

〈資料〉

低温環境においてNaClが *Listeria monocytogenes*の運動性に及ぼす影響

中屋 祐子

Effects of NaCl on the motility of *Listeria monocytogenes* in low-temperature environments

Yuko Nakaya

Summary *Listeria monocytogenes* is a causative agent of food-borne infections and is frequently isolated from ready-to-eat foods that do not require heating before eating. Such processing steps, characterized by low temperatures and high saline levels, are considered to be stressful environments for this bacterium; nevertheless, food contamination occurs. This bacterium expresses flagella at 30 °C or below. Since flagella are motor organs but also involved in adhesion, they are thought to contribute to the early stages of contamination. In this study, the author conducted experiments to determine how the presence of NaCl at levels of 0, 4, and 6% affects flagellar motility in cultures at 15°C and 25°C. The results showed flagellar motility even in an environment with 4% NaCl at 15°C and that with 6% NaCl at 25°C, suggesting that flagellar adhesion to food may occur during processing.

Key words: *Listeria monocytogenes*, Ready-to-eat foods, Flagella, Motility, NaCl

I. 緒言

*Listeria monocytogenes*は、食品を介してヒトにリステリア症を引き起こす。リステリア症は日和見感染症であり、特に妊婦が本菌で汚染された食品を摂取した場合には、胎児や新生児に敗血症や髄膜炎などの重篤な感染症を引き起こす。一方、健康な成人への感染は、 10^7 cfu/g程

度に汚染された食品を摂取した場合に、胃腸炎症状として発症するが、それ程重篤ではない¹⁾。

本菌は、自然界に広く分布しているため、乳製品や食肉など様々な食品を汚染する。なかでも、喫食前に加熱を必要としないready-to-eat (RTE) 食品から分離されることが多い。また、これまでに13の血清型が知られており、ヒトリステリア症から検出される血清型は95%以上が

女子栄養大学栄養学部保健栄養学科
〒350-0288 埼玉県坂戸市千代田3-9-21

Department of Health and Nutrition, Faculty of Nutrition,
Joshi-Eiyoh University
3-9-21, Chiyoda, Sakado, Saitama 350-0288, Japan

連絡先：中屋 祐子

女子栄養大学栄養学部保健栄養学科

Tel/Fax: +81-49-282-3716

E-mail: ayuko@eiyo.ac.jp

受付日：2022年2月24日

採択日：2022年3月10日

4b、1/2a、1/2b型であることが報告されている²⁾。

本菌の至適温度は37℃であり、増殖可能温度域は-0.4～45℃と広い。また、至適水分活性は0.99（食塩濃度1.72%相当）であり、増殖可能な水分活性は0.92（食塩濃度11.5%相当）で、耐塩性が高いという特徴もある。さらに、4～5本の周毛性鞭毛を有する。鞭毛は運動器官であるとともに、人工物などへの接着にも関与する。興味深いことに、本菌の鞭毛は37℃で発現が抑制され、30℃以下で発現することが知られている³⁾。従って鞭毛はリステリア症の生体内における病原因子として関与していないと考えられている。

リステリア汚染の頻度が、比較的高いとされているRTE食品にスモークサーモンや明太子がある^{4,5)}。スモークサーモンの加工工程である調味浸漬の際の食塩濃度は、おおよそ4～6%であり、燻乾温度は20～25℃である。また、明太子の加工工程である調味浸漬の際の食塩濃度はおおよそ6%で、漬け込み液の温度は10～15℃である。これらの食品の熟成期間は製造者によって違いはあるが、スモークサーモンでは1週間程度、明太子では1～2日である⁶⁾。本菌の至適温度、至適水分活性から、これらの加工食品や加工工程は、本菌の増殖にとってストレス環境となり得るが、それにもかかわらず食品汚染が生じている。従って、低温かつ高塩濃度の環境下において、接着に関与する鞭毛による運動性を理解することは、食品汚染を防止することに繋がり、それに続くリステリア症を防ぐ手掛かりとなり得る。そこで本研究では、前述のRTE食品の加工工程と同様の条件、すなわち15℃および25℃培養において、かつ、それぞれ0%、4%、6% NaClの存在が⁷⁾、*L. monocytogenes*の運動性にどの様に影響を及ぼすのかについて、各温度下での食塩濃度による違い、および各NaCl濃度での温度による違いを比較検討した。

II. 材料と方法

1. 供試菌株

供試菌株には、基準株として広く用いられている*L. monocytogenes* ScottA血清型4b⁷⁾ および*L. monocytogenes* 052101、053122、600469、600497、920931の計6株を用いた。

2. *L. monocytogenes* 5株における血清型別

リステリア型別用免疫血清「生研」（デンカ生研）の添付文書に従って供試菌5株のO抗原型別およびH抗原型別を行い、血清型を判定した。

3. NaCl加BHI soft agar培地の調製

ブレインハートインフュージョン（BHI）液体培地（栄研化学）に、細菌用寒天（栄研化学E-MJ00）を0.3%になるように加え、これを基礎培地とした（0% NaCl加soft agar）。次いで、この基礎培地に、NaCl（FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp, 特級）をそれぞれ4%および6%となるように加えたsoft agar培地（4% NaCl加soft agarおよび6% NaCl加soft agar）を準備した。各濃度のNaCl加soft agarは、滅菌後、φ87.5 mm（内径85 mm）の滅菌浅型シャーレ（栄研化学AU3100）に注ぎ入れ、一夜静置し固化した。

4. 菌液の調製

供試菌株6株をそれぞれBHI液体培地4 mLに接種し、37℃で一夜培養した。その一夜培養菌液を、分光光度計（GeneQuant pro, Amersham Biosciences Corp.）にて、600 nmの波長で吸光度optical density（OD₆₀₀）を測定し、新たなBHI液体培地を用いて0.6 OD₆₀₀になるように希釈調製した。調製した希釈菌液は、0%、4%、6% NaCl加soft agarに接種するまで氷中に保存した。

5. NaCl加soft agar培地への菌液の接種

0.6 OD₆₀₀に調製した菌液を、0%、4%、6% NaCl加soft agarそれぞれ10枚に接種した。接種位置は、シャーレの中心から半径23 mmの円周上に120度の間隔で3ヶ所とした。菌液を接種する際には、接種位置を印した台紙上にNaCl加soft agar培地の入ったシャーレを載せ、マイクロピペットを用いて印上に3 μLずつ滴下した。滴下後、各NaCl濃度のsoft agarの5枚ずつを、15℃と25℃で培養した。5枚のうち1枚は遊走円直径測定に、4枚は鞭毛染色に使用した。遊走円直径は6つの培養条件において、8、24、32、48、54、72、78、120、126、144、168時間経過後にノギスを用いて測定した。なお、遊走円が歪であった場合には長径と短径の平均を記録した。3ヶ所に接種した遊走円が交差する直前の直径が

38 mmであるため、測定時に直径38 mmを超えた場合には、その前の測定時間の直径を記録した。

6. 遊走円中の細胞における鞭毛有無の確認

鞭毛有無の確認は48、72、120、168時間培養後に行った。遊走円辺縁をスポイトで約100 μ L 吸い3 mLの精製水に入れ、鞭毛に衝撃が加わらないよう穏やかに攪拌した。25 $^{\circ}$ C、3,000 rpm、15分間遠心した後、上清を除去し、新たな精製水3 mLを入れ攪拌した。agarを沈殿させるため10分間静置し、細胞を含む上清を新たな試験管に移した。次いで、鞭毛固定のため10% 中性ホルマリンを500 μ L入れ5分放置した。さらに残存する培地成分とホルマリンを除去するために25 $^{\circ}$ Cで3,000 rpm、15分間遠心した後、上清を除去し、精製水3 mLを入れ攪拌した。この操作を2回行った。最後に菌塊を沈殿させるため20分間放置した。上清5 μ Lをスライドグラスに塗抹し鞭毛染色を行った。鞭毛染色にはLeifson法を用いた⁸⁻⁹⁾。

Ⅲ. 結果

1. 供試菌5株における血清型の判定

Table 1 に供試菌5株における血清型別の判定結果を記した。O抗原型別では、5株すべてにおいて、混合血清I/IIによる凝集は認められなかった。また混合血清V/VIによっては、5株すべてに凝集が認められた。更に、単味血清VI、VII、VIII、IXとの反応では、5株すべてにおいて血清VIにより凝集が認められた。一方、H抗原型別では、5株すべてにおいて血清A、AB、Cによる凝集が認められ、血清Dによる凝集は

認められなかった。以上の結果から、リステリア型別用免疫血清「生研」添付文書に記載されている被検菌の血清型の決定表より、5株ともに血清型4bと判定した。

2. 15 $^{\circ}$ Cと25 $^{\circ}$ C培養における各NaCl加soft agarでの*L. monocytogenes*の遊走円直径の経時的变化

供試菌6株について15 $^{\circ}$ Cおよび25 $^{\circ}$ C培養における0%、4%、6% NaClでの遊走円直径の経時的变化をFig. 1に示した。6株全てにおいて15 $^{\circ}$ C培養の0%、4% NaClおよび25 $^{\circ}$ C培養の0%、4%、6% NaClでは、時間の経過に伴って遊走円の広がりが増大した。一方、15 $^{\circ}$ C培養の6% NaClではScottA株でわずかに遊走円の広がりが増大したものの、他の5株の遊走円の広がりほとんど認められなかった。なお、25 $^{\circ}$ C培養の0% NaClでは全ての株において120時間経過後の測定で直径38 mmを超えたため、78時間までの測定結果を示した。

6つの培養条件における遊走円直径を比較するために遊走円が13 mmに達する時間の6株の平均をTable 2示した。なお13 mmに達する時間はFig. 1に基づく近似曲線より求めた。いずれの温度下においても13 mmに達する時間はNaCl濃度に依存して長く、また、同じNaCl濃度においては15 $^{\circ}$ Cより25 $^{\circ}$ Cの方が短かった。

3. 15 $^{\circ}$ Cと25 $^{\circ}$ C培養における各NaCl濃度での遊走円と鞭毛有無の確認

Fig. 2に6株の最終測定時の遊走円と鞭毛染色の結果を示した。なお、25 $^{\circ}$ C培養の0% NaClは前述したとおり120時間で直径38 mmを超えた

Table 1 Serotype determination of the 5 test strains by O-antigen and H-antigen typing

株番号	O 抗原型別				判定	H 抗原型別				判定	血清型
	混合血清 I / II	混合血清 V / VI	単味血清 VI, VII, VIII, IX	判定		血清 A	血清 AB	血清 C	血清 D		
052101	-	+	VI	VI	+	+	+	-	ABC	4b	
053122	-	+	VI	VI	+	+	+	-	ABC	4b	
600469	-	+	VI	VI	+	+	+	-	ABC	4b	
600497	-	+	VI	VI	+	+	+	-	ABC	4b	
920931	-	+	VI	VI	+	+	+	-	ABC	4b	

Table 2 Time for the migration circle diameter on soft agar to reach 13 mm under each culture condition

培養温度	NaCl (%)	13 mm に達する時間 (h) *	SD
15°C	0	74	6
	4	142	9
	6	372	67
25°C	0	25	2
	4	53	9
	6	134	27

* The time to reach 13 mm is the mean value of 6 strains.

ため、鞭毛染色を行った最終時間である72時間培養後の遊走円と鞭毛染色の結果を示した。15°C培養の6% NaClにおいて、いずれの株でも遊走円辺縁は濃く明瞭であり、遊走円中に鞭毛は認められなかった。一方、他の培養条件では、いずれの株も遊走円辺縁はびまん性であり、遊走円中に鞭毛が認められた。

IV. 考察

*L. monocytogenes*によって汚染される頻度の高いRTE食品は低温で加工され、食塩濃度が比較的高い。このような環境は本菌の増殖にとってストレスな環境にもかかわらず食品汚染が生じている。

本研究では、これらの食品の加工環境と同様の培養条件、すなわち15°Cと25°C培養において、それぞれ0%、4%、6% NaClの添加が、本菌の運動性にどの様に影響を及ぼすかについて、各温度下でのNaCl濃度による違いおよび各NaCl濃度での温度による違いを比較検討した。その結果、遊走円の広がりほとんど認められなかった15°C培養の6% NaClを除く全ての培養条件において最終の遊走円直径測定時に6株共に遊走円から鞭毛を有する細胞が確認された (Fig. 2)。従って、遊走円の拡大は鞭毛によるものと示唆された。また、遊走円が13 mmに達する時間の比較により鞭毛による運動性は、25°Cで、至適水分活性に近い条件の方が適していると考えられる。しかし、言い換えれば、15°C培養の6% NaClを除く培養条件のうち、13 mmに達する時間が最も長かった15°C培養の4% NaClの条件下であっても鞭毛の存在が確認されたこと

は、RTE食品および設備機器への鞭毛による接着が生じ得る可能性があることを示唆している。

Vatanyoopaisarnらは¹⁰⁾、22°Cで野生株は鞭毛欠失株より10倍高くステンレスに接着したことを明らかにし、また、Calyらは¹¹⁾、20°Cにおける0%と6% NaClの存在下で鞭毛が認められ、プラスチックやステンレスに接着したことを示し、なかでもScottA株は他の株より、より接着したと述べている。さらに、鞭毛が観察されなかった株や鞭毛発現が抑制された11% NaClの存在下では接着がほとんど認められなかったと報告している。

Calyらと実験条件は異なるものの、本研究では15°C培養における0%、4% NaClおよび25°C培養における0%、4%、6% NaClの条件下で鞭毛が認められ、実験条件の中で本菌にとって最もストレスな条件である15°C培養の6%NaClで鞭毛が認められなかったことは、Calyらの報告と関連性があると推察する。

RTE食品は低温で比較的高濃度の食塩の存在下で加工され、さらに熟成期間が長いものも少なくない。本研究においてデータは示していないが、25°C培養の6% NaClの条件下で、ScottA株以外の5株は48時間と72時間では鞭毛は認められなかったものの、120時間と168時間では鞭毛が認められた。また、15°C培養の4% NaClの条件下においても全ての株ではないが、同様の傾向が認められた。低温で高濃度の食塩の存在下においては、遅い増殖に伴う鞭毛発現によって熟成期間中に汚染される可能性もあり得る。一方、ScottA株はいずれの条件下でも48時間から鞭毛が認められ、他の5株よりも早い段階において鞭毛発現が良好であり、ScottA株と他5

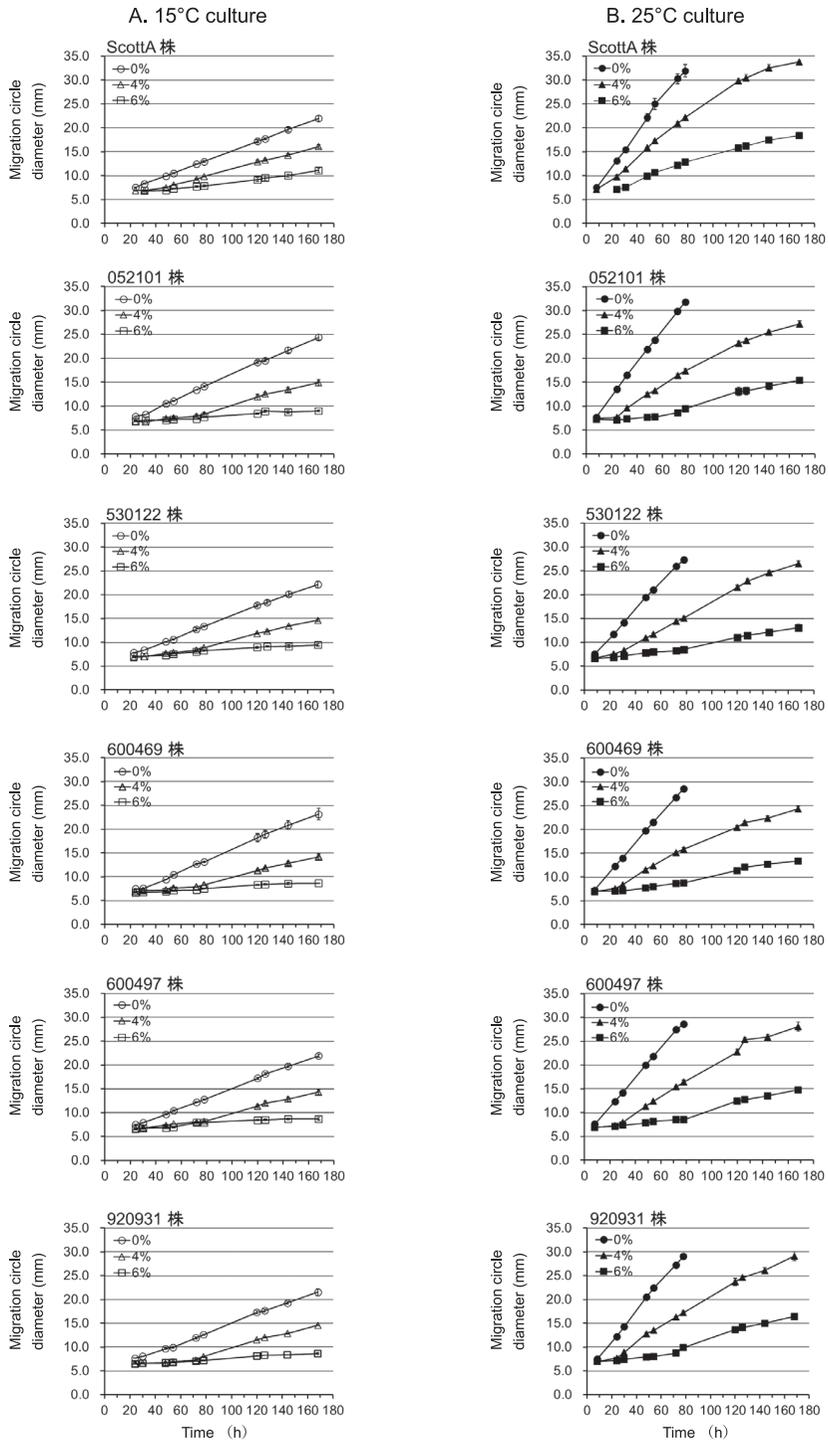


Fig. 1 Changes over time in the migration circle diameter of *Listeria monocytogenes* under condition (A): 15°C culture of soft agar added with 0%, 4%, and 6% NaCl, and condition (B): 25°C culture of soft agar added with 0%, 4%, and 6% NaCl. The migration circle diameter at each measurement time represents the mean value \pm SD of 3 experiments.

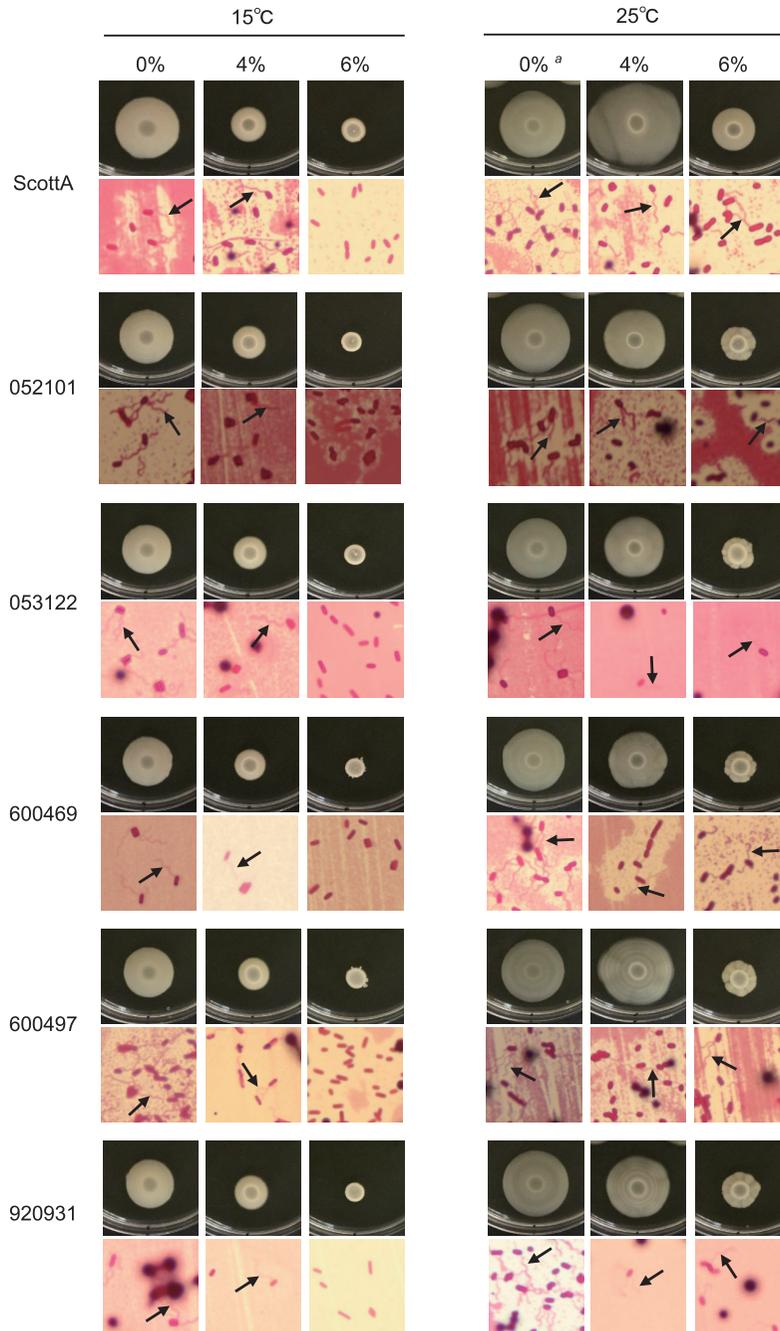


Fig. 2 Migration circles and flagellar staining at 168 hours in 15°C and 25°C cultures of soft agar, with 0%, 4%, and 6% NaCl added to each. Arrows indicate flagella.
^a All 6 strains of 25°C cultures with 0% NaCl show migration circles and flagellar staining at 72 hours.

株において鞭毛発現に差がある様に思われた。

本実験に用いたScottA株以外の5株は研究室に保存されていた*L. monocytogenes*であり、5株中4株は髄液由来、1株は胸水由来である。しかしこれらの株は臨床的背景が乏しく、また全て血清型4bであり、これらにおける株間の比較には至らなかった。今後、*L. monocytogenes*が分離された背景が明らかな株や異なる血清型について低温、かつ、NaClの添加が鞭毛の発現に伴う運動性にどの様に影響を及ぼすかを比較する必要があると考える。

V. 結語

RTE食品は*L. monocytogenes*による汚染頻度が高い。これらの食品の加工環境と同様である15℃培養の4% NaClや25℃培養の6% NaClの条件下において168時間培養後でも鞭毛の発現が認められたことからRTE食品や設備機器への本菌による汚染に鞭毛が関与している可能性があることが示唆された。

VI. 謝辞

本研究に際し、遊走円の測定についてご教示いただきました女子栄養大学 林 修 名誉教授に深謝致します。また、soft agar上の遊走円の写真撮影のご指導をいただきました栄研化学株式会社 竹下康之氏に感謝申し上げます。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

文献

1) World Health Organization : Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-eat Foods: Technical Report. Microbiological Risk Assessment series 5. 8-12, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2004).

- 2) Kathariou S: *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. J Food Prot, 65: 1811-1829, 2002.
- 3) Peel M, Donachie W and Shaw A: Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. J Gen Microbiol, 134: 2171-2178, 1988.
- 4) 原やす子, 和泉澤真紀, 石井久美子, 阿部晃久, 大橋英治, 丸山務: わが国におけるReady-to-Eat水産食品の*Listeria monocytogenes*汚染. 日本食品微生物学会雑誌, 20: 63-67, 2003.
- 5) 菅原直子, 佐々木ひとえ, 加藤浩之, 小林妙子, 渡邊節, 山田わか, 谷津壽郎, 斎藤紀行: *Listeria monocytogenes*によるready-to-eat食品の汚染実態. 宮城県保健環境センター年報, 25: 45-48, 2007.
- 6) 福田裕, 山澤正勝, 岡崎恵美子 監修: 全国水産加工品総覧. 341-578, 光琳 東京(2005).
- 7) Briers Y, Klumpp J, Schuppler M and Loessner MJ: Genome Sequence of *Listeria monocytogenes* Scott A, a Clinical Isolate from a Food-Borne Listeriosis Outbreak. J Bacteriol, 193: 4284-4285, 2011.
- 8) Leifson E: Staining, shape and arrangement of bacterial flagella. J Bacteriol, 67: 377-389, 1951.
- 9) 藪内英子: ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌. 日常検査シリーズ, 14: 29-46, 1977.
- 10) Vatanyoopaisarn S, Nazli A, Dodd CER, Rees CED and Waites WM: Effect of Flagella on Initial Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel. Appl Environ Microbiol, 66: 860-863, 2000.
- 11) Caly D, Takilt D, Leuret V and Tresse O: Sodium chloride affects *Listeria monocytogenes* adhesion to polystyrene and stainless steel by regulating flagella expression. Lett Appl Microbiol, 49: 751-756, 2009.