

〈平成14年度〉

食品中におけるVNC細菌の危険性評価に関する研究

牧 野 壮 一

(帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター教授)

Passage in mice causes a change in the ability of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress : resuscitation from the viable but non-culturable (VNC) state

要 約

Salmonella Oranienburg の汚染した乾燥イカによる集団食中毒が1999年に発生した。原因食品由来サルモネラは食塩耐性であったが、患者由来株は感受性であった。両由来分離株はマウスへの毒力はほぼ同じであったが、食塩耐性の食品由来株をマウス体内から回収すると食塩感受性株に変わった。一方、患者由来株はマウス体内を通過させても食塩感受性は変化しなかった。サルモネラを人工的に汚染させた乾燥イカを作成すると、耐性株のみが直接製品から分離できた。しかしながら、食塩感受性株を人工的に汚染させた場合、蛍光染色で菌体を観察すると90%以上が生きることが確認できた。このことは食塩のストレス存在下で感受性株がviable but non-culturable (VNC) 状態に陥っていたことを示唆している。この推論は有効な増菌法を使用すればサルモネラが蘇生できたことで確かめられたといえる。結論として、VNC 状態の*S. Oranienburg*は食塩保存された食品中で人に危害を与える可能性があり、食品検査で注意する必要がある。

序 論

日本では、生イカの一部は高濃度の食塩水に漬け、乾燥させて、乾燥イカとしてスナック菓子などに食されている。生ものは高濃度の食塩水に漬

けることにより食品媒介感染症の防止に効果があると広く考えられてきた^{1, 15, 16, 25, 31)}。しかしながら、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Oranienburgと*S. enterica* subsp. *enterica* serovar Chesterに汚染された乾燥イカによる46都道府県に渡る食中毒が1999年にわが国で発生し、敗血症や胃腸炎を伴う1500人以上の患者が確認された^{31, 34)}。原因食品は一つの工場で作られ、生イカが製造工程中でサルモネラの汚染が起こったものと想定された。このことから、サルモネラは食塩水の浸潤及び乾燥中に生イカに汚染し、しかも病原性を保持していたと考えられた。

Campylobacter jejuni, *C. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* や*Bacillus cereus*などの細菌は乾燥食品中で検出されてきた^{1, 4, 13, 17, 18, 27, 33)}。さらに、*Vibrio cholerae*, *E. coli* O157:H7, *C. jejuni*そして*Salmonella* spp.などが生き続けているが培養不可能な状態、すなわちviable but non-culturable (VNC) 状態に海水や河川、そして食塩か食品中で陥ることが報告されてきた^{2, 9, 11, 23, 26, 30, 32)}。その結果、それらの細菌の生菌数が過小計算されると理解されている。本研究では、なぜ*S. Oranienburg*が厳しい条件下で生き残ることができたのかに焦点を当てる。

材料及び方法

(1) 菌株と培地：乾燥イカ及び患者から分離

Table 1 S. Oranienburg isolates used in this study

Isolates	Origin	Symptoms
Sa99001	Patient	asymptomatic
Sa99004	Patient	septicemia
Sa99026	Patient	septicemia
Sa99061	Patient	septicemia
Sa99073	Patient	asymptomatic
Sa9911T	Dried squid	—
Sa9912A	Raw materials	—
Sa9921K	Raw materials	—
Sa9937O	Raw materials	—
Sai-1	Patient	septicemia
Sai-2	Patient	diarrhea

Sai-1とSai-2は散発例で、他は集団発生例由来株であった。

された9株のS. Oranienburgを使用した (Table 1)。乾燥イカの水分活性は0.6であった¹⁾。液体培地は食塩を含まないnutrient broth (NB; Difco Lab., Mich., USA), Hajna tetrathionate broth (HTB; Eiken co. ltd., Tokyo, Japan) そしてbrain heart infusion broth (BHI; Difco Lab., Mich., USA) を用いた。固形培地はDHL agar (DHL; Eiken co. ltd., Tokyo) と trypticase soy agar (TSA; BBL/Becton Dickinson, Mich., USA) である。

(2) Pulsed-field gel electrophoresis: Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) による遺伝子解析をGautom等の方法¹⁴⁾ に従い実施した。使用酵素は*Xba*I or *Bln*I (TOYOBO, Tokyo, Japan) で、解析はGene Navigator (Amersham Pharmacia, co., Ltd) により行った。

(3) 乾燥に対する感受性の試験方法: NBで37℃, 20時間培養した菌体を生理食塩水で洗浄後、同量の生理食塩水に懸濁した。その50 μ l を450 μ l の生食を含む48-well microtitre plate (Nalge Nunc International) 内に移した。その後、プレートに蓋をしないで45℃, 24時間放置して乾燥させた。その後、滅菌蒸留水500 μ l を加え、懸濁後、その適当量をDHL及びTSA platesに菌数 (CFU) を計るために塗抹した。

(4) S. Oranienburgの食塩水中での生存試験: 約 10^8 - 10^9 個のS. Oranienburgを濃度の異なる食塩水中に添加し、37℃, 24時間培養した。その

適当量をDHL及びTSA plates上に塗抹して、生菌数を測定した。

(5) S. Oranienburgのマウスへの感染実験: 6週齢のメスのBALB/cマウスを使用した。マウスには、約 6.6×10^6 個のS. Oranienburgを腹腔内接種した。肺及び脾臓から菌の回収を行った。

(6) 実験的に作成した乾燥イカからのサルモネラの回収実験: 生イカ5gを7%濃度の食塩水に浸潤させ、約 6.6×10^6 個のS. Oranienburgを接種後、4℃で24時間培養した。イカを取り出し、45℃で24時間風乾し、乾燥イカを作成した。そこに、5mlのbuffered peptone water (BPW, pH7.2) を加え、37℃で1時間培養し、その適当量をDHL plates上に塗抹した。同時に上清を使用し、HTB (10ml) 中で37℃で20時間増菌培養し、most probable number (MPN) を計測した。もう一方の増菌法としてサルモネラの培養ろ液を5%濃度のBHI-brothに加え、増菌を行った³²⁾。同様に、MPNを計測した。

(7) 蛍光染色: サルモネラ菌体はLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit (Molecular Probes, Netherland) で染色した。蛍光顕微鏡で1000個の菌体を観察した。

結 果

(1) サルモネラのDNA解析: 疫学研究^{31, 34)} から、患者由来サルモネラは乾燥イカ由来であると考えられているので、9株 (Table 1) を用いて、遺伝子型別を行った。予想通り、PFGEパターンは感染事例由来株は同一で (lanes 3-5 and 8-10 in Fig. 1), 散発例由来とは異なっていた (lanes 1, 2, 6 and 7 in Fig. 1)。

(2) 乾燥イカ由来S. Oranienburg株の性質: 9株の乾燥に対する感受性を調べた。まずサルモネラを食塩水に懸濁し、45℃で24時間培養して菌数の推移を比較したが、優位差は観察できなかった。

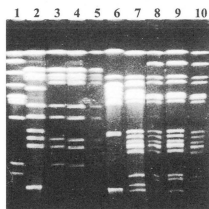


Fig. 1 PFGE patterns of *S. Oranienburg* isolates. Five representative isolates containing two *S. Oranienburg* isolates, Sai-1 and Sai-2, isolated from other sporadic outbreaks, were analyzed by PFGE using *BlnI* (lanes 1-5) and *XhoI* (lanes 6-10). Lanes 1 and 6, Sai-1; 2 and 7, Sai-2; 3 and 8, Sa99004; 4 and 9, Sa9911T; 5 and 10, Sa9921K.

た (Table 2)。しかしながら生理食塩水にサルモネラを懸濁後、乾燥すると、患者由来サルモネラの菌数の顕著な減少が観察され、Sa99004株が特に顕著であった。一方、食品由来株の減少は顕著でなく、特にSa9911T株で菌数の減少が少なかった (Table 2)。そのためこれらの2株を標準株として以後の実験に使用した。しかし、サルモネラを滅菌蒸留水に懸濁後、乾燥して菌数の推移を観察すると、全ての株は菌数の減少は観察されなかった (Table 2)。そのため、乾燥への感受性は食塩に対する感受性と同一ことであると結論した。

それぞれの株の各種食塩濃度における生菌数を比較した。食品由来株は17% NaCl水中でさえも

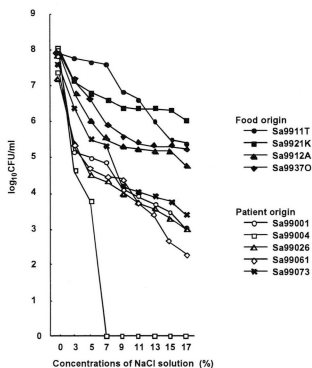


Fig. 2 Bacterial cell numbers of *S. Oranienburg* in NaCl solutions.

24時間後には100倍程度しか減少しなかったが、患者由来株Sa99004は7% NaCl水中で24時間後には生菌数はゼロであった (Fig. 2)。以上より、食品由来株は乾燥、すなわち食塩耐性で、患者由来株は感受性であると結論できた。またこの違いは寒天培地の違いでの影響はなかった。

(3) マウスへの病原性：食塩に対する感受性が違う株において、マウスへの病原性の違いを調べた。しかし、全く差は観察できなかった (Fig.

Table 2 Survival of *S. Oranienburg* isolates through the dry-up process

Isolates	Culturable cell numbers (CFU/ml)			
	Initial dose	Dry-up in saline	Dry-up in water	Incubation in saline*
Patient-origin				
Sa99001	1.7×10^8	3.5×10^2	6.9×10^6	2.6×10^7
Sa99004	5.3×10^8	< 10	1.8×10^7	2.2×10^7
Sa99026	4.4×10^8	1.9×10^3	2.2×10^7	1.7×10^7
Sa99061	6.8×10^8	2.4×10^2	1.4×10^6	2.8×10^7
Sa99073	3.8×10^8	1.5×10^2	2.5×10^7	1.2×10^7
Food-origin				
Sa9911T	5.6×10^8	2.8×10^7	3.0×10^6	1.8×10^7
Sa9912A	3.7×10^8	8.9×10^5	1.0×10^7	2.5×10^7
Sa9921K	5.0×10^8	2.3×10^6	5.6×10^6	2.2×10^7
Sa9937O	9.4×10^8	7.2×10^6	1.4×10^7	2.7×10^7

*All isolates were incubated in saline at 45°C for 24 h.

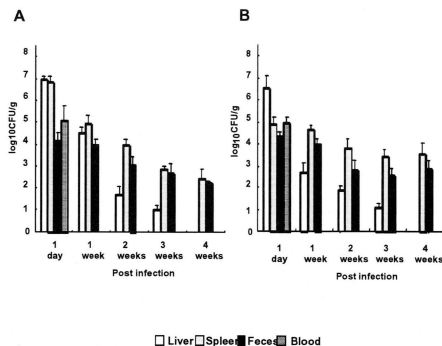


Fig. 3 Comparison of pathogenicity of *S. Oranienburg* in mice. *S. Oranienburg* isolates Sa9911T of food origin (A) and Sa99004 of patient origin (B) were intraperitoneally injected into BALB/c mice and the viable bacteria were counted in liver, spleen, peritoneal blood and feces every week for 4 weeks after infection.

Table 3 Numbers of NaCl-sensitive *S. Oranienburg* recovered from mice

Isolates	Tissue	Numbers of NaCl-sensitive colonies				
		1 day	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Sa9911T	liver	36/50	24/50	10/50	0/21	ND
	spleen	2/50	21/50	24/50	7/50	3/50
	blood	20/50	ND	ND	ND	ND
	feces	13/50	44/50	17/50	15/50	11/14
Sa99004	liver	50/50	50/50	50/50	7/7	ND
	spleen	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50
	blood	50/50	ND	ND	ND	ND
	feces	50/50	50/50	50/50	50/50	50/50

NaCl-sensitivities of a maximum of 50 colonies were examined by dry sensitivity tests.
ND, not detected.

3)。

(4) マウス感染後の分離菌株の食塩感受性：マウス感染後、回収されたサルモネラ50コロニーについて食塩感受性を調べた。食塩耐性食品由来Sa9911T株においては、回収菌の内、4.88%が食塩感受性株に変化していた (Table 3)。反対に、食塩感受性で患者由来株Sa99004を接種した場合は、食塩感受性に関しての変化は認められなかった。

(5) 実験的に作成した乾燥イカからのサルモ

ネラについて：患者由来サルモネラは17%NaCl水中で培養しても耐性株は分離できなかった。しかし、乾燥イカの中で感受性が変わるかどうか不明である。そこで、Sa99004とSa9911T (約 6.6×10^6 cells) がイカと混合し、乾燥イカが作られた。約 4.0×10^6 個のSa9911T株が乾燥イカから分離できたが、Sa99004株では全くサルモネラは分離できなかった (Table 4)。それぞれのBPW懸濁液が蛍光染色され調べた結果、90%以上が生きていた (Fig. 4)。

Table 4 Resuscitation of *S. Oranienburg* cell suspension from VNC state

Enrichment procedures	Recovery of Sa99004 cells from*				MPN values [SD]
	1 ml	100 μ l	10 μ l	1 μ l	
Direct plating	— (0/25)	— (0/25)	— (0/25)	— (0/25)	0
HTB	+ (5/25)	+ (1/25)	— (0/25)	— (0/25)	0-45 [17.76]
Supernatant	+ (23/25)	+ (13/25)	+ (5/25)	— (0/25)	225-550 [187.64]

* One ml and its serial dilutions of the Sa99004 cells contaminated-BPW suspensions with dry-processed squids were used for each experiment as described in Materials and Methods.

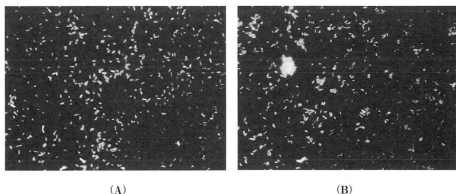


Fig. 4 Fluorescent microscopy assay for viability of *S. Oranienburg* Sa9911T (A) and Sa99004 (B) in BPW suspensions recovered from the experimentally processed dried squids.

(6) VNC状態のサルモネラの蘇生：サルモネラをHTBで増菌後、MPNが計測された。Sa99004株では、1 ml 当たり0-45 (SD=17.76) 個の生菌数であった (Table 4)。第二の増菌法で調べると、1 ml 当たり225-550 (SD=187.64) 個の生菌数であった (Table 4)。直接培地に塗抹すると、全くコロニーは生育しなかった (Table 3)、Sa99004株はVNC状態に入り込んでおり、しかも両増菌方法で蘇生されたことが明らかになった。

考 察

*S. Oranienburg*に汚染された乾燥イカによる集団食中毒事例が1999年に起きた^{31, 34)}。食品及び患者由来株はそれぞれPFGEフィンガープリンティング法で同一と判断されたので、サルモネラに汚染された乾燥イカが原因の食中毒であると結論された。一般に細菌は約0.6程度の低い水分活

性の食品中では増殖が鈍くなると考えられている³⁵⁾。しかしながら*S. Oranienburg*が原材料や最終食品加工品から分離されたので (Table 1)、乾燥イカは加工前もしくは加工中に高度の汚染が起こっていたと考えられた。

MPN法で約10-10³個の*S. Oranienburg*が原因食材1グラム当たり存在していたが、直接培養法では20個程度しか分離できなかった³¹⁾。この食中毒事例では、患者の主症状は敗血症であり、そのためその程度の低い菌数では全身感染が起こりにくいといえる。しかしながら、大量の細菌が乾燥イカに付着し、しかもVNC状態に入り込んでいたら、通常の検出法では分離できないが、感染を起こすであろう。*Salmonella*は事実水溶液中で急速にVNC状態に入り込み^{3, 26, 32)}、実際に乾燥イカ中ではサルモネラの菌数は保存中に徐々に減少していた³¹⁾。このように食品中の汚染病原菌の正確

な数が不明であれば、真の危険性の評価に大きな影響を与えるであろう。

今回の研究では、食品由来のサルモネラは食塩耐性であったが、患者由来株は感受性であった。また、食品由来食塩耐性株はマウス体内通過後には感受性株に変化した、その機構は明らかにできなかった。個の一方的な変化は*in vivo*でのみ起こり、*in vitro*では観察できない現象であった。

我々は以前、enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157 汚染イクラによる事例を報告し²⁴⁾、今回のサルモネラの例と非常に近い結果であった。すなわち、患者由来EHEC O157は食塩感受性であり、イクラ由来株は耐性であった。さらに食塩耐性O157株は*in vivo*で感受性に変化した。これらの結果から、環境中の*Salmonella*やO157のような腸管病原菌のもともとの性質は食塩耐性なのかもしれない。しかし、感染を起こすと、体内の種々の環境変化で感受性株に変わるの

かもしれない。しかしながら、マウス感染実験を行った結果、食塩感受性の変化は毒性に変化を及ぼすことはないと考えられた。

食塩などで誘導される浸透圧の変化や、熱、そして冷凍などの種々のストレス条件下で^{6, 30, 32)}、細菌は自らを守るためにVNC状態に変化する。VNC状態の細菌は、ある種の条件下で蘇生が起こるであろう^{5, 29, 32)}。本研究で、VNC状態のサルモネラの蘇生には増菌過程が必要で、試験管内の方法では二種類の方法を示した。これらの方法がサルモネラの検出に使用されるのみならず、VNC状態の細菌の数を測定するのにも利用可能であろうと考えられた。食塩などの浸透圧による遺伝子レベルでの変化はいくつかの細菌で報告されている^{7, 12, 35)}。将来はサルモネラのVNC状態の遺伝子レベルでの解析が進み、VNCとは何かが明らかになるものと期待される。

Resuscitation and systemic infection of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg in the viable but non-culturable (VNC) state through mice with morphine-treatment

要 約

食品中でviable but non-culturable (VNC) に入り込んだ*S. Oranienburg*の蘇生と病原性についてモルヒネ投与マウスを用いて実験を行った。VNCサルモネラは無処理のマウスでは完全に排除されたが、モルヒネ投与マウスは菌血症になり死亡した。そのためモルヒネ投与マウスはVNCサルモネラの病原性を評価するのに適しているといえるだろう。

序 論

チフス以外のサルモネラは胃腸炎を起こし、食品媒介感染症の原因となる。食品や患者の分や

血液からサルモネラを分離することがサルモネラ症の同定につながり、食品からの分離が重要である。しかしながら病原細菌は簡単にviable but non-culturable (VNC) に入り込む^{6, 8)}。この結果、食品中の本当の生菌数が過少計測され、通常の細菌検査法では食中毒の原因食品の判明を困難にさせる³²⁾。病原菌が患者から分離されても原因食品から分離できないときは、原因菌が食品中でVNCに入っているのかもしれない。すなわちVNC状態の病原菌は人に潜在的に危害をもたらすといえる。

*S. Oranienburg*と*S. Chester*に汚染された乾燥イカによる46都道府県に渡る食中毒が1999年にわが国で発生し、敗血症や胃腸炎を伴う1500人以上

の患者が確認された^{31, 34)}。原因食品は一つの工場で作られ、生イカが製造工程中でサルモネラの汚染が起こったものと想定された。このことから、サルモネラは食塩水の浸潤及び乾燥中に生イカに汚染し、しかも病原性を保持していたと考えられた。実験的にサルモネラ汚染乾燥イカを作成すると、サルモネラはVNC状態に入り込み倍地上に生育できなくなる。多分乾燥イカ中には多くのサルモネラが存在していたと考えられる。しかし、VNC状態のサルモネラの食品中からの回収や病原性を評価することはできない。そこで、モルヒネマウスを用いることによりVNCサルモネラの病原性を評価できることを示した。

材料と方法

(1) 菌株と培地：二株のサルモネラ株を使用した。S. Oranienburg Sa99004株は乾燥イカによる集団感染において、患者から分離された株でありS. enteritidis strain 363は人由来株である²⁰⁾。液体培地は食塩を含まないnutrient broth (NB; Difco Labo., Mich, USA) とbuffered peptone water (BPW, pH 7.2) である。平板培地はDHL agar (Eiken co. Ltd., Tokyo, Japan) である。

(2) 乾燥に対する感受性の試験方法：NBで37℃、20時間培養した菌体を生理食塩水で洗浄後、

同量の生理食塩水に懸濁した。その50μlを450μlの生食を含む48-well microtitre plate (Nalge Nunc International) 内に移した。その後、プレートと蓋をしないで45℃、24時間放置して乾燥させた。その後、滅菌蒸留水500μlを加え、懸濁後、その適当量をDHL及びTSA platesに菌数 (CFU) を計るために塗抹した。

(3) 感染実験とモルヒネ投与方法：6週齢のメスのBALB/cマウスを用いてBhaskaran等の方法に従って実験を行った³³⁾。0.1mlのモルヒネの生理食塩水懸濁液 (体重あたり100mg/kg) を腹腔内に12時間後、14日間接種した。マウスには、約 6.6×10^5 個のS. Oranienburgを腹腔内接種した。肺及び脾臓から菌の回収を行った。

結果

マウスのサルモネラに対する感受性：約 6.6×10^5 個のS. Oranienburg Sa99004株を腹腔内感染してもマウスは少なくとも40日間全く変化がなく生き残っていた (Fig. 3)。そのため、もっと多くのSa99004株を投与するとサルモネラ感染が起きるかもしれないと考え、 3.6×10^9 個のS. Oranienburg strain Sa99004を接種した。また、同様に 6.6×10^4 or 8.1×10^2 個のS. Enteritidis strain 363も同時に接種した。その結果、平均死

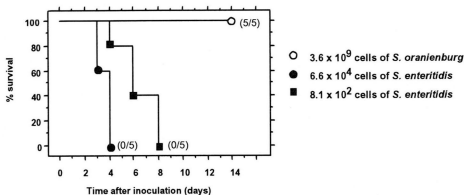


Fig. 5 Survival of BALB/c mice against *Salmonella* infection. Groups of five mice were orally inoculated with S. Enteritidis (closed symbols) and S. Oranienburg (open circle). $P < 0.0001$ for S. Enteritidis vs. S. Oranienburg. Numbers of survivors of five mice in each group are in parenthesis.

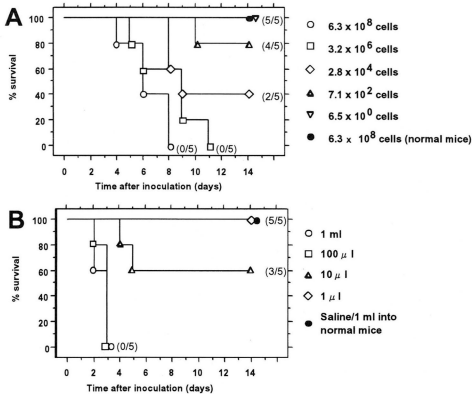


Fig. 6 Survival of morphine-treated BALB/c mice against *S. Oranienburg* infection. (A) Groups of 5 morphine-treated mice were orally inoculated with various numbers of *S. Oranienburg* (open symbols). Normal mice infected with 6.3×10^8 cells of *S. Oranienburg* are shown as a closed circle. $P < 0.0001$ for normal mice vs. morphine-treated mice with 6.3×10^8 cells. $P < 0.001$ for normal mice vs. morphine-treated mice with 3.2×10^6 cells. (B) Groups of 5 morphine-treated mice were orally inoculated with 1 ml ($\circ$), 100 μ l ($\square$), 10 μ l ($\triangle$), and 1 μ l ($\diamond$) of the BPW suspension of VNC cells and saline ($\bullet$). Normal mice ($n=5$) were also intraperitoneally inoculated with 1 ml of the VNC suspension ($\bullet$). No. of survivors in each group are in parenthesis.

亡日数はそれぞれ3.6と6.4日であった (Fig. 5)。反対に、*S. Oranienburg*接種群は全て生き残った (Fig. 5)。以上より *S. Oranienburg* は低頻度では感染するが、正常なマウスには毒力は非常に低く、発症はしないことが明らかとなった。

(2) モルヒネ投与マウスの感受性：モルヒネが細菌感染への感受性を増やすという報告があるので^{3, 22)}、*S. Oranienburg* への感受性も増大させることができると考えた。同様に、VNC *Salmonella* が病原性を保持していることを確かめるのにも使用できるのではないかと考えた。種々の数の Sa99004株 6.3×10^8 と 3.2×10^6 をモルヒネ投与マウスに接種すると、平均日数6.4と7.8日で全てのマウスが死亡した (Fig. 6A)。 2.8×10^4 と 7.1×10^2 個のサルモネラを接種すると、平均に日数8.3と10日で3および1匹のマウスを死亡させたが、65個の

菌数では14日後でも全てが生き残っていた (Fig. 6A)。このことからモルヒネ投与により *S. Oranienburg* への感受性が増すことが明らかになった。サルモネラのすべての血清型がマウスに全身症状を引き起こすわけではないので、モルヒネマウスを用いることにより全身感染を引き起こすことができるようになるといえる。

(3) VNC状態のサルモネラのマウスへの病原性：VNC状態の *S. Oranienburg* の懸濁液を希釈してモルヒネ投与マウスの腹腔内に接種した。1 mlのVNC懸濁液を正常マウスの腹腔内に接種したところ、全てのマウスは生き残った (Fig. 6B, closed circle)。このことは正常マウスはVNCサルモネラの病原性を評価するには不適格であることが言えた。しかしながら、全てのモルヒネマウスは1 ml 及び100 μ lのVNC懸濁液を投与され

ると、それぞれ平均日数2.6と2.8日で死亡し、10 μ l 接種群では二匹のマウスが平均4.5日で死亡した (Fig. 6B)。モルヒネ投与マウスは1 μ lや生食投与では死亡しなかった。以上よりモルヒネ処理マウスは培養可能なサルモネラのみならずVNC状態のものへの感受性も明らかに増加していることを意味している。

2.8×10^4 及び 7.1×10^5 個の新鮮培養S. Oranienburgはモルヒネ投与マウスを4と2匹それぞれ死亡させ (Fig. 6A), 10 μ lのVNC懸濁液は3匹のモルヒネ投与マウスを死亡させた (Fig. 6B)。このことは10 μ l 懸濁液には約 10^4 個以上の病原性を保持しているサルモネラを含んでいると考えられた。

考 察

VNCサルモネラのMPNは225-550 (SD = 187.64) 個の生菌が1 ml中に含まれていると推定された (Table 3)。今回のモルヒネを用いた系では、それよりも約200倍高い数字が出たので、食品から菌体を回収するにはモルヒネ投与マウスが適しているのかもしれない。

VNC状態の細菌は長い間注目されてきたが¹⁰⁾、試験管内での蘇生のみが報告され^{5, 19, 28, 29, 32)}, *in vivo*では検討されてこなかった。本報告でモルヒネ投与マウスでVNCサルモネラの蘇生を報告した。原因と推定される食品から原因菌を分離することは非常に大変なことなので、本方法は有用になるかもしれない。また、全ての病原菌に対して病原性を評価するためのマウスモデル系が確立しているわけではないので、モルヒネを用いた本方法は有用かもしれない。モルヒネ処理は哺乳類のマクロファージの死を誘導するので³¹⁾、モルヒネ投与マウスは細胞内寄生菌に対して特に評価可能な有用な方法であろう。例えば、*L. monocytogenes* はマウスに致死性が低いので、多くの免疫学的研

究に利用されている²¹⁾。

E-cadherin A transgenic miceがリストeriaの病原性評価に利用されたが²⁰⁾、繁殖とかで維持が困難である。モルヒネ投与マウスが病原菌の病原性評価に役立つかもしれない。またVNC細菌が麻薬投与患者へのリスクも上昇するであろう。

文 献

- 1) Aguilera, J. M., and Karel, M. (1997) Preservation of biological materials under desiccation. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 37: 287-309.
- 2) Barcina, L., Lebaron, P., and Vives-Rego, J. (1997) Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. FEMS Microbiol. Ecol. 23: 1-9.
- 3) Bhaskaran, M., Reddy, K., Sharma, S., Singh, J., Radhakrishnan, N., Kapasi, A., and Singhal, P. C. (2001) Morphine-induced degradation of the host defense barrier: role of macrophage injury. J. Infect. Dis. 184: 1524-1531.
- 4) Butzler, J. P., and Oosterom, J. (1991) *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. Int. J. Food. Microbiol. 12: 1-8.
- 5) Cappelletti, J. M., Minet, J., Magras, C., Colwell, R. R., and Federighi, M. (1999) Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5154-5157.
- 6) Caro, A., Got, P., Lesne, J., Binard, S., and Baleux, B. (1999) Viability and virulence of experimentally stressed nonculturable *Salmonella typhimurium*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3229-3232.
- 7) Cheville, A. M., Arnold, K. W., Buchrieser, C., Cheng, C. M., and Kaspar, C. W. (1996) *rpoS* regulation of acid, heat, and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1822-1824.
- 8) Chmielewski, R. A., and Frank, J. F. (1995) Formation of viable but nonculturable *Salmonella* during starvation in chemically defined solutions. Lett. Appl. Microbiol. 20: 380-384.
- 9) Choa, J. C., and Kim, S. J. (1999) Viable, but non-culturable, state of a green fluorescence protein-tagged environmental isolate of *Salmonella typhi* in groundwater and pond water. FEMS Microbiol. Lett. 170: 257-264.
- 10) Colwell, R. R. (2000) Viable but non-culturable bacteria:

- a survival strategy. J. Infect. Chemother. 6: 121-125.
- 11) Colwell, R.R., Brayton, P. R., Grimes, D. J., Roszak, D. B., Huq, S. A., and Palmer, L. M. (1985) Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: Implications for release of genetically engineered microorganisms. Bio/Technol. 3: 817-820.
 - 12) Csonka, L. N. (1989) Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. Microbiol. Rev. 53: 121-147.
 - 13) D'Aoust, J. Y., Sewell, A. M., and Greco, P. (1994) Detection of *Salmonella* in dry foods using refrigerated pre-enrichment and enrichment broth cultures: summary of collaborative study. J. AOAC Int. 77: 1490-1491.
 - 14) Gautom, R. K. (1997) Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. J. Clin. Microbiol. 35: 2977-2980.
 - 15) Glass, K. A., Loeffelholz, J. M., Ford, J. P., and Doyle, M. P. (1992) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2513-2516.
 - 16) Guraya, R., Frank, J. F., and Hassan, A. N. (1998) Effectiveness of salt, pH, and diacetyl as inhibitors for *Escherichia coli* O157:H7 in dairy foods stored at refrigeration temperatures. J. Food Prot. 61: 1098-1102.
 - 17) Kim, Y. R., Czajka, J., and Batt, C. A. (2000) Development of a fluorogenic probe-based PCR assay for detection of *Bacillus cereus* in nonfat dry milk. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1453-1459.
 - 18) Kunene, N. F., Hastings, J. W., and von Holy A. (1999) Bacterial populations associated with a sorghum-based fermented weaning cereal. Int. J. Food Microbiol. 49: 75-83.
 - 19) Kurokawa, M., Nukina, M., Nakanishi, H., Tomita, S., Tamura, T., and Shimoyama, T. (2000) Resuscitation from the viable but nonculturable state of *Helicobacter pylori*. Kansenshogaku Zasshi. 73: 15-19.
 - 20) Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C., and Cossart, P. (2000) A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. Science. 292: 1772-1775.
 - 21) Levine, W. C., Buehler, J. W., Bean, N. H., and Tauxe, R. V. (1991) Epidemiology of nontyphoidal *Salmonella* bacteremia during the human immunodeficiency virus epidemic. J. Infect. Dis. 164: 81-87.
 - 22) MacFarlane, A. S., Peng, X., Meissler, J. J. Jr., Rogers, T. J., Geller, E. B., Adler, M. W., and Eisenstein, T. K. (2000) Morphine increases susceptibility to oral *Salmonella typhimurium* infection. J. Infect. Dis. 181: 1350-1358.
 - 23) Makino, S., Chongsanguam, M., Kurazono, H., Hayashi, H., Chun, H., Suzuki, S., and Shirahata, T. (1999) Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. J. Vet. Med. Sci. 61: 1245-1247.
 - 24) Makino, S., Kii, T., Asakura, H., Shirahata, T., Ikeda, T., Takeshi, K., and Itoh, K. (2000) Does enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 enter the VNC state in salmon roe? Appl. Environ. Microbiol. 66: 5536-5539.
 - 25) Masuda, S., Hara-Kudo, Y., and Kumagai, S. (1998) Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in soy sauce, a fermented seasoning. J. Food Prot. 61: 657-661.
 - 26) Mattick, K. L., Jorgensen, F., Legan, J. D., Cole, M. B., Porter, J., Lappin-Scott, H. M., and Humphrey, T. J. (2000) Survival and filamentation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 at low water activity. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1274-1279.
 - 27) Norton, D. M., McCamey, M. A., Gall, K. L., Scarlett, J. M., Boor, K. J., and Wiedmann, M. (2001) Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. Appl. Environ. Microbiol. 67: 198-205.
 - 28) Oliver, J. D., and Bockian, R. (1995) *In vivo* resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2620-2623.
 - 29) Reissbrodt, H., Heier, H., Tschäpe, Kingsley, R. A., and Williams, P. H. (2000) Resuscitation by ferrioxamine E of stressed *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from soil and water microcosms. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4128-4130.
 - 30) Rollins, D. M., and Colwell, R. R. (1986) Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. Appl. Environ. Microbiol. 52: 531-538.
 - 31) Saito, A., Otsuka, K., Hamada, Y., Ono, K., and Masaki, H. (2000) Effects of Temperature, pH and sodium chloride concentration on the growth of *Salmonella* Oranienburg and *Salmonella* Chester isolated from dried squid and behaviors of those strains in the dried squid. Jpn. J. Food. Microbiol. 17: 11-17.
 - 32) Santo Domingo J. W., Harmon, S., and Bennett, J. (2000) Survival of *Salmonella* species in river water. Curr.

- Microbiol. 40: 409-417.
- 33) Tilden, J. Jr., Young, W., McNamara, A. M., Custer, C., Boesel, B., Lambert-Fair, M. A., Majkowski, J., Vugia, D., Werner, S. B., Hollingsworth, J., and Morris, J. G. Jr. (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. Am. J. Public Health 86: 1142-1145.
- 34) Tsuji, H., and Hamada, K. (1999) Outbreak of salmonellosis caused by ingestion of cuttlefish chips contaminated by both *Salmonella* Chester and *Salmonella* Oranienburg. Jpn. J. Infect. Dis. 52: 138-139.
- 35) Wood, J. M. (1999) Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 230-262.

Studies on the recovering and the risk of VNC (viable but non-culturable) *Salmonella*

Sou-ichi Makino

(Research Center for Animal Hygiene and Food Safety Obihiro University
of Agriculture and Veterinary Medicine)

A diffuse outbreak of food poisoning due to *Salmonella* Oranienburg (SO) and *S. Chester*, caused by the intake of contaminated dry-processed squids, occurred in Japan during 1999. All the implicated foods were manufactured by the same company and which were created through the processes containing soaking in liquid seasoning with high concentrations of NaCl prior to dehydration. The preservation of foods by these concentrated NaCl followed by desiccation is widely viewed as an effective means of preventing food-borne infections. Nevertheless, the pathogen was detected from the causative foods, which led to hypothesize that SO could undergo soaking in concentrated NaCl and subsequent drying, but still survive and retain its pathogenicity for humans.

SO isolates from both the causative foods and patients in the outbreak, showed identical PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) patterns, however, the isolates obtained from foods showed resistance to NaCl osmotic stress, while isolates of patients-origin were sensitive to NaCl. In addition, representative isolates of both sources were almost identical in their virulence for mice, but a NaCl resistant cells of food-origin changed the phenotype following passage through mice, becoming NaCl-sensitive. In contrast, no phenotypical change was observed in patient-originating isolate. The SO cells of patient isolate formed no colonies by direct plating after 24h of incubation in 7% NaCl solutions, but which resuscitated by appropriate enrichment. Moreover, the non-culturable cells of patient isolate seemed to be viable by epifluorescent microscopy assay, suggesting that the significant loss of culturability in patient isolate by exposure to NaCl solutions might mean the entry into the viable but non-culturable (VNC) state. When the VNC cells originating from patient were injected into mice treated with morphine, all the infected mice died within 3days after infection and SO cells were recovered from their organs. The *in vitro*/*vivo* assays seemed to be useful methods inducing the resuscitation from the VNC state in *Salmonella* and might be effective for other pathogenic bacteria.

Based on the present study, it was demonstrated that *Salmonella*, recognized as the most major food-borne, zoonotic bacterial pathogen, maintained the survival in environment containing several stress factors for this organism. This study announces the importance of

latent viability and pathogenicity of *Salmonella* in human infection and partially elucidate genetical relationship with the phenotypic change. Finally, the existence of VNC *Salmonella* leads to consider the necessity of new diagnostic tools instead of general culturing methods, which would be an important theme in the future. The present study would contribute to such a detection and evaluation of pathogenicity of the VNC *Salmonella*.