

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：82601  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K12928  
研究課題名(和文) 食品製造環境におけるリステリアのバイオフィーム形成機構の探知と制圧に向けた研究  
  
研究課題名(英文) Studies on the molecular basis and control on the biofilm formation of *Listeria monocytogenes* at food manufacture environments  
  
研究代表者  
山本 詩織 (Yamamoto, Shiori)  
  
国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部・研究助手  
  
研究者番号：40795291  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、食品加工・調理施設における *Listeria monocytogenes* のバイオフィーム形成による食品汚染が問題視されていることを鑑み、当該形成能に関与する環境因子の探索と遺伝子発現プロファイルの構築を通じ、その形成基盤及び誘引機構に関して検討した。多様な由来源から得られた171株のバイオフィームアッセイにより、菌株間多様性及び温度依存性挙動が示された。その内、低温環境下での当該形質の有意な減少には付着性因子の関与が示され、同時に細胞表面疎水性が低く、物質表面への付着性が弱いことが示唆された。また、当該形質では、14個の遺伝子が浮遊細胞よりも10倍以上高く発現していた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

食品加工・調理施設における *L. monocytogenes* のバイオフィーム形成は食品への持続汚染を誘起する一因と目されており、その制御が必要とされている。本研究の遂行を通じて、低温環境下における当該形成能の特性に加え、当該形成に伴う遺伝子発現プロファイルを明らかにできた。本成果は、環境生態学観点からの当該形成機構の解明及び新規バイオフィーム制御技術の確立に繋がるアプローチの一つであり、食品衛生管理における重要な基礎的学術知見となると共に、バイオフィーム形成制御に向けた活用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in food manufacturing environments results in the contamination of food and is therefore a cause for concern. This study aimed at understanding the molecular basis and attractant mechanisms, through to clarify the environmental factors that influence biofilm formation and to construct of gene expression profiles. A total of 171 *L. monocytogenes* isolates from various food specimens were subjected to biofilm quantification, and showed diversity and a temperature dependent behavior. Biofilm formation decreased at low temperatures and was associated with the adhesion factor. The strains also showed low cell surface hydrophobicity, suggesting poor adhesion to material surfaces. In addition, expression of 14 genes was found to be higher (> 10 fold) in the biofilm-forming cells than in the planktonic cells.

研究分野：食品衛生学

キーワード：*Listeria monocytogenes* バイオフィーム 温度 遺伝子発現

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

バイオフィームは環境微生物における生存戦略の一つであり、生存性やストレス・薬剤等耐性の上昇を引き起こす。食品衛生分野では、バイオフィームに伴う課題として、*Listeria monocytogenes* による食品加工・調理施設での長期的生存への寄与が想定されており、実際に過去に複数の事例が報告されている。*L. monocytogenes* は易感受性者に菌血症、敗血症、流産等の重篤な症状を呈すると共に高い致死性を顕すことが知られており、公衆衛生上、注視すべき病原体の一つである。本菌は生ハムやチーズ、魚介類加工品等の非加熱喫食食品において広く存在し、冷蔵温度下で増殖することが可能であることから、食品汚染を介したヒト健康危害を招く。食品加工・調理施設での本菌によるバイオフィーム形成は、食品への持続汚染を誘起する一因と目され、食中毒発生へと繋がる危険性を有することから、この制御が必要とされている。

バイオフィームは一度形成すると完全除去が難しく、それには食品の表面構造の複雑さ、又は菌体外多糖による洗浄剤等の浸透しにくさに関与している。バイオフィームの形成阻害として、細菌の付着を押さえる成分の探索や、付着しにくい材料表面の開発等が試みられており、その一例として、過酢酸及びナイシンといった消毒剤や、界面活性剤であるシヨ糖脂肪酸エステルが *Listeria monocytogenes* のバイオフィーム形成を抑制することが報告されている。しかしながら、これらの阻害では一定の効果があるものの、バイオフィーム形成能は浮遊細胞が付着するための物質表面の構造・素材によって変化することから、長期間効果を持続させるのは困難である。また、食品加工施設では次亜塩素酸、過酢酸、過酸化水素等の消毒剤が実際に用いられているが、これらも前述同様に効果は低い。このように、これまでのバイオフィーム形成制御では化学的刺激による浮遊細胞の付着を抑制する手法としての新たな成分の探索・製造・開発が一般的であり、環境生態学的観点からの当該形成機構の解明及び新規バイオフィーム制御技術の確立につながる新たなアプローチを行うことは、当該形質によるヒト健康危害の低減への貢献が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、*L. monocytogenes* のバイオフィーム形成による健康危害への影響の低減を目指し、本菌におけるバイオフィーム形成機構を探知すると共にその制圧に向けた研究を行った。バイオフィーム形成に関与する環境因子の探索と遺伝子発現プロファイルの構築を通じ、バイオフィーム形成基盤に関与する基礎的知見の集積とそれに伴う同表現形質の誘引機構の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) バイオフィーム形成能の菌株間多様性の把握

バイオフィーム形成能の菌株間多様性の把握し、当該形成能による分類を行うため、ヒト臨床、動物、食品、及び環境由来から分離した *L. monocytogenes* 計 171 株を供試菌株とし、バイオフィームアッセイに供した。バイオフィームは HTM 培地を用いて 30 及び 37 下で 72 時間培養することで形成させ、クリスタルバイオレット染色法を用いて定量を行った。

#### 2) 低温環境下におけるバイオフィーム形成能の特性解析

食品加工・調理施設では血清型 1/2a 株が比較的多く検出される傾向があることを鑑み、上記 1) で高バイオフィーム形成を示した血清型 1/2a 株を選択し、5 及び 37 下で形成されたバイオフィームについて、クリスタルバイオレット染色法によるバイオフィームアッセイを行った。また、付着性に関連する遺伝子群について、リアルタイム PCR による遺伝子発現量の定量を行った。細胞表面の物理化学的性質の変化を調べるため、シトクロム c 結合アッセイによる表面電荷、及び Microbial adhesion to solvents (MATS) analysis による細胞表面疎水性の変化量を測定し、比較した。

#### 3) バイオフィーム形成に伴う遺伝子発現プロファイルの構築

ヒト病態発現に関わる血清型としては 4b が多く報告されており、このことから上記 1) で高バイオフィーム形成を示した血清型 4b のヒト臨床由来 *L. monocytogenes* 菌株 2 株を選択し、浮遊細胞・バイオフィーム形成細胞について次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析に供した。解析には CLC Genomics Workbench を用い、各遺伝子発現量の比較解析を行った。

### 4. 研究成果

多様な由来源から得られた *L. monocytogenes* 菌株 171 株のバイオフィーム形成能を比較したところ、分離の由来や菌株毎の形質によって当該形成能が多様化していることが明らかになった。30 及び 37 間におけるバイオフィーム形成能を比較すると、30 下における形成能の方が有意に高く認められた ( $P < 0.01$ )。特に形成能が高く見られた血清型 1/2a の 7 株について、5 下における当該形質を評価したところ、37 下に比べて形成能は有意に低い結果となった ( $P < 0.01$ )。これらの菌株について、付着性因子関連遺伝子として既知である *dltA*、*agrA*、及び *inlAB* 遺伝子について 5 及び 37 下におけるバイオフィーム形成細胞の遺伝子発現量を比較したところ、5 下の当該形質細胞において *dltA* 遺伝子が増加傾向にあった。細胞表面の物理化学的性質として、表面電荷は 5 及び 37 間で差異は認められなかったが、細胞表面疎水性については 37 下で溶媒親和性が有意に増加するのに対し ( $P < 0.01$ )、5 下では差異が認められな

った。すなわち、低温環境下では細胞表面疎水性が低く、物質表面への付着性が弱いことが考えられ、これがバイオフィーム形成能の減少に関与している可能性が示唆された。また、バイオフィーム形成に伴う遺伝子応答の検討として、トランスクリプトーム解析による遺伝子発現プロファイルの構築を行ったところ、14 個の遺伝子について、浮遊細胞時に比べてバイオフィーム形成細胞時の方が遺伝子発現量が 10 倍以上高く認められた。

以上より、低温環境下におけるバイオフィーム形成能の特性に加え、当該形成に伴う遺伝子発現プロファイルを明らかにできた。本成果は環境生態学的観点からのバイオフィーム形成機構の解明及び新規バイオフィーム制御技術の確立に繋がる新たなアプローチの一つとなり、食品衛生管理における重要な基礎的学術知見となると共に、バイオフィーム形成制御に向けた活用も期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto S., Nakayama T., Asakura H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Draft genome sequence of <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CRB139-1, isolated from poultry meat in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00075-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MRA.00075-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山本詩織、森 篤志、朝倉 宏	4. 巻 47
2. 論文標題 国内市販鶏挽肉におけるカルバペネム耐性菌の汚染実態調査	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本防菌防黴学会誌	6. 最初と最後の頁 47-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 窪 亜紀、川端舞香、川村研二、古木孝二、谷内正人、二川眞子、井上慎也、中澤佑介、山本詩織	4. 巻 7
2. 論文標題 男性外来患者における基質特異性拡張型 $\beta$ -ラクタマーゼ（ESBL）産生菌の直腸内長期保菌について	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 恵寿総合病院医学雑誌	6. 最初と最後の頁 21-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本詩織、中山達哉、朝倉 宏
2. 発表標題 市販猪肉由来大腸菌の薬剤耐性汚染実態と分離株の遺伝特性について
3. 学会等名 第40回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本詩織、朝倉 宏
2. 発表標題 低温加熱調理を通じた鶏肉における微生物汚染低減効果に関する検討
3. 学会等名 日本食品衛生学会第115回学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本詩織、朝倉 宏
2. 発表標題 鶏肉におけるカルバペネム耐性菌汚染実態及び <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 分離株のゲノム特性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本詩織、川村研二、朝倉 宏
2. 発表標題 外来患者由来ESBL産生大腸菌の分子遺伝学的特性について
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本詩織、川村研二、朝倉 宏
2. 発表標題 外来患者由来ESBL産生大腸菌の分子遺伝学的特性について
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本詩織、関 享子、朝倉 宏
2. 発表標題 低温加熱調理を通じた鶏肉における微生物汚染低減効果及び検体中心温度推移に関する検討
3. 学会等名 日本食品衛生学会第114回学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本詩織、森 篤志、朝倉 宏
2. 発表標題 国内市販鶏挽肉におけるカルバペネム耐性腸内細菌科菌群の汚染実態に関する検討
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第45回年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本詩織、朝倉 宏
2. 発表標題 <i>Listeria monocytogenes</i> のバイオフィルム形成に及ぼす温度影響とその特性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 詩織、朝倉 宏
2. 発表標題 <i>Listeria monocytogenes</i> のバイオフィルム形成に及ぼす温度影響とその特性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第32回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本詩織、朝倉 宏、石井良和、五十君静信
2. 発表標題 国内の市販鶏肉から分離されたバンコマイシン耐性Enterococcus gallinarumのフルオロキノロン耐性について
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本詩織、朝倉 宏
2. 発表標題 国内市販鶏肉におけるArcobacter butzleriの汚染実態とCampylobacter jejuniへのフルオロキノロン耐性伝播について
3. 学会等名 第113回日本食品衛生学会学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考