

B-24 河川水中 *Campylobacter jejuni* に対する ギラン・バレー症候群発症関連菌株の推定

○浅田 安廣^{1*}・大河内 由美子²・越後 信哉¹・伊藤 禎彦¹

¹京都大学大学院工学研究科都市環境工学専攻 (〒615-8540 京都府京都市西京区京都大学桂)

²麻布大学環境科学部 (〒252-0206 神奈川県相模原市中央区淵野辺1-17-1)

* E-mail: asada@urban.env.kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

水道水を介した水系感染症の主要原因菌の一つに *Campylobacter jejuni* がある。日本では塩素消毒の不備等により、*C. jejuni* による感染症が発生したケースが確認されている¹⁾。そのため、カルキ臭などによる水道水離れ問題の解決案の一つである残留塩素低減型水道システムを想定した場合、*C. jejuni* による微生物リスクが増加すると考えられる。さらに *C. jejuni* は、下痢症発症後にギラン・バレー症候群(Guillain-Barré syndrome; GBS)、反応性関節炎のような重篤な健康影響を引き起こす可能性があるため、飲料水曝露による *C. jejuni* が引き起こす健康影響として、下痢症以外にも続発症も考慮する必要がある。

重篤な神経障害であるGBS発症と *C. jejuni* の関連性については注目されており、*C. jejuni* が持つリポオリゴ糖(Lipooligosaccharide; LOS)のコア糖鎖部とヒト神経細胞構成因子であるガングリオシドとの間に分子相同性が確認されている²⁾。つまり、ガングリオシド様LOSを保有する *C. jejuni* の存在が、*C. jejuni* 感染症発症後のGBS発症に関わる微生物側因子であると考えられる。ガングリオシドはシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の総称であり、*C. jejuni* 菌株のLOS外部コア構造にシアル酸が含まれている場合、外部コア部分にガングリオシド様構造を形成し、その構造を持つ *C. jejuni* 菌株はGBS発症に関与する可能性があると考えられる。そしてその構造を持つ *C. jejuni* 菌株が水道原水中に存在する場合、*C. jejuni* による水系感染症が発症した後に続発症としてGBS発症をもたらす危険性があると考えられる。

こうした背景を踏まえて、本研究では、水道原水となる河川水中でのGBS発症に関連する *C. jejuni* 分離菌株の存在を把握することを目的とした。*C. jejuni* 菌株が持つ様々なLOS構造は遺伝子情報に基づいて19種類のクラス(A-Sクラス)に分けられている。GBS患者分離菌株の96%はクラスA, B, Cであると報告されており³⁾、*C. jejuni* のLOS

構造クラスがA, B, Cの場合、GBS発症に関与すると考えられる。本研究ではまず、水道原水となる河川水から *C. jejuni* を分離し、分離菌株に対してクラスA, B, CのLOS構造クラスを持つ *C. jejuni* の存在を把握した。

一方で、遺伝学的なGBS発症の可能性が直ちに、ガングリオシド様構造のLOSの保有を意味するとは言えない。そこで本研究では、河川水から分離した *C. jejuni* 菌株に対して液体クロマトグラフ・タンデム質量分析計(LC-MS/MS(リニアイオントラップ型))を用いた糖鎖構造解析を行い、シアル酸を含むLOSを保有する菌株の存在を確認した。

2. 実験方法

(1) 河川水中 *Campylobacter jejuni* の分離

調査対象として、桂川河川水(宮前橋付近)を選定した。河川水試料 3 L (30 本分)を滅菌した孔径 0.2 μm のメンブレンフィルター(ADVANTEC, A020A090C)を用いて加圧ろ過を行った後、20 mL の Bolton 培地(OXOID)に浸けて、37 °C、24 時間微好気培養を行った。24 時間培養後、培養液 2 mL を Preston 培地(OXOID) 10 mL に添加し、42 °C で 24 時間微好気培養した。

培養後、CCDA 寒天培地上に乗せたニトロセルロースメンブレンフィルター(孔径 0.45 μm, Whatman)に培養液 200 μL を添加し、37 °C で 2 時間培養した。培養後、メンブレンフィルターを取り除き、そのまま 42 °C で 48 時間、微好気培養した。CCDA 寒天培地に分離されたコロニーから疑わしい集落を全て釣菌し、PBS(pH 7.4)に懸濁した後、CCDA 寒天培地 2 枚に同量添加した。1 枚ずつ好気条件、微好気条件で 42 °C、48 時間培養し、微好気条件のみで生えたコロニーに対して DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した。

次に DNA ポリメラーゼと反応組成液(TAKARA Ex Taq), *C. jejuni* に特異的な *mapA* 遺伝子を増幅する 2 種類のブラ

イマー⁹⁾で調製した PCR 反応液を用いて、抽出した鋳型 DNA に対してサーマルサイクラー (TAKARA PCR Thermal Cycler Dice[®], タカラバイオ株式会社) を用いて、その後、1.5 % アガロースゲル電気泳動により増幅断片を分離し、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドで染色後、UV 照射により増幅断片を確認し、DNA 増幅断片が確認できたサンプルを *C. jejuni* 陽性と判断した。

(2) 遺伝子保有状況による *Campylobacter jejuni* の LOS 構造クラス判定

LOS 構造クラス判定には、様々な遺伝子保有状況の確認が必要である。本研究では LOS 構造クラスとして、クラス A, B, C のみの判定であることから、Koga ら (2006) がクラス A, B, C 判定に用いた遺伝子 (*orf7ab*(*cst II*): クラス A, B, *orf5 IIb* (*cgtA IIb*): クラス B, *orf7c*: クラス C) それぞれに特異的な 2 種類のプライマー⁹⁾を用いて、*C. jejuni* 分離菌株に対して PCR により各遺伝子の保有状況を把握し、LOS 構造クラスを判定した。判定方法は、*orf7ab* のみ保有している場合はクラス A, *orf7ab*, *orf5 IIb* を保有している場合はクラス B, *orf7c* のみ保有している場合はクラス C とした。いずれの遺伝子も検出しなかった場合は UC (Unclassified) とした。

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

河川水から分離した *C. jejuni* 菌株をニュートリエント No.2 培地 (OXOID) で増菌培養し、温水-フェノール法で LOS を抽出した。次に LC-MS/MS を用いて、プレカサートイオンスキャンを行い、シアル酸を持つ可能性がある構造を示すシグナルを抽出した。シアル酸のシグナルは、ネガティブモードで $m/z=290$ に出現することが確認されている⁹⁾ことから、プレカサートイオンスキャンでは $m/z=290$ のフラグメントイオンをターゲットイオンと設定した。得られたシグナルに対して、プロダクトイオンスキャンを行い、得られたプロダクトイオンのスペクトル情報から、シアル酸含有 LOS を保有する *C. jejuni* 菌株を推定した。そしてそれらの菌株を GBS 発症関連菌株として判定し、GBS 発症関連菌株の存在を把握した。

3. 結果と考察

(1) 遺伝子保有状況による GBS 発症関連菌株の存在把握

河川水から分離した *C. jejuni* 分離菌株全 76 株の LOS 構造クラスを判定した結果、クラス A が 14 株 (16%)、クラス B が 0 株 (0%)、クラス C が 3 株 (4%)、クラス A, C の複合クラスが 3 株 (4%)、UC が 56 株 (73%) であった。GBS 発症に関連する構造クラスの中では、クラス A が最も多い割合を占めていた。Koga ら (2006) は、胃腸炎、GBS 発症患者から

分離した *C. jejuni* 菌株に対して、LOS 構造クラス判定 (クラス A~F) と抗ガングリオシド抗体 (GM1a 抗体, GD1a 抗体, GT1b 抗体) との抗原抗体反応による結合の確認を行っている⁹⁾。その結果、クラス A の菌株と GM1a 抗体, GD1a 抗体との抗原抗体反応が最も強く生じており、GBS 発症との関連性を示唆していると報告している。本研究でも、クラス A が最も多く確認されていることから、河川水から分離した菌株の中に GBS 発症関連菌株が存在する可能性が高いと判断できる。

(2) 糖鎖構造解析に基づいた GBS 発症関連菌株の存在把握

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

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

$m/z=599$ のシグナルに対するプロダクトイオンスキャン結果では $m/z=290$ のシグナルが存在し、シアル酸の存在が確認された。また、 $m/z=290$ 以外にシアル酸に関連するシグナルとして $m/z=581$ が確認された。 $m/z=581$ は、シアル酸が二個結合している構造を示すシグナルであることが確認されている⁹⁾。そのため、検討している菌株の LOS にはシアル酸が二個結合した構造を含んでいると考えられる。以上から、 $m/z=599$ のシグナルをシアル酸含有 LOS 構造のシグナルと判断した。そして、 $m/z=599$ のシグナルが確認できた 9 株全てで、プロダクトイオン

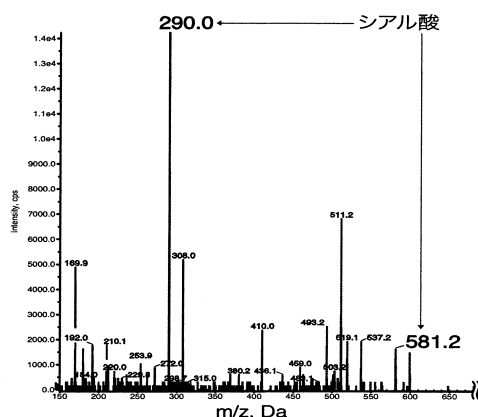


図-1 $m/z=599$ に対するプロダクトイオンスキャン結果

表-1 シアル酸含有 LOS 保有菌株に対する LOS 構造クラス判定結果

LOS構造クラス	シアル酸保有菌株数	シアル酸保有なし菌株数	合計
A	3	11	14
C	2	1	3
A/C	3	0	3
UC	1	55	56

キャンにより $m/z=290$ あるいは 581 、図1に示した主要ピークが確認できた。そのため、これらの菌株は全て同様の構造を保有していると判断した。

続いて、LOS構造クラスとLC-MS/MSによる糖鎖構造解析の結果を比較した。その結果を表-1にまとめる。シアル酸含有LOSを保有する9株のLOS構造クラスは、クラスAが3株、クラスCが2株、クラスA、Cの複合クラスが3株、UCが1株であった。クラスAではGM1、GD1a様構造、クラスCではGM1a様構造を表現していると言われている⁹⁾。しかし、構造分析の結果ではシアル酸を2個含んだ構造が確認されていることから、GM1、GD1a構造ではない可能性がある。既往研究では、クラスAと判定されたGBS関連菌株の中にガングリオシド様構造としてGD3、GT1a様構造を保有している菌株も存在していることが確認されている⁷⁾。本研究で確認されたシグナルもシアル酸を2個含んでいることから、LC-MS/MSによるLOS構造分析では、GD3、GT1a様構造をベースとしたコア糖鎖構造が検出したと考えられる。そしてGT1aあるいはGD3をベースとしたコア糖鎖構造を持つシアル酸含有LOSを保有している菌株が存在すると判断し、これらをGBS発症関連菌株であると推定した。以上から、河川水を水道原水とした場合、*C. jejuni*によるGBS発症のリスクが存在すると判断した。

一方で、遺伝子情報でシアル酸保有なしと判定されたUCの菌株の中に、LOS構造分析によりGT1aあるいはGD3をベースとしたコア糖鎖構造を持つシアル酸含有LOSを保有している菌株が確認された。シアル酸自体は確認されていることから、今回設定した遺伝子保有状況による構造クラス判定では、シアル酸含有LOSを保有している菌株を確認しきれない可能性があると考えられる。今後、LOS合成関連遺伝子保有状況と構造分析によるLOS構造の情報を増やし、GBS発症関連菌株判定に必要な情報を明確にしていける必要があると考えられる。

4. まとめ

河川水から分離した*C. jejuni*分離菌株全76株に対して、LOS合成関連遺伝子保有状況によるLOS構造クラス判定、

LC-MS/MSによるLOS構造分析を行い、GBS発症関連菌株の存在実態把握を試みた。まずLOS構造クラス判定の結果、クラスA、CのLOS構造クラスを持つ*C. jejuni*が確認された。次にLC-MS/MSによるLOS構造分析の結果、シアル酸含有LOSのコア糖鎖構造の存在が確認された。LOS構造クラスの情報を含め、シアル酸含有LOSのコア糖鎖構造はGD3、GT1a様構造であると推定し、河川水から分離した菌株の中にGBS発症関連菌株が存在すると判断した。そのため、飲料水曝露後の*C. jejuni*が引き起こす疾病にはGBS発症のリスクが存在する可能性が示された。

謝辞：本研究は、平成24年度科学研究費助成事業(若手研究(B))の一部として行った。記して謝意を示す。

参考文献

- 1) 山田俊郎, 秋葉道宏: 最近 10 年間の水を介した健康被害事例, 保健医療科学, Vol.56, pp.16-23, 2010.
- 2) Yuki, N.Taki, T., Inagaki, F., kasama, T., Takahashi, M., Saito, K., Handa, S. and Miyatake, T.: A bacterium lipopolysaccharide that elicits Guillain-Barré syndrome has a GM1 ganglioside-like structure, *J. Exp. Med.*, Vol.178, pp.1771-1775, 1993.
- 3) Gilbert, M., Karwaski, M.-F., Bernatchez, S., Young, N. M., Taboada, E., Michniewicz, J. Cunningham, A.-M. and Wakarchuk, W. W.: The genetic bases for the variation in lipo-oligosaccharide of the mucosal pathogen, *Campylobacter jejuni*: Biosynthesis of sialylated ganglioside mimics in the core oligosaccharide, *J. Biol. Chem.*, Vol.277, pp.327-337, 2002.
- 4) Khan, I. U., Gannon, V., Loughborough, A., Jokinen, C., Kent, R., Koning, W., Lapen, D. R., Medeiros, D., Miller, J., Neumann, N., Phillips, R., Robertson, W., Schreier, H., Topp, E., van Bohove, and Edge, T. A.: A methods comparison for the isolation and detection of thermophilic *Campylobacter* in agricultural watersheds, *J. Microbiol. Methods*, Vol. 79, pp.307-313. 2009.
- 5) Koga, M., Gilbert, M., Takahashi, M., Li, J., Koike, S., Hirata, K. and Yuki, N.: Comprehensive analysis of bacterial risk factors for development of Guillain-Barré syndrome after *Campylobacter jejuni* enteritis, *J. infect. Dis.*, Vol.193, pp.547-555, 2006.
- 6) Dzieciatkowska, M., Brochu, D., van Belkum, A., Heikema, A. P., Yuki, N., Houliston, R. S., Richards, J. C. Gilbert, M. and Li, J.: Mass spectrometric analysis of intact lipooligosaccharide: direct evidence for O-acetylated sialic acids and discovery of O-linked glycine expressed by *Campylobacter jejuni*, *Biochemistry*. Vol.46, pp.14704-14714, 2007.
- 7) Yuki, N. and Tsujino, Y.: Familial Guillain-Barré syndrome subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis, *J. Pediatr.*, Vol.126, p.162, 1995.