

短報

加熱損傷リステリア菌 (*Listeria monocytogenes* IID577) の 選択増菌培養法に関する基礎的検討

寺西 大*, 古川一郎, 相川勝弘, 浅井良夫,
尾上洋一, 新川隆康

Study of Selective Enrichment Method of Heat-injured *Listeria monocytogenes* IID577.

Hiroshi TERANISHI, Ichiro FURUKAWA,
Katsuhiko AIKAWA, Yoshio ASAI,
Yoichi ONOUE and Takayasu NIKKAWA

はじめに

リステリア菌 (*Listeria monocytogenes*) は動物、植物、土壌、河川水、下水等多様な環境中に分布しており、人畜共通感染症として、ヒトが感染すると髄膜炎、敗血症等を起こし、動物が感染すると脳炎、敗血症および流産を起こすことが知られている¹⁾。リステリア菌は環境中に広く分布していることから、加工環境によっては食品を汚染することがあり、乳および肉の加工食品を中心とした死亡例を伴う食品媒介性のリステリア症が欧米において発生している。米国では食品媒介性のリステリア症は、人口100万人当たり4.8人と報告されている²⁾。わが国では食品が原因と確認されたリステリア症は1事例³⁾にすぎないが、わが国の本菌汚染率は食肉製品全体で4.1%、非加熱食肉製品のみでは22.2%と欧米同様に高率²⁾、集団発生の可能性も十分あると考えられている。

食品媒介性のリステリア症の原因食品としては、殺菌乳、ナチュラルチーズ、タンのゼリーよせ、ホットドッグ、ミートパテ等¹⁾が知られており、これらは加熱処理や凍結処理によりリステリア菌の汚染菌数は少なく、損傷状態になっている場合も少なからずあると考えられる。細菌が加熱や凍結、乾燥といったストレスを受けるとその構造や機能に障害を受け生理的に不都合な状況に陥る。

回復不能な不可逆的損傷を受け死に至る重度のものから増殖にほとんど影響を受けない軽度のものまで程度は様々であるが、その間の領域にあって条件次第で生存性を回復可能な半致死性である菌は損傷菌とよばれている。つまり、損傷菌と非損傷菌とは可逆的な変化であり、損傷を受けた後の環境条件により回復可能な状態の菌である。回復した菌については、病原遺伝子の脱落等がなければ、その病原性に著しい変化はないと考えられている⁴⁾。食品衛生学的には、通常、損傷を受けていない菌は選択培地および非選択培地に同等に発育するが、損傷菌は非選択培地には発育可能であるが障害を受けたため選択剤の感受性が増大し選択培地には発育することができない状態の菌と定義される⁵⁾。現在、食品からのリステリア菌の検出は、国際酪農連盟 (IDF) 法に準拠した公定法⁶⁾すなわち選択増菌培地 (*Listeria* Enrichment Broth) による30℃、48時間培養後、選択寒天培地 (PALCAM寒天またはOxford寒天) での30~35℃、24~48時間培養による分離で行われているが、損傷菌に対する配慮はなされていないため、本菌が存在するにもかかわらず検出できない可能性が危惧されている⁴⁾。損傷菌を含む食品検体を検査する場合、競合菌から目的とする菌を如何に選択するかという問題と同時に、目的とする菌の損傷回復を考慮し、効率よく検出する工夫が必要である。リステリア菌に限らず、森地⁴⁾は食品からのすべての食中毒菌検査、汚染指標菌検査には損傷菌対策が必要であると述べている。

そこで、IIDの3菌株を用いて加熱により本菌を損傷化させ、リステリア3菌株から熱感受性の高い菌株IID577を選択し、以降、その菌株を用いて損傷回復に有効とされているピルビン酸、カタラーゼおよびMgSO₄を単独で、或いは組み合わせて添加し損傷回復を考慮した選択培地での損傷菌の回復と増殖動態について検討した。

同時に新しい遺伝子増幅法であるLAMP法についてリステリア損傷菌検出に対する有効性についても検討したので併せて報告する。

材料および方法

1. 供試菌

供試菌として*L. monocytogenes* IID566, IID577およびIID581を使用した。

2. 加熱損傷菌の作製

リステリア菌をTrypticase Soy Broth (TSB, Becton Dickinson) で35℃、24時間培養した。培養液は生理的食塩水で約10⁶CFU/mlの菌液を調製し試験管に10mlずつ分注後、55℃の温浴中で6分間加熱し損傷化の程度を検討した。加熱処理後、直ちに氷水で冷却し、菌数測定

神奈川県衛生研究所 微生物部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
*現 地域調査部 茅ヶ崎分室

に供した。実験は3回繰り返した。

リステリア損傷菌及び非損傷菌の菌数測定には非選択培地としてYeast Extract (Becton Dickinson)を0.6%の割合で添加したTrypticase Soy Agar(TSA, Becton Dickinson)を使用し、非損傷菌数測定には選択培地のPALCAM Listeria Selective Agar(PAL, Merck)を使用した。

加熱損傷菌の確認には、処理した菌液を生理的食塩水で適宜段階希釈し、各希釈ごとに選択・非選択培地ともに平板5枚ずつ使用した。希釈菌液は0.2mlずつ滴下し、コンラージ棒で塗抹した。35℃で24時間培養した後、菌数を測定した。加熱損傷菌数は非選択培地であるTSAに発育した菌数から選択培地のPALに発育した菌数の差である。使用した3菌株のうち損傷菌と非損傷菌の比が1:100以上となった条件を選び、その後の損傷菌の回復と増殖の検討に使用した。1:100以上の比とするのは、この損傷菌液を希釈して培養液に添加する場合に、100CFU/ml未満レベルの接種菌液0.1ml中に非損傷菌が含まれる可能性を排除するためである。

3. 加熱損傷リステリア菌の各増菌培地での回復と増殖

非選択培地であるTSB培地、公定法の選択増菌培地であるListeria Enrichment Broth(EB, Merck)培地、EB培地に損傷菌の回復に効果があるとされるピルビン酸ナトリウム(和光純薬工業、特級)を0.1%の割合で添加したEB(EB+P)培地、カタラーゼ(CALBIOCHEM)を500U/mlの割合で添加したEB(EB+C)培地、MgSO₄(和光純薬工業、特級)を0.025%の割合で添加したEB(E B+Mg)培地、これらの添加物質を組み合わせたEB(EB+P+Mg およびEB+C+Mg)培地を増菌培地として検討した。これらの培地10mlに、加熱損傷処理を施した菌液を10CFU/ml未満となるように添加し、30℃で0、24および48時間培養後、TSAとPALを用いて損傷菌作

製時と同様に菌数を測定した。対照試験として、加熱処理を実施しなかった菌液について非損傷菌の挙動測定のため同じ条件で培養後、菌数を測定した。これらの試験も3回の繰り返し実験を行った。ただし、EB培地については、6回の繰り返し実験を行った。

結果については、損傷菌を接種した各増菌培地の48時間後のPAL菌数を一元配置分散分析により検定し、有意差が認められた場合にTukeyの多重比較により、どの培地間に有意な差が認められたかを検討した。

LAMP法による遺伝子検出は以下のように行った。はじめに各培養液を核酸抽出キット「EXTRAGEN II」(東ソー)を使用して前処理を行った。ついでリステリア検出キット(栄研化学、試作品)を使用し6領域を認識する4種類のプライマーにより65℃、1時間の核酸増幅を行い、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム濃度をLoopampリアルタイム濁度測定装置(テラメックス)にて測定した。測定は検討した各培地の菌数測定時に同時に行った。EB培地については3回の繰り返し実験時について実施した。

結果および考察

1. リステリア3菌株の加熱損傷状況と加熱損傷条件の設定

L. monocytogenes IID566, IID577およびIID581の55℃における加熱損傷状況を図1に示した。グラフの菌数は3回の繰り返し実験の平均値を示している。加熱による損傷は菌株によりかなり異なり、*L. monocytogenes* IID566では加熱による損傷は起きにくく4分後までTSAとPALの差は1オーダー以内であり、6分後まで加熱しても死滅する菌は増加するもののTSAとPALの差は2オーダーを超えることはなく、当初目標にしていた損傷菌と非損傷菌の比を1:100以上とする条件を満たせなかった。

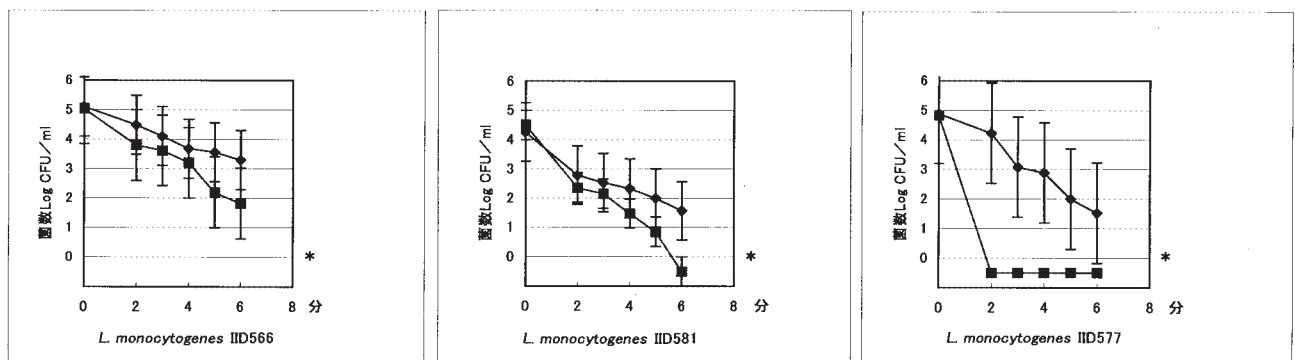


図1 *L. monocytogenes* IID 566,581,577 の 55℃における加熱損傷状況

◆:TSA 発育菌, ■:PAL 発育菌 エラーバーは標準偏差

* 菌数の検出限界:1CFU/mlアスタリスクの位置以下は検出限界未満を示す

L. monocytogenes IID581も*L. monocytogenes*IID566と類似した傾向を示し、加熱後5分までTSAとPALの差が1オーダー以内であり6分後でも当初目標を満たすことはできなかった。

L. monocytogenes IID577では加熱による死滅減少度は*L. monocytogenes* ID566 およびIID581に比べて大きく、かつ、速やかに損傷化が起こり、加熱後2分で選択培地のPALでは1CFU/ml未満の菌数となった。TSA上でのみ発育する損傷化した菌は加熱後2分で4.2Log CFU/ml、3分で3.1Log CFU/ml、4分で2.9Log CFU/mlとなった。加熱後2分の段階で当初目標としてきた損傷菌の割合を十分に満たすが、加熱損傷化の再現性が必ずしも良いとはいえないため、非損傷菌をより少なくするという配慮で、4分加熱後の*L. monocytogenes* IID577菌液を用いることとした。

2. 増菌培地中での*L. monocytogenes* IID577の損傷回復と増殖

図2にTSB培地での損傷菌の損傷回復と増殖および対照として非損傷菌の増殖のグラフを示した。初発菌数は接種菌液の測定値から求めたところ、55℃4分の損傷化処理では0.2~0.3CFU/mlとなり、非損傷菌数は接種菌

以上に増殖し、48時間ではその菌数は低下していた。3回の繰り返し実験で増殖は全く同じ傾向を示し、再現性は極めて良かった。

EB培地での損傷菌の損傷回復と増殖および対照として非損傷菌の増殖のグラフを図3aに示した。EB培地は選択剤が含まれているため、加熱損傷菌のEB培地での増殖は48時間後においてもばらつきが大きく菌数の平均値も5.3Log CFU/mlと低かった。損傷化したことで選択剤の感受性が増大し発育動態が不安定になっていると考えられた。EB培地では非損傷菌であっても非選択培地のTSB培地に比べて菌数の増殖は劣り、24時間後に6.2~6.8Log CFU/mlになり48時間で8.3Log CFU/ml程度となっている。これらも6回の繰り返し実験で全く同じ傾向を示した。そこで、このEB培地に前述の損傷回復に有効と考えられる物質を添加した各種培地における損傷菌の損傷回復と増殖および対照として非損傷菌の増殖のグラフを図3b~fに示した。各実験条件の損傷回復物質添加培地においては非損傷菌ではEB培地と同様の傾向を示し、差は認められなかったが、損傷菌では24時間以内に損傷状態から回復していることが認められ、48時間で平均7.3~9.0Log CFU/mlまで増殖し、各損

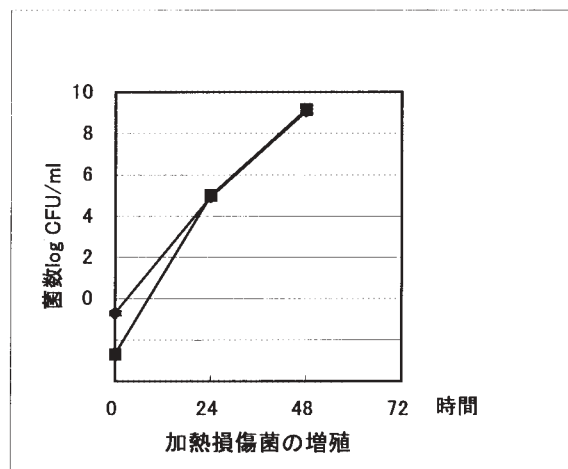
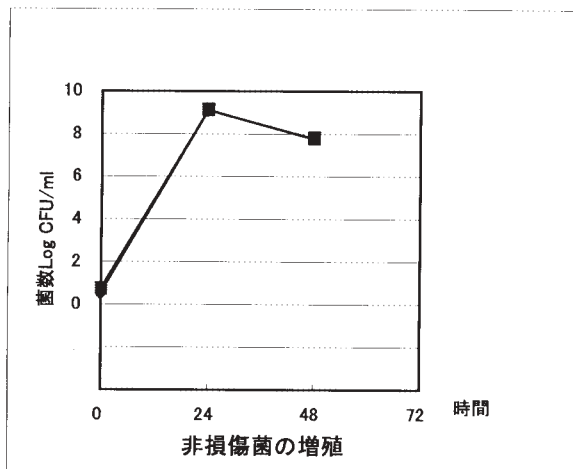


図2 TSB培地での*L. monocytogenes* IID,577非損傷菌および55℃,4分間加熱損傷菌の増殖動態
◆:TSA発育菌, ■:PAL発育菌 エラーバーは標準偏差
損傷菌の0時間のPAL発育菌数は希釈前の接種菌液の測定値より算出

数の測定値からこれの1/100以下の菌数であることが確認された。TSB培地での損傷菌の動態をみると、0時間で認められていたTSAとPALの菌数差が24時間培養の時点では認められなくなった。これは損傷菌が24時間以内に回復していることを示していると考えられた。この時点で菌数は5.0Log CFU/mlに達し、48時間後では9.0Log CFU/ml程度の菌数まで増殖することが判明した。

非損傷処理では初発菌数は3~4CFU/mlであった。非損傷菌はTSB培地において24時間で9.0Log CFU/ml

傷回復物質添加培地はEB培地に比し増殖が良くなっており、発育菌数のばらつきの程度も小さい傾向にあった。一元配置分散分析を用いて、選択分離培地であるPAL発育菌数による48時間後の各6種類の培地間の菌数増殖をみると1%の有意水準で差が認められた。Tukeyの多重比較によりEB培地とEB+C培地の発育菌数間には差が認められなかったが、EB培地とその他のすべての損傷回復物質添加培地の間に5%の有意水準で発育菌数に差が認められた。しかし、添加物質の種類あるいは組み

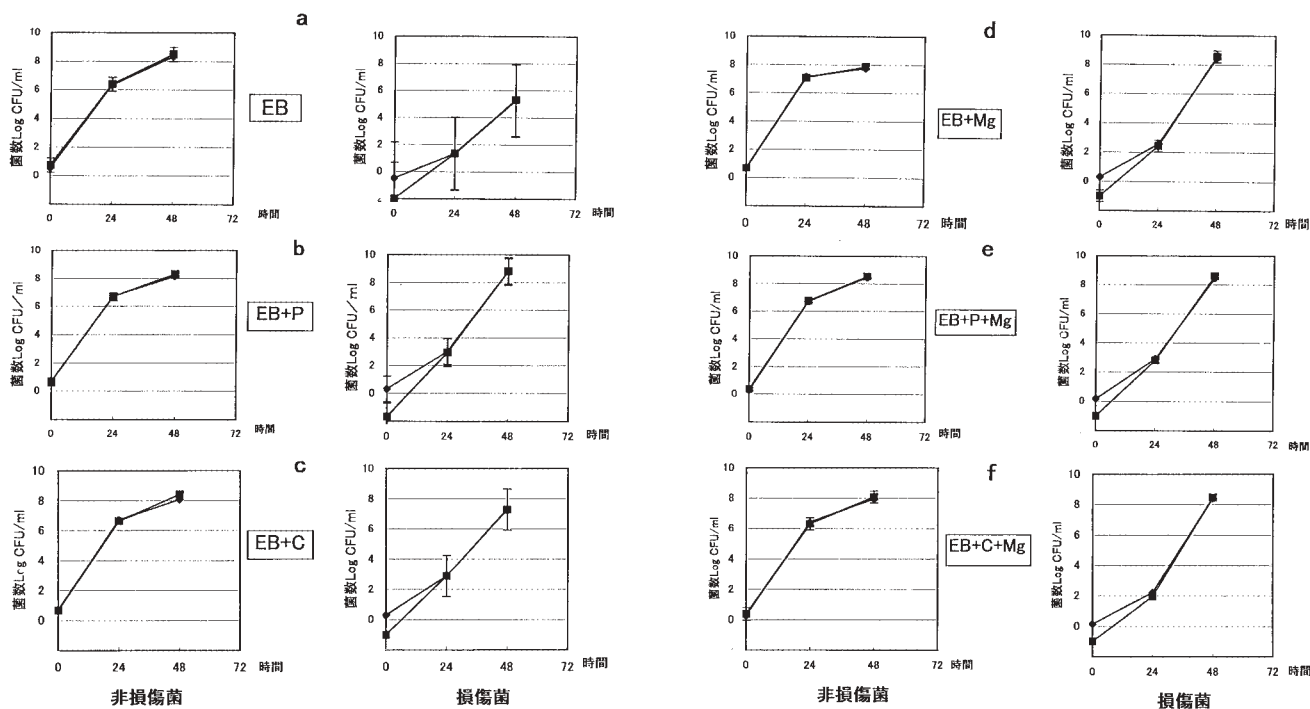


図3 EB培地および各種損傷回復物質添加EB培地での*L.monocytogenes* IID,577 非損傷菌および損傷菌の増殖
 ◆:TSA 発育菌, ■:PAL 発育菌 エラーバーは標準偏差
 損傷菌の0時間のPAL発育菌数は希釈前の接種菌液の測定値より算出
 P:ピルビン酸ナトリウム(0.1%) C:カタラーゼ(500U/ml) Mg:MgSO₄(0.025%)

表 TSB培地、EB培地および損傷回復物質添加EB培地でのリステリア非損傷菌および損傷菌のLAMP法陽性数

	培地	0時間	24時間	48時間
	非損傷菌 LAMP法 陽性数	TSB	0/3	3/3
EB		0/3	3/3	3/3
EB+P		0/3	3/3	3/3
EB+C		0/3	3/3	3/3
EB+Mg		0/3	3/3	3/3
EB+P+Mg		0/3	3/3	3/3
EB+C+Mg		0/3	3/3	3/3

	培地	0時間	24時間	48時間
	損傷菌 LAMP法 陽性数	TSB	0/3	3/3
EB		0/3	1/3	2/3
EB+P		0/3	1/3	3/3
EB+C		0/3	1/3	3/3
EB+Mg		0/3	2/3	3/3
EB+P+Mg		0/3	2/3	3/3
EB+C+Mg		0/3	1/3	3/3

EB培地への添加物質

P:ピルビン酸ナトリウム(0.1%) C:カタラーゼ(500U/ml) Mg:MgSO₄(0.025%)

合わせの種類による菌数の有意な差は認められなかった。EB+C培地では48時間後の菌数のばらつきが比較的大きく、平均の菌数も低かったためEB培地との間に有意な差が認められず、EB+C培地ではリステリア菌の加熱損傷には回復効果が弱い可能性があった。今回の実験で損傷リステリア菌に対しピルビン酸やMgSO₄の培地への添加は損傷状態からの回復を促進していると考えられた。しかし、これらの物質を組み合わせると添加した場合には損傷回復の効果が增强することは認められなかった。ピルビン酸とカタラーゼの効果については、加熱損傷により菌体のカタラーゼとスーパーオキシドディスムターゼの活性が低下し、培養過程で蓄積される微生物にとって有害な過酸化水素やスーパーオキシラジカルをピルビン酸やカタラーゼが分解し⁵⁾、損傷状態からの回復に有効

であるためと報告されている。MgSO₄では傷害により細胞壁のテイコ酸よりMg²⁺が漏出することによる構造的変化が起こるがMg²⁺を添加することで回復を促すと報告されている⁵⁾。

食品中、特に加工食品よりリステリア菌を分離する場合には損傷菌の存在を考慮する必要があると考えられているが、本実験においてはEB培地へのピルビン酸やMgSO₄添加の有用性が示唆された。

LAMP法の結果を表に示した。非損傷菌では24時間以降すべての培地で菌が検出されたが、損傷菌では24時間では菌数が十分に増殖していない場合が多く、3例とも検出できた培地は、非選択培地のTSB培地のみであった。48時間後には損傷回復物質を添加したEB培地のすべてでLAMP法陽性となった。これらの実験からLAMP

法は概ね 10^3 CFU/ml程度の菌数があれば検出可能であることが示された。LAMP法は検出感度がPCR法と同等であり、操作がより容易である。反応時間も1時間程度で、前処理の時間を含めても3時間ほどで検出できる。このため、より詳細な検討は必要であるが、損傷回復物質添加EB培地で増菌を行い、LAMP法を併用することで損傷菌の効果的かつ迅速な検出が可能になると考えられた。(平成18年7月20日受理)

文 献

- 1) 丸山 務, 小久保彌太郎: 新訂水系感染症と細菌性食中毒, 坂崎利一編, pp.413-435, 中央法規(2000)
- 2) 奥谷晶子, 五十君静信: 厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業「食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究」平成15年度総括・分担研究報告, 12-17(2004)
- 3) 五十君静信, 山本茂貴, 牧野壮一, 本藤 良, 寺尾通徳, 神保勝彦ほか: 厚生労働科学研究費補助金食品安全確保研究事業「食品由来のリステリア菌の健康被害に関する研究」平成15年度総括・分担研究報告書, 174-183(2004)
- 4) 森地敏樹: 食品加工において生ずる損傷菌の挙動と対策, 最新食品微生物制御システムデータ集, 春田三佐夫, 宇田川俊一, 横山理雄編, pp.151-180, サイエンス フォーラム(1983)
- 5) 水落慎吾: 損傷菌とその回復における培地からの試み, 防菌防黴, 31, 197-205 (2003)
- 6) 厚生省生活衛生局: 乳及び乳製品のリステリアの汚染防止等について, 平成5年8月2日, 衛乳第169号(1993)