

第1章 はじめに

1.1 研究の背景

マガキの旬である9月～2月ごろは広島県内だけでなく全国的に牡蠣を食べる機会が増加する。広島県内で生産される広島カキは日本全体の62%の生産量を誇っている（広島水産振興センター）。そのため、呉高专周辺にも牡蠣の養殖に重きをおいている水産業者が多数存在している。その反面牡蠣の生食によるノロウイルスなどが引き起こす食中毒が問題視されている。そういったノロウイルスの被害は今後拡大していくと考えられている。その要因として、広島から出荷されるマガキのほとんどは剥きガキとして出荷されるが、牡蠣殻を剥く専門職いわゆる打ち子の高齢化が問題視され、ゆくゆくは剥きガキから殻付きのカキに転換されるのではないかというのがある。また、出荷される牡蠣殻に対して、微生物学的安全と衛生基準が存在しておらず、それらの問題を解明、解決するために令和元年度にはインキュベーションワークの一環で牡蠣が保有する菌の解明に関する研究が行われた。その研究の中で、牡蠣殻1gあたりにおよそ1億匹を超える細菌が付着していることが判明し、牡蠣殻内部に存在している絶対量の10倍以上の細菌が存在している結果が得られた。

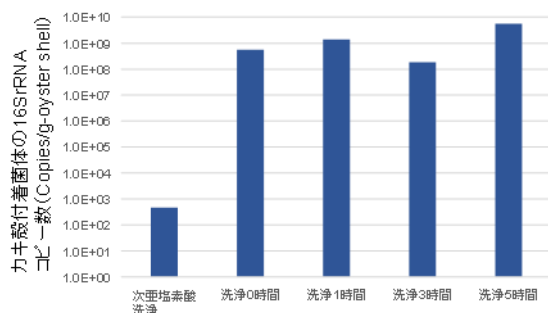


図-1 カキ殻表面の菌数

すなわち、牡蠣殻表面が食中毒の汚染源であるという古くからある暗黙知が正しいものであると同時に殻付きのカキを提供する上で高度な殺菌処理が必要であることが証明された。また、この研究では、牡蠣殻に存在する微生物の菌叢を調査し、*Microvirgula aerodenitrificans* という種がほぼ100%の占有比率で存在していることが確認された。このことから、以下の2つの仮説が考案された。

仮説 1. 牡蠣殻の組成は、他の二枚貝と異なっているが、優占株の働きで変化していること。

仮説 2. ノロウイルスを吸着および集積する機能がある事。

仮説 1. に関して、通常の二枚貝は、炭酸カルシウムの結晶系の一つであるアラゴナイト

相であるが、牡蠣殻の場合は、アラゴナイト相の同質異像であるカルサイト相で形成されている。この理由は解明されていないが、カキ類は稚貝の段階ではアラゴナイト相であるが、成長に伴いカルサイト相に移行することが知られている (Carriker et al., Marine biol., 1991)。また、アコヤガイが同菌種を含む細菌群に感染することで、アラゴナイトで形成されるはずの真珠がカルサイトで形成されるという知見も報告されている。(Ogimura et al., Fish.Sci., 2012)。この2つの知見を総合すると①の仮説が導かれる。

仮説 2.に関しては、*M.aerodenitrificans* は従来廃水処理生態系 (e.g.活性汚泥) からの検出の報告が多い微生物である。活性汚泥内には、ヒト腸管に感染し増幅したノロウイルスを吸着するキャリアーとなる種が存在している。(Miura et al., J.Virol., 2013)。ノロウイルスはこれらのキャリアーによって不活化を免れ海域に流入し、カキなどの貝類に蓄積することで再び人に感染するという生活環である。しかしながら、カキとノロウイルスが密接な関係であることの証明にはならない。そこで、*M.aerodenitrificans* が検出されたことにより、この菌種にはノロウイルスを吸着・集積する能力があるのではないかという仮説に至った。

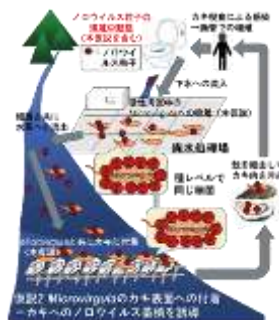


図-2 仮説 2 概要

1.2 研究で得られる成果

仮説 1 の成果は、牡蠣殻付着細菌を利用した自己再生コンクリートの可能性がある。このコンクリートは、微生物のカルサイト生産作用によるひび割れ修復を基本としていて、また牡蠣殻は粗粉碎することでコンクリートの粗骨材として利用することが検討されている。従来の自己再生コンクリートは、培養した微生物をパッケージ化し、コンクリートの打設時に一緒に混和するため、コストの大幅上昇が懸念されている。しかし、牡蠣殻を粗骨材として使用し、付着細菌によるカルサイト生産で自己再生機能を付与することができれば、従来の方法に比べて、劇的にコストの低下を図れるようになる。

仮説 2 の成果は、この仮説が真であったときに、ノロウイルスの吸着能を持つ当該細菌の除去によりカキへの蓄積を防止でき、結果として、ノロウイルスによる沿海環境の汚染を阻止することができる。すなわち、カキ養殖業者の夢でもあるノロウイルスのいないカキの生産の可能性がある。

1.3 本研究の目的

本研究では、1.1 と 1.2 で述べた仮説を裏付けるために、実際に業者からカキを譲り受け

て、下記の内容について研究していく。仮説を裏付けていく過程を3つに分割した。

① M.aerodenitrificans の分離株の獲得

前述でも述べたように、マガキの表面に付着している微生物のほぼ100%を当該細菌が占有しているが、牡蠣殻表面の菌叢を調べた研究はまだ存在していない。しかしながら、M.aerodenitrificans は活性汚泥の中から発見される特に珍しくない微生物である。それゆえに株の分離は容易であると予想できるが、マガキ殻表面から分離できるかは誰もわからないため、本研究で最も重きに置くテーマと言える。

② M.aerodenitrificans が炭酸カルシウム結晶構造を変化させている可能性の検証

仮説1に関する検証だが、アラゴナイト相を持つ牡蠣殻の表面微生物叢を調べることでより証明が可能であると考えられる。また、有機酸カルシウムに対する資化性があるかどうかを調べていく。

③ M.aerodenitrificans 分離株のノロウイルス吸着能検証

ノロウイルス粒子は、特定のバクテリア細胞表面に存在する血液型決定抗原類似糖鎖に吸着することが知られている。すなわち、当該細菌においてABO抗体と結合する抗原の有無を調べれば、ノロウイルス吸着能の有無を確認できる。

本研究では、上記の3つの過程のうち一つ目である M.aerodenitrificans の分離株の獲得を目指していく。

第2章 実験内容

2-1 牡蠣殻表面に付着した *M. aerodenitrificans* の獲得

この実験は、牡蠣殻表面の存在する M.aerodenitrificans の分離株を得るために行った。詳しい実験方法は下記に示すが、一般的な寒天平板培養法で分離株の獲得を試みた。

2-1-1 使用器具

- ・ クリーンベンチ
- ・ 遠心分離装置
- ・ インキュベーター
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ サーマルサイクラー
- ・ 高圧蒸気滅菌機
- ・ 電気泳動装置

2-1-2 培地作成

①NR2A 培地を作成（組成は表 1 に示す）

表 1

	分量
R2A Broth ダイゴ	3.2g/L
KH ₂ PO ₄	3.2g/L
K ₂ HPO ₄	9.7g/L
KNO ₃	0.5mmol/L

②ゲランガムを 15g/l 添加し、オートクレーブする。

③滅菌シャーレに流して、常温で冷却する。

2-1-3 寒天平板培養法

①粉碎した牡蠣殻を生理食塩水により、10 倍希釈する。同様に希釈サンプルを 10 倍希釈することを繰り返し、 $10^0 \sim 10^7$ 希釈したサンプルを作成する。



写真-1 粉碎した牡蠣殻

②2-1-2 で作成した培地にそれぞれの希釈倍率の希釈液を添加し、コンラージ棒で培地に塗布する。



写真-2 希釈液からのコロニー形成

③形成されたコロニーを白金耳で掻き取り、新しい培地で分離培養を行う。



写真-3 分離したコロニー-1



写真-4 分離したコロニー-2



写真-5 分離したコロニー-3

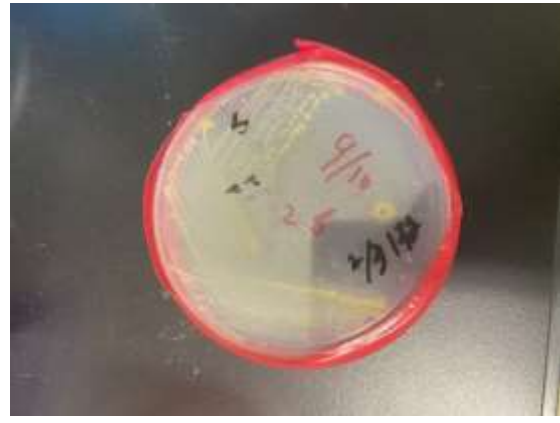


写真-6 分離したコロニー-4

④③で純粋化できていない場合再度操作を行う。



写真-7 2種以上のコロニー形成

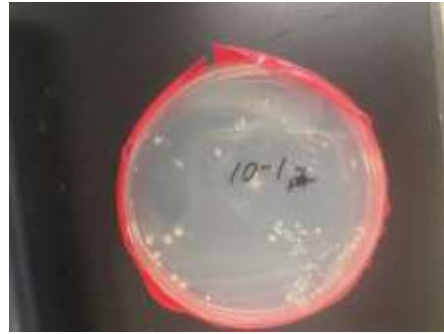
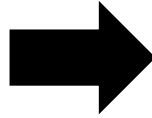


写真-8 分離したコロニー5

2-1-4 Cell Lysate の作成

分離できたコロニーの属株の同定を行う際の塩基配列解析のために、PCR 反応を行うが、その前準備として、Cell Lysate の作成を行った。

- ①1.5ml チューブに DW50 μ l を入れ生菌の確認できたコロニーを懸濁する。
- ②BL buffer40 μ l と Proteinase K 溶液 5 μ l をチューブに添加する。
- ③60 $^{\circ}$ C-20 分、95 $^{\circ}$ C-5 分で溶菌させる。
- ④10000rpm、15 分で遠心分離を行い、上清を回収する。
- ⑤PCR 反応に備え、菌液を冷凍保存する。

2-1-4 PCR

- ① 2-1-3 で調整した Cell Lysate 及び各試薬を氷上解凍する。
- ② 以下の試薬をチューブに滴下し、Master Mix を作成する。

PCR 一反応あたりの組成

- (1) Sapphire Amp 5 μ l
- (2) DW 3.8 μ l
- (3) Forward primer 0.1 μ l
- (4) Reverse primer 0.1 μ l

上記を必要分作成し、9 μ l ずつ PCR チューブに分注する。

- ③ 各 PCR チューブに Cell Lysate を 1 μ l ずつ滴下する。
- ④ チューブ内を軽く混和し、軽く遠心したのちにサーマルサイクラーにセットする。

PCR 反応は以下の設定で行う。

予熱 95 $^{\circ}$ C-2 分

- | | |
|----------------------------|-----------|
| 熱変性 95 $^{\circ}$ C-10 秒 | } 35 サイクル |
| アニーリング 55 $^{\circ}$ C-5 秒 | |
| 伸長 72 $^{\circ}$ C-30 秒 | |

最終伸長 72°C—2 分

冷却 10°C

PCR 反応が冷却工程に入ったら、直ちに PCR チューブを回収する。

2-1-5 PCR 産物の確認

- ① 1 x TAE buffer をフラスコにとり、Agarose S を 1.5% 加えたのち、電子レンジを用いて溶解させる。
- ② ゲル板をトレイに組み込み、ゲルを流し込み、コームを差し込む。
- ③ ゲル完成後、電気泳動装置に移し、ウェル内に 2 μ l ずつ PCR 産物と泳動用のサイズマーカーを注入する。
- ④ 100V、15 分で電気泳動を行う。
- ⑤ 泳動終了後、ゲルを Ethylene bromide 水溶液に 5 分浸す。
- ⑥ ゲルをトランスイルミネーターにセットし、UV を照射する。
- ⑦ 蛍光バンドを確認したのち、CCD カメラを用いて蛍光バンドを記録する。

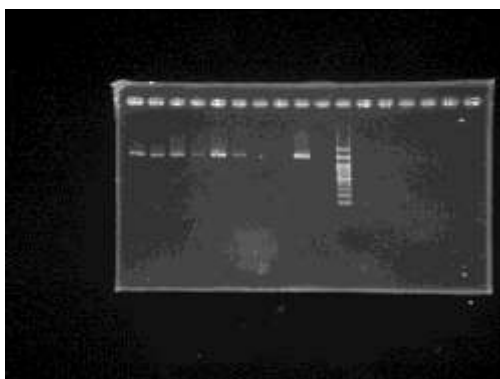


写真-9 CCD カメラを用いた蛍光バンドの画像

2-1-6 PCR 産物の精製

PCR 産物の精製には、AMPure XP を用いた。

- ① AMPure XP を PCR 産物に対して、1.8 倍量加える。
- ② ピペティングで混合後、5 分間静置。
- ③ 磁気プレート上で 2 分静置し、上清を除去。このとき 5 μ l 程度残しておく。
- ④ 磁気プレート上で 70% エタノール 200 μ l を加え、30 秒静置し、上清を除去。
この作業を複数回行う。
- ⑤ 磁気プレートから下ろし、溶出液を 40 μ l 以上加え、ピペティングで懸濁後、5 分静置し、磁気プレート上で 1 分静置する。
- ⑥ 磁気プレート上で精製 DNA を含む上清を新しいチューブに移す。

2-1-7 DNA 解析（シーケンス反応試薬調整）

- (1) シーケンスプライマー (27F) 1μl
 - (2) DW 12μl
 - (3) PCR 産物 1μl
- ① 6.4pmol/L に 27F プライマーを調整する。
 - ② 上記の組成で PCR チューブに混和する。
 - ③ 調整したサンプルをサンガーシーケンス解析サービス (FASMAC 株式会社) に外注する。
 - ④ 得られた塩基配列を NCBI データベースと照合し、種の同定を行う。(写真-10、11 参照)

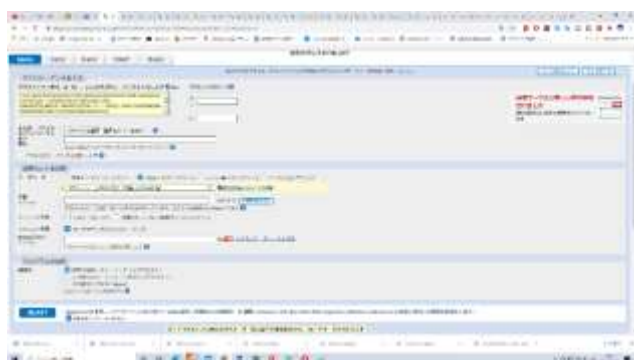


写真-10 NCBI 設定画面

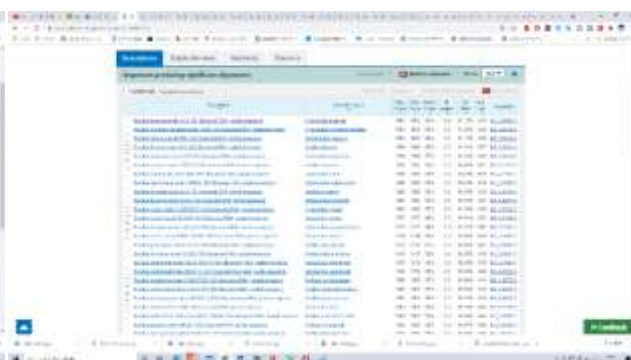


写真-11 実際の塩基配列解析後

2-2 M.aerodenitrificans を用いたカルシウム析出

M.aerodenitrificans によって炭酸カルシウムの結晶構造が変化するのではという仮説を検証するために、有機酸カルシウムを用いたカルシウム析出を行った。しかしマガキ殻表面から M.aerodenitrificans を分離できなかったため、NITE(独立行政法人 製品評価技術基盤機構)から分離株を購入し、以下の実験を行った。

2-2-1 培地の作成

カルシウム析出にあたり、有機酸カルシウムを含む液体培地を作成し、そこに該当する菌種と 2-1 の実験で同定した菌種を入れることで、M.aerodenitrificans にカルシウムに対する資化性があるかどうかを検証した。組成は下記表 2 を参照。

表-2

	分量
R2A Broth ダイゴ	3.2g/L
KH ₂ PO ₄	3.2g/L
K ₂ HPO ₄	9.8g/L
KNO ₃	0.5mmol/L
有機酸カルシウム	

(ギ酸カルシウム、乳酸カルシウム、酢酸カルシウム)	1g/L
---------------------------	------

表-2 の組成の液体培地を試験管に 10mL ずつ分注し、オートクレーブによる滅菌を行った。しかし下記の写真-12 のように白い沈殿物が発生したため、液体培地の組成を変更することにした。



写真-12 沈殿化した NR2A 液体培地

2-2-2 培地の組成の見直し

2-2-1 で NR2A 液体培地は、有機酸カルシウムと相性が良くなかったため、LB 培地で同じ操作を行ったところ白い沈殿物は発生しなかったため、カルシウム析出は LB 液体培地で行うこととした。組成は下記の表-3 に記載。

表-3

	分量
ハイポリペプトン	10.0g/L
酵母エキス	5.0g/L
NaCl	5.0g/L
有機酸カルシウム（ギ酸カルシウム、乳酸カルシウム、酢酸カルシウム）	1g/L

2-2-3 前培養およびカルシウム析出

カルシウム析出を行う前に有機酸カルシウムが入っていない通常の LB 培地を用いて、解析で同定できた細菌と *M.aerodenitrificans* を前培養し、そこから 10 μ L 菌液を採り、有機酸カルシウムの入った LB 培地へ投与した。（写真-13,14 参照）



第3章 実験結果

3-1 マガキ殻表面に存在する微生物の解析結果

解析を委託したサンプル数は全部で 40 個あり、そのうち 16 個のサンプルについて解析することができ、その塩基配列から NCBI データベース上での照合が確認できたサンプルを下記の表-4 示す。に残りの 24 個のサンプルは、DNA の精製段階で、きれいに精製できていなかったことや、2 種以上の細菌が存在していたことなどから正しい塩基配列が読めなかった事が原因に挙げられる。

表-4

Family	genus	closest relative	Similarity (%)
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus eiseniae</i>	91.13
<i>Caulobacterales</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i>	98.9
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	99.51
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	94.24
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	94.85
<i>Comamonadaceae</i>	<i>Delftia</i>	<i>Delftia acidovorans</i>	96.4
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	99.51
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	99.76
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	99.39
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia fergusonii</i>	99.15
<i>Bacillaceae</i>	<i>Exiguobacterium</i>	<i>Exiguobacterium aestuarii</i>	97.06
<i>Bacillaceae</i>	<i>Exiguobacterium</i>	<i>Exiguobacterium aestuarii</i>	98.9
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	95.35

<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	98.51
<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio furnissii</i>	99.63
<i>Vibrionaceae</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Vibrio furnissii</i>	98.9

3-2 M.aerodenitrificans の分離

3-1 から本研究の目的である M.aerodenitrificans の分離株を獲得するには至らなかったが、その代わりに、カキの食中毒の原因の一つであるビブリオ菌の分離には成功した。

3-3 カルシウム析出について

M.aerodenitrificans によるカルシウム析出の実験に関しては観察時間を長めに設けているため、現時点までの結果ではまだデータが足りないがゆえに省略させていただきます。

第4章 まとめと今後の課題

4-1 まとめ・課題

- ・ 今回の結果から、牡蠣殻表面において圧倒的に占有しているにも関わらず、M.aerodenitrificans の分離株の獲得には至らなかった。従って、当該細菌が難培養性である可能性が出てきた。一般的に海洋細菌は難培養性であることが知られており、培養可能な細菌種はぜんたいの 0.1%程度であると言われている。また、今回の培養条件では当該細菌がコロニーを形成することが無かったと考えられた。今回の研究での分離条件ではコロニーの形成がないため、分離が困難であると考えられるため、今回は R2A 培地を用いた培養であったためこの培地とは異なる培地を用いて再度分離を行うことが必要である。あるいは、牡蠣殻から直接ゲノム DNA を抽出し環境メタゲノムから当該細菌のゲノムを再構成し、二つの仮説について検証する必要がある。

- ・ M.aerodenitrificans 以外の微生物の分離についても、本研究の結果から 16/40 つまり全体の 40%しか成功していないので、仮に当該細菌のコロニーが形成されても分離できずに無駄になってしまう可能性があるため、解析の精度を上げていく必要がある。

- ・ 現在進行形でカルシウム析出についての実験を行っているが、まだ時間がかかる見込みなので、継続して観察していくことが必要である。

参考文献

- 1) Carriker et al., (1991). Chemical elements in the aragonitic and calcitic microstructural groups of shell of the oyster *Crassostrea virginica*: a proton probe study. *Marine Biology*, 109(2), 287-297.
- 2) Ogimura et al., (2012). Deformation and blemishing of pearls caused by bacteria. *Fisheries science*, 78(6), 1255-1262.
- 3) Miura et al., (2013). Histo-blood group antigen-like substances of human enteric bacteria as

specific adsorbents for human noroviruses. *Journal of virology*, 87(17), 9441-9451.

- 4) 寺島和希, 畠俊郎, 微生物機能によるカルシウム系鉱物析出促進条件に関する検討 (2008.3) 参照先 : <http://library.jsce.or.jp/jsce/open/00063/2008-07-0014.pdf>
- 5) 平林竜一, 畠俊郎, 微生物機能によるカルシウム系鉱物析出に適した糖類及びカルシウム濃度に関する検討 (2009.3) 参照先 : <http://library.jsce.or.jp/jsce/open00063/2008-07-0025.pdf>