

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26560055

研究課題名(和文)食品中のVBNC食中毒起因菌の検出法と復帰条件の検討

研究課題名(英文)Evaluation of the detection method and resuscitation conditions of foodborne pathogenic bacteria in viable but nonculturable state in food

研究代表者

島本 敏 (Shimamoto, Toshi)

広島大学・生物圏科学研究科・助教

研究者番号：70583136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：環境中には生きているが培養できない状態(viable but nonculturable, VBNC or VNC)の細菌が存在していることが知られていた。食品中にVBNC状態の食中毒細菌が含まれていた場合、腸管内で栄養状態に復帰して食中毒の原因となる可能性が示唆されている。コレラ菌や腸炎ピブリオを低温・飢餓条件下で保存すると難培養状態(VBNCを含む)に移行する。これらの細菌は温度上昇処理によって栄養状態に復帰することがわかり、EMA(エチジウムモノアジド)-qPCRでその変化をモニタリングした。また、難培養状態からの復帰にはある程度の細胞密度が必要であり、シグナル因子の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been known that viable but nonculturable (VBNC or VNC) bacteria are present in the environment. If foods contain the foodborne pathogenic bacteria in VBNC state, it has been suggested that they may cause food poisoning after the resuscitation of the VBNC bacteria in the intestinal tract.

When *Vibrio cholerae* or *Vibrio parahaemolyticus* cells were kept in the low temperature and starvation conditions, they turned to uncultured bacteria (including the VBNC). These bacteria were found to resuscitate to the vegetative cells by temperature up-shift. This process was monitored by EMA (ethidium monoazide) -qPCR. Furthermore, the resuscitation required a certain degree of cell density, suggesting that the presence of a signal factor.

研究分野：食品衛生学

キーワード：VBNC VNC コレラ菌 腸炎ピブリオ

### 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 or VNC) 状態の細菌が多く存在していることが知られていた。例えば、*Vibrio cholerae* の場合、インドなどのコレラ流行地域でさえ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ほとんどない。また、腸炎ピ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全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。

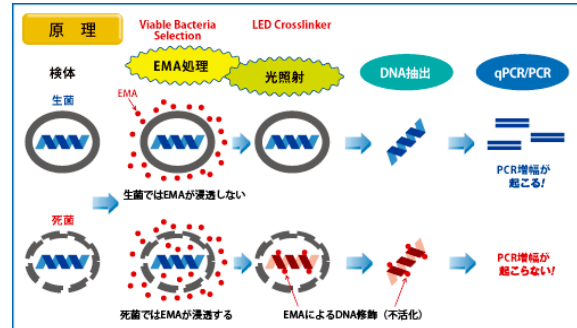
### 2. 研究の目的

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 or VNC) 状態の細菌が多く存在していることが知られていた。食中毒起因菌が食品中に VBNC 状態で存在していた場合、腸管内で栄養状態の細菌に復帰して増殖し、食中毒の原因となる可能性が指摘されている。しかし、現在、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 状態の細菌による大規模な食中毒発生が危惧されている。そこで、本研究では、食品中の VBNC 状態の細菌の検出方法を確立するため、EMA-qPCR 法を用いて、VBNC 細菌の検出方法を比較検討する。また、食品中の VBNC 状態の食中毒起因菌が食中毒の原因となるリスクを調べるために、培養可能状態への復帰条件についても検討を行う。

### 3. 研究の方法

EMA-qPCR 法による生菌のゲノム定量と温度上昇処理による復帰条件での培養法を組み合わせることによって VBNC 状態を含む腸炎ピブリオの生菌の検出を試みた。EMA-qPCR 法は、細胞膜非透過性の DNA インターカレーターであるエチジウムモノアジド (EMA) を DNA 抽出の前段階で作用させることにより、生菌由来の DNA のみを選択的に増幅することのできる方法である。細胞膜が壊れた死菌では菌体内に EMA が侵入し、DNA を修飾するため PCR において DNA の増幅が阻害される。また、低温により VBNC 状態になった腸炎ピブリオは温度上昇処理により培養可能な状態に

復帰することが知られている。これらの方法を組み合わせることで、VBNC 状態の細菌が温度上昇処理によって復帰した場合には、ゲノム定量の値は変わらず、コロニー数が増加するという現象が見られると考えた。



(引用：タカラバイオ株式会社 HP)

図1 EMA-qPCR法の原理

まず、培養した腸炎ピブリオをPBS(リン酸緩衝生理食塩水)に懸濁し、4℃の低温で数週間保持することによって培養できない状態に移行させた。ほとんどコロニーの形成が見られなくなった菌液に20℃、20時間程度の温度上昇処理を加え、EMA-qPCR法によるゲノム定量とコロニーカウントを行って温度上昇処理前の結果と比較した。

また、低温・飢餓条件下における生菌数の挙動を見ることを目的に、難培養状態に移行させる処理を行った菌に対し1週間毎に経時的な測定を行った。EMA-qPCR法と20℃もしくは30℃の温度上昇処理による復帰条件での培養法を組み合わせ、難培養状態への移行の処理を行った日を0週間目として、測定を行った。

*Vibrio cholerae* も同様に4℃で数週間保持することでVBNC状態へ移行させた。温度上昇処理とともに、さまざまな細菌の培養上清を加え、より復帰に効果ある条件を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) VBNC状態への移行

4つの異なる菌株の腸炎ピブリオ細菌を低温・飢餓条件下で難培養状態に移行させたところ、コロニーの形成が見られなくなるまでの期間は5から9週間と菌株によって異なっていた。

コレラ菌においても、細菌を低温・飢餓条件下で難培養状態に移行させたところ、コロニーの形成が見られなくなるまでの期間は8から10週間と菌株によって異なっ

ていた。また、腸炎ビブリオの移行期間と比較すると長い傾向が認められた。

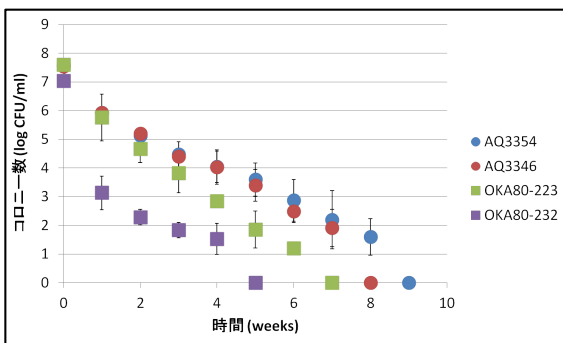


図2 腸炎ビブリオ各菌株の難培養状態への移行

難培養状態に移行するまでの期間が菌種、菌株によって異なる傾向が示されたことから、細菌が難培養状態に移行する速度に関わる因子のひとつとして、それぞれの菌種、菌株が生息していた環境に応じて獲得した環境ストレスへの耐性が関与している可能性が示唆された。

## (2) 難培養状態からの温度上昇処理による復帰

難培養状態に移行させた菌に対し、EMA-qPCR 法と復帰条件での培養法で生菌数の定量を試みた結果、温度上昇処理前にはほとんどコロニーが形成されなかったサンプルで 20 の温度上昇処理後にはコロニー数に明らかな増加が見られたのに対し、EMA-qPCR の測定結果にはほとんど差が見られなかった。また、温度上昇処理後のサンプルにおける EMA-qPCR の結果から概算される生菌数はコロニーカウントにより測定した生菌数よりも大きい値となった。これはゲノム測定値では生菌数に差がないことを示していることから、温度上昇処理による生菌数の増加は復帰によるものであると考えられる。また、復帰（温度上昇処理）後のサンプルにおける EMA-qPCR の Ct 値から概算される生菌数がコロニーカウントにより測定した生菌数よりも多かったことから、本条件では培養可能状態に復帰していない生菌がサンプル内に存在していることが示唆された。

経時的測定の結果、温度上昇処理前の菌液ではコロニー数が時間依存的に減少していくのに対し、ゲノムコピー数の減少は 4 log copies/ml で頭打ちとなった。これは、本実験で用いた条件における EMA-qPCR 法の検出限界であると考えられた。今後、さらなる条件の検討が必要であると思われる。

る。

また、30 の温度上昇処理を加えた菌液では、コロニー数、ゲノムコピー数ともに温度上昇処理前よりも増加し、常に高い生菌数を維持していた。このことは、菌の増殖が起こっている可能性が示唆された。通常であれば PBS という増殖に必要な養分が存在しない環境で増殖が起こることは考えにくいですが、この場合は死菌から溶出した菌体内内容物が栄養源となっているものと考えられた。20 の温度上昇処理を加えた場合にはコロニー数の増加が見られたが、30 の場合ほどの増加は見られなかった。また、コロニー数の測定を行った際、予め PBS で希釈した菌液に温度上昇処理を加えた場合にはコロニー数が増加しない傾向が見られた（図3）。

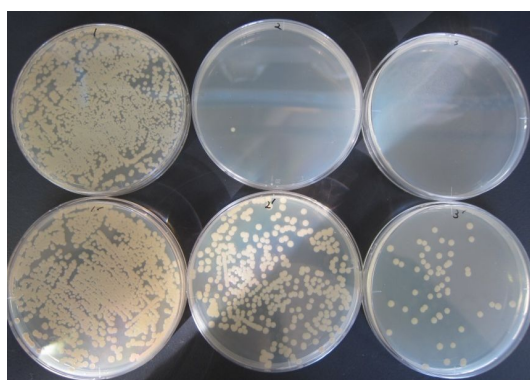


図3 温度上昇処理と希釈の前後によるコロニー数の違い

上: 希釈後に温度上昇処理  
下: 温度上昇処理後に希釈  
左から PBS で 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup> 倍希釈

コレラ菌においても、温度上昇処理前に希釈すると、温度処理後に希釈したときのコロニー数と比較し減少することがわかった。

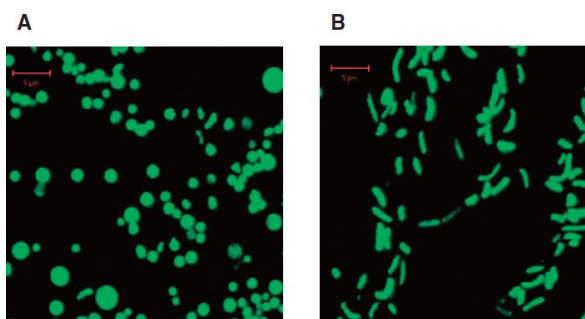


図1 (A) VBNC 状態のコレラ菌。(B) 培養可能状態(栄養細胞)のコレラ菌。Takeda, Y., *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 87, 1-12 (2011)

これらのことから,VBNC 状態からの菌の復帰・増殖にはある程度の細胞密度もしくは菌が培養液中に放出した何らかのシグナル因子が必要であると考えられる。これにより,菌体間の情報伝達手段であるクオラムセンシングと VBNC との関連が示唆された。

### (3) まとめ

上記の結果から,低温流通されている食品中にも温度上昇のみで復帰あるいは増殖する菌が存在している可能性が考えられる。VBNC 状態,難培養状態の菌が養分の添加なしで復帰あるいは増殖する可能性があることから,販売や消費の現場での取り扱いによっては菌の増殖や交差汚染を引き起こす可能性を示唆している。

## 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 1 件)

1. 大楽菜穂, 島本 敏, 島本 整, 低温ストレス下における腸炎ビブリオの EMA-qPCR 法による定量と生菌数の関係,第 48 回腸炎ビブリオシンポジウム,2014 年 11 月 13 日,金森ホール(北海道函館市)

〔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：  
出願年月日：  
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

島本 敏 (SHIMAMOTO TOSHI)

広島大学・生物圏科学研究科・助教

研究者番号：70583136

### (2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：