

## 食肉の微生物学的安全性を維持する塩類の作用メカニズムの解明

島村 裕子, 増田 修一

静岡県立大学食品栄養科学部

**概要** 本研究では、効果的な食肉の殺菌方法を見出すために、各種塩類(NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>)の食肉への食中毒菌の付着・侵入に及ぼす影響を調べ、食肉の微生物学的安全性を維持する塩類の作用メカニズムについて明らかにすることを目的とした。

5% NaCl 溶液に 24 時間浸漬した肉片の上部表面(汚染面の線維の方向は垂直)に菌液 0.1 mL を付着させた場合、菌が内部 1 cm までの侵入に留まった。これらの結果より、NaCl が食肉表面の構造を変化させることにより、菌の侵入を阻害した可能性が示唆された。次に、食肉に分布する結合組織の構成成分であるコラーゲン I、コラーゲン IV、フィブロネクチンおよびラミニンの 4 種の細胞外マトリックス(ECM)タンパク質に着目し、食中毒菌の ECM タンパク質への付着に対する塩類の影響について検討した。

その結果、各種 ECM タンパク質において、5 および 10% NaCl 溶液処理により、食中毒菌の付着が抑制されることが示唆された。これらの結果より、5 および 10% NaCl 溶液が食中毒菌の食肉への付着・侵入を阻害するメカニズムとして、ECM タンパク質への付着に対する抑制作用が考えられた。さらに、塩類が食中毒菌の毒素遺伝子(*sea*)発現やバイオフィーム形成に及ぼす影響について検討したところ、5% NaCl 溶液に浸漬した黄色ブドウ球菌、サルモネラおよび大腸菌において、毒素遺伝子およびバイオフィーム関連遺伝子の発現が有意に減少した。これらの結果より、5% NaCl 溶液は、食中毒菌の毒素遺伝子およびバイオフィーム関連遺伝子の発現を抑制または不活化できることが示唆された。

本研究の成果より、塩類は、食中毒菌の付着・侵入を抑制するだけでなく、その病原性因子の発現も抑制できる可能性が示唆され、今後、実際に塩類で処理した食品表面や内部における食中毒菌の挙動や病原性因子の発現についてさらに詳細に調べ、塩類を用いたより効果的な殺菌法の開発につなげていきたいと考えている。

### 1. 緒言

2011 年、ユッケで起きた腸管出血性大腸菌 O-111 による集団食中毒事件を機に、消費者の食肉の安全性に対する不安が高まっている。食肉の食中毒菌における汚染において、食中毒菌が単に食肉の表面に付着しているだけでなく、食肉内部にまで侵入した場合、洗浄や表面の加熱のみでは、除去・除菌できない可能性がある。そのため、食中毒菌の食肉内部への侵入や毒素遺伝子発現に影響を与える因子について明らかにすることは、食中毒菌による汚染防御を考える上で重要である。我々は、これまでに、効果的な食肉の殺菌方法を見出すための基礎的な知見を得ることを目的として、アルカリ性・酸性電解水併

用処理を用いた食肉の殺菌法について検討を行い、その殺菌効果は、従来の鶏肉の洗浄に用いられている次亜塩素酸ナトリウム処理よりも効果があることを明らかにしている。アルカリ性電解水(pH 11.5)と酸性電解水(pH 2.5)を併用して使用することで、pH は中性(約 pH 7.0)となり、塩(NaCl)を生じることから、生じた塩が食肉の殺菌に影響を与えていると推察された。本研究では、効果的な食肉の殺菌方法を見出すために、影響因子として考えられる各種塩類(NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>)が食肉への食中毒菌の付着・侵入に及ぼす影響を調べ、食肉の微生物学的安全性を維持する塩類の作用メカニズムについて明らかにすることを目的とした。

近年、宿主に対し、悪影響を及ぼす病原菌やそれらの産生する毒素に関しては、その治療や予防の面から、鼻腔内や腸管内での付着機構に関する研究が進んでいる<sup>[1,2]</sup>。食肉に対する微生物の付着に関して、食肉に含まれる細胞外マトリックス(ECM)タンパク質(コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等)に微生物が付着することが報告されている<sup>[3,4]</sup>が、実際の食肉を用いた研究報告は少なく、いまだ不明な点が多い。そこで、食肉の結合組織の構成成分である ECM タンパク質に着目し、その中でも食肉表面に多く分布するコラーゲン I、コラーゲン IV、フィブロネクチンおよびラミニンの 4 種について、食中毒菌の各種 ECM タンパク質への付着特性を調べるとともに、食中毒菌の ECM タンパク質への付着に対する塩類の影響を解明した。

毒素型食中毒では菌自体ではなく、菌が産生する毒素が問題となる。食肉を塩溶液に浸漬することで、付着した食中毒菌の毒素産生を抑制もしくは産生された毒素を不活化できれば、食中毒の危険性は減少する。また、バイオフィームは細菌にとって特徴ある微視的な住処となっているが、固体表面への付着に伴い、特定の遺伝子の発現が高められることや、遺伝子型が同じでも表現型が大きく異なることが報告されている<sup>[5,6]</sup>。これまでに、温度、pH、振とう、糖類などの環境因子がバイオフィームに与える影響について報告されているが、塩類の影響については、ほとんど報告されていない。そこで、塩類が食中毒菌の毒素遺伝子発現やバイオフィーム形成に及ぼす影響についても検討した。

## 2. 研究方法

### 2.1 塩溶液が食肉表面の線維の状態に与える影響

#### 2.1.1 試料の調製

試料は、鶏むね肉のブロック肉を試験に供した。試料はアオノミート株式会社より供与され、大学内に搬入後、冷蔵貯蔵 3 日以内に実験に供した。試験直前に各ブロック肉を無菌的に縦 2 cm×横 2 cm×高さ 2 cm の立方体に包丁でカットした。上部表面の線維方向が垂直(線維の入る方向が縦方向)の肉片の試料を作製した。

#### 2.1.2 塩溶液への食肉の浸漬

MilliQ 水、1%、5%および 10%の各種塩(NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>)溶液を各々 100 mL ずつ入れた 200 mL の

ビーカー内に縦 2 cm×横 2 cm×高さ 2 cm の立方体にカットした肉片を 0 分、5 分、15 分、1 時間、24 時間浸漬し、肉片の表面の線維の状態を経時的に実体顕微鏡(SZX10, OLYMPUS)で観察した。

### 2.2 塩溶液への浸漬が食中毒菌の付着・侵入に与える影響

#### 2.2.1 試料の調製および塩溶液への食肉の浸漬

試料は、2.1.1と同様、鶏むね肉のブロック肉を試験に供した。試験直前に各ブロック肉を無菌的に縦 3 cm×横 3 cm×高さ 6 cm の立方体に包丁でカットした。上部表面の線維方向が垂直(線維の入る方向が縦方向)の肉片の試料を作製した。MilliQ 水、5% NaCl 溶液を各々 200 mL ずつ入れた 500 mL のビーカー内に縦 3 cm×横 3 cm×高さ 6 cm の立方体にカットした肉片を 24 時間 4°C で浸漬した。

#### 2.2.2 供試菌株および接種菌液の調製

*Staphylococcus aureus* C-29 および *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis NBRC3313 を試験に供した。一晚培養した各菌培養液 30 μL を BHI(関東化学)液体培地(3 mL)に接種し、37 °C で 24 時間振盪培養した。培養後、マイクロチューブに各菌体の培養液 100 μL と滅菌 PBS 900 μL を分注し、懸濁した。この懸濁液を PBS で 5~6 log CFU/mL および 6~7 log CFU/mL の濃度に希釈し、調製後 1 時間以内に試験に供した。

#### 2.2.3 接種菌液の食肉への接種

縦 3 cm×横 3 cm×高さ 6 cm の立方体にカットした肉片をアルミ箔に包み、直立させた。肉片の上に接種菌液を 0.1 mL(5~6 log CFU/mL)または 0.01 mL(6~7 log CFU/mL)スポットした。試料の乾燥を防ぐため、滅菌水を含ませたキムワイプでビーカーまたはシャーレを包み、その上からアルミホイルで覆った。各々の試料を低温室内(4 °C)で 24 時間保存したものを菌汚染肉(菌汚染肉の初発菌数は、4~5 log CFU/肉片)とした。

#### 2.2.4 菌の回収と菌数の測定

24 時間後、各肉片の表面を麺棒で拭き取り(表面)、表面から 1 cm(0 cm~1 cm)、表面から 2 cm(1~2 cm)、表面から 4 cm(2~4 cm)、表面から 6 cm(4~6 cm)の位置で切断した。食肉表面の菌数は、拭き取り後の綿棒を 90 mL の PBS に入れ、120 秒間ストマッキングすることで回収した。各切断した試料の菌は、試料をストマッカー袋に入

れ、滅菌 PBS を 90 mL 加え、スタマッカーバックミキサー (iMIX; Interlab) にて 120 秒間スタマッキングすることで回収した。スタマッキング後、PBS による段階希釈液を 0.1 mL ずつ、黄色ブドウ球菌はマンニット食塩培地、サルモネラは XLD 寒天培地に滅菌コンラージ棒にて塗布した後、48 時間培養後のコロニー数を計測した。

### 2. 3 ECM タンパク質に付着した食中毒菌に対する NaCl の影響

#### 2. 3. 1 NaCl 処理菌懸濁液の調製

*S. aureus* C-29、*Salmonella* Enteritidis NBRC3313、*Escherichia coli* ATCC 10798 を各々一晚培養し、各菌培養液 30  $\mu$ L を BHI (関東化学) 液体培地 (3 mL) に接種し、37°C で 24 時間振盪培養した。培養後、マイクロチューブに各菌体の培養液 1 mL を分注し、4,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離することによって菌体を集菌し、PBS で 2 度洗浄した後、各濃度 (0%, 1%, 5% および 10%) の NaCl 溶液で再懸濁して 10<sup>9</sup> CFU/g とした。調製した菌懸濁液は 1 時間以内に試験に供した。

#### 2. 3. 2 ECM タンパク質に付着した食中毒菌の定量

各 ECM タンパク質 (コラーゲン I, コラーゲン IV, フィブロネクチン = 100  $\mu$ g/mL, ラミニン = 50  $\mu$ g/mL) 200  $\mu$ L で被膜した丸底 96 well plate に菌懸濁液 (10<sup>9</sup> CFU/g) 100  $\mu$ L を加え、25°C で 2 時間インキュベーションした。菌懸濁液を除去した後、200  $\mu$ L のアルカリ性電解水、酸性電解水、PBS の順に 3 回洗浄した。付着した菌を 55°C で 20 分間熱固定し、次いで 95  $\mu$ L の 1% クリスタルバイオレットで、25°C で 45 分間反応させて染色した。各 well の過度の染色を滅菌水で 3 回リンスして除去し、室温で 30 分間空気乾燥させた。95% エタノール 100  $\mu$ L を well に加えて 15 分間脱色し、530 nm の吸光度を測定した。

### 2. 4 塩類が毒素及びバイオフィーム関連遺伝子に与える影響

#### 2. 4. 1 供試菌株および ECM タンパク質コーティングプレート

食中毒菌の毒素として、毒素型食中毒起因菌の黄色ブドウ球菌の毒素 staphylococcal enterotoxin A (SEA) 遺伝子の発現量を調べた。ECM タンパク質は、黄色ブドウ球菌が特異的に付着したコラーゲン I (100  $\mu$ g/mL) を用いた。バイオフィーム形成については、黄色ブドウ球菌は *icaD* 遺伝子、サルモネラおよび大腸菌は、*csqD* 遺伝子の発現

量を調べた。ECM タンパク質は、黄色ブドウ球菌については、コラーゲン I (100  $\mu$ g/mL) を、サルモネラおよび大腸菌については、ラミニン (50  $\mu$ g/mL) を用いた。NaCl 処理菌懸濁液の調製および ECM タンパク質に付着した食中毒菌の定量については、2. 3. 1 および 2. 3. 2 と同様に行った。なお、ECM タンパク質をコーティングしていない試料をコントロールとした。

#### 2. 4. 2 リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現量の測定

ECM タンパク質で被膜した丸底 96 well plate に菌懸濁液 100  $\mu$ L を加え、25°C で 6 時間インキュベーションした後、菌懸濁液を除去した。100  $\mu$ L の PBS を加えて再懸濁したものを集菌し、4,000 $\times$ g で 5 分間遠心した後、上清を捨て、菌体を回収し、RNA の抽出を行った。RNA 抽出 RiboPure-Bacteria (Ambion) を用い、キットのプロトコールに従って Total RNA を抽出、精製し、RNase free water に溶解した。分光光度計 (GeneQuant pro, GE healthcare Japan) で 260 nm と 280 nm の吸光度を測定し、RNA 濃度と純度を確認した。次いで、PrimeScript RT reagent Kit (Takara Bio.) を用いて RT-PCR を行った。Total RNA 抽出物からランダムプライマー、Oligo dT プライマーを用いて cDNA を合成した。10  $\mu$ L の反応系のうち Total RNA 量が 10 ng の濃度になるように調製した。リアルタイム RT-PCR は SYBER ExScript RT-PCR kit (Takara Bio.) およびその取扱説明書に従って、Real-time PCR 装置 (Thermal Cycler Dice® Real Time System II; Takara) にて行った。逆転写反応液 10  $\mu$ L のうち 2  $\mu$ L を用いて、20  $\mu$ L の反応系でリアルタイム RT-PCR を行い、mRNA の発現を測定した。サンプル間の mRNA 量を補正するために、16S rRNA 遺伝子を内部標準として用いた。プライマーは、Table 1 に示した。各遺伝子発現量は、コントロールにおける発現量を 1 とした時の相対量で示した。

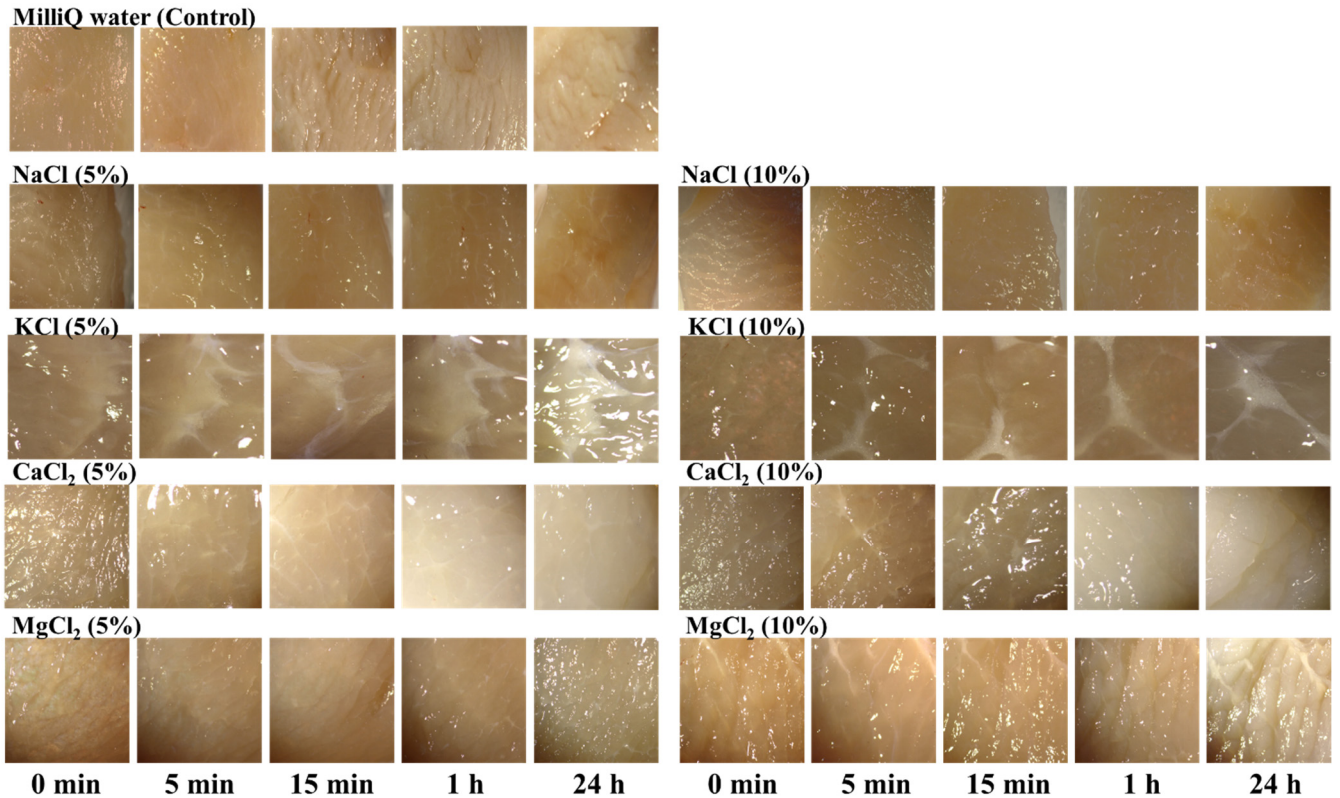
### 3. 研究結果

#### 3. 1 塩溶液が食肉表面の線維の状態に与える影響

肉片を 1、5、10% の各種塩溶液 (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) に 0、5、15 分、1、24 時間浸漬して、表面の状態を顕微鏡で観察した (Fig. 1)。MilliQ 水および 1% 各種塩溶液 (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) に浸漬した肉片では、時間経過に伴い肉片表面の線維の間隔が広がった (data not

**Table 1.** Primers used for real time RT-PCR

Gene	Primers sequences	Length (bp)
<i>sea</i>	5'-AAAATACAGTACCTTTGGAAACGGTT-3' 5'-TTTCCTGTAAATAACGTCTTGCTTGA-3'	94
16S rRNA	5'- GCGAAGAACCTTACCAAATC-3' 5'- CCAACATCTCACGACACG-3'	120
<i>S. aureus icaD</i>	5'- GGGTGGATCCTTAGTGTTACAATTTT-3' 5'- TGACTTTTTGGTAATTCAAGGTTGTC-3'	198
<i>S. Enteritidis csgD</i>	5'-GCCTCATATTAACGGCGTGT-3' 5'-GGACTCGGTGCTGTTGTAGC-3'	70
<i>E. coli csgD</i>	5'- CCCGTACCGCGACATTG -3' 5'-ACGTTCTTGATCCTCCATGGA-3'	200
<i>S. aureus</i> 16S rRNA	5'- GCGAAGAACCTTACCAAATC-3' 5'- CCAACATCTCACGACACG-3'	120
<i>S. Enteritidis</i> 16S rRNA	5'- CGGGGAGGAAGGTGTTGTG-3' 5'- GAGCCCGGGGATTCACATC-3'	705

**Fig. 1.** Effects of various salts on structure of meat fibrous

Each meat sample portion was subdivided ( $2 \times 2$  cm) and dipped in various salt solutions. The dipped samples were stored at 4 °C.

shown)。一方、5% NaCl 溶液に浸漬した肉片では、時間経過に伴い肉片表面の線維の構造が引き締まった。その他の5% 塩溶液(KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>)に浸漬した肉片でも、時間経過に伴い肉片表面の線維の構造が変化した。また、10%各種塩溶液(NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>)に浸漬した肉片では、時間経過に伴い肉片表面の線維の間隔が広がった。

### 3. 2 塩溶液への浸漬が食中毒菌の付着・侵入に与える影響

各種 5% 塩溶液(NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>)または MilliQ 水(コントロール)に浸漬した鶏むね肉(線維方向

は垂直)の上部表面にサルモネラ菌液 0.1 mL(初発菌数 4~5 log CFU/肉片)を接種し、4°Cで24時間保存したところ、MilliQ 水、KCl、CaCl<sub>2</sub> および MgCl<sub>2</sub> 溶液に浸漬した肉片では、菌は 6 cm 以上内部まで侵入したが、NaCl 溶液に浸漬した肉片では、1 cm 以上内部まで侵入しなかった(**Table 2**)。同様の実験を初発菌数は同様に、接種菌液量のみを 1/10 量(0.01 mL)にし、サルモネラおよび黄色ブドウ球菌で行ったところ、両菌において、MilliQ 水に浸漬した肉片では、菌は 6 cm 以上内部まで侵入するが、5%各種塩溶液に浸漬した肉片では、1 cm 以上は内部まで侵入しなかった(**Table 3**)。

**Table 2.** Effects of various 5% salt solutions on bacterial adhesion and invasion of *Salmonella* Enteritidis to chicken breast meat (inoculum size of 0.1 mL)

	Control	5% NaCl	5% KCl	5% CaCl <sub>2</sub>	5% MgCl <sub>2</sub>
Surface	2.73±0.06	1.41±0.97	1.10±0.95	1.82±0.04	1.88±0.25
Surface~1 cm	3.40±0.05	2.57±0.57	2.47±0.14	2.60±0.04	2.52±0.11
1 cm~2 cm	2.03±0.02	<1	2.27±0.17	2.00±0.13	1.32±1.25
2 cm~4 cm	2.30±0.02	<1	2.24±0.18	2.39±0.17	2.60±0.21
4 cm~6 cm	1.65±0.16	<1	2.27±0.03	2.73±0.15	2.36±0.09

Fresh chicken breast meat samples on the skin side were inoculated with 0.1 mL of *S. Enteritidis* NBRC3313 (at a level of 4~5 log CFU/skin). The inoculated samples were stored for 24 h at 4 °C.

**Table 3.** Effects of various 5% salt solutions on bacterial adhesion and invasion of *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus* to chicken breast meat (inoculum size of 0.01 mL)

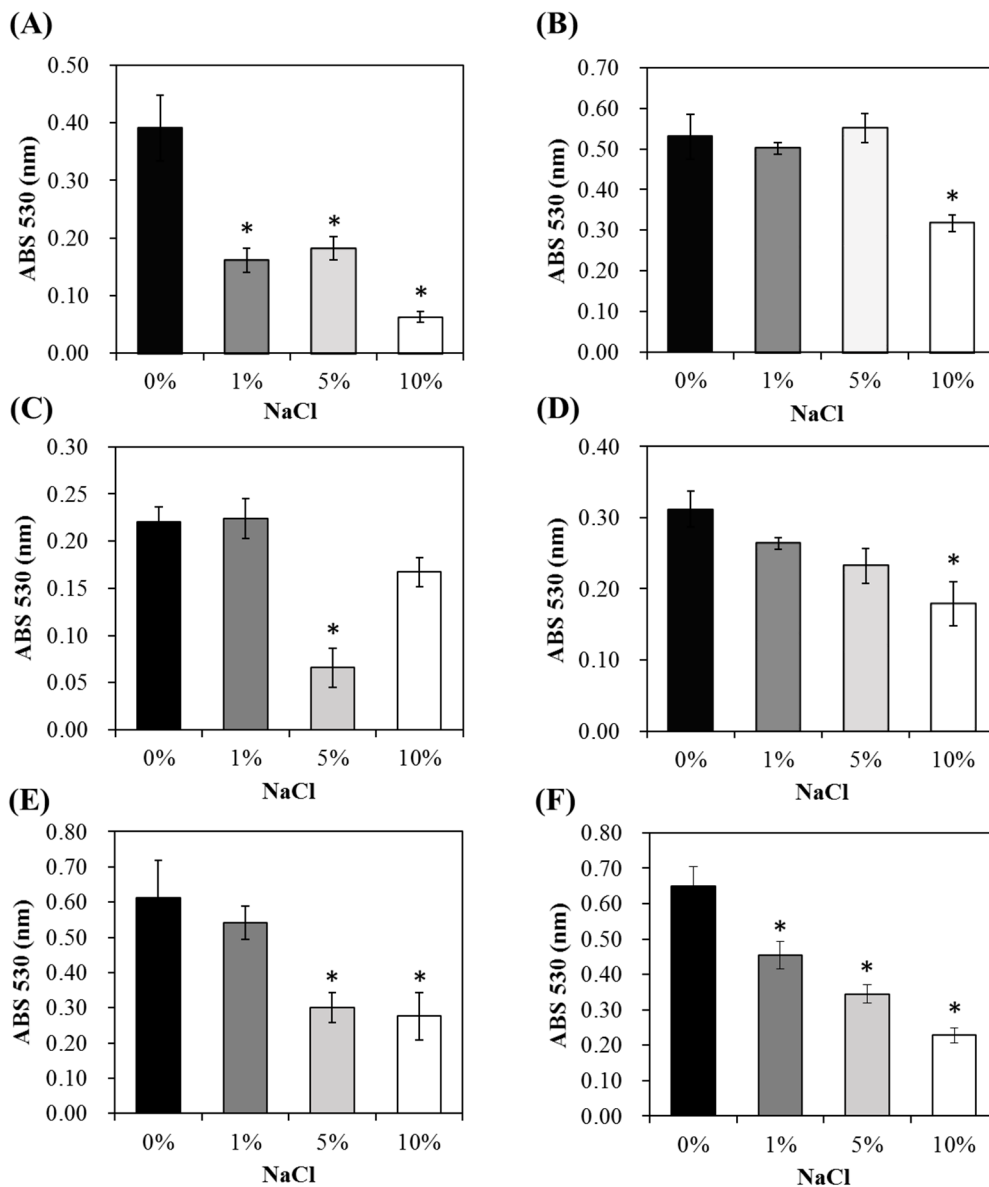
<i>S. Enteritidis</i>	Control	5% NaCl	5% KCl	5% CaCl <sub>2</sub>	5% MgCl <sub>2</sub>
Surface	2.83±0.04	2.44±0.08	2.40±0.09	2.31±0.04	2.64±0.07
Surface~1 cm	3.16±0.02	2.88±0.05	2.95±0.07	2.62±0.09	3.02±0.10
1 cm~2 cm	1.10±0.17	<1	<1	<1	<1
2 cm~4 cm	1.49±0.20	<1	<1	<1	<1
4 cm~6 cm	1.42±0.10	<1	<1	<1	<1
<i>S. aureus</i>					
Surface	2.99±0.04	2.91±0.04	3.17±0.06	2.76±0.03	3.09±0.05
Surface~1 cm	2.84±0.03	2.91±0.03	3.22±0.02	3.11±0.06	2.88±0.06
1 cm~2 cm	1.20±0.35	<1	<1	<1	<1
2 cm~4 cm	1.59±0.11	<1	<1	<1	<1
4 cm~6 cm	1.89±0.26	<1	<1	<1	<1

Fresh chicken breast meat samples on the skin side were inoculated with 0.01 mL of *S. Enteritidis* NBRC3313 or *S. aureus* C-29 (at a level of 4~5 log CFU/skin). The inoculated samples were stored for 24 h at 4 °C.

### 3. 3 ECM タンパク質に付着した食中毒菌に対する NaCl の影響

コラーゲンIおよびフィブロネクチンについては、黄色ブドウ球菌が特異的に付着し、コラーゲン IV およびラミニンについては、サルモネラおよび大腸菌が特異的に付着した。ECM タンパク質に付着した黄色ブドウ球菌に対する NaCl の影響について検討したところ、コラーゲン I の付着においては、1、5 および 10% NaCl 溶液により付着が有意に減少し (Fig. 2 (A))、フィブロネクチンの付着において

は、10% NaCl 溶液においてのみ付着が有意に減少した (Fig. 2 (B))。また、コラーゲン IV に付着したサルモネラおよび大腸菌に対する NaCl の影響を検討したところ、5% NaCl 溶液によりサルモネラ (Fig. 2 (C))、5 および 10% NaCl 溶液により大腸菌 (Fig. 2 (D)) の付着が有意に減少した。ラミニンの付着においては、10% NaCl 溶液によりサルモネラ (Fig. 2 (E)) の、1、5 および 10% NaCl 溶液により大腸菌 (Fig. 2 (F)) の付着が有意に減少した。



**Fig. 2.** Effects of NaCl solution on initial attachment of bacteria to extracellular matrix proteins. (A) *Staphylococcus aureus* C-29 to collagen I, (B) *S. aureus* C-29 to fibronectin, (C) *Salmonella* Enteritidis NBRC3313 to collagen IV, (D) *S. Enteritidis* NBRC3313 to laminin, (E) *Escherichia coli* to ATCC 10798 collagen IV, (D) *E. coli* ATCC 10798 to laminin. Values represent the mean  $\pm$  SD for three independent experiments. \* represents  $p < 0.05$  compared with the 0%.

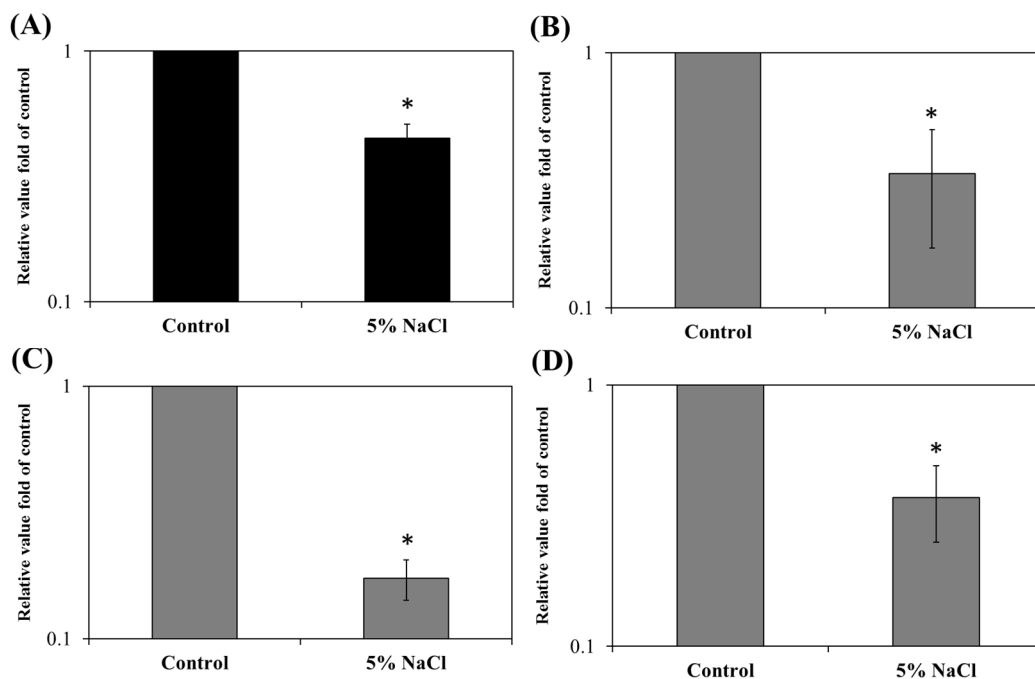
### 3. 4 塩類が毒素及びバイオフィーム関連遺伝子に与える影響

塩類が食中毒菌の毒素遺伝子 (SEA) 発現やバイオフィーム形成に及ぼす影響について検討した。その結果、5% NaCl 溶液に浸漬した黄色ブドウ球菌では、コントロールと比較して *sea* (Fig. 3 (A)) および *icaD* 遺伝子 (Fig. 3 (B)) の発現が有意に減少した。サルモネラ (Fig. 3 (C)) および大腸菌 (Fig. 3 (D)) においても、コントロールと比較して *csgD* 遺伝子の発現が有意に減少した。

### 4. 考 察

食中毒菌の食肉への侵入を抑制する方法として、各種塩類 (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) に着目し、これら塩溶液が食肉表面の線維の状態に与える影響について検討した。その結果、5% NaCl 溶液に浸漬した肉片では、時間経過に伴い肉片表面の線維の構造が引き締まり、その他の 5% 塩溶液 (KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) に浸漬した肉片においても、時間経過に伴い肉片表面の線維の構造が変化した (Fig. 1)。塩類が解離して生じる塩素イオン (Cl<sup>-</sup>) は、タ

ンパク質を変性させ、食肉や魚肉等を締める役割を持つことが知られており、肉片内部に食塩が浸透することでタンパク質が食塩水に溶けてゲル状となり、弾力性が増すことが報告されている<sup>[7]</sup>。これらの結果より、塩溶液に浸漬した食肉では菌の付着・侵入を阻害できる可能性が示唆された。そこで、塩溶液への浸漬が食中毒菌の侵入に与える影響について検討した。その結果、5% NaCl 溶液に 24 時間浸漬した肉片の上部表面 (汚染面の線維の方向は垂直) に菌液 0.1 mL を付着させた場合、菌が内部 1 cm までの侵入に留まったことから、NaCl により食肉表面の構造が変化することで、菌の侵入を阻害できる可能性が示唆された (Table 2)。さらに、菌液量を 0.01 mL に減少させて検討したところ、全ての 5% 塩溶液 (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) で菌が内部 1 cm までの侵入に留まった (Table 3) ことから、これら塩類により食肉表面の構造が変化したことにより、菌の付着・侵入を阻害できる可能性が示唆された。これらの結果より、5% NaCl 溶液では、その他の塩溶液 (KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>) と比較して、食中毒菌の侵入を強く抑制できることが推察された。



**Fig. 3.** Effect of 5% NaCl solution on gene expression of staphylococcal enterotoxin A (*sea*) and biofilm master regulator genes (*icaD* and *csgD*) on initial attachment of bacteria to extracellular matrix proteins. (A) Relative gene expression of *sea* in *Staphylococcus aureus* C-29, (B) Relative gene expression of *icaD* in *S. aureus* C-29, (C) Relative gene expression of *csgD* in *Salmonella* Enteritidis NBRC3313, (D) Relative gene expression of *csgD* in *Escherichia coli* ATCC 10798. Values represent the mean  $\pm$  SD for three independent experiments. TGE; teaflavin-rich green tea extracts. \* represents  $p < 0.05$  compared with the control.

次に、食中毒菌の付着機構を解明するために、食肉に分布する結合組織の構成成分である ECM タンパク質に着目し、その中でも食肉表面に多く分布するコラーゲン I、コラーゲン IV、フィブロネクチンおよびラミニンの 4 種について、食中毒菌の各種 ECM タンパク質への付着特性を調べた。その結果、コラーゲン I およびフィブロネクチンについては、黄色ブドウ球菌が特異的に付着し、コラーゲン IV およびラミニンについては、サルモネラおよび大腸菌が特異的に付着した。そこで、食中毒菌の ECM タンパク質への付着に対する塩類の影響について検討した。その結果、各種 ECM タンパク質において、5 および 10% NaCl 溶液処理により、食中毒菌の付着が抑制されることが示唆された (Fig. 2)。これらの結果より、5 および 10% NaCl 溶液が食中毒菌の食肉への付着・侵入を阻害する作用メカニズムとして、食肉中に含まれる ECM タンパク質への付着に対する抑制作用が考えられた。

また、毒素型食中毒では、菌自体ではなく菌が産生する毒素が問題となる。食肉を塩溶液に浸漬することで、付着した食中毒菌の毒素産生を抑制もしくは産生された毒素を不活化できれば、食中毒の危険性は減少する。また、バイオフィームは細菌にとって特徴ある微視的な住処となっているが、固体表面への付着に伴い、特定の遺伝子の発現が高められることや、遺伝子型が同じでも表現型が大きく異なることが報告されている<sup>[5,6]</sup>。グラム陰性菌のバイオフィームに関しては、細胞表層の繊毛、鞭毛および curli (細胞外繊維状タンパク質構造物) などが初期付着に重要な役割を果たし、バイオフィーム形成統括制御因子 csgD タンパク質は、curli 構造遺伝子オペロン (csgBAC) に必須の活性化因子であることが報告されている<sup>[8]</sup>。これまでに、温度、pH、振とう、糖類などの環境因子がバイオフィームに与える影響について報告されているが、塩類の影響についてはほとんど報告されていない。そこで、塩類が食中毒菌の毒素遺伝子 (sea) 発現やバイオフィーム形成に及ぼす影響について検討した。その結果、5% NaCl 溶液に浸漬した黄色ブドウ球菌、サルモネラおよび大腸菌において毒素遺伝子およびバイオフィーム関連遺伝子の発現が有意に減少した (Fig. 3)。これらの結果より、5% NaCl 溶液は、食中毒菌の毒素遺伝子およびバイオフィーム関連遺伝子の発現を抑制もしくは不活化できることが示唆された。

## 5. 今後の課題

本研究では、NaCl 溶液が食中毒菌の食肉への付着・侵入を阻害することを明らかにし、そのメカニズムとして、食肉中に含まれる ECM タンパク質への付着に対する抑制作用が考えられた。さらに、食肉への食中毒菌の付着・侵入に関して、バイオフィームの形成が関与している可能性が示唆され、5% NaCl 溶液が食中毒菌バイオフィーム関連遺伝子の発現を抑制することも明らかにした。しかし、NaCl 溶液による食中毒菌の付着・侵入の抑制作用と病原性の発現との関係については明らかになっていない。そこで、今後は、NaCl 等の塩類による食中毒菌の付着・侵入を抑制する環境下における食中毒菌の病原性因子の発現について明らかにしていきたいと考えている。また、塩類で処理した実際の食品表面や内部での食中毒菌の挙動や病原性因子の発現については、未解明の重要な研究分野であり、これらのことについてさらに詳細に調べ、塩類を用いたより効果的な殺菌法を開発していきたい。

## 6. 文献

- [1] Weidenmaier C, Goerke C, Wolz C.: *Staphylococcus aureus* determinants for nasal colonization. *Trends Microbiol.*, **20**: 243-250 (2012).
- [2] Farfan MJ, Torres AG.: Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.*, **80**: 903-913 (2012).
- [3] Zulfakar SS, White JD, Ross T, Tamplin ML.: Bacterial attachment to immobilized extracellular matrix proteins *in vitro*. *Int. J. Food Microbiol.*, **157**: 210-217 (2012).
- [4] Zulfakar SS, White JD, Ross T, Tamplin ML.: Effect of pH, salt and chemical rinses on bacterial attachment to extracellular matrix proteins. *Food Microbiol.*, **34**: 369-375 (2013).
- [5] Davies DG, Chakrabarty AM, Geesey GG.: Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1181-1186 (1993).
- [6] Hoyle BD, Williams LJ, Costerton JW.: Production of mucoid exopolysaccharide during development of



*Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Infect. Immun.*, **61**: 777-780 (1993).

[7] 下村 道子, 渋川 祥子, 島田 キミエ, 山崎 清子.:  
新版 調理と理論 学生版. 250-251, 361-362 (2008).

[8] Kristina Jonas, Henrik Tomenius, Abdul Kader, Staffan Normark, Ute Römling, Lyubov M Belova and Öjar Melefors.: Roles of curli, cellulose and BapA in

*Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiology* **7**: 70 (2007).

## 7. 謝 辞

本研究は、公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団平成 26 年度研究助成の支援を受けて行いました。ここに記して感謝致します。

## Elucidation of the Mechanism of Action of Salt for Maintaining Microbiological Safety of Non-Heated Meat Products

Yuko Shimamura, Shuichi Masuda

School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

### Summary

In our previous study, alkaline electrolyzed water (AIEW; pH 11.5) and strong acidic electrolyzed water (StAEW; pH 2.5) treatment on fresh chicken breasts significantly reduced the inoculated pathogens as compared with untreated controls. The pH value of the waste fluid becomes neutral (approximately pH 7.0) by continuously-mixing AIEW and StAEW, consequently, waste solutions produces NaCl. Therefore we expected that salts had inhibitory effect on bacterial adhesion to meat surfaces. First, elucidating the factors influencing the invasion of food poisoning bacteria to the meat inside by and antimicrobial effect of various salts (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>) on fresh meat were evaluated in this study. When the skin side of meat samples dipped with 5 % NaCl solution were inoculated with 0.1 mL of *Salmonella* Enteritidis (at a level of 4~5 log CFU/skin) and stored for 24 h at 4 °C, bacteria invaded 1 cm in depth from the inoculated side of meat samples. Next, the effect of NaCl solutions (0, 1, 5 and 10%) on attachment of *Staphylococcus aureus*, *S. Enteritidis*, and *Escherichia coli* to dominant extracellular matrix (ECM) proteins: collagen I, collagen IV, fibronectin and laminin were assessed. Each strain showed significant attachment to any ECM proteins. However, NaCl solutions inhibited attachment of each bacterial strain to ECM protein in a concentration-dependent manner. We also investigated the expression of staphylococcal enterotoxin A (*sea*) and biofilm master regulator genes (*icaD* and *csgD*) after treatment with 5 % NaCl solution using real-time RT-PCR. Five present NaCl solution significantly inhibited the gene transcription of *sea* and *icaD* in *S. aureus* and *csgD* in *S. Enteritidis*, and *E. coli*. These results will assist to develop the novel control method using salts to prevent contamination of meat surfaces, for improving food safety and quality.