

助成番号 9933

食品中の塩濃度の及ぼす病原細菌への影響とその遺伝解析

助成研究者：牧野 壮一（帯広畜産大学 畜産学部 獣医学科）

共同研究者：岡田 由美子（国立公衆衛生院 衛生獣医学）

伊藤 喜久治（東京大学 農学部 獣医学科）

武士 甲一（北海道衛生研究所 食品科学部）

高食塩濃度に耐性をもつ *Listeria monocytogenes*（リステリア）の性状に培地中の食塩が与える影響を調べた。培地に添加した食塩濃度が高くなるに従いリステリアの増殖能は低くなり、通常の短桿菌から長い鎖を形成する形態変化が見られた。しかし鎖を形成した菌も培養細胞へ侵入後は短桿菌と同様に増殖した。更にマウスに対する病原性試験の結果からも、本菌が食塩によって増殖能の低下と形態変化を起こすものの病原性には大きな影響はないことが示された。

1998年の5月から6月にかけて、神奈川県、富山県、東京都等で腸管出血性大腸菌O157:H7（以下O157）による集団感染症が発生した。原因食品はイクラ醤油漬であることが判明した。イクラと患者からO157が分離された。それらは、PFGE（pulsed-field gel electro phoresis）法によるDNA解析、プラスミドプロファイル、薬剤感受性試験等の試験により遺伝学的にほぼ同一であろうと結論された。しかし、調味液中でイクラ由来株は5日間生残していたが、患者由来株は2日後には完全に検出されなくなった。同時に、調味液と同濃度（13%）の食塩水で添加消長試験を行ってみたところ、イクラ由来株3株は抵抗性を示したのに対し、患者由来株2株は感受性を示した。培地の違いによる生菌数の変化を調べると、検出される菌数に差があることが明らかになり、特にDHL培地やマッコンキー培地上では、極端に検出される菌数が少ないことが判明した。さらに、プレート上に発育しない菌体について蛍光染色し鏡検すると、生きている可能性のある菌体が数多く観察され、生きてはいるが培養できない状態、いわゆるVNC（Viable but Non-Culturable）状態になっている可能性があるかと推察された。これらの結果から、今後の再発を防止するためには、確実に病原菌を培養できる方法を確立するとともに、万全の汚染防止策を取ることが極めて重要であると考えられた。

助成番号 9933

食品中の塩濃度の及ぼす病原細菌への影響とその遺伝解析

助成研究者：牧野 壮一 (帯広畜産大学 畜産学部 獣医学科)

共同研究者：岡田 由美子 (国立公衆衛生院 衛生獣医学部)

伊藤 喜久治 (東京大学 農学部 獣医学科)

武士 甲一 (北海道衛生研究所 食品科学部)

1) 緒論

食塩は食品調味料には不可欠であるが、食品の長期保存、即ち塩蔵技術として多くの食品に用いられてきた。我々は、塩が自然物質による防腐剤として働く一方、細菌性食中毒の防止にもある程度の効果があると経験的に考えてきた。しかし、一部の病原細菌は高濃度の食塩中で増殖する。また、最近、食塩存在下で長期保存された病原菌が人工培地で培養不可能ないわゆる休眠状態になり、人体内に侵入後、息を吹き返す事実が報告され始めてきた。食中毒の発生がこの数年大きな社会問題として消費者に不安を与えている現在、塩の食品添加の意義を食品媒介感染症という観点から科学的に解析する必要がある。本実験では具体的にリステリアと腸管出血性大腸菌O157をとりあげる。リステリアは主に乳製品から人に感染し、20%の含塩状態でも増殖する食塩耐性菌の代表である。また、O157は、1998年に我々が経験した高食塩添加のイクラが原因による広範囲な感染事例を起こし、分離菌株は高濃度食塩存在に耐えていたので、休眠状態の研究に最適な例であると判断した。

脳脊髄膜炎、流産を引き起こすリステリア症は *Listeria monocytogenes* (以下リステリア) によって引き起こされる人畜共通感染症であり、その主要な感染経路はリステリア汚染食品の摂取である。本菌は低温増殖能と共に高食塩濃度耐性を持ち、これらの性状が保存中の食品内での本菌の増殖に大きく関与している。リステリアは自然界に広く分布しているので、動物性食品の一次汚染の制御は困難となっている。従って食品媒介リステリア症の発生を予防するためには、製造・保存時における本菌の食品内増殖を制御することが重要である。しかし本菌の高食塩耐性と本菌の病原性に関する研究はほとんど行われていない。

また、日本ではサケの卵は醤油漬けにして保存され、イクラ醤油漬けとして寿司の材料として人気がある。一般的に醤油漬込み液の食塩濃度は13%であるが、長い間、高濃度の食塩による保存方法は経験的に食品媒介感染症

を防ぐために有効なであると考えられてきた。しかし、1998年にイクラ醤油漬けによる腸管出血性大腸菌O157による感染事例が日本各地で62名において発生した。しかも原因となったイクラ醤油漬けは一つの会社で製造されたものであったため、製造過程でO157の汚染があったものと考えられた。また汚染原因食品は九ヶ月間冷凍保存されていたため汚染経路は特定できなかったが、冷凍保存中もO157は高濃度の食塩濃度中で生残し、病原性を保持していたことが明らかとなった。同時に、イクラは高濃度の食塩濃度中で原因O157は死滅しなかったことより、原因菌は食塩に対して耐性であった可能性が考えられた。コレラやリステリアは食塩に耐性であることは知られているが、大腸菌ではそのような報告はない。さらには、原因食品に含まれていたO157の生菌数をMPN法にて計測したところ、約0.2-10個の菌数で発症することが分かった。通常1000個程度の菌量で発症すると考えられており、今回の事例は極めて発症菌量が少ないと考えられた。そこで、イクラ醤油漬け中には実際にはもっと多くの菌数が含まれていたが、高濃度の食品中では通常の方法では分離できない状態、すなわちVNC（Viable but non-culturable）状態のO157が含まれていたのではないかと考えた。実際、コレラやO157はそれぞれ海水や河川中でVNCになっていることが報告されている。しかし、食品中でO157がVNC状態になっていたという報告はない。同時に、食品中の食塩がO157に及ぼす影響についても全く報告されていない。そこで本研究では、今回分離されたO157が食品中でVNC状態になっていたのかどうかを明らかにするために、原因O157の食塩中における抵抗性について病原性との関係を調べた。

2) リステリアの食塩耐性と病原性

2-1. 要約

高食塩濃度に耐性をもつ *Listeria monocytogenes*（リステリア）の性状に培地中の食塩が与える影響を調べた。培地に添加した食塩濃度が高くなるに従いリステリアの増殖能は低くなり、通常短桿菌から長い鎖を形成する形態変化が見られた。しかし鎖を形成した菌も培養細胞へ侵入後は短桿菌と同様に増殖した。更にマウスに対する病原性試験の結果からも、本菌が食塩によって増殖能の低下と形態変化を起こすものの病原性には大きな影響はないことが示された。

2-2. 材料と方法

(1) 供試菌株

すべての実験には *Listeria monocytogenes* EGD(血清型 1 / 2a)を用いた。

(2) 培地及び試薬

リステリアの増菌にはブレインハートインフュージョン (BHI) 培地 (Difco)に0~10%の食塩 (和光純薬) を添加して用いた。菌数の測定には普通寒天培地 (日水製薬) を用いた。

(3) 食塩存在下でのリステリアの増殖と形態の変化

リステリアの一夜培養菌を食塩添加BHI培地に一定量摂取し、一夜静置培養を行ったあとそれらの菌を10段階希釈して普通寒天培地に塗布し、菌数を測定した。また、それらの菌は生理的食塩水に浮遊させて実体顕微鏡を用いて形態の観察を行った。

(4) 高濃度食塩下でのリステリアの病原性の変化

リステリアを0.5%及び3.5%食塩添加BHI培地で一夜震盪培養し、それらを遠心分離してPBSで洗浄後、PBSで希釈し、以下の病原性試験を行った。

2×10^6 cell/wellに調整して24時間培養した培養細胞 (HeLa細胞およびSwiss3T3細胞)に菌液を摂取した。その30分後に細胞を3回ハンクスのリン酸緩衝液で洗浄し、細胞外の菌を除くためにゲンタマイシン $50 \mu\text{g/ml}$ を含むMEM培地に交換した。各ウェルの細胞を一定時間毎に5回洗浄し、冷却滅菌水で細胞を破壊し、細胞内菌数を測定した。

マウスに対する病原性を調べるために、BALB/c Jclマウス8週令を用いて、静脈内投与と腹腔内投与では 10^5 cfu、経口投与では 10^8 cfuを投与した。投与液量はそれぞれ0.1mlとした。投与3日後、脾臓および肝臓を摘出し、グラム当たりの臓器内菌数を測定した。

2-3. 結果

(1) 食塩存在下でのリステリアの増殖曲線

各濃度の食塩 (0.5~7.5%) 添加BHI培地中に 8.5×10^5 個のリステリアを接種して、 37°C 24時間静置培養し、菌数を調べた (図1)。その結果、食塩濃度の増加とともに平板培地上のコロニー数の減少が観察された。同時に、菌体を顕微鏡で観察すると、食塩濃度の上昇とともに、菌の形態が長くなっているのが観察された。次に、 2×10^5 個のリステリアを0.5%および3.5%食塩添加BHIプロスに接種し、 37°C 24時間振盪培養し、1時間毎にODと生菌数を測定した。ODは対数増殖期には常に3.5%の方が低かったが、15時間以後は両濃度ともにほとんど同じになった (図2)。しかし、平板培地上の生菌数は常に3.5%の方が低く、24時間後も同様であった (図2)。このことは、食塩添加によりリステリアの増殖が抑制されただけでなく、分裂も抑

制されたことを意味している。即ち、高濃度の食塩存在下で観察された長い形態を示した菌体は、細胞分裂が抑制された結果生じたものであろうと考えられた。実際に長くなった菌体を通常の培地に接種すると正常に増殖し、通常の菌の長さになっていた。

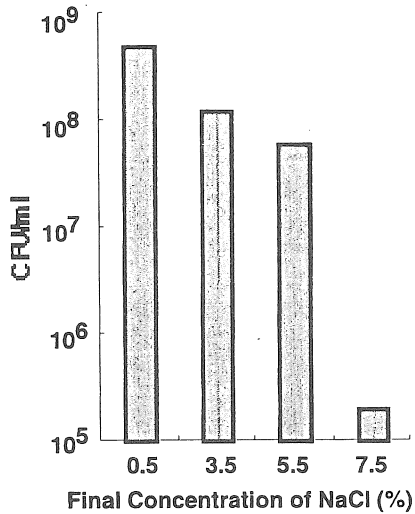


図1. リステリアの食塩濃度の異なる培地中での菌数の変化

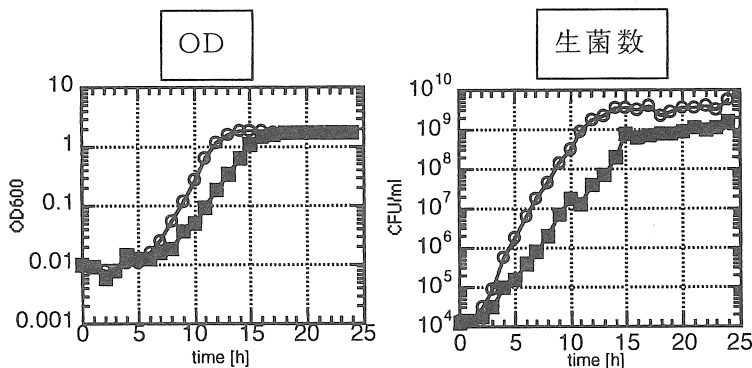


図3. 食塩濃度の異なる培地中でのリステリアの増殖曲線
○、0.5%NaCl添加BHIブロス、■、3.5%NaCl添加BHIブロス

(2) 食塩添加による培養細胞およびマウスの感染試験への影響

0.5および3.5%食塩存在下で培養したリステリアをHeLa細胞に感染させた結果、両者ともほとんど同じ細胞内増殖曲線を呈していた。しかし、マウス

静脈内及び腹腔内投与では0.5%での発育菌の回収菌量が3.5%のものよりも有意に高い結果が得られた。経口投与では両者の間に有意差は見られなかった(図3)。

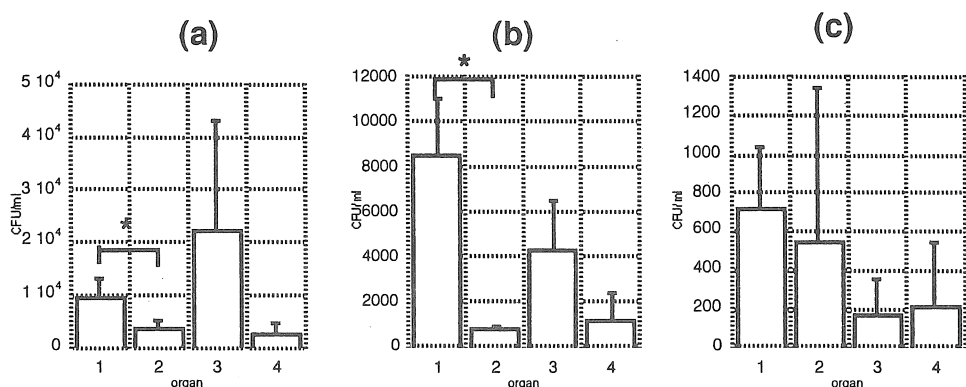


図3. Recovery of *L. monocytogenes* EGD from spleen and liver of BALB/c mice. *L. monocytogenes* cells incubated in BHI broth containing NaCl at the final concentrations of 0.5% and 3.5% were intravenously (a), intraperitoneally (b) or intragastrotically (c) injected into mice. 1: 0.5% NaCl, spleen. 2: 3.5% NaCl, spleen. 3: 0.5% NaCl, liver. 4: 3.5% NaCl, liver. * significantly different

2-4. 考察

本研究からリステリアは高濃度の食塩存在下で、その増殖および細胞分裂が抑制され、本菌の感染機会を極端に抑制すると考えられた。しかし一方では、食品汚染後のリステリアの病原性や増殖能に変化を与えることはなく、病原性は保持していた。以上のことから、リステリアは食塩存在に反応し、自らの生理機能を変化させて、環境に耐え、食塩が薄まったときに元の性質を発揮できると考えられた。即ち、食塩添加は高濃度であればリステリアの増殖抑制に効果があるものの、リステリア症の減少には大きな効果は期待できないと考えられた。リステリアの高食塩濃度耐性は、食品内での本菌の増殖を促進する重要な要因であり、その解析は食品媒介リステリア症の予防に大変重要であると思われるので、現在高食塩濃度下で増殖しない変異株を作出し、形態の変化や病原性に関して遺伝解析を行う予定である。

3) イクラ由来腸管出血性大腸菌O157の食塩耐性

3-1. 要約

1998年の5月から6月にかけて、神奈川県、富山県、東京都等で腸管出血性大腸菌O157:H7（以下O157）による集団感染症が発生した。原因食品はイクラ醤油漬であることが判明した。イクラと患者からO157が分離された。それらは、PFGE (pulsed-field gel electro phoresis) 法によるDNA解析、プラスミドプロファイル、薬剤感受性試験等の試験により遺伝学的にほぼ同一であろうと結論された。しかし、調味液中でイクラ由来株は5日間生残していたが、患者由来株は2日後には完全に検出されなくなった。同時に、調味液と同濃度（13%）の食塩水で添加消長試験を行って見たところ、イクラ由来株3株は抵抗性を示したのに対し、患者由来株2株は感受性を示した。培地の違いによる生菌数の変化を調べると、検出される菌数に差があることが明らかになり、特にDHL培地やマッコンキー培地上では、極端に検出される菌数が少ないことが判明した。さらに、プレート上に発育しない菌体について蛍光染色し鏡検すると、生きている可能性のある菌体が数多く観察され、生きてはいるが培養できない状態、いわゆるVNC (Viable but Non-Culturable) 状態になっている可能性があるかと推察された。これらの結果から、今後の再発を防止するためには、確実に病原菌を培養できる方法を確立するとともに、万全の汚染防止策を取ることが極めて重要であると考えられた。

3-2. 材料と方法

(1) 菌株

使用したEHEC O157株は、本事例から分離されたイクラ由来3株および患者由来4株である（表1）。

表1, 使用菌株のリスト

Strain	Serotype	Origin	Isolation	Toxin
#2	O157:H7	Roe	Hokkaido	Stx1 Stx2
#3	O157:H7	Roe	Hokkaido	Stx1 Stx2
#4	O157:H7	Roe	Hokkaido	Stx1 Stx2
#5	O157:H7	Patient	Kanagawa	Stx1 Stx2
#6	O157:H7	Patient	Tokyo	Stx1 Stx2
#7	O157:H7	Patient	Toyama	Stx1 Stx2
#8	O157:H7	Patient	Chiba	Stx1 Stx2

(2) 培地

液体培地はL-brothまたは食塩成分を含まないNutrient broth (Difco) を用いた。寒天平板培地としてL-agar、DHL寒天培地（栄研）、MacConkey寒天培地（MC; 栄研）、Tryptocase soy agar (TSA; BBL)、Heart infusion agar (HI; 栄研)、Brain heart infusion agr (BHI; Difco)、Nutrient agar (NA; Difco)、Mueller Hinton agar (MH; 栄研)を目的に応じ用いた。

(3) O157株の漬込み液および食塩水中での消長

イクラ醤油漬けの漬込み液の組成は醤油79.0%、水分14.0%、調味料6.5%、合成酒0.3%、発酵調味料0.2%から成り、食塩相当量13%であった。Lプロスで培養したイクラ由来O157株と患者由来O157株を漬込み液に接種し、32℃における菌数の変化をL-agar上にて測定した。食塩水中でのO157の菌数の推移は、37℃で一夜培養したO157菌液1.0mlを遠心し、その沈渣に13%もしくは7%の食塩水100mlを加えた。その液を37℃で培養し、0.1ml当り菌数の推移を経時的に適当な平板培地を用いて調べた。必要な時に、同時にLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits (Molecura Probes) を用い、菌体を蛍光染色しO157の生死を判別した。

(4) 薬剤感受性試験

薬剤感受性試験は“Sensi-Disc “ (Becton Dickinson, USA) を用いて、マニュアルに従い行った。使用薬剤ディスクは、12種類（fosfomycin, tetracycline, minocycline, streptomycin, ampicillin, penicillin G, chloramphenicol, kanamycin, nalidixic acid, norfloxacin, cefdinir, trimethoprim）を用いた。

(5) DNA解析

常法に従い、XbaIによる切断後、PFGE (Pulsed field gel electrophoresis) 法によりイクラ由来株および患者由来株のDNA解析を行った。同時に常法に従って、プラスミドDNAを抽出し、プラスミドパターンを調べた。

(6) マウスへの攻撃試験

マウスはBalb/c雌（4～6月齢）の無菌マウスを用いた。飼育はビニールアイソレーター内で行った。イクラ由来株（#2）と患者由来株（#5）を13%食塩水中で72時間培養後、その0.1mlをメタルカテーテルを装着した1ml注射筒を用いて経口投与した。同時に、投与した0.1mlをTSA培地上に塗抹し、コロニーの発育を調べた。

(7) その他の方法

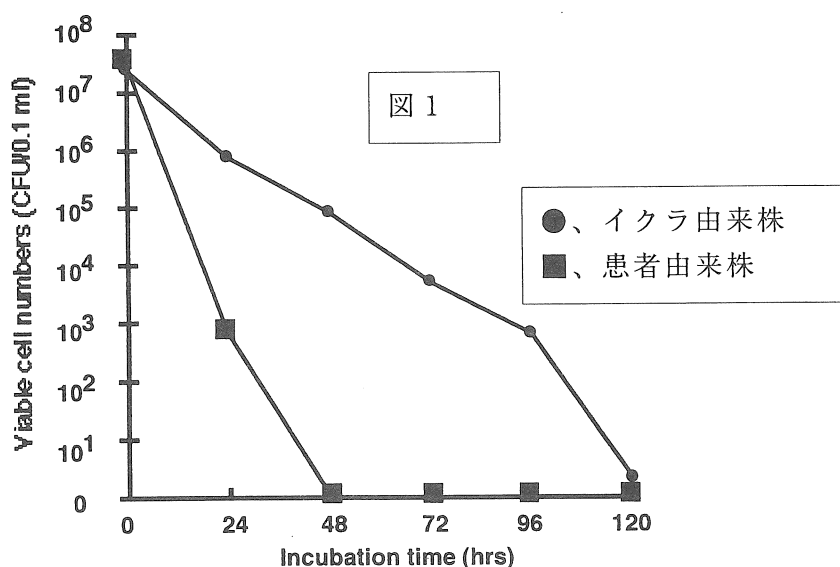
ベロ細胞の毒性試験はVTEC-RPLA（デンカ生研）およびベロ細胞試験を

常法に従い行った。DNA分離方法、プラスミド分離方法、PCRは以前の報告（Microbiol. Immunol. 42: 683-688., 42:815-822, 1998）に従った。

3-3. 結果

(1) 調味液におけるO157添加消長試験

魚卵は豊富な栄養を含んでいるので、魚卵にO157を添加すると増殖するだろうと始めに考えた。しかし、無傷もしくは潰した魚卵にO157を添加してもO157は増殖しなかった（結果示さず）。それらを-20℃で冷凍保存しても菌数の増減は見られなかった。しかし、10倍量のPBSを加えるとO157は増殖した（結果示さず）ので、潰込み液中でO157が増殖し、結果的に感染を起こしたのではないかと考え、その可能性を調べた。図1にイクラ由来株（#2）と患者由来株を調味液に接種した時の菌数の経時変化を調べた。両菌株を約 10^7 個接種すると#2は生菌数は減少するが、5日以上L-agar上にてコロニーを検出できた。しかし、#5株は2日後にはL-agar上には全くコロニーが検出できなくなった。



(2) 分離菌株のDNA解析

イクラ由来株#2と患者由来株#5食塩に関して感受性が異なっていたため、両者が遺伝学的に同一ではない可能性も考えられた。そこで、表1に示した全株に関してDNA解析、プラスミドプロファイルおよび薬剤感受性を調べた。感受性試験は、#6株がペニシリンGに耐性であった以外、全ての株は全薬剤に感受性であった。さらに、プラスミドプロファイルは、O157が共通に保存しているプラスミドと同じ大きさのプラスミドを保有していたが、

6 株には小さなプラスミドがさらに保有されていた (図2-A)。PFGE解析では、# 6において僅かな違いはあるものの、全株ともほぼ同一のオリジンであると考えられた (図2-B)。RAPD解析は示さないが、同じ結果になった。

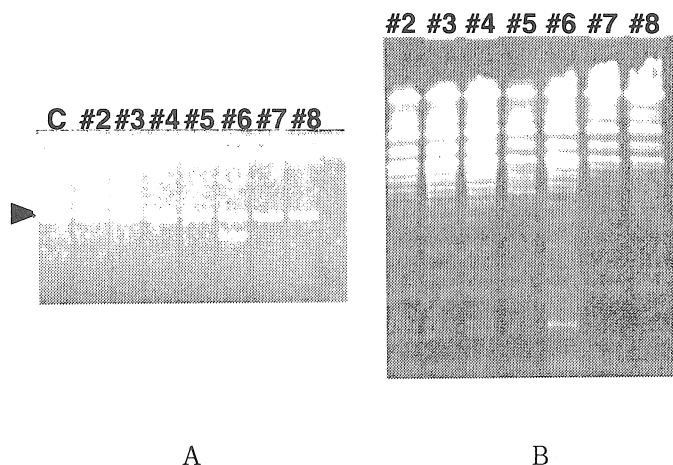


図2. 分離菌株のプラスミドプロファイル(A)とパルスフィールドゲル電気泳動解析(B)

(3) 食塩水中におけるO157株の生菌数の変化

以上より患者由来株はイクラ由来株と同一クローンであるにもかかわらず、食塩に対する感受性には差があると結論した。そこで、調味液と同濃度の13%食塩水中において、食塩を含まないNutrient brothで培養した各菌株の生菌数の差をL-agar上にて調べた。その結果、患者由来株#5と#6は48時間後には0.1ml中にはコロニー成育が見られなかった (図3-A)。即ち、この両株は食塩に感受性であった。一方、イクラ由来3株は全て耐性を示した (図3-A)。しかし、患者由来株の内、2株はイクラ由来株株よりは感受性であったが、感受性ではなかった。この現象は、7%食塩水でも同様であった (図3-B)。結果は示さないが、3%食塩水中でも同じ結果になった。これらの形質はNutrient brothで約100世代継代しても変化が無かった (結果示さず)。

表2. Viable cell numbers of O157 on various plates in 13 % NaCl

Strains	Inoculum Size (10^7)	Bacterial numbers (1,000 CFU/0.1ml)							
		L	DHL	MC	TSA	HI	BHI	N	MH
#2	1.0	1,100	8.5	5.0	7,800	1,100	870	1,100	1,000
#5	1.4	0	0	0	112	1	24	98	10

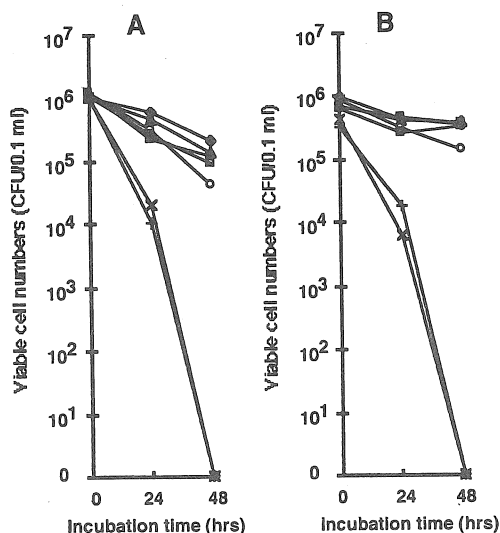


図3. 13%食塩水(A)および7%食塩水(B)中のO157の消長

イクラ由来株：#2 (◆)、#3 (▲)、#4 (■)

患者由来株：#5 (×)、#6 (+)、#7 (□)、#8 (○)

(4) 食塩水中で培養したO157の生菌数と培地との関係

これまでの結果は全てL-agar上におけるコロニーの形成を調べたが、培地によりコロニー形成に差があるかどうかを調べた。イクラ由来株#2と患者由来株#5を13%食塩水中で48時間培養し、その希釈液を各種培地に塗抹して生菌数を比較した。その結果、明らかに生育する菌数は培地により差があった(表2)。#2株はTSA平板上で最も菌数が多く観察されたが、DHL上では接種菌量の0.1%以下に減少していた。#5株では#2株より常に菌数は低く、#2株と同様にTSA寒天上で最も菌数が多かった。DHLおよびL-agar上ではコロニーは検出されなかった。そこで、菌数の推移をNutrient brothで培養した菌を用いて調べたところ、明らかにDHL平板上での菌数は急激に減少していることが分かった(図4)。しかし、#2株では6日後でもDHL平板上で生育するコロニーがあった。#5株は、TSA培地上で72時間後にはコロニーの生育が観察されなかった。この結果は7%食塩水の場合でも同じであった。

13%食塩水中で72時間培養後、#2は接種菌量の約半分の菌数がTSA培地上で検出できたが、#5は全くコロニー形成が見られなかった(図4)。そこで、実際の細菌の生死をLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kitsを用いて蛍光染色し、緑色に染まる生菌と、赤色に染まる死菌を蛍光顕微鏡

下で計測した。1500個ランダムに数えた結果、イクラ由来株では緑色の菌が99.3%で赤色の菌が0.7%だった。患者由来株では緑色が96.5%で赤色が3.5%であった。

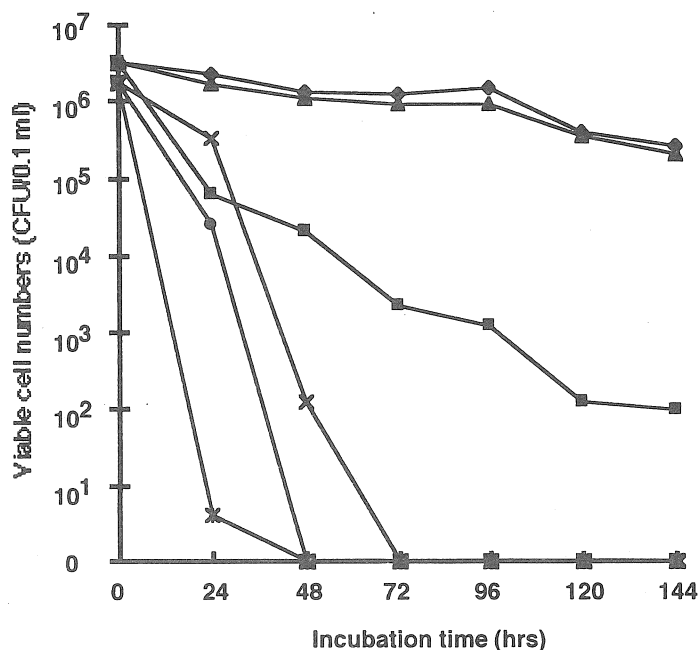


図4. 13%食塩水中で培養したイクラ由来株と患者由来株の異なる培地上のコロニー数の推移

イクラ由来株のTSA (◆)、N-agar (▲)、DHL (■) 平板上での発育と患者由来株のTSA (×)、N-agar (●)、DHL (*) 平板上での発育

また、13%食塩水中で72時間培養した#5の0.1mlを、TSA上でコロニー発育が観察されないことを確認し、Yeast extract (1mg/ml)に接種して37℃で48時間培養した。その結果、毒素産生やPFGEパターンも元株と同じO157が得られた(結果示さず)。さらに、同時に、Nalidixic-acid (40 μg/ml)を加えると48時間後には顕微鏡下でlong-formになった菌体が観察された。以上の結果から、#5株は食塩水中でVNC(Viable-but-non-culturable)状態に変化していると結論された。

(6) マウスへの感染実験と食塩耐性

VNC状態のコレラはウサギへの病原性を保持し、かつウサギ体内で培養可能な状態に回復することが報告されている。そこで、方法に従い、イクラ由来株と患者由来株を13%食塩水中で37℃72時間培養し、その0.1mlをマウスに経口投与してマウスへの毒力および腸管内からの菌の回収を調べた。こ

の際投与した患者由来株0.1ml中にはTSA平板上ではコロニー形成は観察されなかったが、イクラ由来株では105コロニー検出できた。イクラ由来株ではマウスは死亡し、腸管内からO157が回収されたが、患者由来株ではマウスの死亡やO157の回収は検出されなかった。

3-4. 考察

今回使用したO157株は全てイクラ醤油漬けが原因の集団感染事例から分離された株であった。高濃度の食塩存在下で長期間冷凍保存された魚卵が原因となった世界で初めてのO157感染事例であった。イクラにO157を人工的に添加しても菌の増殖は観察できなかった。同様に、冷凍保存しても菌の増減は観察されなかった。このことはイクラがO157の安定な保存剤になっていたのであろう。しかも菌の増殖が観察できなかったことから、O157はイクラ製造工程のどこかのステップでにおいて、ヒトの発症に必要な菌量の汚染があったと考えられる。しかし、その菌量はどのくらいなのか結論が得られていない。実際には、0.2~10個程度で発症したと推定しているが、他の報告に比べると非常に少ない。イクラ醤油漬け内のO157汚染に偏りがあったのかもしれない。

一方では、イクラから分離されたO157は食塩耐性であったが、患者から分離された株#5は食塩感受性であった。この患者由来株#5は13%食塩水中で72時間後には通常の培地上には成育しなくなるが、Yeast extract液中では増殖した。これらの結果から、イクラ醤油漬け内には食塩耐性O157菌と多数のVNC状態の食塩感受性菌が存在していたのだろう。また、実際の細菌の生死をLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kitsによる蛍光染色法で蛍光顕微鏡下で計測した。このキットが確実にVNC状態の細菌を染め分けることができるとしたら、イクラ由来株も20~30%はVNC状態になっていたと推定される。実際に、イクラ由来株を食塩水中で培養すると感受性菌が一時的にせよ分離できた。

患者から分離されたO157は、食塩耐性株と感受性株であった。このことは、イクラ中の食塩感受性株は通常の培地には成育しないが、ヒトの体内を通過すると食塩耐性菌とともに通常の培地上にも成育するようになることを意味している。同時に、病原性も回復したと考えられる。そこで、O157の動物実験系として一般的であるGerm-free-mouseを用いた実験を行った。食塩耐性菌はマウスを殺したのに、食塩感受性菌はマウスを殺さなかった。しかも、腸管内から食塩感受性菌は回収されなかった。このことはVNC状態の食塩感受性菌がマウスに対する病原性を保有していないことを意味してい

る。しかし、このことがヒトにおいてVNC状態のO157が毒力が無いことにはならないだろう。多分マウスに対するO157による死亡は、O157の定着より、産生毒素のみが影響しているのだろう。VNC状態のO157が病原性を保有しているのかは、O157のヒトへの感染系を再現可能なモデル系の確立が必須である。しかし、VNC状態のO157はYeast-extract中で増殖したことや、増殖したO157が毒素を産生していたことから、病原性は保有していると考えられる。しかし、感受性株はどのようにして生まれてきたのかは明らかにすることはできない。可能性として、耐性菌が体内の通過により感受性菌になるのか、イクラの中に存在するVNC状態の感受性菌が体内通過の際に病原性を回復したのか、どちらかであろう。今後の研究成果に期待するべきであろう。

VNC状態の細菌はさまざまなストレスを受けて、自らの生理機能が変化し正常な細胞分裂ができなくなってしまうている。たとえば、サルモネラは加熱で、コレラ菌は海水中で、O157は河川中でVNC状態になることが報告されている。今回、O157が食塩存在下でVNC状態になることを示したが、もしこのような変化が一般的に食品中で起きるのであれば、通常の細菌培養分離同定方法ではVNC状態の病原菌の分離はできないことになる。食中毒が起きた場合、原因食材を特定するのが非常に困難な場合があるが、その一要因としてVNC状態が考えられるかもしれない。今回、木暮等の報告に従い、VNC状態のO157をYeast-extract中で回復することができたが、完全な食塩耐性O157の回復条件であるかは分からない。また、生体内で本当に回復できるのか今後の課題である。的確な回復条件の確立が病原菌の分離には必要になってくるであろう。

同時に、大きな問題として、O157の分離方法があげられる。即ち通常の腸内細菌の分離方法として用いられている胆汁酸添加の培地である。しかし、VNC状態のO157はこのような培地には全く成育しなくなる。食塩耐性菌でさえ、徐々にそのような培地上でのコロニー数は減少していった。実際に、我々は動物の糞便からEHECを分離する際に、増菌培地としてTSBを使った方が選択制の強い培地より、より効果的にEHECを分離できた。即ち、食品や環境から腸内細菌を分離するには、胆汁酸の添加されている培地での直接分離や増菌は極力避ける必要があるだろう。これは他の細菌でも言えることで、VNC状態への細菌の変化が一般的に起こっているとしたら、今までの細菌分離方法ではそのような状態の細菌は分離できなくなるであろう。

Effect of Sodium Chloride on Pathogenic Bacteria and Its Genetical Analysis

Sou-ichi Makino¹, Yumiko Okada², Kikuji Itho³, and Koichi Takeshi⁴

¹Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Department of Veterinary Medicine,

²The National Institute of Public Health, Department of Veterinary Public Health,

³Tokyo University, Department of Veterinary Medical Sciences,

⁴Hokkaido Institute of Public Health, Food Hygiene Division

Summary

The effects of sodium chloride on the morphology, growth and virulence of *Listeria monocytogenes* were examined. The growth of *L. monocytogenes* EGD was inhibited by adding NaCl, and chain formation of bacterial cells was observed. But *L. monocytogenes* was able to multiply in HeLa cells normally regardless of the concentration of NaCl. When *L. monocytogenes* was injected into mice and recovered from the spleen and liver, no difference was shown by intragastorically injection. These results showed that NaCl inhibits the bacterial cell growth but has almost no influence on the pathogenicity. Finally, we thought that the growth of *L. monocytogenes* could be protected in foods containing a high concentration of NaCl but that the hazard to humans by *Listeria* might be preserved.

In the period from May to June 1998, the outbreak of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 infection occurred in Kanagawa, Toyama, Tokyo and other places. We isolated *E. coli* O157 from salmon roe and patients. Analysis of the isolates by a pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), plasmid profiles, and antibiotic patterns, revealed that all isolates derived from same origin. We studied *E. coli* O157 in the saline solution (13%), resulting that 3 food origin isolates were resistant to NaCl, but that 2 patient origin isolates were sensitive. And the examination into whether the living cell numbers changed according to the difference of plates showed that the detected cell numbers were different. It was extremely small, especially on DHL agar and on MaConkey agar. In addition, under the fluorescence microscopy, bacterial cells, which were possibly alive, were observed. These results indicated the possibility that *E. coli* O157 entered into VNC (Viable but Non-Culturable) state. In conclusion, it is important to establish the way to detect the pathogen certainly and to take the surest plan for preventing contamination.