

機関番号：401115

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880049

研究課題名（和文） 腸炎ビブリオの調理環境における走化性に関する研究

研究課題名（英文） Study on chemotactic response of *Vibrio parahaemolyticus* in the kitchen

研究代表者

澤辺 桃子 (SAWABE TOKO)

函館短期大学・食物栄養学科・講師

研究者番号：10531121

研究成果の概要（和文）：

本研究では、遺伝子組換えした腸炎ビブリオ GFP 株を用いて、腸炎ビブリオの調理環境下における走化性を可視化した。走化性の評価は、アミノ酸や魚介類粘液をアガロースプラグに含有させ、そのプラグに対して集まる菌体を蛍光リングとして検出する方法を用いた。腸炎ビブリオは誘引性の高いセリンや魚介粘液などに対して 5 分以内という短時間で集積リングを形成した。魚介類粘液などに対する誘引性は魚介類の種類や部位によって差異が見られた。

研究成果の概要（英文）：

Chemotactic responses in a model environment for the kitchen were visualized by using GFP-tagged *Vibrio parahaemolyticus*. The chemotaxis was measured by agarose plug assay. *V. parahaemolyticus* formed an apparent ring showing green fluorescence against various strong chemoattractants within five minutes. The chemotactic responses against fish/shellfish mucus or extracts differed in the kind and the part of fish/shellfish.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	930,000	279,000	1,209,000
22 年度	740,000	222,000	962,000
年度			
年度			
年度			
総計			2,171,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：腸炎ビブリオ・走化性・GFP・調理環境

1. 研究開始当初の背景

(1) 食品を取り扱うあらゆる過程で食中毒を防ぐための様々な対策が講じられているにもかかわらず、食中毒の発生は後を絶たない。食中毒原因物質の 50-60% は細菌であり、夏季に増加する腸炎ビブリオによる食中毒は

魚介類を介して調理環境に持ち込まれる。腸炎ビブリオは好塩細菌であるため一夜漬けの漬物に調理器具等を介して入り込み、食中毒の原因食品となった事例があるなど二次汚染が問題となっている。

(2) 腸炎ビブリオに関する研究は疫学や殺菌、静菌、消毒などの制御に関するもの、食品や自然環境中からの迅速検出など広範囲に渡る。しかし、調理環境や調理器具に関するものは、酸性電解水の殺菌効果に関連した報告と調理器具または手から食品へ、あるいは食品間のクロスコンタミネーションの割合を検討した二次汚染に関する研究があるだけである。

(3) 調理器具や手指の汚染は、蛍光ローションとブラックライトを用いて肉眼にて疑似検証することができるが、汚染原因となる細菌は時間とともに増殖し、調理器具に付着した成分や食品の種類などでもその動態は異なると予想される。そのため生きている細菌による汚染の広がりを経時的に観察することが徹底的な二次汚染の防止対策には必要であると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究は食中毒防止の様々な対策が講じられていても発生する食中毒に対し、微生物生態学的視点から汚染防止策を提案するための基礎研究である。腸炎ビブリオの緑色蛍光タンパク質 GFP 発現株による走化性の可視化を検討し、食品や調理器具等への汚染の広がり方など調理環境における詳細な生態を明らかにすることで具体的な二次汚染防止策を提案することを目的とする。

(2) 調理器具の種類や有機物の存在、塩分濃度などの細かな違いにより、腸炎ビブリオの汚染は不均一に広がるのが予想される。洗浄や調理器具、食材の放置時間などの条件検討により、二次汚染の危険度も可視化により明確に示すことができると考え、これらの結果は腸炎ビブリオ細菌の生態を考慮した食中毒防止に重要な情報を与えるものだと確信する。特に、可視化による蛍光画像は調理従事者への啓蒙活動にもより高い効果を上げることができると考える。

3. 研究の方法

(1) 腸炎ビブリオ GFP 発現株は次のように作製した。北海道大学大学院 水産科学研究院で保存されている耐熱性溶血毒 (TDH) 産生性 *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 に *gfp* 遺伝子を接合伝播にて導入し、腸炎ビブリオ GFP 株を作製した。ZoBell 2216E 培地で対数増殖期まで、37°C、120 rpm にて振盪培養して集菌した。Chemotaxis media (8 mM K₂HPO₄, 2.2 mM KH₂PO₄, 0.1 mM EDTA, 2% NaCl) で 2 回洗浄した後、600 nm の吸光値が約 2 になるように Chemotaxis media に懸濁したものを供試菌液とした。

(2) 魚介類粘液試料は次のように調製した。函館市内の市場で購入した 8 種類の魚介類を鰓や体表、消化管など部位別に分けて 25 種類の魚介類粘液試料を調製した。8 種類の魚介類は次の通りである；マアジ (英名 Japanese jack mackerel, 学名 *Trachurus japonicus*)、マダイ (英名 red seabream, 学名 *Pagrus major*)、スルメイカ (英名 Japanese Flying Squid, 学名 *Todarodes pacificus*)、ホッコクアカエビ (英名 Pacific northern pink shrimp, 学名 *Pandalus eous Makarov*)、ホタテガイ (英名 Japanese scallop, 学名 *Mizuhopecten yessoensis*)、アサリ (英名 Japanese littleneck, 学名 *Ruditapes philippinarum*)、マガキ (英名 Japanese oyster, 学名 *Crassostrea gigas*)、ゆでだこ (英名 boiled octopus 学名 *Ordo Octopoda*)。

体表粘液は、魚介類を人工海水で一度洗浄した後、滅菌綿棒で擦り採取して滅菌人工海水に懸濁し、魚介類粘液試料とした。その他の部位は、各部ごとにホモジナイズした後、滅菌人工海水に懸濁し、遠心分離 (3,000rpm, 10min) を行い、上清を魚介類粘液試料とした。

(3) 化学走性は Yu and Alam の報告にある Agarose-in-plug bridge method を改変したアガロースプラグアッセイ法にて行った。ラプテック®チェンバースライドのシリコンスペーサー枠の中央部に、加温溶解した 1.5% アガロースと各種誘引物質を混合した溶液 12 μL を載せた。直ちに Matsunami カバーガラス (24x24mm) を重ね、2-3 分静置した。カバーガラスの隙間から調製した腸炎ビブリオ菌液 400 μL を注入し、LED 蛍光励起光源装置 VISIRYAS (ATTO) と SCF515 フィルターを装着したデジタルカメラにて観察し、撮影を行った。プラグの周囲に菌体が集積した明確なリングが形成された場合を陽性とした。陽性対照には、*Vibrio* 属細菌の多くで誘引性が確認されている 10 mM L-セリンを用い、陰性対照は誘引物質を添加しない 1.5% アガロースとした。

4. 研究成果

本研究では腸炎ビブリオの GFP 株を接合にて作製した。ZoBell 2216E 寒天培地にその株を塗布し、LED 蛍光励起光源装置 VISIRYAS (ビジレイズ) とデジタルカメラを用いて 1 時間ごとのインターバル撮影にて 24 時間連続観察を行い、腸炎ビブリオの増殖を蛍光強度の変化にて捉えることができた。

次に走化性を評価するための予備検討を行った。多くのビブリオ属細菌の走化性実験における陽性対照には L-セリンが用いられて

いるので、作製した GFP 株と野生株の L-セリンに対する走化性を検討した。評価方法は、定性的ではあるが、簡便な手法として知られているアガロースプラグアッセイにて行った。本法は、細菌が誘引性を示すような物質をアガロースと混合し、円柱状に固化させたプラグをスライドガラス上に置いて周囲を細菌の懸濁液で満たす。プラグから形成される物質の濃度勾配に対して誘引され、走化性を示す場合には、細菌にとって適正な濃度領域に菌体が集積してリングが形成される。走化性を示さない場合は細菌集積リングが形成されず、リングの有無で走化性を定性的に評価できる。

GFP 株と野生株のどちらも L-セリンを混ぜたアガロースプラグ周囲に菌体が集まったリングが同様に形成されたことで、L-セリンに誘引されることが確認でき、*gfp* 遺伝子の導入と発現が走化性に与える影響は低いと考えられた。また、GFP の蛍光でリングを撮影すると、より明確な画像が得られた(図 1)。

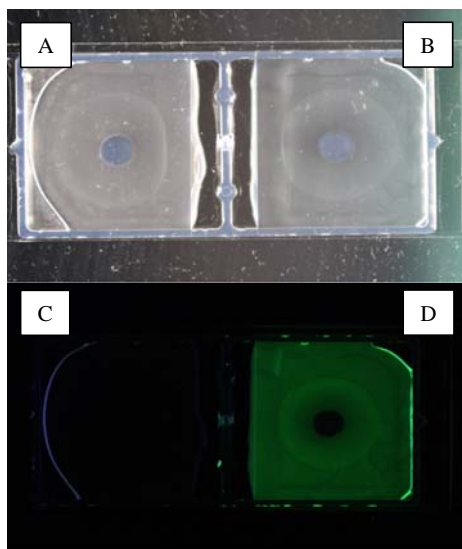


図 1 腸炎ビブリオ野生株と GFP 株の菌体を用いた L-セリンに対する走化性。
A, C:野生株, B, D:GFP 株

次に作製した腸炎ビブリオ GFP 株と様々な魚介類粘液を用いて走化性の評価をアガロースプラグアッセイにて検討した。本研究の結果、検討した 25 種類の魚介類粘液のうち、マアジ鰓、マダイ鰓、スルメイカ直腸、エビ頭、マガキ鰓、ゆでだこ体表の 6 種類で明確な菌体集積リングが確認できた。また、腸炎ビブリオが 5 分以内という短い時間で速やかに反応し、適正濃度域に集積することを経時的に可視化し、記録することができた。さらに腸炎ビブリオの誘引性は魚介類の種類や

その部位によって異なることが示唆された。

表 1 腸炎ビブリオの魚介類粘液や抽出物に対する走化性

sample	presence of bacteria accumulation ring	
Japanese jack mackerel (<i>Trachurus japonicus</i>)	gill	+
	body surface	-
	muscle	-
	intestines	-
red seabream (<i>Pagrus major</i>)	gill	+
	body surface	-
	muscle	-
	intestines	-
Japanese Flying Squid (<i>Todarodes pacificus</i>)	gill	-
	body surface	-
	muscle	-
	intestines	+
Pacific northern pink shrimp (<i>Pandalus eos Matcarov</i>)	body surface	-
	head	+
	muscle	-
Japanese scallop (<i>Aburatsubopecten yessoensis</i>)	gill	-
	mantle	-
	muscle	-
	intestines	-
Japanese littleneck (<i>Ruditapes philippinarum</i>)	gill	-
	mantle	-
Japanese oyster (<i>Crassostrea gigas</i>)	gill	+
	mantle	-
	muscle	-
boiled octopus (<i>Order Octopoda</i>)	body surface	+

以上の結果より、本研究の目標であった腸炎ビブリオ走化性の可視化を研究期間内に達成することができた。今後、より多くの魚介類粘液や調理器具との組み合わせについて検討し、走化性を評価することで、食品検査における魚介類の重要検査部位や取り扱いに注意を要する魚種を選抜することができるかもしれない。また、定量的な方法と合わせて、誘引性の確認された粘液間の比較なども行う必要があると考える。

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 2 件)

①澤辺桃子, 坂牛百合香, 澤辺智雄, 腸炎ビ

- ブリオの走性行動の可視化, 函館短期大学
紀要, 査読無, 37号, 2011, 41~45
- ②澤辺桃子, 澤辺智雄, 蛍光標識テクノロジー
を利用した食中毒細菌エコロジの理
解, New Food Industry, 査読無, 54号,
2011, 印刷中

[学会発表] (計1件)

- ①澤辺桃子 他3名, 腸炎ピブリオの魚介類
粘液に対する走性応答の可視化, 第100回
日本食品衛生学会学術講演会, 2010年9
月17日, 熊本県立大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤辺 桃子 (SAWABE TOKO)
函館短期大学・食物栄養学科・講師
研究者番号: 10531121

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: