

Listeria monocytogenes の増殖抑制に及ぼす有機酸の効果

坂倉 有紀 (管理栄養学科・助手) ・吉田 啓子 (家政保健学科・教授)

Inhibitory Effects of Organic Acids on the Growth of *Listeria monocytogenes*

Sakakura, Yuki · Yoshida, Keiko

Abstract

Listeriosis is a potentially fatal food-borne disease caused by *Listeria monocytogenes*, a psychrotrophic bacteria that is widespread in the environment. In this study, we investigated the inhibitory effects of organic acids on the growth of *Listeria monocytogenes*. As a result, the growth of *Listeria monocytogenes* was strongly inhibited in acetic acid. Compared at equal initial pH values and % concentration, the relative inhibition effect was acetic acid > lactic acid > citric acid > HCl. The addition of 0.1% acetic acid of food suppressed the growth of *Listeria monocytogenes* without defects of food flavor when it stored at 10°C and 15°C.

Keywords : organic acids, *Listeria monocytogenes*, controlled storage temperature, microbiological investigation

キーワード : 有機酸、リステリア モノサイトゲネス、温度管理、微生物学的調査

目的

リステリア症は、自然界に広く分布するリステリア菌のうち *Listeria monocytogenes* (以後 *L. monocytogenes*) を原因菌とする動物由来感染症で、food-borne disease のひとつであると考えられている。リステリア症は、新生児や高齢者、免疫不全患者などにおいて髄膜炎、脳炎や敗血症を引き起こす。わが国では、欧米と異なり食品によるリステリア症は少なかったが、近年ナチュラルチーズの *L. monocytogenes* によるとみられる集団食中毒事報告例も1件見られ、関心は高まっている。また、*L. monocytogenes* は低温増殖性を示すため、冷蔵・冷凍食品の汚染も問題となる。そのため食品に添加可能な物質の *L. monocytogenes* の増殖の

抑制に関する検討が必要である。本研究では、有機酸による *L. monocytogenes* の増殖抑制効果について検討した。また、食品への有機酸の添加が冷蔵保存に有効であるかどうか、有機酸存在下の *L. monocytogenes* の増殖について検討を行った。

方法

供試菌および培養方法

供試菌として *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 (Remel) (以後 *L. monocytogenes* 7644) を用いた。*L. monocytogenes* 7644 は、0.6% Yeast extract (OXOID) を含む Tryptone soya broth (OXOID) (以後 TSBYE) で培養を行った。菌数の測定には、PALCAM選択培地 (OXOID) を使用した。30°C、

48時間培養後にPALCAM選択培地上で生育しエスクリン分解能を有し、且つ中央が凹んだ緑灰色集落を *L. monocytogenes* と判定した。

有機酸による *L. monocytogenes* 7644 増殖抑制効果の検討

TSBYEを乳酸、酢酸、クエン酸、塩酸でそれぞれpH 4.5、5.0、6.0および0.2%となるように調製した。各培地に、*L. monocytogenes* 7644 を 10^5 CFU/ml接種し、10℃および30℃で保存した。経時的に菌数を測定した。

有機酸の添加による食品中の *L. monocytogenes* 7644 増殖抑制効果の検討

米飯、酢飯、炊き込みご飯、牛乳、ローストビーフに有機酸を適当な濃度になるように添加した。普通寒天培地斜面で継代培養した *L. monocytogenes* 7644 を0.85%生理食塩水で適宜希釈し、試料に対し 10^4 または 10^5 CFU/gとなるように接種した。一般家庭での冷蔵庫保存を考慮し、4℃、10℃および15℃に保存した後、それぞれ経時的に取り出しPALCAM選択培地を用いて分離培養を行い、菌数を測定した。

結果

有機酸による *L. monocytogenes* 7644 増殖抑制効果の検討

TSBYEを乳酸、酢酸、クエン酸、塩酸でそれぞれ

れ pH 4.5、5.0、6.0に調製し、*L. monocytogenes* 7644 の保存試験を行った。Fig.1に10℃で保存した菌数の経時推移を示した。2日目までに pH 4.5 および pH 5.0 では、すべての酸で菌数の増加が認められなかった。7日目に、pH 5.0 では、クエン酸、塩酸が1オーダー増加したのに対し、乳酸、酢酸では、増加が認められなかった。pH 6.0 では、2日目に、塩酸が2オーダー超の増加を示したのに対して、他の3つの有機酸では1オーダー増加し、7日目も同様の傾向であった。Fig.2に30℃で保存した菌数の経時的推移を示した。pH 4.5 では2日目までに菌数の増加が認められず、酢酸では低下した。pH 5.0 では、2日目までに、塩酸で5オーダー、クエン酸、乳酸で4オーダーの増加を示したのに対し、酢酸では1オーダーの増加が認められた。pH 6.0ではすべての酸で1日目に5オーダーの増加を認めた。

次にTSBYEに各酸0.2%添加し *L. monocytogenes* 7644 の消長を検討した。Fig.3に10℃および30℃で保存した菌数の経時的推移を示した。TSBYEに0.2%の乳酸、酢酸、クエン酸、塩酸を添加すると、培地のpHはそれぞれ pH 5.5、5.4、5.4、5.5を示した。10℃では、2日目までに各有機酸で菌数の増加が認められなかった。30℃では、2日目までに、塩酸が5オーダー、乳酸、クエン酸が4オーダーの増加を示したのに対し、酢酸では2オーダーの増加を示した。酢酸は、明らかな増殖抑制効果を示した。

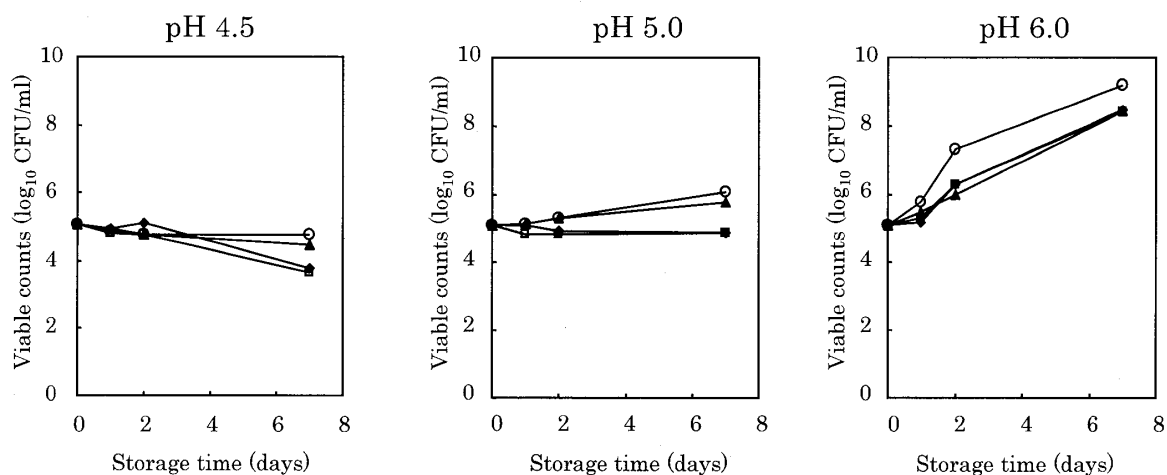


Fig. 1 Changes in the numbers of *L. monocytogenes* 7644 in pH 4.5, 5.0, 6.0 TSBYE prepared with lactic acid (◆), acetic acid (□), citric acid (▲) and HCl (○) during storage at 10°C.

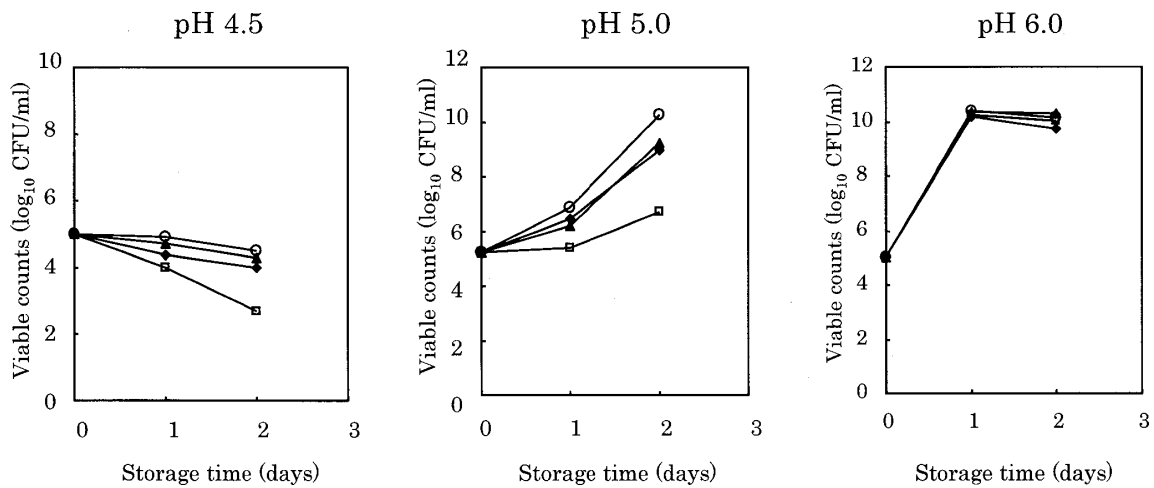


Fig. 2 Changes in the numbers of *L. monocytogenes* 7644 in pH 4.5, 5.0, 6.0 TSBYE prepared with lactic acid(◆), acetic acid (□), citric acid (▲) and HCl (○) during storage at 30°C.

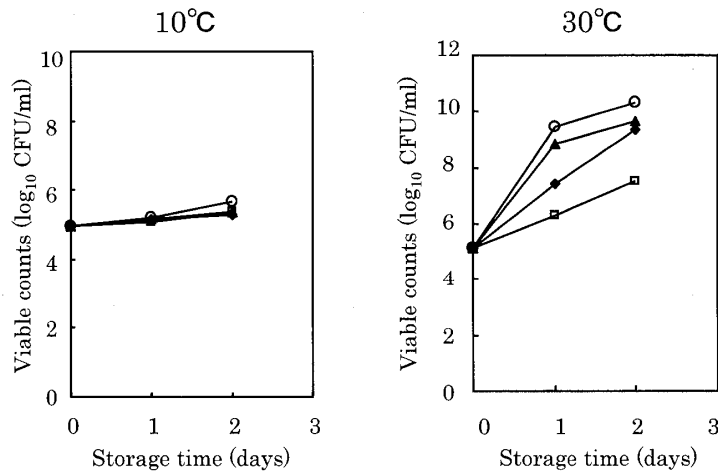


Fig. 3 Changes in the numbers of *L. monocytogenes* 7644 in TSBYE containing with 0.2% lactic acid (◆), acetic acid (□), citric acid (▲) and HCl (○) during storage at 10 and 30°C.

米飯と酢飯中の *L. monocytogenes* 7644 の消長

先の実験結果より、酢酸は有機酸の中で最も *L. monocytogenes* 7644 の増殖を抑制することが示されたので、酢酸を使用した食品である酢飯に *L. monocytogenes* 7644 を人為接種し、酢酸無添加の米飯と比較して増殖の経時推移を検討した。結果をFig.4に示した。10°Cにおいて、米飯では2日目までに菌数が2オーダー増加したが、酢飯では増加が認められなかった。酢飯では7日目でも明らかな増殖抑制効果を認めた。30°Cでは、米飯は2日目までに5オーダーの増殖を示したが、酢飯では増殖は認められなかった。4°Cでは、7日目に米飯は1オーダー以上の増加を示した。*L. monocytogenes* は4°C以下でも増殖することが知ら

れているが、米飯上でも増殖が認められた。一方、酢飯では米飯に比べて増殖が抑制された。なお、調理直後の米飯の pH は5.9であり、酢飯の pH は4.2であった。

米飯を食品への酢酸添加モデルとして、*L. monocytogenes* 7644 の増殖における酢酸濃度の検討を行った。先の実験で使用した酢飯における酢酸濃度は、0.2%であり、一般的な酢飯の酢酸濃度は0.2 - 0.25%である。醸造酢メーカーのひとつには、夏場の弁当の食中毒予防として、ご飯を炊く際に、米2合に対して大さじ1杯の穀物酢を入れることを推奨している。これは、酢酸濃度約 0.1%に相当する。また、典型的な食中毒菌であるサルモネラ菌、ブドウ球菌、腸炎ビブリオ等に対し、酢酸濃度0.1%の添加によって静菌作用があると

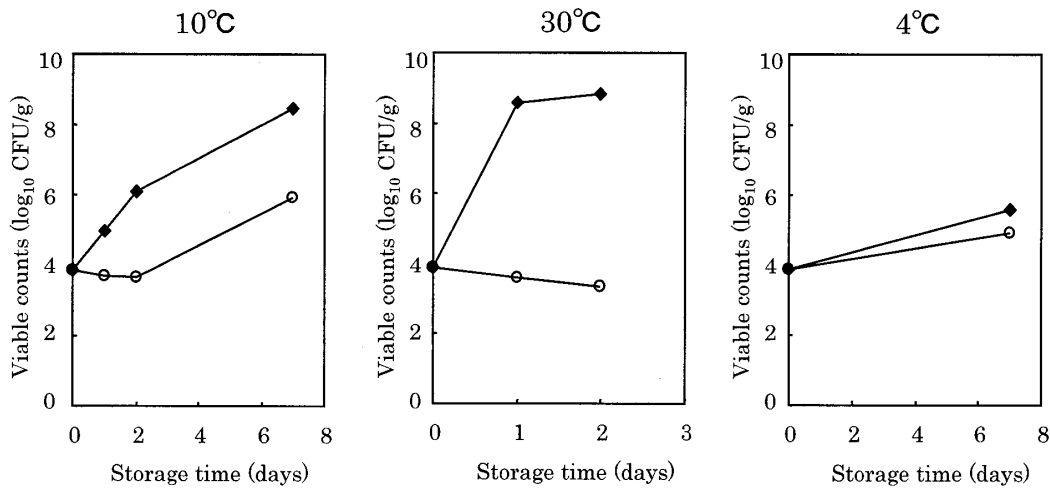


Fig. 4 Changes in the numbers of *L. monocytogenes* 7644 in cooked rice (◆) and sumeshi (vinegar taste rice for sushi) (○) during storage at 10, 30 and 4°C.

されている。これらをもとに、先の実験結果をふまえて、0、0.01、0.05、0.10、0.20、0.25%酢酸を白飯に添加した際の *L. monocytogenes* 7644 の増殖の経時推移を検討した (Fig.5)。培養温度は10°Cおよび15°Cで行った。10°Cでは0、0.01%酢酸で2日目に1オーダー、7日目に3オーダー以上の菌数の増加が認められたが、0.05から0.25%酢酸では、菌数の増加が見られなかった。15°Cでは、2日目までに、0および0.01%酢酸では3オーダーの増加、0.05%では0.5オーダー増加したが、0.1から0.25%酢酸では菌数の増加が見られなかった。7日目では、菌数は0から0.01%酢酸では2日目とほぼ維持され、0.05%酢酸では2オーダー増加した。0.10から0.25%酢酸では菌数の増加が認められなかった。

食品への酢酸の添加と *L. monocytogenes* 7644 の増殖抑制効果

食品に酢酸を添加し、*L. monocytogenes* 7644 を人為接種して、酢酸の増殖抑制効果を検討した。酢酸は0、0.01、0.05、0.1%となるように添加した。炊き込みご飯では、10°Cおよび15°Cで米飯とほぼ同様の結果であった (Fig.6)。10°Cにおいて、7日目では、0.01%酢酸が、無添加に比べて菌数が2オーダー低かった。また、官能的には、0.01および0.05%酢酸では酢の味、においは感じられなかった。0.1%酢酸では酢のにおいが少し感じられたが、炊き込みご飯に含まれる食材の香りが強く、酢酸を添加しても、味、においともに食品の風味に影響を与えなかった。

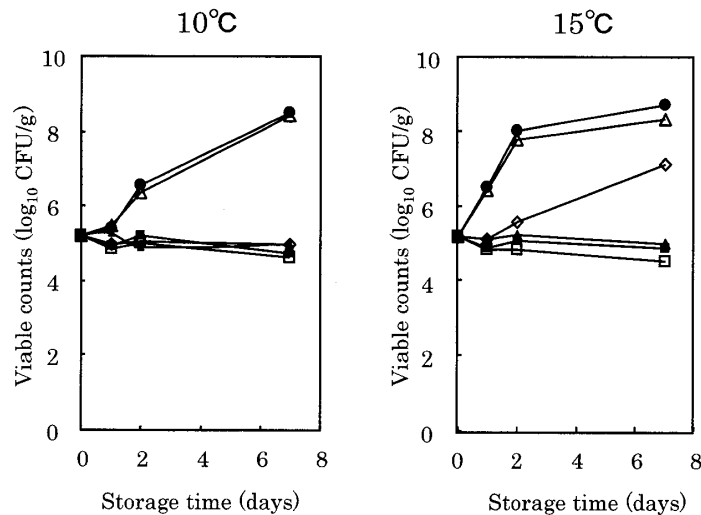


Fig. 5 Changes in the numbers of *L. monocytogenes* 7644 in cooked rice in the presence of acetic acid during storage at 10 and 15°C. Concentration of acetic acid: (●) 0%; (△) 0.01%; (◇) 0.05%; (▲) 0.10%; (■) 0.20%; (□) 0.25%.

Fig.7に牛乳およびローストビーフに対する酢酸の添加による *L. monocytogenes* 7644 の増殖の経時推移を示した。酢酸は0、0.05、0.1%となるように添加した。牛乳は、10℃および15℃において0.1%酢酸で1日目までは菌の増殖が抑制された。7

日目では、0および0.05%酢酸で菌数が3オーダー増加したのに対して、0.1%酢酸では2オーダー増加した。ローストビーフでは、10℃では2日目までに、15℃では1日目までに、酢酸添加群で菌数の増加を認めなかった。ローストビーフは、賞味

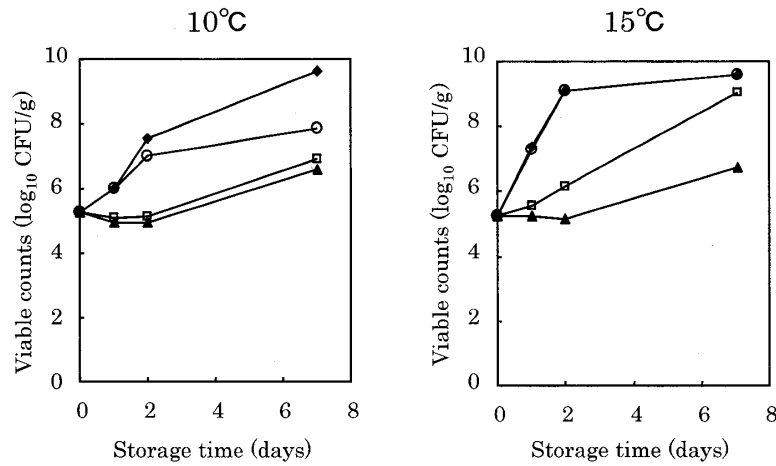


Fig. 6 Changes in the numbers of *L. monocytogenes* 7644 in cooked rice seasoned with soy sauce and vegetables in the presence of acetic acid during storage at 10 and 15°C. Concentration of acetic acid: (◆) 0%; (○) 0.01%; (□) 0.05%; (▲) 0.10%.

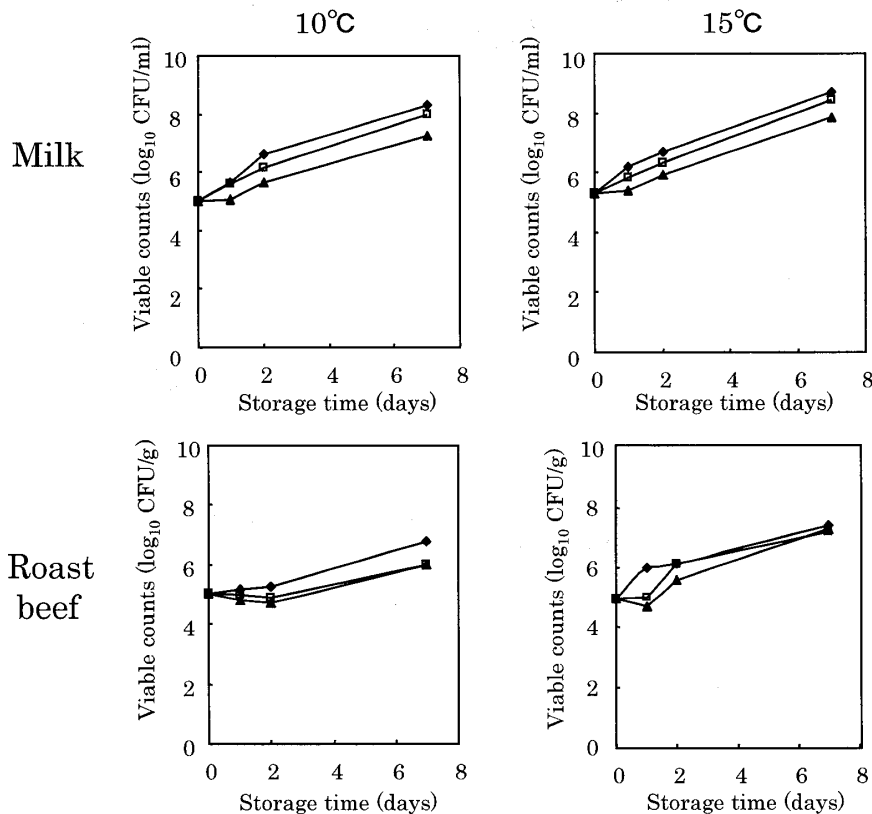


Fig. 7 Changes in the numbers of *L. monocytogenes* 7644 in milk and roast beef in the presence of acetic acid during storage at 10 and 15°C. Concentration of acetic acid: (◆) 0%; (□) 0.05%; (▲) 0.10%.

期限の期間が短く、通常製造から1日である。酢酸の添加によって、1日目の時点で明らかな *L. monocytogenes* 7644 の増殖抑制効果が見られた。

考察

リステリア菌はグラム陽性の無芽胞短桿菌で、家畜、野生動物、魚などの動物や、河川、下水など環境中に広く存在することから、さまざまな食品が汚染される可能性がある。また、4℃以下でも増殖が可能であるため、食品の低温での流通や保存を食品衛生の中核としているわが国において、本菌がもつ低温増殖性は、今後重大な食中毒の発生が危惧される。リステリア菌の汚染を防止し、リステリア菌の増殖を抑制する対策が必要とされている。

リステリア症は動物由来感染症で、汚染された食品を介して *L. monocytogenes* が経口感染し、腸管から肝臓を経て菌血症、胎盤汚染を呈する。その病型は髄膜炎が最も多く、ついで敗血症、脳炎

である。2001年に発生した *L. monocytogenes* による北海道のナチュラルチーズを原因食品とする集団食中毒では、患者の多くは胃腸炎を呈した。

体内に感染したリステリア菌は、好中球やマクロファージのターゲットとなるが、細胞内寄生菌であるため、スーパーオキシドディスムターゼやカタラーゼなどの活性が高く、殺菌されにくい。また、貧食されファゴソームに取り込まれた後に、*listeriolysin O* を産生し、ファゴソーム膜に pore を形成して細胞質へ脱出し、活性酸素による殺菌から逃れるというエスケープ機構を有する (Fig.8) [1]。リステリア症は、新生児や高齢者、妊婦、免疫不全患者において発症しやすいと考えられている。糖尿病など免疫低下やレドックスバランスが低下した場合、好中球やマクロファージによる免疫反応が低下するため [2, 3]、リステリア菌の感染の危険が懸念される。

リステリア症の原因食品には、生乳やナチュラルチーズ等の乳製品、肉製品、キャベツコールス

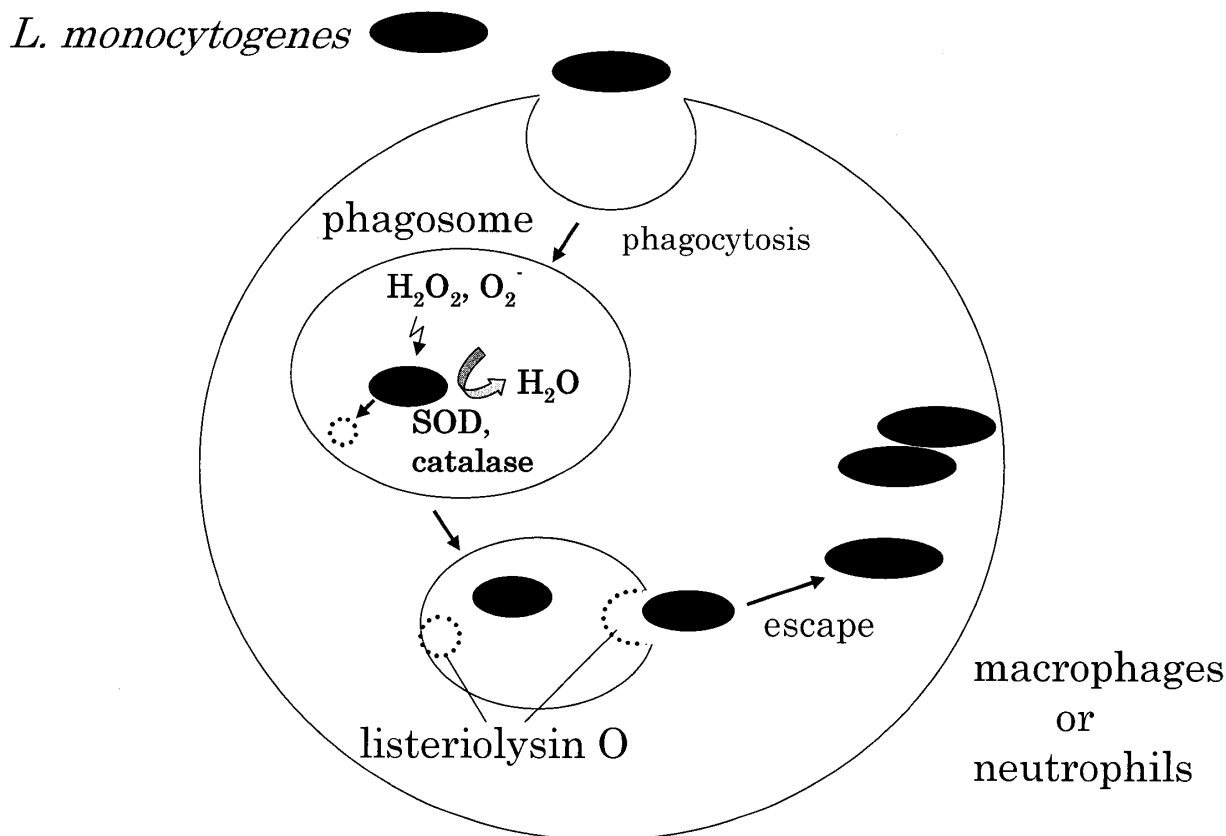


Fig. 8 Schematic representation of the escape process in *L. monocytogenes*

ローサラダなど多岐にわたる。これらの原因食品の多くは、食の欧米化とも関連することから、今後、日本国内においてもリステリア症が増加することが予測される。チーズなど輸入の多い食品では、汚染の検疫が重要と考えられる。また、食生活の変容とともに、調理せずにそのまま食べられる、いわゆる ready to eat meal が、近年多く流通している。これにはリステリア菌を多く含むものも存在するとみられている[4]。

リステリア症は、他の食品媒介の細菌性感染症に比べ致死率が高く、米国では年間約2500名が感染し、そのうちの20%が死亡すると推計されている[4]。このため食品医薬品局(FDA)では食品サンプル(25g)から本菌は検出されてはならないとしており、欧州でも、1gあたり100個以下に抑えることが義務づけられている。ready to eat mealも *L. monocytogenes* 汚染に対する規格・基準が設定されている。

本研究では、有機酸による *L. monocytogenes* 7644 の増殖抑制効果を検討した。10℃、7日間の保存試験において、pH 4.5 では増殖が認められなかった。また、pH 4.0 でも同様に検討を行ったが、培養後に *L. monocytogenes* 7644 は検出されなかった。細菌によって、酸性側の生存限界pHは異なるが、*L. monocytogenes* 7644 では pH 4.0 から pH 4.5 付近にあることが推測された。また、pH 5.0 では pH 6.0 に比べ抑制効果は大きく、pH 5.0 および pH 6.0 における *L. monocytogenes* 7644 に対する増殖抑制効果は、強さの順に、酢酸>乳酸>クエン酸>塩酸であった。酢酸は、多様な食中毒菌に対しても強い増殖抑制効果が認められており、本菌においても同様の結果が示された。乳酸は、*Bacillus coagulans* 等に対しても強い増殖抑制効果を示す。また乳酸は、食品添加物としての許可されているため、本菌の増殖抑制に有用であることが示唆された。0.2%の酸の添加においても増殖抑制効果は、pH 5.0 および pH 6.0 と同様であった。

米飯と酢飯における *L. monocytogenes* 7644 の増殖については、米飯では、人為接種によって4℃でも増殖が見られ、酢飯では抑制された。家庭の冷蔵庫保存においても、*L. monocytogenes* の二次

汚染があった場合、米飯では危険が高まり、酢飯の方が菌の増殖を抑制できることが示された。

食品への酢酸添加モデルとして、米飯に添加する酢酸濃度に対する *L. monocytogenes* 7644 の増殖を検討した。官能的には、酢酸濃度0.01%以下ではにおいが全く感じられず、0.05%ではあまり感じられなかった。0.1%では酢のにおいが少し感じられ、0.2 - 0.25%では酢の味、においが強く感じられた。米飯に添加する際には、酢酸濃度 0.05 - 0.1%以下の添加が、米飯の風味に影響を与えない濃度として望ましいことが示唆された。10℃、15℃ともに0.1 - 0.25%酢酸で本菌の増殖は見られなかった。0.01%酢酸では無添加の場合とほぼ同じ増殖パターンを示した。0.05%酢酸では、15℃において2日目までに菌数の増加は見られないが、7日後には2オーダー増加した。0.05%酢酸は、米飯に添加しても酢の味をほぼ感じない濃度であるため、食品の添加による細菌の増殖抑制効果が期待されるが、10℃では抑制されるが、15℃の長期では抑制効果が低下するため、保管温度にも注意が必要であることが示唆された。炊き込みご飯では、10℃において、7日目では、0.01%酢酸が、無添加に比べて菌数が2オーダー低下した。*L. monocytogenes* は、塩濃度によっても増殖が抑制されるため[5, 6]、この菌数の低下は、炊き込みご飯に含まれる塩分と酢酸との相乗的な効果であると推測された。炊き込みご飯、牛乳、ローストビーフに対する酢酸の添加においても、0.1%酢酸の添加は1日保存では、すべての条件で、*L. monocytogenes* 7644 の増殖抑制効果を示した。

本研究では、*L. monocytogenes* 7644 は pH の低下によって増殖が抑制され、各 pH および % 濃度では、有機酸のうち酢酸が強く増殖を阻害することが示された。有機酸のもつ抗菌作用としては、pH の低下による抗菌作用、非解離分子が微生物の菌体へ透過しやすいことに基づく抗菌作用、各有機酸固有の抗菌作用などがあげられる。有機酸型の保存料であるプロピオン酸、ソルビン酸および安息香酸において、その抗菌作用は非解離分子の量に比例していることが報告されている[7]。本研究でも、*L. monocytogenes* の増殖抑制効果の

強さの順序は、いずれの pH 及び %濃度においても酢酸>乳酸>クエン酸>塩酸であり、pKa (酸解離定数) の値の高いものから低いものへの順序と一致している。有機酸による効果は諸説あるが、本検討でも非解離分子による効果を支持する結果となった。有機酸は古くから食品中に含まれ、食品の殺菌、保存を目的として利用されてきた。また、お酢は単独で、身近な殺菌剤として使われてきた。寿司店では板前が酢水を使って手を洗い、家庭ではまな板の殺菌に用いてきた。しめさばのように酢で調理された魚では、保存後も細菌の増殖が抑制されることが示されている [8]。有機酸は、食品成分のひとつでもあり、食酢中には4.5%程度、果実中には0.1 - 2%程度、食肉中には1%程度含まれている。添加物とは異なる成分として有機酸の量も同時に把握する必要があるだろう。

今後は、有機酸添加による他食品での *L. monocytogenes* の消長、有機酸以外の添加物との組み合わせによる本菌の消長についても検討したいと考えている。また、食品中の *L. monocytogenes* の汚染実態や、流通、販売における食品中での菌の消長についても調査し、リスク評価をしていく必要があると考える。

参考文献

1. Lecuit M, Cossart P. (2002) Genetically-modified-animal models for human infections: the *Listeria* paradigm. *Trends. Mol. Med.* 8, 537-542.
2. Darmaun D, Smith SD, Sweeten S, Sager BK, Welch S, Mauras N. (2005) Evidence for accelerated rates of glutathione utilization and glutathione depletion in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes. *Diabetes.* 54, 190-196.
3. Sakakura Y, Sato H, Shiiya A, Tamba M, Sagara J, Matsuda M, Okamura N, Makino N, Bannai S. (2007) Expression and function of cystine/glutamate transporter in neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 81, 974-982.
4. 中村寛海、西川禎一 (2006) 水産品のリステリア汚染 生活衛生 vol.50, 175-184.
5. Conner DE, Brackett RE, Beuchat LR. (1986) Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 59-63
6. Boziaris IS, Skandamis PN, Anastasiadi M, Nychas GJ. (2007) Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. *J Appl Microbiol.* 102, 796-805.
7. 松田敏夫 食品微生物制御の化学 幸書房 p104-132.
8. 吉田啓子 (2007) 小売段階における寿司製品の消費期限について 鎌倉女子大学紀要 第14号 p79-88.

要旨

リステリア症は、環境中に広く存在する *Listeria monocytogenes* を原因とする foodborne disease のひとつであり、新生児、妊婦、免疫不全患者において感染しやすいことが知られている。本研究では、*Listeria monocytogenes* の増殖抑制に及ぼす有機酸の効果を検討した。その結果、酢酸において、*Listeria monocytogenes* の強い増殖抑制効果を認めた。有機酸の効果は、同一の pH および %濃度において増殖抑制効果の強い順に 酢酸> 乳酸> クエン酸> 塩酸 であった。また、食品への添加では、10℃ および 15℃ の保存において 0.1% の酢酸を添加することにより、食品の風味を損なわずに *Listeria monocytogenes* の増殖抑制効果を認めた。

(2007.10.25 受稿)