	0*	0.9 ± 0.7
	再培養 24 h後	8.60 ± 0.40	100	8.20 ± 0.60	0.33 ± 0.09	6.30 ± 0.19	100	4.09 ± 0.40	73.6 ± 4.64
NCTC 11168	直後	8.20 ± 0.12	100	8.30 ± 0.10	0.9 ± 0.7	8.20 ± 0.19	100	0*	0.9 ± 0.7
	再培養 24 h後	8.60 ± 0.10	100	8.10 ± 0.60	0.33 ± 0.09	6.31 ± 0.26	100	4.10 ± 0.40	75.5 ± 7.99

図20:VBNC誘発処理条件の検討。

圧力媒体: *Brucella* broth

* 1 > CFU/ml

		未処理				高圧処理 (450 MPa, 10 min, 25°C)			
		全菌数 (log cells/ml)	有呼吸活性 細胞率 (%)	生菌数 (log CFU/ml)	球菌化率 (%)	全菌数 (log cells/ml)	有呼吸活性 細胞率 (%)	生菌数 (log CFU/ml)	球菌化率 (%)
81-176	直後	8.50 ± 0.30	100	8.40 ± 0.10	0.93 ± 0.5	8.30 ± 0.50	100	0*	0.8 ± 0.29
	再培養 24 h後	8.60 ± 0.70	100	8.20 ± 0.60	0.53 ± 0.29	6.50 ± 0.36	100	4.52 ± 0.62	77.3 ± 11.3
NCTC 11168	直後	8.20 ± 0.12	100	8.15 ± 0.10	0.67 ± 0.68	8.10 ± 0.42	100	0*	0.77 ± 0.24
	再培養 24 h後	8.60 ± 0.50	100	8.21 ± 0.50	0.47 ± 0.34	6.30 ± 0.25	100	4.30 ± 0.42	70.7 ± 8.49

高圧処理(450 MPa、10分間、25°C)により、亜致死損傷菌が生じるとともに、VBNCの特徴を有した球状細胞を誘発することが明らかになった。

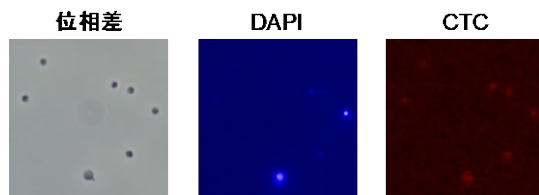


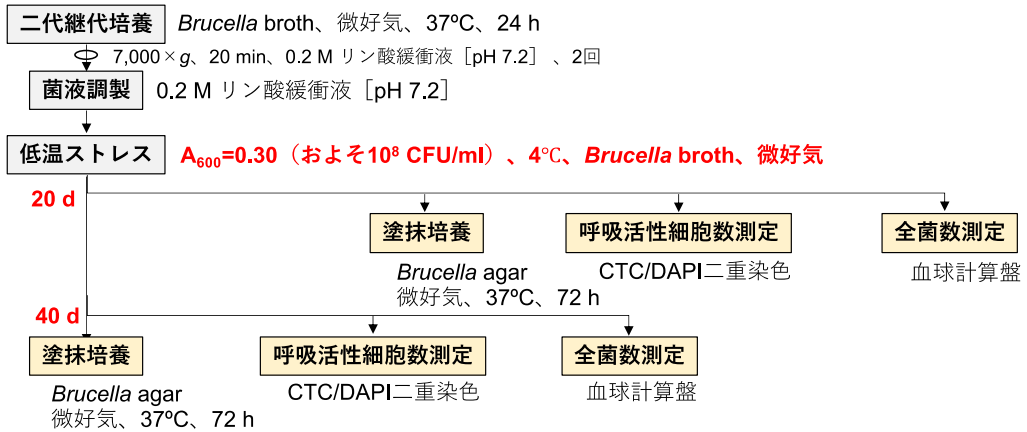
図21:VBNC球状細胞分取の試み。

② 既知ストレス処理 VBNC 化との比較解析

上記の検討により、高圧処理による VBNC 誘発が示された。本処理により誘発される VBNC 細胞の特徴を明らかにするため、既知の VBNC 誘発ストレスとして、低温 (*Appl Environ Microbiol* 1995 61:2713-2719) を対照として上記と同様の解析を行った。

NCTC11168 と 81-176 を用い、上記文献を参考にして、BB にて 4°C、40 日間インキュベート後に、全菌数、有呼吸活性細胞数、生菌数(コロニー形成細胞数)測定を行った(図 22)。その結果、生菌数は検出限界以下(< 1 CFU/ml)であり、99%以上が球状細胞であったものの、有呼吸活性細胞率は全菌数の 60~75%程度であった(図 22)。すなわち、呼吸活性を持たない球状細胞が一部存在することが明らかになった。また、供試した両菌株において同様の結果であった。

実験手順



結果

	20 d				40 d			
	全菌数 (log cells/ml)	有呼吸活性細胞率 (%)	生菌数 (log CFU/ml)	球菌化率 (%)	全菌数 (log cells/ml)	有呼吸活性細胞率 (%)	生菌数 (log CFU/ml)	球菌化率 (%)
81-176	8.5	100	6.1	99.4	8.1	63.7	0*	99.8
NCTC 11168	8.1	100	6.8	99.3	7.6	75.7	0*	99.9

低温ストレスにより誘導されるVBNC細胞（球状細胞）の一部は死細胞であると推察され、高圧処理により誘発される球状細胞とは異なる生理状態にあると考えられた。

図 22: 高圧処理と低温処理による VBNC 化の比較解析

③ *C. jejuni* における普遍性の検証

ATCC 33560 および鶏肉分離株(NFH-L01)について先述した条件(450 MPa、10 分間、25°C)で高圧処理を行い、全菌数、有呼吸活性細胞数、生菌数(コロニー形成細胞数)測定を行ったところ、VBNC 化を誘発することがわかった(図 23)。

圧力媒体: 0.2 Mリン酸バッファ [pH7.2]		* 1> CFU/ml							
		未処理				高圧処理 (450 MPa, 10 min, 25°C)			
		全菌数 (log cells/ml)	有呼吸活性細胞率 (%)	生菌数 (log CFU/ml)	球菌化率 (%)	全菌数 (log cells/ml)	有呼吸活性細胞率 (%)	生菌数 (log CFU/ml)	球菌化率 (%)
ATCC 33560	直後	8.2	100	8.4	1.5	8.2	100	0*	1.6
	再培養 24 h後	8.5	100	8.4	0.5	6.5	100	4.52	74.9
NFH-L01	直後	8.5	100	8.4	1.2	8.2	100	0*	1.4
	再培養 24 h後	8.5	100	8.2	1.2	6.3	100	4.09	82.6

圧力媒体: Brucella broth		* 1> CFU/ml							
		未処理				高圧処理 (450 MPa, 10 min, 25°C)			
		全菌数 (log cells/ml)	有呼吸活性細胞率 (%)	生菌数 (log CFU/ml)	球菌化率 (%)	全菌数 (log cells/ml)	有呼吸活性細胞率 (%)	生菌数 (log CFU/ml)	球菌化率 (%)
ATCC 33560	直後	8.1	100	8	1.5	8	100	0*	1.4
	再培養 24 h後	8.25	100	8.2	0.5	6.5	100	4.67	71.9
NFH-L01	直後	8.5	100	8.1	1.2	8.3	100	0*	0.5
	再培養 24 h後	8.6	100	8.2	1.2	6.3	100	4.52	65.9

標準株および鶏肉分離株においても、①と同条件の高圧処理により VBNC の特徴を有した球状細胞を誘発することが明らかになった。

図 23: *C. jejuni* における普遍性の検証

[考察及び今後の課題]

以上の結果より、450 MPa、10 分間、25°C の高圧処理が VBNC の特徴をもつ球状細胞を誘発することが明らかになり、低温ストレスにより誘導される VBNC 細胞とは異なる生理状態にある可能性が示唆された。今後は低 pH、酸化、飢餓などの他のストレス下で誘導される VBNC 細胞との比較も必要である。また、細胞を分取することに成功したものの、再現性が高くないことが判明したため、安定に回収するための条件検討も重要である。

2) 個別課題: 高圧処理による VBNC 化に関わる遺伝子の同定(河原井 武人(日本大学))

[研究内容・方法]

VBNC 化誘導条件および非誘導条件の結果を基に、高圧処理後培養時におけるトランスクリプトーム比較解析を RNA-seq (*Microbiology* 2011 157:2922-2932) により行う。尚、VBNC 化誘導条件における集団内の細胞の VBNC 化率が低い場合、選別分取法により球状化菌細胞を分取し、VBNC 菌として解析に用いる。既知の VBNC 誘導ストレスである低温、低 pH、酸化、飢餓により誘発された VBNC 細胞との RNA-seq によるトランスクリプトーム比較解析を行うことにより、高圧処理による球形化および VBNC 化を誘導する候補遺伝子を絞り込む。得られた候補遺伝子の欠失株を作製し、高圧処理による VBNC 化の有無を解析することで、VBNC 化を誘導する遺伝子を同定する。

[成果]

研究期間内には着手することができなかった。

3) 個別課題: 高圧処理による *C. jejuni* の感染リスクへの影響(河原井 武人(日本大学))

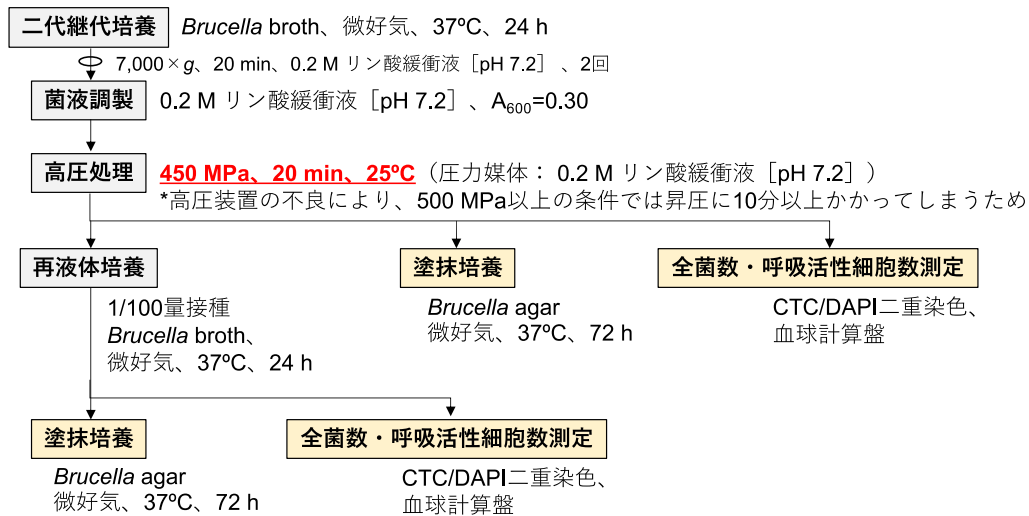
[研究内容・方法]

VBNC 誘発条件および非誘導条件(菌が完全に死滅する条件)での高圧処理を施した NCTC11168 を用いて、鶏およびマウスモデル (*Food Microbiol* 1999 16:375-383) における復帰処理の効果を解析することで、高圧処理による VBNC 化リスクと食品殺菌への適用条件を検証する。尚、以下は一例ではあるが、他菌種を含む既報の様々な復帰処理の効果も検証する。発育鶏卵 (*Appl Environ Microbiol* 1999 65:5154-5157) における蘇生、鶏肉への接種および回収 (*Front Microbiol* 2020 10:Article 2920)、対数期中期培養上清、カタラーゼもしくは Tween 80 添加培地での復帰効果 (*Microbiol Spectrum* 2022 10:e02110-21)。

[成果]

先述した高圧処理(450 MPa、10 min、25°C)は、全菌数の 70~80%程度を VBNC 菌に特徴的な形態(球状)に変化させるものの、一部の菌は増殖能を維持しているため、復帰処理の効果を解析できない状態であった。そこで高圧処理の時間を変更することで増殖型菌を全滅させるアプローチについて検討した。処理時間を 20 分に延長して(4450 MPa、20 min、25°C) BBA に塗抹したところ、コロニー形成率が 0%であったことから、増殖型菌は全滅したものと考えられる(図 24)。しかしながら、本高圧処理後の球菌化率は 2%程度にまで減少していたため、VBNC の誘発効率としては条件(4450 MPa、10 min、25°C)よりも大幅に劣っていることが推測される(図 24)。

実験手順



実験結果

	全菌数(log cells/ml)	有呼吸活性細胞率(%)	生菌数(log CFU/ml)	球菌化率(%)
直後	8.25 ± 0.1	100	0*	1.3 ± 0.5
再培養24 h後	6.0 ± 0.69	34.3 ± 6.89	0*	2.3 ± 1.5

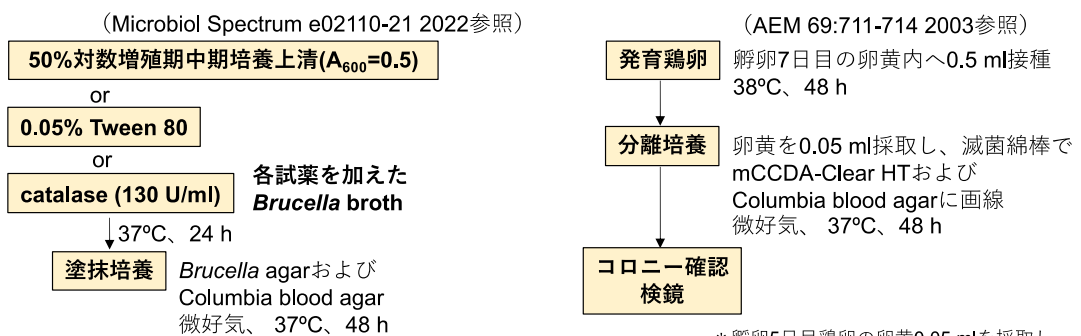
コロニー形成能をもたないらせん状細胞(有呼吸活性細胞は30%程度)

図 24: VBNC 非誘発条件(菌が完全に死滅する条件)の検討。

450 MPa・20 min・25°C の条件で高压処理を施した菌液について、1) 発育鶏卵の内部でのインキュベーション後に卵黄を寒天培地に塗抹、2) 各種添加物(対数期中期培養上清、カタラーゼもしくは Tween 80)を含む液体培地での培養後に寒天培地に塗抹、の復帰処理を試みたところ、発育鶏卵処理のみで効果がみられ、高压処理菌を接種した 3 個の発育鶏卵のうち 2 個でコロニー形成能が回復した(図 25)。

実験手順

復帰処理



実験結果

VBNC誘導処理	培養上清	Tween 80	catalase	発育鶏卵
高压	両培地で陰性	両培地で陰性	両培地で陰性	2/3* (両培地で同様)
低温	両培地で陰性	両培地で陰性	両培地で陰性	1/3* (両培地で同様)

*陰性の鶏卵には出血と発育不良あり、接種の失敗と考えられる

図 25: VBNC 状態からの復帰処理の検討。

[考察及び今後の課題]

以上の結果より、450 MPa・20 min・25°C の高圧処理は VBNC を誘発する一方で、増殖型菌を全滅できるものの、処理後の球菌化率の低さから考えると実際に VBNC 化した菌数は少ないことが予想される。今後 VBNC 菌の研究を進展させるためには、増殖型菌の全滅効果を維持しつつも、球菌化率を上げるための条件を検討することが必要だろう。そこで孔径の異なる滅菌フィルターを複数組み合わせることによって球状化した菌のみを回収する試みを行ってきたが、回収率の再現性が低いことが判明したため、安定に回収される条件検討が急務である。また、本高圧処理はわずかながら VBNC 菌を誘発してしまう可能性があることから、食中毒のリスクを孕んでいる。鶏肉の滅菌法として確立するためには、増殖型菌だけではなく、VBNC 菌も全滅させ、かつ鶏肉の食感を維持するための条件検討も必要である。

4) 個別課題: 復帰処理が市販鶏肉からのカンピロバクター検出頻度に及ぼす影響(河原井 武人(日本大学))

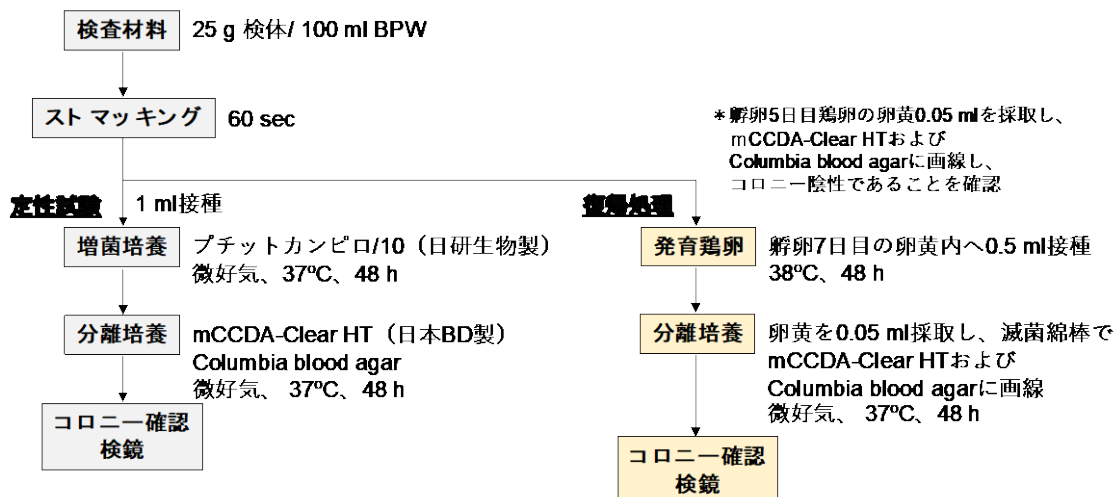
[研究内容・方法]

低温処理(4°C; *Appl Environ Microbiol* 1995 61:2713-2719)によるカンピロバクターの VBNC 化について報告されている一方、わが国における鶏肉流通の殆どは冷蔵温度で実施されている。つまり、市販鶏肉を汚染している菌が VBNC 化していることが推測されるため、一般的な培養法では菌が検出されにくくなっている可能性がある。上述の個別課題において実施した復帰処理のうち、良好な復帰効果が得られた場合には、市販鶏肉に対して当該復帰処理を行い、未処理鶏肉との間で検出菌数を比較する。得られた知見を基にして、鶏肉に含まれるカンピロバクターの検出頻度を向上させるための手法を提案する。

[成果]

本研究期間内では市販鶏肉よりもカンピロバクターの汚染率が高いと考えられている鶏レバーを用いて検証を行った。すり潰した市販鶏レバー4 検体を選択増菌培地にて培養後、あるいは発育鶏卵処理後に選択寒天培地に塗抹し、コロニー形成能を確認した(図 26)。前者の場合だといずれの検体でも陰性だったが、後者では 4 検体のうち 2 検体は陽性であった(図 26)。

実験手順



実験結果

検体	定性試験	復帰処理
レバー1	両培地で陰性	0/3 (両培地で同様)
レバー2	両培地で陰性	2/3* (両培地で同様)
レバー3	両培地で陰性	0/3 (両培地で同様)
レバー4	両培地で陽性	3/3 (両培地で同様)

図 26: 復帰処理が市販鶏肉からのカンピロバクターの検出頻度に及ぼす影響。

*陰性の鶏卵は未受精卵

[考察及び今後の課題]

今後は検体数を増やして再現性を確認するとともに、市販鶏肉についても同様な検証を行う。また、上述の課題で決定された高圧条処理による滅菌効果についても調べる。

2 研究全体の成果、考察及び結論

市販の鶏肉は 60～80%と高い確率でカンピロバクターに汚染されているにも関わらず、本菌による食中毒のほとんどは散発的であり、他の細菌由来の食中毒に比べて事件あたりの感染者数は圧倒的に少ないが (*Emerg Infect Dis* 2016 22: 1193-1200)、突如として 50 人から数百人規模の被害をもたらすアウトブレイクが発生する場合もある。また、感染者のうち約 1/1,000 の確率で自己免疫性末梢神経疾患である GBS を発症し、日常生活に深刻な被害を及ぼすリスクも秘めている。ペルーでは *C. jejuni* に起因する大規模な GBS のアウトブレイクが現在も続いているが、その発症率の高さに加えて長期化している原因は依然として不明である。カンピロバクターが原因と疑われながら菌が検出されない食中毒事例も多く、食品あるいは環境における未解明な適応機構の存在も示唆される。このようにカンピロバクター感染症に不確定要素が多い背景には、本菌のステルス的な戦略が関係していると考えられ、我々はこの戦略を炙り出す目的で PV と VBNC に着目した。

カンピロバクターはゲノムあたり 18～39 個の PV 遺伝子をコードしているため、それらの遺伝子の PV によって一つの菌個体から理論的には 2^{18} (26 万) から 2^{39} (5,000 億) という莫大でかつ不安定なバリエーションがつけられる。その中には GBS や血清耐性などの病原性に関連したバリエーションが含まれることから以前から感染リスクを指摘されていたが (*Mol Microbiol* 2000 37:501-514; *J Bacteriol* 2017 e00027-17)、それらを網羅的・安定的に取得して解析する手段がなかった。本研究で確立された PV の全ゲノム解析系は、病原性に関連したバリエーションの取得から、得られたバリエーションの遺伝学的な解析までの一連の過程を可能にする。本研究では *in vitro* (血清耐性、抗菌ペプチド耐性、高細胞侵入性) と *in vivo* (鶏とマウスの消化管定着) の選択圧に適応したバリエーションやそれらの phasevariome を得る段階までを実証したが、残念ながらそれぞれの表現型の原因となる遺伝子を同定し、作用メカニズムや感染リスクを考察する段階までは研究を進めることができなかった。PV は基本的にカンピロバクターが宿主環境のような生物学的なストレスに対抗する戦略と位置づけられており、どちらかという物理的・化学的なストレスの多い食品中のカンピロバクターの生残性に PV が寄与しているかどうかは明らかではない。PV 遺伝子の大部分は多糖体や外膜蛋白質などの菌体表層構造の形成に寄与している反面、ストレス応答性プロテアーゼや DNA 制限・修飾酵素のように遺伝子の発現制御に関わるものも存在するため、PV が VBNC やバイオフィーム形成のような生理的反応を誘導している可能性は否定できない。また、菌体表層構造の PV を介して消毒剤のような化学的ストレスに対する耐性を付与している可能性もある。全ゲノム PV 解析系を用いて食品衛生的に問題となるバリエーションを取得・解析することは新たなリスクの検出につながるかもしれない。

VBNC 状態のカンピロバクターは通常の培養法では増殖しないが、ヒトに感染後に増殖する可能性があるため、食品衛生的なリスクを孕む。通常カンピロバクターを VBNC 化するためには様々なストレス下に長時間曝露することが必要だが、本研究では短時間高圧処理をするだけで VBNC 状態に移行することを確認した。また、VBNC から増殖型への復帰させる手段として発育鶏卵処理が有効である可能性を提示した。いずれも再現性や分子メカニズムについての知見が不足しているものの、VBNC の基礎研究にかかる時間の短縮や食品中のリスク検出の高精度化につながる可能性がある。また、カンピロバクターの高圧殺菌技術の実用化に向け、VBNC のリスクおよびその対策にまつわる問題点についても提案することができた。VBNC 細胞まで全滅させる十分な殺菌効果の確保と食感の維持を両立させるためには高圧処理条件を見出すだけでなく、処理後の生残性などを検討しなければならず、カンピロバクターによる食中毒を防ぐための処理方法としては、さらなる検

討が必要だろう。高圧殺菌は最終的な包装形態で処理を行うため、消費者の食卓に届くまで微生物の汚染を受けない。このような利点から、高圧殺菌技術は畜産食品の衛生保持や品質保持期限を延長するうえで有用であると考えられる。

以上のように、本研究ではこれまで研究に着手することが困難であったカンピロバクターの PV と VBNC に焦点を当てた解析を行い、カンピロバクター食中毒における潜在的なリスクを検出するための知見を提供することができた。今後は本研究をもとにして実用化に向けた研究を目指し、食品衛生的に有益な知見を蓄積する必要がある。

Ⅲ 本研究を基にした論文等

1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト
特になし。

2 本研究を基にした学会発表の実績
研究期間内の成果について以下の発表を予定している。

○山本章治、李謙一、窪村亜希子、伊豫田淳、明田幸宏、相川知宏、岡村雅史、北条史、大崎敬子、三戸部治郎. *Campylobacter jejuni* の phase variation によって生じるバリエーションを安定化したライブラリーの作成と評価. 第 97 回日本細菌学会総会(札幌、令和 6 年 8 月)

3 特許権等の出願・申請等の状況
特になし

4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物
81-176PL と NCTC11168PL の phasevariome を解析するためのプログラム Camp_PV_Finder

5 その他（各種受賞、プレスリリース等）
山本章治. 遺伝的に超不安定な *Campylobacter* のゲノムを安定化する. 日生研たより. 2023 69(2):11-16. (日生研から発行される刊行物への寄稿)

Ⅳ 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) PV のリスクを顕在化するための手法の確立 ① PV の全ゲノム解析系を確立する ② 鶏とマウスにおけるライブラリースクリーニング系を確立する ③ 鶏とマウスへの適応能を付与する PV 型を同定する ④ 鶏とマウスへの適応を担う遺伝子を同定するとともにそのリスク評価を行う ⑤ 感染リスクが高い PV 型のストレス感受性を検証する	3	血清耐性、抗菌ペプチド LL-37 耐性、高細胞侵入性を付与する PV 型をそれぞれ同定するとともに、81-176 については血清耐性に関わる遺伝子を新規に明らかにするなど、PV の全ゲノム解析系をベースとしたライブラリースクリーニング法の有用性を <i>in vitro</i> で実証することができた。 鶏とマウスにおけるライブラリーの <i>in vivo</i> スクリーニング系を確立した。この系を用いて排卵鶏と C57BL/6 マウスの消化管に定着能をもつバリエーションを取得することに成功し、その PV 型を解読した。しかしながら、研究期間内には原因遺伝子の同定やそれに基づいたリスク評価を実行できなかった。

<p>(2) (2) 高圧処理によるVBNC化の検証</p> <p>① 高圧処理による球形化とVBNCの関連性を確実なものにするとともに、<i>C. jejuni</i>間での普遍性を検証する</p> <p>② 高圧処理によるVBNC化に関わる遺伝子を同定する</p> <p>③ 高圧処理による感染リスクの評価を行う(VBNC状態からの復帰処理法の確立を含む)</p> <p>④ 復帰処理が市販鶏肉からのカンピロバクター検出頻度に及ぼす影響を検証する</p>	3	<p>VBNC を誘発する一方で増殖型菌を全滅するための高圧処理条件を決定した。この条件で処理した菌を発育鶏卵に接種すると VBNC から増殖型に復帰することが示唆された。また、市販鶏レバーに VBNC 菌が含まれている可能性が示唆された。しかしながらその一方で、研究期間内に VBNC 状態の球菌化細胞を安定に解析するための条件や、鶏肉の品質を保ちつつ VBNC 状態の菌を完全に死滅させる条件を決定するまでには至らなかった。</p>
---	---	--

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	3	全体目標の2/3程度を達成できた。
(2) 研究成果の有用性	3	カンピロバクターの潜在的な食中毒リスクおよびそれに伴う疾病リスクとなる菌側の因子を明らかにするうえで重要である。
<p>総合コメント</p> <p>概ね順調に進んでいる。なお、研究項目2については、担当の分担研究者の一身上の都合により、令和5年11月より中断した。</p>		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。

(別添1)

研究成果の概要 (和文)

本研究は主要な食中毒起因菌である *Campylobacter jejuni* の潜在的なリスク因子と考えられている phase variation (PV) と viable but non-culturable (VBNC) を研究するための新しいアプローチを確立する目的で行われた。*C. jejuni* は PV によって一つの菌個体から、26 万から 5,000 億という莫大でかつ不安定なバリエーションをつくることができる。それらのバリエーションは高い病原性やストレス耐性などをもつ可能性があり、食中毒リスクを秘めている。本研究ではゲノム編集によって PV を固定し、網羅的かつ安定なバリエーションからなるライブラリーを構築・評価する手法を確立した。また、このライブラリーの中から、病原性や宿主内適応に関連したバリエーションを *in vitro* 及び *in vivo* の選択圧下でスクリーニングし、遺伝学的に解析する実験系を確立した。一方、VBNC 状態の *C. jejuni* は通常の培養法では増殖しないが、ヒトに感染後に増殖する可能性があるため、食品衛生的に問題である。本研究では *C. jejuni* を簡易的に VBNC 化する手法と VBNC から増殖型への復帰法について検討し、それぞれ高圧処理と発育鶏卵接種を支持する知見を得た。以上の成果は、今まで PV や VBNC に隠されてきた *C. jejuni* の潜在的リスクを明らかにするうえで重要なツールになると考えられる。

(別添2)

研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Research on new approaches to uncover environmental adaptation mechanisms by <i>Campylobacter jejuni</i>
Research project number	JPCAFSC20222205
Research period	FY 2022 – 2023
Name of principal research investigator (PI)	Shouji Yamamoto

Abstract/Summary

This study aimed to establish new approaches to study phase variation (PV) and viable but non-culturable (VBNC), which are considered potential risk factors for *Campylobacter jejuni*, a major cause of foodborne illness. *C. jejuni* can produce a huge number of unstable variants, ranging from 260,000 to 500 billion, from a single bacterium through PV. These variants may be highly pathogenic, stress tolerant, and thus are a potential risk for food poisoning. In this study, we established a method to fix PV by genome editing and to construct and evaluate a library consisting of comprehensive and stable variants. We also established an experimental system to screen and genetically analyze variants associated with pathogenicity and host adaptation from this library under selective pressure *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, *C. jejuni* in the VBNC state does not grow in normal culture methods, but it may grow after infection in humans, which is a food safety issue. In this study, we investigated a simple method to convert *C. jejuni* into VBNC and a method to revert VBNC to a vegetative form, and obtained findings supporting high-pressure treatment and inoculation into embryonated chicken eggs, respectively. These results will be an important tool to reveal the potential risk of *C. jejuni*, which has been hidden by PV and VBNC.

本研究は主要な食中毒起因菌である *Campylobacter jejuni* の潜在的なリスク因子と考えられている phase variation (PV) と viable but non-culturable (VBNC) を研究するための新しいアプローチを確立する目的で行われた。*C. jejuni* は PV によって一つの個体から、26 万から 5,000 億という莫大でかつ不安定なバリエーションをつくることができる。それらのバリエーションは高い病原性やストレス耐性などをもつ可能性があり、潜在的に食中毒発生のリスクがある。本研究ではゲノム編集によって PV を固定し、網羅的かつ安定なバリエーションからなるライブラリーを構築・評価する手法を確立した。また、このライブラリーの中から、病原性や宿主内適応に関連したバリエーションを *in vitro* 及び *in vivo* の選択圧下でスクリーニングし、遺伝学的に解析する実験系を確立した。一方、VBNC 状態の *C. jejuni* は通常の培養法では増殖しないが、ヒトに感染後に増殖する可能性があるため、食品衛生的に問題である。本研究では *C. jejuni* を簡易的に VBNC 化する手法と VBNC から増殖型への復帰法について検討し、それぞれ高圧処理と発育鶏卵接種を支持する知見を得た。以上の成果は、今まで PV や VBNC に隠されてきた *C. jejuni* の潜在的なリスクを明らかにするうえで重要なツールになると考えられる。

This report provides outcome of the captioned research programme funded by Food Safety Commission Japan (FSCJ). This is not a formal publication of FSCJ and is neither for sale nor for use in conjunction with commercial purpose. All rights are reserved by FSCJ. The view expressed in this report does not imply any opinion on the part of FSCJ.

1 . List of papers published on the basis of this research

N/A

2 . List of presentations based on this research

The following presentation is planned regarding the results of the research during the research period.

○Shouji Yamamoto, Kenichi Li, Akiko Kubomura, Sunao Iyoda, Yukihiro Aketa, Chihiro Aikawa, Masashi Okamura, Fuhito Hojo, Takako Osaki, Jiro Mitobe. Construction and evaluation of *Campylobacter jejuni* phase-locked variant libraries. 97th Annual Meeting of the Japanese Society for Bacteriology (Sapporo, August 2024)

3 . The number and summary of patents and patent applications

The program "Camp_PV_Finder" to analyze the phasevariome of 81-176PL and NCTC11168PL.

4 . Others (awards, press releases, software and database construction)

Shouji Yamamoto. Stabilizing the genetically hyperunstable *Campylobacter* genome. *NIBS Letter*. 2023 69(2):11-16.