

25. 食中毒事例における原因食品からの高感度な 起因菌の分離に関する研究

- 大久保和洋（旧所属 三重県保健環境研究所微生物研究課、
現所属 松阪保健福祉事務所衛生指導課）
岩出 義人（三重県保健環境研究所微生物研究課）
片山 正彦（三重県保健環境研究所微生物研究課）

【 研究目的 】

食中毒事件の調査で常に問題となるのは、原因と思われる食材からの食中毒起因菌の分離である。本研究では“生きていますが培養できない (Viable But Nonculturable)”細菌の培養能力回復という視点から、原因食材からの高感度の食中毒起因菌の分離法を確立し、食中毒原因食材の同定率を上げることによって、食中毒の予防に寄与することを目的とする。

【 研究の必要性 】

通常食中毒が発生した場合、患者や調理従事者から聴き取り等を行って原因食材を推定する。そしてその食材から、患者から検出されたものと同一の菌を検出することによって完全な食中毒の解明となる。原因食材を同定しなければ、感染経路を完全に解明することができず、新たな食中毒を防ぐための有効な対策も立てることができない。

しかしながら、多くの食中毒事例では原因食材を同定できていない。2010年に三重県で発生した10数例の食中毒事例のうち、原因食材を特定できたものはわずか3件にすぎなかった。さらに食材から菌を検出することができないばかりに、食中毒と断定することができなかつた有症事例も多く存在する。これらのことから、食材からの食中毒起因菌の高感度な分離法の確立が、食中毒対策において重要な課題となっている。

【 研究計画 】

原因食材からの食中毒起因菌の分離が困難な理由の1つとして、近年提唱されているのは、食材中の菌が温度や栄養状態など様々なストレスにさらされ、生存はしているものの、従来の培養方法では分離・増殖できない状態 (Viable But Nonculturable; VBNC 状態) にあるというものである。本研究ではVBNCの研究が最も進んでいる細菌の1つである腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) を用いて、VBNC 状態からの培養能力の回復方法と、

その応用について以下の方法で研究する。

- (1) これまでの先行研究において明らかとなっている、腸炎ビブリオを VBNC 状態にする方法、さらに VBNC 状態から回復させる方法の確認と評価を行う。
- (2) VBNC 状態から回復させる方法について様々な条件検討を行い、VBNC からの回復に必要な因子を同定する。
- (3) 同定された因子をもとに、食材からの VBNC 細菌の分離・培養方法を確立する。

【 実施内容・結果 】

これまでの他の先行研究では、栄養分が含まれていない、海水に近い成分の培養液中に腸炎ビブリオを入れ、4℃に培養液を冷やすことによって腸炎ビブリオが VBNC 状態になることが報告されている。さらに、VBNC 状態になった後に培養液を室温に戻すと VBNC 状態から回復することも明らかになっている。まず、我々もこの研究の追試験を行い、同様の結果を得ることができた。

この実験を基に、培養液を海水に近い成分から純水まで様々な条件に変え、4℃に冷やすことによる VBNC 状態への移行と、温度上昇による VBNC 状態からの回復を調べた。その結果どのような培養液の組成でも、4℃にすれば期間の差はあれ VBNC 状態に移行することが明らかとなったが、VBNC 状態からの回復には特定の培養液の成分が必要であることが示唆された。

さらに詳細に調べるため次の実験を行った。培養液（表 1）を 4℃に冷却することによって VBNC 状態になった腸炎ビブリオに、①エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) のみ加えたもの、②EDTA に過剰な塩化カルシウムを加えたもの、③EDTA に過剰な塩化マグネシウムを加えたもの、④EDTA に過剰な塩化カルシウムと塩化マグネシウムの両方を加えたもの、の 4 つの条件を設定して温度を室温に戻し、VBNC から回復するかどうか調べた。その結果塩化カルシウムと塩化マグネシウムの両方を加えた場合のみ、VBNC 状態から回復した。この実験から、VBNC 状態からの回復には培養液中にマグネシウムイオンとカルシウムイオンの両方が必要であることが明らかになった。

表 1：使用した培養液の組成

NaCl	0.5 %
KCl	10 mM
Na ₂ HPO ₄	0.5 mM
Tris (pH = 8.0)	10 mM
MilliQ	

【 考察と今後の課題 】

今回の一連の実験では、比較的 VBNC の研究が進んでいる腸炎ビブリオを用いたが、その他の細菌でも環境の変化に伴って VBNC 状態になるものが多数報告されている。その中には食中毒菌として重要な大腸菌 (*Escherichia coli*) や黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、カンピロバクター (*Campylobacter jejuni*) もある。これらの細菌にも今回腸炎ビブリオを使って行った我々の実験の結果があてはまるかどうかは、実際に確かめる必要はもちろんあるものの、ほぼ同様の結果になるのではないかと予想される。その根拠としては、どの細菌でも同じような条件（低栄養状態や低い温度）で VBNC 状態になることや、報告数は少ないものの VBNC 状態の細菌はどれも似たような生物学的挙動を示すことがあげられる。研究者の中には VBNC 状態になることは、厳しい環境に適応するために細菌が共通に保持している機構の 1 つではないかと提唱する者もいる。今後の本研究の応用を考えると、他の細菌での同様の実験も早期に行う必要がある。

今回の研究で、腸炎ビブリオが VBNC から回復するためには培養液中にカルシウムイオンとマグネシウムイオンが必要であることが明らかになった。このことから腸炎ビブリオが VBNC 状態になるということは、単に温度の低下や貧栄養状態による生命活動の低下ということではなく、外部刺激を受けて細菌が自ら生命活動の方式を変えているということが示唆される。すなわち、低温や貧栄養状態という外部刺激に対して、遺伝子の発現パターンなどが変化し、厳しい環境を生き抜くために増殖を一旦中止し、あたかも冬眠するように生存していると考えられる。これは重要な知見で、今現在においても VBNC 状態の正確な定義についていろいろな説がある中、VBNC 状態における特異的な遺伝子発現の有無や、特定のタンパク発現が提示できる可能性が出てきた。これが明らかになると、「VBNC 状態にある細菌」が明確に規定することができ、この分野の研究が大きく進むと思われる。

VBNC 状態から回復するためには、カルシウムイオンとマグネシウムイオンが必要であるという結果から、恐らく VBNC 状態からの回復にはなんらかのシグナル反応が細菌に起こっていると予想される。今後、その回復のスイッチが入る瞬間、すなわちカルシウムイオンやマグネシウムイオンを加えたときに、どのような遺伝子やタンパクが活性化されるのか網羅的に解析・同定を行い、さらに同定された因子を効果的に活性化する方法を見つけ、それを食材に応用することにより、効率的な起因菌の同定につなげていきたい。

【 謝辞 】

本研究を実施するにあたり、研究助成を頂きました公益財団法人大同生命厚生事業団に深く感謝いたします。

【 経費使途明細 】

KOD plus Neo (実験用消耗品)	3 個	37,800 円
Ex Taq (実験用消耗品)	5 個	39,690 円
Ex Taq Hot Start version (実験用消耗品)	2 個	22,050 円
8ch multipipetto (実験用機器)	2 個	42,651 円
8ch multipipetto stand (実験用機器)	1 個	47,691 円
標準血液ろ紙 Leucine (実験用消耗品)	1 個	10,118 円
XF TYPE-1 desk PLUS (機材)	1 個	46,620 円
XF TYPE-1 sidetable PLUS (機材)	1 個	43,260 円
電動ピペッター (実験用機器)	1 台	10,120 円
合計		300,000 円