

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12737

研究課題名(和文) VBNC状態の食中毒起因菌の検出法と培養可能状態への復帰条件の探索

研究課題名(英文) Studies on detection of foodborne pathogenic bacteria in VBNC state and resuscitation condition to culturable state

研究代表者

島本 整 (Shimamoto, Tadashi)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：90187443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：生存しているが通常の培養法では培養できない状態(viable but nonculturable, VBNC)の細菌は一般的な培養法では検出されないものの、特定の条件下では培養可能状態に復帰することが明らかとなっている。本研究では、コレラ菌(*Vibrio cholerae* 0139)と腸炎ビブリオ(*V. parahaemolyticus*)を材料として、VBNC状態への移行と培養可能状態への復帰について検討を行った。

その結果、塩濃度はVBNC状態への移行と培養可能状態への復帰に重要な因子の1つであることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Bacteria of viable but nonculturable (VBNC) conditions cannot be detected by general culture methods, but it became apparent that under certain conditions, it is possible to resuscitate to the culturable state. In this study, we investigated the effect of salt concentration on transition of *Vibrio cholerae* 0139 and *V. parahaemolyticus* to VBNC state and resuscitation to a culturable state.

As the results, it became clear that salt concentration is one of the important factors for transition to VBNC state and resuscitation to the culturable state.

研究分野：病原微生物学, 食品衛生学

キーワード：VBNC コレラ菌 *Vibrio cholerae* 腸炎ビブリオ *Vibrio parahaemolyticus* ビブリオ viable but nonculturable

1. 研究開始当初の背景

以前より環境中には生きていますが培養できない (viable but nonculturable, VBNC または VNC) 状態の細菌が多く存在していることが知られていた。たとえば、*Vibrio cholerae* の場合、インドやバングラデシュなどのコレラ流行地域でも環境中から原因菌である *V. cholerae* O1/O139 が分離されることはまれである。また、腸炎ビブリオの場合も魚や海水中から分離される菌のほとんどは、病原因子である溶血毒素を保有していない株である。それにもかかわらず食中毒が発生する原因として、VBNC 状態の細菌がヒト腸管内で栄養状態に復帰し、病原性を発揮している可能性が示唆されている。一方、食品中の細菌検査は、培養可能状態の細菌のみを対象としており、VBNC 状態の細菌数についてまったく考慮されていない。もし、市販食品が VBNC 状態の食中毒起因菌に汚染されていた場合、食中毒のリスクがあるが、現状ではそれを調べる方法がないため大きな問題となっている。

2. 研究の目的

本研究では、食品中における VBNC 状態の細菌 (特に食中毒起因菌) の実態を把握し、VBNC 状態の細菌に関するリスク評価方法の確立を目指している。そのため、食中毒起因菌の VBNC 状態への移行条件と培養可能状態への復帰条件を検討し、VBNC 状態の細菌のみを特異的かつ定量的に検出する方法の開発を目指す。そして、確立された検出法を利用して市販食品中の VBNC 状態の食中毒起因菌の検出と食中毒の原因となるリスクを解析する。

3. 研究の方法

(1) 菌株

コレラ菌 (*Vibrio cholerae* O139 MDO-6 株) と腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus* AQ3354 株) を材料として用いた。

(2) 低温・飢餓ストレスによる VBNC 状態への誘導

コレラ菌または腸炎ビブリオを LB 培地または *Vibrio* LB 培地 (LB 培地 + 1% NaCl) を用いて 37 で一晩培養した。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-), 0.8% NaCl を含む) または人工海水 (ASW, 2.5% NaCl を含む) で 2 回洗浄後、OD₆₀₀=0.1 となるように PBS または ASW に菌体を懸濁し、4 で保管した。

(3) VBNC 状態から培養可能状態への復帰

VBNC 状態から培養可能状態への復帰は、20 で 24 時間~48 時間保温することによって行った。

4. 研究成果

(1) VBNC への移行に対する PBS と ASW の影響

コレラ菌、腸炎ビブリオ、いずれも ASW (人工海水) の方が速やかに VBNC 状態に移行した (図 1)。

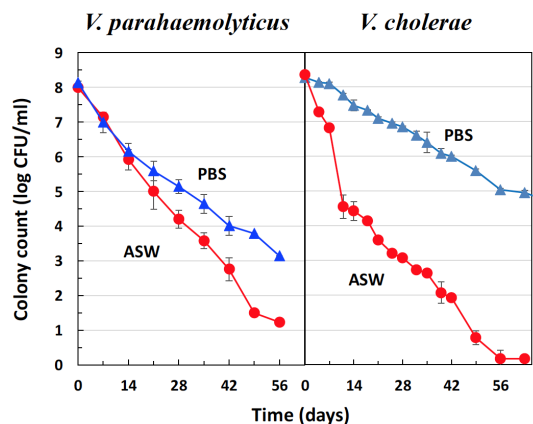


図 1 腸炎ビブリオとコレラ菌の VBNC 状態への移行に対する PBS と ASW (人工海水) の効果

(2) コレラ菌の VBNC 移行に対する塩濃度の影響

PBS と ASW に含まれる NaCl の濃度をそれぞれ 2.5% と 0.8% にした場合、いずれも NaCl 濃度が高い方が速やかに VBNC 状態に移行した。また、同じ NaCl 濃度では ASW の方が速やかに VBNC に移行した (図 2)。

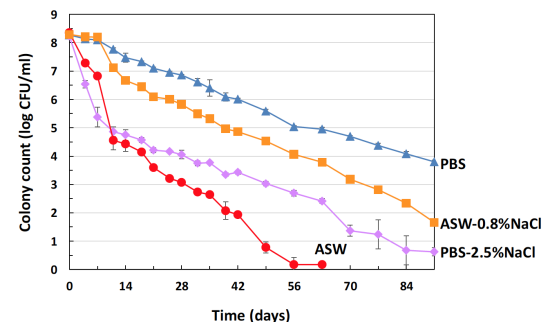


図 2 コレラ菌の VBNC 状態への移行に対する塩濃度の効果 (1)

次に VBNC 状態への移行に関して効果の高い ASW について、NaCl の濃度を変えて効果を調べた。その結果、NaCl 濃度を下げると VBNC 状態への移行に時間がかかるようになり (図 3)、NaCl 濃度を上げると早く VBNC 状態に移行することがわかった (図 4)。

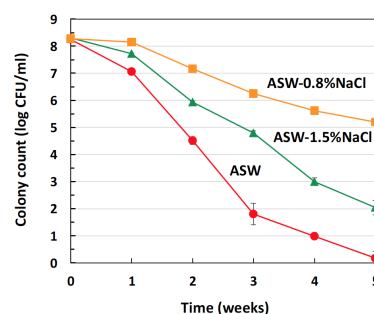


図 3 コレラ菌の VBNC 状態への移行に対する塩濃度の効果 (2)

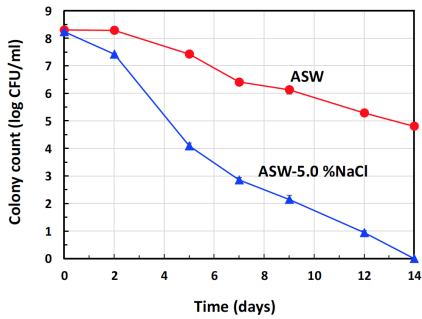


図4 コレラ菌の VBNC 状態への移行に対する塩濃度の効果 (3)

(3) コレラ菌の VBNC 状態から培養可能状態への復帰に関する塩濃度の効果

コレラ菌が VBNC 状態から培養可能状態に復帰する際の塩濃度の影響を調べた。ASW で VBNC 状態にしたコレラ菌を PBS または ASW で希釈して 20⁶, 24 時間保温することによって培養可能状態に復帰させた。その結果, PBS で希釈した場合は復帰が認められたが, ASW で希釈した場合には復帰しないことがわかった (図5)。また, PBS で VBNC 状態にしたコレラ菌を PBS または ASW で希釈して復帰操作を行ったところ, 同様に ASW で希釈した場合には復帰しないことがわかった (データは示さない)。

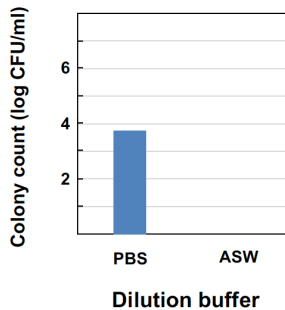


図5 VBNC 状態から培養可能状態への復帰に対する ASW と PBS の効果

(4) PMA (propidium monoazide) を用いた生菌数測定

PMA は DNA にインターカレートする性質を持つ物質であり, 死菌の細胞膜を通過し生菌の細胞膜を通過しないという性質を有する。この性質を定量 PCR (qPCR) と組み合わせることによって生菌数のみを調べることが可能である (図6)。

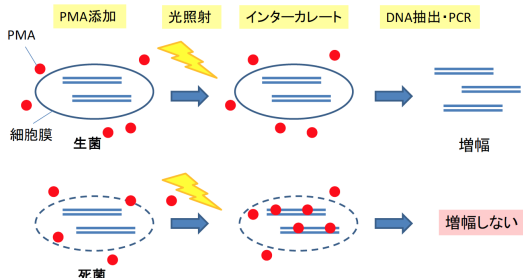


図6 PMA を利用した生菌数測定

ASW を用いた場合, PBS よりもコレラ菌を VBNC 状態に速やかに移行させることができる (図1, 2)。特に, 5% の NaCl を含む ASW を用いた場合, わずか 2 週間程度で VBNC 状態に移行することがわかった (図4)。そのため, 過度のストレスからコレラ菌が VBNC 状態にならずに死んでいることが危惧された。そこで, 5% NaCl を含む ASW で VBNC 化したコレラ菌を材料として, PMA を用いた qPCR によって生菌数測定を行った。その結果, LB 培地上のコロニー数が急激に低下しても PMA-qPCR 法で測定した生菌数はほとんど変化しないことが明らかとなった (図7)。この結果は, 5% NaCl という強いストレス条件下でコレラ菌は死なずに VBNC 状態に移行していることを示している。

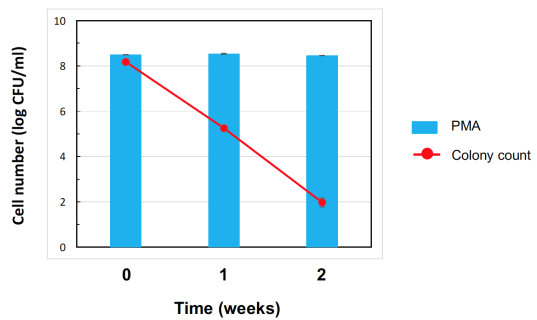


図7 5% NaCl を含む ASW で VBNC 状態に移行させたコレラ菌に関する PMA-qPCR 法による生菌数測定

以上の結果よりコレラ菌について VBNC 状態への移行と培養可能状態への復帰には NaCl 濃度が関与していることが明らかになった。また, 海洋細菌である腸炎ビブリオについてもストレスの低いはずの ASW の方が早く VBNC 状態に移行することがわかった。

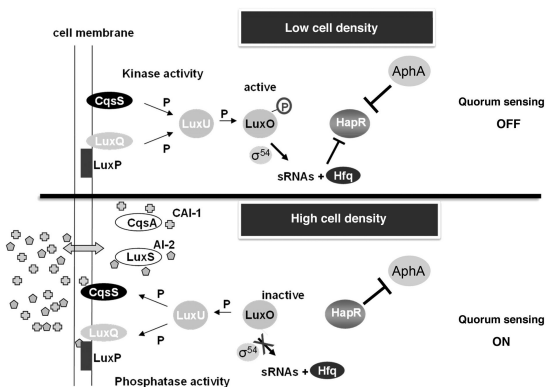


図8 コレラ菌 (*V. cholerae*) の quorum sensing 機構 (Rothenbacher & Zhu, 2014)

(5) コレラ菌の VBNC 状態から培養可能状態への復帰における autoinducer の影響

一方, *Vibrio vulnificus* において, quorum sensing に関与する autoinducer (AI-2) が培養可能状態への復帰を促進する因子として, 同定されている (Ayrapetyan et al., 2014)。コレ

ラ菌は *V. vulnificus* と同じビブリオ属の細菌であり、少なくとも CAI-1 と AI-2 の2つの autoinducer を生成していることが知られている (図8)。

そこで、コレラ菌を用いて CAI-1 の合成に関与する *csqA* 遺伝子と AI-2 の合成に関与する *luxS* 遺伝子のそれぞれの欠損株を作製し、野生株 (MDO-6 株) と欠損株より autoinducer を含む cell-free supernatant (CFS) を調製して VBNC 状態のコレラ菌に対する培養可能状態への復帰に関する効果を調べた。さらに、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus* AQ3354 株) と大腸菌 (*Escherichia coli* C3000 株)、サルモネラ (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 株) についても同様に CFS を調製して VBNC 状態のコレラ菌に対する効果を調べた。

その結果、*csqA* 変異株より調製した CFS を用いた場合、野生株や *luxS* 欠損株の場合と比較して培養可能状態への復帰が遅れが認められた。この結果は *V. vulnificus* の結果と異なり、コレラ菌では培養可能状態への復帰に CAI-1 が関与していることを示唆している (データは示さない)。また、コレラ菌以外の CFS を用いた場合は、図9に示すように、同じビブリオ属の腸炎ビブリオ由来の CFS のみがコレラ菌を培養可能状態に復帰させることが可能であり、大腸菌およびサルモネラ由来の CFS は復帰させる効果を示さなかった。この結果は、近縁の細菌が産生する autoinducer によってのみ VBNC からの復帰に効果があることを示しており、コレラ菌の自然環境における生態への関与を示唆している。

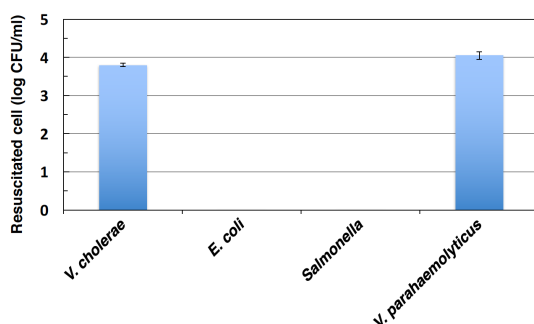


図9 様々な菌種由来の cell-free supernatant (CFS) を用いて VBNC 状態のコレラ菌を培養可能状態へ復帰させた場合の比較(24時間、20℃で保温した結果)

以上の結果を踏まえて、今後は実際に市販されている食品中(特に魚介類)にどの程度 VBNC 状態の細菌(特にビブリオ属細菌)が残存しているのか、またどのような条件下で VBNC 状態から復帰するのかについて検討する必要がある。

<引用文献>

Ayrapetyan, M., Williams, T.C., Oliver, J.D.

(2014) Appl. Environ. Microbiol. 80, 2478-2483.

Wu, B., Liang, W., Kan, B. (2016) Front. Microbiol. 7, article 404.

Rothenbacher, F.P., Zhu, J. (2014) Gut Microbes 5, 120-128.

5. 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

島本 敏, 成谷 宏文, 島本 整, コレラ菌の VBNC 状態への移行に対する塩濃度の影響, 第91回日本細菌学会総会, 2018年3月27, 28日

島本 敏, 岡田 佳奈, 成谷 宏文, 島本 整, ビブリオ属細菌が VBNC 状態に移行する条件の検討, 第51回ビブリオシンポジウム, 2017年10月20日

島本 敏, 島本 整, 難培養状態のコレラ菌が培養可能状態に復帰する条件の検討, 第50回腸炎ビブリオシンポジウム, 2016年10月21日

6. 研究組織

(1)研究代表者

島本 整 (SHIMAMOTO, Tadashi)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
研究者番号: 90187443