

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00784

研究課題名(和文)大腸菌0157の調理器具を介する挙動

研究課題名(英文)Behavior of Escherichia coli 0157 via cooking utensils

研究代表者

横井川 久己男 (Yokoigawa, Kumio)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・教授

研究者番号：60230637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌0157による食品の二次汚染を防止するため、調理器具素材に付着した本菌の生存能と殺菌剤耐性を明らかにした。調理器具素材に付着した生細胞数は、水道水に漬け置く状態ではほとんど低下しないこと、また、自然乾燥させた場合は1時間で約千分の一に低下することが判明した。また本菌は、調理器具素材に付着した直後から、次亜塩素酸ナトリウムに対して高い耐性を示し、付着直後から高濃度の洗剤、殺菌剤を使用する必要があると考えられた。培養温度では、温度の低下に伴って付着細胞数が低下する傾向が見られた。また、食品成分が調理器具に付着した場合、特に多糖類が本菌の付着とバイオフィルムの形成を促進することも判明した。

研究成果の概要(英文)：To suppress the food pollution by Escherichia coli 0157 via cooking utensil, we examined the survival and resistance against disinfectant of the pathogen. The cells attached to the surfaces of cooking utensils lived for long time even in the tap water. The disinfectant-resistance of cells attached to the surfaces immediately increased after the initial attachment. Polysaccharides among food components markedly stimulated the initial attachment and biofilm-formation of the cells.

研究分野：食品微生物学

キーワード：大腸菌0157 調理器具 バイオフィルム

1. 研究開始当初の背景

大腸菌 O157 の主要な感染源は食肉であるが現実には多様な食品群が感染源となり、家庭内での調理器具を介する食品の二次汚染が問題となる。食材ごとの調理器具の使い分けや殺菌は事実上困難であり、本菌による食品の二次汚染を防止する有効な対策が望まれる。食肉加工場ではステンレスに対する本菌のバイオフィームが以前より問題視されており、バイオフィームの形成防止や除去に関する研究が行われてきた [1, 2]。しかし、調理器具では食品との接触が短時間であり、バイオフィーム形成の問題よりも、短時間の接触で本菌が調理器具に付着し、他の食品に移動することが問題と思われる。申請者はこれまでに、金属類、ガラス、プラスチック類等の調理器具素材 8 種類に対する大腸菌 O157 の付着性を検討し、本菌の付着性は素材によって大きく異なることや、食品成分の存在が調理器具素材に対する本菌の付着性に大きな影響を与えること等を明らかにした [3]。また、付着細胞の生存能は素材の種類によって異なることも確認している [4]。さらに、短時間の接触で付着した細胞は遊離細胞よりも高い次亜塩素酸ナトリウム耐性を有し、かつ洗剤等で容易に生細胞として遊離することも見出ししている [5] が、調理器具を介する大腸菌 O157 の挙動については、これまでほとんど研究されていない。

[1] Silagyi, K., et al.: Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection-influence of isolated strains on biofilm formation by Sakai and EDL 933 E. coli O157., *Food Microbiol.*, 26, 514-519 (2009). [2] Y.J. Oh, et al.: Influence of culture conditions on Escherichia coli O157:H7 biofilm formation by atomic force microscopy., *Ultramicroscopy*, 107, 869-874 (2007). [3] Tsuji Makiko and Kumio Yokoigawa. Attachment of Escherichia coli O157:H7 to abiotic surfaces of cooking utensils. *Journal of Food Science*, 77: 194-199, 2012. [4] 横井川久己男, 達牧子, 武政二郎, 日本農芸化学会 2013 年度合同広島大会講演要旨集, p.95, 2013. [5] 後藤月江, 達牧子, 横井川久己男, 日本農芸化学会 2014 年度支部大会講演要旨集, p. 41, 2014.

2. 研究の目的

多種多様な素材で作られる調理器具に対する大腸菌 O157 の付着性と生存能を明らかにするため、調理器具素材となる金属類やプラスチック類等の小片に、本菌を短時間接触させ、付着細胞数の割合、付着細胞の殺菌剤耐性、洗浄による付着細胞の遊離と生存率を明らかにする。また、食品成分や他の微生物が共存する条件での挙動も同様に検討する。続いて、調理器具素材ごとに、付着した本菌の生存能や除菌・殺菌条件も検討する。本菌が

付着した調理器具素材から他の食品への本菌の移動も測定し、調理器具を介する食品の二次汚染防止をはかる。

3. 研究の方法

(1) 調理器具に使用されるプラスチック類 (ポリエチレン, ポリプロピレン, ウレタン樹脂, ポリ塩化ビニル等) や、木材 (柳, イチョウ, 朴, ヒノキ, 桐, ヒバ, ケヤキ等), 金属類 (アルミ, ステンレス, 鋼, モリブデン鋼, 鉄等), ガラス, 陶器, セラミック等を対象に、大腸菌 O157 の付着と生存を明らかにする。また、日本工業規格に基づく表面仕上げが異なる素材についても検討する。大腸菌 O157 の細胞懸濁液に各種調理器具素材の平板を浸漬し、経時的に付着細胞数を計測する。付着細胞数の測定は、浸漬した平板を寒天培地の上に密着させて培養し、素材平面と寒天の間に形成されるコロニー数を測定することにより行う。生存能については、調理器具類の実際の使用方法を考慮して、本菌が付着した平板を自然乾燥や水道水に浸け置く状態で放置し、経時的に付着した生菌数を調べる。自然乾燥過程は、種々の条件に設定した恒温恒湿インキュベーターを使用して行う。なお、8 種類の調理器具素材を用いて付着性を調べたこれまでの研究では、素材の種類、牛脂の存在、増殖温度、他のグラム陰性細菌が生産するアシルホモセリンラクトン類の存在により本菌の付着性が変動することを明らかにしているが、本研究ではより多様な素材や食品成分について詳細な検討を行う。

殺菌剤耐性については、主に次亜塩素酸ナトリウム耐性を測定する。細胞が付着した調理器具素材を次亜塩素酸ナトリウム処理後、生理食塩水で洗浄し、細胞が付着した素材を寒天培地と密着させ、培養後に形成されるコロニー数から、生細胞数を測定する。実験補助者となる博士後期課程院生は、培地等の実験材料の調製、コロニー数の計測等において補助的な作業を行う。

(2) 生理学的状態の異なる大腸菌 O157 を使用して、素材表面への付着と生存を検討する。使用する細胞は、増殖段階が異なるもの、増殖温度の異なるもの、並びに保存条件の異なるもの等を使用する。調理器具素材や実験法は前年度と同様に行う。これまでの研究成果では、大腸菌 O157 の生育温度を 15, 25, 37 とした時、付着性が最も低いのは 15 で生育した場合であったが、生育温度と付着性の関係をより詳細に検討すると共に、冷蔵や冷凍による保存期間が異なる大腸菌 O157 の付着と生存も検討する。なお、付着細胞の損傷により、コロニー形成能が低下することが確認された場合は、コロニー形成までの培養日数を延長して対応するか、プロピジウムモノアジドを用いるリアルタイム PCR で検討する。

付着細胞の除菌・殺菌については、洗剤、殺菌剤、超音波処理、マイクロ波処理を行い、調理器具素材から遊離する細胞数や残存する細胞数を測定する。

(3) 大腸菌 0157 が混入する可能性が高い食肉類を主な食品試料とし、大腸菌 0157 の調理器具素材への付着と生存に与える影響を検討する。食品試料をあらかじめ塗抹した調理器具素材に対する大腸菌 0157 の付着と生存を検討すると共に、食品試料に摂取した大腸菌 0157 について同様に検討する。これまでの研究では、牛脂が付着した調理器具素材に対して本菌はほとんど付着しないことから、油脂の成分についても検討する。また、腸内細菌科の細菌が生産するヘキサノイルホモセリンラクトンが大腸菌 0157 の付着性を低下させることを既に報告しているため、他の細菌が共存する条件でも付着と生存を検討する。なお、付着した大腸菌 0157 と他の腸内細菌の識別は、本病原体の選択培地であるソルビトールマッコンキー寒天培地を使用する。実際の食品中に混入している細菌類の中には、上記選択培地で判別が容易でない細菌の存在も想定されるが、その場合には、もう一つの選択培地であるクロムアガー選択培地を併用して対応する計画である。

(4) 調理器具素材ごとに並びに食品の種類ごとに、調理器具素材に付着した本菌の食品への移動を検討する。移動先の食品としては生食の機会が多い野菜類、刺身等を主に検討し、素材と食品の接触時間は数秒から30分間の間とする。

4. 研究成果

(1)はじめに

微生物は至る所に存在して食品に混入するため、様々な食品製造設備や調理器具に付着し、やがてバイオフィームを形成する。バイオフィームは薬品に対する抵抗性が高く物理的にも強固であるため、通常の洗浄や殺菌では完全除去が困難であり、バイオフィーム形成前の段階で防御することが必要である。微生物の各種素材に対する付着性は、素材表面の物性や汚れの種類、付着環境並びに微生物の生育環境によって異なるため、食品の製造設備に応じて対策が必要である。本研究では、調理器具を介する大腸菌 0157 の挙動を検討した。

(2) 初期付着細胞の固体表面での生存性

大腸菌 0157 (10^2 , 10^4 , 10^6 個/25 μ l) をステンレス及びガラス表面に塗り広げ、自然乾燥による生菌数の低下を調べた。牛肉汁のない状態での大腸菌は、ステンレス表面での乾燥1時間で1/100から1/10000の細胞数へ低下した。素材の種類によって死滅速度が異なるが、ガラスのように親水性の高い素材は、疎水性の高いステンレスより死滅速度が遅

いと思われた。一方、牛肉汁と共に自然乾燥させた場合は、肉汁成分により乾燥しにくく、大腸菌は死滅しにくくなった。この場合も、ガラスよりステンレスの方が死滅しやすい傾向となった。

(3)初期付着の栄養環境

一般に、栄養状態の乏しい条件で、微生物は付着してバイオフィームを形成する[6]。また、付着細胞は浮遊細胞に比べ増殖が極めて遅い。大腸菌 0157 を添加したミネラルウォーターとステンレス片を接触させた際の付着細菌数の経時的変化を検討したところ、栄養がほとんどない環境で細菌は急速に付着した。従って、使用後の食品加工・調理器具を水に漬け置くことは本菌の付着数を高めバイオフィームを形成させると考えられた。

(4)殺菌剤耐性

食品加工・調理器具に形成されたバイオフィームは極めて高い殺菌剤耐性を示すが、その耐性を獲得する時期は意外に早いことが判明した。浮遊細胞とステンレスに付着した直後の本菌の次亜塩素酸ナトリウム耐性を調べたところ、浮遊細胞は0.01 ppmの次亜塩素酸ナトリウムで99%以上が殺菌されるが、付着細胞は付着直後でも99%以上の殺菌効果を得るためには1 ppm濃度の次亜塩素酸ナトリウムが必要であった。すなわち、付着しただけで次亜塩素酸ナトリウムに対する耐性が約100倍増大したことになる。付着細胞の殺菌剤耐性を、付着後の時間経過と共に調べると、殺菌剤耐性は付着時間の経過と共に急激に増大することが判明した。

(5)付着性に影響を与える因子[7]

食品成分 食品加工・調理器具の汚れー
食品加工・調理器具の汚れは、以下のような問題を引き起こす。素材の種類と食品成分の組合せにもよるが、一般に汚れは微生物の付着を促進し、バイオフィーム形成の引き金となる。汚れや匂いが食品へ移行し、食品の品質を低下させる。設備の腐食・機能低下の原因となる。汚れは殺菌剤の有効濃度を低下させ、殺菌効率を低下させる。従って、汚れは可能な限り早く除去することが必要である。

まず、脂質やタンパク質の汚れを想定して、素材表面にスライスした牛肉を置き、室温で20分間接触させた後に牛肉を取り除いた場合は付着する菌数が低下し、1%牛血清アルブミン溶液(40 μ L/cm²)と接触させた後に室温で20分間自然乾燥させた場合は未処理と付着菌数に違いが見られず、また加熱溶解した牛脂(40 μ L/cm²)と接触させた後に室温で20分間放置した場合は最も低い付着菌数となった。以上のことから、食肉成分の汚れにより付着菌数が増加することはないと考えられた。ただし、汚れはバイオフィームの形

成を促進することに留意すべきである。一方、食品には多様な多糖類も含まれるが、これまでバイオフィルムの形成に關与することは知られていたが、初期付着への關与はほとんど検討されていない。我々は、穀類や海藻類の多糖類が初期付着に与える影響を検討したところ、多糖類は本菌の初期付着を著しく高めることが判明した。

(6)微生物の生育温度が付着性に与える影響

大腸菌 0157 は低温で培養すると、酸に対する耐性が低下することを我々は以前に報告した[8]。付着についても、培養温度が影響すると考え、いくつかの温度で培養した大腸菌 0157 の付着性を調べた。異なる温度で生育した大腸菌 0157 のステンレス、チタン、ガラスに対する付着性を検討したところ、明らかに、15℃で生育した菌は付着性が低下することが判明した。この理由の一つとして、大腸菌の運動性が低温では増大することが考えられる。また、大腸菌細胞の表層には粘着性カーリ（繊毛）と呼ばれる繊維状構造物が存在し、細胞や組織への付着性に關与することが報告されているが、その量は低温で増大することが知られているため、食品加工・調理器具への付着に粘着性カーリは關与しないと考えられた。

(7)細菌のクオラムセンシングと付着性

ある種の細菌類は、自らの細胞集団の密度や他の細胞の密度を感知するシステム（クオラムセンシング）をもっている。大腸菌は自らの細胞密度を知るためにインドールを産生し、その濃度によって自らの細胞密度を感知している。また、他のグラム陰性菌が自らの細胞密度を知るために産生するアシルホモセリンラクトンを感知する能力も大腸菌は備えている。また、アシルホモセリンラクトン類は大腸菌のバイオフィルム形成を抑制するという報告もある[9]が、付着性に与える影響については報告がなかった。そこで、各種アシルホモセリンラクトンの存在下で、大腸菌 0157 の付着性を調べた。その結果、N-ヘキサノイル-DL-ホモセリンラクトンを添加した場合には付着性が抑制され、大腸菌 0157 の付着性が他の細菌の存在によって影響を受けることが判明した。

<引用文献>

[6]Florjaniča M and Kristlb J. The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. *Int J Pharm*, 405, 16-22 (2011).

[7]Tsuji M and Yokoigawa K. Attachment of *Escherichia coli* 0157:H7 to abiotic surfaces of cooking utensils. *Journal of Food Science*, 77(4), 194-199 (2012).

[8]Yokoigawa K, Takikawa A, Okubo Y, Umesako S. 2003. Acid Tolerance and *gad* mRNA Levels of *Escherichia coli* 0157:H7 Grown in Foods. *Int J Food Microbiol* 82:203-211 (2003).

[9]Lee J, Jayaraman A and Wood TK. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiology* 7:issue 42. (2007).

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 8 件)

Yumiko Nishimura-Danjobara, Keisuke Oyama, Kaori Kanemaru, Keiko Takahashi, Kumio Yokoigawa and Yasuo Oyama : N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine-lactone, a quorum sensing molecule, affects cellular content of nonprotein thiol content in rat lymphocytes: Its relation with intracellular Zn²⁺, *Chemico-Biological Interactions*, Vol.280, 28-32, 2018. (査読有り)

Norio Kamemura, Keisuke Oyama, Kaori Kanemaru, Kumio Yokoigawa and Yasuo Oyama : Diverse cellular actions of tert-butylhydroquinone, a food additive, on rat thymocytes, *Toxicology Research*, Vol.6, 922-929, 2017. (査読有り)

Badr Ali Hoida, Takahashi Keiko, Ryushi Kawakami, Yasuo Oyama, Kumio Yokoigawa and Kaori Kanemaru : Screening and analysis of edible seaweeds in the ability to adsorb Shiga toxin., *European Food Research and Technology*, 2017. (査読有り)

Maki Takeda, Keisuke Oyama, Norio Kamemura, Kaori Kanemaru, Keizo Yuasa, Kumio Yokoigawa and Yasuo Oyama : Change in plasma membrane potential of rat thymocytes by tert-butylhydroquinone, a food additive: Possible risk on lymphocytes, *Food and Chemical Toxicology*, Vol.109, No.1, 296-301, 2017. (査読有り)

Goto Tsukie, Makiko Tsuji, Kaori Kanemaru and Kumio Yokoigawa: Adsorption of Shiga Toxin to Poly-Glutamate Precipitated., *Journal of Food Science*, Vol.81, No.12, 2977-2981, 2016. (査読有り)

Eiko Niwa, Tsuyoshi Mitani, Shohei Saitoh, Kaori Kanemaru, Shiro Ishida, Kumio Yokoigawa and Yasuo Oyama : Zinc increases vulnerability of rat thymic lymphocytes to arachidonic acid under in vitro conditions, Food and Chemical Toxicology, Vol.96, 177-182, 2016. (査読有り)

Hirimitsu Tsuzuki, Shota Inoue, Daiki Kobayashi, Gantulga Uuganbaatar, Kaori Kanemaru, Kumio Yokoigawa and Yasuo Oyama : Methyl cinnamate increases cell vulnerability to oxidative stress induced by hydrogen peroxide in rat thymocytes, Fundamental Toxicological Sciences, Vol.3, No.3, 121-125, 2016. (査読有り)

Takefumi Hattori, Hirimitsu Tsuzuki, Hiroe Amou, Kumio Yokoigawa and Akira Ohta : A biosynthetic pathway for (E)-methyl cinnamate formation in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma matsutake*, Mycoscience, Vol.57, No.3, 181-186, 2016. (査読有り)

〔学会発表〕(計 10 件)

川上 竜巳, 金丸 芳, 横井川 久己男 : 食品微生物や発酵食品に含まれる D-アミノ酸検出のための UHPLC 検出系の構築, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 2017 年 10 月.

Badr Ali Hoida, Takahashi Keiko, Ryushi Kawakami, Yasuo Oyama, Kumio Yokoigawa and Kaori Kanemaru : Screening and analysis of edible seaweeds in the ability to adsorb Shiga toxin, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, Oct. 2017.

後藤 月江, 金丸 芳, 横井川 久己男 : 固定化ポリマー-グルタミン酸の志賀毒素吸着性, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 2017 年 10 月.

酒井 仁美, 酒井 徹, 横井川 久己男 : 調理器具素材への大腸菌の付着を抑制する小麦粉の成分について, 第 38 回日本食品微生物学会学術総会, 2017 年 10 月.

横井川 久己男, 高橋 啓子, 金丸 芳 : 非生物素材に付着した大腸菌 0157 のバイオフィルム形成, 日本農芸化学会 2017 大会, 2017 年 3 月.

横井川 久己男, オワイダ アリ バドル, 金丸 芳 : 食用海藻の志賀毒素吸着性, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会講演要

旨集, 64, 2016 年 9 月.

酒井 仁美, 酒井 徹, 横井川 久己男 : 調理器具素材への大腸菌の付着に及ぼす穀類の影響, 第 37 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 111, 2016 年 9 月.

酒井 仁美, 酒井 徹, 横井川 久己男 : 大腸菌の非生物素材への付着に対する穀類の影響, 日本農芸化学会中四国支部第 45 回講演会要旨集, 23, 2016 年 6 月.

後藤 月江, 達 牧子, 金丸 芳, 横井川 久己男 : 沈殿したポリ- -グルタミン酸の志賀毒素吸着性, 日本農芸化学会中四国支部第 45 回講演会要旨集, 24, 2016 年 6 月.

オワイダ アリ バドル, 金丸 芳, 横井川 久己男 : Screening and analysis of edible seaweeds in the ability to adsorb Shiga toxin, 日本農芸化学会中四国支部第 45 回講演会要旨集, 23, 2016 年 6 月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井川 久己男 (Yokoigawa, Kumio)
徳島大学・大学院社会産業理工学研究部生物資源産業学域・教授
研究者番号 : 60230637