

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 2 月 12 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659334

研究課題名(和文) 生きているが培養できない菌(VBNC)の検出法開発と食品衛生に及ぼす影響

研究課題名(英文) Development of detection method for bacteria in viable but not culturable state

研究代表者

錫谷 達夫(Suzutani, Tatsuo)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40196895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌を滅菌蒸留水に浮遊させ、4 または20 で静置した。この菌液中の生菌数を継続的にコロニー形成単位(cfu)として計測したところ、培養に固形培地を用いると4 では120～160日、20 では210～230日で生菌は検出されなくなった。しかし、この菌液を液体培地で培養すると更に30～40日程度生菌を検出できたことから、固形培地での生きているが培養できない菌(VBNC)の判定は適切ではないことが分かった。次に液体培地でも生菌を検出できなくなった菌液をマウスに経口投与した。マウス6匹中2匹の便から、培養できる状態に戻った菌を検出できた。以上の結果は真に大腸菌がVBNCになることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：After suspension of E. coli in sterilized distilled water, we incubated this suspension at 4 or 20 degrees to detect the culturable (or colony forming) E. coli titer continuously. 1) Using agar media, culturable E. coli was detected for 120-160 or 210-230 days from incubation at 4 or 20 degree, respectively. However, culturable E. coli was detected for an additional 30-40 days using liquid media. This result indicates that a judgment regarding the viable but not culturable (VBNC) state of bacteria should be carried out with liquid media. 2) We incubated the E. coli suspension for a further month after judging it to be in a VBNC state and injected the VBNC E. coli into 6 mice per os. The recovery of E. coli from a VBNC to a culturable state in mice was detected in the excrement from 2 of 6 mice. This result clarified that E. coli could form a true VBNC state.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：食品衛生 細菌性食中毒

1. 研究開始当初の背景

食品や水道水を汚染する細菌の検査では菌を分離培養するのが一般的である。ところが培養による調査では、患者から分離された原因菌を感染経路から検出できない食中毒事例や感染症が多数存在する。このような感染事例に、培地では増殖しない“生きてはいるが培養できない菌 (Viable but not culturable; VBNC)” が関与しているのではないかという指摘がある。

VBNC が確かに生きていて、死菌ではないことを証明するには動物の体内で増殖させる必要がある。しかし、大腸菌のように常在菌叢に存在する菌の場合、検査する菌株と常在菌として存在する菌株の鑑別が必要であり、検査することが困難である。*Campylobacter jejuni* では、VBNC を孵化鶏卵に接種して分離培養できることが報告された (*Appl Environ Microbiol* **65**: 5154-7, 1999)。しかし、この方法の追試や他の菌種でも用いることができるか否かを調べた報告はない。

2. 研究の目的

いくつかの菌種で VBNC を作成できるか否かを検討し、調整できた VBNC を用いて孵化鶏卵で培養できることを確認する。逆に、この研究から、本当に VBNC と呼んでよい状態の菌が調整できることを証明する。

3. 研究の方法

菌株

本研究では大腸菌や腸炎ピブリオで実験を行ったが、結論を得られたのは大腸菌のみであったので、以下には大腸菌の結果だけを示す。

大腸菌は標準菌株として ATCC25922 株を、臨床分離株として福島県立医科大学附属病院で分離された 2 株を用いた。また、ニューキノロン耐性株は岡山大学泌尿器科学講座より分与された株 (耐性株) を用いた。これらの株は全て 16S rRNA をシーケンシングし、大腸菌であることを確認した。

培地

大腸菌の培養には以下の培地を用いた。液体培地として最少栄養培地である M9 培地、栄養分が多い Lurai Broth (LB) 培地、LB よりさらに 2~3 倍栄養分を増やした Super Broth (SB) 培地を用いた。固形培地には普通寒天培地、デオキシコーレート培地のほか、上記の液体培地に寒天を加えた M9 寒天培地、LB 寒天培地、SB 寒天培地を用いた。また好気性細菌数測定用 (AC) ならびに大腸菌群測定用 (CC) の PetrifilmTM 培地 (3M 社) を用いた。この培地は細菌を接種した後、表面が乾燥しないようプラスチックフィルムを密着させて培養するよう工夫された培地である。

大腸菌液の調整

LB 培地で 1 晩振盪培養した大腸菌 40 μ l を LB 培地 4 ml に加え、37 で 3 時間振盪培養後、3,000 rpm、10 分間遠心して pellet とした。この菌を 4 ml の滅菌再蒸留水に懸濁後、遠心して pellet とした。同じ操作をもう一度繰り返し、菌を 2 度再蒸留水で洗浄後、OD₅₅₀ が 0.15 となるように再蒸留水に懸濁した。この菌液を再蒸留水で 10 倍希釈した後、4 または 20 に静置保存した。

大腸菌の定量培養

) 液体培地での定量培養

液体培地で 10 倍階段希釈した菌液、各 100 μ l を 96 well plate 5 well ずつに入れ、37 で 1 日培養した。培地の濁りから菌の増殖を肉眼で観察し、混濁した well 数を最確数表に当てはめて菌数 (cfu/ml) を推定した (MPN 法)。

) 固形培地を用いた定量培養

再蒸留水で 10 倍階段希釈した菌液 50 μ l を固形培地に接種し、コンラージ棒で培地表面に塗り広げた後、37 で 1 日培養した。出現したコロニー数を数え菌数 (cfu/ml) に換算した。

) 混積培養法

再蒸留水で 10 倍階段希釈した菌液 1 ml をシャーレに入れ、そこに加熱溶解後、45 に保温した寒天培地を 10 ml 加え、菌液と培地をシャーレ内で良く混和した。均一となったら培地が固化するまで静置し、その上から液状の寒天培地を重層して固化させた後、37 で 1 日培養した。培養後、培地の中にできたコロニーを数え、菌数 (cfu/ml) を求めた。

) Petrifilm 法

再蒸留水で 10 倍階段希釈した菌液 1 ml を培地に接種し、その上をプラスチックフィルムで覆った後、AC は 2 日間、CC は 1 日間 37 で培養し、コロニー数をカウントした。

孵化鶏卵の感染実験

VBNC が孵化鶏卵で増殖できるか否かを受精後 11 日目の孵化鶏卵を用いて調べた。気室の部分の卵殻表面をポビドンヨードで消毒後、釘を用いて小さな穴をあけた。この穴から漿尿膜腔に VBNC になったと思われる菌液を注射器で 0.2 ml 接種した。穴をパラフィンで閉じた後、孵化鶏卵は加湿した 37 のふ卵器で培養した。接種後 1、2、3 日後に卵殻を切り取り、漿尿液を回収、これをデオキシコーレート寒天培地に接種して黄色い乳糖分解菌のコロニー (大腸菌) を観察した。

マウスの感染実験

VBNC がマウスの大腸内で増殖できるかを調べた。

マウスは6週令、メスの Balb/c を用い、実験に用いる前日にプロトンポンプインヒビターであるランソプラゾール水溶液 (1 mg/ml) を 0.2 ml ゾンデで胃内に投与する群と投与しない群で比較した。

に示した方法で蒸留水にニューキノロン耐性大腸菌株を浮遊し、4 に静置した。およそ 150 日後、液体培地で菌の増殖が検出できないことを実験に用いた。この菌液を 3,000 rpm 10 分遠心して菌を pellet とした後、最初の菌液の 1/10 容の再蒸留水で菌を浮遊させた (10 倍濃縮)。この液 0.2 ml をゾンデでマウスの胃内に接種した。摂取後、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間後および 1 日、5 日後にマウスの便を回収し、蒸留水で溶解した後、クラリスロマイシンを 100 µg/ml 加えたデオキシコーレート培地に接種してコンラージ棒で培地表面に塗布した。37 で 24 時間培養後、乳糖を分解して黄色に染まるコロニー (大腸菌) を数えた。

4. 研究成果

飢餓状態で保存した大腸菌数の検討

再蒸留水で洗浄し、浮遊させた大腸菌 4 株 (標準菌株、臨床分離株 1、臨床分離株 2、耐性株) を 4 と 20 に静置し、毎週、その一部をサンプリングして LB 寒天培地で定量培養した。その結果

) 約 1×10^6 cfu/ml でスタートした菌数は週数とともに減少し、4 では 120~160 日で、20 では 210~230 日程度でコロニーを形成しなくなった。

) 菌株による差はわずかではあるが認められ、標準菌株が最も早くコロニーを形成できなくなった。

) 同じ条件で菌数を定量したものの、同じサンプルでも 1 log 程度、測定値 (cfu/ml) が変動した。

以上の結果から大腸菌が VBNC になるのには 4~8 か月もの長い時間が必要であること、冷たい水の中よりも室温程度のほうが長期間培養できる状態を保っていることが明らかとなった。

培地の種類と培養法の検討

VBNC の定義は「生きているが人工培地では増殖できない状態」とされている。しかし、どのような培地で増殖できなくなった時に VBNC というのか、培地中の栄養素の多寡によって培養できるか否かが変わるかなど、明確にされていない点が多い。そこで、栄養素の含有量が大きく異なる液体培地 3 種 (M9, LB, SB) とそれに寒天を加えた固形培地、さらに固形培地ではあるが菌を接種した表面をプラスチックフィルムで覆う PetrifilmTM を用いて、標準菌株が蒸留水中、4 で VBNC へと変化する過程を継時的に定量培養して調べ

た。その結果

) ほとんど栄養素を含まない M9 寒天培地では 40 日程度で菌が検出できなくなった。

) しかし、標準的な栄養素を含んだ LB 寒天培地と栄養分が豊富に添加された SB 寒天培地の間で菌数の違いは認められなかった。

) 液体培地では保存期間 0 日の点から観察期間全てにおいて固形培地より 10~100 倍高い菌数と定量され、菌数が 0 になるまでにおよそ 40 日長い期間が必要であった (固形培地で約 110 日に対し、液体培地で約 150 日)。

) Petrifilm は固形培地ではあるが、高い菌数が検出でき、液体培地と固形培地の中間的な値が得られた (検出できなくなるのは約 130 日後)。

以上の結果をまとめると液体培地は 10~100 倍固形培地よりも菌の検出感度が高く、Petrifilm は固形培地でありながら液体培地同様検出感度が高い。従って、どの培地で培養できなくなった場合を VBNC と呼ぶのかを規定していない現在の定義では、液体培地で培養できる菌を VBNC として扱っている可能性がある。

混釈培養による検討

上記の液体培地のほうが検出感度が高いという結果から、菌が周囲を培地で覆われているような状態が増殖に好ましいのか、あるいは寒天の中に菌の増殖を阻害する因子が含まれているという 2 つの仮説が成り立つ。これを明らかにするため、寒天培地の中に菌を混ぜ込んで培養する混釈培養による菌数の測定を行った。その結果、培地の種類を問わず、混釈培養することによって菌の検出感度は液体培地による培養と同じ程度まで高まった。このことから、培養の感度を決定するのは栄養素の多寡や寒天の有無ではなく、菌が培地で覆われ、乾燥し難い点にあると予想できた。Petrifilm は固形培地ではあるが、菌液を培地に塗り広げた後、表面をプラスチックフィルムで覆うため、乾燥し難いことが菌の検出感度を高めているものと予想された。

孵化鶏卵での VBNC の培養

Campylobacter jejuni で報告されているように、大腸菌でも VBNC が孵化鶏卵で培養が可能であるか、また、上記の実験で培地で検出できなくなった大腸菌が本当に死菌ではなく VBNC であるか否かを明らかにする目的で、孵化 11 日目の孵化鶏卵の漿尿腔に菌液を接種し、1、2、3 日後に漿尿液中の菌数を定量培養して調べた。しかし、残念ながら卵殻に穴をあけて接種する段階で、卵殻表面の菌がコンタミするようで、大腸菌以外の菌もコロニーを形成し、実験に用いた大腸菌の同定が困難であった。

マウスでの VBNC の培養

次にマウスを用いて VBNC の培養を試み

た。哺乳動物の大腸内には常在菌として大腸菌が存在する。この菌と実験に用いた菌を簡単に鑑別できるようにこの実験にはクラリスロマイシン耐性株を用いた。

先ず、マウスの腸内にクラリスロマイシン耐性株が存在しないことを確認するため、マウスの便を蒸留水に浮遊させ、10、100、1000 µg/ml のクラリスロマイシンを添加したデオキシコーレート培地に接種した。その結果、どの濃度のクラリスロマイシンが存在する培地上でもコロニーを形成できる菌は常在しないことが確かめられた。そこで、以降の実験は 50 µg/ml 加えた培地を用いた。

培地で培養した菌を 2×10^7 cfu 飲ませたコントロールのマウスでは、プロトンポンピンヒビターによる処理をしなくても 6 時間後をピークに 4~6 時間後から菌の排泄が始まり、1 日後も大腸菌は排出されていた。しかし、5 日後には排出が認められなかった。この結果から、ヒト由来の大腸菌はマウスの腸内で増殖はするものの、定着はしないことが分かった。一方、VBNC となった菌はプロトンポンピンヒビター処理をしなかったマウス 6 匹からは生きて菌として排泄されることはなかった。しかし、処理したマウス 6 匹中 2 匹から、接種 6 時間後にのみ 1 個の便あたり 3 - 33cfu の大腸菌が培養できた。このことから、蒸留水中で 180 日以上静置し、少なくとも 50 日間培養できないことを確認した菌の一部は確かに動物体内では増殖できる菌に復帰できる VBNC であった。

【まとめ】

大腸菌を蒸留水中に浮遊させると 100 日以上という長い時間をかけて、確かに VBNC と証明できる菌へと変換させることができた。この菌をプロトンポンピンヒビター処理したマウスの腸内で培養できる菌へと戻すことは可能であった。孵化鶏卵の系では培養できる菌を回収できなかったが、実験法を含め、さらなる検討が必要である。また、大腸菌以外の菌についてもマウスや孵化鶏卵で検討を加えたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

錫谷達夫(福島県立医科大学・医学部・教授)

研究者番号: 40196895

(2)研究分担者

鳥羽 衛(福島県立医科大学・医学部・助教)

研究者番号: 20443864

佐藤友香(福島県立医科大学・医学部・助教)

研究者番号: 70583623

(3)連携研究者

福島哲仁(福島県立医科大学・医学部・教授)

研究者番号: 90208942