

平成22年 5月27日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19300252

研究課題名 (和文) 大腸菌 0157 の感染力に対するマイクロ波の影響

研究課題名 (英文) Effect of microwave on pathogenicity of *Escherichia coli* 0157

研究代表者

横井川 久己男 (YOKOIGAWA KUMIO)

徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部・教授

研究者番号：60230637

研究成果の概要 (和文)：

大腸菌 0157 に対する電子レンジのマイクロ波の影響を調べた。本病原体の電子レンジ処理により、生細胞数と酸耐性は共に低下した。また、電子レンジ処理後に新たに増殖した本菌のベロ毒素生産性も低下した。種々の食品に接種した本病原体に対しても電子レンジのマイクロ波は、同様の作用を示した。電子レンジの二次的な加熱作用を排除して、37℃で本菌にマイクロ波を照射した場合にも、病原性は低下した。マイクロ波の作用は、細胞密度の増加に伴って作動するクオラムセンシング機構 (特に SdiA タンパク質) に影響を与え、病原性を低下させることが判明した。大腸菌 0157 による食中毒の防止にマイクロ波は有用であると思われた。

研究成果の概要 (英文)：

The author examined the effect of microwave irradiation on *Escherichia coli* 0157. When the cell was heated with microwave oven, the survival and acid resistance were decreased. The verocytotoxin (VT) produced by the cells cultured for 24 h after the microwave-treatment was less than that produced by untreated cells. Microwave also reduced the pathogenicity of the cells in foods. Microwave irradiation to the pathogen at 37°C with a microwave irradiator also reduced the pathogenicity. The transcription of VT gene was delayed by microwave irradiation. The VT gene expression was regulated by the quorum sensing system, and microwave irradiation was found to activate SdiA in the system. Microwave is useful for preventing food poisoning by *E. coli* 0157.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	12,100,000	3,630,000	15,730,000

研究分野：応用微生物学
科研費の分科・細目：生活科学・食生活学
キーワード：大腸菌 O157, マイクロ波

1. 研究開始当初の背景

大腸菌 O157 の抗生物質による殺菌においては、ベロ毒素遺伝子の活性化や細胞内に蓄積されたベロ毒素の放出により病態が悪化する事例が知られている。従って、感染予防が重要になる病原体である。大腸菌 O157 は数細胞でも経口感染するほど感染力が強く、この感染力は胃の酸性バリアーを容易に通過できる高い酸耐性等と密接に関連する。しかしながら、この酸耐性は本病原体の生理学的状態によって変動するため、本病原体の感染力は生理学的状態によって変動することになる。本報告者は、本病原体による食中毒防止を目的として、食品の素材から食事に至るまでの各過程で、大腸菌 O157 の挙動を明らかにすることを目的とした研究を進めてきた。電子レンジは食事の直前に食品を暖めるため等に汎用されるため、大腸菌 O157 が体内に侵入する直前の段階であり、電子レンジ処理後の生理学的性質が注目される。

電子レンジは、マイクロ波の2次的な加熱作用を利用したものであり、加熱作用に有害性はないが、マイクロ波自体の有害性については様々な報告がある。0.50 mW/cm² より強いマイクロ波は水晶体上皮細胞の増殖を抑制するという報告、携帯電話のマイクロ波が染色体の高次構造に影響するという報告等がある。また、マイクロ波がガン細胞の細胞死を誘導するため結腸直腸ガンの治療に利用できる可能性を示唆する報告もある。肉や魚のマイクロ波加熱は発ガン性のヘテロサイクリックアミンを生成するという報告もあるが、電子レンジは汎用されている現状である。一方、マイクロ波は無害とする報告もあり、800 mW/kg 以下のマイクロ波は遺伝子に

害を及ぼさないとする報告、2.4-26 mW/kg の強さの 813-836 MHz のマイクロ波は DNA 損傷やアポトーシスを誘導しないとする報告、マイクロ波の発がん性は立証できないとする報告もある。これらの違いはマイクロ波の強度や波長並びに生物の感受性の違いに起因すると考えられ、マイクロ波は生物に何らかの影響を与えると考えるのが妥当である。そのため実際に電子レンジにおいてもマイクロ波の機器からの放出は厳密に封鎖されている。

微生物に対するマイクロ波の作用では、加熱作用を除くと殺菌効果は低いと報告されているが、大腸菌 O157 に対する作用は報告されていない。電子レンジの使用状況を考えると、大腸菌 O157 がマイクロ波照射を受ける確率は高く、マイクロ波の本病原体に対する作用は解明する必要性が高いと考え、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

大腸菌 O157 の感染力と密接に関連する酸耐性は、本病原体の増殖の場となる食品の種類や増殖温度等によって変動することを私達は明らかにしてきた (1)。食品を暖めるために電子レンジを1分間程度使用する場合、本病原体は生存すると報告されている (2) が、大腸菌 O157 の生理学的状態に対する影響は調べられていない。電子レンジの作用は、マイクロ波自体の作用と2次的な加熱作用を含むが、これらの作用を別々に切り離すことが可能なマイクロ波発生装置 (現有) を使用して本病原体に対する作用を明らかにする。マイクロ波は種々の化学反応や一部の酵素反応に対して反応速度や特異性に影響することが報告されているため、大腸菌 O157 の感染力と関連する生理学的状態に対しても

影響があると推定される。本研究では、種々の食品に混入した大腸菌 O157 の生存率、増殖能力、酸耐性及びベロ毒素生産性に対するマイクロ波の影響を明らかにすることを目的とした。

(1) Yokoigawa, K., Takikawa, A., Okubo, O., and Umesako, S., Acid Tolerance and gad mRNA Levels of *Escherichia coli* O157:H7 Grown in Foods, *Int. J. Food Microbiol.*, **82**, 203-211 (2003).

(2) Apostolou, I., Papadopoulou, C., Levidiotou, S., and Ioannides, K. The effect of short-time microwave exposures on *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto chicken meat portions and whole chickens. *Int. J. Food Microbiol.*, **101**, 105-110. (2005).

3. 研究の方法

<使用菌株>

10株の遺伝的に異なる大腸菌 O157 を使用した。本報告書では、主に *Escherichia coli* O157:H7 No.98 (sakai 株) を使用して得られた結果を示す。

<試薬>

LB 培地 (1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1/1000 容) 及び LB 寒天培地 (1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%NaCl、1.5%精製寒天、1/1000 容) はナカライテスク社のものを使用した。その他の試薬は市販特級品を使用した。

<マイクロ波照射装置>

マイクロ波の照射はシャープ電子レンジ RE-T13、もしくはナショナル電子レンジ NE-EH22 を用いて行った。これらの電子レンジは一般の家庭向けに市販されているものである。温度制御が可能なマイクロ波照射装置として、グリーンモーター (東京電子 0~300W 可変) を使用した。

<増殖測定>

大腸菌 O157 の増殖は分光光度計 (島津 UV-1200) を用いて 660 nm の濁度を測定することにより調べた。

<ベロ毒素生産量の検出と定量>

ベロ毒素の検出・定量には、逆受身ラテックス凝集反応法による大腸菌ベロ毒素検出用キット『VTEC-RPLA 「生研」』を使用した。各試料の 2 倍希釈系列を作成し、ラテックス凝集反応を示す最大希釈倍率をベロ毒素量として示した。

<ベロ毒素遺伝子の mRNA 定量>

マイクロ波照射により、温度を 37°C に制御して、大腸菌 O157 を通気攪拌培養した。培養 3 時間から 24 時間までの濁度 (660 nm) を測定し、それぞれの時間ごとの試料をサンプリングし、ベロ毒素の定量に使用した。また、サンプルの一部は、ベロ毒素遺伝子の mRNA の定量に使用した。ベロ毒素遺伝子の mRNA は逆転写した後、定量 PCR を行い、その後アガロース電気泳動法により定量した。

ベロ毒素遺伝子の定量 PCR に使用したプライマーには、O-157 ベロ毒素 1 型、2 型遺伝子 PCR Typing Set (TaKaRa) を使用した。

<酸耐性測定>

pH 3 に調製した LB 培地に、大腸菌 O157 を 1×10^4 cells/ml の密度で懸濁し、37°C で 1 時間インキュベーションした。その後、生存率を算出し、酸耐性とした。

4. 研究成果

大腸菌 O157 は胃の酸性バリアーを容易に通過できる高い酸耐性をもち、また有害なベロ毒素を生産する。このような本病原体の性質は、細胞の生理学的な状態によって変動することが知られているが、食事の直前に使用される電子レンジの影響については、これまで調べられていない。電子レンジはマイクロ波の二次的な加熱作用を利用したものであり、マイクロ波は生体に対して様々な影響を及ぼすことが知られている。本研究では、本病原体に対するマイクロ波の影響を調べ、大腸菌 O157 を弱毒化することを目的とした。まず初めに、大腸菌 O157 の生細胞数変化に対するマイクロ波の影響を調べた。電子レンジを使用して、5ml の大腸菌 O157 細胞懸濁液 (3×10^5 cells/ml) の最終温度が 40°C 及び 60°C になる条件を検討し、それぞれ 170 W で 30 秒間と 700 W で 7 秒間の処理条件を設定した。この電子レンジ処理を行った後の生存率はそれぞれ約 65% と約 10% であった。大腸菌 O157 は 40°C で死滅しないと考えられるが、

このような電子レンジ処理により細胞に何らかの損傷が生じたと考えられる。

続いて、電子レンジ処理を行った細胞の酸耐性を調べた。170 W で 30 秒間した後の大腸菌 0157 のところ、意外にも酸耐性の低下は見られなかった。その原因を検討したところ、電子レンジ処理後の酸処理 (pH 3 の LB 培地中で 37°C 1 時間インキュベーション) 中に、損傷細胞の修復が起こることが判明した。しかし、700 W で 7 秒間処理した後の、大腸菌 0157 の酸耐性は明らかに低下することが判明した (図 1)。

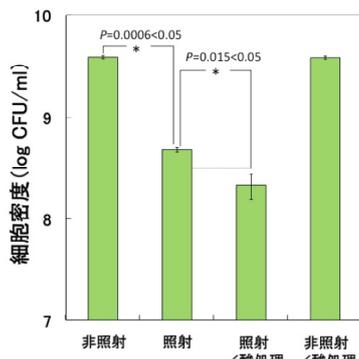


図 1 電子レンジ処理した大腸菌 0157 の細胞数と酸耐性の減少

大腸菌 0157 細胞密度 2×10^6 /ml
電子レンジ処理 700 W, 7 秒間

一方、700 W, 7 秒間の電子レンジ処理の後、新しい培地に植え継いで培養した大腸菌 0157 のペロ毒素生産性は、有意に低下することが判明した (図 2)。以上のことから電子レンジ処理は、大腸菌 0157 の生細胞数や酸耐性並びにペロ毒素生産性を低下させると考えられた。

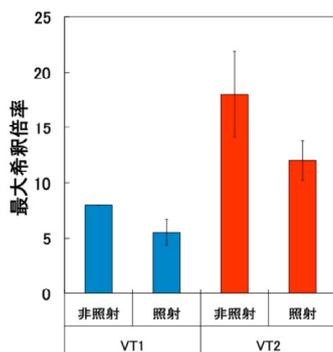


図 2 電子レンジ処理した大腸菌 0157 のペロ毒素生産量

電子レンジで 700 W, 7 秒間処理した後、その一部を新しい LB 培地に植菌して、37°C で 24 時間培養し、ペロ毒素量を調べた。

電子レンジの加熱作用による影響を排除

するため、マイクロ波の作用を二次的な加熱作用と切り離して調べることが可能な、マイクロ波照射装置 (グリーンモチーフ, 東京電子) を用いて実験を行った。図 3 は、マイクロ波照射及び非照射で培養した時の大腸菌 0157 の増殖である。

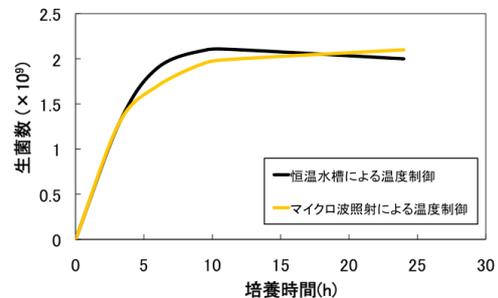


図 3 マイクロ波照射又は恒温水槽で温度を 37°C に制御して培養した時の大腸菌 0157 の増殖

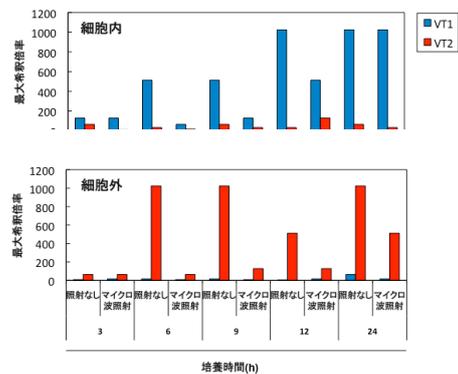


図 4 マイクロ波照射培養及び非照射培養におけるペロ毒素生産量の経時変化

マイクロ波照射により、わずかに増殖が遅れる傾向が見られたが、増殖曲線に大きな違いは見られなかった。各培養時間でペロ毒素量を測定した所、マイクロ波照射によりペロ毒素量は明らかに低下することが判明した (図 4)。以上の結果から、マイクロ波は大腸菌 0157 のペロ毒素生産性を抑制するものと考えられた。

次に、種々の食品に接種した大腸菌 0157 に対する電子レンジの影響を検討した。種々の条件で電子レンジ処理を行った後の生存率は、香辛料を含むカレーやシチューで著しく低く、デンプンを含む白がゆで高い生存率となった (図 5)。

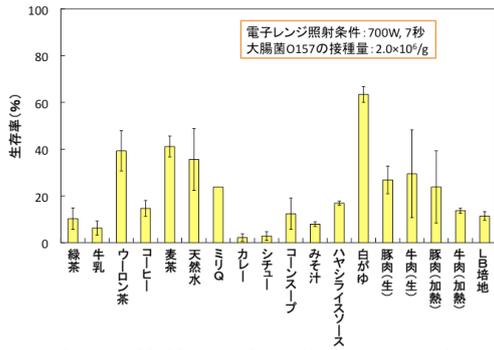


図5 食品に接種した大腸菌 O157 の電子レンジ処理後の生存率

大腸菌 O157 細胞密度 $2 \times 10^6/g$
電子レンジ 700 W, 7 秒間

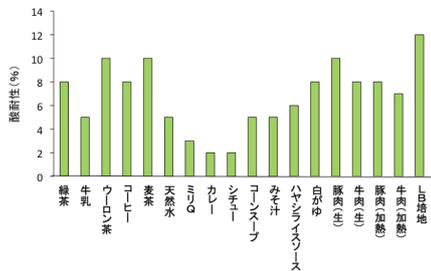


図6 食品に接種した大腸菌 O157 の酸耐性に対する電子レンジの影響

大腸菌 O157 細胞密度 $2 \times 10^6/ml$
電子レンジで 700 W, 7 秒間

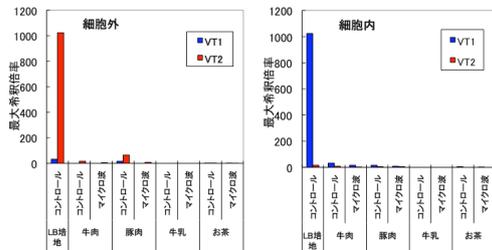


図7 電子レンジ処理後に食品で生育した大腸菌 O157 のベロ毒素量

栄養培地に接種した場合に比べて、食品中に接種した大腸菌 O157 の酸耐性は低く (図 6), マイクロ波照射の影響より食品の種類が大きく影響すると考えられた。食品に接種した大腸菌 O157 のベロ毒素生産性は、栄養培地に接種した場合に比べて、食品中では著しく低い結果が得られた (図 7)。

以上のことから、食品に混入した大腸菌 O157 のベロ毒素生産性や酸耐性は、食品の影響を受けて低下し、さらに電子レンジ処理により大きく低下すると考えられ、本病原体の感染力低下に電子レンジ処理は有効であ

ると考えられた。

次に、大腸菌 O157 に対するマイクロ波の作用機構を検討した。まず、マイクロ波が大腸菌 O157 のベロ毒素 (VT) 量を低下させたことから、VT 遺伝子 mRNA 量の変動を検討した。培養液にマイクロ波照射して培養温度を 37°C に制御して通気攪拌培養した場合と、恒温水槽で 37°C に制御して通気攪拌培養した場合では、大腸菌 O157 の増殖に大きな違いは見られなかった。しかし、VT 遺伝子の mRNA 量は、2 つの培養条件で有意な違いが見られた。恒温水槽で温度制御した場合には、定常期に近づくにつれて、細胞あたりのベロ毒素遺伝子の mRNA レベルも増大したが、マイクロ波照射した場合には、この mRNA レベルの増加が遅延する傾向が見られた。このような細胞密度の増加に伴って細胞あたりの転写活性が増大する機構は、クオラムセンシングと呼ばれ、大腸菌 O157 が自ら分泌するホルモン物質 (オートインデューサー) の濃度を感知して作動する制御機構であり、マイクロ波照射はこのクオラムセンシング機構に何らかの影響を与えると考えられた。

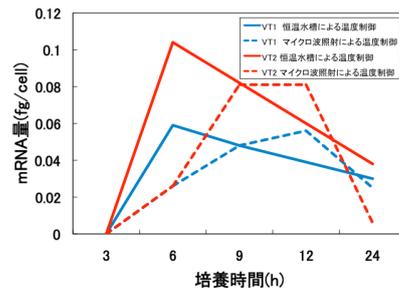


図8 マイクロ波照射培養がベロ毒素遺伝子の転写に与える影響

クオラムセンシングには、アドレナリン様物質が細胞表層のリセプター (QseC) に結合して作動する場合と、インドールやアシルホモセリンラクトン類が細胞内に直接侵入して SdiA タンパク質を活性化する場合があるが、ベロ毒素量の経時的変化と各遺伝子の転写レベルの解析から、後者の経路、特 SdiA の活性化にマイクロ波が影響を与えると推定された。マイクロ波は大腸菌 O157 の食中毒の防止に有用と考えられた。

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 5 件)

①Niro Takemasa, Shinya Ohnishi, Makiko Tsuji, Tomoko Shikata and Kumio Yokoigawa: Screening and Analysis of Spices with Ability to Suppress Verocytotoxin Production by *Escherichia coli* O157. **Journal of**

Food Science, Vol.74, pp.461-466, 2009, 査読有

②寺本 忠司, 武政 二郎, 横井川 久己男 : 食品企業における自主細菌検査の基本技術, **月刊 HACCP**, Vol.15, No.5, pp.20-31, 2009, 査読無

③ Kuniko Nagasaka, Hideyuki Nakagawa, Fumihiko Satoh, Takefumi Hosotani, Kumio Yokoigawa, Hitomi Sakai, Haruhiko Sakuraba, Toshihisa Ohshima, Mitsuko Shinohara, and Kiyoshi Ohura : A novel cytotoxic protein, Karatoxin, from the dorsal spines of the redfin velvetfish, *Hypodytes rubripinnis*. **Toxin Reviews**, Vol. 28, No. 4, pp.260-265, 査読有

④ Mizue Miki, Kumi Tanimoto, Tomoko Shikata and Kumio Yokoigawa : Production of Human Type Glycosylated Tissue Plasminogen Activator and the Role of Its Carbohydrate Moiety. **Natural. Science. Research**, Vol.22, pp.97-104, 2008, 査読有

⑤ Machiko Sato, Kyoko Kanie, Kenji Soda and Kumio Yokoigawa : Suppressive Effect of Poly-γ-Glutamate on SOS Response of *Salmonella typhimurium* Induced by Chemical Mutagens. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Vol.105, No.6, pp.690-693, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計 15 件)

①武政 二郎, 達牧子, 田中文乃, 横井川久己男 : 大腸菌 0157 の固体表面への付着性. 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010 年 3 月 28 日, 東京大学 (東京)

②田中文乃, 横井川久己男 : 大腸菌 0157 のペロ毒素生産に対するオートインデューサーの影響. 日本農芸化学会中四国支部第 26 回講演会, 2010 年 1 月, 愛媛大学 (愛媛)

③達 牧子, 武政 二郎, 横井川 久己男 : マイクロ波照射培養による大腸菌 0157 のペロ毒素生産性の変動. 日本農芸化学会中四国支部第 25 回講演会, 2009 年 10 月 31 日, 琉球大学 (沖縄)

④達 牧子, 武政 二郎, 横井川 久己男 : 食品に混入した大腸菌 0157 に対するマイクロ波の影響. 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 24 日, 神戸ポートアイランド (兵庫)

⑤達 牧子, 武政 二郎, 横井川 久己男 : マイクロ波照射による温度制御の下で生育した大腸菌 0157 の特徴. 第 30 回日本食品微生物学会学術総会, 2009 年 10 月 20 日, タワーホール船堀 (東京)

⑥横井川 久己男 : 電子レンジのマイクロ波が大腸菌 0157 に及ぼす影響. 日本家政学会第 61 回大会, 2009 年 8 月 31 日, 武庫川女子大学 (兵庫)

⑦西谷 雅人, 松本 和也, 横井川 久己男 : 大腸菌 0157 の生細胞数、酸耐性及びペロ毒

素生産性に対する電子レンジの影響. 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2009 年 3 月 28 日, 福岡国際会議場 (福岡)

⑧松本 和也, 西谷 雅人, 横井川 久己男 : 大腸菌 0157 のペロ毒素生産性と酸耐性に対するマイクロ波の影響. 日本農芸化学会中四国支部第 23 回講演会, 2009 年 1 月 24 日, 高知大学 (高知)

⑨横井川 久己男, 池田 麻乃, 大西 伸弥 : 大腸菌 0157 に対するマイクロ波の影響. 第 31 回日本分子生物学会年会 第 81 回日本生化学会大会 合同大会, 2008 年 12 月 12 日, 神戸ポートアイランド (兵庫)

⑩横井川 久己男 : 大腸菌 0157 に対する香辛料とマイクロ波の影響. 第 29 回日本食品微生物学会学術総会, 2008 年 11 月 12 日, 広島国際会議場 (広島)

⑪横井川 久己男, 池田 麻乃, 大西伸弥 : 香辛料精油成分とマイクロ波による大腸菌 0157 の弱毒化. 第 49 回日本生化学会中国・四国支部例会, 2008 年 5 月 17 日, 香川県民ホール (香川)

⑫横井川 久己男 : 大腸菌 0157 のペロ毒素生産に対する香辛料精油成分の影響. 日本農芸化学会 2009 年度大会, 2008 年 3 月, 名城大学 (愛知)

⑬大西 伸弥, 池田 麻乃, 小野田 協子, 横井川 久己男 : 香辛料精油成分とマイクロ波の組合せによる大腸菌 0157 の弱毒化. 日本農芸化学会中四国支部第 20 回講演会, 2008 年 1 月 26 日, 徳島大学 (徳島)

⑭横井川 久己男 : 香辛料による大腸菌 0157 の弱毒化. 日本農芸化学会中四国・西日本支部合同大会, 2007 年 9 月 15 日, 山口大学 (山口)

⑮横井川 久己男 : 食をとりまく微生物危害の現状. 第 28 回日本食品微生物学会学術セミナー, 2007 年 7 月 27 日, サンポートホール高松 (香川)

〔図書〕(計 2 件)

①寺本 忠司, 武政 二郎, 横井川 久己男 : 製造現場にやさしい食品細菌検査 (DVD), 鶏卵肉情報センター, 2009 年 2 月 10 日

②横井川 久己男, 寺本 忠司, 武政 二郎 : 食品細菌検査の基本技術 (冊子), 鶏卵肉情報センター, 2009 年 2 月 10 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井川 久己男 (YOKOIGAWA KUMIO)
徳島大学・大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部・教授
研究者番号 : 60230637

(2) 研究分担者

該当なし