

と、種々のストレスに対する抵抗性が強くなることが示されており、大腸菌では広くストレスタンパクを誘導する RNA ポリメラーゼである σS が活性化されることが知られている (Hengge-Aronis1999)。しかし、腸炎ビブリオの低浸透圧ストレスに対する抵抗性について、増殖時期による影響の有無については不明である。そこで本実験では、増殖時期と低浸透圧による死滅との関係を究明した。

B. 研究方法

共試菌株

表 1・1 に示した菌株のうち、実験 2・1 には Vp15 を、実験 2・2、2・3 には Vp9、15、42、112 を用いた。

低浸透圧での死滅とイオン

10ml の滅菌水に、滅菌した $145\mu l$ の 3%NaCl 溶液、3%NaCl 溶液と浸透圧が等しく 1 Osm である 3.7%KCl 溶液、6.7%MgCl₂·6H₂O 溶液、または 4.9%CaCl₂·2H₂O 溶液をそれぞれ $145\mu l$ 加えた溶液 (それぞれ 14mOsm) を準備した。供試菌株を食塩ポリミキシンブイオン (日水製薬) で 37°C、一晚培養した後に、食塩加ブイオン (1%BactoOR peptone (Difco USA)、0.3%酵母エキス、2%NaCl) に継代し 37°C で 1 晩培養し、室温で 15 分間遠心 (3000rpm) し、集菌した。菌体を 3%NaCl 溶液 10ml に懸濁し、菌数を計測し初期菌数とした。あらかじめ調整した溶液それぞれに $200\mu l$ ずつ菌懸濁液を入れて混和し (混和後の浸透圧: 33mOsm)、1 時間後、2 時間後に菌数を計測した。

低浸透圧と低食塩濃度の死滅に及ぼす影響

食塩ポリミキシンブイオン (日水製薬) で 37°C、一晚培養した後に、食塩加ブイオンに継代し、37°C で 24 時間培養した定常期の菌を、室温で 15 分間遠心 (3000rpm) することによって集菌し、1M ショ糖加リン酸緩衝液 (pH7.4) または 3%食塩加リン酸緩衝液に懸濁した。この菌懸濁液の菌数を計測し、その菌数から下記のように希釈した後の菌数を求め、初期菌数とした。

この菌懸濁液を図 2・1 に従い、1M ショ糖加リン酸緩衝液の菌懸濁液を

1M ショ糖加リン酸緩衝液で希釈することによって、食塩濃度 0%で、ショ糖によって 1Osm に調整された菌液を用意した。3%食塩加リン酸緩衝液の菌懸濁液を、1M ショ糖加リン酸緩衝液で希釈することによって、ショ糖を含み浸透圧が 1Osm に調整された菌液を、また、リン酸緩衝液で希釈することによって得られた、食塩濃度 0.01~0.3%の浸透圧 0.004Osm~0.1Osm の菌液を、または、3%食塩加リン酸緩衝液で希釈することによって、食塩濃度 3%でショ糖を含まない菌液をそれぞれ調整した。

それぞれの条件に調整された菌液の 1 時間、24 時間後の生存菌数を測定し、菌数の変化を調べた。

増殖時期と低浸透圧での死滅

食塩ポリミキシンブイオン（日水製薬）で 37℃一晩培養した後に、食塩加ブイオンに継代し、37℃で 3 時間培養した対数増殖期の菌、6 時間培養した定常期初期の菌、24 時間培養した定常期の菌の菌数をそれぞれ計測し、初期菌数とした。これらを、室温で 15 分遠心（3000rpm）、集菌し、0.1%食塩加リン酸緩衝液に懸濁することによって菌を洗浄し、菌数を計測した後、再度室温で 15 分遠心（3000rpm）、集菌し、0.1%食塩加リン酸緩衝液に懸濁した。懸濁し終わった時点を 0 分とし、生存菌数を 0 分、30 分、60 分、120 分、24 時間後に計測した。

菌数の計測

1%食塩加普通寒天培地上に、1%食塩加 PBS で 10 倍階段希釈した菌液 50 μ l を塗抹し、37℃一晩培養後、発育したコロニー数を計測した。菌数は、菌液 1ml 中の菌数を対数で表示した。検出限界は 20CFU/ml である。

C. 研究結果

低浸透圧での死滅とイオン

同じ浸透圧でも、NaCl のみより、MgCl₂、CaCl₂を加えた場合の方が 1 時間後の生存菌数が多かった（図 2・2）。KCl を加えた場合は、NaCl のみの場合と変わらなかった。図には示さないが 2 時間後の生存菌数も同様であった。

低浸透圧と低食塩濃度の死滅に及ぼす影響

Vp15 については 2 回の実験結果の平均を示している (図 2・3)。シヨ糖による浸透圧調整を行わなかった食塩濃度 0.1%以下の菌液では、1 時間以内に菌数が検出限界未満 (20CFU/ml) まで減少するのに対して、シヨ糖により浸透圧が 1Osm に保たれていた場合は、食塩濃度が 0%でも検出限界未満になるまでの菌の急速な死滅は認められず緩やかに菌が減少し、24 時間後にも 10³ CFU/ml 生残することが認められた。また、浸透圧がシヨ糖により 1Osm に保たれていた食塩濃度 0.01~0.3%の菌液では、1 時間および 24 時間で減少する菌数に関して、食塩濃度の相違による差異は認められなかった。

また、Vp9, Vp42, Vp112 では各 1 回ずつ行った平均を図示したが (図 2・4)、同様の結果が得られた。ただし、シヨ糖存在下においても食塩濃度が低いほうが、24 時間後の菌数が減少しやすい傾向が認められた。

増殖時期と低浸透圧での死滅

Vp15 については 2 回の実験結果の平均を図示している (図 2・5)。3 時間培養した対数増殖期の菌は、洗浄過程の短時間、低浸透圧にさらされただけで、生存菌数が 10² CFU/ml まで減少し、24 時間後には検出限界まで減少した。一方、6 時間培養した定常期初期、24 時間培養した定常期の菌は、1 時間後には 10⁶~10⁷ CFU/ml まで減少しただけで、24 時間後にも 10⁴~10⁵ CFU/ml が生存していた。

また、Vp9, Vp42, Vp112 でも同様の傾向がみられた。図 2・6 には 3 株について各一回測定を行った結果の平均を図示した。

D. 考察

低食塩濃度と低浸透圧の死滅に及ぼす影響を調べた結果 (図 2・3, 4) から、真水で洗浄した際に腸炎ビブリオが急速に死滅するのは、食塩濃度が低いためではなく、低浸透圧にさらされたためであり、浸透圧が海水程度であれば低食塩濃度でも 1 時間は腸炎ビブリオが生残できることが明らかとなった。したがって、海産物の洗浄を行う際には、食塩濃度を低くしただけでは腸炎ビブリオが生残する可能性がある。また、腸炎ビブリオによる他の食材への 2 次汚

染の危険性も強く示唆される。野菜等の食材からはタンパクや糖が溶出し、付着している水の浸透圧が上昇することが起こり得る。本研究の成果から、浸透圧がある程度以上高い場所に腸炎ビブリオが付着した場合、菌は急速には死滅せず生残するため、その後の調理によって増穂に適当な塩分・温度環境に置かれた場合に増殖が起こり、食中毒原因食品となり得ると考えられる。夏季には調理場の温度が腸炎ビブリオの増殖に適した 20℃以上となり、海産物の取り扱いとともに、同じ調理場で取り扱われる食材・器具への汚染防止を心がける必要がある。また、1 時間程度の時間では、浸透圧が同じく 10sm であれば NaCl とショ糖の間に生存菌数の差が見られないが、24 時間では大きな差がみられることから、腸炎ビブリオが生存、増殖に NaCl を必要とする理由は、海水の浸透圧を調節する溶質としてではなく、正常な菌の代謝を行い、生存を維持することに必要とされる他の機構によるものと考えられる。

低浸透圧での死滅とイオンの関係を調べた結果 (図 2・2)、同じ低浸透圧下での死滅は、NaCl のみよりも、Mg²⁺、Ca²⁺も存在する場合の方が死滅し難いことが示された。この結果は、食塩以外の微量元素が含まれる海洋中や食品中では食塩のみの存在下でよりも、低浸透圧抵抗性が高くなることを示唆している。*Vibrio cholerae* では Mg²⁺の存在により、細胞外膜の構造が強固になり、低浸透圧に対して抵抗性が高くなるという報告がある (Lohia et al・1985)。また、腸炎ビブリオでは Mg²⁺がタンパク分泌を亢進することが報告されている (Bhattacharya et al・2000)。本実験からも、Mg²⁺、Ca²⁺は溶質としての浸透圧調節以外に、低浸透圧の死滅抑制に働く機構に関与すると考えられる。

増殖時期と、低浸透圧での死滅の関係を検討した結果、対数増殖期の菌に比べ、定常期初期および定常期の菌は低透圧ストレスに対して抵抗性が高く、死滅し難かった (図 2・5, 6)。細菌が定常期になり、 σS が誘導されてそれに続く一連の広範なストレス防御機構が発現するのは、培養液中の栄養素を消費し飢餓ストレスがかかることが引き金のひとつであると考えられている (Hengge-Aronis 1999)。腸炎ビブリオでは、飢餓状態の菌は熱、低滲透圧、H₂O₂に対して抵抗性が強いことが報告されている (Koga&Takumi 1995a)。したがって、本実験で定常期の菌が低浸透圧に対して抵抗性が強い一因として、定常期の菌が飢餓状態のストレスによって誘導された諸因子によるものが考えられる。

参考文献

Bhattacharya M., Roy S. S., Biswas D., Kumar R. 2000. Effect of Mg²⁺ ion in protein secretion by magnesium-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the coastal water of Haldia port. FEMS Microbiol. Lett. 185:151-156

Hengge-Aronis R. 1999. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. Curr. Opin. Microbiol. 2:148-52

Koga T., Takumi K. 1995a. Nutrient starvation induces cross protection against heat, osmotic, or H₂O₂ challenge in *Vibrio parahaemolyticus*. Microbiol. Immun 39:213-215

Koga T., Sakamoto F., Yamamoto A., Takumi K. 1999. Acid adaptation induces cross-protection Against some environmental stresses in *Vibrio parahaemolyticus*. J. Gen. Appl. Microbiol. 45:155-161

Lohia A., Majumbar S, Chatterjee A. N., Das J. 1995. Effect of changes in the osmolarity of the growth medium on *Vibrio cholerae* cells. J. Bacteriol. 163:1158-1166

24時間、37°C培養

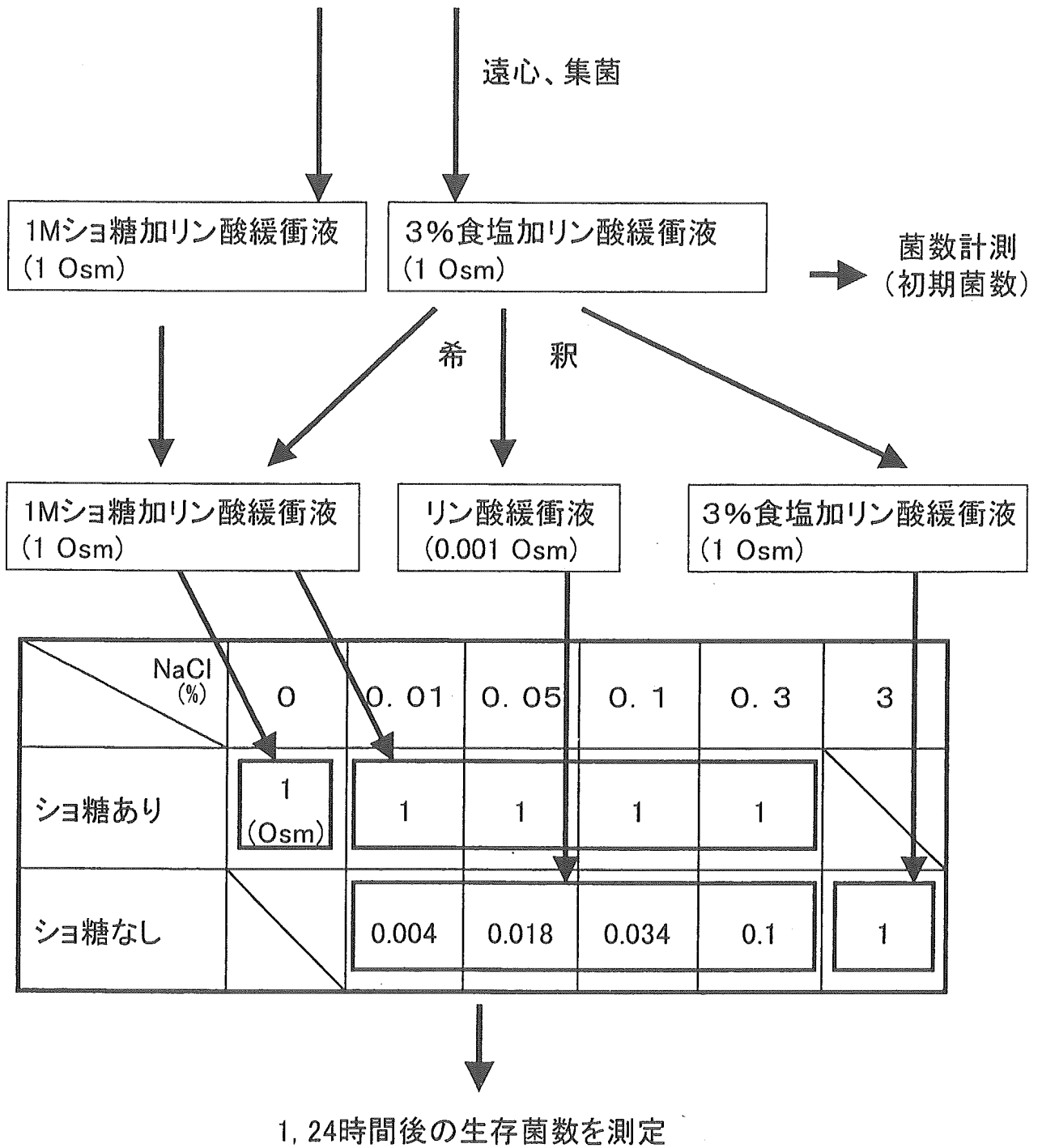


図2-1: 低浸透圧と低食塩濃度の影響の検討

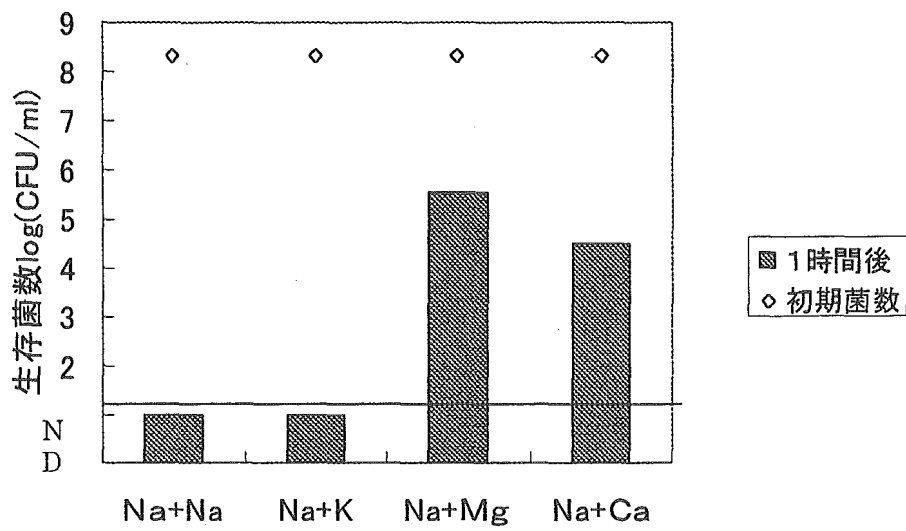
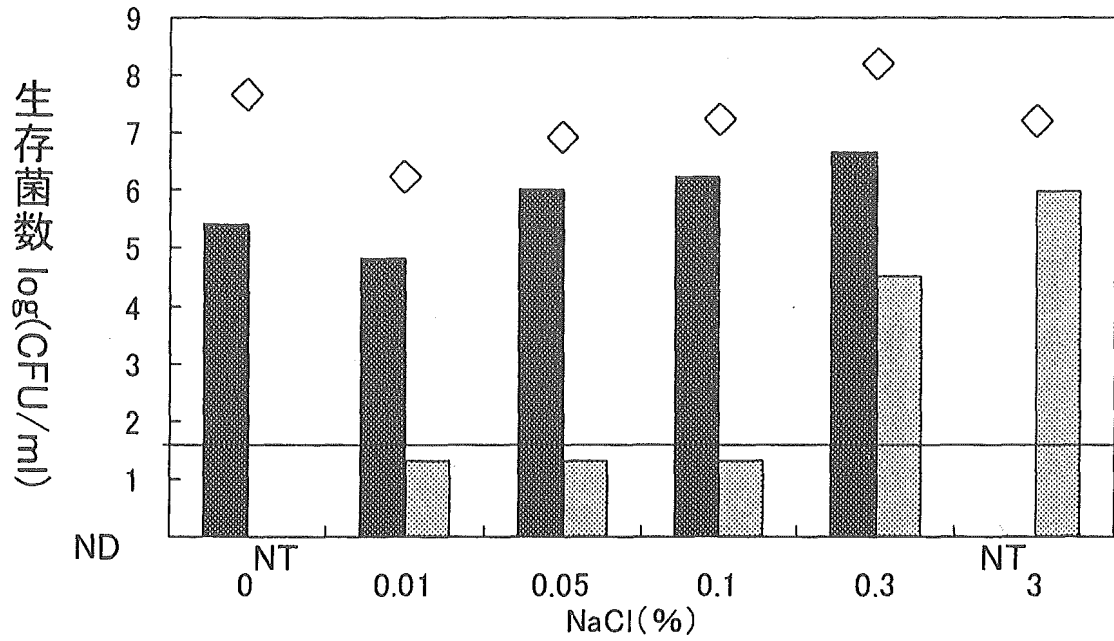


図2-2 低浸透圧での死滅とイオン
 低浸透圧下での1時間後の生存菌数
 ND: not detected-level

(A) 1時間後



(B) 24時間後

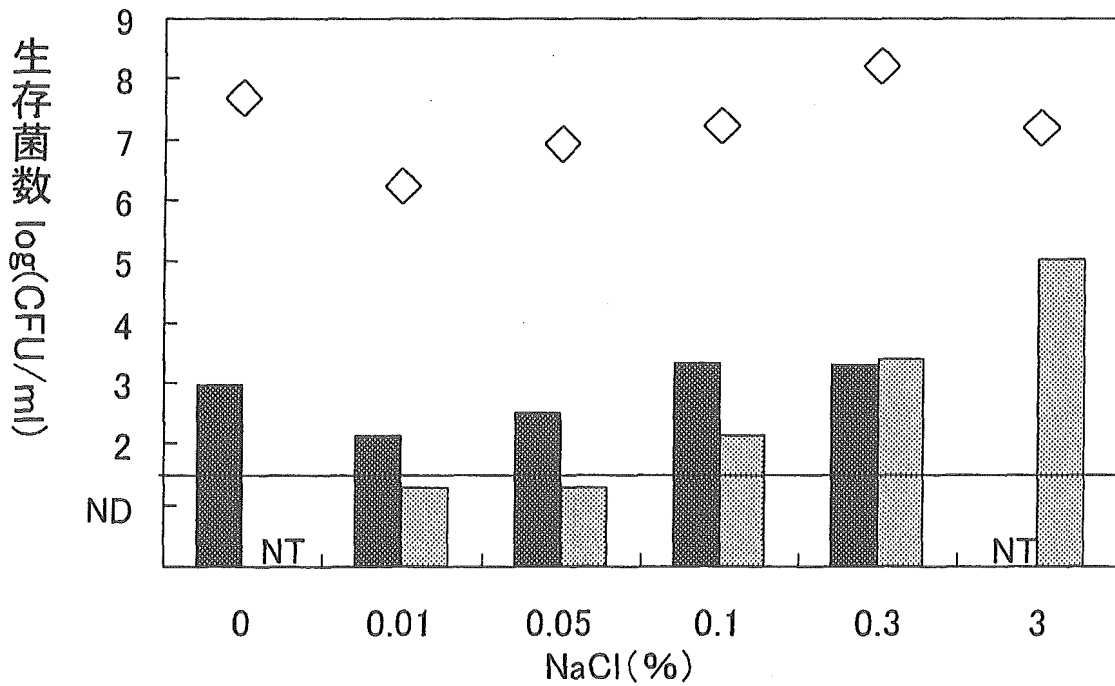


図2-3 低浸透圧と低食塩濃度の死滅に及ぼす影響

■ ショ糖あり □ ショ糖なし ◇ 初期菌数

Vp15 2回の平均 (A)1時間後の生存菌数 (B)24時間後の生存菌数

NT: not tested ND: not detected-level

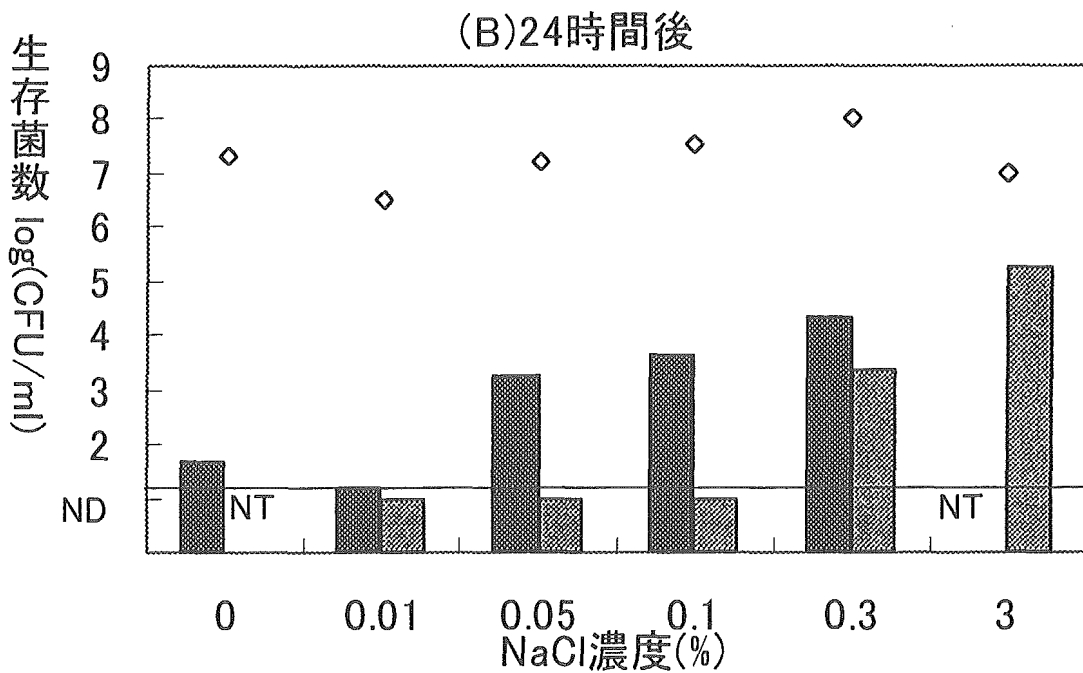
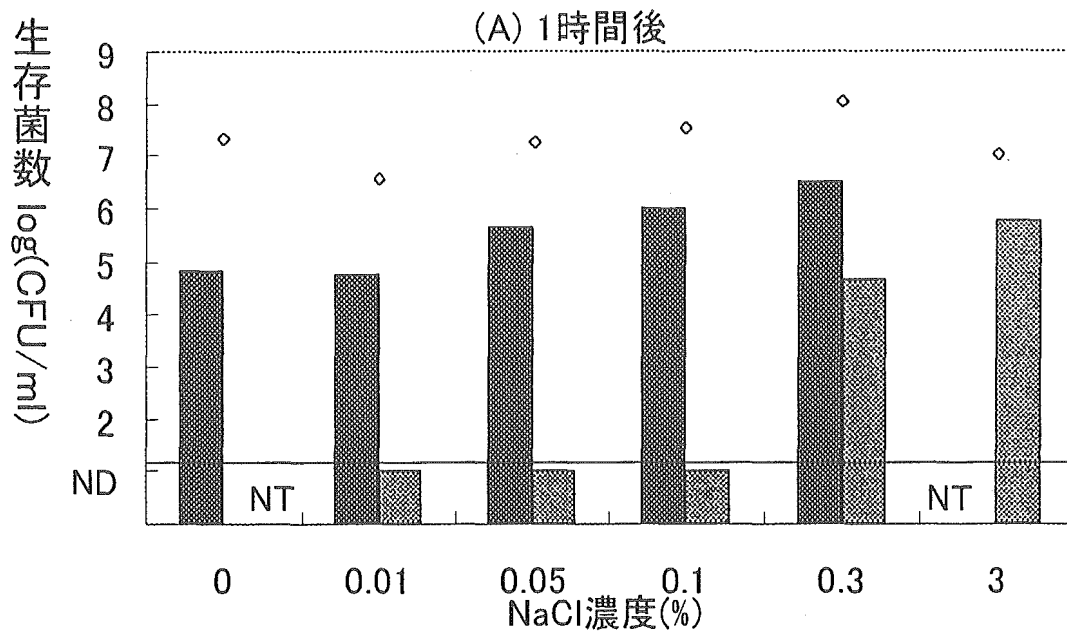


図2-4 低浸透圧と低食塩濃度の死滅に及ぼす影響

■ シヨ糖あり ■ シヨ糖なし ◇ 初期菌数

Vp9,42,112の平均 (A)1時間後の生存菌数 (B)24時間後の生存菌数

NT: not tested ND: not detect-level

Vp15

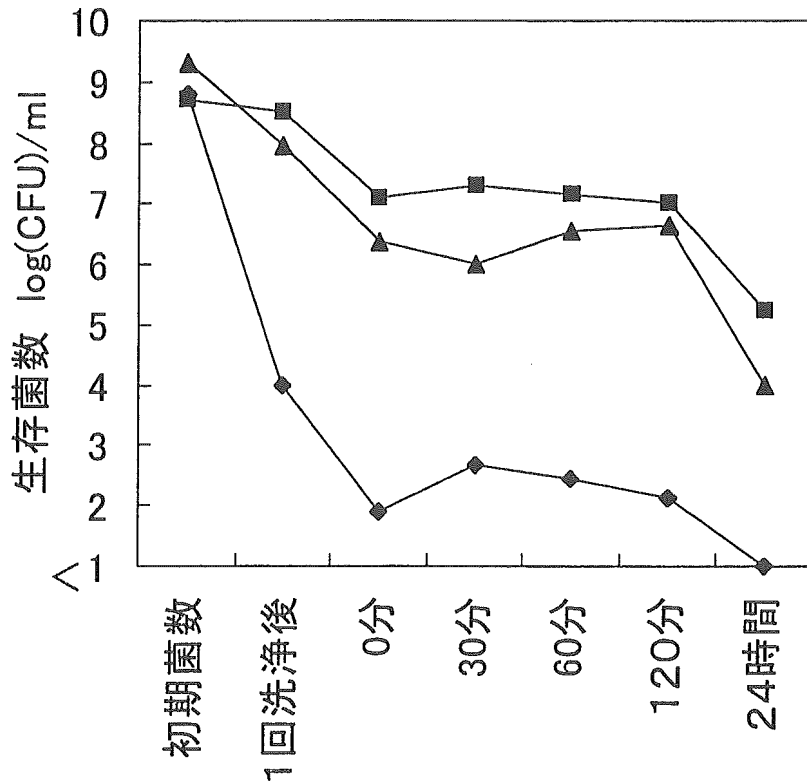


図2-5 増殖時期と低浸透圧での死滅

3時間培養(◆)、6時間培養(■)、24時間培養(▲)した菌の、0.1%食塩加リン酸緩衝液中での死滅を調べた。Vp15を用い、2回測定した結果の平均を図示している。

3株の平均

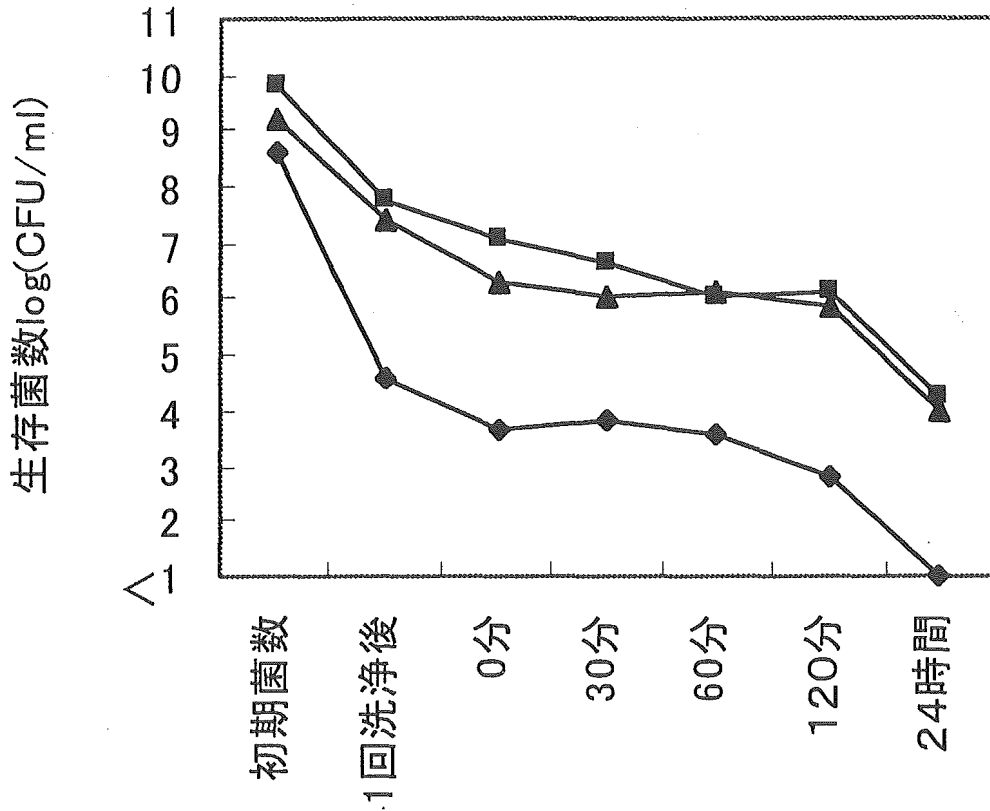


図2-6 増殖時期と低浸透圧での死滅

3時間培養(◆)、6時間培養(■)、24時間培養(▲)した菌の、0.1%食塩加リン酸緩衝液中での死滅を調べた。Vp9, 42, 112を用い、各1回測定した平均を図示している。

分担研究報告
腸炎ビブリオの低浸透圧耐性獲得に関する研究

熊谷 進（東京大学）

要旨

腸炎ビブリオは低張食塩水に曝露されることによって、より低い低浸透圧環境に対する耐性を獲得することが認められた。酸への曝露では低浸透圧に対する交叉耐性は確認されず、むしろ酸に曝露した後に低浸透圧に曝露した場合に死滅しやすい傾向があった。しかし、低浸透圧に曝露した菌は酸に対して耐性を獲得することが示された。ショ糖で浸透圧を海水程度（10sm）に保ち NaCl 濃度を低い条件に暴露した場合に、低浸透圧に対する耐性を獲得し得なかったことから、食塩濃度の低下自体は低浸透圧耐性を付与しないことが示された。すなわち、菌が死滅しない程度の低張食塩水による低浸透圧耐性の獲得は、食塩濃度が低いことによるのではなく、低浸透圧の結果獲得されるものであることが判明した。

A. 研究目的

腸炎ビブリオは、飢餓状態や酸などのストレスに曝されている間にそれらのストレスに順応し、より強いストレスに対して抵抗性を獲得することが知られている（Wong et al・1998, Koga et al・1995a, Koga et al. 1999）。食中毒細菌が環境ストレスに対して抵抗性を獲得した場合、通常の培養条件で増殖した細菌を用いて実験的に見出した方法によって殺菌することができない危険性がある。食中毒細菌を制御し、食中毒予防を図るためには、菌の性質としての耐性獲得条件を把握する必要がある。汽水域や海産物を真水で洗浄したことを想定した低食塩濃度の溶液は、腸炎ビブリオに対して、低浸透圧、低食塩濃度の 2 つのストレス要素を持っている。しかし、腸炎ビブリオを含め、病原細菌においては、これら要因による耐性獲得についてはこれまで報告が見られない。海水が希釈されて低浸透圧にさらされた場合の耐性獲得についてより詳しく検討するため、低浸透圧および低食塩濃度への曝露によって、より強いそれら要因のストレスに対して耐性を獲得するか否かについて検討を加えた。

また、腸炎ビブリオについて酸耐性の獲得に関しては、酸への曝露が熱、胆汁、クリスタルバイオレット、低食塩濃度等のストレスに対して交叉耐性があることが報告されており (Wong et al・1998, Koga et al・1999)、また、培養液中の食塩濃度を低くして低食塩濃度ストレスを与えた場合に、酸耐性を獲得することが報告されている (Koga et al・1999)。主としてサルモネラや大腸菌については酸耐性獲得の機構に関する知見が得られており、ストレスによって誘導される因子からカスケード状に様々なタンパクが誘導または抑制され、誘導されたタンパクが他の種類のストレスに対抗する反応を誘導することによって交叉耐性を付与することが認められている (Pichereau et al. 2000, Ramos et al・2001, Arnold et al. 2001)。様々なストレスのうち、酸ストレスを代表として用いて、低浸透圧耐性と酸耐性に共通の機構があるかどうか知るために、交叉耐性の有無を調べた。

B. 研究方法

共試菌株

表 1・1 に示した菌株のうち、実験 3・1 にはすべての菌株を使用した。ただし定常期の菌としては Vp15 のみを用いた。実験 3・2 には Vp9, 15, 21, 42 を用い、実験 3・3 にはすべての菌株を、実験 3・4 には Vp9, 15, 42, 112, 316 を用いた。実験 3・5 では、Vp9, 15, 21, 42, 316 を用いた。

低張食塩水による低張食塩水耐性の獲得 (図 3 1)

食塩ポリミキシンブイオン (日水製薬) で 37℃ 一晚培養した後に、食塩加ブイオン (1% Bacto_Rpeptone (Difco USA)、0.3% 酵母エキス、2% NaCl) に継代し、37℃ で 2.5 時間培養した対数増殖期の菌を、室温で 15 分間遠心 (3000rpm) し集菌した後、3% 食塩加リン酸緩衝液 pH7.4) に懸濁した。その菌懸濁液を 3% 食塩加リン酸緩衝液またはリン酸緩衝液で希釈し、食塩濃度を 0.4、0.5 または 3% に調製し、室温で 30 分間放置した。希釈後の初期菌数を求めるためこの菌懸濁液を一部採取し、直ちに菌懸濁液をリン酸緩衝液で希釈して食塩濃度を 0.3% に調整した。調整し終わった時点を 0 分とし、0 分および 30 分後の菌数を計測した。

24 時間培養した定常期の菌については、対数増殖期の菌よりも、浸透圧に対

する抵抗性が強いため、低浸透圧の条件を厳しく設定し、0.3、0.5または3%食塩加リン酸緩衝液に調整した後、食塩濃度を0.1%に希釈して、生存菌数を測定した。

低食塩濃度・低浸透圧による耐性の獲得(図3.2)

食塩ポリミキシブイオン（日水製薬）で37℃一晩培養した後、食塩加ブイオンに継代し、37℃で2.5時間培養した対数増殖期の菌を、室温で15分間遠心（3000rpm）し、集菌した後、3%食塩加リン酸緩衝液または1Mショ糖加リン酸緩衝液に懸濁し、それらを3%食塩加リン酸緩衝液、1Mショ糖加リン酸緩衝液またはリン酸緩衝液で希釈することによって3%NaCl、0.5%NaCl、NaClを0.5%含むショ糖液（10sm）または270mOsmショ糖（0.8%NaCl相当）に菌液を調整し、15分間室温に放置した。これらの菌液を、室温で15分間遠心（3000rpm）し集菌した。初期菌数を測定するために、遠心したものうち1本は再度懸濁し、菌液の一部を採取し菌数を測定した。集菌した菌体を0.3%食塩加リン酸緩衝液、または0.3%NaCl相当である100mOsmショ糖加リン酸緩衝液に懸濁し、0分、80分後の生存菌数を計測した。

酸による酸耐性の獲得(図3.3)

食塩ポリミキシブイオン（日水製薬）で37℃一晩培養した後、食塩加ブイオンに継代し、37℃で2.5時間培養した対数増殖期の菌を、室温で15分間遠心（3000rpm）し集菌した後、食塩加ブイオン pH6.5) 10ml または 2N塩酸でpHを5に調整した食塩加ブイオン10mlを加え、懸濁した。30分間室温で放置した後、室温で15分間遠心（3000rpm）、集菌し、2N塩酸でpHを4、3.8または3.6に調整した食塩加ブイオン10mlを加え懸濁した。懸濁した時点を0分とし、0分、60分後に菌懸濁液の菌数を計測した。

3.4 酸による低浸透圧耐性の獲得(図3.4)

食塩ポリミキシブイオン（日水製薬）で37℃一晩培養した後、食塩加ブイオンに継代し、37℃で2.5時間培養した対数増殖期の菌を、室温で15分間遠心（3000rpm）し集菌した後、食塩加ブイオン（pH6.5）10ml または 2N塩酸でpHを5に調整した食塩加ブイオン10mlを加え懸濁した。30分間室温で放置した後、室温で15分間遠心（3000rpm）、集菌し、1%食塩加リン酸緩

衝液に懸濁した。その菌懸濁液の一部を、初期菌数の計測のために採取した後、リン酸緩衝液で希釈し、食塩濃度を 0.16%、0.18%、0.20%、0.22% または 0.24% に調整した。調整した時点をも 0 分とし、0 分、30 分後に菌数を計測した。

3.5 低浸透圧による酸耐性の獲得(図 3.5)

食塩ポリミキシンブイヨン（日水製薬）で 37℃ 一晚培養した後に、食塩加ブイヨンに継代し、37℃ で 2.5 時間培養した対数増殖期の菌を、室温で 15 分間遠心（3000rpm）し集菌した後、3% 食塩加リン酸緩衝液に懸濁し、3% 食塩加リン酸緩衝液またはリン酸緩衝液で希釈し、食塩濃度を 0.4、0.5 または 3% に調整し、室温で 30 分間放置した。初期菌数の計測のため一部を採取した後、50 μ l の菌液を 2N 塩酸で pH3.6、3.8 または 4.0 に調整した食塩加ブイヨン 450 μ l に懸濁した。懸濁した時点をも 0 分とし、30 分、60 分、120 分後に菌数を計測した。

生存菌数の計測

1% 食塩加普通寒天培地を用いて計測を行った。

統計的分析

StatView_R(SAS Institute Inc.) を用い、Fisher の PLSD によって、有意差検定を行った。

C. 研究結果

低張食塩水による低張食塩水耐性の獲得

対数増殖期の菌について、Vp15 については 2 回の実験結果の平均を、他の 5 株では各菌株 1 回の測定値の平均を図示した（図 3.6）。Vp15 では、0.4% または 0.5% 食塩水中に懸濁し 30 分間放置してから食塩濃度を 0.3% に調整した場合、調整直後の 0 分および 30 分後に菌数はわずかしかなかった。一方、対照として 3% 食塩水中に懸濁し 30 分間放置してから食塩濃度を 0.3% に調整した場合、30 分間で 4 桁以上菌数が減少した（図 3.6, A）。他の菌株でも、0.4% または 0.5% 食塩水で条件付けたものは 3% 食塩水で条件付

けたものに比べ、0 分および 30 分後までに死滅した菌数が有意に少なかった（図 3・6, B）。これらの成績は低張食塩水のストレスにより低張食塩水耐性が獲得されたことを示している。

定常期の菌については、Vp15 について 3 回測定した結果の平均を図示している（図 3・7）。定常期の菌においても対数増殖期と同様に耐性獲得が認められた。しかし、対数増殖期ほど顕著ではなかった。

低食塩濃度・低浸透圧による耐性獲得の検討

図 3・8 には VP15 について 5 回行った測定結果の平均を示した。0.3%NaCl で菌を死滅させた場合、3%NaCl での条件付けと比較して、0.5%NaCl での条件付けの方が、0 分後および 30 分後までに死滅した菌が有意に少なく、耐性の獲得が認められた。ショ糖を加え 10sm に浸透圧を調整した 0.5%NaCl での条件付けでは、3%NaCl での条件付けと比較して耐性の獲得は認められず、むしろ菌が死滅しやすい傾向が見られた。ショ糖 270mOsm (0.8%NaCl 相当) での条件付けでも、3%NaCl での条件付けと比較して耐性の獲得は認められず、むしろ菌が死滅しやすい傾向が認められた。（図 3・8, A）

ショ糖 100mOsm (0.3%NaCl 相当) で菌を死滅させた場合にも 0.3%NaCl で死滅させた場合と同様の傾向が見られ、3%NaCl での条件付けと比較して、0.5%NaCl での条件付けのみが、0 分後までに死滅した菌が有意に少なく、耐性を獲得していた（図 3・8, B）。

図 3・9 には Vp9、21、42 について各 1 回行った測定の平均を示した。Vp15 について得られた成績と同様に、0.5%NaCl で条件付けた菌のみで、3%NaCl で条件付けた菌と比較して有意に死滅し難く、耐性が認められた。0.3%NaCl とショ糖 100mOsm のいずれで死滅させた場合にも、ショ糖を加え 10sm に浸透圧を調整した 0.5%NaCl の条件付けでは、3%NaCl での条件付けと比較して耐性を獲得せず、むしろ死滅しやすかった。また、ショ糖 270mOsm (0.8%NaCl 相当) で条件付けた菌でも、3%NaCl で条件付けた菌と比較して耐性を獲得せず、むしろ死滅しやすいことが認められた。

酸による酸耐性の獲得

pH4、3.8 または 3.6 の食塩加ブイオンに懸濁してから 60 分後の生存菌数について、各 1 回測定した 6 菌株の平均を図示した（図 3・10）。統計的な解析

を行った結果、pH5 と pH6.5 で条件付けたもの間に、pH3.8 で死滅させた場合は $P < 0.05$ 、pH3.6 で死滅させた場合には $P < 0.001$ でそれぞれ有意差が認められた。pH4 で死滅させた場合には有意差が見られなかった ($P = 0.8251$)。

酸による低浸透圧耐性の獲得

5 株について各 1 回測定した、30 分後の生存菌数の平均を図示した (図 3・11)。pH6 に曝露した菌と比較して、pH5 に曝露した菌はむしろ死滅しやすく、酸による低浸透圧耐性獲得は認められなかった。

低浸透圧による酸耐性の獲得

0.4%NaCl または 0.5%NaCl に曝露した菌を、pH3.8 または pH4.0 で死滅させた場合には耐性の獲得がみられなかった (図 3・12 : A, B)。一方、pH3.6 で死滅させた場合には、3%NaCl に曝露した菌と比較して、0.4%NaCl または 0.5%NaCl に曝露した菌の方が、30 分間および 60 分間に死滅した菌数が有意に少なく (図 3・12 : C)、低浸透圧での条件付けによって、酸に対する耐性を獲得することが認められた。

D. 考察

本研究により腸炎ビブリオは低浸透圧ストレスに曝露されることによって、より低い低浸透圧環境に対する耐性を獲得することがわかった。真水による海産魚介類の洗浄が腸炎ビブリオ食中毒防止のために推奨されているが、洗浄水の NaCl 濃度が、菌が死滅しない程度の低さになると、低浸透圧抵抗性を強める可能性がある。特に海産魚介類の加工場、市場等海産物を大量に扱う場合には、洗浄水の交換頻度を高くし、腸炎ビブリオが耐性を獲得しないような措置が必要であると考えられる。

また、酸への曝露では低浸透圧に対する交叉耐性は確認されず、むしろ酸に曝露した後に低浸透圧に曝露した場合に死滅しやすい傾向があった。しかし、低浸透圧に曝露した菌は酸に対して耐性を獲得することが示された。したがって、酸によって誘発されるストレス耐性獲得機構は低浸透圧耐性には関与しないが、低浸透圧で誘発される機構には酸耐性を引き起こす機構が含まれることが示唆された (図 3・13)。

汽水域や降雨時の海水、海産物洗浄に使用した真水を想定した低張食塩水は、腸炎ビブリオに対して、低浸透圧と低食塩濃度の 2 つのストレス要素を持っている。どちらの要素で耐性を獲得しているのかを検討した。その結果、ショ糖で浸透圧を海水程度 (10sm) に保ち NaCl 濃度が低い条件では、低浸透圧に対する耐性を獲得し得なかったことから、食塩濃度の低下自体は低浸透圧耐性を付与しないことが示された。すなわち、菌が死滅しない程度の低張食塩水による低浸透圧耐性の獲得は、食塩濃度が低いことの直接的結果ではなく、低浸透圧の結果獲得されるものであることが判明した。

0.5%NaCl で条件付けた菌とは異なり、ショ糖 270mOsm (0.8%NaCl 相当) で条件付けた菌は、低浸透圧に対して耐性を獲得しなかった。腸炎ビブリオは増殖に NaCl を特異的に要求し (Morisita&Takada1976)、Na⁺ を特異的に要求するエネルギー転換系を有している (黒田と土屋 1996)。好塩微生物の酵素には塩類が多い場合に酵素活性が高いものが多いと考えられており、Na⁺ を特異的に要求するものも知られている (畝本 1980)。以上から、低浸透圧耐性獲得の機構にも、NaCl が特異的に要求されるのではないかと考えられる。

低浸透圧ショックに対しての細菌の反応に関しては、大腸菌で、低浸透圧ショックにより Mechanosensitive channel (Msc)が開き、細胞内のタンパクが放出されるという報告がある (Ajouz et al. 1998, Berrier et al. 2000)。また、腸炎ビブリオと同じビブリオ属で *Vibrio alginolyticus* で、NaCl で活性化される Msc が存在する可能性が示唆されている (Nakamaru et al. 1999)。

これらの報告と、本章での結果から、*Vibrio alginolyticus* と同じビブリオ属である腸炎ビブリオにも NaCl の存在下で調節される Msc が存在するのではないかと考えられる。NaCl 存在下で外液の浸透圧が低下すると Msc を介して細胞質内の溶質が細胞質外に放出され、次により低い浸透圧に曝露された場合に、細胞内の溶質濃度がすでに低く、そのため最適な浸透圧状態から低浸透圧に曝された場合に比べて、細胞質外からの水の細胞内流入速度が小さく、細胞質膜にかかる膨圧が少ないために、低い浸透圧でも生残できる、という機構で浸透圧耐性が獲得されるのではないかと考えられる。

なお、死滅様式の研究により 10sm の NaCl 中では菌の生存が 24 時間保たれていたのに対して、10sm ショ糖液中では 24 時間の間に緩やかに死滅することが見出され、そのことより NaCl が浸透圧を調節する溶質として以外に、正常な菌の生存を維持することに必要とされる、他の機能を持つものと考えら

れた。本研究においてはシヨ糖により浸透圧を 10sm にした 0・5%NaCl で条件付けた菌およびシヨ糖 270mOsm で条件付けた菌は、3%NaCl で条件付けられた菌と比較し、低浸透圧によってむしろ死滅しやすいことが認められたが、これは生存に必要とされる Na⁺量の不足によるものと推測される。

参考文献

Ajouz B., Berrier C., Garrigues A., Besnard M., Ghazi A. 1998. Release of thioredoxin via the mechanosensitive channel MscL during osmotic downshock of *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 273 : 26670-26674

Arnold C. N., McElhanon J., Lee A., Leonhart R., Siegele D. A. 2001. Global analysis of *Escherichia coli* gene expression during the acetate-induced acid tolerance response. *J. Bacteriol* 187:2178-86

Berrir C., Garrigues A., Richarme G., Ghazi A. 2000. Elongation factor Tu and DnaK are transferred from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli* during osmotic downshock presumably via the mechanosensitive channel MscL. *J. Bacteriol.* 182:248-251

Koga T., Takumi K. 1995a. Nutrient starvation induces cross protection against heat, osmotic, or H₂O₂ challenge in *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiol. Immun* 39:213-215

Koga T., Sakamoto F., Yamamoto A., Takumi K. 1999. Acid adaptation induces cross-protection Against some environmental stresses in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 45:155-161

黒田照夫、土屋友房. 1996. 腸炎ピアブリオの細胞膜におけるエネルギー転換系の特徴. *日本細菌学雑誌* 51 : 697・705

Morisita H., Takada H. 1976. Sparing effect of lithium ion on the specific requirement for sodium ion for growth of *Vibrio parahaemolyticus*. *Can. J. Microbiol.* 22:1263-8

Nakamaru Y., Takahashi Y., Unemoto T., Nakamura T. 1999. Mechanosensitive channel functions to alleviate the cell lysis of marine

Pichereau V., Hartke A., Auffray Y. (2000) Starvation and osmotic

stress induced multiresistences influence of extracellular compounds.
Int.J.Food Microbiol. 55, 19-25

Ramos J., Gallegos M., Marques S (2001) Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. Curr.Opin.Microbiol. 4,116-171

畝本九 1980・海洋細菌の塩適応細菌の生態 8 極限環境の微生物微生物生態研究会編学会出版センター東京：121-136

Wong H., Peng E, Han C, Lan S (1998) Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. Infect.Immun., 66, 3066-3071