

Vibrio parahaemolyticus の
viable but non-culturable状態の
誘導及びその復帰の検討

日野まど香, 木下瑛莉, 齋藤洋子, 安丸昌代, 米倉久美子, 波多野昌二

(西九州大学健康栄養学科)

(平成17年12月8日受理)

**Induction of Viable but Non-culturable State in *Vibrio parahaemolyticus*
and its Resuscitation**

Madoka HINO, Eri KINOSHITA, Yoko SAITO, Masayo YASUMARU,
Kumiko YONEKURA, Shoji HATANO

(*Department of Health and Nutrition Science, Nishikyushu University*)

(Accepted December 8, 2005)

Abstract

Cells of *Vibrio parahaemolyticus* were tested for changing into viable but non-culturable state (VNC) when incubated at a low temperature, nutrition and salinity condition. The cells were cultured in a nutrient broth medium containing 3% NaCl at 37°C, shifted into a nutrient-free medium containing 1.85% NaCl, and incubated at 10°C. The number of colony decreased exponentially with the incubation time except from day 4 to day 7. However, the total cell number and the viable cell number maintained at an almost constant. The result indicates that the cells reach VNC within the first 10 days under the above mentioned condition. Morphological changes of cells from rod shape to coccoid shape were observed after a 16-day starvation culture at 10°C. The resuscitation of non-culturable cells occurred after spreading them onto a nutrient agar supplemented with a H₂O₂-degrading compound such as sodium pyruvate. The non-culturable cells were not resuscitated by addition of several antioxidative compounds tested. In this study, the condition for induction of VNC state and the resuscitation effect of sodium pyruvate were indicated.

Key words : *Vibrio parahaemolyticus* 腸炎ビブリオ
viable but non-culturable state 培養不能状態
resuscitation 復帰
morphological change 形態変化

1. 緒 言

一部の細菌は、自然界では、生きているが通常の寒天平板培地や液体培地では培養することができない生理状態になっていることが知られている。このように通常の培養条件では培養できないものの、何らかの生理活性を示す生理状態を1985年にアメリカ・メリーランド大学の Colwellら¹⁾がVNC(Viable but Non-Culturable)状態として提唱した。現在までに、大腸菌、カンピロバクター、サルモネラなどの食中毒原因菌をはじめ、49種でこのVNC状態に移行することが報告されている²⁾。このVNCへの移行の要因の多くは、低温、飢餓条件であるが、紫外線などの太陽光線、塩分などの浸透圧、通気、乾燥、各種の金属塩、塩素処理などによる例も報告されている³⁾。

このVNC状態の菌の存在は、食品等の衛生管理を従来の概念で行うと、細菌が生きているにも関わらず検出できないために、細菌汚染の度合いの判定を誤ることを示唆する。そのため、VNC状態について明らかにすることは急務であると考えられる。

本研究では、日本において細菌性食中毒の原因菌として常に上位を占め、衛生上問題とされている腸炎ビブリオ食中毒の原因菌である *Vibrio parahaemolyticus* に着目した。この *V. parahaemolyticus* は、海洋に広く分布する好塩性(至適塩濃度3%)のグラム陰性の短桿菌で、TDH (thermostable direct hemolysin)と呼ばれるタンパク質の耐熱性溶血毒、およびその類似溶血毒であるTRH (TDH-related hemolysin)を産生する⁴⁾。この菌のコロニー形成能は、海水の温度と密接な関係を持ち、実際、環境からの検出も夏季に集中して起こり、冬季にほとんど検出されない⁵⁾。そのため、VNCの概念が提起されて以来、*V. parahaemolyticus* は、冬季の間はVNC状態になって存在していると考えられている⁶⁾。そこで本研究では、低温、低栄養、低塩分環境下で *V. parahaemolyticus* がどのようにVNC状態に移行するか調べた。

また、最近になり、従来の寒天平板培地法による細菌の検出は、培養に時間がかかることや、VNC細菌の検出が難しく細菌数を過少評価してしまうといった欠点があるために、蛍光活性染色法⁷⁾や、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH法)^{8,9)}、遺伝子増殖法 (*in situ* PCR法¹⁰⁾、*in situ* LAMP法¹¹⁾、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE法)¹²⁾などが、提唱されている。しかしながら、これらの手法は高額機器や高度な技術が必要であり、寒天平板培地法の簡便性には及ばない。そこで、VNC状態の細菌も培養できるような寒天平板培地を作製することを目的として、VNC状態から回復作用をもつ物質の検索を行った。

2. 実験方法

2.1 供試菌株

Vibrio parahaemolyticus WP-1 (神奈川現象陽性株)は、九州大学大学院農学研究院生物機能科学部門食品バイオ工学講座食品衛生化学分野より、分譲して頂いた。

2.2 VNC状態への誘導

V. parahaemolyticus 株を3%食塩添加普通ブイヨン(栄研化学社製)液体培地5 mlに接種し、37℃にて17時間振とう培養を行なった。前培養液100 μ lを新しい液体培地5 mlに加え、対数増殖期(O.D.=0.3)まで培養した。集菌後、1.85%食塩水で3回洗浄し、10⁶ CFU(colony forming unit)となるように1.85%食塩水に懸濁し、10℃にて静置培養をした。

2.3 菌数計測法

VNC状態へ誘導処理をした菌液に、Live/Dead BacLight bacterium viability kit (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands)を添加(終濃度0.3%(v/v))し、10分間暗室に放置することで染色した。この染色法は、細胞膜の完全性による染色液の浸透性を利用した方法で、膜の損傷している菌体は赤色に、無傷の菌体は緑に染まる。試料2.5 μ lをスライドガラスにのせ、気泡が入らないようにしてカバーガラスをかけ、落射型蛍光顕微鏡(OLYMPUS BX-FLA)にて、励起フィルター450~480 nm、吸収フィルター515 nmまたはダイクロイックミラー500 nmを用いて、緑色に染色された菌を計測し生菌数を算出した。また、カバーガラスをバクテリア計算盤(サンリート硝子)上にのせたのち、菌懸濁液を一滴、計算盤上のカバーガラスの間に入れ、位相差顕微鏡(OLYMPUS BX-PHD)にてチャンパー内に分布する菌数を計測し、全菌数を算出した。培養可能菌数は、菌液を10倍連続希釈後、1.85%食塩添加普通寒天培地に100 μ l塗抹し、37℃で一晩培養することにより生じたコロニーを計測し算出した。

2.4 走査電子顕微鏡

VNC状態へ誘導処理をした菌液に、その約6倍量の1%グルタルアルデヒドを含む0.1 M カコジル酸緩衝液pH 7.4を加え2時間浸漬し、固定した。次に、20 mlのディスプレイザブル・シリンジに、ホルダーをセットしたシリコンリング付SEmpore(日本電子製)を取り付け、その表面を超純水(DDW)で洗浄した後、0.1%ポリリジン(Poly-lysine hydrobromide, MW 7000-150000, Sigma)でコーティングした。固定した菌液35 μ lをSEmpore上に置き、DDWで3回洗浄後、t-ブタノールを滴々滴下し、約10分処理して、完全にt-ブタノールに置換した。その

後、SEMpore上の試料を液体窒素を用いて完全に凍結させた。凍結させた試料は、そのまま走査電子顕微鏡(JSM-5500LV, 日本電子製)の試料室に入れ、低真空モード(真空度30 Pa)で、約1時間放置することで乾燥させた。

乾燥が完了した試料は、イオンスプッター装置(JFC-1600, 日本電子製)を用いて10 nmの厚さに白金をコーティングした。観察は、走査電子顕微鏡(高真空モード, 加速電圧15 kV, スポットサイズ8~15で行った。

2.5 VNC状態からの回復物質の検索

VNC状態へ誘導処理した5, 6日目の菌液100 μ lを、試薬を添加した寒天培地と無添加培地に塗抹した。その後、試薬を添加した寒天培地上に生じたコロニー数から算出される培養可能菌数と無添加培地のコロニー数から算出される培養可能菌数を比較し、添加試薬の回復作用の有無を検討した。低栄養環境から普通寒天培地のような高栄養環境に移行させると、生理機構の攪乱(metabolic imbalance)が生じ、活性酸素が発生され細胞に損傷を与えているのではないかとの報告がある¹³。よって、添加試薬には、水溶性の抗酸化物質(アスコルビン酸; ASA, アスコルビン酸ナトリウム; SAS)や油溶性の抗酸化物質(プロトカテキユ酸エチル; EPC, ブチルヒドロキシアニソール; BHA, ジブチルヒドロキシトルエン; BHT), さらに, H₂O₂消去作用をもつピルビン酸ナトリウム(SPV)を用いた。油溶性の抗酸化物質はエタノールに、水溶性の抗酸化物質は水に溶解し、オートクレーブ滅菌後50℃程度にさました培地に、0.01~0.00001%になるように添加した。ピルビン酸ナトリウムは、終濃度が10~0.001%になるように計り取り、培地とともにオートクレーブ滅菌した。

3. 実験結果及び考察

3.1 VNC状態への誘導

1.85%食塩水及び10℃の低温, 低栄養, 低塩分環境下

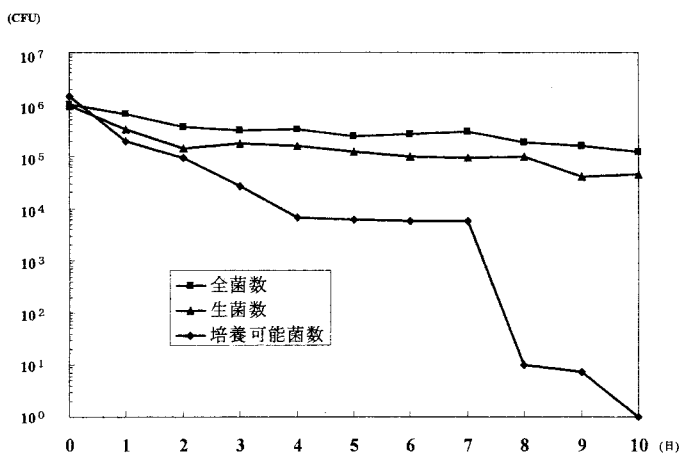


図1 *V. parahaemolyticus* のVNC状態への移行

で静置培養を行った結果、培養可能菌数は3段階の減少変化を示すことがわかった。つまり、はじめに培養可能菌数の直線的な減少(4日間)後、減少がほとんど観察されない時期(3日間)を経て、再び減少(3日間)を示し、10日目には培養可能な菌が観察されなくなった(図1)。

この期間に蛍光染色した菌を蛍光顕微鏡により観察し、生菌数を計測したところ、低温, 低栄養, 低塩分環境下にさらすことにより、生菌数は減少したが、培養可能な菌が観察されなくなった10日目でもまだ、蛍光顕微鏡下で緑色の蛍光を示す生菌が5.0×10⁷/ml個存在することが分かった。このことから、*V. parahaemolyticus* が、低温, 低栄養, 低塩分処理によりVNC状態に陥っていることが明らかとなった。*V. vulnificus* は、人工海水、5℃で2~3週間培養するとVNC状態に移行する¹⁴こと、*V. cholerae* O1は、栄養物をほとんど含まない培地、15℃で1ヵ月以上培養するとVNC状態に移行する¹⁵ことが報告されていることから、低栄養, 低温条件により、*Vibrio* 属菌はVNC状態にいたると推測された。

3.2 形態変化

VNC状態における菌の形態の変化について走査電子顕微鏡で観察したところ、0日目ではほとんどの菌が桿菌であったが、3日目では丸みをおび、16日目ではほとんどの菌が球形化していた。また、日が経つにつれ表面のしわが深くなっていた(図2)。つまり、低温, 低栄養, 低塩分環境下をVNC状態になって生き延びている細胞は、球形化していることがわかった。*V. vulnificus* は、人工海水中、5℃で培養すると桿菌から球菌へ形態変化する¹⁴こと、*V. cholerae* は、栄養素の欠乏により小型化すること¹⁶が報告されていることから、今回明らかになった現象はこれら *Vibrio* 属菌に共通した特徴であるかもしれない。

3.3 VNC状態からの回復に及ぼす抗酸化物質の影響の検討

VNC処理開始後5, 6日目の *V. parahaemolyticus* 菌液を用いて、抗酸化物質(プロトカテキユ酸エチル; EPC, ブチルヒドロキシアニソール; BHA, ジブチルヒドロキシトルエン; BHT, アスコルビン酸; ASA, アスコルビン酸ナトリウム; SAS)にVNC状態からの回復作用があるか調べた(図3)。油溶性抗酸化物質を培地に添加する際に、培地中に加えられたエタノール(0.001%~0.0001%)の影響について確認したところ、コロニー数の増減は見られず、添加エタノールの影響がないことを確認した(データは報告せず)。得られた無添加培地及び抗酸化物質添加培地での菌数を、クラスカル・ウォリス検定により比較した結果、VNC処理開始後5日目、6日目ともに、有意な増加はみられなかった。つまり、油性、水性ともに抗酸化物質にVNC状態からの回

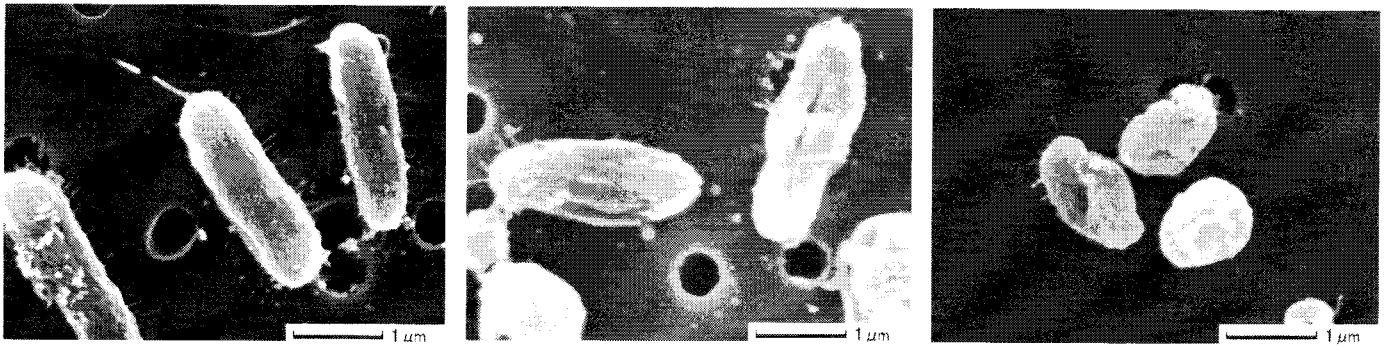


図2 VNC状態にいたる *V. parahaemolyticus* の電子顕微鏡写真

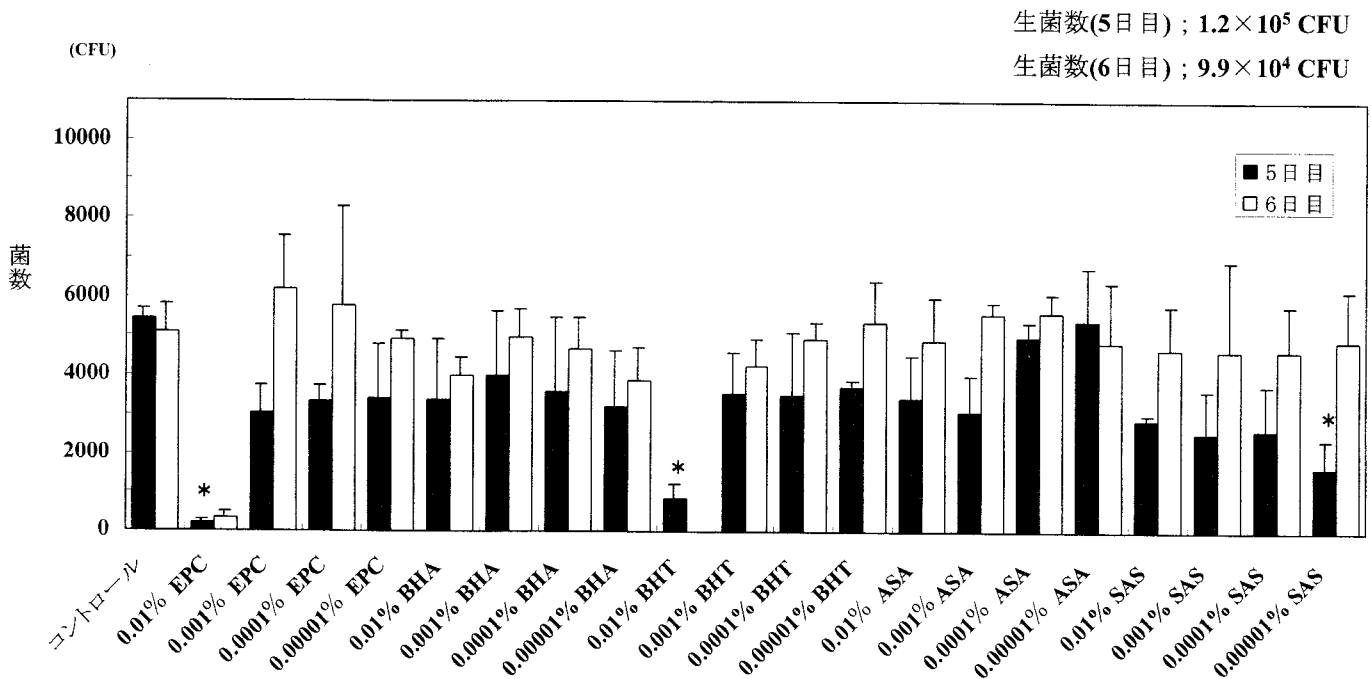


図3 VNC状態からの回復に及ぼす抗酸化物質の影響

EPC; Ethyl protocatechuate, BHA; Butyl hydroxyanisold,
BHT; Butyl hydroxytoluene, ASA; Ascorbic acid, SAS; Sodium ascorbate
* ; コントロールと比較したときの有意差 (p<0.05)

復作用がないことがわかった。また、VNC処理開始後5日目では、0.01%EPC、0.01%BHT及び0.00001%SAS添加培地に塗抹したときに、無添加培地に塗抹したときと比較して、菌数が有意に減少していた(すべてp<0.05)。VNC処理開始後6日目では、0.01%EPCと0.01%BHT添加培地に塗抹したときに、菌数が無添加培地と比較して減少していたが、有意差はみられなかった。この理由については不明であり、今後の研究課題である。

3.4 VNC状態からの回復に及ぼすピルビン酸ナトリウムの影響の検討

さらに、先と同様にしてピルビン酸ナトリウム(SPV)にVNC状態からの回復作用があるか調べた(図4)。その結果、VNC処理開始後5日目では、1%ピルビン酸ナトリウム添加培地に無添加培地の約2.1倍、VNC処理開始後6日目では無添加培地の約5.6倍のコロニーが形成

された。先と同様の検定を行った結果、VNC処理開始後6日目の菌液を1%ピルビン酸ナトリウム添加培地に塗抹した場合のみ、無添加培地と比較して有意な(p<0.05)菌数の増加がみられた。ピルビン酸ナトリウムは、活性酸素のスカベンジャー作用を有する物質であるため、先の報告¹⁾と同様に活性酸素が寒天培地上にコロニー形成する際の障害となっていることが考えられる。また、ピルビン酸ナトリウムの添加によって、生菌がどの程度培養可能になっているか検討したところ、無添加培地では、実際の生菌の4.4%しか培養できないのに対して、1%ピルビン酸ナトリウムを添加したときには、実際の生菌の9.4%(5日目)及び31.3%(6日目)まで培養可能になっていた。しかしながら、中野ら¹⁷⁾と同様に、本研究でも標準偏差に示すように実験毎に回復作用にばらつきが大きく、回復にはさらに多様な因子が関係すると推測された。

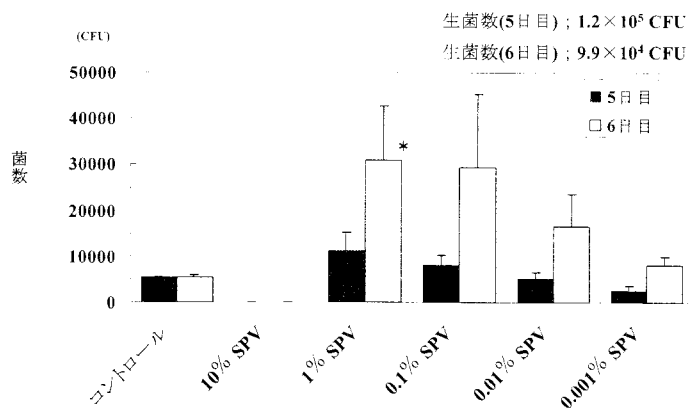


図4 VNC状態からの回復に及ぼす
ピルビン酸ナトリウムの影響

SPV: Sodium pyruvate

* ; コントロールと比較したときの有意差 ($p < 0.05$)

今後は、VNC状態の菌も完全に寒天平板培地上で培養可能にすることを目指し、寒天平板培地の寒天濃度及び培地支持体の種類等の培養方法について検討する予定である。また、培地栄養要求性が一時的に複雑化した損傷菌は、最小培地では生育できないが、それにアミノ酸、ペプチド、ペプトン、酵母エキス、血液成分、グルコース、各種の代謝中間体（ピルビン酸、クエン酸など）、リン酸、マグネシウム塩などを添加して培養すれば増殖能を取り戻すことや、代謝活性が衰えた菌では、各種のデヒドロゲナーゼ、ATP合成系の構成酵素、プロテアーゼ、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼなどの活性が低下していることが報告されている⁹⁾。よって、これらの試薬のVNC状態からの回復作用についても調べ、より有効なVNC状態からの回復剤の探索を行う予定である。

4. 要 約

本研究では、食中毒菌である *Vibrio parahaemolyticus* (腸炎ビブリオ)株が、低温、低栄養、低塩分の環境下で、生きているが培養できない(VNC)状態にどのように移行するか調べた。

37℃で培養した *V. parahaemolyticus* の対数増殖期細胞を1.85%食塩水中に 10^6 CFUになるように調整し、10℃に保存した。その結果、培養可能菌数は3段階の減少変化を経ることがわかった。また、その過程における生菌数を計測したところ、ゆるやかにしかも2段階で減少したが、培養可能な菌がなくなった10日目でも、まだ 5×10^1 /mlの生菌が存在することが確認され、*V. parahaemolyticus* がVNC状態に陥っていることが明らかとなった。また、その過程で菌の形態は、桿菌から球形に変化していることが分かった。

また、抗酸化物質（アスコルビン酸、アスコルビン酸ナトリウム、プロトカテキユ酸エチル、BHA、BHT）やピルビン酸ナトリウムが、VNC状態からの回復作用があるか検討した。VNC処理開始後5、6日目の菌に抗酸化物質を添加しても回復作用は見られなかったが、1%ピルビン酸ナトリウムを添加したとき、5日目の菌では無添加培地の2.1倍、6日目の菌では無添加培地の5.6倍のコロニーが形成された。つまり、無添加培地では、実際の生菌の4.4%しか培養できないのに対して、1%ピルビン酸ナトリウムを添加したときには、実際の生菌の9.4%（5日目）及び31.3%（6日目）まで培養可能になっていた。今回の研究により、ピルビン酸ナトリウムにはVNC状態からの回復作用があることが示唆されたが、十分な回復作用ではないため、今後は、さらに回復作用のある物質の検索や培養方法の検討をする予定である。

5. 参考文献

- 1) R. R. Colwell: *Bio/Technology*, 3, 817 (1985)
- 2) 木暮一啓: 月刊 海洋, 号外33, 6 (2003)
- 3) M. J. Gauthier: "Environmental parameters associated with the viable but nonculturable. In Nonculturable microorganisms in the environment", p. 87 (2000) (ASM Press, Washington, DC)
- 4) 竹田美文: "ビブリオと消化器感染症" [標準微生物学第6版], 川名林治監修, p. 191 (1996) (医学書院)
- 5) A. DePaula, L. H. Hopkins, J. T. Peeler, B. Wentz, L. M. McPhearson: *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2299 (1990)
- 6) M. A. R. Chowdhury, H. Yamanaka, S. Miyoshi, S. Shinoda: *FEMS Microbiol. Ecol.*, 74, 1 (1990)
- 7) N. Yamaguchi, M. Nasu: *J. Appl. Microbiol.*, 83, 43 (1997)
- 8) S. J. Giovannoni, E. F. DeLong, G. J. Olsen, N. R. Pace: *J. Bacteriol.* 170, 720 (1988)
- 9) E. F. DeLong, G. S. Wickham, N. R. Pace: *Science*, 243, 1360 (1989)
- 10) G. J. Nuovo: *J. Histotechnol.*, 17, 235 (1994)
- 11) F. Maruyama, T. Kenzaka, N. Yamaguchi, K. Tani, M. Nasu: *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 5023 (2003)
- 12) G. Muyzer, E. C. De Waal, A. G. Uitterlinden: *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 695 (1993)
- 13) S. F. Bloomfield, G. S. A. B. Stewart, C. E. R. Dodd, I. R. M. Booth: *Microbiology*, 144, 1 (1998)
- 14) J. D. Oliver, L. Nilsson, S. Kjelleberg: *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2640 (1991)
- 15) K. Kondo, A. Takade, K. Amako: *FEMS Microbiol.*

Lett., 123(1-2), 179 (1994)

- 16) R. M. Baker, F. L. Singleton, M.A. Hood: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 930 (1983)
- 17) 中野宏幸, 藤井みか, 北口暁子: 月刊 海洋, 号外 33, 112 (2003)
- 18) 森地敏樹: 月刊 海洋, 号外33, 56 (2003)