

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32714

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05446

研究課題名（和文）カンピロバクターの新たな運動性評価法の開発と運動阻害物質のスクリーニング

研究課題名（英文）Development of a new method to assess *Campylobacter* motility and screening of motility inhibitors

研究代表者

澤井 淳 (Sawai, Jun)

神奈川工科大学・健康医療科学部・教授

研究者番号：80288216

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：カンピロバクター（*C. jejuni*）は高い運動性を持ち、食品内部への移動が懸念される。従来の2次元での細菌の運動性評価ではなく、ろ紙を利用し食品中への移動を想定した細孔中での3次元条件下での*C. jejuni*の運動性+バイオフィーム(BF)形成能の評価方法の確立ができた。本手法によりエッセンシャルオイル等の天然抗菌物質が揮発条件下で*C. jejuni*の運動性を抑制することが示され、一方でアルコールや次亜塩素酸Naは噴霧条件でも*C. jejuni*を阻害できなかった。食肉表面に*C. jejuni*を接種した実験でも*C. jejuni*の低減が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カンピロバクターの運動性を食肉・食材中への移動を想定した系（有機物含有、垂直移動、バイオフィーム形成）において把握することを目的とし、運動の方向性や細孔中などの3次元条件下での運動性の評価方法を開発した。この評価方法により、カンピロバクターの運動性を阻害する化学物質等のスクリーニングを行うことができた学術的意義は大きい。菌を死滅させるという従来の評価だけでなく、運動性を阻害するという新たな制御方法を提示し、微生物制御および食品衛生分野全体に波及効果をもたらす社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：*Campylobacter* (*C. jejuni*) is highly motile, and there is concern that it may migrate inside food products. Instead of the conventional two-dimensional evaluation of bacterial motility, we have established a method for evaluating *C. jejuni* motility + biofilm (BF) formation capacity under three-dimensional conditions in pores, assuming migration into foodstuffs, using filter paper. The method showed that natural antimicrobial substances such as essential oils inhibited *C. jejuni* motility under volatile conditions, while alcohol and sodium hypochlorite failed to inhibit *C. jejuni* even under spray conditions. Experiments in which meat surfaces were inoculated with *C. jejuni* also showed a reduction of *C. jejuni*.

研究分野：殺菌・抗菌技術

キーワード：食中毒 カンピロバクター 移動性 運動性 バイオフィーム ろ紙 エッセンシャルオイル

### 1. 研究開始当初の背景

2019年の我が国における食中毒の発生状況を見ると、カンピロバクターはアニサキスについて発生件数は全体の2位(289件、細菌性食中毒では1位)となっている(厚生労働省、食中毒統計資料)。カンピロバクターは加熱や乾燥には比較的弱いことから、生食および加熱不十分での喫食が最大の要因となる。また、カンピロバクターは少量感染菌(10<sup>2</sup>個程度)であり、他の多くの食中毒菌と比較すると、制御が難しい要因の一つである。そして、もう一つの要因が、カンピロバクターが微好気性であり、かつ高い運動性を有することである。大気中の酸素濃度では生存できないが、5~10%程度の酸素は必要なため、表面近傍の食品内部へ入り込んで、時としてバイオフィーム(BF)を形成する。

我が国の家畜におけるカンピロバクターの感染率は30~90%と高く、屠畜場、食鳥処理場での食肉表面への付着は避けられない状況にある。現在、食肉の殺菌にも次亜塩素酸ナトリウムが使用されているが、有効成分の遊離塩素が肉成分の有機物により失活するため、消毒効果として不十分である事が指摘されており、消毒剤の選定は非常に難しい。そうならば、カンピロバクターの制御は、本菌が表面から食品内部への侵攻を抑制することが、極めて重要な食中毒・感染症予防になり、つまるところ、選択すべき消毒処理法は殺菌効果に加え、カンピロバクターの運動性に対する阻害効果を有することがキーポイントとなると考える。

カンピロバクターは両端の鞭毛による高い運動性を有し、食品内部への移動を可能としている。ヒトの腸管細胞へのカンピロバクターの侵襲についての研究は現在精力的に行われているが、環境中におけるカンピロバクターの運動性の研究は決して多くない。一般に細菌の運動性は寒天平板上での2次元での泳動能力で評価されている。この評価方法では菌が寒天平板上で形成したコロニーが大きいほど、運動性が高いこととなる。顕微鏡やビデオカメラを用いた画像解析による検討もあるが、いずれにせよ、2次元的な運動を観察するものである。

しかし、食品は3次元的な構造であり、表面の毛穴や細胞のすき間、微細な傷の中を泳動し食品内部に入り込んでコロニーやバイオフィームを形成する能力を評価しなければ、実際の食品への感染能力の評価をすることはできない。大腸菌や枯草菌なども高い泳動能力を持っている。これらの菌との2次元での相対的な評価だけでは、現在のカンピロバクター食中毒の拡大は説明できない。

カンピロバクターの運動特性を食品中への移動を想定した系において、運動の方向性や細孔中などの3次元条件下での運動性をどのように評価し、カンピロバクターの制御に繋げるかということが、重要と考える。

### 2. 研究の目的

本研究は以下の3点を目的とする。

- 1) カンピロバクターの運動性を食肉・食材中への移動を想定した系(有機物含有、垂直移動、BF形成)において把握することを目的とし、運動の方向性や細孔中などの3次元条件下での運動性の評価方法を開発する。
- 2) 1)の評価方法により、カンピロバクターの運動性を阻害する天然抗菌物質および非加熱物理的処理方法等のスクリーニングを行う。
- 3) 2)の結果をもとに、食肉表面にカンピロバクターを塗布し、天然抗菌物質および物理的処理等を行い、運動性が阻害できるかどうか検討する。

これまで寒天平板上でのコロニーの大きさによる2次元での運動性評価ではなく、食肉・食材中への移動を想定した系において、運動の方向性や細孔中などの3次元条件下での運動性、さらにBF形成までの評価を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) ろ紙を用いた運動性の評価方法の開発

供試菌としてカンピロバクター(*Campylobacter jejuni* ATCC 29428)、大腸菌(*Escherichia coli* ATCC25922)、枯草菌(*Bacillus subtilis* ATCC6633)を使用し実験を行った。*C. jejuni*を生理食塩水で希釈後、CCDA培地に塗布し微好気条件で培養した。*E. coli*および*B. subtilis*は普通寒天培地に塗布し、培養した。形成したコロニーに滅菌したニトロ

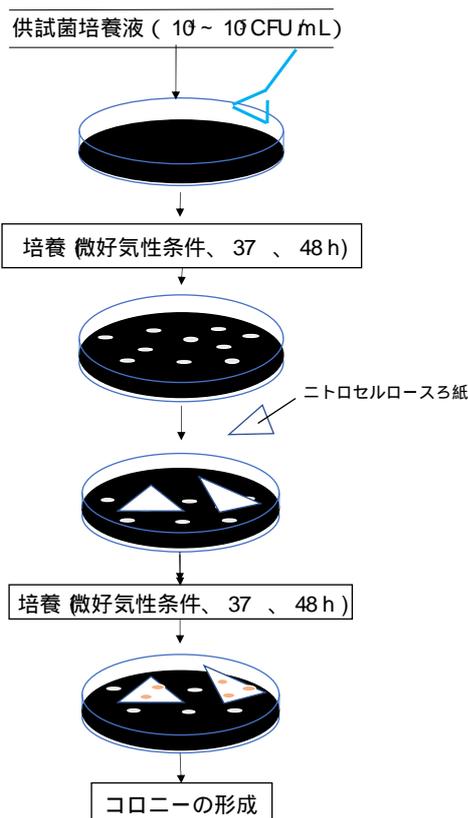


図1 ろ紙を用いたカンピロバクターの運動性の評価方法

セルロース製のろ紙（孔径：0.2, 0.3, 0.45, 1.6, 20-25  $\mu\text{m}$ ）を1~10枚と重ねて置き、*C. jejuni*は微好気条件で、*E. coli*および*B. subtilis*は好気条件で培養した。その後、ろ紙の上に形成されたコロニーを採取し、グラム染色後に顕微鏡で観察した（図1）。

#### (2) 本評価方法による抗菌物質のスクリーニング

CCDA培地上に形成した*C. jejuni*のコロニーの上ろ紙（0.45  $\mu\text{m}$ ）をのせた。シャーレの蓋に調製した抗菌物質溶液を染み込ませたペーパーディスクをのせ蓋をした。倒置して微好気条件で培養後、CCDA培地のろ紙上のコロニーを観察した。また消毒用アルコール（エタノール70%）および次亜塩素酸ナトリウムをCCDA培地上のコロニーに直接吹きかけ、その後ろ紙をコロニー上に置いた。

#### (3) 食肉表面での検討

食肉として鶏肉表面に*C. jejuni*を接種し揮発条件下での検討を行った。文献の方法に従い、鶏肉をアルコール消毒し、*C. jejuni*を接種したサンプル鶏肉を調製した。滅菌シャーレに、ろ紙を載せたサンプル鶏肉と(2)と同様に抗菌物質溶液を染み込ませたペーパーディスクをのせ蓋をし培養した（微好気条件、37, 48 h）。その後、ストマッカー処理（1 min）を行い、CCDA培地でコロニーカウント法により、*C. jejuni*の生菌数を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) ろ紙を用いた運動性の評価方法の開発

*C. jejuni*は0.2~0.45  $\mu\text{m}$ の孔を通り、ろ紙表面でコロニーを形成した（図2a、表1）。ろ紙上に形成されたコロニー中に*C. jejuni*が実際に存在することも顕微鏡により確認できた。さらに孔サイズ0.2  $\mu\text{m}$ では1枚、0.3  $\mu\text{m}$ および0.45  $\mu\text{m}$ では9枚までのろ紙の孔を通り、ろ紙上にコロニーを形成することが可能であった。一般に0.45  $\mu\text{m}$ 以下のフィルターは滅菌フィルターとして使用されているが、*C. jejuni*は、そのフィルターの孔を通りコロニーを形成することが可能であった。一方、*E. coli*および*B. subtilis*では、0.2, 0.3, 0.45  $\mu\text{m}$ の孔サイズでは孔を通過できず（図2b、表2、表3）1.6  $\mu\text{m}$ 以上の孔サイズが必要であった。以上の結果より、寒天を使用した2次元における評価では差がつきにくい*C. jejuni*と*E. coli*、*B. subtilis*の運動性をろ紙を使用することで、明確に差別化することができ、本法が*C. jejuni*の新たな運動性の評価方法として利用できる可能性が示唆された。

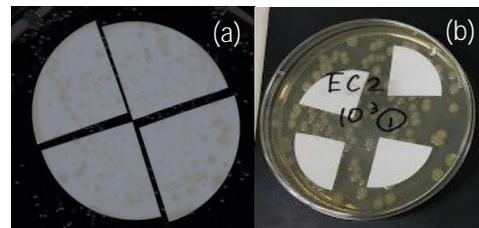


図2 コロニー上ろ紙をのせて培養後の結果。(a) カンピロバクター、(b) 大腸菌

表1 ろ紙を用いた*C. jejuni*の運動性の評価

孔径 ( $\mu\text{m}$ )	ろ紙 (枚)					
	1	3	5	7	9	10
0.2	○	×	-	-	-	-
0.3	○	○	○	○	○	×
0.45	○	○	○	○	○	×

○:コロニー形成有 ×:コロニー形成無 -:未実施

表2 ろ紙を用いた*E. coli*の運動性の評価

孔径 ( $\mu\text{m}$ )	ろ紙 (枚)					
	1	3	5	7	9	11
0.2	×	-	-	-	-	-
0.3	×	-	-	-	-	-
0.45	×	-	-	-	-	-
1.6	○	○	○	○	×	-
20-25	○	○	○	○	○	○

○:コロニー形成有 ×:コロニー形成無 -:未実施

表3 ろ紙を用いた *B. subtilis* の運動性の評価

孔径 ( $\mu\text{m}$ )	ろ紙 (枚)					
	1	3	5	7	9	11
0.2	×	-	-	-	-	-
0.3	×	-	-	-	-	-
0.45	×	-	-	-	-	-
1.6	○	○	○	○	×	-
20-25	○	○	○	○	×	-

○:コロニー形成有 ×:コロニー形成無 -:未実施

(2) 本評価方法による抗菌物質のスクリーニング

オレガノ、タイムチモール、ユーカリ油、カルバクロール等の精油類は揮発して効果を発揮した。ろ紙上に *C. jejuni* のコロニーは確認されず、増殖あるいは運動性を阻止した(表3)。一方、消毒剤として使用されているアルコールおよび次亜塩素酸ナトリウムを噴霧した場合、*C. jejuni* を阻止できず、ろ紙上にコロニー形成が確認された(表4)。現在処理において使用されている消毒剤は、有効に作用していない可能性が示唆された。以上の結果より、本評価方法により *C. jejuni* の阻害物質のスクリーニングが可能であった。

表3 香気成分が *C. jejuni* の運動性に及ぼす効果

	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$
コントロール	×	×	×
オレガノワイルド	×	○	○
タイムチモール	×	○	○
ヒノキチオール	×	×	×
カプサイシン	×	×	×
ポリリジン	×	×	×
イソチオシアン酸アリル	×	×	×
ユーカリ油	○	○	○
カルバクロール	○	○	○

○:効果あり(コロニー形成なし) ×:効果なし(コロニー形成あり)

表4 消毒用アルコールと次亜塩素酸ナトリウムが *C. jejuni* の運動性に及ぼす効果

	100 $\mu\text{L}$	200 $\mu\text{L}$	300 $\mu\text{L}$
コントロール	○	○	○
70%アルコール	○	○	○
次亜塩素酸ナトリウム	○	○	○

○:コロニーが形成された ×:コロニーが形成されなかった

(3) 食肉表面での検討

鶏肉表面でのろ紙の使用は、コントロールでもコロニー形成が認められなかった。これは、*C. jejuni* がサンプル食肉内部へ移動している可能性が考えられた。そこでコロニーカウント法にて効果を検討した。香気成分により、*C. jejuni* の低減が認められた。しかしながら、Controlでも *C. jejuni* の生菌数は減少しており、有意な差とは言えなかった。

実食肉における評価において、結果で他の菌のコンタミネーションを防ぐために食肉表面をアルコール消毒後に *C. jejuni* を接種した。これが食肉表面を傷付けてしまい、*C. jejuni* が肉内部へ移動しやすい環境を整え、ろ紙側へ移動を阻害した可能性がある。また、アルコール消毒の方法は、文献でのリステリア菌においては問題なく行えたが、リステリア菌より抵抗性が低い *C. jejuni* においては、残留したアルコールが *C. jejuni* を死滅、あるいは損傷(損傷菌)を引き起こしたため、Controlにおいても抗生物質糖を含む CCDA 培地でのコロニー数が低下したことも考えられた。以上より、ろ紙での評価方法では、*C. jejuni* 以外の細菌がコロニーを形成できなかったことから、アルコール消毒を行わず実験を行うことを検討している。

<引用文献>

Ferrero, R. L., Lee, A. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. *Microbiology*, Vol. 134, 1998, 53-59.

Karim, Q. N., Logan, R. P., Puels, J., Karnholz, A., Worku, M. L. Measurement of motility of *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, and *Escherichia coli* by real time computer tracking using the Hobson BacTracker. *Journal of Clinical Pathology*, Vol. 51, 1998, 623-628.

Omura, K., Kaibara, E., Yamaguchi, S., Aoyagi, H., Nishio, M., Tomita, K., Sawai, J. Effect of treatment with heated scallop shell powder on the inactivation of naturally existing bacteria and *Listeria monocytogenes* inoculated on chicken meat. *Foods*, Vol. 13, 2024, 370

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsukuda Haruka, Akimoto Taiki, Fukikoshi Nona, Wada Resei, Sawai Jun	4. 巻 12
2. 論文標題 Antibiofilm Effects of Heated Scallop Shell Powder on <i>Campylobacter jejuni</i> Biofilms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 43 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes12010043	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 澤井淳	4. 巻 7
2. 論文標題 カンピロバクターの運動性評価法の開発とそのバイオフィルム制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 879-881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Omura, U., Kaibara, E., Yamaguchi, S., Aoyagi, H., Nishino, M., and Sawai, J.	4. 巻 13
2. 論文標題 Effect of treatment with heated scallop shell powder on the inactivation of naturally existing bacteria and <i>Listeria monocytogenes</i> inoculated on chicken meat	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods13030370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関野響生、西尾裕美花、武田夕依、澤井淳
2. 発表標題 <i>Campylobacter jejuni</i> の運動性の評価方法の開発
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第49回年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澤優子、関野響生、西尾裕美花、武田夕依、澤井淳
2. 発表標題 Campylobacter jejuniの運動性の評価方法の開発と増殖・運動阻害物質のスクリーニング
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第50回年次大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関