

研究課題名 (研究項目名)	誘電泳動法を用いた細胞分離・捕捉技術の確立による Viable But Non-Culturable 状態のカンピロバクターの網羅的特性解析（課題番号：JPCAFSC2022 2203） 1 ハザード・ばく露実態の評価に必要な科学的知見の集積 (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
主任研究者	研究者名：小関成樹 所属機関：国立大学法人北海道大学

## I 研究期間及び研究目的等

### 1 研究期間

令和4年度～令和6年度（3年間）

### 2 研究目的

過去30年以上にわたり、「生きているが培養できないViable But Non-Culturable (VBNC)」状態の細菌に関して様々な研究がなされている。この間、細胞膜の活性に着目した蛍光染色法による検出技術の発展、さらには選択的膜透過性色素による処理及びリアルタイムPCR法を用いた生菌由来DNAの選択的な検出定量が可能となってきている。これにより、生きている細胞数だけを定量可能となり、VBNC数を定量化できるまでに発展している。しかし、未だにVBNC状態そのものの性質は明らかになっていない。

なぜ、VBNCの研究が進まないのか？その理由はVBNC状態にある細菌細胞だけを選択的にありのままの状態 で捕集する技術がなかったためである。VBNCの検出においては細菌細胞に様々な化学修飾を施すことで検出を可能としていたため、VBNC状態そのものの細胞を捕集できなかった。解析すべきVBNC細胞を準備できないため、VBNC自体の性質を明らかにする研究は進まなかった。

一方、申請者は近年開発された誘電泳動法とマイクロ流路を組合わせた技術を用いることで、VBNC状態の細菌細胞のみを捕集しうる手法等の知見を得つつある(成果については未発表の情報を含む)。原理としては、生菌と死菌とで細胞表面の電気的特性が異なることを利用して、マイクロ流路内に設置した電極間に異なる周波数を与えることで生菌のみ、あるいは死菌のみを選択的に捕集可能となる。この手法によれば、VBNC状態のカンピロバクター細胞のみを捕集可能となり、化学修飾の影響を受けないため、VBNC細胞内での生化学的な変化を検討するための試料取得が可能となる。

本研究では、新たな細胞分離技術を用いてカンピロバクター細胞の VBNC 状態への移行条件、さらにはVBNC 状態からの蘇生回復条件を明らかにする。その上で、VBNC 細胞を遺伝子発現レベルから代謝活性レベルで網羅的に解析し、VBNC 状態の細菌細胞の生理活性状態を解明することを目的とする。

### 3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
(1) VBNC状態のカンピロバクター汚染実態の解明	市販鶏肉のカンピロバクター汚染実態調査	小関成樹（北海道大学）
(2) VBNC状態への移行およびVBNCからの蘇生	誘電泳動法とマイクロ流路装置を用いたVBNCの定量評価	小関成樹（北海道大学）

回復条件の探索		
(3) VBNC細菌細胞の生理活性状態の解明	オミクス解析によるVBNC特性の評価	小関成樹（北海道大学）
(4) VBNCの発生およびVBNCからの蘇生回復予測モデルの開発	VBNCの発生予測モデルとVBNCからの蘇生回復予測モデルの開発	小関成樹（北海道大学）

#### 4 倫理面への配慮について

本研究では、細菌の食品上での生残挙動を検討するため、ヒトおよび実験動物を対象とする実験は行わないことから、倫理上問題となることはない。ただし、本研究では Biosafety Level 2 に値する病原体を取り扱うため、感染症法(感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律:平成 10 年法律第 114 号)及び家畜伝染病予防法:昭和 26 年法律第 166 号)等を遵守し、北海道大学病原体等安全管理委員会による安全管理及び指導の元、研究及び実験が実施される。また、本研究では細菌の遺伝子情報を利用するが、遺伝子組み替えは行わないため、関連する法令等への対応は必要ない。

## II 研究内容及び成果等

### 1 研究項目名：VBNC 状態のカンピロバクター汚染実態の解明

(1) 個別課題名：PCR法を用いたVBNC状態のカンピロバクター数の定量評価（小関成樹（北海道大学大学院農学研究院））

カンピロバクター食中毒への関与が懸念されているViable But Non-Culturable (VBNC) 状態のカンピロバクターの実食品上での存在状況を遺伝子解析技術により把握し、VBNC状態の細菌がカンピロバクター食中毒リスクへ及ぼす影響を解明することを目指して研究を進めている。リスク評価における重要な情報の一つとして、実際に流通している鶏肉のカンピロバクターの汚染実態があるが、これまでの研究では培養法による調査は散発的に行われてきているものの、VBNC状態の菌数を考慮した調査はなされていなかった。そこで、VBNC状態の*Campylobacter jejuni*を検出定量するために、*C. jejuni* の遺伝子数を定量するリアルタイムPCR法に、選択的膜透過性色素 (EMA: ethidium monoazide あるいは PMA: propidium monoazide) による処理を組み合わせることで死菌由来のDNAを修飾する技術を用いて、生菌由来DNAのみを選択的に検出定量することを目指した研究を実施した。

市販鶏肉における *C. jejuni* の汚染状況を通常のリアルタイム PCR 法にて定量した結果、50 検体中 16 検体で *C. jejuni* が検出され、定量値は  $10^3$  CFU/g 程度であった。一方で、EMA/PMA 処理を行った場合、全ての検体で検出されなかった。これは一般にリアルタイム PCR 法での定量下限値が  $10^3$  CFU/mL であり、選択的膜透過性色素による処理を行った場合、生菌への影響が少なからずあり、それにより定量下限値よりも低い菌数になったためであると考えられる。一方、mCCDA 培地での平板培養法では全ての検体で検出限界以下 ( $<10^2$  CFU/g) であった。これらの結果からだけでは、市販鶏肉検体には生菌が存在せず、死菌だけだったと言い切ることは、検出感度の点から困難であった。

そこで、より低濃度の *C. jejuni* 生菌数を検出する方法として、リアルタイムPCR法による迅速な菌の陽性/陰性判定とMPN（最確数法: Most Probable Number）による定量計算法を組み合わせ、市販鶏肉中の *C. jejuni* の定量を川崎ら（2013）の方法にしたがい実施した。MPN法は試料中の標的微生物数が微量であっても、その単位体積当たり存在する微生物数はポアソン分布に従うと推定して菌数を求める手法であり、確率分布的定量試験法として普及している。本法では希釈系列が多く必要なものの、近年の計算環境の発達により計算自体は容易である。この手法とPCR法での迅速な判定を組み合わせることで、低菌量の *C. jejuni* の生菌数のみを定量可能となる。測定原理的には検出限界は1 gあたり 0.04個以上となり、これは検体25g 中に1個体の存在を検出できる感度を意味する。

試験系の妥当性を確認するために、既知濃度の *C. jejuni* 生菌菌液（約2 log CFU/g）を鶏肉に接種した添加実験において、MPN法により求めた *C. jejuni* の菌数は1.82～2.15 log MPN/gであり、良好に生菌数を検出できると判断した。検討結果の例を示すと、MPN法による *C. jejuni* の生菌数検出では、全12検体中4検体が陽性と得られた。また、検出された検体での *C. jejuni* 菌数は0.04～0.12 MPN/gの範囲であり、1 MPN/gを超えた検体がなかった（図1）。この結果は検体25 g中に1～3個の *C. jejuni* が生菌（培養可能）として存在する検体が30%程度の確率であることを示している。

本結果で示されているMPN-PCR法では生菌（培養可能菌）のみを検出定量しており、*C. jejuni* のVBNC数を定量評価できているわけではない。リアルタイムPCR法の定量限界（ $\sim 10^3$  cells）を考えると、鶏肉を汚染している *C. jejuni* 菌数をEMA/PMAによる選択的に生菌/死菌定量は現実的に難しい。リアルタイムPCR法（選択なし）による総菌量とMPN-PCR法との差からも、死菌かVBNCかを判別定量することはできない。本研究での調査結果に加え、他の調査報告をみてもリアルタイムPCR法に

よる *C. jejuni* の検出菌数（総菌数、生菌・死菌・VNBC含む）は最大でも  $10^3$  CFU/g 程度であり、VNBC状態の菌がこの総菌数以上に検出されることはない。したがって、研究当初の仮説である、培養検出される生菌数以上に大量のVNBC状態の菌が潜んでいる、という仮説は否定されたことになる。

研究の当初予想は覆されたが、これまでに報告されている培養法を基盤とする鶏肉の *C. jejuni* 汚染実態の調査結果は、報告されている菌数中に仮に VNBC が一定量存在したとしても、汚染実態数そのものを変えるほどの影響はないことが確認できた。鶏肉の汚染実態としての VNBC の定量は困難ではあることが明らかとなった。

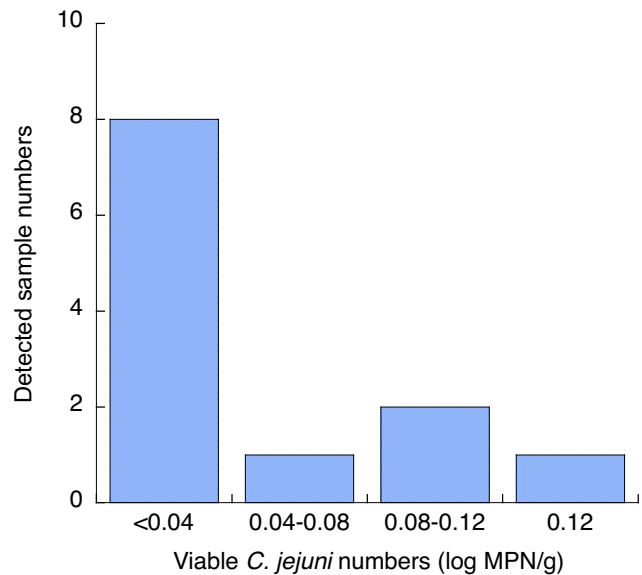


図1 市販鶏もも肉のMPN-PCR法により求めた *C. jejuni* 生菌数の分布

## 2 VBNC 状態への移行および VBNC からの蘇生回復条件の探索

(1) 個別課題：VBNC 状態のカンピロバクター細胞の効率的な捕集技術の確立（小関成樹（北海道大学大学院農学研究院））

細菌細胞が VBNC 状態であるかを検知する技術としては前述の培養法と EMA/PMA-PCR 法との組み合わせによって実現できるが、これらの方法では VBNC 状態の細菌細胞の経時的な状態観察は不可能である。なぜなら、蛍光色素染色による化学修飾を細胞に施してしまうことから、細胞本来の性質は損なわれてしまうからである。

そこで、色素などによる化学修飾を施さずに

VBNC 細胞を非侵襲のままに分離・捕集する技術が必要である。そのための技術として、誘電泳動法とマイクロ流路を組み合わせた分離・捕集方法が有効であると考えた（図2）。本方法の原理は、誘電特性の異なる粒子間（例えば、VBNC 細胞、生菌細胞と死菌細胞）の周波数応答の違いに基づき、各粒子に働く誘電泳動力の方向が異なるような周波数に設定することで電氣的に粒子同士の分離が可能となる。

誘電泳動法とマイクロ流路装置による損傷菌あるいは VBNC 細胞の分離・捕集方法を確立するために周波数特性、EMA/PMA-PCR 法との相関、蛍光顕微鏡による生死判別観察結果との相関とを確認した。供試材料として、*Campylobacter jejuni* (RIMD 0366027、RIMD0366042、RIMD0366048) を mCCDA (modified charcoal-cefoperazonedeoxycholate agar) 培地でそれぞれ画線塗末し、 $42^{\circ}\text{C}$  で 48 時間培養した。釣菌してボルトン培地へ加え、 $42^{\circ}\text{C}$  で 48 時間培養した。その後、リン酸緩衝液で洗浄し等量ずつ混合したものを実験に用いた。試料液は損傷・死滅を誘導するために、カンピロバク

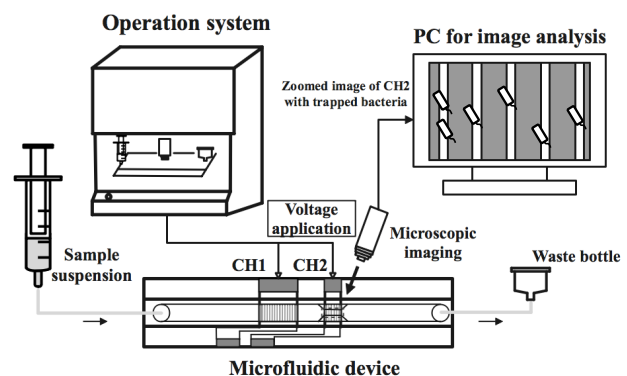


図2. 誘電泳動法とマイクロ流路実験装置の概略図

ターのような微好気性菌に適した培養環境として、アネロパック微好気（A-28、三菱ガス化学）で調整した微好気状態の角形ジャーにおいて 4°C および 37°C で保存した。菌数測定は mCCDA 培地を使用した培養法と ELESTA PixeeMo（AFI Corp.）を使用した誘電泳動法で行った。

はじめに EMA-PCR 法によって定量した生菌数と培養法によって定量した *C. jejuni* 数の変化を比較した（図 3）。37°C で保存した場合に 1 日経過後には培養法では生菌が検出できなくなったのに対して、EMA-PCR による検出では 4 日間の保存期間中に漸減するにとどまった。したがって、37°C で 1 日以上保存することで、*C. jejuni* は生きていますが培養できない VBNC 状態に移行していることが示された。このように特定の条件によっては、培養法と EMA-PCR 法による定量評価結果の差から、VBNC 数を定量評価することが可能であることが確認された。

次に波数 3 条件での誘電泳動法と培養法で計測した *C. jejuni* 数の変化を図 4 に示した。周波数 3 条件での誘電泳動法の測定結果を比較すると、3 条件全ての周波数において、保存 1 日で初期菌数より約 1 log 減っている。このことから、1 日で初期菌数のうち 90 パーセントの細胞が何らかの生理的、形態的な変化を生じたものと考えられる。保存 2 日目以降は、周波数 7 MHz では補足可能な菌数が減少して検出限界以下になった。一方で、5 MHz と 3 MHz では菌が検出され続ける。

図 4 に示した EMA-PCR 法による VBNC 菌数の変化と比較すると、5 MHz での検出数の推移の相関性が高いことが読み取れる。一般的に、誘電泳動による細胞の補足において、7 MHz のような高い周波数では生きていて活性の高い細胞のみが捕捉されることが報告されている。一方で、周波数が低くなると、死滅あるいは損傷によって活性が低下した細胞も捕捉される、とされている。3 MHz の低周波数での検出数変化が保存期間中に認められないことから、この周波数体では生菌も損傷菌も生菌も含めた総菌数が評価できているものと考えられる。それよりも高い周波数の 5 MHz では死菌は捕捉されないが、損傷状態の菌の補足が可能であることが示唆され、EMA-PCR 法による損傷菌検出と高い相関性が示されたものと考えられる。これらの変化中の生菌/死菌を細胞膜の健全性による評価を

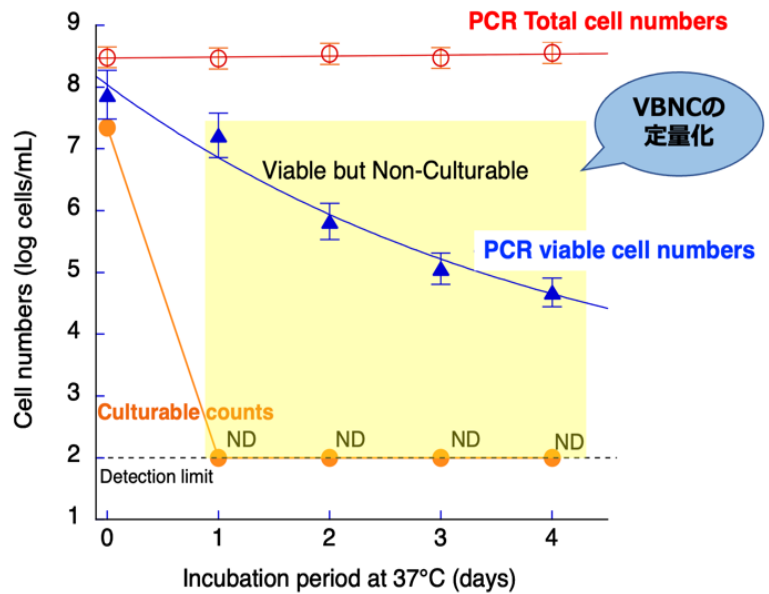


図 3. *C. jejuni* を 37°C で保存した際の EMA-PCR 法と培養法による生菌数計測結果の比較

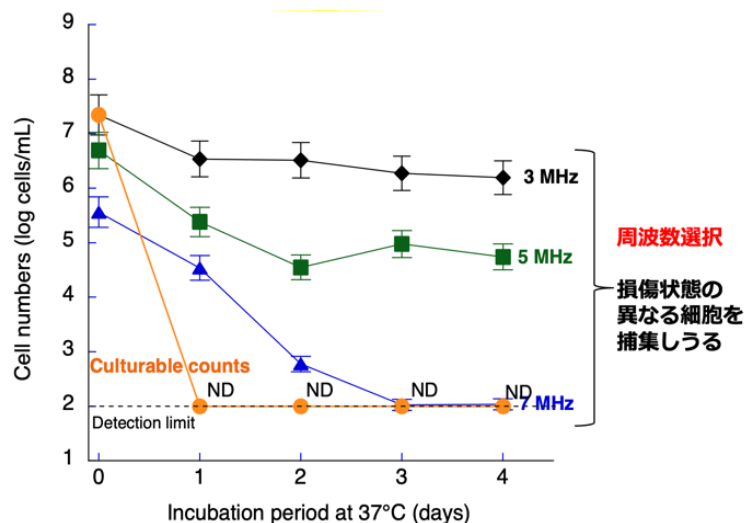


図 4. 微好気条件（酸素5%）37°C で保存した際の各測定方法における *C. jejuni* 数の変化。誤差範囲は 3 試料の測定結果の標準偏差を示す。N.D.: Not detected（検出限界以下）

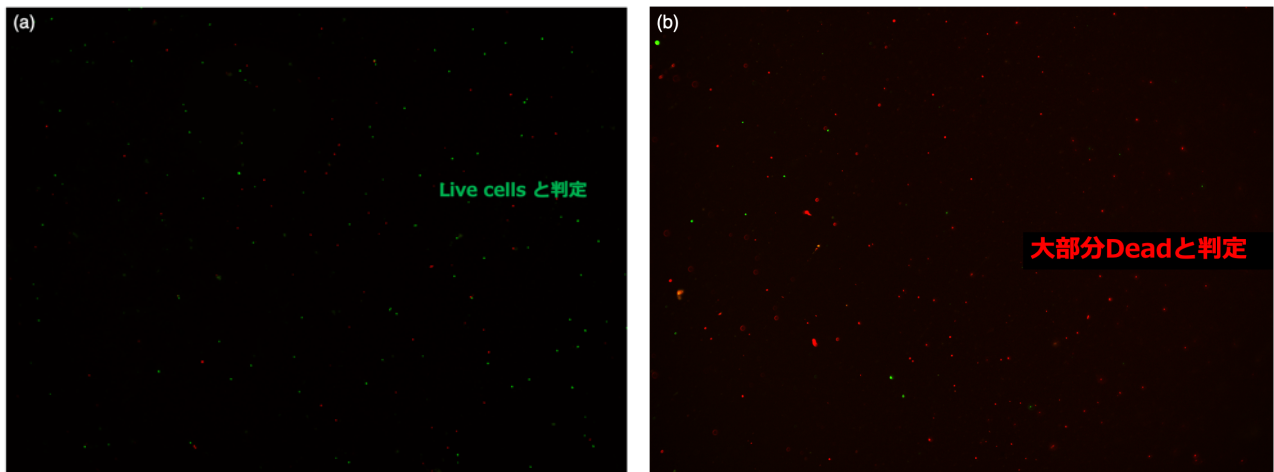


図5. 微好気条件（酸素5%）37°Cで保存中の*C. jejuni*の蛍光顕微鏡観察像 (a) 1日保存 (b) 3日保存。生菌は緑色に、死菌は赤色として観察される。

可能とする LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit を用いて蛍光顕微鏡による生死判別を観察した（図4）。本キットを用いることにより、無傷の細胞膜を有する細菌は、緑色蛍光で染色され、損傷した膜を有する細菌は、赤色傾向で染色されることから、その結果、37°Cで1日保存した*C. jejuni*は死菌（赤色）と判別される個体も一定数認められたが生菌（緑色）が多く認められていたが、3日目には大部分が死菌と判定されており、誘電泳動法による7MHzでの観察結果と近い挙動が認められた。このように、誘電泳動法による定量評価は用いる周波数によって、他の評価結果との相関性を認めることができることが明らかとなり、新たな評価系としての有用性が示された。

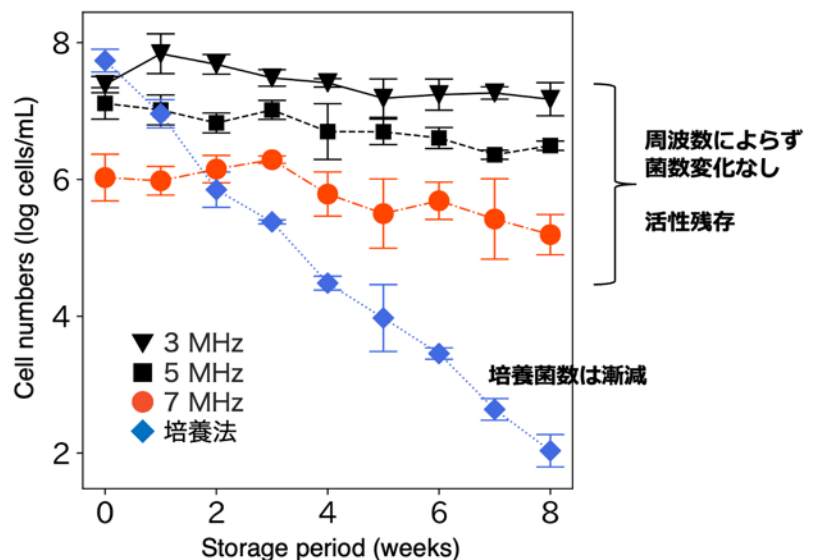


図6. 微好気条件（酸素5%）4°Cで保存した際の各測定方法における*C. jejuni*数の変化。誤差範囲は3試料の測定結果の標準偏差を示す。

一方、4°Cで保存した場合には、長期間にわたり損傷（VBNC）状態に変化することがなく、8週間保存した後も僅か

ながらも生菌として培養法で検出することができる状態であった（図6）。このような場合には、誘電泳動法による検出評価結果は、補足周波数に関係なく期間中を通して横ばいに推移していた。すなわち、培養可能な状態の菌体が存在している場合には、誘電泳動法による分離定量が難しいことが明らかとなった。すなわち、完全に培養不能な状態となることで、何らかの生理的、形態的な顕著な変化が生じることが、菌体の誘電特性を大幅に変化させることに繋がり、結果として分離定量が可能となるものと考えられた。

さらに、VBNC細胞の分離・捕集方法をより普遍的な方法として確立するために、流速、周波数特性とから生菌、死菌、VBNC状態の分離条件を明確化するために、*C. jejuni* (RIMD0366048) 1菌株を

使用して詳細な条件検討を行った。培養直後の菌液（生菌、培養可能菌）を誘電泳動法マイクロ流路装置に供すために、専用の緩衝液であるエレストバッファーで置換し、リン酸緩衝液を数滴加え導電率を $40 \pm 5 \mu\text{S/cm}$ に調整し、これを試料とした。この試料を適宜希釈した菌懸濁液を2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 MHzの周波数、0.005, 0.010, 0.015 mL/minの流速において、すべての周波数-流速条件下でそれぞれ総流量が 0.1 mLとなるように誘電泳動法マイクロ流路装置に供し、捕捉された菌数を測定した。また、検査後の廃液について、それぞれ培養法で菌数を計測し、全培養可能生菌数として、各条件下での捕捉率を求めた。今回は、捕捉率 = ELESTAでの捕捉菌数(cells/mL) / 全培養可能生菌数(CFU/mL)で定義した。

表1. 誘電泳動法マイクロ流路装置による*C. jejuni*生菌数補足における流速と周波数の影響

Frequency (MHz)	Captured cell numbers (log cells/mL)		
	Flow rate (mL/min)		
	0.005	0.010	0.015
2.0	6.95	6.65	5.95
2.5	6.93	6.30	5.40
3.0	6.76	6.26	4.13
3.5	6.76	6.05	2.98
4.0	6.54	5.54	2.85
4.5	6.46	4.94	2.28
5.0	6.32	4.56	2.43

Captured cells (cells/mL) = captured cell counts (cells/PCscreen)  $\times$  dilution rate / total flow rate (mL)

※Initial viable number: 7.42 log CFU/mL)

表2. 誘電泳動法マイクロ流路装置による*C. jejuni*生菌数補足率 (%)における流速と周波数の影響

Frequency (MHz)	Captured rate (%)		
	Flow rate (mL/min)		
	0.005	0.010	0.015
2.0	87.3	44.1	3.4
2.5	84.3	19.6	1.0
3.0	55.9	17.6	0.1
3.5	55.9	4.3	0.0
4.0	34.3	1.3	0.0
4.5	28.4	0.3	0.0
5.0	20.6	0.2	0.0

Capture rate (%) = Captured cells (cells/mL) / Cell counts in waste liquid (CFU/mL)

表1より、周波数が高く流速が速いほど捕捉できる培養可能生菌数は少なくなることがわかった。また、表2より、捕捉率も同様の特性を示した。また、もっとも生菌を捕捉している2 MHz-0.005mL/minの周波数-流速条件でもすべての菌を捕捉するには至っていないが、これは本誘電泳動力を利用したマイクロ流路内での電気ろ過技術の特性として、菌液が流れる流路に100  $\mu\text{m}$ 程度の厚みがあるのに対し、電極が流路底にある状態であり、すべての菌を捕捉することは原理的に不可能であることに起因している。

次に*C. jejuni*の死菌の補足特性を検討した。生菌液を121°Cで15分間オートクレーブにて加熱処理を施し死菌を作成した。この死菌液を生菌測定と同様に2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 MHzの周波数、0.005, 0.010, 0.015 mL/minの流速において、すべての周波数-流速条件下でそれぞれ総流量が0.1 mLとなるように誘電泳動法マイクロ流路装置に供し、捕捉された菌数を測定した。また、検査後の廃液について、それぞれ培養法で菌数を計測した。総菌数についても、オートクレーブにかける前の培養直後の菌液を用いて培養法で確認した。

表3. 誘電泳動法マイクロ流路装置による*C. jejuni*死菌数補足における流速と周波数の影響

Frequency (MHz)	Captured cell numbers (log cells/mL)		
	Flow rate (mL/min)		
	0.005	0.010	0.015
2.0	4.20	2.08	N.D.
2.5	4.03	N.D.	N.D.
3.0	2.51	N.D.	N.D.
3.5	1.70	N.D.	N.D.
4.0	N.D.	N.D.	N.D.
4.5	N.D.	N.D.	N.D.
5.0	N.D.	N.D.	N.D.

Captured cells (cells/mL) = captured cell counts (cells/PCscreen) × dilution rate / total flow rate (mL)

N.D. Not detected

死菌についても周波数が高く流速が速いほど捕捉死菌数は低下した（表3）。生菌と死菌の補足特性を比較すると、流速を0.005 mL/minとして、周波数を4 MHz以上に設定することで、死菌を補足することなく、生菌だけを補足可能であることが定量的に示された。この結果をもとにして、乾燥ストレスによって培養不能になった*C. jejuni*を培養法と誘電泳動法マイクロ流路装置による補足菌数とを比較した（図7）。

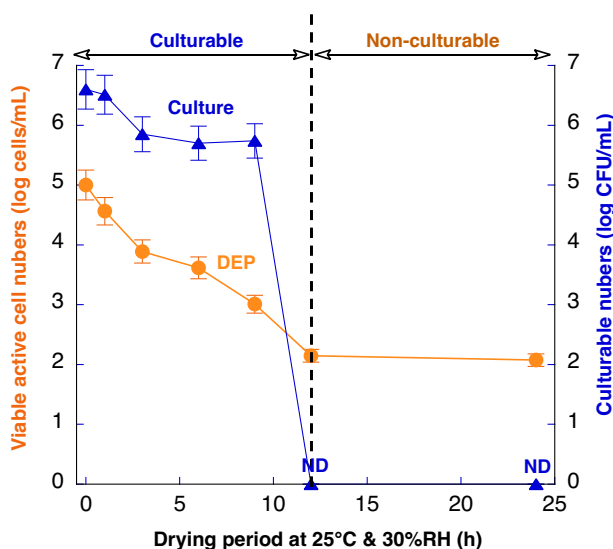


図7 乾燥に伴う培養可能菌数と誘電泳動法（5 MHz）での補足菌数との関係

この結果から、乾燥に伴い培養法では検出できなくなる12時間後においても、誘電泳動法（5 MHz）

では $10^3$  cells/mL 程度の細菌が捕捉されていた。この結果は死菌が捕捉されない誘電泳動条件で捕捉されている生菌として捉えられており、培養不能な状態であるにもかかわらず、生きている菌（VBNC状態）として補足できることが示された。本結果は後述するリアルタイムPCRによるVBNC検出と若干の差異があることから、この差異の原因を探る必要がある。さらに、今後は乾燥ストレスによるVBNCだけでなく、薬剤処理と加熱殺菌によるストレスによって誘導されるVBNCについても補足可能性を検討する。

次に加熱に伴う VBNC 発生の補足分離を検討した。図 8 は 121 °C で 15 分間の加熱による培養法での培養可能生菌数の変化を示したものである。横軸は加熱処理前と処理後を表し、縦軸は 1 mL あたりの培養可能な生菌数の常用対数値を表している。3 反復における測定結果の平均値をプロットし、それぞれに 3 反復における標準偏差を表すエラーバーを付した。図中の波線は検出限界（1 log CFU/mL）を示す。加熱処理前は培養可能な生菌数が約  $10^8$  CFU/mL であったが、加熱処理により検出限界以下にまで減少した。このことから 121 °C で 15 分間の加熱処理により、培養可能であった生菌はすべて死菌に変化し、菌液中には約  $10^8$  CFU/mL の死菌が存在していることが考えられる。

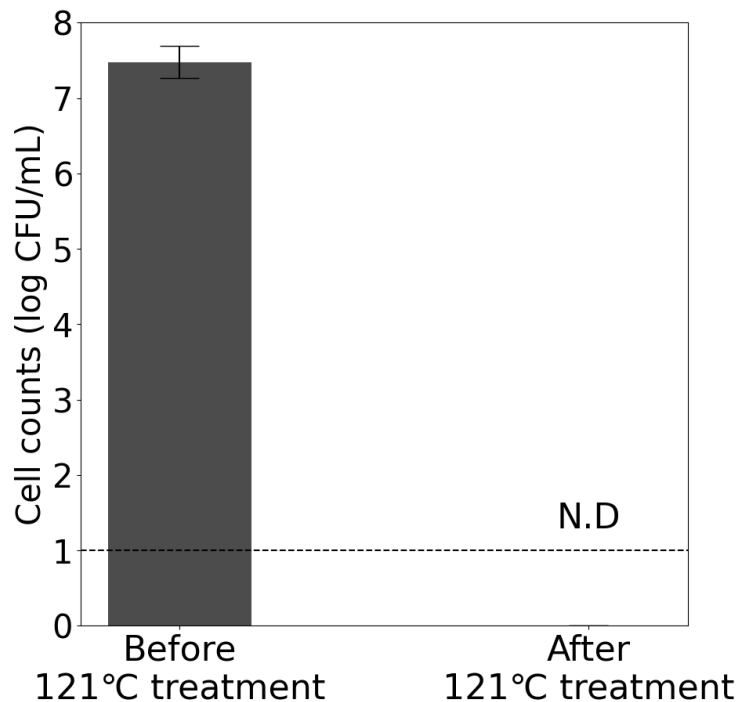


図 8 121 °C で 15 分間の加熱による培養可能な *C. jejuni* 菌数の変化。N.D.: Not detected

図9は121 °Cで15 分間加熱した *C. jejuni* の誘電泳動法による捕捉特性を示したものである。横軸は周波数を表し、縦軸は1 mLあたりの捕捉した *C. jejuni* 菌数の常用対数値を表している。ただし、最も左の棒グラフは加熱処理前における培養法での1 mLあたりの培養可能生菌数の常用対数値を表す。測定値の平均値をプロットし、標準偏差をエラーバーで表した。2 MHz から3.5 MHzまでの周波数条件では *C. jejuni* が捕捉された。図9より、菌液中には約  $10^8$  CFU/mLの死菌が存在していることから、捕捉された菌は死菌であることが考えられる。また、周波数の上昇に伴い捕捉可能な *C. jejuni* の菌数は減少し、4.0 MHz以上の周波数条件では、121 °Cで15 分間の加熱により死菌となった *C. jejuni* は検出されなかった。

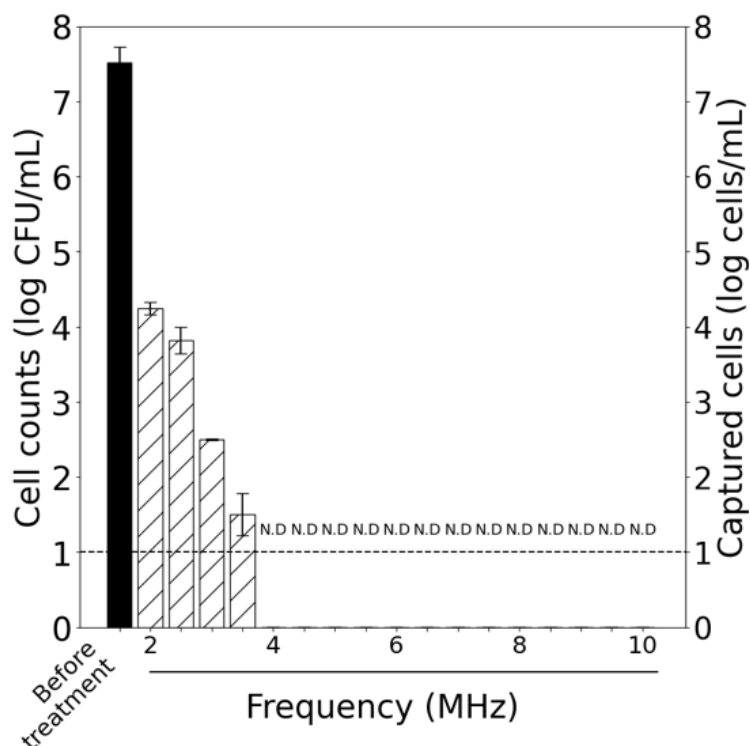


図9 121 °Cで15 分間加熱した *C. jejuni* (死菌) の誘電泳動法による捕捉菌数に及ぼす周波数の影響。

次にVBNCを誘導するための条件として、50 °Cで *C. jejuni* を加熱した時の加熱時間と、培養可能生菌数の関係を示した(図10)。横軸は加熱時間を表し、縦軸は1 mLあたりの培養可能な生菌数の常用対数値を表す。3 反復における測定結果の平均値をプロットし、それぞれに3 反復における標準偏差を表す誤差範囲(エラーバー)を付した。図中の波線は検出限界(1 log CFU/mL)を示す。加熱時間の増加とともに培養可能な生菌数が減少し、35 分間の加熱で検出限界以下となった。したがって、50 °Cで35 分間の加熱は培養可能生菌が存在しなくなる境界であり、VBNC状態に誘導する加熱ストレス強度として最も適していることが考えられる。以上の結果より、50 °Cで35 分間の加熱により、*C. jejuni* のVBNC状態への誘導を行い、誘電泳動による捕捉試験を実施することとした。

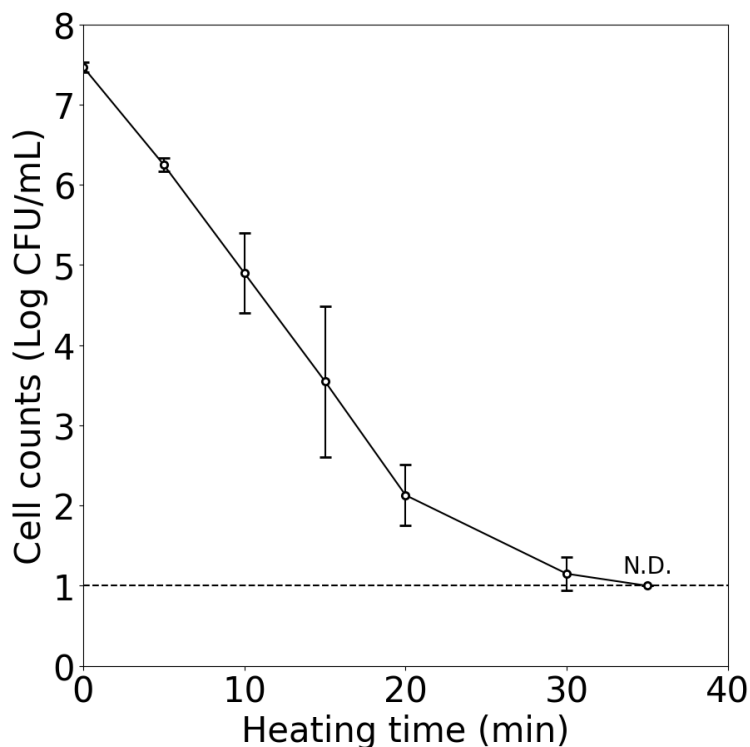


図10 50 °Cでの加熱による時間と培養可能生菌数の関係

図11は50 °Cで15 分間加熱した*C. jejuni*の誘電泳動法による捕捉特性を示したものである。横軸は周波数を表し、縦軸は1 mLあたりの捕捉した*C. jejuni*菌数の常用対数値を表している。ただし、最も左の棒グラフは加熱処理前における培養法での1 mLあたりの培養可能生菌数の常用対数値を表す。測定値の平均値をプロットし、標準偏差をエラーバーで表した。全ての周波数条件において*C. jejuni*が捕捉された。図8より、菌液中には培養可能な生菌が存在しないことから、捕捉された*C. jejuni*は死菌もしくはVBNCであることが考えられる。また図9より、4.0 MHz以上の周波数条件では、死菌となった*C. jejuni*は検出されなかったことから、図11の死菌とVBNCが混在する菌液の捕捉において、4.0 MHz以上の周波数条件では、VBNC状態の*C. jejuni*のみを分離し、捕捉・定量したことが示唆された。周波数の上昇に伴い捕捉可能な*C. jejuni*の菌数の減少したことから、4.0 MHzで*C. jejuni*を捕捉すると、VBNCを最も多く定量できることが考えられる。

また、図12は培養法と誘電泳動法による50 °Cで35分間の加熱処理前後の検出菌数を比較したものである。加熱処理前の細菌については、いずれの手法においても検出された。一方で、加熱処理後の細菌については、培養法では検出限界以下となったことが確認され、誘電泳動法のみにより検出された。周波数条件は死菌を捕捉しない4 MHzにおける結果であることから、従来の培養法では検出できないVBNCを検出し、分離できたことが示唆された。

誘電泳動とマイクロ流路装置の複合技術を用いたVBNCの分離は、本実験で行ったように死菌とVBNCの混在菌と、死菌のみからなる菌の周波数による捕捉特性を比較することで可能とした。しかし、これは直接的にVBNC状態の細菌を確認できたわけではない。あくまでも、捕捉した細菌が培

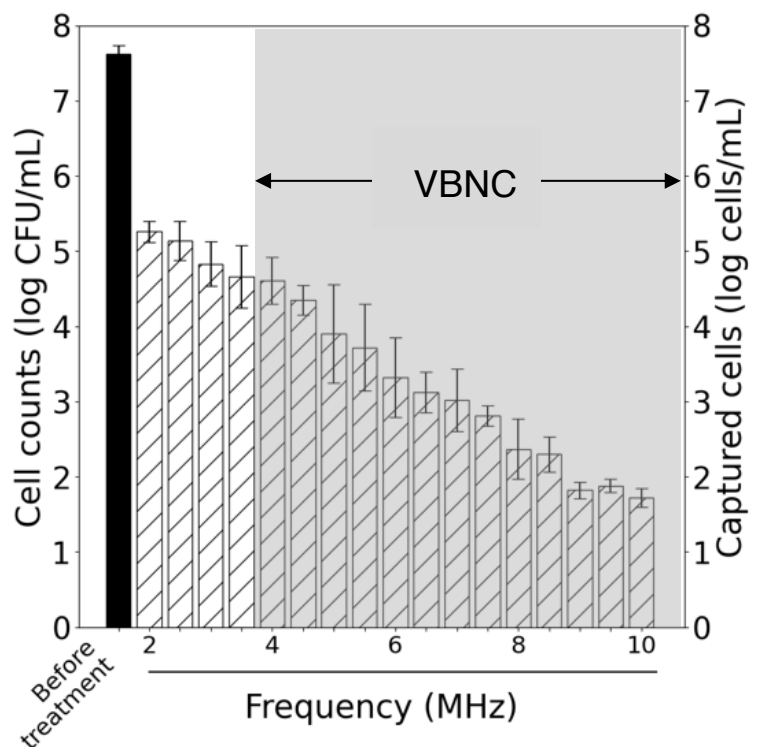


図11 50 °Cで35 分間加熱した*C. jejuni* (死菌とVBNCが混在)の誘電泳動法による捕捉菌数に及ぼす周波数の影響

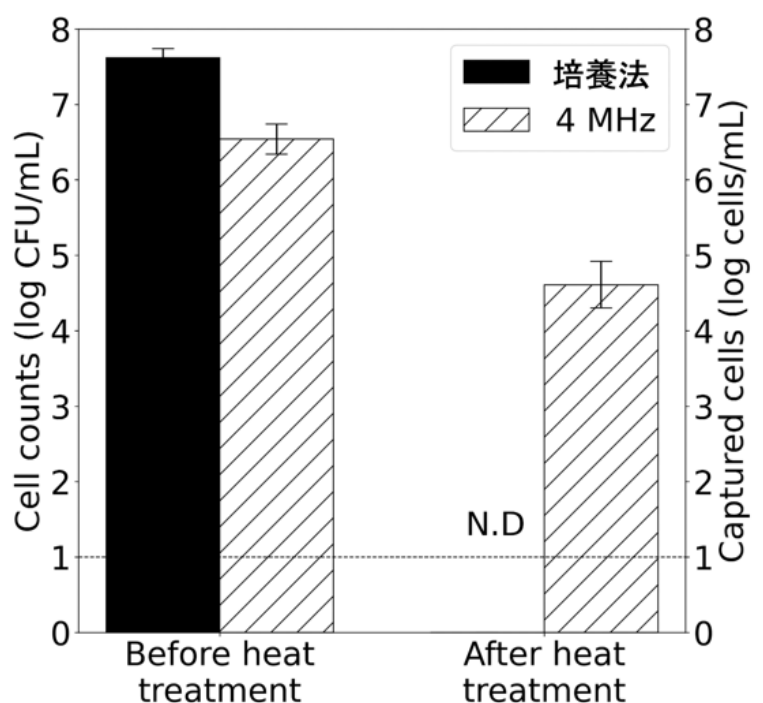


図12 培養法と誘電泳動法による50 °Cで35分間の加熱処理前後の検出菌数

養可能な生菌ではないことを培養法の結果から確認し、死菌ではないことを誘電泳動法による捕捉特性の結果と比較することで、消去法的にVBNC状態の細菌とであることを示したにすぎない。

そこで、本実験で分離できたカンピロバクターがVBNCであること確認するために、分離補足した細菌細胞を後述するPMA-qPCR法によるVBNCの定量を行った。その結果、本手法で分離したVBNC（と判断される）菌数とPMA-qPCR法によって定量した菌数が高い精度で一致することが明らかとなった。したがって、誘電泳動とマイクロ流路装置を用いた手法は化学修飾を施すことなくラベルフリーでVBNCを分離定量可能とする新たな方法として極めて有力である。

しかし、本研究で用いた手法の問題点としては、死菌とVBNCを分離可能と考えられる死菌捕捉の限界周波数条件が、細菌の種類や死菌の調製方法によって異なることが予想されるという点である。細菌の種類や死菌の調製方法により、細胞膜に異なった損傷を与えると考えられるためである。そのため、今回は121℃で15分間の加熱により死菌を調製し、50℃で35分間の加熱により誘導したVBNCの捕捉特性と比較したが、例えば50℃で長時間の加熱により調製した死菌の捕捉特性と今回調製した死菌との比較や、加熱以外の塩素や乾燥などにより調製した死菌との比較を行い、死菌の調製法ごとに異なった捕捉特性が存在するかを明らかにする必要がある。さらに今後、*C. jejuni*以外のVBNC状態の細菌の分離を目指す場合は、研究目的に従い、対象とする細菌ごとに今回と同様な手法を用いて捕捉特性を検討する必要がある。

### 3 VBNC状態への移行およびVBNCからの蘇生回復条件の探索

#### (1) 個別課題個別課題：VBNCへの移行条件の検討（小関成樹（北海道大学大学院農学研究院））

培養可能生菌とVBNC状態の菌の両方を検出するために有用な方法として、PCR（Polymerase Chain Reaction）法または定量PCR（qPCR）法が挙げられる。しかし、PCR法は食中毒を引き起こさない非生存細胞由来のDNAも増幅してしまう問題がある。そこで、生菌のみを検出するためにPCRまたはqPCR法と蛍光色素であるpropidium monoazide（PMA）を用いた処理を組み合わせた方法が、近年提案されている（Zeng et al., 2016）。

PMAは、損傷した細胞壁および細胞膜を通して死菌にのみ侵入し、DNAに結合することで、PCR法によるDNA増幅を阻害することができる。生菌のみを定量する他の手法としてはPMAと同様の原理で作用するethidium monoazide（EMA）を用いた方法があるが、EMA処理はPMA処理に比べ、生菌を部分的に透過してしまうことからPMA処理が一般的に利用されている（Nocker et al., 2006）。近年、生細胞の選択的な検出を向上させるために、PMA Enhancer for Gram-negative bacteria（Biotium, Inc.）が販売されている。しかし、*C. jejuni*においてPMAとPMA Enhancerを併用することでVBNC状態の菌の検出が阻害されている可能性があることが示されている（Okada et al., 2023）。そのため、本実験ではPMA Enhancerを使用しないPMA-qPCR法を行った。

PMA-qPCR法で定量した菌はVBNCと培養可能生菌の2つの状態を含む生菌である。従来の培養法によって定量できる菌は培養可能生菌であるため、PMA-qPCR法と培養法で定量した菌数を比較することで、VBNCの菌数を定量することができると考えられる。

本研究では、上記で説明したPMAとPCR法を組み合わせたPMA-qPCR法と培養法による定量で、*C. jejuni*のVBNCの検出および定量が可能であるか検討し、さまざまなストレスを与えた菌に対して培養法およびPMA-qPCR法での菌数測定を行うことで、VBNC菌の検出と定量が可能であるか、また、環境ストレスが*C. jejuni*へ与える影響を検討した。

供試細菌には、*Campylobacter jejuni* (RIMD0366048)を使用した。この菌株は、大阪大学微生物研究所（Research Institute for Microbial Diseases: RIMD）より入手した。RIMD0366048はギラン・バレー

症候群の原因菌である。一部の実験では複数菌株を用いて実験をしており、*C. jejuni* 3 菌株(RIMD0366027, RIMD0366042, RIMD0366048) を用いた。-80 °Cで保管されている菌体をmCCDA (modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar) 平板に白金耳で画線塗抹し、アネロパック微好気(三菱ガス化学、A-28)で調整した微好気条件下(酸素濃度6~12%、二酸化炭素濃度5~8%)で42 °Cで48時間培養した。mCCDA平板上に発育した細菌のコロニーを白金耳により回収し、ボルトン液体培地10mL中で微好気条件下、42 °Cで48時間培養した。ボルトン液体培地は、0.2 μm孔径フィルター滅菌(ザルトリウス、S6534-FMOSK)を行ってから使用した。培養には、どちらも42 °Cに設定した恒温器 (EYELA 東京理化工業株式会社、SLI-400) を用いた。培養した菌液を、3000 ×gで10分間遠心分離 (サーモフィッシュャーサイエンティフィック、Sorvall ST 8 Centrifuge) したのちD-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) で洗浄した。洗浄は3回行なった。塩素実験等の一部鶏肉加工工程を再現するためにタンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA) を用い、3回目の洗浄を、100 mg/mLウシ血清アルブミン (BSA) 10 mLで行った。

本実験では、食品加工における殺菌や流通の際の乾燥でのストレスを*C. jejuni*に与えることで塩素ストレスや乾燥ストレスを検討した。ストレスを与えた菌の菌数はリアルタイムPCR法と培養法により算出した。培養法では、菌液をD-PBSで適宜10倍段階希釈した後に、mCCDA培地に100 μLまたは1000 μL塗抹し、42 °Cに設定した恒温器 (EYELA 東京理化工業株式会社、SLI-400) で培養を行い、48時間培養後に発生したコロニー数を生菌数とした。

以下の3つのストレス処理によって、VBNCへの誘導を行った。

#### 1) 次亜塩素酸ナトリウムによる塩素ストレス

日本の食鳥処理工程において、鶏肉殺菌に使われている次亜塩素酸ナトリウムで塩素処理を行った。高濃度の次亜塩素酸ナトリウムを用いた実験では、殺菌時の有機物である鶏肉の存在を再現するために、100 mg/mLのBSA 10 mLで洗浄を行った菌液も実験に供した。

次亜塩素酸ナトリウムの調製は、滅菌純水を用いて希釈を行なった。希釈後の濃度は塩素濃度計 (東亜ディーケー株式会社、DR300) を用いて規定の濃度となっているか確認をした。

100および50 ppm次亜塩素酸ナトリウム8 mLに100 mg/mLのBSA 10 mLで懸濁した*C. jejuni*菌液を1 mL混合した。混合後、3分後に50 mMのチオ硫酸ナトリウム1 mLを混合することで、塩素反応を止めた。塩素処理を行わないサンプルには、次亜塩素酸ナトリウム8 mLに対してチオ硫酸ナトリウム1 mLを先に混合することで塩素を失活させてから菌液を混合することで、コントロールとした。塩素の失活には塩素濃度計 (東亜ディーケー株式会社、DR300) で濃度の確認を行なった。

低濃度である10および5 ppm次亜塩素酸ナトリウムを用いた実験では、100 mg/mLのBSA 10 mLで洗浄を行っていない菌液を用いて上記と同様の実験を行った。

これらの混合した溶液10 mLを培養法とPMA-qPCR法を用いて培養性と生存率を評価した。

#### 2) 過酢酸によるストレス

日本の鶏肉殺菌において使われている過酢酸で塩素処理を行った。過酢酸の調製は、滅菌純水を用いて希釈を行なった。

1000および300 ppm過酢酸8 mLに*C. jejuni*菌液(RIMD0366027, RIMD0366042, RIMD0366048)を1 mL混合した。混合後、3分後に50 mMのチオ硫酸ナトリウム1 mLを混合することで、塩素反応を止めた。塩素処理を行わないサンプルには、次亜塩素酸ナトリウム8 mLに対してチオ硫酸ナトリウム1 mLを先に混合することで塩素を失活させてから菌液を混合することで、コントロールとした。

これらの混合した溶液10 mLを培養法とPMA-qPCR法を用いて培養性と生存率を評価した。

#### 3) 乾燥によるストレス

作成した菌液100  $\mu\text{L}$ を48wellプレート (Falcon、353078) に滴下し、プレートを乾燥機 (静岡製機株式会社、DSJ-miniを用いて25  $^{\circ}\text{C}$ 、湿度30 %で1, 3, 6, 9, 12, 24時間通風乾燥させた。乾燥菌体をD-PBS 1 mLで再懸濁し、この1 mLを培養法とPMA-qPCR法を用いて培養性と生存率を評価した。また、乾燥させないものは懸濁をせずに、菌液1 mLを培養性とPMA-qPCR法に用いて評価した。

#### 4) 加熱によるストレス

供試細菌として患者および患者糞便から分離された *C. jejuni* (RIMD0366048) を使用した。PMA-qPCR 法において PMA 処理での効果が 5 log CFU/mL 程度のため、培養後の菌濃度を 5 log CFU/mL 程度となるように希釈した。加熱ストレスとして、菌液 100  $\mu\text{L}$ を96well PCR プレートに分注し、サーマルサイクラーを用いて 50  $^{\circ}\text{C}$ 、30 分加熱し、加熱終了後直ちに 4  $^{\circ}\text{C}$  で冷却した。加熱後、菌液を回収し培養法とPMA-qPCR 法により培養性及び生存率評価を行った。

様々な濃度の細胞を含むサンプル160  $\mu\text{L}$ に、40  $\mu\text{L}$ のD-PBSを添加した。その後、PMAxx<sup>TM</sup>溶液 (H<sub>2</sub>O中20 mM ; Biotium, Inc.) を最終濃度25  $\mu\text{M}$ になるように200  $\mu\text{L}$ のサンプルに添加した。サンプルを混合し、恒温器 (EYELA 東京理化学器械株式会社、SLI-400) を用いて、37  $^{\circ}\text{C}$ の暗所で10分間インキュベートした後、15分間光照射 (タカラバイオ株式会社、EM300) し、PMAxx<sup>TM</sup>を活性化した。これを1回のPMA処理とした。複数回のPMA処理を行うために、サンプルを8,000  $\times$  gで10分間、4  $^{\circ}\text{C}$ で遠心分離 (久保田商事株式会社、3520) し、菌体ペレットを160  $\mu\text{L}$ のD-PBSに再懸濁し、上記のように25  $\mu\text{M}$  PMAxx<sup>TM</sup>で処理を行った。本実験では、計3回のPMA処理を行った。

DNA抽出はDNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen、69504)を用いた。サンプルを300  $\times$  gで5分間遠心分離 (久保田商事株式会社、3520) し、菌体ペレットをD-PBS200  $\mu\text{L}$ で再懸濁後、20  $\mu\text{L}$ のProteinase K、200  $\mu\text{L}$ のBuffer ALを添加し、混合した。混合後、ヒートブロック (日本ジェネティクス株式会社、MiniC-100) により56  $^{\circ}\text{C}$ で10分間インキュベートした。インキュベート後、200  $\mu\text{L}$ のエタノールを添加し、混合後、コレクションチューブ中のDNeasy Mini Spin Columnに移し、6000  $\times$  gで1分間遠心操作 (久保田商事株式会社、3520) を行なった。遠心分離後、DNeasy Mini Spin Columnのみを新しいコレクションチューブに移し、500  $\mu\text{L}$  Buffer AW1を添加し、混合後、6000  $\times$  gで1分間遠心操作 (久保田商事株式会社、3520) を行なった。さらに、遠心分離後、DNeasy Mini Spin Columnのみを新しいコレクションチューブに移し、500  $\mu\text{L}$  Buffer AW2を添加し、混合後、20000  $\times$  gで3分間遠心操作 (久保田商事株式会社、3520) を行なった。遠心分離後、DNeasy Mini Spin Columnのみを1.5マイクロチューブに移し、100  $\mu\text{L}$ のBuffer AEをDNeasyメンブレン上に直接添加後、6000  $\times$  gで1分間遠心操作 (久保田商事株式会社、3520) を行なった。DNA収量を最大にするために、Buffer AEを添加する作業を2度行い、100  $\mu\text{L}$ の溶出量を得た。

抽出したDNAは、Thermal Cycler Dice Real Time System III (タカラバイオ株式会社、TP950) を用いて、qPCR解析に使用した。カンピロバクターの定量を行うために、特定のプライマーとプローブを使用した (表4)。GoTaq<sup>®</sup> Probe qPCR Master Mix (Promega、A6102) を用いて、抽出したDNA2  $\mu\text{L}$ を含む最終容量20  $\mu\text{L}$ にPCR混合物を調製した (表5)。調整の際の混合には、小型簡易遠心機 (株式会社ニチリョー、00-NCF+) を用いて行なった。サーマルサイクリングは95  $^{\circ}\text{C}$ -2分を1サイクル、95  $^{\circ}\text{C}$ -3秒、60  $^{\circ}\text{C}$ -30秒を40サイクルで実施し、データは各サイクルの終了時に測定した。

菌濃度の絶対定量を行うために、濃度既知のカンピロバクター菌液を用意し、菌濃度と Ct 値との相関関係を表す検量線を作成した。作成した菌液の一部を菌濃度確認のためにmCCDA培地で培養し、残りはヒートブロック (日本ジェネティクス株式会社、MiniC-100) において95  $^{\circ}\text{C}$ で5分間加熱することにより死菌液とした。PCR 実験ではこの死菌液を4 段階に希釈し、PMA 処理を行わずPCR にかけることで検量線を作成した。作成した検量線を用いて測定したCt値から、菌濃度を算出した。

表 4 本実験で用いたプライマーおよびプローブ

Primer or Probe	塩基配列 (5'-3')	遺伝子
CampF2	CACGTGCTACAATGGCATAT	16S rRNA
CampR2	GGCTTCATGCTCTCGAGTT	
CampP2	FAM-CAGAGAACAATCCGAACTGGGACA-BHQ1	

表 5 PCR 混合物の容量

Component	Volume
GoTaq Probe qPCR Master Mix	10.33 $\mu$ L
Forward Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
Hydrolysis Probe (10 $\mu$ M)	0.2 $\mu$ L
Template DNA	2 $\mu$ L
Nuclease-Free Water	6.67 $\mu$ L

## 結果および考察

### 1) 次亜塩素酸ナトリウムによる塩素ストレスでのVBNC誘導

図13はカンピロバクター菌液を100 ppm、50 ppmの次亜塩素酸ナトリウムで3分間塩素処理を行い、培養法とPMA-qPCR法により計測した菌数を示した図である。培養法で検出した菌数がPMA-qPCR法よりも少ない場合、PMA-qPCR法と培養法で検出した菌数の差がVBNC状態の菌数であると考えられる。

100 ppm次亜塩素酸ナトリウムで塩素処理を行った場合、PMA-qPCR法では生菌数が4log CFU/mL程度存在したのに対し、培養法では検出限界以下であった。これにより、100 ppmで塩素処理を行うことで、培養可能生菌がVBNCへと状態を移行していると考えられる。

50 ppm次亜塩素酸ナトリウムで塩素処理を行った場合にも同様に、PMA-qPCR法では検出されたが、培養法では検出されないという結果が得られた。これにより、濃度を下げた50 ppmでも同様に一部の培養可能生菌がVBNC状態へと移行したと考えられる。また、100 ppmおよび50 ppmのどちらでも一部の培養可能生菌がVBNC状態へと移行したため、次亜塩素酸ナトリウムによる塩素処理を行なった菌液は死菌およびVBNCで構成された菌であると考えられる。

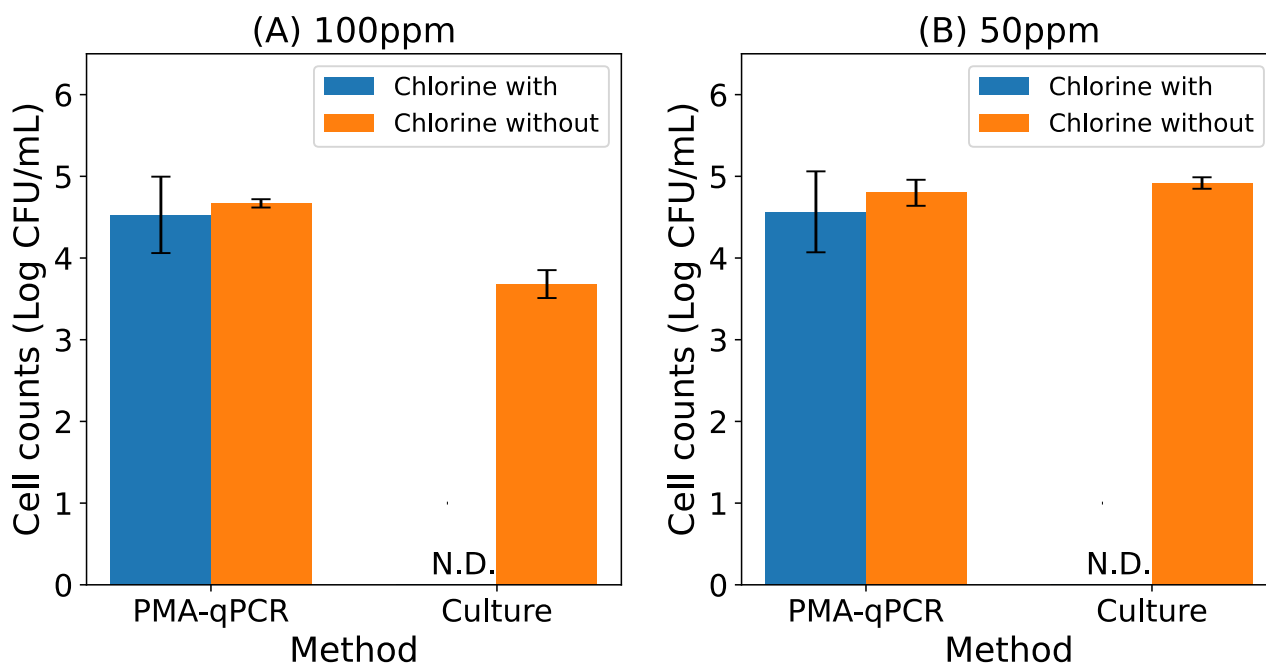


図 13 100, 50 ppm 次亜塩素酸ナトリウムで塩素処理を行った菌液での培養法と PMA-qPCR 法により得られた菌数の比較

また、次亜塩素酸ナトリウムの濃度に着目してみると、濃度の違いによって生菌数に変化は見られなかった。これは、溶液中に有機物であるBSAが豊富に存在することで、次亜塩素酸ナトリウムによる塩素殺菌効果が低下しており (Virto et al., 2005) 本実験で用いた次亜塩素酸ナトリウムの濃度では、有機物が豊富な条件では十分な殺菌作用を示せなかったことが考えられる。より高濃度の次亜塩素酸ナトリウムや、*C. jejuni*に対して次亜塩素酸ナトリウムよりも高い殺菌作用のある (Weerasooriya G et al., Food Control 2022) 酸性化亜塩素酸ナトリウムを使用することで、培養可能生菌をVBNCへと状態を変化させることなく死菌へと誘導することができる可能性がある。一方で、EUのように健康および安全上の理由から、除菌剤の使用を禁止した場合、より食中毒のリスクが高まると考えられる。

また、本実験で用いた菌株RIMD0366048が次亜塩素酸ナトリウムに対して塩素耐性を持つ菌株である可能性もある。そのため、複数菌株や菌株を混合した菌液を用いて同様の実験を行うことで、*C. jejuni*菌の塩素ストレスに対する影響の傾向を検討することができると思われる。

図14と15はカンピロバクター菌液を100 ppm、50 ppmの次亜塩素酸ナトリウムで3分間塩素処理を行い、培養法とPMA-qPCR法により計測した菌数を示した図である。

10, 5 ppm どちらの場合でも処理を行うと培養法では測定ができなかったものの、PMA-qPCR 法では検出ができ、生菌数が4log CFU/mL程度存在した。PMA-qPCR 法での測定では生菌数にあまり差がなかったため、塩素処理により培養能力だけが失われ、生存はし続けていると考察できる。

菌株数に着目しても、菌株数の差によって生菌数などの定量性に違いは見られなかった。殺菌剤等

のストレスでは、自然要因系のストレスと異なり、菌株間に違いがあまり見られないと考えられているためと考えられる。

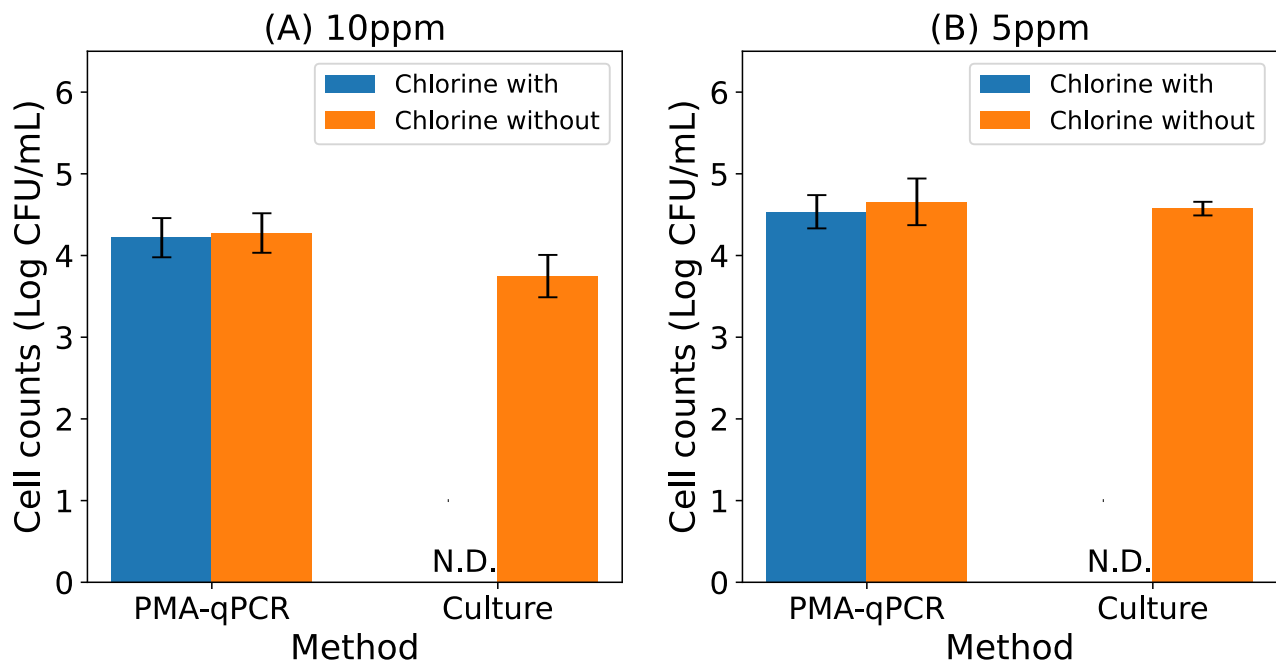


図 14 10, 5 ppm 次亜塩素酸ナトリウムで塩素処理を行った 1 菌株 (RIMD0366048) 菌液での培養法と PMA-qPCR 法により得られた菌数の比較

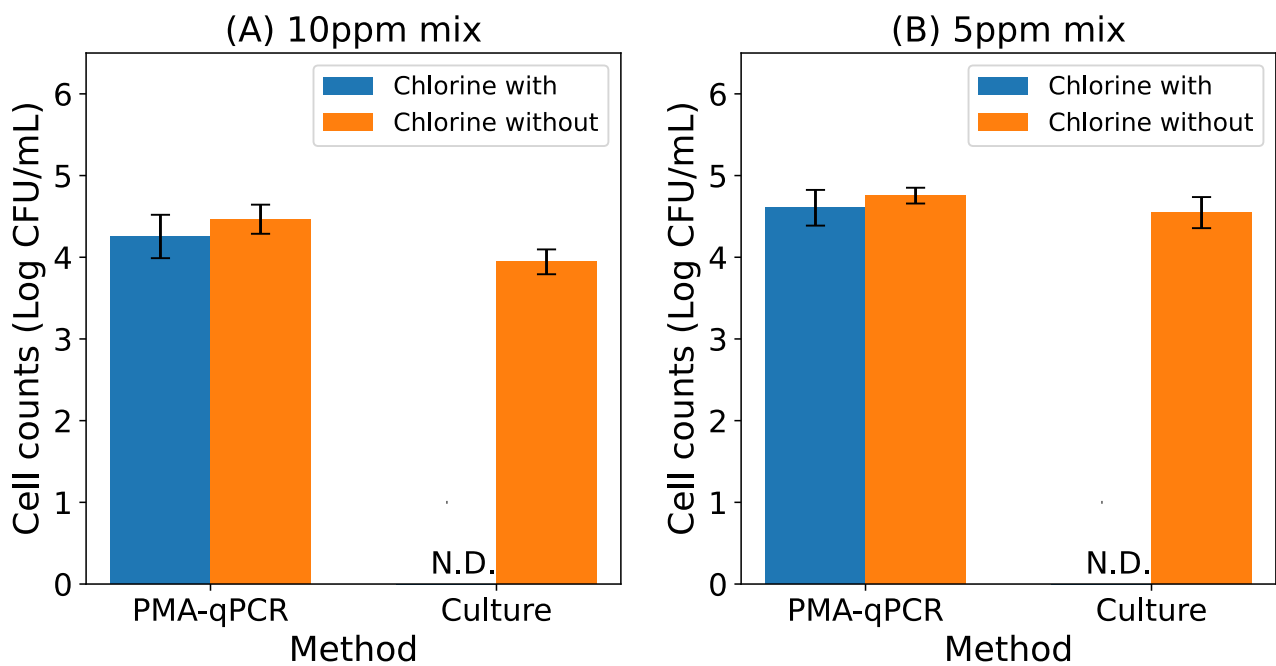


図 15 10, 5 ppm 次亜塩素酸ナトリウムで塩素処理を行った 3 菌株 (RIMD0366027, RIMD0366042, RIMD0366048) 菌液での培養法と PMA-qPCR 法により得られた菌数の比較

## 2) 過酢酸による塩素ストレスでのVBNC誘導

図16はカンピロバクター菌液（RIMD0366027, RIMD0366042, RIMD0366048）を300 ppmおよび1000 ppmの過酢酸で3分間塩素処理を行い、培養法とPMA-qPCR法により計測した菌数を示した図である。

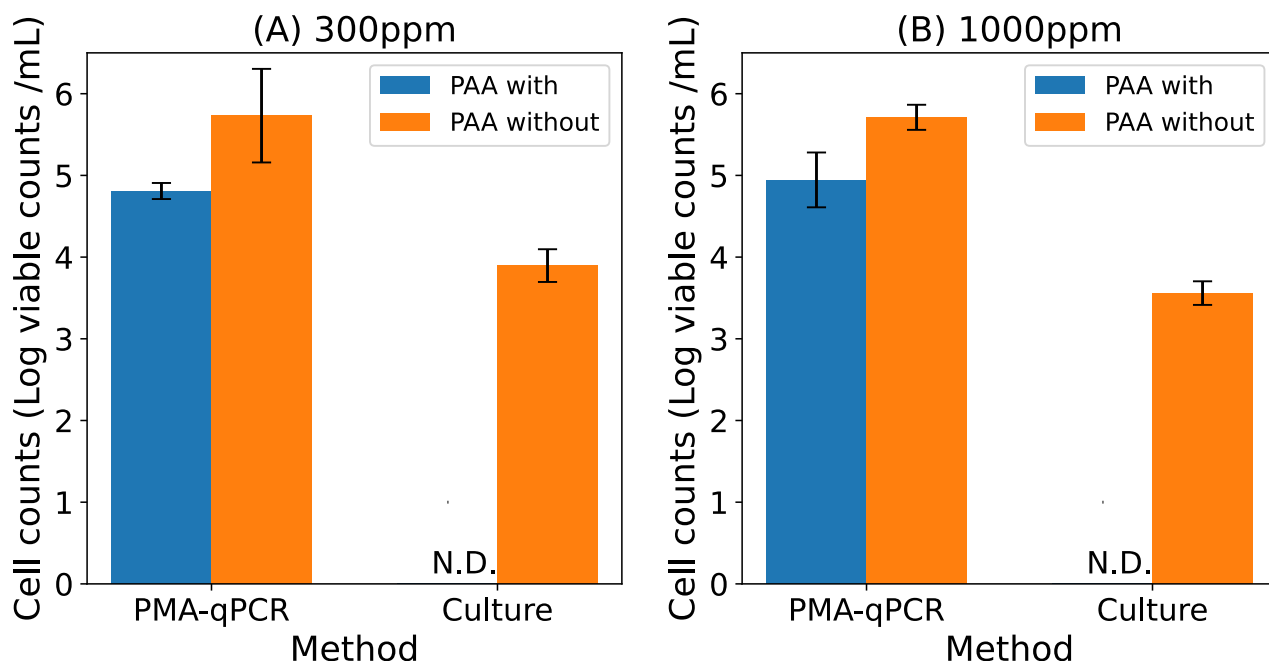


図 16 300, 1000 ppm 過酢酸で塩素処理を行った  
3 菌株（RIMD0366027, RIMD0366042, RIMD0366048）菌液  
での培養法と PMA-qPCR 法により得られた菌数の比較

300 ppm, 1000 ppmのどちらの濃度でも処理した場合、培養法では検出されなかったもののPMA-qPCR法では5log CFU/mLが検出された。次亜塩素酸ナトリウムの処理実験と同様に、PMA-qPCR法と培養法での検出できる状態の違いに着目すると、これらの濃度では殺菌後もカンピロバクターが存在していると考えられる。

## 3) 大気環境下における乾燥ストレスでのVBNC誘導

図17, 18はカンピロバクター菌液を大気環境下で乾燥機（静岡製機株式会社、DSJ-mini）を用いて1、3、6、9、12、24時間乾燥させ、培養法とPMA-qPCR法により計測した生菌数である。図17は1菌株（RIMD0366048）、図18は3菌株（RIMD0366027, RIMD0366042, RIMD0366048）使用した実験である。

1菌株（RIMD0366048）のみを使用した実験では、培養法での結果は、乾燥時間経過とともに培養可能生菌が減少し、乾燥時間12時間で検出限界以下となった（図17）。一方で、PMA-qPCR法では、VBNCを含む*C.jejuni*生菌数は乾燥時間6時間までは少し減少するものの、その後乾燥を進めた場合には、一定の生菌数を保っていた。したがって、塩素ストレスを与えた際と同様に、*C.jejuni*がVBNC状態へと状態を移行したと考えられる。また、特に乾燥時間6時間から9時間にかけて、PMA-qPCR法での定量による生菌数はあまり変化が見られないが、培養法での培養可能生菌数は大きく減少している。このことから、特にこの乾燥時間の間で、培養可能生菌がVBNC状態へと移行していると考えられる。

同様に3菌株（RIMD0366027, RIMD0366042, RIMD0366048）を使用した実験では、1菌株での実験と異なり培養法において乾燥9時間で検出限界以下となった（図18）。また、PMA-qPCR法での検出による生菌数は、乾燥6時間までは少し減少するが、その後一定の生菌数を保つという同様の結果が得られた。本実験でも、乾燥時間6時間から9時間にかけて、生菌数はあまり変化が見られず、培養可能生菌

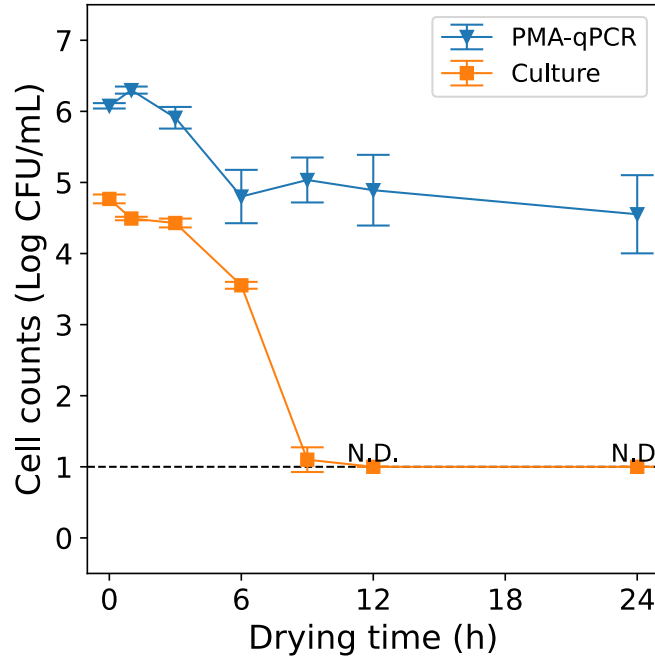


図 17 大気環境下での乾燥を行った1菌株（RIMD0366048）菌液での培養法と PMA-qPCR 法により得られた菌数の比較

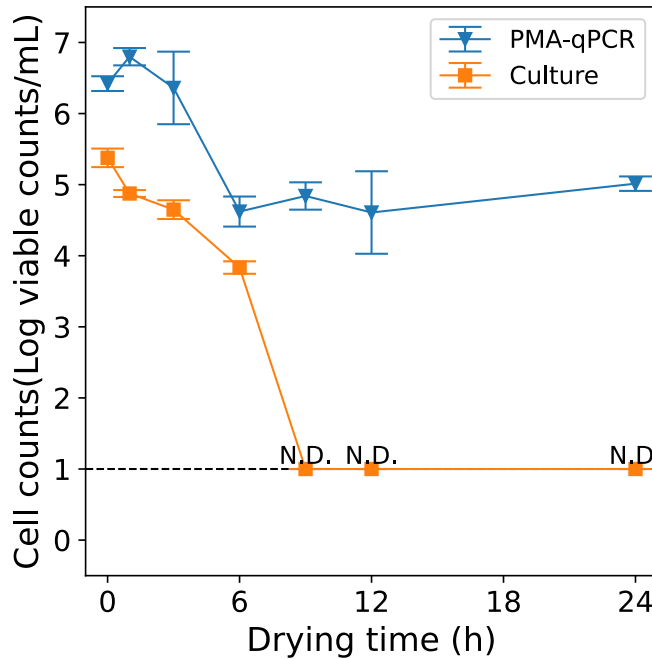


図 18 大気環境下での乾燥を行った3菌株（RIMD0366027, RIMD0366042, RIMD0366048）菌液での培養法と PMA-qPCR 法により得られた菌数の比較

数のみ減少している。そのため、この乾燥時間の間で培養可能な*C. jejuni*がVBNC状態へと減少していると考えられる。

したがって、食品加工における輸送段階での大気環境下の乾燥により、鶏肉に付着する*C. jejuni*がVBNCへと状態を変化することで、培養法による検査では検出されずに、生菌が付着したまま販売されることで、ヒト感染のリスクがあるだろう。

#### 4) 加熱ストレスでのVBNC誘導

50°C, 35 分での加熱後菌液に関して、加熱前菌液と比較して qPCR（全菌数）の結果は同程度である一方で、PMA-qPCR では約 1.1log の菌数差、培養法では検出限界以下を示した（図 19）。低温加熱ストレスにより、細胞として培養性を失った一方で、多くの細胞が細胞膜を維持した状態であったと考えられる。培養法では検出されなくなったにも関わらず PMA-qPCR 法では一定数検出されたことは、VBNC（生きているが培養できない）状態への移行を示唆しており、PMA-qPCR 法と培養法での菌数差から、加熱後においても約 3.5 log CFU/mL の VBNC が存在していたと考えられる。

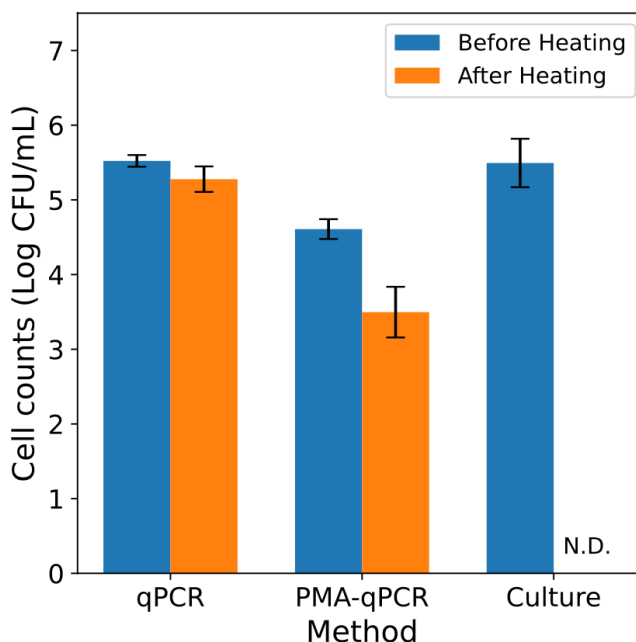


図 19. *C. jejuni* (RIMD0366048) を 50°C 35 分間加熱した後の細菌数。PMA-qPCR 法と培養法により測定。培養法の検出限界は 1logCFU/mL。

#### 4 VBNC 状態への移行および VBNC からの蘇生回復条件の探索

個別課題： VBNC 細菌細胞の生理活性状態の解明（小関成樹（北海道大学大学院農学研究院））

##### 1) 代謝活性変化の検討

VBNC移行条件を基にして、健全状態から損傷、死滅に至る過程でのカンピロバクター細胞内で、どのような代謝活性の変化が生じているのかを明らかにするために、代謝物質の増減を網羅的に調べるメタボローム解析によって主にエネルギー代謝経路を中心にして網羅的な解析を実施した。具体的には、キャピラリ電気泳動・飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS）を用いてカンピロバクター菌体の代謝物を解析し変動を捉えることを目的とした。

前述したように明確にVBNC化が認められた37°C保存中（0~4日目）の培養後の*C. jejuni*菌体の培地を除去し、超純水にて 2 回洗浄を行った。そこに内部標準物質 5 μMを含んだメタノール溶液を添加し、懸濁及び 30 秒間の超音波処理を行った。Milli-Q 水を加えて攪拌し、30 秒間静置した。その後、抽出液を回収し、遠心分離(2,300 × g, 4°C, 5 分)を行った。遠心分離後、限外ろ過チューブ(ウルトラフリー MC PLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット 5 kDa)に抽出液を移し取った。これを遠心

(9,100 × g, 4°C, 120 分)し、限外ろ過処理を行った。ろ液を乾固させ、再び Milli-Q 水に溶解して測定に供した。

代謝物質の調査検討は極めて多岐にわたり、さまざまな角度からの検討をしている。全体的な特徴を捉えるために、サンプル間、すなわち、37°C 保存中のサンプルの特性に違いがあるのかを主成分分析で解析した結果を図 20 に示す。この結果から、明らかに 0 日目と 3 日目のサンプルが他の保存日サンプルとかけ離れており、異なる性質を有することが示唆された。

次に検出された代謝物質を階層クラスタ分析によって解析した結果をヒートマップとして図 21 に示した。この結果から明らかなように、3 日目のサンプルの味、代謝活性が他の保存日サンプルとは大きく異なることが認められた。*C. jejuni* を 37°C で保存 3 日目では、培養法では検出できる菌は存在せず、蛍光顕微鏡観察でも死菌が大部分と推定され、さらに誘電泳動法による高周波数帯 (7 MHz) での検出ができなくなったサンプルである。したがって、細菌が死滅に至るタイミングにおいて、さまざまな代謝活性に変化が生じることを示唆する結果であると、解釈することができる。細菌細胞の死滅には、このように代謝経路、代謝活性に大きな変化が生じることが示された。一方で、VBNC 状態の場合には、このような劇的な変化は生じておらず、通常 (健常) の細胞と同様の代謝活動を維持しているものと推察される。

具体的にどのような代謝物質群に変化が生じたのかを詳しくみてみると、いくつかの特徴的な代謝活性の変化が認められたが、その中でも核酸代謝の一部に顕著な違いが認められた (図 22)。

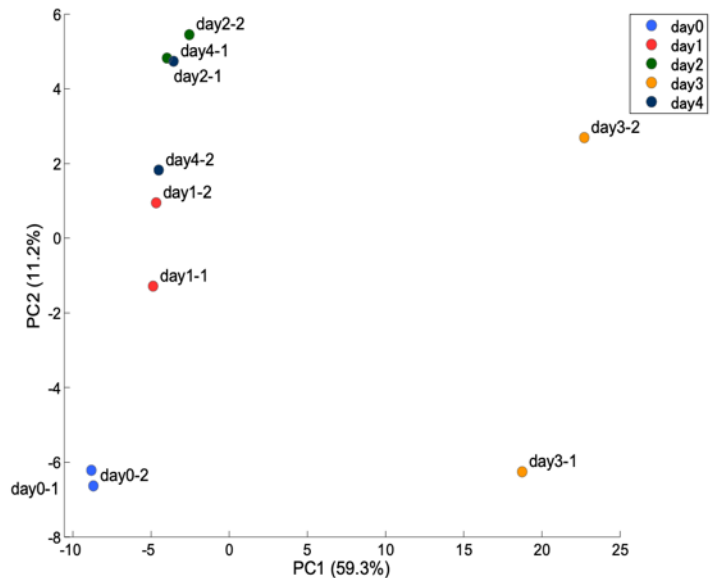


図20 主成分分析結果  
PC1, PC2 はそれぞれ第1主成分得点、第2主成分得点を示し、括弧内の数字は各主成分の寄与率を示す。各プロットのラベルはサンプル名を示す。

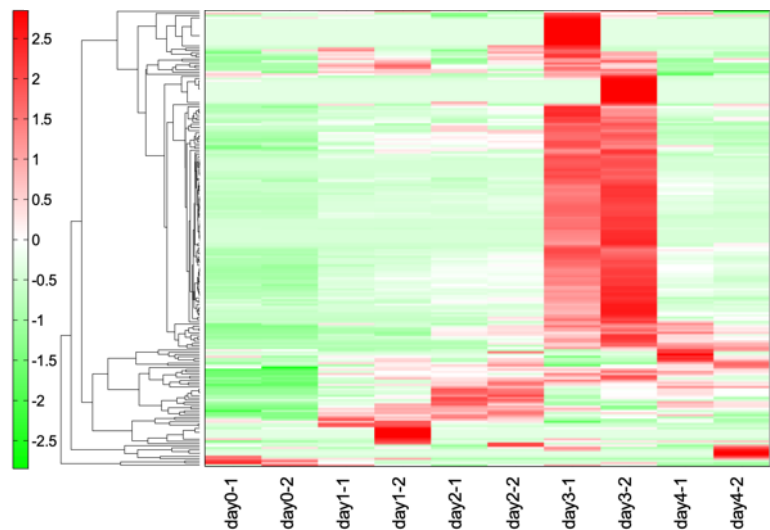


図 21 Hierarchical Cluster Analysis, HCA (階層的クラスタ分析) 結果 (HeatMap 表示)

横軸はサンプル名、縦軸はピークを示す。ピークに対して HCA を実施し、ピーク間の距離は図中の樹形図で表している。緑が濃いほど平均よりも小さいことを示し、赤が濃いほど平均よりも大きいことを示す。

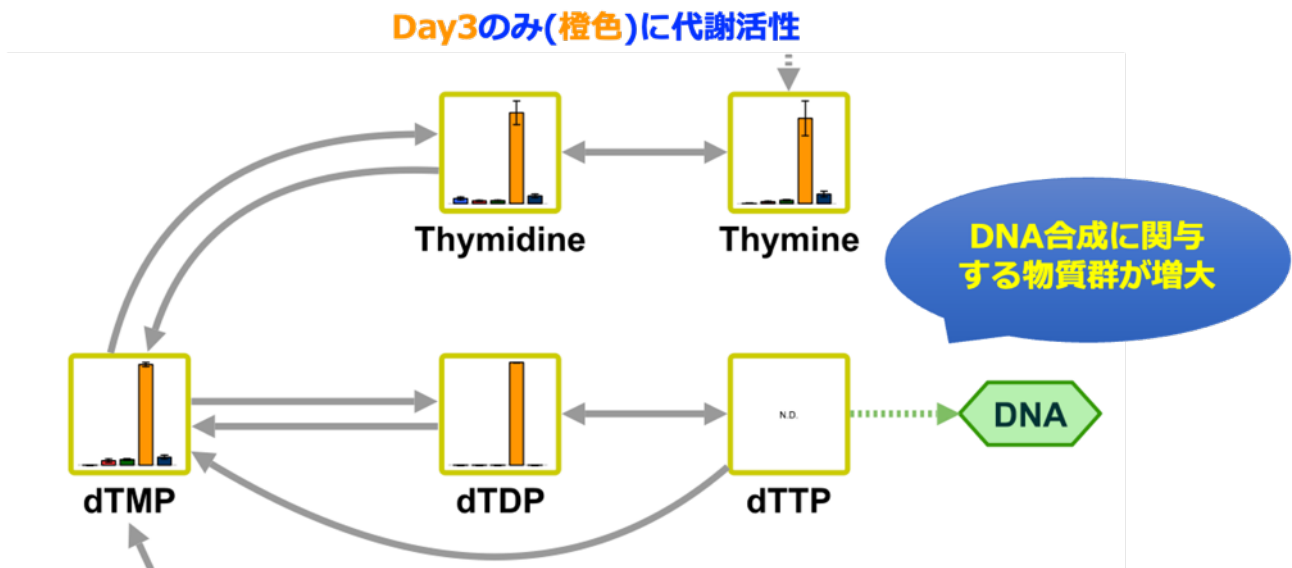


図 22 代謝物質の経路図(核酸代謝 - ピリミジン代謝)

HMT 代謝物質ライブラリに登録されている代謝物質のうち、本試験で検出された物質を代謝経路に描画した。グラフは左から順に day0 (青色)、day1(赤色)、day2(緑色)、day3(橙色)、day4(紺色)の相対面積値を示す。N.D. : Not Detected.

図 22 に示すように、3 日目以外の保存日サンプルでは、ほとんど活性が認められていないことから、37°Cで3 日間のストレスが何らかのトリガーとなり、細胞死に向かい代謝活性を大きく変化させたものと考えられた。

## 2) 擬似小腸溶液 (Simulated Intestine Fluid: SIF) を用いた VBNC の *Campylobacter jejuni* の蘇生能力の検討

新たな蘇生可能性の検証や今後のモデル小腸環境として、モデル消化管溶液 (SIF; Simulated Intestine Fluid) を使用する (Fuchisawa Y et al., Journal of Applied Microbiology 2022)。特に小腸上皮様細胞を用いたモデル系では、小腸上皮様細胞自体の寿命を考慮しなければならず、最大2日間の滞留時間しか再現することができなかった。そこで、液体であるSIFを使用することで、*C. jejuni* の最大潜伏期間である5日間やそれ以上の長期的な実験を行うことを想定した。また、この実験系では、*C. jejuni* の蘇生挙動のみならず、モデル小腸環境における代謝活性の変化や病原性物質の発生を評価することができると考えた。そこで本実験では、小腸内の消化液を再現したSIFを使用して、①：先行研究の再現実験、②乾燥によるストレスを与えた11菌株のVBNCが蘇生挙動を示すかどうかを検討した。

供試細菌として、患者及び患者糞便から分離された*C. jejuni* (RIMD0366026, 027, 028, 029, 042, 043, 044, 048, 049, 050, 051) 11菌株を使用した。モデル消化管液として (Fuchisawa et al., 2022) に基づき擬似小腸溶液SIFを作成した。滅菌純水500mLの中に、Gifu anaerobic medium broth powder(Nissui Pharmaceutical Corporation)5.9%(w/v)と、胆汁酸 bile salt(Oxoid)0.3%(w/v)を入れて、115°C, 15分で高圧蒸気滅菌したものをSIFとして使用した。先行研究 (Fuchisawa et al., 2022) の再現実験として、初期菌数が4, 2. 1 logCFU/mLとなるように調整した*C. jejuni*11菌株混合溶液をSIF、ウマ溶血入り Bolton broth (増菌培地)、Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) 10mLにそれ

ぞれ接種した。この懸濁液を37 °C、微好気条件下で最大3日間培養して先行研究との菌の増殖挙動における再現性を検討した。そして、SIFにおけるVBNCの蘇生挙動評価のために、12時間通風乾燥した*C. jejuni* 11菌株混合溶液1mLをSIF、Bolton broth、PBS 10mLにそれぞれ接種した。この懸濁液を37 °C、微好気条件下で最大5日間培養した。各時間における培養可能な生菌数を、培養法により寒天培地上でカウントされたコロニー数を蘇生した菌数として算出した。

先行研究 (Fuchisawa et al., 2022) の再現実験の結果 (図23) より、初期菌数4 log CFU/mL、2 log CFU/mL、1 log CFU/mLのいずれの場合もSIFは増菌培地であるBolton培地と同様の増殖挙動を示すことが明らかになった。また、図24はSIFを使用した先行研究 (Fuchisawa et al., 2022) との比較である。この結果から、先行研究 (Fuchisawa et al., 2022) とおおよそ同様の増殖挙動を示すことが明らかとなり、再現性をとれた結果となった。このことから、SIFを用いて、37 °C、微好気条件下で培養することで、小腸環境を再現しつつ液系で実験が行えるVBNCの感染性検討に関する新たな実験手法となりうると考えられる。

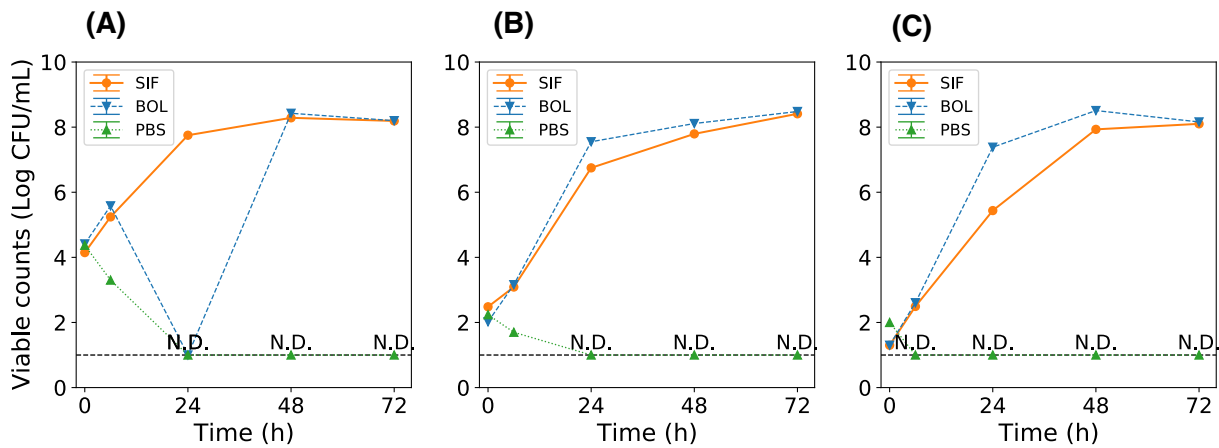


図23. 37 °C、微好気条件下におけるSIF (○)、Bolton broth (▽)、PBS (△) での*C. jejuni*の増殖挙動。(A) 初期菌数4 logCFU/mL、(B) 初期菌数2 logCFU/mL、(C) 初期菌数1 logCFU/mL。検出限界は1 logCFU/mLである。

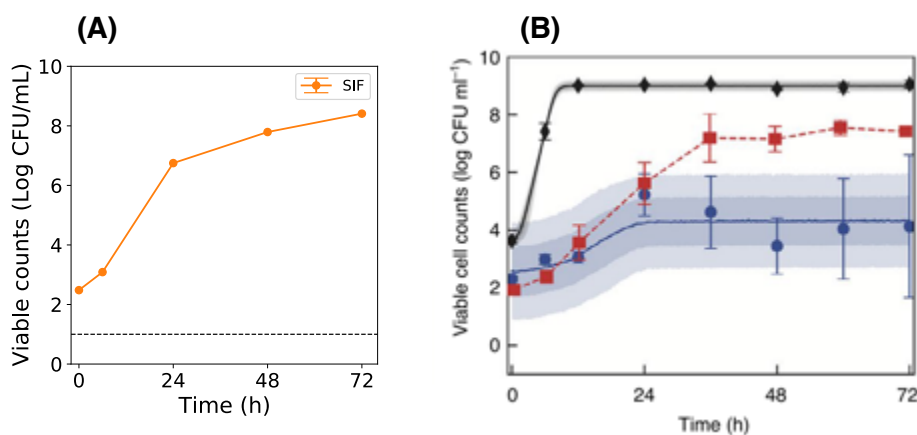


図24. (A) 初期菌数2 log CFU/mL、37 °C、微好気条件下、におけるSIF (○) ) での*C. jejuni*の増殖挙動。 (B) (Fuchisawa et al. 2022) における同条件での増殖挙動 (□)

**SIFにおけるVBNCの蘇生挙動評価** 12時間乾燥し検出限界以下にまで減少した状態の*C. jejuni* は、SIF、bolton broth、PBS中で120時間培養しても培養能力を回復しないことが確認された (図25)。本研究で蘇生挙動が確認されなかった原因には以下の二つの点が主な原因であると考えられる。

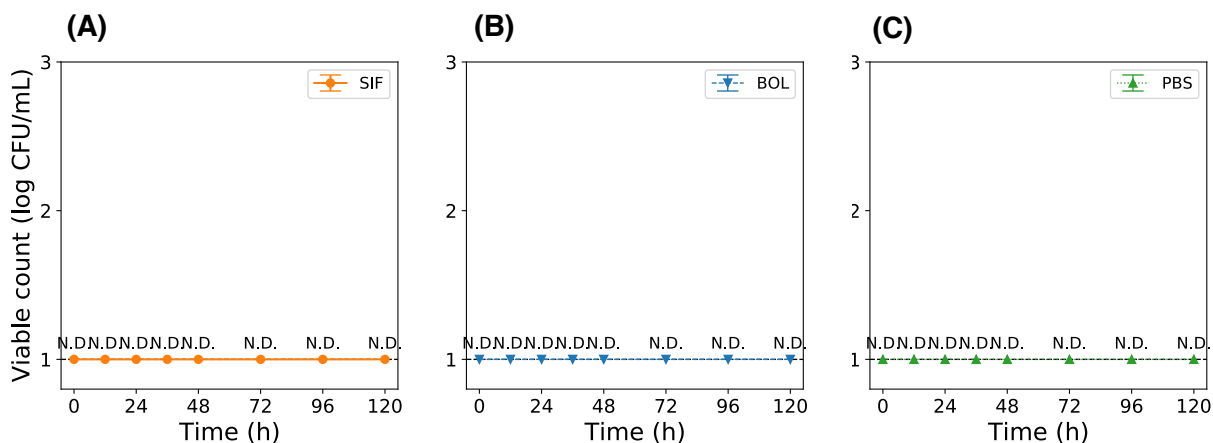


図25. 37 °C、微好気条件下におけるSIF (○) 、Bolton broth (▽) 、PBS (△) での乾燥ストレスを与えたVBNCの*C. jejuni*の蘇生挙動の観察。

### ① ストレス強度

蘇生能力は外的ストレスの持続時間と強度に依存することが知られている。(Zhao et al., 2013) は*Escherichia coli* O157:H7の蘇生能力は、VBNC誘導条件の強度が増すごとに著しく低下することを報告している。本研究の手法では、湿度/乾燥、酸素、飢餓、温度のストレスがかかっていると考えられ、*C. jejuni*がVBNCとして生存はするが蘇生能力は有していない可能性が考えられる。

### ② 蘇生条件

このVBNC状態の*C. jejuni*は蘇生能力を有しているものの、本研究の増殖因子は蘇生に関係なかった可能性も考えられる。また先行研究において、アメーバ内や宿主の単球内で*C. jejuni*が生き残るという研究や、腸内細菌叢中でも死滅せず生き残っていることが確認されている (Fuchisawa et al., 2022)。このように他の生物との相互作用が蘇生に関与している可能性も考えられる。しかしながら、限られた研究期間内で想定しうる膨大な条件の中で蘇生可能性を検討することは難しいと判断し、VBNC自体のSIF中での代謝活性、あるいは病原性を保持し感染能の有無を代謝活性の面から検討した。

### 3) 核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) を用いた *C. jejuni* の代謝物質評価

NMRとは核磁気共鳴 (Nuclear Magnetic Resonance) の略称であり、構成原子の置かれた環境を一つ一つ区別して調べることで、原子同士のつながり方を特定することができる。特に有機化合物の同定、定量を行うことに使われる。そこで、CE-TOFMS による解析よりも簡便にできる可能性を検討するために本研究ではNMRを用いて、SIFを用いた擬似小腸環境で培養した生菌、VBNCの代謝生成物の変化や違いを検討した。

供試細菌として、患者及び患者糞便から分離された*C. jejuni* (RIMD0366027, 042, 048) 3菌株を使用した。モデル消化管液として (Fuchisawa et al., 2022) に基づき擬似小腸溶液SIFを作成した。滅菌純水500mLの中に、Gifu anaerobic medium broth powder(Nissui Pharmaceutical Corporation)5.9%(w/v)と、胆汁酸 bile salt(Oxoid)0.3%(w/v)を入れて、115°C, 15分で高圧蒸気滅菌したものをSIFとして使用した。さらに、VBNC状態の発生評価とSIFでの培養試験を行った。*C. jejuni* 3菌株混合菌液100 µLを電気乾燥機を用いて、25°C, 湿度30%以下で12時間通風乾燥した。通風乾燥した*C. jejuni*菌体をSIF 10 mLで再懸濁し、37 °C、微好気条件下で48時間培養した。また、生菌は初期菌数が4 log CFU/mLとなるようSIFに菌液を接種し、37 °C、微好気条件下で48時間培養した。実験対象区として菌液を摂取しないサンプルを2つ用意し、1つは培養時間0時間としてそのまま、1つは37 °C、微好気条件下で48時間培養したものを作成した。

サンプルは孔径0.2 µmのシリンジフィルターを用いて滅菌処理をした培養後のサンプル540µLの培地と60 µL 10xのNMR buffer (100mM NaP (pH 7.4) , 5mM TSP-d<sub>4</sub>, 10mM Formate, 0.4% (w/v) NaN<sub>3</sub>, 100%D<sub>2</sub>O (混合後濃度はこれの10分の1) ) を混合した。混合した600 µLの溶液を5 mm NMR管に540 µL注入し、手回し遠心機を用いて管壁に付着している混合溶媒を分離した。NMR測定の条件はChenomx NMR Suiteで指定されたものに準拠し (表6) 、化合物同定はChenomx NMR Suiteで化合物の同定と定量を行った。

表6 NMR測定条件

Measurement parameters	Values
Temperature	25 °C
Pulse program	noesypr1d
Scans	128 scans
Acquisition time	1.0 s
Relaxation delay	4.0 s
Spectral width	12 ppm
Rotation	on (20 Hz)
Measurement time	10 min

## 結果と考察

(1) 化合物同定 Chenomxで同定した化合物と濃度を表7に示した。なお、SIF 0hとSIF 48hでは顕著な違いは見られなかった（データ記載なし）。また、SIF、生菌48h、VBNC48hの間で差があった物質にはハイライトを入れている（*C. jejuni*の主要な代謝経路及び関連酵素には濃いハイライトを入れている；図26）。表より、生菌48hのみ濃度に差が見られる物質が多く見られた。一方でSIF 0hとVBNC 48hでは濃度に差が見られる物質がFumarate（フマル酸）以外に存在しなかった（EthanolとFormateは実験手法の中でコンタミネーションする可能性があり、菌体由来の物質ではない）。しかし、Fumarate（フマル酸）にはSIF 0h、生菌48h、VBNC 48hで顕著な差が見られたため、生菌とVBNCの差を示す物質なのではないかと考えられる。

飯田の「食中毒起因菌 *Campylobacter jejuni*の低温損傷に関する分子生物学的研究」によると、コハク酸デヒドロゲナーゼ（Sdh）をコードする遺伝子の発現がVBNCで減少しており、sdhがVBNC状態への移行に関与する候補遺伝子の一つとして推定されたことが明らかになっており、このVBNC状態で発現の減少が見られたSdhはTCAサイクル（クエン酸回路）のコハク酸からフマル酸に参加する酵素であることが知られており、フマル酸とVBNC状態への移行に何らかの関係性があることが考えられる。VBNC状態の細菌細胞が一定程度の代謝活性を保持していることは確認できたが、感染能を有するか、あるいは蘇生の可能性があるかまでは明らかにできなかった。

表7 同定した化合物一覧。単位はmM

物質	SIF 0h	生菌 48h	VBNC 48h
2-Oxoglutarate	0.4479	0.4479	0.4479
2-Oxoisocaproate	0.062	0.062	0.062
Acetate	4.5809	5.5193	4.5809
Alanine	6.5302	6.5302	6.5302
Asparagine	1.4928	1.162	1.5458
Aspartate	2.0726	0.1631	2.0726
Choline	0.3059	0.3059	0.3059
Cytidine		0.0167	
Ethanol	0.3579	2.8657	0.6323
Formate	2.5725	1.1704	2.7084
Fumarate	0.0071	0.0001	0.0521
Glucose	8.3528	8.3528	8.3528
Glutamate	4.7057	4.7057	4.7057
Glycine	3.8563	3.8563	3.8085
Histidine	0.8525	0.8469	0.8735
Isoleucine	2.3323	2.3323	2.3323
Lactate	1.751	0.6856	1.751
Leucine	6.9434	6.9434	6.9434
Lysine	3.0425	3.0073	3.0425
Methionine	1.341	1.1488	1.341
Phenylalanine	2.9581	2.9581	2.9581

Proline	1.7883	1.7883	1.7883
Pyroglutamate	4.5622	4.3188	4.5622
Serine	2.9459	2.9459	2.9459
Succinate	1.3454	4.1713	1.3454
Threonine	2.4307	2.2652	2.4307
Trehalose	0.2049	0.2049	0.1458
Tryptophan	0.81	0.7987	0.81
Tyrosine	0.6346	0.6457	0.6346
Uracil	0.1021	0.0782	0.1021
Valine	4.5656	4.5656	4.5656
sn-Glycero-3-phosphocholine	0.4428	0.4428	0.4428

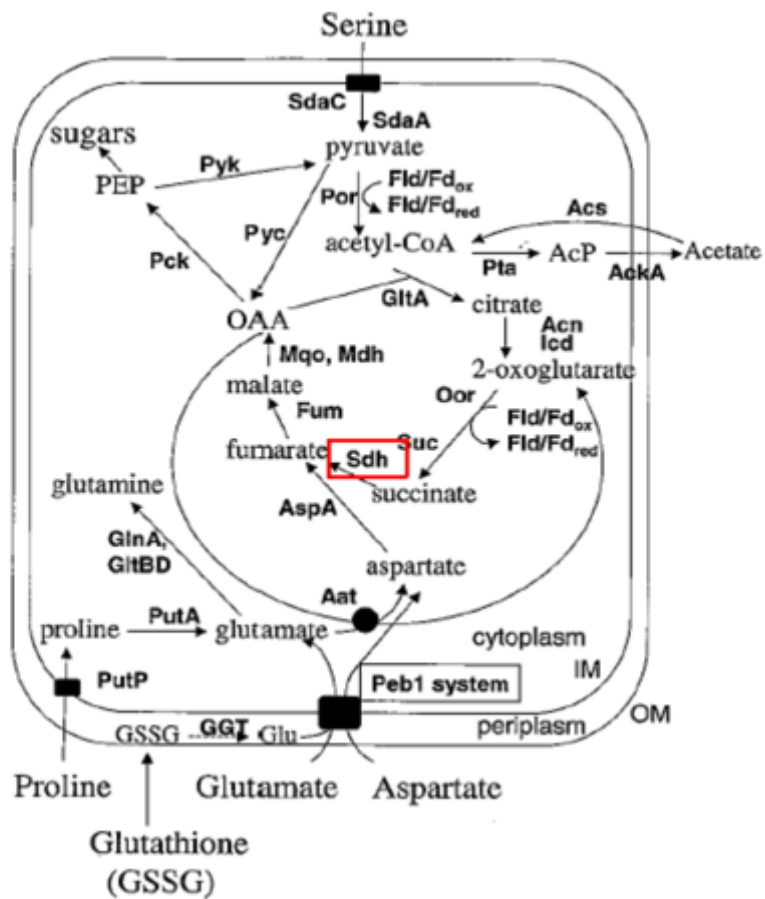


図26. *C. jejuni*の主要な代謝経路および関連酵素  
(文献: Nachamkin et al., 2008より抜粋)

(4) 個別課題: VBNC の発生および VBNC からの蘇生回復予測モデルの開発

VBNC からの蘇生の評価実験系の確立は極めて難しい研究課題である。実験動物への感染有無の確認や、有精卵中での蘇生観察など、さまざまな研究報告がなされているが、必ずしも再現性が高い

ものではなく、普遍的かつ客観的な方法は未だに確立されていない。

有精卵や鶏肉滲出液との共培養によって回復する事例、哺乳類細胞との共培養によって蘇生回復する事例の報告等があることから、何らかの栄養成分の組合せと一定以上のインキュベーション期間によって蘇生する可能性が示唆される。

そこで、本年度は小腸上皮様細胞（モデルとして Caco-2 細胞使用）と VBNC 状態の *C. jejuni* との共培養期間を延長することで、蘇生回復が認められるかを検討している。具体的には乾燥ストレスによって VBNC 状態に移行した細菌細胞と Caco-2 細胞とを一定期間共培養して蘇生回復が認められるかの検討を継続的に行っている。しかし、現時点までに、共培養によって VBNC 状態の *C. jejuni* が培養可能な状態にまで蘇生回復する現象を捉えることはできていない（図 27）。

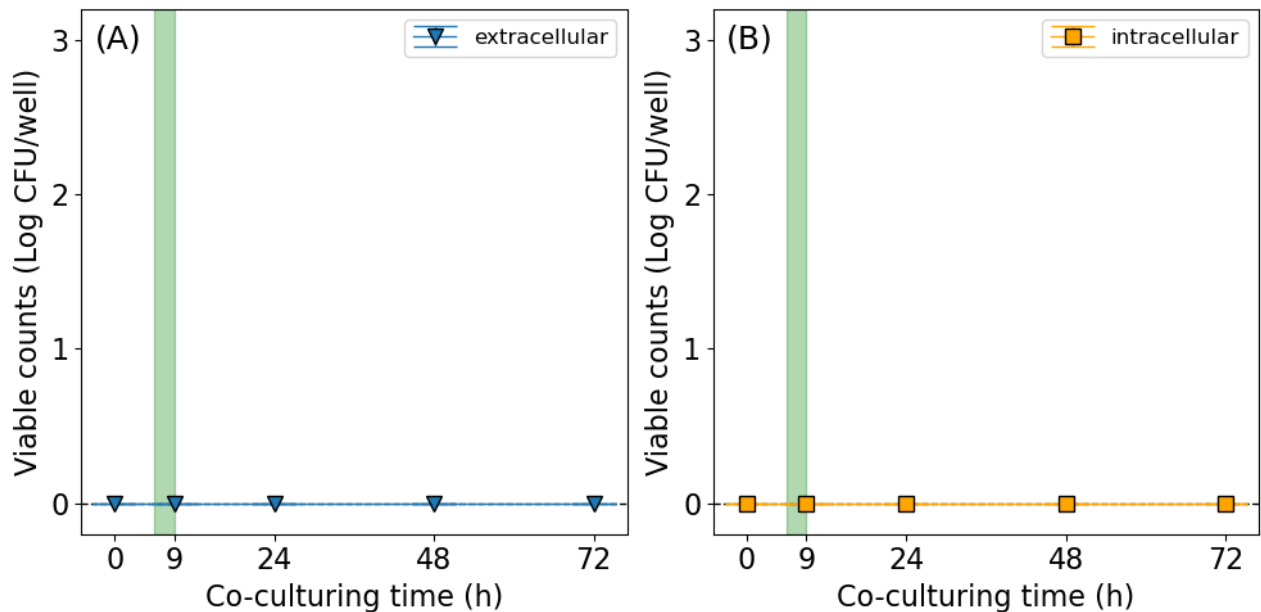


図27. Viable but non-culturable (VBNC) *Campylobacter jejuni* のCaco-2細胞との共培養による培養可能菌への変化 (A) Caco-2細胞外の*C. jejuni* 培養可能菌数 (B) Caco-2細胞内の*C. jejuni* 培養可能菌数。緑色の縦棒範囲はヒト小腸内での消化滞留時間を示している。

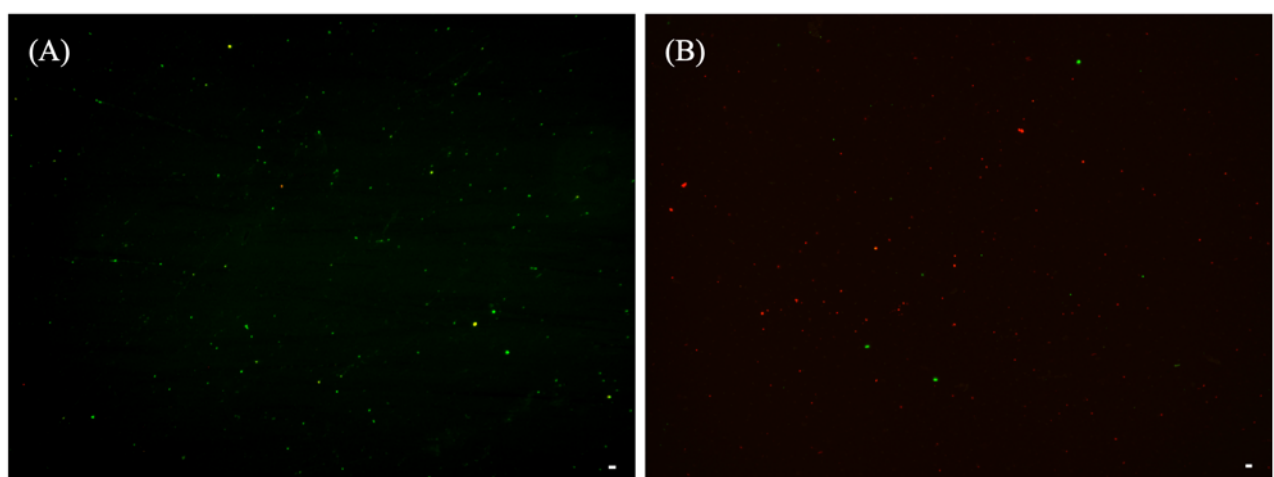


図 28 緑色蛍光色素 (SYTO 9) および赤色蛍光色素 (ヨウ化プロピジウム) による *C. jejuni* (RIMD0366048) の検出。(A) は 37°C で 48 時間共培養した Caco-2 細胞 (RCB0988) の細胞外 *C. jejuni* を示し、(B) はダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に 37°C で 48 時間保存した *C. jejuni* を示す。画像は顕微鏡 20 視野の観察領域で撮影した。スケールバーはすべて 8  $\mu$ m に対応。

しかし、Caco-2 細胞との共培養した場合には *C. jejuni* 細胞は死滅せずに生存し続けていることが、LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit を用いて染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察した結果から確認された (図 28A)。一方で、Caco-2 細胞と共培養せずに、培養液中に保存した場合には VBNC の *C. jejuni* 細胞は死滅していた (図 28B)。これらの結果から、Caco-2 細胞の存在および高栄養な培地成分が VBNC 状態の *C. jejuni* の生存維持に貢献していることが示唆されたが、培養法によって培養可能な状態にまでの蘇生回復には至らなかった。

この原因としては、次の4つが考えられる。

- 1) 3日よりもさらに長い時間を経て細菌が回復し、培養可能な状態に変化する。
- 2) VBNC 状態のままでも *cadF* や *ciaB* といった病原性遺伝子が産生され、細胞に侵入している。
- 3) 蘇生能力や侵入能力には菌株差があり、この菌株は蘇生や侵入しにくい菌株だった。
- 4) 乾燥ストレスは *C. jejuni* を蘇生できなくさせるほどのストレスであり、どのような条件でも蘇生することはない。

これらの可能性の中で、1)を確認するために共培養期間の延長は実験系自体 (Caco-2 細胞の耐久性、寿命の問題) に問題があり、極端な培養期間の延長は難しい。一方で、2)で示したように、VBNC 状態の *C. jejuni* は培養能力の有無によらず、生物学的な活性をある程度維持しており、小腸上皮様細胞内に侵入可能で感染成立も可能なのかもしれない。このことを確認するためには、*C. jejuni* 細胞自身の活性 (活動量) を何らかの方法で確認できれば良い。微生物はエネルギー代謝活動により細胞内に NAD(P)H を生成するが、WST-8 と呼ばれる物質は電子メディエーターを介する事で、この NAD(P)H により還元され水溶性 formazan (オレンジ色) を生成する。この formazan の生成量は微生物のエネルギー代謝活性に比例するため、オレンジ色への呈色を見ることで、その微生物の生存率や活性度合を確認できる可能性があり検討した。

カンピロバクターも TCA サイクルから ATP を産生しており、これを生命活動に使用している。BacTiter-Glo Microbial Viability Assay は、ATP の定量をベースに生菌数を決定するシステムである。本システムを用いることで、生菌、VBNC、死菌の間に ATP 産生量による違いを見出せる可能性がある。そこで、本実験では、BacTiter-Glo Microbial Viability Assay を用いて、①生菌の検量線の作成、②生菌、VBNC、死菌の間の ATP 産生量の違いを測定した。

供試細菌には患者及び患者糞便から分離された *C. jejuni* (RIMD0366027, 042, 048) 3 菌株を使用した。凍結乾燥された BacTiter-Glo Substrate を BacTiter-Glo Buffer で溶解し、バックグラウンドとなる発光を低減させるために 15 分間室温で平衡化したものを BacTiter-Glo Reagent として調整した。*C. jejuni* 3 菌株混合菌液を滅菌純水 (dH<sub>2</sub>O) で懸濁した。菌懸濁液 100 μL と BacTiter-Glo Reagent 100 μL を専用の 96 穴マイクロプレートの A 行の各ウェルに添加した (行は左から 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0, <0, 実験対象区、単位は logCFU/mL)。添加後 5 分間インキュベーションを行い、高感度ルミノメーター (Promega, GloMax Navigator System) で ATP 量を測定した。モデル消化管液として

(Fuchisawa et al., 2022) に基づき擬似小腸溶液 SIF を作成した。滅菌純水 500 mL の中に、Gifu anaerobic medium broth powder (Nissui Pharmaceutical Corporation) 5.9% (w/v) と、胆汁酸 bile salt (Oxoid) 0.3% (w/v) を入れて、115°C、15 分で高圧蒸気滅菌したものを SIF として使用した。*C. jejuni* 3 菌株混合菌液 100 μL を電気乾燥機を用いて、25°C、湿度 30% 以下で 12 時間通風乾燥した。通風乾燥した *C. jejuni* 菌体を SIF 1 mL で再懸濁し、37°C、微好気条件下で 24 時間、48 時間培養した。なお、0h 測定用の菌体は滅菌純水 1 mL で懸濁して測定に用いた。各培養時間終了後、1 mL の培養液を滅菌純水 1 mL で 3 回洗浄した。純水 1 mL の菌懸濁液 100 μL と BacTiter-Glo Reagent 100 μL を専用の 96 穴マイクロプレートに添加した。添加後 5 分間インキュベーションを行い、高感度ルミノメーター

(Promega, GloMax Navigator System) でATP量を測定した。

菌濃度を変えた生菌のATP量を測定した結果(図29)、*C. jejuni*が4 log CFU/mL以下の時はATP量が2 log RLUであった。一方、4 log CFU/mL以上の時はATP量と菌濃度に比例関係が見られた。このことから、*C. jejuni*が生きていると判断できる閾値を2 log RLUと設定できる可能性が考えられる。

ATP量の0hと48hの比較結果を図30に示す。生菌は0hとSIF培養48hでも5 log RLUほどのATP産生量を示していた。一方で、VBNCと死菌では0hでは4 log RLUほどのATP産生量が見られたが、培養48h後は2~3 log RLUほどに減少していることがわかった。それぞれの菌ごとでは24 h, 48 hのATP産生量に変わりはない。時間経過ごとの比較で見るとVBNCは3log RLUほどATP産生量であったものの死菌は2 log RLUであり1 log RLUほどの差が見られた。図29より閾値は2 log RLUと設定したので、死菌は培養後にATPを産生できていないが、VBNCはわずかに産生している可能性が考えられた。また、NMRによる代謝産物の定量で、クエン酸回路が機能しない可能性が示唆されたため、生菌とVBNCの間ではクエン酸回路が機能しないことによるATP産生量の低下は考えられた。これらの結果から、VBNC状態に移行したカンピロバクターは代謝活性を残していることが示唆され、感染能が残っている可能性が示唆された。そこで、VBNCの蘇生評価を試みた。

VBNC からの蘇生の評価実験系の確立は極めて難しい研究課題である。実験動物への感染有無の確認や、有精卵中での蘇生観察など、さまざまな研究報告がなされているが、必ずしも再現性が高いものではなく、普遍的かつ客観的な方法は未だに確立されていない。有精卵や鶏肉滲出液との共培養によって回復する事例、哺乳類細胞との共培養によって蘇生回復する事例の報告等があることから、何らかの栄養成分の組合せと一定以上のインキュベーション期間によって蘇生する可能性が示唆される。

本研究では特に「ヒト小腸内におけるVBNCの蘇生能力」を解明し定量することで、VBNCの人体に対する感染力の有無を検討する。ヒト小腸上皮様細胞を使用したモデルヒト小腸環境において、乾燥によるストレスを与えた11菌株のVBNCが蘇生あるいは侵入挙動を示すかどうかを検討した。また、蛍光顕微鏡による観察も行った。そこで、本年度は小腸上皮様細胞(モデルとしてCaco-2細胞使用)とVBNC状態の*C. jejuni*との共培養期間を延長することで、蘇生回復が認められるかを検討した。

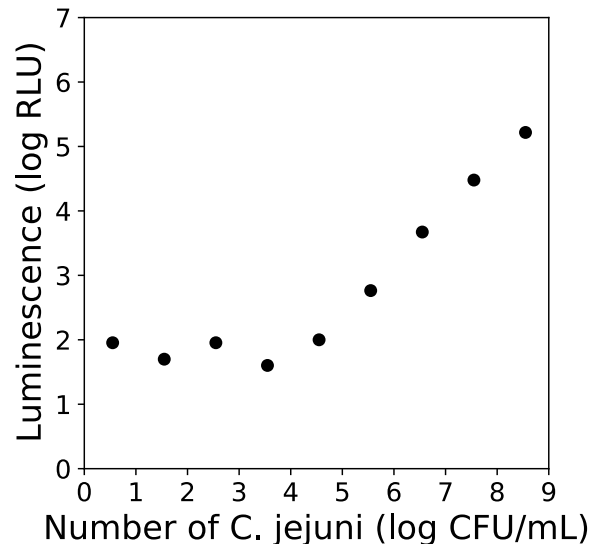


図29. *C. jejuni*の菌濃度とATP産生量の結果

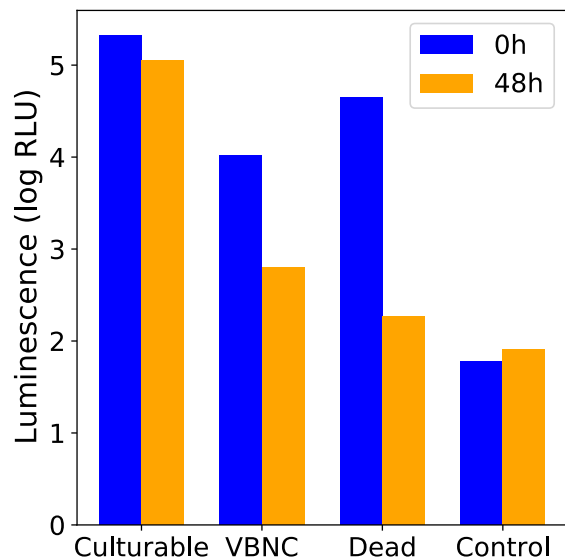


図30. *C. jejuni*の生菌、VBNC、死菌、コントロールのATP産生量の比較

供試細菌として患者及び患者糞便から分離された*C. jejuni* (RIMD0366026, 027, 028, 029, 042, 043, 044, 048, 049, 050, 051) 11菌株を使用した。*C. jejuni* 11菌株混合菌液100  $\mu$ Lを電気乾燥機を用いて、25 $^{\circ}$ C、湿度30%以下で12時間通風乾燥した。通風乾燥した*C. jejuni*菌体をPBS 1 mLで再懸濁し、通風乾燥前と通風乾燥後の菌液を培養法 (mCCDA培地) とLIVE/DEAD<sup>TM</sup> BacLight<sup>TM</sup> Bacterial Viability Kit (L13152、Molecular Probes) を用いて蛍光顕微鏡で検出した。ヒト小腸環境における蘇生・侵入挙動を確認する目的で、通風乾燥した*C. jejuni*菌液250  $\mu$ Lを、小腸上皮様細胞Caco-2細胞を敷き詰めたモデルヒト小腸環境で、37  $^{\circ}$ C、微好気条件下で、最大48時間共培養した。培養開始から9時間、24時間、48時間に細胞外の液体250  $\mu$ Lと、細胞への侵入能を検討するためのゲンタマイシン保護アッセイ (Szymanski C et al., Infection and Immunity 1995) により得られた細胞内の液体100  $\mu$ Lを培養法と蛍光顕微鏡を用いて検出した。

VBNCの発生を評価した結果、寒天平板上で培養可能な*C. jejuni*生菌数は12時間の乾燥で検出限界以下にまで減少した。一方12時間後の菌液を蛍光色素にて染色して、蛍光顕微鏡で観察した結果、細菌の一部に細胞膜の損傷がなく、生菌として緑色に発色している菌体が存在していることが確認された (図31)。先行研究においても、VBNC状態の細菌の細胞膜損傷がないことが報告されている。したがって、12時間の乾燥ストレスによって、一部の*C. jejuni*は培地上では分裂増殖不可能になったものの、生存能力は失っていないVBNC状態へと移行したものと考えられる。

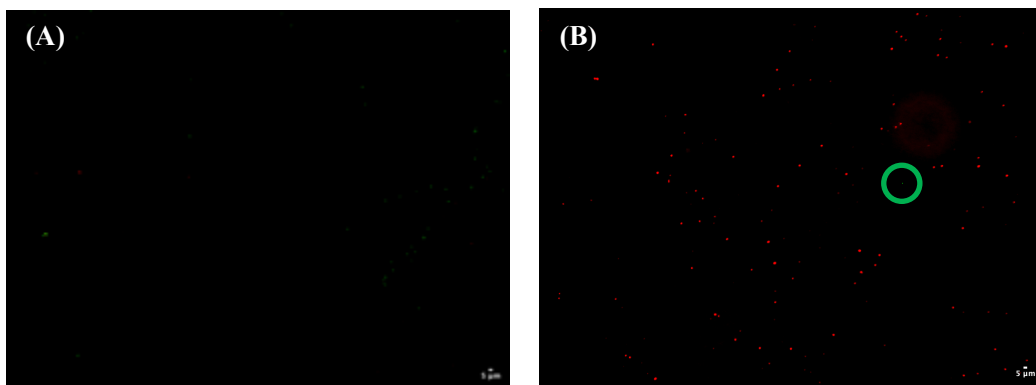


図31. 緑色蛍光色素 (SYTO 9) および赤色蛍光色素 (ヨウ化プロピジウム) による*C. jejuni* (RIMD0366048) の検出。(A) は37 $^{\circ}$ Cで48時間共培養したCaco-2細胞 (RCB0988) の細胞外*C. jejuni*を示し、(B) はダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に37 $^{\circ}$ Cで48時間保存した*C. jejuni*を示す。画像は顕微鏡20視野の観察領域で撮影した。スケールバーはすべて5  $\mu$ mに対応。蛍光顕微鏡による観察結果 (A) 乾燥0h、(B) 乾燥12h

次に、モデルヒト小腸環境下におけるVBNCの細菌の挙動を評価した。12時間乾燥し検出限界以下にまで減少した状態の*C. jejuni*は、小腸上皮様細胞と48時間共培養しても細胞外・細胞内で培養能力を回復していないことが確認された (図32)。しかし、蛍光顕微鏡では48時間の共培養後の細胞外で48時間まで生存していたことが確認された (図33)。一方で、細胞内細菌は蛍光顕微鏡でも観察されなかったことから (図34)、VBNCのまま細胞に侵入しないことが示唆された。

このことから、乾燥によるストレスでVBNCに移行した*C. jejuni*は、モデル小腸環境において培養能力を回復したり、侵入挙動を示すことはなく人体に対する感染能力を有している可能性は限りなく低いと考えられる。しかし、48時間の培養でもモデル小腸環境で生存していたため、VBNC自体の代謝活動、病原性因子の産生により感染を引き起こす可能性は否定しきれない。

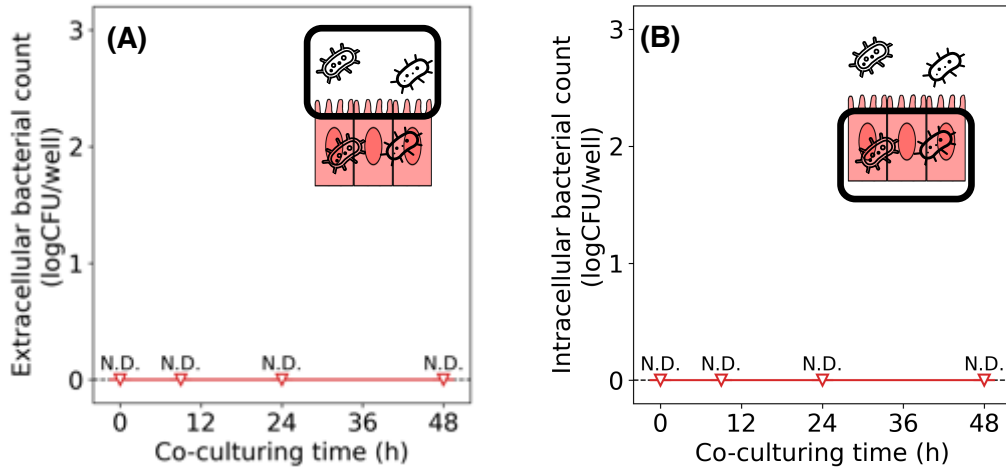


図32. ヒト小腸上皮様細胞Caco-2細胞と共培養した、12時間の乾燥ストレス暴露後の*C. jejuni*を培養法で検出した結果 (A) 細胞外細菌、(B) 細胞内細菌

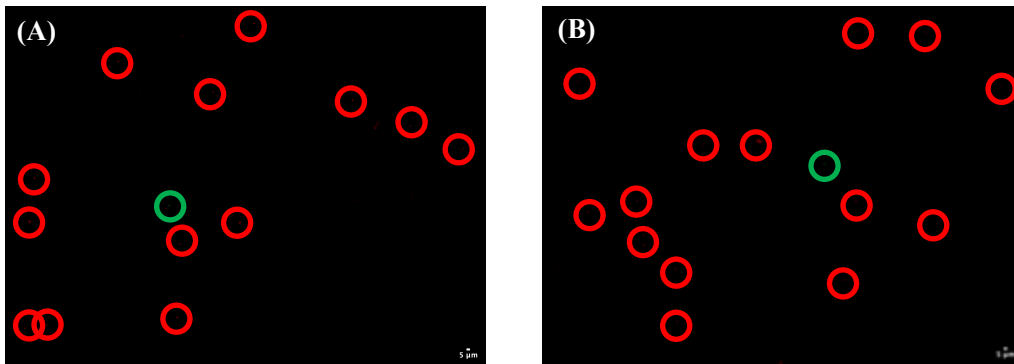


図33. ヒト小腸上皮様細胞Caco-2細胞と共培養した、12時間の乾燥ストレス暴露後の*C. jejuni*を蛍光顕微鏡で観察した結果 (A) 共培養24時間後の細胞外細菌、(B) 共培養48時間後の細胞外細菌

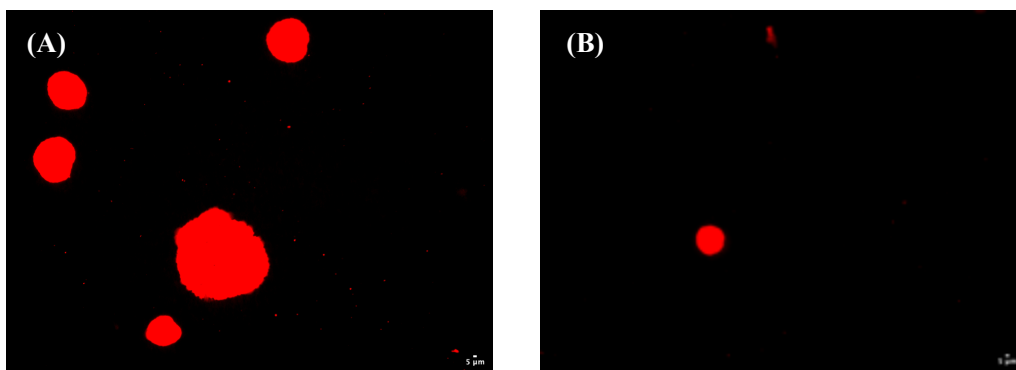


図34. ヒト小腸上皮様細胞Caco-2細胞と共培養した、12時間の乾燥ストレス暴露後の*C. jejuni*を蛍光顕微鏡で観察した結果 (A) 共培養24時間後の細胞内細菌、(B) 共培養48時間後の細胞内細菌  
(赤い物体はアーチファクト；Caco-2細胞の溶け残り)

## 5 研究全体の成果、考察及び結論

従来、VBNCの検出においては細菌細胞に様々な化学修飾を施すことで検出を可能としていたため、VBNC状態そのものの細胞を捕集できなかった。解析すべきVBNC細胞を準備できないため、VBNC自体の性質を明らかにする研究は進まなかった。本研究では近年開発された誘電泳動法とマイクロ流路を組み合わせた技術を用いることで、特定の周波数帯においてVBNC状態の細菌細胞のみを捕集する技術を開発することに成功した。この手法によれば、VBNC状態のカンピロバクター細胞のみを捕集可能となり、VBNC細胞内での生化学的な変化を検討するための試料取得が可能となる。しかし課題も残っている。具体的には補足可能なVBNC量が少ないため、補足したVBNCを別の評価系で用いるには技術的に難しい状態にある。この点については装置の改良によって解決できる見込みであり、今後の発展が大いに期待され、VBNC状態の細菌細胞の生理活性状態のさらなる特性解明に寄与する。

他方で、カンピロバクター食中毒の原因として VBNC 状態のカンピロバクターの潜在的な存在に注目したが、当初想定していた市販鶏肉から VBNC 状態の菌と生菌とを分離定量することは現実的な総汚染菌数の実態から考えて、技術的にも困難であるだけでなく、VBNC が大量に潜んでいる可能性は低いことが明らかとなった。したがって、カンピロバクター食中毒が減少しない原因として VBNC の存在に起因させることは無理があり、本研究では真相究明にまで至らなかった。

温度、乾燥、塩素といった複数のストレスから VBNC 状態に移行させる条件を見出し、それらについての分離捕集条件を明らかにして、カンピロバクターの損傷・VBNC への移行条件に応じた、カンピロバクター細胞内での代謝活性の変化も一部明らかにした。しかし小腸上皮様細胞への侵入特性評価も含めて、VBNC 状態のカンピロバクターを蘇生させるための条件を見出すことはできず、VBNC の感染性の有無については確たる証拠となる結果を得ることはできなかった。

以上、本研究では大きな目標であったカンピロバクターの VBNC 状態の細胞の分離定量をラベルフリーで実現することには成功したものの、依然として VBNC 状態のカンピロバクターの感染特性については様々な検討課題が残っている。

## 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  
なし（投稿準備中）
- 2 本研究を基にした学会発表の実績
  - 1) Ami Iwasaki, Tomohiro Murakami, Kento Koyama, and Shige Koseki. Quantification of the number of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* by an alternative novel technique using dielectrophoresis with micro-fluidic device. International Association for Food Protection 2023 Annual meeting, Poster presentation, July 17, 2023 (Toronto, Canada)
  - 2) 岩崎愛深、村上知広、小山健斗、小関成樹: 誘電泳動とマイクロ流路装置を用いた複合技術によるカンピロバクター損傷菌の定量・分離. 日本食品微生物学会 2023 年次大会 (大阪) 2023 年 9 月 20 日
  - 3) Tomohiro Murakami, Hiroto Nakajima, Hiroya Hoshino, Kento Koyama, and Shige Koseki. Quantification of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* by using PMA-qPCR and dielectrophoresis with micro-fluidic device. International Association for Food Protection 2024 Annual meeting, Poster presentation, July 16, 2024 (Long Beach, USA)

4) Hiroya Hoshino, Tomohiro Murakami, Kento Koyama, and Shige Koseki. Survival of viable but non-culturable state *Campylobacter jejuni* by co-culturing with human small intestinal epithelial-like cells. International Association for Food Protection 2024 Annual meeting, Poster presentation, July 16, 2024 (Long Beach, USA)

3 特許権等の出願・申請等の状況  
なし

4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物  
なし

5 その他（各種受賞、プレスリリース等）  
なし

#### 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
<p><b>(1) VBNC 状態のカンピロバクター汚染実態の解明</b></p> <p>鶏肉の生産から消費に至る過程におけるカンピロバクターの VBNC 汚染実態を明らかにする。従来の培養法と新たな遺伝子解析手法による生菌数測定結果の差から VBNC 数を定量し、VBNC の存在実態を解明する。</p>	4	当初想定していた市販鶏肉から、VBNC 状態の菌と生菌とを分離定量することは現実的な総汚染菌数の実態から考えて、技術的にも困難であるだけでなく、VBNC が大量に潜んでいる可能性は低いことが明らかとなった。
<p><b>(2) VBNC 状態への移行および VBNC からの蘇生回復条件の探索</b></p> <p>カンピロバクターの VBNC 状態への移行、あるいは VBNC 状態からの蘇生回復条件を新たな VBNC 検出・分離技術を駆使して明らかにする。具体的には温度、pH、水分活性等の環境要因の影響を定量的に評価する。</p>	5	誘電泳動法とマイクロ流路装置による特定条件下で誘導された VBNC 細胞の分離・捕集方法は確立した。さらに、温度、乾燥、塩素といった複数のストレスから VBNC 状態に移行させる条件を見出し、それらについての分離捕集条件についても検討した。
<p><b>(3) VBNC 細菌細胞の生理活性状態の解明</b></p> <p>上述の VBNC 移行条件を基にして、効率的に VBNC 状態のカンピロバクターを誘電泳動法を用いて捕集し、VBNC 細胞内での遺伝子発現と代謝活性とを網羅的に解析することで、VBNC 細胞の生理活性状態を明らかにする。</p>	5	カンピロバクターの損傷・VBNC への移行条件に応じた、カンピロバクター細胞内での代謝活性の変化を明らかにするためにメタボローム解析、ATP 産生能力の評価、蛍光顕微鏡観察による膜機能の評価から、VBNC 状態に移行する際の代謝活性の変化の一部を明らかにした。
<p><b>(4) VBNC の発生および VBNC からの蘇生回復予測モデルの開発</b></p> <p>上記(1)～(3)で得られた知見を基盤にして、どういった環境条件で、どの程度の確率でカンピロバクターは VBNC 状態に移行するか、あるいは VBNC 状態から回復するかを評価可能とする数理/機械学習モデルを構築する。</p>	3	カンピロバクターの損傷・VBNC からの蘇生回復条件を様々な角度から検討し、小腸上皮様細胞への侵入特性の解析、VBNC 状態のプロテオーム解析も進めたが、培養能を回復させる条件を見出すことはできず、予測モデルの開発にも至らなかった。

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	4	カンピロバクターの VBNC への移行特性を明らかにして、VBNC をラベルフリーで分離定量する技術は開発できたが、蘇生条件の発見には至らなかった。
(2) 研究成果の有用性	5	カンピロバクターの生菌、死菌、VBNC 状態の菌体をラベルフリーで分離定量可能としたことは今後のリスク評価研究における基盤技術として有用である。
<p>総合コメント</p> <p>研究課題ごとに目標を達成できたものと、できなかったものが分かれたが、VBNC への移行条件や代謝活性の変化、誘電泳動法による VBNC 分離補足手法の構築といった新たな知見を多数見出し、研究全体とすれば今後のリスク評価研究の基盤技術を提供する有意義な成果が得られたものとする。</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)

「生きているが培養できないViable But Non-Culturable (VBNC)」状態の細菌に関して様々な研究がなされている。この間、細胞膜の活性に着目した蛍光染色法による検出技術の発展、さらには選択的膜透過性色素を用いたリアルタイムPCR法による生菌由来DNAの選択的な検出定量が可能となってきたが、未だにVBNC状態そのものの性質は明らかになっていない。本研究では誘電泳動法とマイクロ流路を組み合わせた技術を用いることで、蛍光色素等の化学修飾なし(ラベルフリー)に、特定の周波数帯においてVBNC状態の細菌細胞のみを捕集する技術を開発することに成功した。特に、カンピロバクター食中毒の原因の一つと考えられている不十分な加熱処理(50~60℃)において発生しうるVBNCをラベルフリーで分離定量する技術の開発に成功した。この手法によれば、VBNC状態のカンピロバクター細胞のみを捕集でき、VBNC細胞内の生化学的な変化を検討するための試料取得を可能とした。一方で、カンピロバクター食中毒の原因としてVBNC状態のカンピロバクターの潜在的な存在に注目したが、当初想定していた市販鶏肉からVBNC状態の菌と生菌とを分離定量することは現実的な総汚染菌数の実態から考えて、技術的にも困難であるだけでなく、VBNCが大量に潜んでいる可能性は低いことが明らかとなった。したがって、カンピロバクター食中毒が減少しない原因としてVBNCの存在に起因させることは無理があり、本研究では真相究明にまで至らなかった。

(別添2)

研究成果の概要 (英文)

Title of research project	Comprehensive characterization of <i>Campylobacter</i> in viable but non-culturable state by establishment of cell separation and capture technique using dielectrophoresis
Research project number	JPCAFSC20222203
Research period	FY 2022 – 2024
Name of principal research investigator (PI)	Shigenobu Koseki

Abstract/Summary

It is an established fact that various studies have been conducted on bacteria in the "Viable But Non-Culturable (VBNC)" state. These are bacteria that are alive but cannot be cultured. During this period, detection techniques using fluorescent staining methods focused on cell membrane activity have advanced significantly. Real-time PCR methods using selective membrane-permeable dyes have enabled the selective detection and quantification of DNA derived from viable bacteria. However, the nature of the VBNC state itself remains unclear. In this study, we developed a technique that combines dielectrophoresis and microfluidics to capture only VBNC bacterial cells at specific frequency bands without chemical modification (label-free). We have developed a technique to separate and quantify VBNC bacteria that may occur under insufficient heating conditions (50–60°C). This is one of the causes of *Campylobacter* food poisoning, and we have done so without labeling. This method allows us to collect VBNC *Campylobacter* cells alone, so we can investigate biochemical changes within them. However, we focused on the potential presence of VBNC *Campylobacter* as a cause of *Campylobacter* food poisoning. It became clear that separating and quantifying VBNC bacteria from commercially available chicken meat is not only technically challenging given the actual total contamination levels, but also unlikely due to the low probability of VBNC being present in large quantities. It is therefore unreasonable to attribute the lack of reduction in *Campylobacter* food poisoning to the presence of VBNC. Furthermore, this study did not reach a conclusive determination of the underlying cause.

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

None

2. List of presentations based on this research

- 1) Ami Iwasaki, Tomohiro Murakami, Kento Koyama, and Shige Koseki. Quantification of the number of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni* by an alternative novel technique using dielectrophoresis with

micro-fluidic device. International Association for Food Protection 2023 Annual meeting, Poster presentation, July 17, 2023 (Toronto, Canada)

2) Aika Iwasaki, Tomohiro Murakami, Kento Koyama, Shigenobu Koseki: Quantification and isolation of Campylobacter-damaging bacteria by combined technique using dielectrophoresis and microfluidic device. Japanese Society for Food Microbiology 2023 Annual Meeting, Osaka, Japan, September 20, 2023.

3) Tomohiro Murakami, Hiroto Nakajima, Hiroya Hoshino, Kento Koyama, and Shige Koseki. Quantification of viable but non-culturable Campylobacter jejuni by using PMA-qPCR and dielectrophoresis with micro-fluidic device. International Association for Food Protection 2024 Annual meeting, Poster presentation, July 16, 2024 (Long Beach, USA)

4) Hiroya Hoshino, Tomohiro Murakami, Kento Koyama, and Shige Koseki. Survival of viable but non-culturable state Campylobacter jejuni by co-culturing with human small intestinal epithelial-like cells. International Association for Food Protection 2024 Annual meeting, Poster presentation, July 16, 2024 (Long Beach, USA)

3. The number and summary of patents and patent applications

None

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

None