

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11647

研究課題名(和文)カンピロバクターの鶏肉表面汚染低減を目指した、LED光殺菌システムの開発

研究課題名(英文) Development of LED sterilization system for Campylobacter jejuni-contaminated raw chicken

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(医学域)・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：カンピロバクターは日本で頻発する食中毒の原因菌であり、本菌で汚染された鶏肉の摂取によって食中毒が発症する。研究代表者は近紫外線発光ダイオード(UVA-LED)がカンピロバクター殺菌に有用であること、また塩素存在下で殺菌効果が増強する事に注目し、鶏肉表面に付着したカンピロバクターに対するUVA-LEDと塩素の併用殺菌の有効性を検討した。

カンピロバクター汚染肉を用いた実験から、UVA-LEDと塩素を併用することで、鶏肉表面においても優れた殺菌効果が得られたことから、UVA-塩素の併用処理は、カンピロバクターの食肉汚染を低減させ、食中毒の予防に効果的な殺菌システムになると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肉表面に付着したカンピロバクターに対して、塩素存在下でUVA-LED照射をおこなった結果、10分間で90%程度の菌を殺菌することに成功した。また同時に光照射後の肉質の変動について色素計を用いた解析を進めたが、UVA-LEDの処理、塩素の処理、双方の併用処理、いずれの群においても肉の色調に変化が認められなかった。ことからUVAと塩素の併用殺菌は肉質の劣化を伴わずに、有効な殺菌効果を示すことが示唆された。鶏肉を使った実験でも有効な殺菌効果が確認できたことから、本システムは現在流行しているカンピロバクター食中毒の予防に効果的な殺菌システムになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Campylobacter jejuni is a food poisoning bacterium which frequently causes food poisoning with the consumption of undercooked or raw contaminated chicken in Japan. The new applicant of disinfection that emitting ultraviolet light diodes (UVA-LED) are useful for sterilizing of Campylobacter jejuni, and the effect of sterilization by UVA is enhanced in the presence of chlorine. So that effect of sterilization in chicken meat was investigated in this study.

The combined use of UVA-LED and chlorine indicated significant disinfection on Campylobacter-contaminated chicken meat. It was suggested that it will be an effective disinfection system for the prevention of food poisoning in chicken meat production.

研究分野：食品衛生学

キーワード：UVA カンピロバクター LED 塩素

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の食中毒統計によると、2000年頃までは食中毒の事件数は腸炎ビブリオやサルモネラ属菌が上位であった。しかしながら、近年の食品保管運搬システムの目覚ましい発展により、これらの病原性細菌の食中毒事件数は激減している。細菌性食中毒の事件数が全体的に低下する中で、カンピロバクターによる食中毒の事件数は減少しておらず、日本で最も頻発する細菌性食中毒の起因菌となっている。

カンピロバクター(*Campylobacter jejuni*)は他の食中毒菌に比べ高い感染性を持つことが知られている。一般的な食中毒菌では 1×10^5 個の生菌摂取が感染成立に必要とされているが、カンピロバクターは $1 \times 10^{2-3}$ 個の菌量で感染が成立するため、少量の汚染で感染が成立してしまう。

食中毒の3原則としては『①つけない、②増やさない、③やっつける』が重要となっているが、現在食中毒が流行しているカンピロバクターは、食品の中ではほとんど増殖することが出来ない病原体であり、特に適切な殺菌・不活化処理により接触拡散を防ぐこと、つまり『③やっつける』ことで『①つけない』ようにする事が予防策として重要となる。

高い感染効率の他にも、鶏肉が高い頻度でカンピロバクターに汚染されている事も食中毒の事件数が多い要因として考えられている。鶏肉が高い頻度でカンピロバクターに汚染されている理由としては、食肉処理時の脱羽工程や、その後の浸水冷却（チラー）工程で、鶏の腸管内容物が漏出し、鶏肉表面（全体）を汚染してしまうためだと報告されている（三澤 日獣会誌 2012）。現在、チラーの工程では殺菌や増菌抑制目的で塩素処理（次亜塩素酸ナトリウムの添加）が行われているが、鶏肉由来の多量の有機物を含んだ溶液中では次亜塩素酸ナトリウムの殺菌能が急速に低下する事が報告されている（Kotula et al. Food Protect 1997）。そのため、鶏肉表面のカンピロバクター汚染を低減させるためには、塩素に加えて新しい殺菌システムの導入が必要となる。

カンピロバクターの食肉汚染は、食鳥処理場所での肉への汚染拡大が大きな要因となっているため、フードチェーンの最上流である食鳥処理で有効な殺菌システムを導入する事が、食中毒予防の最も有効な手段になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の研究グループでは、これまでに近紫外線発光ダイオード(UVA-LED)を用いた殺菌効果について研究を進める中で、(1)カンピロバクターは他の病原性細菌よりもUVAに感受性が高く高い殺菌効果が得られる事が明らかとなり、(2)さらにUVA-LEDは塩素存在下で強力な殺菌効果を示す事を明らかにしてきた。先行研究から、これらのUVA光殺菌システムを食鳥処理場に導入することで、現在世界中で流行しているカンピロバクター食中毒を減少させることが出来ると考えた。本研究では、チラー処理により塩素を纏った鶏肉に対して、UVA照射の有効性を検討することで、食鳥処理工程で効率的にカンピロバクターを死滅させることができるのか実験的な検証を行い、食鳥処理場応用に向け、『UVA-LEDと塩素の相乗的殺菌効果に注目した新しい殺菌システムの構築を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

UVA 紫外線-塩素殺菌システムを食鳥加工場に導入するためには、殺効果・殺菌作用・殺菌システムの安全性について十分に理解する必要がある。そのため本研究は、『UVA-塩素併用の殺菌効果を適切に評価すること』及び『*C. jejuni* の病原性変動を解析し、科学的根拠をもって安全性を証明すること』を目的に以下の検討を行った。

- (1) 鶏肉を用いた、塩素と UVA の相乗的殺菌効果の確認試験
- (2) 塩素と UVA 処理後の鶏肉の色調変動評価
- (3) 塩素と UVA の相乗的殺菌効果のメカニズム検証
- (4) UVA 刺激によるカンピロバクターの病原性変動評価

4. 研究成果

(1) 鶏肉を用いた、塩素と UVA の相乗的殺菌効果の確認試験

これまでの研究から UVA と次亜塩素酸ナトリウムの併用はカンピロバクターに対して、優れた殺菌効果を示すことが明らかとなってきた。鶏肉表面での殺菌効果を確認するため、本研究では市販鶏肉(トリササミ)を用い、カンピロバクターを塗布したモデル汚染肉を作成し、殺菌効果を実験室レベルで評価した。実験の結果、鶏肉表面においても UVA 単独処理、次亜塩素酸ナトリウム単独処理よりも、双方を併用した時に強力な(相乗的)殺菌効果が得られることが明らかとなった。

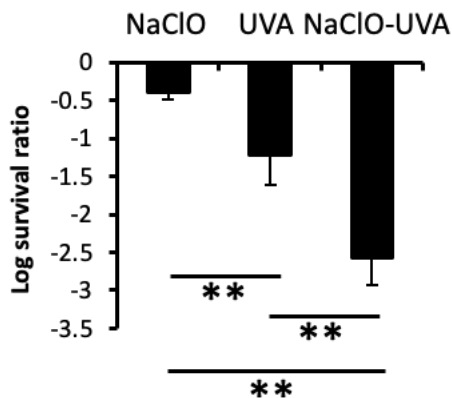


図 1. 塩素と UVA 併用による、カンピロバクターの殺菌効果

次亜塩素酸(NaClO)と UVA の単独処理、及び併用処理(NaClO-UVA)の殺菌効果を未処理群の生菌数と比較し、対数で表記した。

*p < 0.05, **p < 0.01

(2) 塩素と UVA 処理後の鶏肉の色調変動評価

UVA 紫外線照射は、酸化ストレスを介した殺菌能を発揮することが明らかとなっている。殺菌過程の UVA 紫外線照射は、鶏肉に対しても酸化を引き起こし、肉質を低下させてしまう恐れがある。そのため UVA 紫外線照射時の鶏肉の色彩(色彩色素計)について解析を行い、UVA 紫外線照射による鶏肉の劣化程度を評価し、肉質への影響を評価した。(1)殺菌実験で使用した市販鶏肉(トリササミ)を用い、未処理の鶏肉をネガティブコントロール、加熱処理した鶏肉をポジティブコントロールとして色調変化を解析した。その結果加熱処理では肉の色調が大きく変化した一方、UVA 処理、塩素処理、併用処理では色調に変化は認められず、色調で認識できるレベルで、肉質に大きな変化は生じないことが明らかとなった。

	Control	NaClO	UVA	NaClO UVA	Heated
L*	52.8	54.8	52.2	53.0	82.7 ^b
(SD)	(±2.58)	(±2.18)	(±1.26)	(±3.27)	(±1.33)
a*	-0.548	-1.11	-0.566	-0.863	1.06 ^a
(SD)	(±0.678)	(±0.653)	(±0.919)	(±0.915)	(±0.267)
b*	10.2	8.11	8.22	7.24	15.0
(SD)	(±3.21)	(±3.48)	(±2.31)	(±1.88)	(±0.560)

L*: lightness, a*: redness, b*: yellowness. ^{a,b}: ^a: p<0.05, ^b: p<0.01 vs Control

表 1. 塩素と UVA 併用による、肉の色調変化

L*:明度, a*:色相と彩度を示す色度(赤-緑方向), b*:色相と彩度を示す色度(黄-青方向)

*p < 0.05, **p < 0.01

(3) 塩素と UVA の相乗的殺菌効果のメカニズム検証

96well スケールの *in vitro* の実験モデルにより殺菌効果と殺菌機序について解析を行った。これまでの検討では UVA と次亜塩素酸ナトリウムの併用は、相乗的な殺菌効果を示すことが明らかとなっているが、相乗的に殺菌効果が得られるメカニズムについては明らかにできていない。本研究では UVA と塩素を異なるタイミングで処理し、殺菌効果・DNA の酸化(8OHdG)・遊離塩素濃度を測定した。しかしながら、UVA 処理、塩素処理、双方の併用処理後のカンピロバクターを回収し、DNA の酸化について解析を行ったが、カンピロバクターでは DNA の酸化が生じるよりも先に、菌が死滅してしまうため、DNA の酸化を評価系として殺菌メカニズムを解析することができなかった。

(4) UVA 刺激によるカンピロバクターの病原性変動評価

本項目では殺菌処理で残存したカンピロバクターを摂取したケースを想定し、殺菌処理刺激によるカンピロバクターの感染性の違いを評価する。カンピロバクターを未処理群、UVA 単独処理群、次亜塩素酸ナトリウム処理群に分け、カンピロバクターの病原性と関連が深いとされる、菌の運動性、感染上皮細胞からの炎症性サイトカイン(IL-8)の分泌について解析を行い、ヒトの腸管感染性に対する安全性について調べた。

殺菌処理群ではコントロール(未処理)と生菌数を一致させた条件で、ソフトアガーに塗布し運動評価を行い、同じく生菌数を一致させた条件で、培養細胞に作用させサイトカインの分泌を評価した。その検討の結果、UVA 照射や塩素処理では菌の病原性が低下する結果は得られなかったが、残像した菌が強い病原性を示すこともなく、殺菌処理が感染性を高める可能性は低いと考えられた。

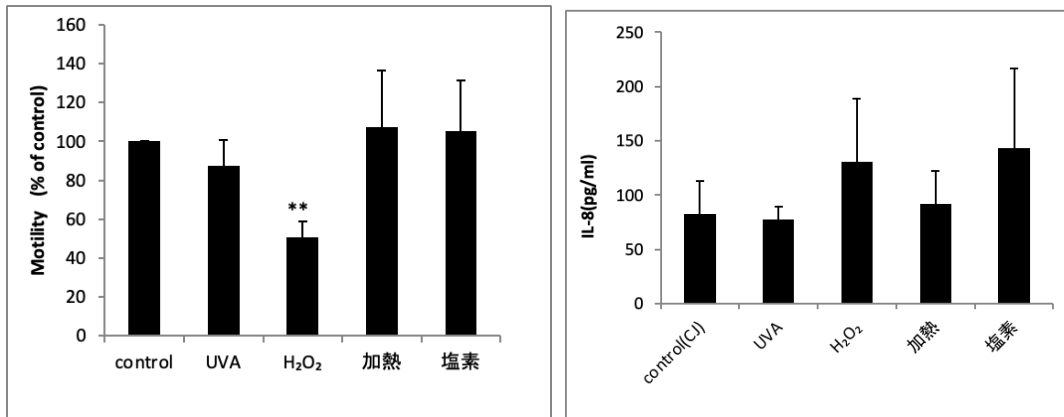


図2. 塩素とUVA処理による、カンピロバクターの病原性変化

(A) 塩素、UVA、加熱、H₂O₂処理後のカンピロバクターを回収し、ソフトアガー寒天培地上で培養。コロニーサイズの変化から菌の運動性変動を評価した。

(B) 塩素、UVA、加熱、H₂O₂刺激後のカンピロバクターを回収し、Caco-2細胞に感染させ、炎症誘導に関わるIL-8の分泌量を測定することで、病原性の変化を調べた。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

以上の検討より、UVA照射は塩素存在下で鶏肉表面においても強力な殺菌効果を示すことが明らかとなった。また肉質についても色調の変化も生じないことから、品質を保持したまま殺菌を行うことが可能であると考えられた。UVA刺激は細菌の病原性を上昇させることもなかったため、安全性が高い殺菌システムとして、食鳥処理への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukushima Shiho, Shimohata Takaaki, Inoue Yuri, Kido Junko, Uebanso Takashi, Mawatari Kazuaki, Takahashi Akira	4. 巻 12
2. 論文標題 Recruitment of LC3 by Campylobacter jejuni to Bacterial Invasion Site on Host Cells via the Rac1-Mediated Signaling Pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2022.829682	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0件

〔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
研究分担者	栗飯原 睦美 (AIHARA Mutsumi) (60596211)	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）・講師 (16101)	
研究分担者	下畑 隆明 (SHIMOHATA Takaaki) (90609687)	福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授 (23401)	
研究分担者	馬渡 一諭 (MAWATARI Kazuaki) (40352372)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・講師 (16101)	
研究分担者	高橋 章 (TAKAHASHI Akira) (90304047)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・教授 (16101)	

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
---------	---------