

“生きているが培養できない” 病原性大腸菌 O157の検出法の開発

門 田 修 子

畜産学研究科畜産衛生学専攻食品衛生学講座（博士後期課程1年）

1. 目 的

細菌性食中毒が発生すると、患者から病原菌を分離すると共に原因汚染食品を特定するため、一般的な細菌学的検査が行われる。しかし、感染源と目される食品や環境から病原菌が分離されない場合がしばしばあり、実際のところ原因食品は2割程度しか特定されず、風評被害を招く事も多い。この原因の一端には、生きているが「培養できない（VBNC：Viable But Non-Culturable）」状態の細菌、いわゆる通常の方法では培養不能状態にある食中毒菌が、海水や河川食品中などへ混在している可能性が考えられる。その為、従来の検査方法の限界が論じられている。我々は、1989年に別海町でおきた、イクラ由来の腸管出血性大腸菌 O157やサルモネラなどの病原細菌がストレス環境下で VBNC 状態に移行し、これらの菌が VBNC 状態にあっても病原性を保持し、動物に感染した場合健康被害をもたらす事を見出した。さらに、サルモネラの VBNC 状態を解析した結果、*rpf* 遺伝子のクローニングに成功し、この遺伝子の組換えタンパクが VBNC 状態のサルモネラを蘇生させる事を既に見出している。そこで、分子学的手法を利用して、難培養状態にある O157と、その近縁種である赤痢菌の検出を可能にする手法の開発を目的として、本研究を行った。

2. 方 法

以下の三段階に分けて研究を行った。

- 1) 赤痢菌からの *rpf* 様遺伝子のクローニング及び組換えタンパクの作成、精製。

サルモネラの *rpf* 遺伝子の配列を元に、赤痢菌のゲノムデータベースを利用して PCR 法により、*rpf* 遺伝子をクローニングした。上記でクローニングした配列から組換えタンパクを作成、精製した。

- 2) VBNC 状態の誘導法の検討

VBNC 状態の *in vitro* での誘導法を確率できれば、研究の推進に大きく寄与できる。

塩や温度、乾燥などの様々な環境下での赤痢菌の動態を調べ、簡便な VBNC 誘導法の確立を目指した。

- 3) 組換えタンパクを用いた VBNC 菌検出法の確立

組換えタンパク質を利用して上記²⁾で誘導した VBNC 状態の赤痢菌の蘇生条件を検討した。

3. 結 果

上記¹⁾の結果について

サルモネラの *rpf* プライマーを用いて PCR を行ったところ、サルモネラの *rpf* とほぼ同じサイズの700bp 付近にバンドが検出された (図1)。このことから、赤痢菌には *rpf* 様遺伝子が存在していると考えられた。そこで、PCR 断片の TA クローニングを行い DNA シークエンサーにより塩基配列を決定した。さらに、赤痢菌 *rpf* と O157, *S. Oranienburg* の *rpf* の塩基配列・アミノ酸配列には、78~99%の高い相同性がみられた。

続いて、*rpf* の PCR 断片を GST 融合タンパク発現用ベクター pGEX-6P-1 にクローニングし、大腸菌 BL21 をトランスフォーメーションした。IPTG 1mM 添加後、8 時間の培養で発現を誘導し、GST カラムとタグ切断酵素による組換え Rpf を精製したところ、SDS-PAGE の結果より、アミノ酸配列から推定される分子量の25KDa 付近にバンドが見られた (図2)。このことから、赤痢菌の組換えタンパクの作成、精製に成功したと考えられる。

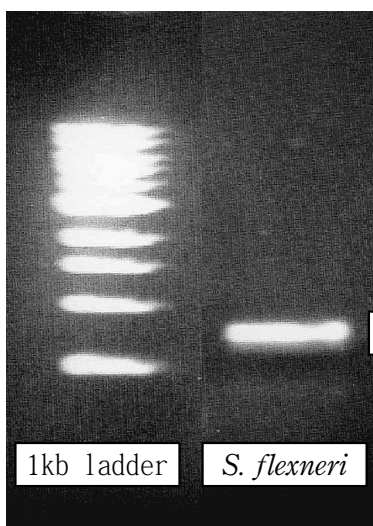


図1. サルモネラ *rpf* プライマーによる PCR 結果

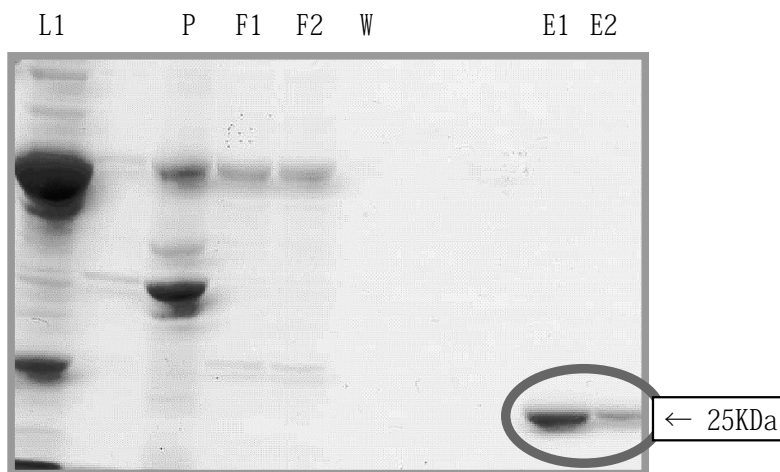


図2. 組換えタンパクの精製結果 (SDS-PAGE)

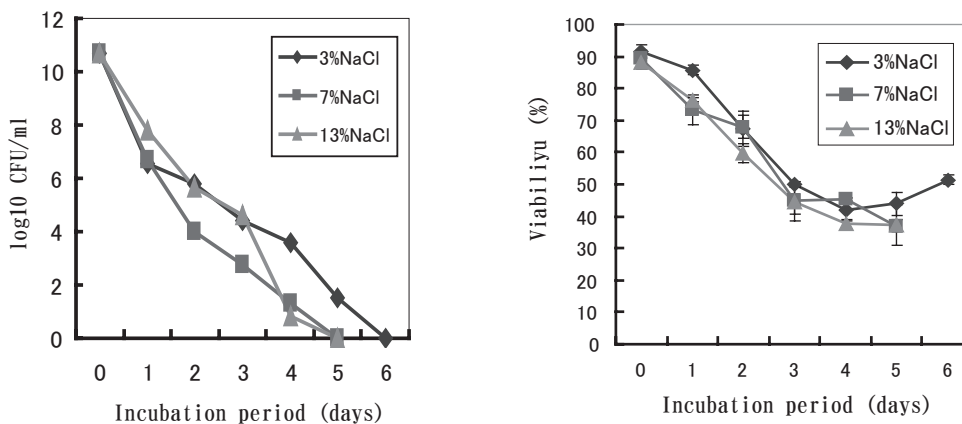


図3. 赤痢菌の VBNC 誘導条件の検討結果

左図: TSA 上のコロニー数

右図: Bac Light 染色による生存率

上記²⁾の結果について

食塩ストレスによる赤痢菌の VBNC 誘導について検討した。

赤痢菌を 3 %, 7 %, 13%濃度の NaCl 存在下で培養し, TSA 上のコロニー数と *Bac Light* 染色による生存率について調べました。

結果, 全ての塩濃度サンプルでコロニー形成が見られなくなったが, 生存率は37%~51%を保っていた(図3)。3% NaCl サンプルの生存率が最も高かったことから, *S. flexneri* の VBNC 誘導は, 3% NaCl 存在下での培養が適していると考えられた。

上記³⁾の結果について

赤痢菌の VBNC 誘導に成功した事から, rRpf による蘇生効果を検討した。

0.001~10 µg/ml の rRpf を含んだ培地に VBNC 状態の赤痢菌を接種後, 7 日間培養し, コロニー形成の有無を観察した。

結果, 培養期間中のサンプルからコロニー形成は見られず, 今回の条件では蘇生を誘導できなかった。

4. 考 察

S. flexneri の *in vitro* での VBNC 誘導に成功した事から, 環境ストレスによる VBNC への移行が証明された。この事から, 細菌性赤痢の発症菌数が微量な背景には, VBNC 菌が関与している可能性が考えられる。また, 広い菌種間で *rpf* の塩基配列・アミノ酸配列に高い相同性が見られた事から, *rpf* は菌の生存や増殖において何らかの共通した重要な働きがあると推察される。

今回の実験では, 赤痢菌における rRpf による蘇生効果は認められなかった。同様の方法でサルモネラにおいては VBNC からの蘇生が起こっている事から, 現時点では断定できないが, 菌の種類によって蘇生のメカニズムは異なると考えられる。

そもそも *rpf* 遺伝子は, *Micrococcus luteus* の培養上清中から発見されたものであり, Rpf についても詳細は解明されていない。サルモネラのように単体で作用する菌種やタイプ別の *rpf* 遺伝子が揃わないと活性を失うものなど様々である。今回の報告で主としたのは赤痢菌であったが, O157 についても赤痢菌と同様に, rRpf 単体では VBNC 状態からの蘇生は認められなかった。よって, 今後は赤痢菌の培養上清を VBNC 菌に添加し, 蘇生の有無を確認すると共に, 未だ明らかにされていない赤痢菌の Rpf について更なる知見を得, 検出法に有用であるか否かを検討していく予定である。

キーワード: VBNC, *rpf*, 蘇生