様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 １１ 日現在

機関番号：１６１０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2015
課題番号：２６５６００４６

研究課題名（和文）光照射によるカンピロバクター侵入性制御を目指した新規鶏肉保存システムの開発

研究課題名（英文）Development of new chicken store system focused on attenuation of Campylobacter jejuni invasion by UVA irradiation

研究代表者
原田　優美（HARADA, Yumi）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・技術補佐員

研究者番号：８０５６８３９５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では近年明らかとなった、酸化傷害によるカンピロバクターの病原性（運動性、侵入性）抑制機構を参考に、UVA照射による酸化傷害も、菌の病原性を抑制し、食肉への拡散・侵入防止に役立つと考えその有用性について検討した。
(1)カンピロバクターはUVA紫外線に強い感受性を示し、強い殺菌効果を示すことが明らかとなった。(2) またUVA紫外線照射により酸化傷害が引き起こされており、さらに(3)菌の宿主細胞への侵入性が低下することも明らかとなった。以上の結果からUVA紫外線照射は、その殺菌効果に留まらず、酸化傷害を介した病原性低下も引き起こすため、食中毒予防の新しいシステムとして有効性が示された。

研究成果の概要（英文）：In a previous study have shown that virulence of Campylobacter jejuni, such as motility and invasion into host cells, were attenuated by bacterial oxidation. We tried to investigate the potency of UVA irradiation induces oxidation in inhibition of Campylobacter jejuni virulence.
In (1) study for checking the bacterial killing ability by UVA irradiation, we found high sensitivity and killing ability in Campylobacter jejuni. (2) UVA irradiation also causes bacterial oxidation, and (3) the bacterial invasion into host cells was attenuated by bacterial oxidation.
Taken together, UVA irradiation-mediated bacterial oxidation led to high killing ability, and attenuated the bacterial virulence in Campylobacter jejuni. Those results suggest that the UVA irradiation is useful for prevention of dispersion in Campylobacter jejuni contaminated food. Our data may serve good understanding for improvements in food sanitation in Campylobacter jejuni.

研究分野：食品衛生

キーワード：Campylobacter jejuni　UVA　酸化

1．研究開始当初の背景

カンピロバクター（*Campylobacter jejuni/coli*）は食中毒の起因菌であり、日本で発生する細菌性食中毒の半数以上をカンピロバクターが占めており、最も頻発する細菌性食中毒の起因菌となっている。特に鶏肉類を介して感染することが多く、厚生労働省による『平成２４年度食品の食中毒菌汚染実態調査』の結果では、国内で流通する鶏ミンチ肉の 36.2%がカンピロバクターに汚染されているという報告もなされ、消費者は高い感染リスク環境の下にいると言える。一般的な食中毒菌では感染成立に 1×10^{5} 個の菌量摂取を必要としているが、カンピロバクターは $1\times10^{2-3}$ 個の菌量で感染が成立し、他の食中毒菌に比べ感染効率が高いことが知られている。さらにカンピロバクターは『感染侵入型』の食中毒菌に分類され、菌の組織への定着・侵入性が感染において病原性を発揮する上で重要な因子となっている。食肉中においても肉への定着侵入は、洗浄や抗菌薬から逃れる上で重要な働きを示していると考えられるため、カンピロバクターのように少量の菌数の摂取で感染を引き起こす菌の場合、肉に対する定着侵入の制御は重要課題であると考えられる。

これまで、食品衛生では菌を①付着させない、②増殖させない、③殺菌することが最も重要な点となっていたが、カンピロバクターは鶏腸管の常在であるため、ほとんどの鶏肉で菌が存在しており、また食肉中ではほとんど増殖しないこともわかっている。そのため③菌をしっかりと殺菌することがカンピロバクター感染予防において非常に重要であると考えられてきたが、その高い感染効率から、殺菌が不十分であった場合には感染のリスクが高くなり、食品中の菌量を減らすことに焦点を絞った既存の殺菌システムだけでは限界がある。

本研究では新たな食中毒予防システムとして、食品中のカンピロバクターの病原性を低減させるシステムの構築に取り組むこととした。

2．研究の目的

カンピロバクターは日本で最も頻発する食中毒の起因菌であり、その感染制御が食品衛生上重要課題となっている。

問題点として食肉の高い汚染率があげられるが、殺菌によって感染のリスクは大幅に低下する。一方でカンピロバクターは感染効率が高いため、少量の菌を摂取しただけで感染が成立してしまう。そのため、加熱が不十分であった場合や殺菌処理が適切でなかった場合にはカンピロバクター感染のリスクが高くなってしまう。

我々は新たな食中毒の予防システムとして、菌の病原性（運動性、侵入性）を制御し、鶏肉中への菌の侵入、拡散を抑制し、人への感染リスクを低減させる新しいシステムの開発を目的している。

3．研究の方法

近年、カンピロバクターの主要病原因子である運動性、組織侵入性が、酸化ストレスにより著しくて以下することが明らかとなった。我々はこれまでの紫外線殺菌のメカニズム解明を目的とした研究で、UVA 紫外線による殺菌効果は酸化ストレスに由来することを見出した。本研究では UVA 紫外線を用い、菌の病原性（運動性、侵入性）を制御し、鶏肉中への菌の侵入、拡散を抑制し、人への感染リスクを低減させる新しいシステムの有用性について検討を行うこととした。

本研究では有効性を示すために、『紫外線、酸化、侵入』をキーワードとした基礎研究を計画した。主な検討項目は下記の４項目である。

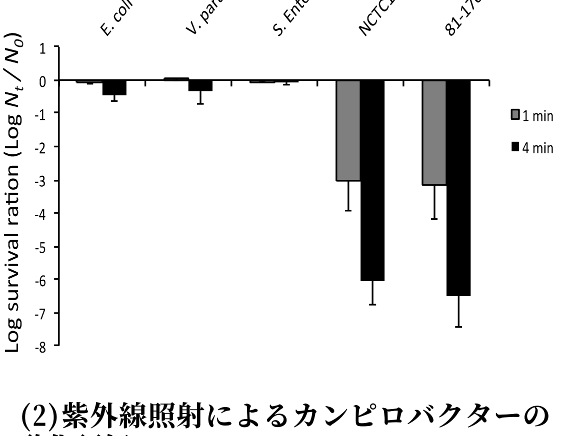
(1) UVA 紫外線照射によるカンピロバクターの殺菌効果
(2) UVA 紫外線線照射によるカンピロバクターの酸化評価
(3) UVA 紫外線照射ストレスによるカンピロバクター上皮細胞侵入性を評価
(4) 鶏肉を用いたカンピロバクター侵入性の評価

4．研究成果

(1)紫外線照射によるカンピロバクターの殺菌効果

これまでに我々の研究グループでは様々な腸管病原性細菌に対する UVA 紫外線の有効性を示してきた。他の腸管病原性細菌と比較し、カンピロバクターに対する UVA 紫外線の有効性を検討した結果、大腸菌、サルモネラ、腸炎ビブリオに比較してカンピロバクターは有意に殺菌されており、UVA 紫外線に対する強い感受性が明らかとなった。（図１）

図1



(2)紫外線照射によるカンピロバクターの酸化評価

これまでの検討から UVA 紫外線による殺菌

効果は酸化ストレスによってもたらされていることが明らかとなっているため、DNA 酸化損傷の指標として用いられる、8-hydroxy-2’-deoxyguanosine(8OHdG) の測定、及び抗酸化物質のカタラーゼ添加による生存変化を検討した。その結果カンピロバクターは他の菌に比べて酸化損傷が進行していること、また抗酸化剤の添加によってカンピロバクターの殺菌効果が低減することが明らかとなり、UVA 紫外線によるカンピロバクターの殺菌は酸化が大きな因子となっていることが明らかとなった。(図2,3)

図2

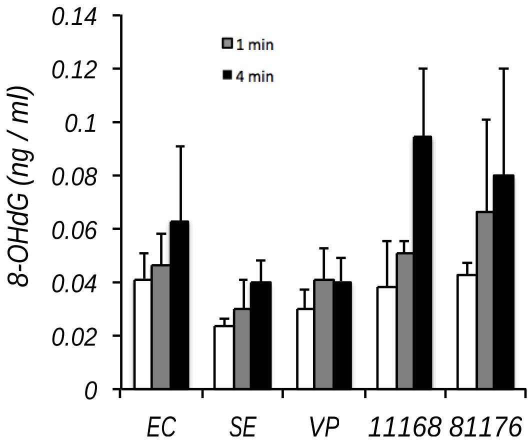
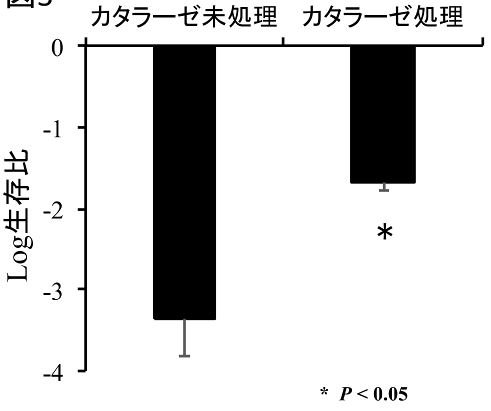
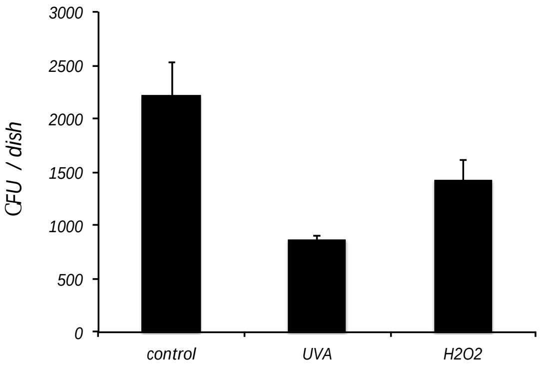


図3



(3)紫外線照射ストレスによるカンピロバクター上皮細胞侵入性を評価
上記の①②の検討結果から、UVA 紫外線ではカンピロバクターの酸化を促し、殺菌効果をしめしていることが明らかとなった。そこで菌が死滅しない程度のマイルドな UVA 紫外線照射を行い、光による酸化刺激を行った菌の病原性について評価を行った。腸管上皮細胞の Caco-2 細胞を用い、ゲンタマイシンプロテクションアッセイによって細胞内に侵入した菌数を評価した。その結果 UVA 紫外線照射によって培養細胞に侵入する菌数が低下することが明らかとなった。(図 4)

図4



(4)鶏肉を用いたカンピロバクター侵入性の評価
培養細胞を用いた③検討同様に、１０g にカットした鶏肉を使った菌の拡散・侵入試験を行った結果、肉のカット面に付着菌が多量となり、UVA 紫外線による菌の拡散・侵入を評価することができなかった。現在、カット肉からカット処理無しのトリササミ肉に変更し追試験を行っている。

(1)～(4)の検討で得られた結果からも UVA 紫外線照射は菌の殺菌についても有効な効果を示すことができ、さらにその酸化機構によってカンピロバクターの侵入、拡散を抑制し、人への感染リスクを低減させる新しいシステムとしての有効性を見出すことができた。本研究は新しい観点から食の安全安心を高める検討となり、今後食品衛生への光応用の進展が期待できる。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）
①常冨愛香里、下畑隆明、後藤茉凛、天野幸恵、中橋睦美、上番増喬、馬渡一諭、宮脇克行、榎本崇宏、芥川正武、木内陽介、高橋章「Campylobacter jejuni に対する UVA-LED の有効性」第 8 回日本カンピロバクター研究会総会、2015 年 12 月 3-4 日京都大学桂キャンパス（京都府・京都市）

６．研究組織
(1)研究代表者
原田　優美　　　（HARADA, Yumi）
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・技術補佐員
研究者番号：80568395

(2)研究分担者
①馬渡　一諭　　（MAWATARI, Kazuaki）
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・講師
研究者番号： 40352372

②下畑　隆明　　　（SHIMOHATA, Takaaki）
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号： 90609687
③中橋　睦美　　　（Nakahashi, Mutsumi）
徳島大学・生物資源産業学部（仮称）設備準
備室・助教
研究者番号： 60596211