

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08051

研究課題名(和文) サルモネラのVBNC状態への移行と増殖可能状態への復帰及び病原性発現機構の解析

研究課題名(英文) STUDY ON THE MECHANISMS UNDERLYING INDUCTION OF VBNC STATE AND RE-SUSCITATION FROM VBNC TO GROWING STATE USING PATHOGENIC SALMONELLA

研究代表者

天野 富美夫 (Amano, Fumio)

大阪薬科大学・薬学部・教授(移行)

研究者番号：90142132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：病原性のサルモネラが種々のストレスに応答してVBNC状態になり、ある条件下で培養することによって再活性化し、コロニー形成能を獲得する機構を研究した。とくに、VBNC状態に特異的に発現されると考えられる菌体表面の抗原に着目したが、本研究では十分な検出と解析ができなかった。そこで、最終年度は、ピルビン酸によってVBNC状態の菌が増殖可能になる割合が上昇する現象に注目し、この過程を促進する物質を探索した。その結果、TCA回路を構成する物質のうち、オキサロ酢酸にピルビン酸と同等かそれ以上の作用が見いだされた。この結果は、VBNCの定義として増殖可能状態への復帰を加えることの妥当性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms underlying induction of VBNC by some kinds of stresses and those concerning resuscitation from the VBNC state to colony-forming state during incubation were studied using pathogenic *Salmonella* in vitro. Extensive studies were made especially on the changes in the surface antigens of the VBNC, however, they did not succeed in producing adequate results for the further analyses. Finally, we focused on the resuscitation processes of the VBNC *Salmonella* that had been extremely elevated by addition of pyruvate. In this study, we found that oxaloacetate showed higher resuscitation effects than pyruvate, and other substrates that compose TCA cycle. These results suggest that resuscitation is the necessary condition for characterization of VBNC, and even suitable for definition of VBNC state of bacteria.

研究分野：医歯薬学

キーワード：VBNC状態 サルモネラ 乾燥耐性 抗体産生誘導 ストレス応答 再活性化 ピルビン酸 オキサロ酢酸

### 1. 研究開始当初の背景

細菌は様々なストレスを受けると、増殖可能な状態から、生存しているが増殖不能な VBNC 状態に移行し、その一部は生残し、他は死に至ると考えられている。また、VBNC 状態の細菌は、適切な外部刺激や環境条件の変化に応じて、再び増殖可能な状態に復帰(resuscitate)するものがあると考えられている。これまでの国内外の研究から、様々な細菌が VBNC 状態に移行することが報告され、VBNC の誘導に関するストレスの種類や環境条件についての報告も多い。しかし、これらの研究からは、依然として、VBNC 状態が細菌の死に至る過程を示すのか、それともある特定の細菌の集団に明確な VBNC の性質を示すものが存在するのか、明らかにされていない。その主な理由は、VBNC の定義が、「コロニー形成しない (= 培養できない) が、生物活性 (= 代謝活性など) をもつ」ことから、「生きているが培養できない」という、生物学的な特徴に基づくためであり、それを担う分子や、その分子の存在状態等に関する情報が非常に少ないためである。その結果、個々の菌が実際に、**①**「培養可能で代謝活性を示す状態」、**②**「VBNC 状態 (= 培養不能だが代謝活性を示す状態)」、**③**「死んだ状態 (= 培養不能で代謝活性も示さない状態)」のいずれであるのか、またその菌が**①**~**②**~**③**の間でどのように移行するのかは、依然として不明のままであった。

われわれは、これまでの研究で、病原性のサルモネラが過酸化水素による酸化ストレス、過剰のグルコース、および乾燥ストレスによって VBNC 状態に誘導されることを見出し、その定量的な解析を行って来た。さらに、酸化ストレスによって VBNC 化したサルモネラは、ピルビン酸の投与によって増殖可能状態に復帰することを見出した。しかし、これらの研究を推進する中で常に問題になったことは、「われわれが行ったのは細菌集団の解析」であり、個々の細菌の状態ならびにその状態の変化を解析する上で有効な、「VBNC 状態に特徴的(特異的)な、ポジティブな指標が存在しない」ことである。もし、サルモネラが VBNC 状態になった時に明瞭に発現してくるマーカー分子を見出すことが出来れば、これらの問題の解決に非常に有用であると考えられる。

### 2. 研究の目的

サルモネラは様々なストレスを受けると、増殖可能な状態から、生存しているが増殖不能な状態 (Viable but Non-culturable

state; VBNC state)に移行し、さらに死に至るものと生残するものに分かれるが、適切な刺激や環境条件によって、一部は増殖可能な状態に復帰(resuscitate)する。われわれは、病原性のサルモネラの VBNC 状態の誘導が、過酸化水素による酸化ストレス、過剰のグルコースおよび乾燥によって起こることを見出した。さらに、ピルビン酸の投与によって、酸化ストレスで VBNC 化したサルモネラが増殖可能状態に復帰することを見出した。しかし、サルモネラの VBNC 状態の誘導機構および復帰機構の詳細は不明である。そこで、本研究は、VBNC サルモネラを分離する方法を確立し、それによって VBNC 菌の生態学的な特徴、生化学的な性状、ならびに VBNC からの復帰機構を明らかにすることを目的とする。さらに、VBNC サルモネラの病原性を評価し、その結果に基づき、食中毒ならびに感染症の予防に有用な手段を見出すことを併せて目的とする。

### 3. 研究の方法

研究は、当初、**(1)**VBNC サルモネラの菌体表面に対する特異的なモノクローナル抗体を作成する実験、**(2)** (1)のモノクローナル抗体が認識する分子の同定と性質の解析、**(3)**(2)の分子をコードする遺伝子の解明と発現調節機構の解析、**(4)**(1)の抗体を用いて VBNC サルモネラの濃縮を行い、種々の培養条件等により、復帰して増殖可能になる群、VBNC 状態で安定している群、VBNC から死に至る群、を定量的に解析する実験、の四つの実験計画から構成されていた。しかし、平成 27 年度の研究の結果、VBNC サルモネラに対するモノクローナル抗体を作成が、当初の計画に沿った方法では困難であることが分かったため、平成 28 年度に菌の密度を変化させて VBNC 菌の比率を高く保ちながら回収することを目的として実験を進めた。その結果、サルモネラの乾燥耐性獲得実験系における菌の生残性及び菌密度の影響を明らかにすることに成功したが、そこで得られた VBNC 菌と死菌、対数増殖性を持つ菌の間の比較における Western blotting によるタンパク発現のパターンの差は見られなかった。また、それらをマウスに免疫して得られた血清の菌に対する凝集性に差が見られなかった。

以上の結果を踏まえ、平成 27 年度は、VBNC 菌の特徴である再活性化による増殖性の復帰(re-suscitation)に着目した実験を行った。具体的には、病原性の環境分離株 SEC1#15-1 を LB 培地中で一晩前培養後、新鮮な LB 培地中に加えて対数増殖期まで

培養した。PBSで洗浄後、LB培地 10 mL に  $1 \times 10^7$  cfu/mL となるように接種し、3 mM 過酸化水素を添加して 37、60 分間、150 strokes/min で振盪培養して酸化ストレスを与え VBNC 状態の菌を調製した。氷冷 PBS で洗浄後、菌を M9 最少培地中に  $1 \times 10^7$  cfu/ となるように懸濁し、0.3 mM PA を添加して 37 で 3 時間、静置培養した。最後に菌液を PBS で適宜希釈し、LB 寒天培地上に塗布して一晚培養しコロニー数(CFU)を計測して生菌数を求めた。

#### 4. 研究成果

これまでの研究で、ストレス付加した 1 個の菌を抗体によって VBNC であると示すことはできなかった。そこで本年度は、過酸化水素の曝露によって病原性のサルモネラを VBNC 状態にし、そこから増殖可能な状態への復帰することを指標に研究した。我々はピルビン酸(PA)添加が復帰率を大きく上昇させることを見出していたので、本年度は、VBNC 菌に対する PA の作用機構の解明とともに VBNC 菌のマーカーとなる性質を見出すことを目的にした。

実験は、病原性の環境分離株 SECI#15-1 を LB 培地中で一晚前培養後、新鮮な LB 培地中に加えて対数増殖期まで培養した。PBS で洗浄後、LB 培地 に接種し、3 mM 過酸化水素を添加して 37、60 分間、酸化ストレスを与え VBNC 状態の菌を調製した。氷冷 PBS で洗浄後、菌を M9 最少培地中に懸濁し、0.3 mM PA を添加して 37 で 3 時間、静置培養した。最後に菌液を PBS で適宜希釈し、LB 寒天培地上に塗布して一晚培養しコロニー数(CFU)を計測して生菌数を求めた。その結果、CFU は M9 培地単独ではほとんど上昇しなかったが、0.3 mM PA の添加によって数十倍から百倍、上昇した。一方、TCA 回路で代謝される基質のうち、オキサロ酢酸は 0.3 mM で PA と同等以上の CFU の上昇を示した。これに対し、リンゴ酸、クエン酸、コハク酸は CFU を上昇させたがその効果は弱かった。これらの結果は、PA からオキサロ酢酸への代謝変化が重要であること、および TCA 回路の基質のうちオキサロ酢酸に特有の代謝が VBNC サルモネラの増殖性の復帰に関与している可能性を示唆すると思われる。以上の結果は、VBNC の定義に「再活性化して増殖性を復帰できる」ことを加えることの妥当性を示唆する。

#### 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 3 件)

1. Morishige Y, Koike A, Tamura-Ueyama A, and Amano F. Induction of viable but nonculturable *Salmonella* in exponentially grown cells by exposure to a low-humidity environment and their resuscitation by catalase. *J. Food Prot.*, 80 (2017) 288-294.
2. 森重雄太、山崎利雄、天野富美夫 患者喀痰および環境から分離した *Mycobacterium avium* complex の抗結核薬感受性 結核、92 (2017) 441-445.
3. 天野富美夫 薬学領域におけるバイオフィーム。臨床と微生物 45 (2018) 19-24.

[学会発表](計 2 件)

1. 小池敦資、小濱清子、天野富美夫 : 「サルモネラ感染マクロファージにおける細胞死誘導機構の解析」フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー、仙台市 2017 年 9 月
2. 天野富美夫、荒木美和、森重雄太、小池敦資、: 「Salmonella の VBNC(Viable But Non-Culturable) 状態からの復帰に対するピルビン酸の促進機構」第 91 回日本細菌学会総会、福岡市 2018 年 3 月

[図書](計 3 件)

1. 天野富美夫 : 第 1 章 バイオフィームの構造と形成機構 3. サルモネラが形成するバイオフィームの構造。「バイオフィーム制御に向けた構造と形成過程」(松村吉信、編) pp. 26-35 (2017)シーエムシー出版(東京)。
2. 天野富美夫 : 4 章 疾病予防と健康管理 4.1. 感染症とその予防対策。「衛生薬学 健康と環境」(永沼章、姫野誠一郎、平塚明、編) pp. 59-61 (2018)丸善出版(東京)。
3. 天野富美夫 : 6 章 食品衛生学 6.3. 食品に由来する疾病の各論(6.3.1-6.3.3)。「衛生薬学 健康と環境」(永沼章、姫野誠一郎、

平塚明、編) pp. 239-253 (2018)丸善出版  
(東京).

[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

(アマノ フミオ)

天野 富美夫(AMANO FUMIO)

(大阪薬科大学・薬学部・教授)

研究者番号: 90142132

### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

( )

研究者番号:

### (4)研究協力者

( )