

Video tracking法による細菌の運動パターンと運動速度の解析

重松, 美加
九州大学医学部細菌学教室

<https://doi.org/10.15017/7238748>

出版情報：福岡醫學雜誌. 88 (4), pp.117-127, 1997-04-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：



Video tracking 法による細菌の運動パターンと運動速度の解析

九州大学医学部細菌学教室 (指導: 天児和暢教授)

重 松 美 加

Analysis of the Swimming Pattern and the Velocity of Bacteria using Video Tracking Method

Mika SHIGEMATSU

Department of Bacteriology (Director: Prof. K. Amako), Faculty of Medicine,
Kyushu University 60, Fukuoka 812-82

The swimming patterns and the velocities of several flagellated bacteria were measured by a computer-assisted video tracking method. The moving path of the individual bacterium revealed that the bacterium frequently changed its swimming direction and velocity. The velocity among bacterial strains varies widely. In low viscous environment, *Campylobacter jejuni* has characteristic swimming pattern with frequent changes in their swimming direction. As the viscosity increase, *C. jejuni* increases its velocity at a little higher viscosity of 3 centipoise (cP) and secondly increases at about 40 cP. Different from other flagellated bacteria, the swimming pattern of *C. jejuni* in these two velocity peaks were changed. *C. jejuni* exhibited continuously forward moving path in the first peak, but in the second it repeated back and forth swimming pattern. We thus assumed that *C. jejuni* may use a different swimming mode in high viscous media from the original mode mediated by the propelling force of the flagella. This method is useful for a detail analysis of bacterial movement and moving patterns in different environmental conditions.

は じ め に

細菌の運動性は病原性にも関与していることが知られている⁹⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²⁴⁾²⁸⁾。特に腸管感染症の起因菌においては、腸管上皮細胞への定着に関与していると考えられている。この運動性は鞭毛の回転運動によりもたらされるが、鞭毛の菌体への付着様式の違いにより運動の速度が異なることが知られている²⁰⁾²²⁾。従来細菌の運動の観察はビデオテープの再生をトレースする方法や、一定距離に要する移動時間を測定することにより成されてきた⁶⁾²⁰⁾²²⁾。今日、ビデオ、顕微鏡、およびコンピューターによるイメージプロセッシング法の進歩によって、速度のみならず、そのパターンまで詳細な解析が容易に行えるようになった²¹⁾。

Campylobacter jejuni は人の下痢性疾患の代表的な原因菌である³⁾。一般に下痢原性の菌は、腸管へ定着するための定着因子を持っていることが感染の必要条件となっている。毒素原性大腸菌では線毛が定着因子と

して機能しているが、*C. jejuni* は線毛を持たず、腸管への定着には鞭毛による運動性が重要であることが示されている¹⁷⁾¹⁸⁾²⁷⁾²⁸⁾。それは次のようなこれまでの研究結果による。まず、諸岡らにより、この菌の運動性を欠落した各種変異株が分離され¹⁷⁾、そのいずれもがマウスの腸管への定着性を消失していることが明らかにされた。次いで植木らは、抗鞭毛抗体が定着を阻止し得ることを示し²⁵⁾ 諸岡らの実験を支持する結果を得ている。さらに高田らは、走化性を失った株を分離し、これらの株が腸管内で定着ができないことを証明し、走化性鞭毛運動が感染に重要であることを明らかにした²⁴⁾。しかし、腸管感染の機構を詳細に見ると、腸管への定着には腸管上皮の表面を覆う厚い粘液層を菌が通過し得るか否かが重要であることは容易に予想できる⁴⁾⁵⁾⁹⁾¹³⁾¹⁶⁾。したがって、運動性についてもその評価が必要であることは言うまでもない。

本研究は、種々の有鞭毛菌の運動性を Video tracking 法という、物の動きを軌跡として記録するイメー

ジプロセッシング法を利用して解析し、とくに *C. jejuni* の粘稠液中での運動の変化、抗体処理による運動への影響を記録解析し、腸管粘稠液中での細菌の運動の解明を試みたものである。

実験方法

菌株と培養条件

小児下痢症患者より分離された *C. jejuni* FUM 158432 株とその非走化性変異株である N 74 と Y 14 株を用いた。N 74 と Y 14 株は野性株より変異誘導剤 methylmethanesulfonate 処理にて得た株である²⁴⁾。これらの菌株は、10%脱繊維羊赤血球加ブルセラ寒天培地上で、もしくはブルセラブロス内で、42°C で酸素除去のための触媒をはずした GasPak jar (ガスパック嫌気システム, BBL, Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) 内の微好気条件下で培養した。*Vibrio cholerae* non O1 VO 18 株, AI 1854 株, *Pseudomonas aeruginosa* K 株, NO 5 株, P 15 株, *Salmonella typhimurium* LT-2 株, *Bacillus subtilis* W 23 株, および *Proteus vulgaris* (臨床分離株) は、普通寒天培地もしくは普通培地で培養しこの実験に用いた。これら菌株は、すべて九州大学医学部細菌学教室保存株である。なお、ブルセラブロス (Difco Laboratories, Detroit, Mich) の処方 は次の通りである。水 1 ℓ に対して Bacto Tryptone 10 g, Bacto Peptamin 10 g, Bacto Dextrose 1 g, Bacto Yeast Extract 2 g, 塩化ナトリウム 5 g および塩化硫酸水素 0.1 g を溶かしたものから成る。

観察試料の作製

24 時間培養した寒天培地上の菌を適当な液体培地に接種し、対数増殖期まで培養した (*C. jejuni* は 17 時間、その他の菌については 2 時間)。培養菌液は、0.1 M の PBS (Phosphate buffered saline: NaCl 8 g, Na₂HPO₄ 29 g, KCl 2 g, KH₂PO₄ 2 g, 水 1 ℓ, pH 7.0) 溶液で 10⁶ CFU/ml まで希釈した²¹⁾。その菌液を 1 滴清浄な新しいスライドガラス上に採り、直ちにカバーガラスで覆った。ガラスに挟まれた菌液の層がなるべく薄くなるように、カバーガラスの表面を軽くピンセットで押さえ、全周をエナメルで封入した。これは、溶液の蒸発を防ぐためである。乾燥すると液体の流動が起こり、観察が難しくなる。

観察と記録

試料は暗視野顕微鏡を用い、対物レンズの 20 倍もしくは 10 倍で観察した。観察はステージ上の温度が 30 °C に保たれている、5 分間の間に終了する様にした。

運動性の菌体が視野に現れたら、DVS-1000 ビデオトラッキング装置 (Hamamatsu Photonics Co., Ltd., Sizuoka) でその運動の軌跡をトレースし、同時にビデオテープに記録した。記録時間は菌体の運動速度により 3 から 6 秒間、遅いものは 5 から 10 秒間とした。とくに、*C. jejuni* はその特徴を示すために長時間記録も行った。記録したビデオテープは再生し、必要な個所をビデオプリンター (YP-186 XC, Sony Corp., Tokyo) で出力し映像として残した²¹⁾。

運動パターンの解析

ビデオプリンターで出力した映像は、画像処理装置 (Nikon Luzex 3, Nireco Co., Ltd., Tokyo) により軌跡の解析を行う。速度の計算、運動の方向の解析、タンプリング回数の計算、時間経過に伴う運動速度の変化などである。なお、解析に用いた各菌個体は、記録を開始した時点で運動していたもので、記録中動かなかったもの、極端に動きの遅いものは対象から除外した。

Tethered cell²⁾の観察

鞭毛によりカバーガラスに付着した菌体を利用して菌体の回転運動を観察した。運動は、一旦ビデオテープに記録したのち、こま送りで再生して、回転の方向、その方向転換および、回転数を記録した。

走化性物質に対する運動の観察

PBS を溶媒とした 0.1 M ピルビン酸溶液をスライドガラスの一端から三分の一の所へ置き、ゆっくりとカバーガラスを被せた。右端以外の 3 か所をエナメルで封入し、10⁶ CFU/ml 菌液を、開いている右端から注入して閉じた。カバーガラス下で生じた走化性物質の濃度勾配による菌の運動の変化と運動速度をカバーガラスの右端から三分の一、中央、対側三分の一の所で、観察記録した。

粘性溶液の作製と粘度の測定

PBS を溶媒として、適当量の各溶質を溶解し粘稠な溶液を作製した。溶質として用いたのは、MC (Methylcellulose: Sigma Chemical Co., St. Louis, 分子量 4,000), PVP (Polyvinylpyrrolidone: Sigma Chemical Co., 分子量 360,000), CMC (Carboxymethylcellulose: Sigma Chemical Co., 分子量 130,000) である。この三者による運動の変化は類似していたため、本実験での結果は MC に対する運動パターンのみを示した。

各溶液の粘度は 30 °C の環境下で、キャノン-フエンスケ型粘度計 (柴田化学工業株式会社) または、ウェロー型粘度計 (草野科学工業) でもとめた動粘度と、

ゲイリーリサック型フラスコによる密度より下記の式から算出した。

$$\text{動粘度 (cSt)} = \text{流出時間 (sec)} \times \text{定数}$$

$$\text{粘度 (cP)} = \text{cSt} \times \text{密度 (g/ml)}$$

鞭毛および Hook 蛋白の精製

植木らによる方法²⁶⁾を改良し鞭毛の精製を行った。*C. jejuni* FUM 158432 株を 500 枚のブルセラ寒天培地より集菌し、10 mM トリス緩衝液 (pH 7.6) で洗浄後トリス緩衝液 20 ml に浮遊させ、超音波発生機 (Branson's Sonifier Cell Distruptor model 200, Branson Sonic Power Co., Danbury, Conn.) で処理した。分画遠心処理 (10,000 xg, 20 分, 100,000 xg, 120 分) を一回行った後、0.01% Lysozyme, 10 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) で 30°C 30 分間処理後 2% Triton X-100 を加え、再び分画遠心を一回行う。沈渣をトリス緩衝液 1 ml に浮遊し、Sephacryl 300 カラムにかける。二つのピークの後で得られた蛋白を精製鞭毛として用いた。

鞭毛を精製したのち、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を Laemmli の方法¹²⁾ に準じて行い、分子量 92 kDa の位置に認められる hook 蛋白のバンドを切り出し、4°C で PBS 中に溶出させた。5000 xg で遠心した上清を hook 抗原として用いた。

抗血清の作製

鞭毛の多価抗体は、不完全フロインドアジュバンドを用いてニュージーランド白兔 (雌, 3 kg) に粗精製鞭毛を 1 週間隔で 2 回皮下接種後、精製鞭毛を 1 週間隔で 2 回耳静脈に接種して得た抗血清を、プロテイン A アフィニティーカラム (Amersham Japan, Shirai Laboratory, Chiba) にかけて IgG を精製した。IgA 単クローン抗体は以前の報告で示した様に BALB/c マ

ウスにより作製²⁵⁾²⁶⁾したものを、-20°C に凍結して使用時に解凍希釈して用いた。抗 hook 抗血清は精製した抗原を ddY マウス (雌, 6 週齢) に不完全フロインドアジュバンドで 1 週間隔で 4 回皮下免疫し、1 週間後に採血し血清を分離した。すべて、56°C, 30 分の処理で補体を失活した後保存していた。

電子顕微鏡観察法

抗鞭毛抗体と抗 hook 抗体の特異性は金コロイドをプローブとした免疫電顕法⁹⁾¹⁹⁾により確認した。エッペンデルフチューブ内で抗血清 (1:10) と菌液 (10⁸ CFU/ml) を混和し 37°C で 20 分反応させた後、遠心し、PBS で洗浄後、1 ml のプロテイン A ゴールドと 20 分間室温で反応させた。余剰のコロイド金を除き、PBS で洗浄後、再度 PBS に浮遊させ常法に従いフォルムバル膜を張った電顕用のグリッドに乗せて 0.5% Uranyl formate にてネガティブ染色し JEM-2000 EX 電子顕微鏡で 100 kV で観察した。

統計学的処理

表 1 に示した各菌株の運動速度は Bonferroni correction を用いた multiple comparison にて各菌株間の運動速度について統計学上の有意差を検討した。

実 験 結 果

各菌株の運動速度の測定

C. jejuni, *C. fetus*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, および *P. vulgaris* の各菌液を PBS 緩衝液で希釈し、単個体の運動を Video tracking 法で記録し、記録時間と軌跡の長さより速度を計算した。測定結果は表 1 に示した通りであった。*V. cholerae* が最も速く、次いで *P. aeruginosa* で、*P. vulgaris* が最も遅かった。単毛菌は一般に周毛菌より

表 1 有鞭毛菌の video tracking 法による運動速度

Bacteria	Number of samples examined	Velocity(μm/sec)		
		Maximum	Minimum	Average±SD
<i>C. fetus</i>	52	40.5	20.4	32.5±4.3
<i>C. jejuni</i>	66	52.7	28.0	39.4±7.3
<i>P. aeruginosa</i>	55	49.7	32.7	40.4±5.2
<i>V. cholerae</i>	50	94.7	63.7	79.6±9.0
<i>S. typhimurium</i>	76	26.5	17.3	20.3±2.5
<i>P. vulgaris</i>	25	19.4	10.2	13.7±2.9
<i>B. subtilis</i>	37	23.9	13.2	16.8±2.5

平均運動速度は Bonferroni correction による multiple comparisons で統計学的に有意差があった(p<0.01)。

速いと言われていたが³, Video tracking 法によってもそれが証明された。同じ単毛菌あるいは、周毛菌でも、菌の種類により速度が異なっていた。*C. jejuni* は、*V. cholerae* の約半分の速度しかなかった。図1と図2に各種細菌の運動の軌跡の一例を提示した。

一つの菌体の運動を長く観察すると、菌の運動は等速直線運動ではないことが解った。*C. jejuni* の運動パターンによって特徴的に示されるように、菌体は頻繁に方向を変え、回転したり、時には一旦停止した後再び運動を再開した。表1に示した速度は最も速かつ連続的に運動している時に測定した速度である。周毛菌は運動の際、菌体の一方へ周毛を束ねて螺旋状にまとめて回転させている。通常鞭毛は反時計回りに回転

されるが、時折時計回りに逆回転させ、鞭毛をほぐし方向転換をする。この動きを、タンプリングと呼んでいるが、Video tracking 法で得た画面上では、これは運動方向の変換として表された。単毛菌の運動方向の変換も、前進運動の停止もしくは斜め後方へのきわめて短い移動とそれに続く別な方向への再度の前進から成っている事が観察された。本文中では、これを周毛菌の例に倣って単毛菌のタンプリングと表現することとした。

低粘度環境下における *C. jejuni* 運動パターン

0.1 M PBS を低粘度溶液として用い、この中での運動パターンを解析した。*C. jejuni* 野性株の運動速度は、3 秒間の記録から算出され、表1に示してある。

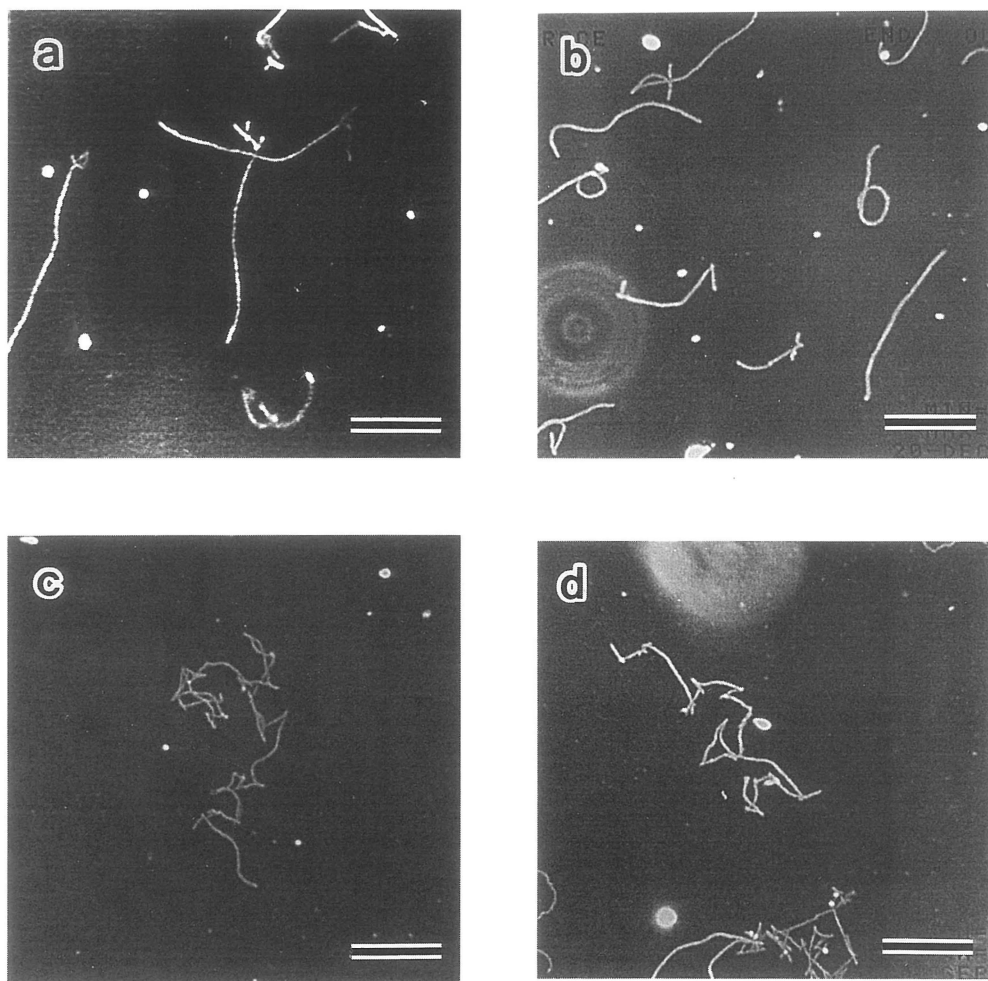


図1 単鞭毛菌のPBS内でのvideo tracking法による運動パターン。(a) *Vibrio cholerae* non O1 VO18株の3秒間の運動軌跡。(b) *Pseudomonas aeruginosa* K株の3秒間の運動軌跡。(c) *Campylobacter jejuni* FUM 158432株の15秒間の運動軌跡。(d) *Campylobacter fetus* 臨床分離株の15秒間の運動軌跡。スケール 100 μ m。

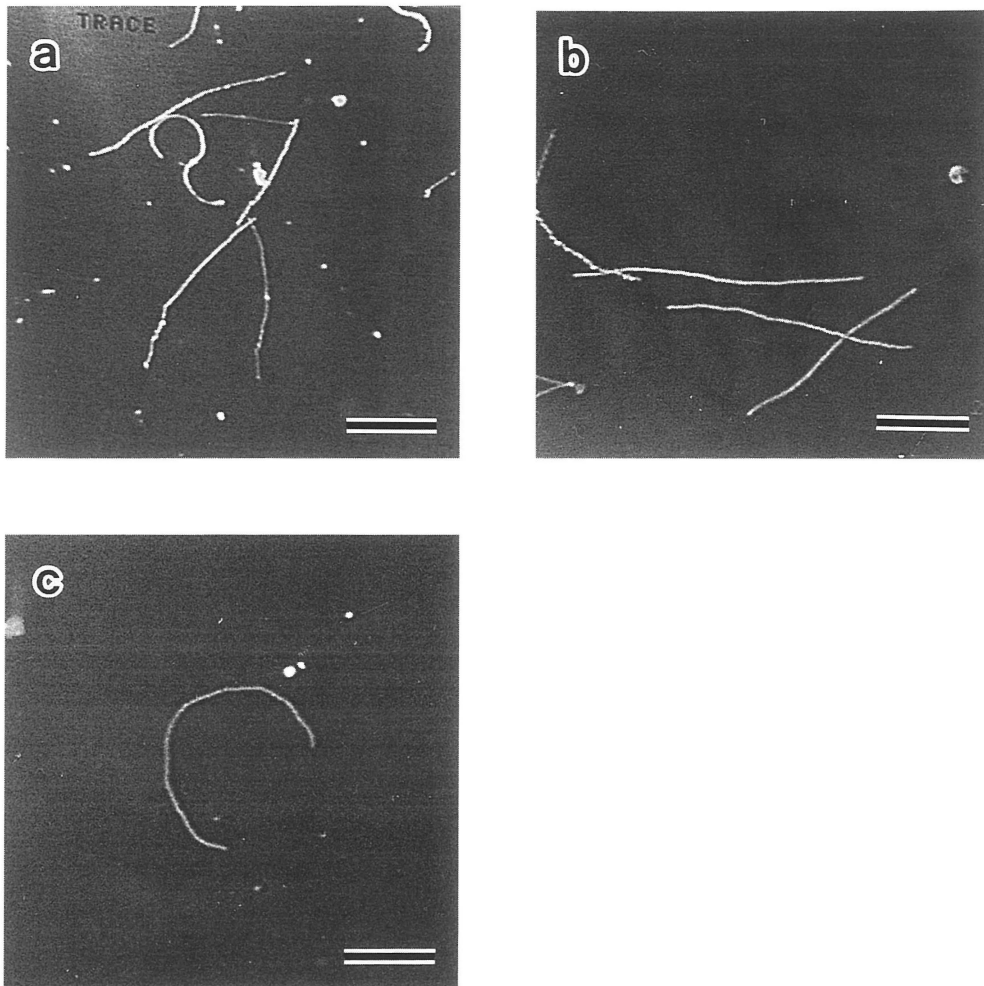


図2 周鞭毛菌のPBS内での video tracking 法による運動パターン. (a) *Salmonella typhimurium* LT-2 株の5秒間の運動軌跡. (b) *Bacillus subtilis* W 23 株の10秒間の運動軌跡. (c) *Proteus vulgaris* 臨床分離株の10秒間の運動軌跡. スケール 100 μm .

野性株の運動速度は $39.3 \mu\text{m}/\text{sec}$ で *V. cholerae*, *P. aeruginosa* よりは遅いが, *S. typhimurium* に比べると速い.

二つの非走化性株は, それぞれ N 74 株が $21.9 \mu\text{m}/\text{sec}$ と Y 14 株が $22.5 \mu\text{m}/\text{sec}$ の平均速度を持ち, どちらも野性株より遅かった. この両者は運動パターンにおいても野性株とは著しい差が見られた. 野性株と非走化性株の典型的運動パターンを図 1-c と図 3 に示した. 図 1-c にあるように野性株の特徴は頻繁な運動方向の転換を意味するジグザグの動きであった. 非走化性株の運動パターンはこれと異なり, 高田らも報告²⁴⁾ しているように観察を続けた 15 秒の間一つの方

向転換の頻度が著しく多いのも特徴の一つでその頻度は, 図 4 に示すように他の菌の 10 倍から 100 倍であった.

Tethered cell での鞭毛の回転運動

実験方法に示したように, スライドガラスに菌体の一端を付着させた Tethered cell で鞭毛の回転方向の変換を観察して見ると, 通常逆時計回りに菌体は回転しているが, 15 から 20 回転に一回の割合で, こま送りのビデオ像から時計回りに数回回転することが確認された.

走化性物質へ向かう *C. jejuni* の運動

走化性物質によるタンプリングへの影響を知るため

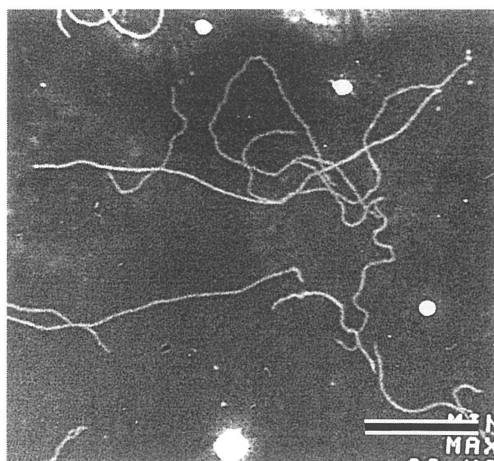


図3 *C. jejuni* 非走化性突然変異株 Y14 の PBS 内での video tracking 法による運動パターン. スケール 100 μm .

に, 0.1 M ピルビン酸を走化性物質として用い検討した. ピルビン酸ナトリウムの濃度勾配の作製法は方法の所で示した. 3カ所のピルビン酸濃度の異なる場所での運動速度とパターンの解析から, 走化性物質より遠い所では PBS の中で示したような方向転換を伴う運動を行い, 走化性物質に近づくにつれて, タンブリングの頻度が減少した.

運動性に対する抗鞭毛抗体の効果

マウスの腸管内で抗鞭毛抗体が *C. jejuni* の定着に対して阻害作用を示すことが報告されている²⁵⁾. 今回は抗鞭毛多価抗体と IgA 単クローン抗体の運動速度とパターンに対する影響を見た. まず, 免疫電顕法により用いた抗体の反応特異性を確認した. 図 5-a と図 5-b に見る様に抗 hook 抗体は hook にのみ反応し, 鞭毛繊維には反応しない. 一方鞭毛繊維に対する抗体は hook に反応しなかった. どちらの抗体も菌体に対しては全く反応しなかった. 抗鞭毛多価抗体および IgA 単クローン抗体のいずれの抗体で処理をしても, 運動速度は野性株, 突然変異株共に未処理の場合に比べて約 30% 減じた.

抗鞭毛繊維抗体の運動パターンに対する影響は著しく, 図 5-d に示したように未処理の菌の運動に比べ広い範囲に広がる運動をせず狭い範囲内でしか動かなくなる. 幾つかの菌体は狭い範囲で回転運動をする事も観察された. 用いる抗体の濃度が上昇するに伴い, 回転運動をする菌の割合も増加した. これより抗鞭毛抗体は効果的に *C. jejuni* の運動を阻害することが明らかになった. 一方, 抗血清を 4 倍に希釈した時点でこ

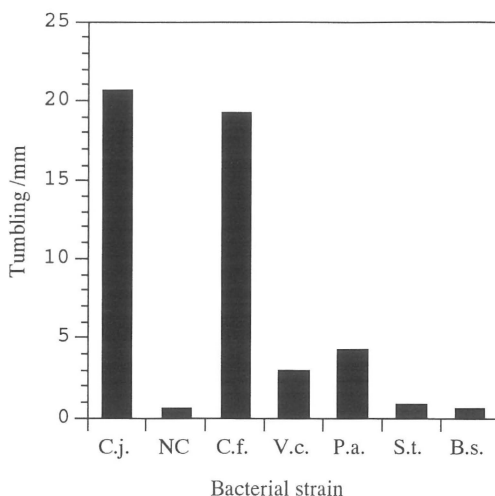


図4 運動中の細菌の方向転換頻度. 各々のデータは 30 個体の平均により求めた. C.j. は *Campylobacter jejuni*, NC は *C. jejuni* の非走化性株, C.f. は *Campylobacter fetus*, V.c. は *Vibrio cholerae*, P.a. は *Pseudomonas aeruginosa*, S.t. は *Salmonella typhimurium*, B.s. は *Bacillus subtilis* を表している.

の効果は失われ, 正常に運動する菌体の割合も増加した. 単クローン IgA 抗体では 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で抗血清の場合と同じ結果を得た. 走化性突然変異株に対する抗鞭毛抗体の作用は, 野性株に対するのと同様であったがより低濃度で運動を阻害した.

細菌の鞭毛は鞭毛繊維と hook と言う二つの部分から成っているが, 後者の部分に対する抗体の作用を見るために, 精製した hook 蛋白を用いて抗 hook 抗血清を作製し, *C. jejuni* の菌体と作用させてみた. 結果は図 5-c に示す通りである. この抗体は, 野性株, 突然変異株の両者において, 運動速度, 運動パターンのいずれにも影響を与えなかった.

高粘度溶液中の運動

腸管粘液層の疑似環境を作るために, MC を PBS 緩衝液に溶かして高粘度溶液を作った. この実験系では一回に 30 菌体以上を観察し, それを三回繰り返した結果の平均値を用いた.

図 6 に示したのは, 数種の有鞭毛菌種における溶液の流動性 (1/粘度) の変化に伴う運動速度の変化である. 図は MC の濃度が上昇するに伴い, 運動速度が一旦増加してある濃度に達すると徐々に低下するのを示している. 今回用いた全ての菌種においては, 0.3-0.5 cP^{-1} (2.0-3.0 cP) の所で最高速度を示し, その後流動性が低下すると速度も低下して行く. V.

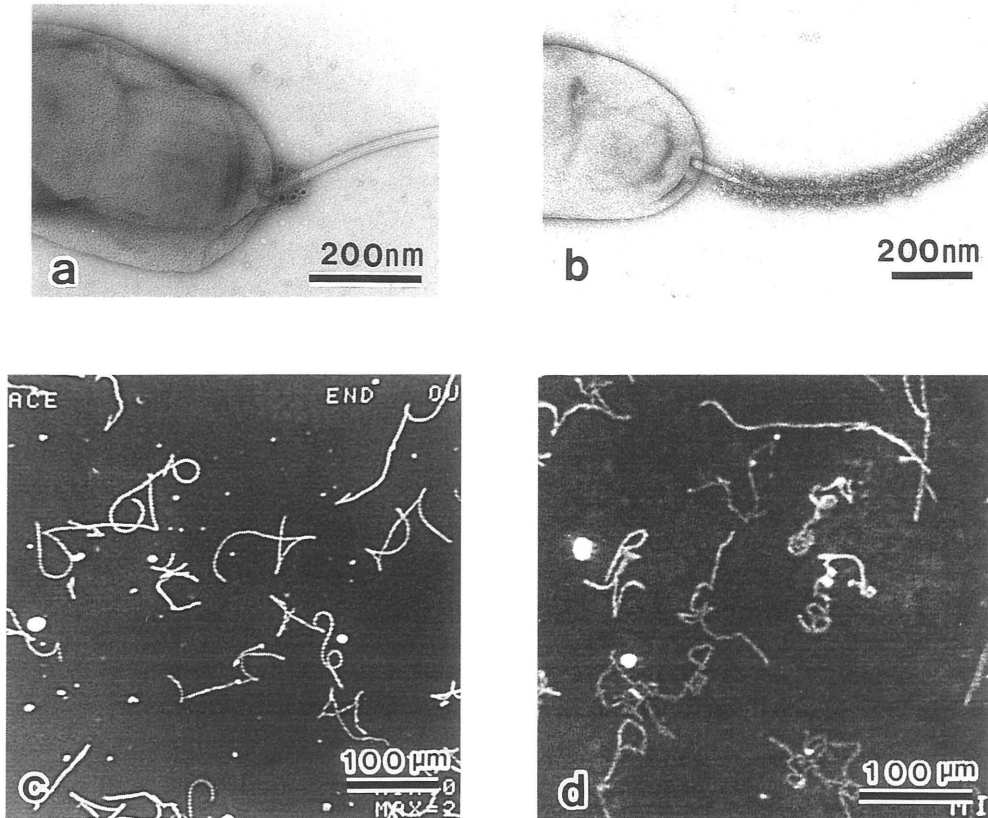


図5 抗血清で処理した *C. jejuni* 野性株の video tracking 法による運動パターン. (a)抗 hook 抗体で処理をした *C. jejuni* の免疫電顕図. (b)抗鞭毛 IgA 抗体-フェリチンで処理をした *C. jejuni* の免疫電顕図. (c)抗 hook 抗体で処理をした *C. jejuni* の video tracking 法による運動パターン. (d)抗鞭毛 IgA 抗体で処理をした *C. jejuni* の video tracking 法による運動パターン.

cholerae や *S. typhimurium* は速度のピークは一つしか見られないが, *C. jejuni* では, さらに流動性の低い 0.025 cP^{-1} (40 cP) の近辺で再び速度の上昇を見た. これは, 異なる測定方法で報告されているこの菌の運動速度の変化についての報告と矛盾しない⁶⁾¹⁰⁾²³⁾.

C. jejuni のこの二つのピークでは, 運動のパターンが異なっていた. 図 7-a から d に示すように, 最初のピークでは *C. jejuni* に特徴的であった方向転換を挟んだ動きを失い, 非走化性株の様に連続して同一方向に運動する様になった. この特徴は 0.025 cP^{-1} (40 cP) 近辺まで認められ, 粘度が高くなった二つ目のピークではこれまでに全く見られなかった, 頻回に方向を変える運動へ変わった. PBS 内での運動と異なる点は運動の進行方向に対して平行に前後への「行きつ戻りつ」の方向転換が増える点にある. この粘度以上は, 徐々に速度が低下しやがてブラウン運動的な振動運動だけになった.

非走化性株も 0.033 cP^{-1} (30 cP) に一つの速度のピークを有するが, 運動のパターンは基本的には PBS 内で見られたものと同様で変化しなかった.

考 察

Video tracking 法を用いて測定した種々の菌の運動速度は, 同じ単毛菌の間でも菌種により異なっていた. このことは菌体の大きさ, 形態, 鞭毛の直径, 回転速度, トルク数などの違いが関与していると考えられる. また, 同一菌種の個体間でも多少のばらつきが見られたが, 菌個体間でも鞭毛の長さ, 菌体の大きさなどばらつきが在るので, 全てが同じ様には動かないのであろうと推察される.

この Video tracking 法で観察すると, 従来の方より, より正確に運動パターンの特徴を示すことができる. 各種の菌の軌跡は, ほぼ直線のもの, 緩やかなカーブを描くもの, 頻回の方向転換を挟むものなど

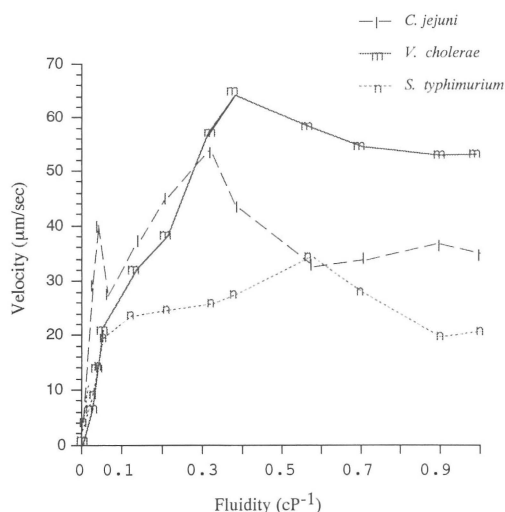


図6 単鞭毛菌と周鞭毛菌の運動速度に於ける粘性の影響。縦軸は運動速度を、横軸は流動性（1/粘度）を表す。他の菌が一つなのに対し *C. jejuni* はグラフ上二つの速度のピークを持つ。

様々であり、これは各菌種に固有の特徴と考えられる。運動パターンの決定が菌の形態による二次的なものか、その他の因子により決定されているのかは、さらにこれからの研究が必要となる。

周毛菌は菌体周囲の多数の鞭毛を束ね一本の鞭毛のようにして、これを反時計方向に回転させて動くことが知られている¹¹⁾¹¹⁵⁾。これまで運動パターン解析は、ほとんどがこの周毛菌によって成されてきた。その運動は、直線的な運動期間 (swimming) と一時停止する期間 (tumbling) の組み合わせで構成されている。Tumbling は完全な運動の停止ではなく、この期間に細菌は鞭毛を逆回転させ、束ねていた鞭毛を一時ほどこき、改めて束ね直した後に、新たな方向に向けて運動を開始する。走化性の運動においては、この二つの運動期間の延長、短縮が認められている。即ち、誘因物質に向かうときは、tumbling の頻度が減少し、離れる時には増加する事である。*C. jejuni* でも鞭毛の回転方向が逆転することが有り得るかを調べるため、自然に発生する tethered 状態の菌体についてその回転方向をビデオ像から調べてみると、野生株では一定の間隔で回転方向が変わることが示され、*C. jejuni* でも周毛菌と同じ運動パターンがあることが明らかにされた。また、今回の運動解析により *C. jejuni* も、swimming と一時停止の二つの組み合わせで運動していることが明らかになった。そして、*C. jejuni* の非走化性変異株では一時停止の頻度が減少している事も明らかになり、

周毛菌の運動パターンと同じ事が単毛の菌でも起こっていることを示す結果を得た。構造上周毛菌と異なるのは、鞭毛が一本しか無いため、一時停止の時期に鞭毛を束ね直す必要はなく、ただ回転方向を一時変え、方向転換をするだけである。この現象は詳細に言えば周毛菌の tumbling とは異なるものであるが、これを単毛菌での tumbling と呼んで差し支えない現象と考える。走化性運動の解析でも、誘因物質であるピルビン酸の濃度の高い所では、tumbling が少なく、低い所では多いという観察結果も、運動の基本パターンは周毛菌、単毛菌で変わらないことを示すものである。

IgM と IgA の抗鞭毛抗体が腸管内での定着を阻止することはすでに報告されているが⁸⁾¹⁶⁾²⁵⁾、今回 Video tracking 法を用いて初めてその運動パターンの変化と運動速度の低下を示すことができた。抗体と反応後 tethered cell にして回転そのものへの影響を見てみると、菌体の回転には変化がなかったことから、抗体の付着は鞭毛の回転そのものには影響していないと言える。したがって運動速度低下の理由としては、鞭毛周囲にまとわりついた抗体蛋白が錘のような作用をして鞭毛の回転回数を低下させていることが考えられる。このことは、IgG 抗体より分子量の大きい IgM の方が動物モデルで感染阻止作用が強かったことの説明にもなるであろう²⁵⁾²⁸⁾。また、今回の実験が二枚のガラス間の狭い空間に試料を封入して観察していることから、ガラス表面と鞭毛に付着した抗体分子が反応して運動を阻害したとも考えられる。実際の腸管内でも、食物残渣や、上皮細胞の剝離片、粘液物質など蛋白の付着しやすいものが多くあり、抗体と反応した菌体はこれらに付着して粘膜上皮へは到達できないことも十分考えられる。

抗 hook 抗体は運動速度にもパターンにも影響を与えなかった。Hook が鞭毛の菌体への付着部にあることから、ここへの抗体の付着は鞭毛繊維への付着以上に鞭毛の回転運動に大きな影響を与えると予測されていたが、今回の結果では抗 hook 抗体は運動性への影響がほとんど無いことが明らかになった。これは、この菌の腸管への感染防御には抗鞭毛抗体のみが有効で、抗 hook 抗体はまず役に立たないことを示したものである。

粘稠な環境での細菌の運動は幾つかの菌ですでに調べられているが、いずれの菌でも、ある程度粘稠度の高い所で運動速度が最大に成るという現象が見られ、これが細菌運動の特徴と考えられている²⁾⁶⁾²⁰⁾²²⁾。*C. jejuni* においても他の菌と同様に、単純な塩の溶液での

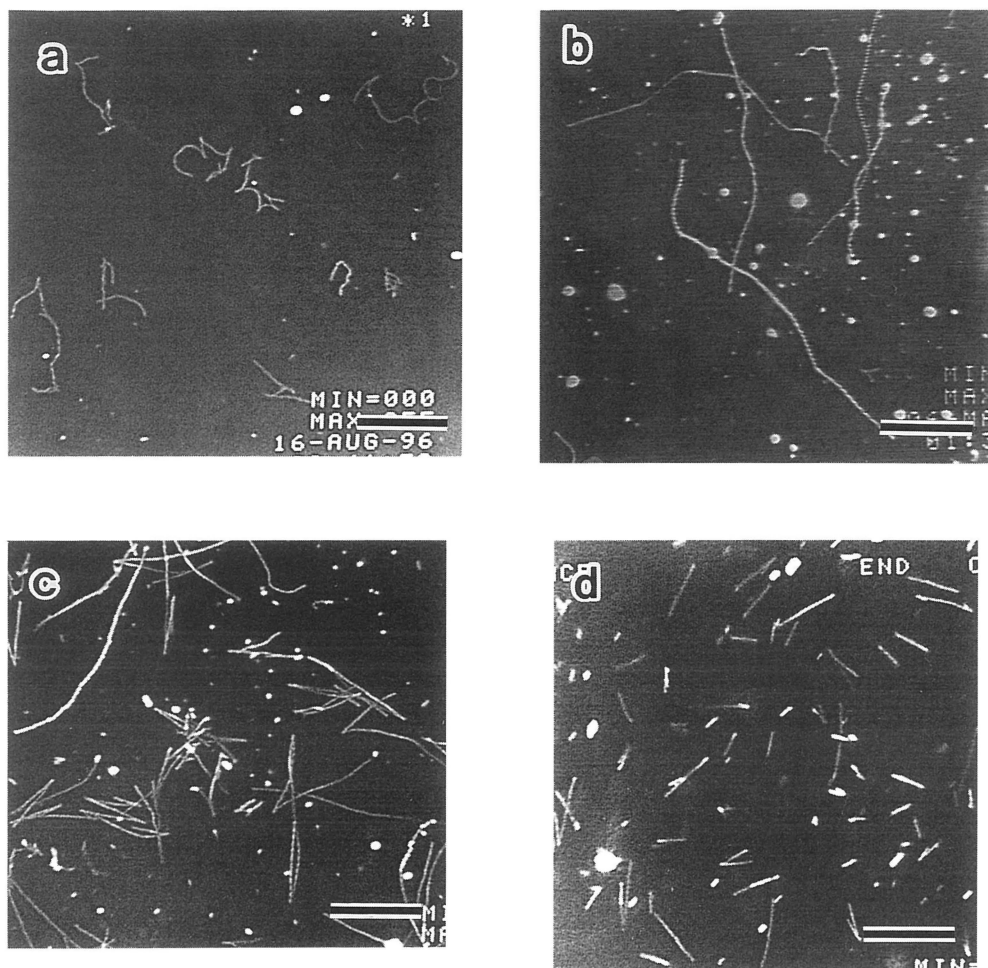


図7 粘稠な環境内での video tracking 法による *C. jejuni* の運動パターン. それぞれ, (a) PBS 内, (b) グラフ上の低粘度でのピーク, (c) 高粘度でのピーク, (d) 120 cP での運動パターンを示す. スケール 100 μm .

速度よりも2から3 cPの粘度の所で最大速度を観察した. これは鞭毛の回転に連れ, 菌体をそれとは反対の方向に回転させて運動すると言う, 細菌の運動機構を反映したものと考えられ, 回転しながら前進するには周囲の液体にある程度の粘稠性が必要であろうと推定される. *C. jejuni* ではさらにもう一度, 粘度の高い状態で速度が増加する現象が観察された⁶⁾⁷⁾²⁰⁾²²⁾²³⁾. これは, Ferrero と Lee によりビデオ録画法で報告された現象と同じものと考えられる⁶⁾. この現象は *C. jejuni* に特徴的で他の菌種では見られないことから, この菌の構造上の特徴に由来するものかもしれない. それは, 運動パターンの解析により明らかにされた. すなわち, 一定方向への定常的な運動から, 直線的で頻繁な折り返し運動への変化である. この運動パターン

は, スピロヘータの運動パターンと似ており⁷⁾, 螺旋状の菌体に由来する運動と理解できる. *C. jejuni* と似た菌体を持つ *V. cholerae* ではこのような運動が見られないのは, 菌体の螺旋の巻き方にわずかながら差があることに因るのではないかと考えられる. すなわち, *V. cholerae* では螺旋は半回転のみであるが, *C. jejuni* では完全に一回転していることが重要な差になっていると推測される. しかし, 形態は同じであるにも関わらず非走化性変異株では速度のピークは一つ (30 cP) しか認められなかった. そのピークは野性株の持つ最初のピークよりさらに粘度の高い所に出来るので, やはり螺旋状の形態が関与している可能性は否定できないが, 走化性に関わる遺伝子のコントロールに, 粘稠な環境での運動に関連したものが在る可能性も否定は

出来ない。今後の遺伝子の解析が必要と考える。

ビデオ、コンピューターの発達により生まれた Video tracking 法は、腸管病原性細菌を初めとした細菌の運動性の検討に有用であり、試料の作製方法の改良によって様々な条件下での運動の観察が今後可能となるであろう。

総 括

暗視野顕微鏡で見た細菌の運動の軌跡を、ビデオ画面上に記録できる Video tracking 法を用いて、細菌の運動速度を正確に記録することができた。その結果、単毛菌では *V. cholerae* が最も速く運動し、その速度は $79.6 \mu\text{m}/\text{sec}$ であった。この方法は、運動速度のみならず運動のパターンも正確に記録でき、単毛菌の運動パターンは、直線運動と運動停止を繰り返すパターンで、周毛菌で詳しく調べられた swimming and tumbling と同じであることを明らかにした。腸管に鞭毛運動で定着することの知られている、*C. jejuni* の腸管粘液内での運動シミュレーションとして、粘稠溶液中での運動の解析を行い、この菌は他の単毛菌と異なり、粘度の高い所でも速い速度で運動し得ることを明らかにした。高粘度環境での運動のパターンはスピロヘータのそれと同じパターンに変化しており、これは *C. jejuni* の螺旋状の菌体由来する性質であると結論した。

謝 辞

稿を終えるにあたり本研究の機会を与えて下さいました九州大学医学部細菌学教室天児和暢教授、第一内科学教室仁保喜之教授、医療技術短期大学部澤江義郎教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Armitage JP: Behavioral responses in bacteria. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 683-714, 1992.
- 2) Berg HC and Turner L: Movement of microorganisms in viscous environments. *Nature (London)* 278: 349-351, 1979.
- 3) Blaser MJ, LaForce FM, Wilson NA and Wang W-LL: Reservoirs for human campylobacteriosis. *J. Infect. Dis.* 141: 665-669, 1980.
- 4) de Melo MA, Gabbiani G and Pechere J-C: Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 57: 2214-2222, 1989.
- 5) Elsinghorst EA, Baron LB and Kopecko DJ: Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: Molecular cloning and expression of

Salmonella typhi invasion determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5173-5177, 1989.

6) Ferrero RL and Lee A: Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 134: 53-59, 1988.

7) Fosnaugh K and Greenberg EP: Motility and chemotaxis of *Spirochaeta aurantia*: computer-assisted motion analysis. *J. Bacteriol.* 170: 1768-1774, 1988.

8) Frens G: Controlled nucleation for regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature (London) Phys. Sci.* 24: 20-22, 1973.

9) Freter R, O'Brien PCM and Macsai MS: Roles of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: *in vivo* studies. *Infect. Immun.* 34: 234-240, 1981.

10) Greenberg EP and Canale-Parola E: Motility of flagellated bacteria in viscous environments. *J. Bacteriol.* 132: 356-358, 1977.

11) Khan S: Motility. In T. A. Krulwich (ed), *The bacteria: a treatise on structure and function*. Academic Press, New York. 301-343, 1990.

12) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680-685, 1970.

13) Lee A, O'Rourke JL, Barrington PJ and Trust TJ: Mucus colonization as a determinant of pathogenicity in intestinal infection by *Campylobacter jejuni*: a mouse cecal model. *Infect. Immun.* 51: 536-546, 1986.

14) Macnab RM: Flagella. In Neidhard FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik M, Schaechter M and Umberger HE (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 70-83, 1987.

15) Macnab RM: Motility and Chemotaxis. In Neidhard FC, Ingraham JL, Low KB, Magasanik M, Schaechter M, and Umberger HE (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 732-759, 1987.

16) McSweeney E, Burr DH and Waker RI: Intestinal mucus and secretory antibody are barriers to *Campylobacter jejuni* adherence to INT 407 cells. *Infect. Immun.* 55: 1431-1435, 1987.

17) Morooka T, Umeda A and Amako K: Motility as an intestinal colonization factor for *Campylobacter jejuni*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1973-1980, 1985.

18) Newell DG, McBride H and Dolby JM: Investigations on the role of flagella in the coloni-

zation of infant mice with *Campylobacter jejuni* and attachment of *Campylobacter jejuni* to human epithelial cell lines. J. Hyg. 95: 217-227, 1985.

19) Roth J, Bendayan M and Orci L: Ultrastructural location of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. J. Histochem. Cytochem. 26: 1074-1081, 1978.

20) Schneider WR and Doetsch RN: Effect of viscosity on bacterial motility. J. Bacteriol. 117: 696-701, 1974.

21) Shigematsu M, Meno Y, Misumi H and Amako K: The measurement of swimming velocity of *Vibrio cholerae* and *Pseudomonas aeruginosa* using the video tracking method. Microbiol. Immunol. 39: 741-744, 1995.

22) Shoesmith JG: The measurement of bacterial motility. J. Gen. Microbiol. 22: 528-535, 1960.

23) Szymanski CM, King M, Haardt M and Armstrong GD: *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. Infect. Immun. 63: 4295-4300, 1995.

24) Takata T, Fujimoto S and Amako K: Isolation of nonchemotactic mutants of *Campylobacter*

jejuni and their colonization of the mouse intestinal tract. Infect. Immun. 60: 3596-3600, 1992.

25) Ueki Y, Umeda A, Fujimoto S, Mitsuyama M and Amako K: Protection against *Campylobacter jejuni* infection in suckling mice by anti-flagellar antibody. Microbiol. Immunol. 31: 1161-1171, 1987.

26) Ueki Y, Fujimoto S, Umeda A and Amako K: Purification and antigenic analysis of flagella of *Campylobacter jejuni*. Microbiol. Immunol. 32: 327-337, 1988.

27) Walker RI, Caldwell MB, Lee EC, Guerry P, Trust TJ and Ruiz PG: Pathophysiology of *Campylobacter* enteritis. Microbiol. Rev. 50: 81-94, 1986.

28) Wassenaar TM, van der Zeijt BAM, Ayling R and Newell DG: Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. J. Gen. Microbiol. 139: 1171-1175, 1993.

(受付 1997-3-18)