食品中の VBNC 食中毒起因菌の検出法と培養可能状態への 復帰条件の検討

広島大学大学院生物圏科学研究科食品衛生学研究室・教授 島本 整

■ 目 的

腸炎ビブリオを含む多くの細菌は、低温や飢餓といった環境ストレスにより、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)になることが知られている。この状態の細菌は培養法を基調とした従来の検出法では検出されないものの、消化管内に入るなど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おり、食中毒の要因となることが示唆されている。本研究の目的は、食品や環境中に多数存在していると思われる VBNC 状態の細菌の検出法を確立することである。本研究では、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 状態を含む腸炎ビブリオの生菌の検出を試みた。

■ 方 法

培養した臨床分離株 2 株と環境分離株 2 株の計 4 株の腸炎ビブリオを PBS(リン酸緩衝生理食塩水)に懸濁し、4°C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。コロニーの形成が見られなくなった菌液に 20°C、20 時間程度の温度上昇処理による培養可能状態への復帰操作を加え、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。

■ 結果および考察

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°C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。この結果は、viable な菌数にほとんど変化がないにもかかわらず、culturable な菌数が増加したことを意味している。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とから、これが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。食品からの検出においては、腸炎ビブリオは検出されなかったものの、温度上昇処理のみによって復帰もしくは増殖することのできる菌が存在していたことが明らかとなった。

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。この結果は、菌の増殖・復帰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(オートインデューサーなど)が必要であることを意味している。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。今後、培養可能状態への復帰促進因子の同定などを行う必要がある。

■ 結 語

本研究では EMA-qPCR 法、復帰条件での培養法のそれぞれで低温・飢餓条件下における VBNC 状態の腸炎ビブリオを定量する基礎となるデータが得られた。特に興味深いのが VBNC とクオラムセンシングとの関連が示唆されたことである。VBNC 状態の菌については未だに明らかにされていない部分が多いため、今後はさらなるデータの収集とともに、実用的な検出法の確立に向けた研究が求められる。食品における VBNC 状態の菌による汚染状況を調査するためには、食品サンプルに対する EMA-qPCR 法の有効性などについて、より詳細な研究が必要である。