

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07729

研究課題名(和文) 室温・冷蔵温度で発育したリステリアの表現型とメカニズムの解明

研究課題名(英文) Studies on phenotypes of *Listeria monocytogenes* grown under room temperature and refrigeration conditions

研究代表者

落合 由嗣 (Ochiai, Yoshitsugu)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：40350178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：食中毒菌のリステリアを酸と過酸化水素に曝露して生残性を解析した。本研究では20℃(室温を想定)と37℃(生体温度を想定)で菌を発育・曝露して解析を行った。ストレス曝露に対する菌の生残性は発育と曝露温度の両温度条件の影響を受けた。曝露温度の影響が特に大きく、37℃よりも20℃で多くの菌の生残が観察された。過酸化水素に曝露されたリステリアにおける遺伝子発現を解析したところ、37℃ではストレス応答で役割を担う多くの遺伝子誘導が観察された一方、20℃では過酸化水素応答で中心的な役割を担う遺伝子の誘導が観察されなかった。以上の成績から、温度条件により本菌が異なるストレス応答をしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： *Listeria monocytogenes* is a food-borne pathogen. In the present study, *L. monocytogenes* grown at 20℃ or 37℃ was subjected to low pH and hydrogen peroxide under different temperatures, including 20℃ and 37℃. Survival curves indicated an increase in the resistance of *L. monocytogenes* to hydrogen peroxide as the temperature decreased during the procedure of stress exposure. In addition, transcriptional induction of some genes that have central roles in response to hydrogen peroxide exposure, including *kat* and *sigB*, was observed at 37℃ but not at 20℃, whereas other stress response genes that were involved in gene expression during the stress exposure were induced at the both temperatures. These findings suggest that hydrogen peroxide is not recognized as a potent stress factor under room temperature conditions. Therefore, this study suggests that this pathogen exerts the high ability to survive and propagate in food processing environments.

研究分野：獣医公衆衛生学

キーワード：リステリア 酸 過酸化水素 温度 ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

多くの病原菌、リステリア、コレラ菌、黄色ブドウ球菌、セレウス菌、レジオネラ、緑膿菌などが、生体外環境で発育している知見が得られている。これらの菌は生体外環境で発育した後、人などの宿主に侵入して感染を成立させている。ここで、病原菌がどのようにして「生体外環境」と「宿主環境」という温度・湿度・栄養などの条件が全く異なる両環境に適応して生残・発育しているかの解析が、研究課題となっている。研究代表者はこれまでに、食中毒の原因菌として知られているリステリアの研究を行ってきた。本菌によって引き起こされる感染症、リステリア症は易感染者で重症化し、致命率は20~30%である。健常者に対しても、他の食中毒原因菌と同様に嘔吐、下痢、腹痛などの消化器症状を示す疾病を引き起こす。また、人のみでなく様々な動物に対しても感染症を引き起こす。その一方で、疾病を呈していない人や動物の糞便からも検出される。さらには、土壌、河川水などをはじめとする自然環境や下水や食品加工施設といった人工環境からも分離され、極めて幅広い生息域を有するのが特徴である。食中毒原因菌のリステリアは汚染食品を介して人に感染するが、主要な汚染経路として、食品加工環境で発育した菌がその汚染源から遊離して食品に付着することで起きると考えられている。それ故、食品加工環境における菌の生態学や生理学的特徴を理解して菌の排除法を確立することが、リステリア症を制御する上で有効と考えられる。

リステリアは上述のように、人などの生体内環境および食品加工施設などの生体外環境のいずれにおいても生残・発育できる。これら二つの環境においては、温度、湿度および栄養などの諸要因が異なる。特に温度要因に関して、生体内環境は37 前後で維持される一方、食品加工環境は多くの場合20 前後で保たれ、さらに生鮮食品は4 前後の冷蔵温度で保存される。このような異なる温度環境下でリステリアが発現する表現型も異なる可能性が考えられる。リステリアに関する多くの研究では、至適増殖温度の30~37 で発育させたリステリアを用いて表現型が解析されてきた。その一方で、食品加工施設で発育しているリステリアは、冷蔵温度条件も含めた20 以下の温度条件で発育していると想定される。ここで研究代表者は、たとえ同じ菌株であっても、37 前後の生体内環境で発育したものと室温・冷蔵温度環境で発育したものと異なった表現型を示す可能性があると考えた。さらに、リステリアは幅広い生態学的特徴を有するため、温度条件などの環境要因が異なる中で、様々なストレスに曝露されると考えられる。例えば、リステリアは酸(低 pH)に対して曝露されていると考えられるが、具体的な曝露環境として、食品加工施設で消毒剤、洗剤などに用いられる酸に対する曝露、食品内で添加物とし

て用いられる酸に対する曝露、宿主に経口的に取り込まれた後、胃を通過する際の胃酸に対する曝露、宿主の細胞内に侵入後、ライソゾーム内で産生される酸に対する曝露、が想定される。温度条件の観点から、前の2条件は室温、あるいは冷蔵温度、後の2条件は37 であり、異なる温度条件でリステリアがどのようなストレス応答をするか、解明する必要があると考えられた。

### 2. 研究の目的

リステリアは幅広い生態学的特徴を有する。この特徴を有する背景として、本菌が幅広い温度範囲で発育できること、また、様々なストレス要因に対して高い応答能力を有していることが知られている。しかし状術のように、発育および曝露温度条件を考慮したリステリアのストレス応答性に関する解析はほとんど行われていない。そこで本研究では、以下の点について明らかにすることを目的とした。

一点目として、リステリアのストレス応答が、曝露前の発育温度条件、および曝露温度条件による影響を受けるかを明らかにする。本研究では、宿主と食品加工施設の両環境におけるストレス応答性を想定し、それぞれ、37 および20 の温度条件で解析を行った。二点目として、リステリアのストレス応答性が発育・曝露温度による影響があった場合、ストレス応答に関わるメカニズムにも違いのあることが予想される。そこで、温度条件によるストレス応答メカニズムの違いを明らかにするため、ストレスに曝露したリステリアにおいて、これまでにストレス応答に関わることが報告されている遺伝子産物が転写レベルで発現量に両温度間で違いがあるかの解析を試みた。三点目として、過酸化水素に対する曝露において鉄が影響を及ぼすことが報告されている。本研究では、発育・曝露温度が異なる条件下で、鉄を添加した状態で過酸化水素に曝露してその影響について検討を試みた。

### 3. 研究の方法

#### 用いたリステリア菌株

リステリアの研究で標準株として頻繁に用いられている EGD-e 株(血清型 1/2a)および市販食肉から分離された 72C2 株(血清型 1/2b)を用いた。

#### 菌株の培養

-80 で凍結保存された菌株を BHI 寒天培地に接種し、20 で48時間、あるいは37 で24時間の条件で培養した。次いで培地上に形成されたコロニーを BHI に接種し、20 で24時間、あるいは37 で12時間の条件で培養した。

#### 菌株のストレス曝露

BHI を用いて得られた培養液を、0.6%酵母エキス添加トリプトソイブロス(TSBYE)に接種し、20 あるいは37 の条件で培養し、

OD<sub>660</sub> が 0.3 (対数増殖期) に達したもののストレス曝露実験に用いた。菌量をおよそ  $3 \times 10^7$  CFU / ml にして PBS で洗浄した。得られた菌を致死的な過酸化水素 (60 mM をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に添加したもの) あるいは酸 (BHI、あるいは PBS を塩酸で pH3 にしたもの) に対して曝露した。曝露温度条件は 20、30、あるいは 37 として 160 rpm の振とう条件で行った。指定する時間まで曝露した後、曝露液を 10 倍段階希釈して寒天培地に接種した。寒天培地として、過酸化水素曝露菌の培養には 1%ピルビン酸ナトリウム・0.6%酵母エキス添加トリプトソイ寒天培地 (TSAYE-PYR) あるいは TSAYE、酸曝露菌の培養には TSAYE を用いた。培地上のコロニー数から菌数、さらに生残率を算出した。

#### 遺伝子発現解析

致死濃度 (150 mM) の過酸化水素に曝露した EGD-e 株から総 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法によって転写産物量を解析した。温度条件に関しては、培養からストレス曝露まで全ての過程を通じて 20、あるいは 37 の一定にして実施した。ストレスに対する曝露時間は、20 では 40 分間および 100 分間、37 では 10 分間および 20 分間とした。対照として過酸化水素を添加していない PBS に浮遊した菌株を準備した。曝露後、RiboPure RNA purification kit (Ambion 社) を用いて総 RNA を抽出し、SuperScript VIL0 cDNA synthesis kit (Invitrogen 社) を用いて cDNA を得た。定量 PCR は Applied Biosystems 7500 real-time system を用いて実施された。PCR 反応には Power green SYBR PCR master mix (Applied Biosystems 社) および 200 nM のプライマーを用いた。ストレス時の発現調節を担う遺伝子 (*sigB*, *ctsR*, *hrcA*, *lexA*, *recA*) および過酸化水素応答への関与が示されている遺伝子 (*fri*, *kat*, *perR*, *sod*) を解析対象とした。内部標準としてはハウスキーピング遺伝子の *rpoB* および *16SrRNA* 遺伝子を用いた。Ct 値を決定した後、過酸化水素非曝露サンプルと曝露サンプルの間での比較 Ct 法によって相対定量を実施した。得られた相対定量値は log<sub>2</sub> に変換して計算された。得られた成績は平均 ± 標準偏差で示された。

#### 鉄添加下での過酸化水素曝露

鉄として硫酸鉄(Ⅱ)あるいは硫酸鉄(Ⅲ)、鉄キレート剤としてデフェロキサミンを用いた。鉄および鉄キレート剤の濃度は全て 20 μM とした。過酸化水素の濃度は 60 mM とした。鉄および鉄キレート剤存在下での過酸化水素曝露に対する生残性解析は 20 で 120 分間、あるいは 37 で 30 分間の条件で実施した。生残率を求めて評価に用いた。鉄および鉄キレート存在下における遺伝子発現の解析を行った。対象遺伝子は過酸化水素曝露応答への関与が示されている 4 遺伝子 (*fri*, *kat*, *perR*, *sod*) および *sigB* とした。総 RNA の抽出およびリアルタイム RT-PCR による定量

は前述した通りに実施した。本実験では、鉄あるいは鉄キレート剤の添加サンプルと不添加サンプルとの間で比較 Ct 値を求め、log<sub>2</sub> に変換して相対定量値を算出した。

#### 統計解析

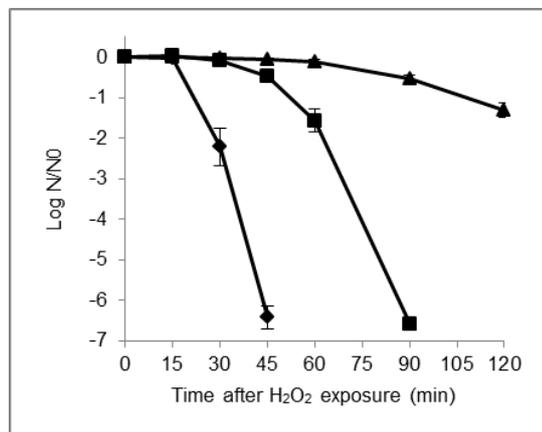
2 群の間での比較では t 検定、あるいは Mann-Whitney の U 検定を用いて解析した。3 群間での比較では、Kruskal-Wallis 検定を行った後、有意差が確認された場合は Scheffe's 多重比較法による解析を行った。P 値が 0.05 未満の場合、有意差があると定義した。

#### 4. 研究成果

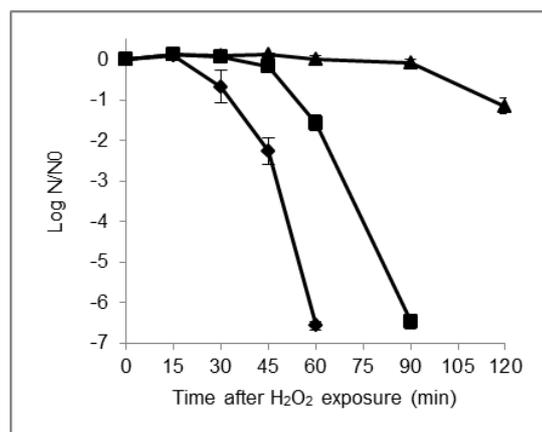
##### EGD-e 株の過酸化水素曝露に対する生残性

標準株の EGD-e 株を、致死濃度の過酸化水素に曝露して生残曲線を作成した。菌株は 20、あるいは 37 で培養後、20、30、あるいは 37 で曝露した。

A



B



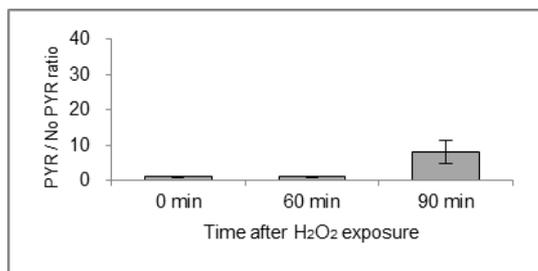
A は 20、B は 37 で発育させた EGD-e 株の成績で、図中の三角 (▲) 四角 (■) および菱形 (◇) で表された曲線はそれぞれ、20、30 および 37 で曝露して得られた生残曲線を示す。いずれの発育温度においても、リステリアの生残性は曝露温度依存的で、曝露温度が低くなるのに伴って生残率の増加が観察された。得られた曲線は、ほぼ全ての菌が生残した状態で維持されているプラトー相、および曝露時間に依存して生残率が減少する不活化相の 2 相から構成されることが

わかった。また、曝露温度に依存してプラトー相の延長が観察された。一方、異なる温度で発育し、同じ曝露温度で処理された生残曲線を比較したところ、37 で曝露された菌に関して違いが観察された。すなわち、37 で発育させた菌の生残性において増加が観察され、菌の発育した環境がその後のストレス応答性に影響を及ぼすことが示された。しかし、菌の生残性に対しては発育温度よりも曝露温度の方が大きな影響を及ぼし、曝露温度が低下に従って生残性の増すことが示された。

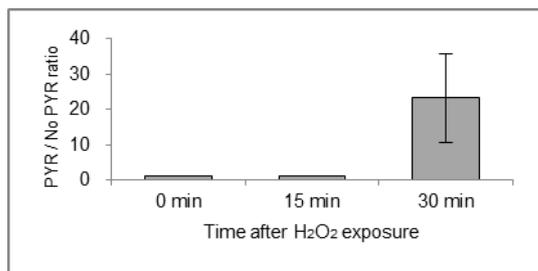
#### 過酸化水素曝露された EGD-e 株の TSAYE および TSAYE-PYR 上での発育の比較

培地を高圧蒸気滅菌処理する時に生じる過酸化水素が細菌のコロニー形成を抑制することが知られている。また、培地に PYR を添加することにより過酸化水素の産生を抑制できる。そこで、培地に添加する PYR の影響を検討した。EGD-e 株の発育およびストレス曝露を一定温度で行った。20 で 60 分間および 90 分間、あるいは 37 で 15 分間および 30 分間の条件で曝露した。曝露後 TSAYE および TSAYE-PYR に接種して得られる菌数の比 (PYR / No PYR) を算出した。その成績を以下に示す。

A



B



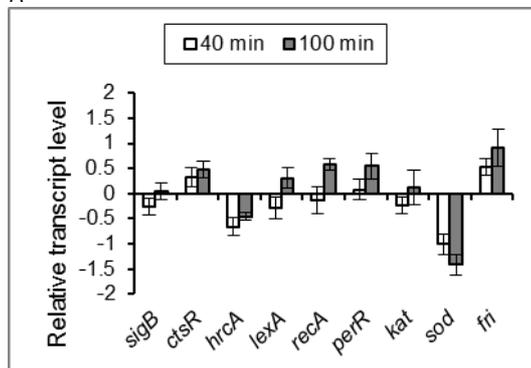
A は 20 、 B は 37 の成績を示す。対照として曝露開始時の菌株から比を求めたところ、ほぼ 1 となり、両培地間での菌数に差のないことが示された。20 で 60 分間および 37 で 15 分間曝露した際の菌数から得られた比もほぼ 1 となった。一方、20 で 90 分間および 37 で 30 分間曝露した際の菌数は平均でそれぞれ、8.1 および 23.1 となり、TSAYE-PYR での菌数が多いことが確認され、PYR 存在下でないと発育できない Resuscitation が観察された。前述の生存曲線において、20 で 60 分間および 37 で 15 分間の条件で曝露した場合、プラトー相の状態にある一方、20 で 90 分間および 37 で

30 分間の条件で曝露した場合は不活化相にあることが示されている。以上から、生残曲線の不活化相でのみ Resuscitation が起きることがわかった。また 20 で 90 分間および 37 で 30 分間、過酸化水素に曝露して得られた比を比較したところ、37 の方が有意 ( $P < 0.05$ ) に大きかった一方、両曝露条件における生残率に有意差は観察されなかった ( $P > 0.05$ )。以上のから、37 において Resuscitation が高頻度で起きていることが示唆された。

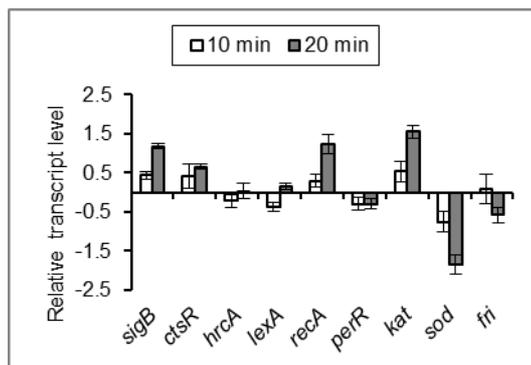
#### 過酸化水素曝露された EGD-e 株における遺伝子発現

生残曲線から、20 と 37 の条件下では、過酸化水素に曝露された菌の生残性に違いのあることが示された。このことから過酸化水素曝露に対する応答メカニズムにも違いがあると考えられたため、曝露を受けた菌から総 RNA を抽出し、ストレス応答に関与している遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。その成績を以下に示す。

A



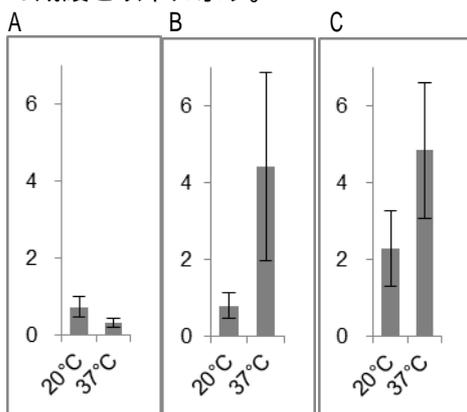
B



A は 20 、 B は 37 で発育および過酸化水素に曝露した成績を示す。20 と 37 との間で比較したところ、ストレス応答時の転写調節で中心的な役割を担う *sigB* および過酸化水素の分解酵素であるカタラーゼをコードする *kat* の発現に違いが観察された。すなわち、20 では転写誘導が観察されなかったが、37 では観察された。一方、ストレス応答時に誘導されて遺伝子発現を調節することが報告されている *ctsR* および *recA* は両温度条件で発現誘導が観察された。20 での過酸化水素曝露条件下で観察された、リステリアの高い生残性と *sigB* および *kat* が誘導されなかった知見は、過酸化水素がこの温度条件に

において菌に対して深刻な損傷を与えていないことを示しているかもしれない。  
鉄および鉄キレート剤が過酸化水素応答に及ぼす影響

鉄は過酸化水素に対するストレス応答に影響することが報告されている。そこで、二価鉄、三価鉄および鉄キレート剤の存在下で EGD-e 株を過酸化水素に曝露し、菌の生残性に影響があるかを解析した。20 および 37 で発育・ストレス曝露して解析を行った。その成績を以下に示す。

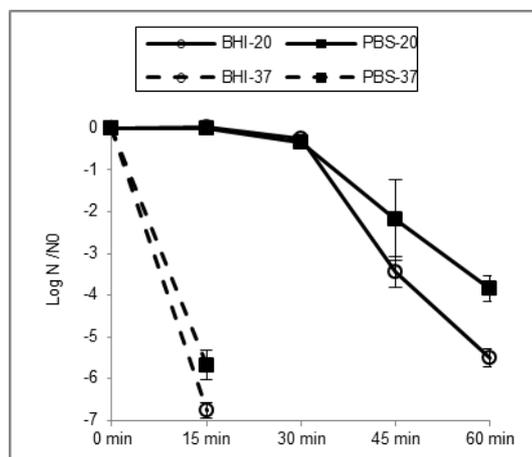


A, B および C はそれぞれ、二価鉄、三価鉄および鉄キレート剤を添加した時の成績を示す。Y 軸は、鉄・鉄キレート剤添加条件および不添加時に得られる生残菌数の比 (Add / No add ratio) である。二価鉄添加条件では 20 および 37 でともに算出される比が 1 未満となり、二価鉄の存在によって菌の生残性が低下することがわかった。三価鉄の成績からは、20 で 1 未満、37 では 1 を有意に超える比が得られ、温度条件によって反対の影響があることが示唆された。鉄キレート剤添加条件では、いずれの温度でも 1 を有意に超える比が得られ、生残性が増していることがわかった。生残性の変化はフェントン反応による活性酸素の生成が大きく寄与しているものと示唆される。一方鉄・鉄キレート剤存在下で遺伝子発現に変化はみられなかった (データ示さず)。

リステリア菌株の過酸化水素曝露に対する生残性

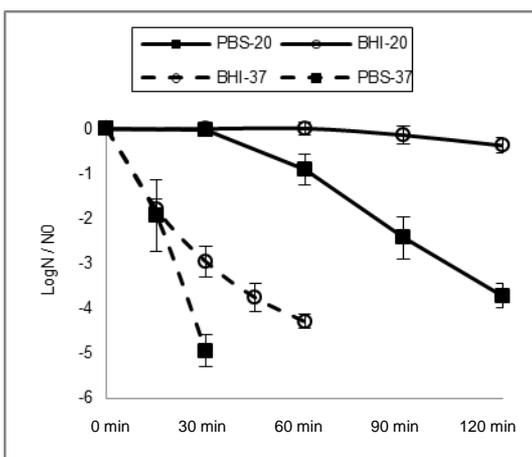
次いで EGD-e 株を酸に曝露した。過酸化水素の成績から曝露温度が生残性に大きな影響を及ぼすと予想されたため、曝露温度を 20 および 37 の 2 条件で解析・比較した。曝露液として、栄養性の異なる BHI および PBS を用いた。これら 2 種類の水溶液を塩酸で pH3.0 にした酸性化 BHI および PBS を曝露液とした。20 では曝露後 15 分、30 分、45 分および 60 分、37 では曝露後 15 分における生残率を求め、生残曲線を作成した。

成績を以下に示す。20 で EGD-e 株を発育および酸曝露させたところ、曝露後 60 分まで生残が観察された。BHI および PBS を用いて得られた生残曲線は、過酸化水素曝露で得られた曲線と同様にプラトー相および不活化相の 2 相から構成され、30 分に



プラトー相から不活化相に移行した。BHI および PBS から得られた生残曲線は類似した軌道を示したものの、曝露後 60 分における菌の生残率は、PBS の方が高かった。37 では曝露後 15 分で菌は著しく減少し、特に BHI からは菌が検出されなかった。以上の成績から、酸に対する曝露においても低温で生残性が増加することが確認された。

EGD-e 株は他のリステリア菌株よりも高い酸感受性を有することが報告されている。そこで、他のリステリア分離株を酸に曝露して生残曲線を作成した。菌株として、食肉から分離された 72C2 株を用いた。この菌株は EGD-e 株とは異なる血清型 1/2b に分類される。菌株を 30 で発育させた後、20、あるいは 37 で pH3.0 の酸性化 BHI および PBS に曝露させた。20 では曝露後 30 分、60 分、90 分および 120 分、37 では曝露後 15 分、30 分、45 分および 60 分における生残率を求めて生残曲線を作成した。



曝露温度の観点から、37 よりも 20 で高い生残性を示すことが改めて確認された。しかし、BHI と PBS から得られた生残曲線を比較すると、72C2 株は栄養に富む BHI 中で酸曝露された方が高い生残性を示した。これは、BHI に含まれる成分の中に、酸耐性に関わる機序を促進していることが示唆される。例えば、グルタミン酸を曝露液に添加することによって、グルタミン酸が菌体内に取り込まれ、プロトンと反応して GABA が生成されること

によって、菌体内の酸性緩和に寄与していることが報告されている。従って、BHI に含まれるグルタミン酸が 72C2 株の酸耐性に寄与した可能性がある。一方、EGD-e 株に関しては、外在性のグルタミン酸の取り込みを担う antiporter をコードする遺伝子を有するものの、グルタミン酸を曝露液中に添加しても生残性に影響のないことが報告されている。この報告が、BHI と PBS で同じような生残動態を示したと関連するかもしれない。

#### 総括

本研究ではリステリアのストレス応答性が環境の温度要因によって影響を受けるかを解析した。一連の解析から、発育および曝露温度条件の影響を受け、特に曝露温度の影響を大きく受け、特に室温環境下における生残性が高くなることがわかった。また、ストレスに曝露されたリステリアが発現するストレス応答に関連した遺伝子が温度条件によって異なることを見出した。以上から、食品加工環境からリステリアを排除する方法を検討する上で、温度条件を考慮しながら評価する必要があるとの結論に至った。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1) Genetic subtyping of *Listeria monocytogenes* via multiple-locus sequence typing using *iap*, *sigB* and *actA*. Yuko Yoshikawa, Yoshitsugu Ochiai, Mariko Mochizuki, Osamu Fujita, Takashi Takano, Ryo Hondo, Fukiko Ueda. J Vet Med Sci, 78, 1831-1839, 2016

2) Sequential transition of the injury phenotype, temperature-dependent survival and transcriptional response in *Listeria monocytogenes*. Yoshitsugu Ochiai, Fumiya Yamada, Yuko Yoshikawa, Mariko Mochizuki, Takashi Takano, Ryo Hondo, Fukiko Ueda. Int J Food Microbiol, 259, 52-58, 2017.

[学会発表](計 4 件)

1) *Listeria monocytogenes* の過酸化水素抵抗性に及ぼす発育・暴露温度条件の解析。 落合由嗣、山田文也、望月真理子、高野貴士、本藤良、植田富貴子。第 158 回日本獣医学会学術集会。2015 年 9 月 7 日～9 日。北里大学獣医学部

2) *Listeria monocytogenes* の過酸化水素曝露に対する生残、発育およびストレス関連因子発現の解析。 落合由嗣、山田文也、吉川悠子、望月真理子、高野貴士、本藤良、植田富貴子。第 89 回日本細菌学会総会。2016 年 03 月 23 日～25 日。大阪国際交流センター

3) 鉄・鉄キレート剤が *Listeria monocytogenes* の過酸化水素抵抗性に及ぼす影響の解析。 落合由嗣、山田文也、吉川悠子、高野貴士、望月真理子、本藤良、植田富貴子。第 159 回日本獣医学会学術集会。2016 年 9 月 6 日～8 日。日本大学生物資源科学部。

4) 食品から分離された *Listeria monocytogenes* のストレス抵抗性に関する解析。 落合由嗣、吉川悠子、山田文也、高野貴士、望月真理子、本藤良、植田富貴子。第 160 回日本獣医学会学術集会。2017 年 9 月 13 日～15 日。鹿児島大学郡元キャンパス。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
落合由嗣 (OCHIAI, Yoshitsugu)  
日本獣医生命科学大学獣医学部准教授  
研究者番号：40350178

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )