

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580274

研究課題名(和文) 水産食品におけるバクテリオシン耐性リステリア菌の動態と制御に関する研究

研究課題名(英文) Study of characteristics and control of bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* in seafood

研究代表者

山崎 浩司 (YAMAZAKI, KOJI)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：40250500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：水産食品でのリステリア制御へのバクテリオシン利用時に問題となる耐性獲得リステリアの性質とバクテリオシンによるリステリア制御に関する研究を行った。リステリアにおけるナイシン耐性は、ナイシンと菌体間の親和性低下が主な要因であること、また細胞膜に存在するタンパク質および細胞壁ペプチドグリカン構造の変化も関与していることが推察された。水産食品におけるリステリアの制御法では、ナイシンとペクチン分解物製剤の併用によって優れた発育抑制のできることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study was investigated the characterization of bacteriocin-resistant *Listeria monocytogenes* and the development of inhibition method using bacteriocin (nisin A) against *L.monocytogenes* in seafood products. Nisin-resistant *L.monocytogenes* showed that the affinity between the cell surface of the resistant strains and nisin molecule was reduced, compared with those of wild strains. And protein profiles on the cytoplasmic membrane and the structure of peptidoglycan layer of the nisin-resistant strains would be also changed. The combination of nisin A and pectin digests was effective for the control of *L.monocytogenes* growth in raw salmon roes seasoned with soy-sauce at refrigeration temperature, suggesting that the combination of them will be a promising tool to ensure food safety to *L.monocytogenes* contamination in seafood.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：リステリア ナイシン バクテリオシン 耐性菌

### 1. 研究開始当初の背景

リステリア(*Listeria monocytogenes*)は、死亡率の極めて高い大規模なヒトのリステリア症を引き起こす食中毒原因菌として、世界的に食品衛生上、最も重要視されている細菌の一つである。欧米では毎年、本菌による食中毒事故が発生し、また加工食品から多数検出され、食品リコールの対象となりその経済的損失も極めて大きい。

日本では、現在まで本菌による食中毒が発生していないため、欧米諸国と比較してリステリアに対する制御対策は依然として遅れている。申請者はこれまでに、日本で流通する水産食品のリステリア汚染状況を調べ、欧米と同頻度に汚染されていることを明らかにした(*Fish. Sci.*, 66, 1193-1195, 2000)。さらに、非加熱状態で摂食する機会の多い水産食品では、諸外国の例のようにリステリアによる集団食中毒の発生も危惧されるため、リステリアの動態解明と食習慣に適合した制御法の確立が急務と考え、これまでに(1)海水中でリステリアは培養できないが生存している状態(VNC)となり得ること、(2)水産発酵食品でのリステリアは、共存微生物の種類によって生残性が変化すること、(3)水産食品からリステリアに対して特異的に抗菌効果を発揮する乳酸菌を分離し、その抗菌物質(バクテリオシン)の構造を決定し、さらに抗菌作用機構の解明を行った。(4)リステリアを含む食品変敗菌制御にバクテリオシンが有効であることを明らかにしてきた。以上、リステリアの食品での制御に申請者が見出した新規バクテリオシンおよび既存 Nisin A の利用が有望であることを明らかにしてきたが、その実用化(使用許可の取得)にあたっては、これらバクテリオシン使用時に出現する可能性のあるバクテリオシン耐性菌に関する知見とその制御法の確立が必須であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、リステリアによる食中毒リスクの高い水産食品でのリステリア制御へ乳酸菌の産生する抗菌ペプチドであるバクテリオシンを積極的に利用しようとするものである。特に、バクテリオシン使用時に問題となる耐性獲得リステリアに焦点を当て、その性質や耐性獲得機構を調べ、水産食品の安全性確保のためのバクテリオシン利用の有効性を示すとともに、水産食品へのバクテリオシン使用許可を得るための基礎的な知見の獲得を目指すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試菌株

本実験では、ナイシン感受性菌として *L.monocytogenes* ATCC19114、ATCC 19115、ATCC7644、FTHU3609、FTHU4401、FTHU6502、IID577、IID578、IID580、

IID581、L57-1、Oka323、Oka1684 および U59-1 を使用した。これらの菌株は、0.5%酵母エキスを追加した Tryptic Soy Agar (TSAYE)で 30 培養後、実験に使用するまで 4 で保存した。また、0.5%酵母エキスを追加した Tryptic Soy Broth(YSBYE)で 30、18 時間培養したものを新鮮培養菌液として以後の実験に供した。

#### (2) ナイシン溶液の調製

ナイシン(2.5% Nisin A 含有、Sigma)を 0.02M HCl に Nisin A として 250  $\mu$ g/ml となるように溶解し、濾過滅菌(ミリポア PVDF フィルター、孔径 0.45  $\mu$ m)したものをナイシン溶液とした。

#### (3) ナイシン耐性リステリアの作出

50  $\mu$ /ml Nisin A を含有した TSA (Ni-TSA) に、*L.monocytogenes* を  $10^6 \sim 10^9$ CFU/ml となるように接種し、30、48 時間培養した。発育コロニーを 50  $\mu$ g/ml Ni-TSA に塗抹・培養した。この操作を 5 回繰り返し、最終的に発育したコロニーをナイシン耐性リステリアとした。

#### (4) 耐性獲得頻度の測定

*L.monocytogenes* の新鮮培養菌液 1ml を集菌洗浄後、0.1%ペプトン含有リン酸緩衝生理食塩水(PBS)900ml に再懸濁した。さらに、最少発育阻止濃度(MIC)の 2 または 4 倍となるようにナイシン溶液を 100  $\mu$ l 添加し、室温で 1 時間保持後、25  $\mu$ l/ml Ni-TSA 平板培地に塗抹した。30、48 時間培養後、生菌数を測定した。耐性獲得頻度は、25  $\mu$ g/ml Ni-TSA 平板培地の生菌数のナイシン非含有 TSA 平板培地での生菌数に対する比率として算出した。

#### (5) 耐性リステリアの発育特性試験

*L.monocytogenes* ATCC7644、IID579 および IID580 とそのナイシン耐性菌(ATCC7644<sup>NR</sup>、IID579<sup>NR</sup>、IID580<sup>NR</sup>)の新鮮培養菌を pH の異なる TSBYE (pH 4.5 ~ 7.0)、食塩濃度の異なる TSBYE (NaCl 終濃度 3% および 10%、pH7.0) に  $10^5$ CFU/ml となるよう接種し、バイオフォトレコーダー(TN-1506、アドバンテック)を用いて 30、20rpm で培養し、660nm における吸光値を経時的に測定した。また、測定した吸光値は、生菌数に換算した。同様に、 $10^5$ CFU/ml となるように菌を接種した TSBYE を 4、8、20、37 で培養し、TSAYE を用いた平板塗抹法(30、48 時間)による生菌数を測定した。得られた生菌数結果から、Baranyi ら(*Int. J. Food Microbiol.*, 23, 277-294, 1994)のモデル式に基づくソフトウェアである MicroFit version 1.0 (Institute of Food Research, UK)を用いて最大比増殖速度( $\mu$  max)および誘導時間を算出した。

(6) 各種食品添加物に対する感受性試験

食品添加物には乳化剤、有機酸および有機酸塩、既存保存料など 12 種類を使用した。すなわち、乳化剤にはショ糖モノパルミチン酸エステル、ショ糖モノミリスチン酸エステル、ショ糖モノラウリン酸エステル、有機酸類には乳酸、クエン酸、酢酸ナトリウム、ソルビン酸カリウム、安息香酸ナトリウム、またその他の食品添加物にはリゾチーム、ポリリジン、プロタミン、チアミンラウリル硫酸およびペクチン分解物製剤(ノイペクチンL)を使用した。各々の薬剤は 1M HCl で pH5.0 または pH7.0 に調整した PBS に 10 μg/ml となるように溶解・希釈後、濾過滅菌したものを食品添加物容器として以後の実験に使用した。

各薬剤の MIC は、96 穴マイクロプレートの各ウェルに、1M HCl で pH5.0 または pH7.0 に調整した 0.04mg/ml メチルオレンジまたはフェノールレッド含有 TSBYE を注入後、液体培地希釈法によって測定した。なお、培養条件は各ウェルに *L.monocytogenes* の親株(ATCC7644、IID578、IID580) またはその耐性株を 10<sup>6</sup>CFU/ml となるように接種後、30、48 時間培養し、培地の色調変化および菌の発育状態から MIC 値を決定した。

(7) 各種抗生物質に対する感受性試験

*L.monocytogenes* の親株(ATCC7644、IID578、IID580) またはその耐性株の新鮮培養菌液を McFarland 0.5 となるように PBS に懸濁し、滅菌綿棒を用いて TSAYE 平板培地に塗抹した。その後、直ちに抗生物質を含有した SN ディスク(アンピシリン、ノボピオシン、ポリミキシン B、コリスチン、エリスロマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、トブラマイシン、バンコマイシンおよびスルファメトキサゾール/トリメトプリム)を平板上に配置し、30、24 時間培養した。感受性の有無は、ディスク周囲に形成された発育阻止円の直径からディスク直径を減じた値をもって評価した。

(8) ナイシン吸着率の測定

*L.monocytogenes* 菌体へ Nisin A を一定時間作用させた後、培地上清中に残存する Nisin A 量を定量し、菌体への Nisin A 吸着率を評価した。なお、Nisin A の定量は Rogers & Montville (*Food Biotechnol.*, 5, 161-168, 1991) の方法を一部改変して行った。

(9) 菌体へのシトクロム C の吸着率測定

*L.monocytogenes* の新鮮培養菌体を 29nM MOPS 緩衝液(pH7.0)に懸濁後、シトクロム C を 0.5ng/ml となるように菌懸濁液に加え、室温で 10 分間保持した。これを遠心分離(13,000xg、5 分間)後、未吸着の

シトクロム C を含む上清の 530nm における吸光値(A)を測定し、菌未接種区(対照)における吸光値を A<sub>0</sub>としてシトクロム C 吸着率を次の式に基いて算出した。[吸着率(%) = (1-A/A<sub>0</sub>) × 100]

(10) 菌体表面疎水性の測定

供試菌株の菌体表面層水性は、新鮮培養菌体を 660nm における吸光値が 0.6 となるように PBS に懸濁後、この菌液 2ml に n-ヘキサデカン 1ml を加え、激しく 60 秒間混和し、そのご 30 分間静置後、水相の 660nm での吸光値を測定した。菌体表面疎水性(%)は、n-ヘキサデカン添加前の菌懸濁液吸光値を A<sub>0</sub>として、水相から有機溶媒相への菌体移行吸着率として表し、次の式から算出した。[総水性度(%) = (1-A/A<sub>0</sub>) × 100]

(11) 溶菌酵素に対する感受性試験

供試菌株の新鮮培養菌体を滅菌生理食塩水を適宜希釈し、溶菌酵素溶液に 10<sup>6</sup>CFU/ml となるように接種した。30、30 分間保持後、0.1%ペプトン含有 PBS で適宜希釈後、TSAYE 平板培地に塗抹した。30、48 時間培養後、生菌数を測定した。溶菌酵素の抗菌活性は、滅菌生理食塩水を用いた試験区(対照)に対する溶菌酵素溶液処理区における *L.monocytogenes* の生菌数の減少量から評価した。なお、溶菌酵素にはラビアーゼ(生化学工業)、アクロモペプチダーゼ(和光純薬)、卵白リゾチーム(太陽化学)の 3 種類を使用し、各々 1mg/ml となるように溶解した酵素溶液を濾過滅菌したものを使用した。

(12) 菌体タンパク質の調製と電気泳動

供試菌株の新鮮培養菌体を 50mM Tris-HCl 緩衝液(pH8.0)を用いて集菌・洗浄後、超音波破砕機(ソニケーター 5202PZT、大岳製作所)を用いて氷冷下で超音波処理(20W、60 秒間)した後、遠心分離(14,000xg、5 分間、4 )して得られた上清を試料 I とした。一方、沈殿物に溶解バッファー[9M 尿素、2%CHAPS、2% Triton X-100、2%ジチオスレイトール、2% IPG バッファー(pH3-10), pH8.8]を 1ml 添加し、さらに Protease inhibitor mix と DNase-RNase (GE Healthcare Bioscience)を各々 1%となるように添加した。氷冷下で再度超音波処理後、遠心分離によって細胞残渣を除去して得られた上清を試料 II とした。抽出した菌体タンパク質の電気泳動は、ATTO ミニスラブ電気泳動装置と 10%ポリアクリルアミドゲルを用い、SDS-PAGE を行った。タンパク質の検出は銀染色法(銀染色 II キットワコー、和光純薬)によって行った。

(13) 食品におけるリステリアの制御

供試菌株には *L.monocytogenes* ATCC7644、IID578 および IID580 を使用した。市販のサケ生筋子を函館市内の小売店が

ら購入し、卵粒（イクラ）を取り出し、冷塩水（塩分濃度 3%）でよく洗浄したものを調味液（薄口醤油：みりん：水 = 3:1:1 を加熱してエタノールを除去し、塩分濃度 3%となるように滅菌水で希釈）とイクラの割合が 2:1 (v/w) となるように調味液に加えて低温（4℃）で 1 時間味付け後、余剰の調味液を液切りして調味イクラを得た。これらサケ生卵および調味イクラにナイシンおよびペクチン分解物製剤を各々 0.5mg または 0.5% となるように添加し、静かによく混合後、4℃で 1 時間保存した。これに、*L.monocytogenes* の 3 株混合菌液を接種初発量  $2.2 \log\text{CFU/g}$  となるように接種し、12℃で保存しながら生菌数を測定した。*L.monocytogenes* の生菌数はクロモカルト・リステリア選択寒天培地（Merck）を用いて 37℃、24 時間ならびに一般生菌数は TSAYE 寒天平板培地を用いて 30℃、24 時間培養後平板上に出現したコロニー数から算出した。なお、サケ生卵および調味イクラの pH および塩分濃度は、pH メータ（B212、堀場）および Mohr 法によって測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ナイシン耐性出現頻度

最少発育阻止濃度（MIC）の 4 倍となるようにナイシン A を含有した Ni-TSB に *L.monocytogenes* を接種した時の生残率から耐性出現頻度を算出した結果、ナイシンの MIC 値が  $7.81 \mu\text{g/ml}$  であった IID577 株の耐性出現頻度は  $1.2 \times 10^{-6}$ 、MIC 値が  $1.95 \mu\text{g/ml}$  であった ATCC7644 株の耐性出現頻度は  $1.0 \times 10^{-8}$  以下となり、リステリアのナイシン感受性が高いほど耐性出現頻度は小さくなることが認められた。

##### (2) ナイシン耐性リステリアの作出および発育動態調査

$50 \mu\text{g/ml}$  ナイシン含有培地（Ni-TSA）に *L.monocytogenes* を接種し、平板上に出現したコロニーから 45 株のナイシン耐性リステリアを得た。耐性強度の違いから選抜した 3 株の発育特性について、TSBYE での低温発育挙動、培養 pH および NaCl 濃度の影響を調べた。その結果、ナイシン耐性リステリアの低温下（4℃ および 8℃）、酸性下（pH5.0 および 6.0）および NaCl 高濃度存在下（3% および 10%）での誘導時間および最大比増殖速度は、親株のそれらと同等もしくは遅くなり、ナイシン耐性獲得に伴った発育特性の特筆すべき変化は認められなかった。

##### (3) ナイシン耐性リステリアの各種薬剤感受性の検討

ナイシン耐性リステリアに対する各種食品添加物および種抗生物質に対する感受性を検討した結果、ナイシンへの耐性強度によらず、ナイシン耐性リステリアの卵白リゾチ

ーム、 $\beta$ -ポリリジン、プロタミンに対する感受性が著しく低下し、タンパク質性の抗菌物質に対して交叉耐性を獲得していることが明らかになった。一方、非タンパク質性の抗菌物質であるソルビン酸カリウムに対する感受性は変化していなかった。また、すべてのナイシン耐性リステリアにおいて、ポリミキシン B に対する感受性が低下したが、アンピシリンやテトラサイクリンに対しては菌株ごとに異なる感受性変化が認められ、異なる耐性機構を有している可能性が示唆された。

##### (4) ナイシン耐性リステリア菌体とナイシンとの相互作用

ナイシン耐性リステリア菌体とナイシンとの相互作用を調べたところ、ナイシン耐性株へのナイシンの吸着量は、親株よりも減少していた。また、ナイシン耐性株における菌体表面電化の状況をチトクロム C の吸着性から評価した結果、すべての耐性株において親株よりも負電荷が低下していた。さらに、有機溶媒親和性からナイシン耐性株の細胞表面疎水性度を調べ、その程度は選抜した耐性株 3 株で異なるものであった。これまで、ナイシン耐性リステリアにおいて菌体表面疎水性の低下は、ナイシンとの疎水性相互作用を低下させるため、耐性機構の一つの要因と考えられてきたが、本研究の結果から菌体表面における疎水性の変化はナイシン耐性の獲得に伴う特性変化の一つではあるものの、ナイシンに対する耐性機構において主要因でないと推察された。

##### (5) 耐性株の細胞壁分解酵素感受性

ナイシン耐性リステリアの細胞壁分解酵素に対する感受性を調べたところ、ナイシン耐性株においてリゾチームとラビアーゼに対する感受性の低下が認められた。したがって、ナイシン耐性の獲得に細胞壁の構造変化も関与していることが推察された。特に、ATCC7644 の耐性株（ATCC7644<sup>NR</sup>）においては菌体表面における負電荷が減少し、疎水性が上昇したことから、細胞壁ペプチドグリカンのタイコ酸やリポタイコ酸の D-アラニル化が起こっている可能性が考えられた。

##### (6) 耐性株のタンパク質発現の変化

ナイシン耐性株のタンパク質発現を調べたところ、分離耐性株 3 株のうち ATCC7644 の耐性株（ATCC7644<sup>NR</sup>）でのみ細胞膜に局在するタンパク質の発現が親株と比べて異なっていた。すなわち、ATCC7644<sup>NR</sup> では 31.4kDa と 56.0kDa 付近のタンパク質が確認され、親株では認められなかった。したがって、ストレスタンパク質の発現がナイシン耐性機構に関与している可能性が推察された。一方、IID579 および IID580 のナイシン耐性株 IID578<sup>NR</sup> と IID580<sup>NR</sup> では親株と比べて異なるタンパク質バンドパターンは認められな

った。

(7) 水産食品におけるナイシンによるリステリアの発育抑制

水産食品におけるリステリアの食中毒を軽減するため、リステリア汚染の可能性の高いサケイクラ醤油漬けを対象としたナイシンを利用したリステリア制御法について検討した。その結果、サケ生卵では、ナイシンの単独添加のみでリステリアの発育を効果的に制御できることが明らかになった。一方、イクラ醤油漬けではナイシンの単独添加ではリステリアの発育抑制はできず、この要因が食品に含まれる食塩の影響と推察された。そこで、食塩の影響を受けにくく、またナイシン耐性リステリアの制御に不適当な抗菌物質(タンパク質性の抗菌物質)を除いて検討し、ペクチン分解物製剤(ノイペクチンL)に着目した。次に、イクラ醤油漬けにおけるリステリア制御へのナイシンとペクチン分解物製剤との併用効果について検討し、これらの併用によってイクラ醤油漬けにおけるリステリアの発育を完全に抑制できることを見出した。

以上の結果から、リステリアにおけるナイシン耐性は、ナイシンと菌体間の親和性低下が主な要因であり、疎水性相互作用よりも静電的親和性が重要であることが示唆された。また、この親和性の低下により、ナイシンに対してのみではなく、ナイシンと同様な性質を有する抗菌物質に対しても交叉耐性を発揮すると推察された。さらに、ナイシンの耐性獲得には細胞膜に局在するタンパク質発現および細胞壁ペプチドグリカン構造の変化も関与していることが推察された。水産食品におけるリステリアの制御法では、ナイシンとペクチン分解物製剤の併用によって優れた発育抑制のできることが明らかとなり、水産加工食品の安全性向上に大きく貢献できると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

山崎浩司、田代卓、白浜慎也、川合祐史、  
ナイシンによる水産練り製品における芽胞形成菌の発育抑制、日本食品科学工学会誌、査読有、61、70-76 (2014)

〔学会発表〕(計5件)

Koji Yamazaki, Growth inhibition of food-borne pathogens using bio-preservatives of microbial origin in food、3<sup>rd</sup> International Fisheries Symposium( The Ambassador City Jomtien, Pattaya, Thailand ) (2013.11.29)

山崎浩司、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を応用した迅速細菌検査法の開発と食品微生物制御、日本食品科学工学会第60回記念大会(実践女子大学、

日野市、東京)(2013.8.29)

白浜慎也、田代卓、山崎浩司、川合祐史、  
醤油漬けサケイクラにおける *Listeria monocytogenes* のナイシンによる発育抑制、平成25年度日本水産学会春季大会(東京海洋大学、港区、東京)(2013.3.28)

久野史峰、山崎浩司、川合祐史、ナイシン耐性リステリア菌の発育特性と抗菌物質感受性、平成24年度日本水産学会春季大会(東京海洋大学、港区、東京)(2012.3.28)

田代卓、清水茂雅、山崎浩司、川合祐史、  
調味カズノコ変敗菌の同定とナイシンによる制御、第32回日本食品微生物学会学術総会(タワーホール船堀、江戸川区、東京)(2011.10.16)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 浩司(YAMAZAKI, Koji)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：40250500

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし