

微生物制御における損傷菌の問題と 培養不能生存菌・未培養菌との比較論

土戸 哲明^{1*}・坂元 仁²

本稿では、未培養菌の特集の中で生存の確認や発育能の評価が難しい点でこれと共通した問題を持ち、殺菌や消毒、抗菌の分野で問題となる損傷菌について紹介する。また同様に、その類似性・相違性が議論になる培養不能生存(viable but nonculturable, VBNCまたはVNC)菌についても併せて論じ、私見を述べたい。

損傷菌とは何か?なぜ問題なのか?

生物工学の分野ではあまり馴染みがないと思われる損傷菌とは、端的には生死に関わるストレスを受けることによって細胞の構造・機能のどこかに傷害を受けた状態にある微生物である。より限定的な言い方をすれば、殺菌や消毒など物理的・化学的処理にさらされた結果、健常菌には影響を与えないような何らかの制限的な条件下で発育ができなくなった微生物である¹⁻³⁾。欧米では以前から食品の衛生や微生物制御の分野で損傷菌の問題が注視されているが、わが国ではあまり関心がもたれてこなかった。しかし、現在わが国の食品産業界では、国際的な貿易や流通上の問題に対応するため関係省庁によるHACCP(危害分析重要管理点)システムの制度化が実施されることになっており、ようやく関心が高まりつつある^{4,5)}。このシステムは加工食品の生産・製造の全過程にわたる微生物の衛生管理・制御を科学的根拠に基づいて行うもので、殺菌工程はこのシステムにおける最重要管理点である。この殺滅菌の保証や処理条件の妥当性・検証の観点から、また近年の消費者の高品質志向に沿った殺菌条件の軽減化導入のトレンドからも、殺滅菌処理後も生残しうる損傷菌発生の問題がクローズアップされてきている。これに伴って食品産業界だけでなく学会誌^{4,7)}などで特集が企画されるなど学術界でも関心がもたれ始めている。

損傷菌は、一般的には損傷が比較的軽微で復活できる生存菌として検出・計数される亜致死的(sublethal)損傷菌を指すことが多い。しかし、次項で述べるように、どこの損傷を検出するか、またどの程度までの損傷なら回復可能と判定されるかは用いる評価方法によって異なり、損傷菌を一義的に定義することには無理がある。損傷菌の計数は必然的に生存数評価に直結する問題である。

筆者らがこれまでの成果をもとに提示している損傷菌の発生モデルを図1に示す^{4,6)}。このモデルでは、従来設定されている亜致死的損傷菌だけでなく、即死菌とは別の殺菌処理後の保存・流通過程で死滅する致死的損傷菌、さらにその間の生死の境にある半致死的(semilethal)損傷菌も置く一方、その生理学的特性の違いをもとに損傷からの回復菌を健常菌と区別している^{4,6)}。損傷菌の生死は殺菌処理時の損傷過程における細胞状態だけでなく処理後の回復過程で細胞修復機能が作動可能かどうかによっても変動する。つまり、その生死は殺菌処理直後には確定しておらず、その後の保存過程での条件次第で回復・蘇生(これらの用語はしばしば混用されるが、ここでは亜致死的損傷菌に対して回復、半致死的損傷菌に対して蘇生とよぶ)し、さらに発育することによって食品などの安全性や健全性を脅かすことになる。このことが近年の食品業界で問題視される所以であるが、損傷菌の特性や発生機構が十分解明されておらず、その制御の理論や対策の方法論が未だ確立されていない。

損傷菌はどのように検出・計数できるか?

一般に生存菌の検出・計数には培養法と非培養法があ

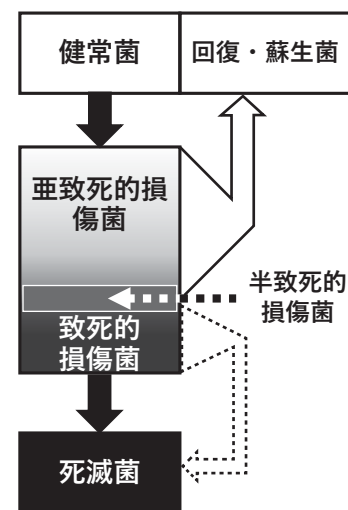


図1. 損傷菌の発生とその後の挙動の概念図。黒矢印は処理中の反応、白矢印は処理後の反応を示す。文献4および6の原因に、半致死的損傷菌を追加した。

り、前者には古くからの寒天平板法が今でも汎用されており、後者では迅速法である蛍光染色法が代表的な方法である。損傷菌の検出・計数にもいろいろな方法があるが、培養法では選択性の有無のある2つの条件、また染色法では染色原理が異なる2つの方法の差分値に基づいて定義されることが多い。このため、計数された損傷菌は上述したように一義的に定義できず、用いる方法の原理によって量(数)的のみならず質的にも異なった損傷菌を計数することになる。たとえば古くから用いられる二重寒天平板法は、典型的には高濃度食塩を含む寒天平板とこれを含まない培地との差分値から損傷菌数が求められる。この場合、適用する食塩濃度によって損傷菌の数が変動し、また食塩耐性低下という細胞膜損傷由来の特性に基づいて評価される。したがって、この場合は食塩耐性低下損傷菌とよぶのが明確な表現である。HACCPシステムでは手間と時間を要する培養法よりも迅速法による生死判定が好まれ、また近年では蛍光色素とフローサイトメトリやPCRを併用する損傷菌計数法も開発されているが、損傷菌の生死は回復させてこそ、より信頼性のある測定が可能になるとみられ、迅速法の適用においては方法論上の条件化と結果の検証に十分な留意が必要である。

本稿筆頭筆者らは、以前に生存率測定法として液体培地を用いる発育遅延解析法⁸⁾を提唱しているが、この発育遅延の発生には生残菌数の低下と損傷菌の回復の2つの要因が関与している。そこで、寒天平板上でのコロニー形成や最確数法での回復強化を図って求めた生残数と上記の発育遅延解析法での生残数との差分値から損傷菌数を求める手法を提唱している(図2)⁹⁾。この方法は、原理面での説得性をもちながら、実際の食品における、いわゆるシェルフライフの概念にも即した実用面でも有利な方法と目される。

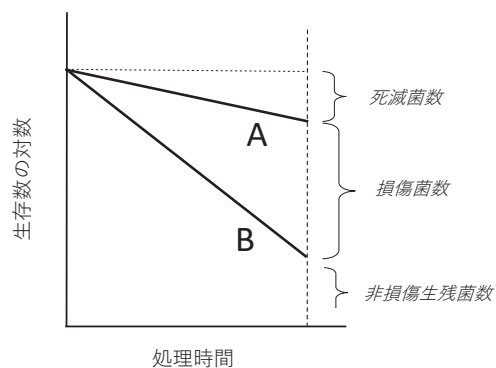


図2. 損傷菌数の評価の概念図。直線AとBはそれぞれ死滅曲線と損傷曲線⁹⁾。

損傷菌はどのような損傷を受けてどう修復するのか？

微生物の損傷とその修復の機構についてはあまりよくわかっていない¹⁻⁵⁾。とくに殺菌処理で汎用される加熱で発生する損傷菌の場合、細胞の各所に損傷が起こるが、それらはその後の保存条件次第で修復される^{4,5,10-12)}。加熱損傷の主要なものは細胞質膜(内膜)の機能傷害と外膜の構造破壊、酵素・タンパク質の失活・変性、DNA・RNAの分解である^{4,5,10-12)}。とくに細胞表層の損傷は損傷菌の発生をもたらすとされる^{13,14)}が、その1次損傷がさらにDNA鎖の酵素的切断や細胞内酸化・活性酸素発生を起し、これら2次損傷が細胞死の原因となる可能性にも留意すべきである^{15,16)}。

損傷菌の多くは、殺菌処理後の適当な条件下での保存過程では初期に発育を停止し、それらの損傷を修復して生存性を復活させる^{4,5,10-12)}。加熱損傷の場合はこの期間、変性タンパク質の自己再生や熱ショック応答・表層ストレス応答を作動させ、シャペロンタンパク質による修復再生や外膜リポ多糖体の修復合成など、それぞれ細胞質と細胞表層の損傷部位を修復するとともに、細胞内pHや酸化還元電位などの恒常性を取り戻す。これらの損傷の質と量、修復の可否と時間の問題は、当然、前項の検出・計数にも密接に関わる⁴⁻⁷⁾。

食品の微生物制御で、より重視すべき対象は殺菌処理に対してきわめて高い抵抗性をもつ芽胞(細菌孢子)である。殺滅処理後の損傷芽胞発生の可能性はその発育による食中毒や腐敗のリスクを高めることになり、冒頭に述べた殺菌条件の緩和化のためにはその科学的概念の構築が必須である。損傷芽胞の特徴として留意すべきは、芽胞本体(コアとよばれる)の損傷のほかに発芽システム(発芽レセプター群とコルテックス分解酵素群)の損傷が加わることである⁴⁻⁷⁾。加熱などの殺菌処理によって芽胞や食品・培地の特性によって発芽能の損傷がコアの損傷に先行して起こった場合、生存しているが発芽できない、いわば“発芽不能生存芽胞”が発生し、それが加工・流通過程での何らかの因子によって発芽可能となる恐れがある^{4,5)}。

損傷菌と培養不能生存菌・未培養菌とはどう違うのか？

損傷菌は上述のように、とくに食品の殺菌や衛生管理の分野で問題になるが、自然環境では培養不能生存状態の菌が、また新規有用微生物の探索などのバイオテクノロジーの分野では未培養(難培養)菌が注目されている^{17,18)}。これらの微生物には生存が定かでないことや、発育あるいは培養ができないか難しい特性があるため、

最近の論文をみると、とくに損傷菌と培養不能生存菌の間での区別はあいまいで、それらの概念が重複・錯綜して混乱している。これに貧栄養(低栄養)菌¹⁹⁾やpersister(遺伝子発現のゆらぎによって生じる培養集団の中の少数派抵抗性菌で持続生存菌などと訳される)も加わって、それら相互間での特性の区別や検出上の識別がさらに不明確化している感がある。たとえば、培養不能生存菌とpersisterの関係を論じたもの²⁰⁾では、その論述の中で培養不能生存菌に損傷菌を含めた考え方がされている。また、未培養菌と培養不能生存菌、貧栄養菌との間でも同様な問題が生じている。未培養菌として分離しても、たとえば、ある特定の発育因子が発見されるとその菌は未培養菌ではなくなり、またきわめて発育速度の小さい貧栄養細菌である場合も想定され、それらの区別があいまいである。

これらの原因の多くは、発生の条件・機構上の概念の不明確さとその検出法に依拠しているように思われる。前項で述べた2つの検出法を用いて単純に差分値をとると、これらの間での菌の識別は難しくなる。またそれらの誘発の処理法や条件を考慮すれば、培養不能生存菌と未培養菌は細胞の生理学的な対応を伴うのに対し、本来の意味の損傷菌は非生理学的環境に突発的にさらされて

発生し、細胞の生理学的対応は回復過程で営まれる。換言すれば、その対応の可否によって培養不能生存菌と未培養菌は細胞生理学的に安定状態にあると言え、遺伝的背景は明らかでないながらも適応的な生残戦略の結果とも捉えられるのに対し、損傷菌は生理学的に不安定ないし準安定な状態にあると言えるだろう。培養不能生存状態の概念を最初に提出したColwellら²¹⁾も当初の意図から損傷にまで拡大化されている点については疑念的な見解を述べている。ただ、Ray²²⁾も考察しているように、上述した半致死の損傷菌の場合には培養不能生存状態にあると言えるかもしれない。このような識別の視点に立てば、培養不能生存菌や未培養菌も殺菌処理にさらした場合、これらの菌からも損傷菌が発生するはずである。

損傷菌と培養不能生存菌および未培養菌との類似性・相違性はとかく議論の多いところであるが、上述のことを含めた筆者らの見解を表1にまとめた。今後、損傷菌を含めたこれらの微生物の生理学的・遺伝学的特性がさらに明らかになれば、より納得可能な識別の概念と方法が確立されるかもしれない。

損傷菌研究にはどのような意義と課題があるのか？

損傷菌は、現在のところ食品の病原性および腐敗性微

表1. 損傷菌と培養不能生存菌・未培養菌との特性比較

微生物	発生要因	特性	応用的意義
損傷菌	<ul style="list-style-type: none"> 殺菌・消毒・抗菌など微生物制御法の適用 	<ul style="list-style-type: none"> 損傷期は受動的対応、回復期にストレス応答・修復系発現 ストレス特異的・非特異的特性、1次・2次損傷、代謝・構造損傷、などの区別 トレランスの発生 属種によっては平板法での感受性の増大 	<ul style="list-style-type: none"> 食品の安全性・健全性の確保・保証 予測微生物学への導入
培養不能生存菌	<ul style="list-style-type: none"> 飢餓・低温など環境変化 病原菌などでは宿主外環境 	<ul style="list-style-type: none"> 多くは適応応答系発現 周辺の細胞の増殖シグナルRpf*に感応するタイプも存在 飢餓誘導されたトキシン・アンチトキシン系の作用による非致死の増殖阻害(?) 微弱な代謝活性、呼吸活性の維持 細胞膜の健全性の維持 Kogure <i>et al.</i>のDVC (direct viable count) 法²³⁾での細胞伸長能の維持 	<ul style="list-style-type: none"> 病原性大腸菌、コレラ菌、結核菌、らい菌など病原菌の宿主外での生存戦略の解明、培養法の確立 培養できなくても遺伝子資源として活用できる
未培養菌	<ul style="list-style-type: none"> 土壌など低栄養環境での適応・棲息 	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝的性質として一般的に低発育能獲得 共生や寄生が必須で人工培地では培養不能の場合、他細胞による必須因子の生産に依存、主要代謝回路の遺伝的欠落 培養条件が不明 人工培養条件が致死的に働く 顕微鏡観察下で細胞形態は維持しても細胞伸長などで生存判定ができない ヘテロ集団の中では栄養源獲得競争や生存競争で淘汰される？ 	<ul style="list-style-type: none"> 有用物質生産など実用的価値の発見・探索 培養できなくても遺伝子資源として活用できる

* 培養不能生存状態からの蘇生を促進する因子 (resuscitation promoting factor)²⁴⁾。

生物の制御において問題視されているが、その制御法の確立や理論の構築だけでなく、そもそも殺菌処理によって細菌をはじめとする微小な生命体はなぜ、またどのように死ぬのかという生命論の根源的な命題⁶⁾としても捉えられ、その論考は微生物の生死判定・菌数評価法の基本概念にもつながるかもしれない。それはともかく、損傷菌をどのように制御すればよいかの戦略的な対策については、いくつかの原理的手法が想定される²⁵⁾。基本的なものとしては損傷の拡大と回復・発育の抑制である。これらの制御法の選択や併用処理の設定に寄与するためにも、細胞の損傷・修復機構の解明への進展を期待したい。

食品の製造工程における HACCP システムでは殺菌の事後評価よりも事前予測の概念が導入されるため、有害微生物の発育や死滅過程を数学モデルで表し、定量的に予測する手法が開発・導入されている^{26,27)}。加熱殺滅菌では従来からの非定温系を含む殺菌加熱量を基準温度での加熱時間に相当する *F* 値 (致死率値) によって殺滅条件の決定や殺菌効果の評価が行われるが、最近筆者らはこの考え方を損傷菌発生プロセスに適用した殺損予測モデル²⁸⁾を展開し、他の制御法との併用の条件設定理論の構築に活用することを企図している。このようなアプローチでは、アメリカ農務省が開発した微生物発育・死滅の予測ツールの ComBase²⁹⁾ やわが国市販³⁰⁾の熱死滅データベースである ThermoKill Database などのモデル検証への活用も有効であろう。

なお、損傷菌についての研究と技術開発の交流の場として日本損傷菌研究会が2015年に発足しており³¹⁾、「損傷菌セミナー」の定例開催を中心に広報・啓発活動が展開されていることを付記する。

文 献

- 1) Andrew, M. H. E. and Russell, A. D. (eds.): *The Revival of Injured Microbes*. Academic Press Inc., Orlando (1984).
- 2) 森地敏樹: 食品衛生学雑誌, **13**, 173 (1972).
- 3) Wesche, A. *et al.*: *J. Food Prot.*, **72**, 1121 (2009).

- 4) 土戸哲明: 日本食品科学工学会誌, **65**, 67 (2018).
- 5) 土戸哲明, 坂元 仁: 日本食品科学工学会誌, **65**, 73 (2018).
- 6) 土戸哲明: 日本防菌防黴学会誌, **47**, 217 (2019).
- 7) 坂元 仁: 日本防菌防黴学会誌, **47**, 239 (2019).
- 8) Takano, M. and Tsuchido, T.: *J. Ferment. Technol.*, **60**, 189 (1982).
- 9) Tsuchido, T.: *Biocontrol Sci.*, **22**, 131 (2017).
- 10) 土戸哲明: 日本防菌防黴学会誌, **18**, 75 (1990).
- 11) 土戸哲明, 坂元 仁: 日本食品微生物学会雑誌, **26**, 70 (2009).
- 12) Cebrian, G. *et al.*: *Foods*, **6**, 107 (2017).
- 13) Tsuchido, T., *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 298 (1985).
- 14) 土戸哲明: 膜, **33**, 266 (2008).
- 15) Sakamoto, J. J. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **276**, 47046 (2001).
- 16) Messner, K. R. and Imlay, A. J.: *J. Biol. Chem.*, **274**, 10119 (1999).
- 17) Vartoukian, S. R. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **309**, 1 (2010).
- 18) Stewart, E. J.: *J. Bacteriol.*, **194**, 4151 (2012).
- 19) 服部 勉: 微生物学の基礎, 学会出版センター (1986).
- 20) Ayraoetyan, M. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **200**, 1 (2018).
- 21) Colwell, R. R. and Grimes, D. J.: *Nonculturable Microorganisms in the Environment* (Cowell, R. R. and Grimes, D. J., ed.), p. 1, ASM Press, Washington, D. C. (2000).
- 22) Ray, B.: *Fundamental Food Microbiology*, 3rd ed., p. 103, CRC Press (2004).
- 23) Kogure, K. *et al.*: *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415 (1979).
- 24) Gupta, R. K. and Srivastava, R.: *Indian J. Microbiol.*, **52**, 114 (2012).
- 25) 土戸哲明, 坂元 仁: 食品工業, **55**, 45 (2012).
- 26) 藤川 浩, 小関成樹: 微生物コントロールによる食品衛生管理, p. 197, エヌ・ティー・エス (2013).
- 27) Ross, T. and McMeekin, T. A.: *Int. J. Food Microbiol.*, **23**, 41 (1994).
- 28) 土戸哲明, 中村一郎: 損傷菌セミナー2018講演要旨集, p. 13, 日本損傷菌研究会 (2018).
- 29) ComBase: <https://www.combase.cc/index.php/ja/> (2019/7/24).
- 30) TriBioX Laboratories: <https://www.tribiox.com/thermokill-database/> (2019/7/24).
- 31) 日本損傷菌研究会: <https://sites.google.com/site/injuredmicrobes/> (2019/7/15).