

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00894

研究課題名(和文) MY現象を応用した新しい食中毒菌検査法の開発

研究課題名(英文) Development of new food poisoning bacteria detection method applying MY phenomenon

研究代表者

翠川 裕 (Midorikawa, Yutaka)

鈴鹿医療科学大学・保健衛生学部・准教授

研究者番号：10209819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：DHL培地などで同菌を培養した場合、単独ではコロニーの中央が黒色を呈する。全面塗抹した場合では黒色を呈さなくなるが輪切りレモンを置いて培養した際には、レモン周囲に硫化水素産生の活性を示すミドリリングと命名した黒環を認め、MY現象1と命名した。さらにサルモネラを接種し、その上を嫌気状態にすることで硫化水素産生の可視化が顕著になることを発見した。この際、中心に抗菌物質を添加すると、その部分にハローが生ずることで新たな抗菌検査法を発案した。サルモネラの硫化水素産生は、菌の増殖の活発化を示す目安であることが証明された。さらにMY現象1は、大腸菌・大腸起因群の共存によってでも促進されることが判明した。

研究成果の概要(英文)：When the Salmonella is cultured in DHL medium, the center of the colony alone shows black color. When it was smeared on the whole surface, it did not show black color, but when it was cultured with sliced lemon, a black ring, named Midoring showing hydrogen sulfide production activity around the lemon, was recognized. This was named MY phenomenon 1. We further discovered that when inoculate Salmonella by making it anaerobic, the visualization of hydrogen sulfide production becomes prominent. In this case, when adding antimicrobial substance to the center, a halo in that part appeared. A new antimicrobial test method was inovated. Salmonella hydrogen sulfide production was proved to be an indication of activation of bacterial growth. Furthermore, MY phenomenon 1 was found to be promoted also by the co-existence of Escherichia coli.

研究分野：公衆衛生、食品衛生

キーワード：サルモネラ 硫化水素産生可視化 MY現象 ミドリリング 新抗菌検査法 ハロー 銅 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

サルモネラは平成 27 年度の細菌性食中毒の患者発生数が、カンピロバクターに次いで高く、大量調理従事者の検便必須項目である。本研究代表者は、サルモネラの硫化水素産生の可視化促進 (MY 現象) を発見し、それを利用した数々の菌検査法を提唱してきた。この間「柑橘類抽出成分によるサルモネラ簡易検出用デバイスの開発と実用化 研究種目 萌芽研究 研究課題 / 領域番号 18650222 2006-2008」および「柑橘抽出成分を用いた食中毒菌サルモネラ等の新検査法の機構解明と普及 研究種目 基盤研究(C) 研究課題/領域番号 22500783 2210-2213」上記二つの科学研究費の補助を得て、研究を一貫して進展させてきた。

我々は、MY 現象にはサルモネラの硫化水素産生の活発化を示す MY 現象 1 (図 1) と嫌気条件下で可視化が鮮明となる MY 現象 2 (図 2) とに大別できることを明らかにしている。

上記の背景のもと、「MY 現象を応用した新しい食中毒菌検査法の開発」と題する本研究を実施した。

2. 研究の目的

A) 柑橘成分以外のサルモネラの H₂S 産生を促進する物質の探索とその機構を解明する。

柑橘成分以外にも、菌の H₂S 産生が増加する物質を探索し、そのメカニズムをそれぞれ明らかにする。また逆に、サルモネラの H₂S 産生を阻害する NaCl 以外の物質の探索も行いその機構を解明する。

B) 新検査法の確立

柑橘成分による MY 現象ミドリリング形成などのサルモネラの H₂S 産生促進効果と NaCl などによる H₂S 産生阻害効果をもたらすメカニズムを応用して、新しい菌検出

法および抗菌性検査の体系を公定法に準ずる方法 (本法) として確立する。

C) 本現象の応用

ラオス等開発途上国におけるサルモネラの保菌率が食品衛生の改善と共に低下する様を本法で調査し、実用化にむけて本法の有効性を確認する。また日本と世界におけるサルモネラの保菌率の推移を明らかにする。

3. 研究の方法

本課題で判明した代表的な 3 点を以下紹介する。

本研究に係る抗菌性検査方法を用いて、金属イオンの抗菌性を調べた (図 3)。菌の一例としてサルモネラ菌を、金属イオンの一例として、塩化第二銅を用いた。具体的には、サルモネラ菌を含む病原性腸内細菌類を、硫黄源と鉄源を含む DHL 寒天培地に接種し、該 DHL 寒天培地上に、塩化第二銅溶液を滴下し OHP フィルムで寒天を覆い嫌気条件下、37 °C で 24 時間培養した。培養後、直下の寒天培地上に顕在する現象を目視にて観察した。

縦 8 cm、横 2.5 cm のシャーレに DHL 寒天培地を作製し、該 DHL 寒天培地に非チフスサルモネラ属菌を密集させて全面に接種 (塗抹) し、1 辺 20 mm の正方形各格子に大腸菌群を n = 3 で 1 ~ 11 個点状にそれぞれ接種し、37 °C で 24 時間後に、目視にて観察した。

新サルモネラ検査法を用いてラオスにおけるサルモネラ罹患の経年変化を調べ、および環境からの分離を試みた。

4. 研究成果

OHP フィルムを用いて形成された嫌

気性の直下の培地にのみ、硫化鉄の黒色変化すなわち MY 現象 2 が出現した。一方、塩化第二銅が滴下された培地直下部分では、黒色変化の現象が認められなかった。サルモネラ菌が嫌気条件下で硫化水素を産生し、硫化水素と D H L 寒天培地に含有される鉄源とが反応して硫化鉄の黒色変化が認められたが、銅イオン存在では抗菌性のため黒色変化が認められなかったと考えられる。以上の結果から、銅イオンには抗菌性があることが判明した。従来法との比較でサルモネラを用いた新しい方法での抗菌性評価方法のほうが感度はより高いと結論付けることができた (Fig.4) (**雑誌論文 1,2,3,7,8**)

大腸菌群を接種した箇所のみ黒色変化を認めた。サルモネラ属菌が培養された D H L 寒天培地上に接種された大腸菌群の周囲に、硫化鉄(FeS)の黒色反応円が出現する現象が認められた(**図 5**)。その一方で、大腸菌群を接種しなかった場合では、この現象が認められなかった。したがって、大腸菌群の周囲では、サルモネラ属菌が嫌気条件下で硫化水素を産生し、増殖していることを目視にて確認できた。これにより、大腸菌群によってサルモネラ属菌の硫化水素産生能が促進される MY 現象 1 が生ずることが解明された(**知的財産権 特許出願 1**)

以上、大腸菌とサルモネラの共生関係を In vitro にて証明した。

ラオスによるサルモネラ汚染の著しさを、ヒトのり患率と環境中からの分離で証明した(**図 6 業績 4, 6**)。分離したてのサルモネラは、大腸菌と共存している場合が多く、MY 現象 1 の状態を確認した。

まとめ

A: 柑橘成分以外に、大腸菌・大腸菌群の産生する有機酸が、サルモネラの MY 現象 1 を引き起こす物質であることを解明

B: MY 現象 2 を利用することにより、新しい抗菌性検査法を確立。

C: 本検査法でラオスのサルモネラ汚染の著しさを示し、大腸菌・大腸菌群の共存で、検出されたてのサルモネラは MY 現象 1 の典型であることを証明。

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 8 件)

1 サルモネラ菌の硫化水素産生能を用いた銅の抗菌性評価

翠川裕、仲井正昭、翠川薫、新家光雄
日本金属学会誌 巻 : 80 165-170
2016

2 A Novel Method of Antibacterial Evaluation Based on the Inhibition of Hydrogen Sulfide Producing Activities of Salmonella-Using Copper as a Model Antibacterial Agent-
Midorikawa Y, Nakai M, Midorikawa K, Niinomi M, Material transaction 巻 : 57 995-1000 2016

3 食中毒菌サルモネラを用いた銅の抗菌性評価

翠川裕、仲井正昭、新家光雄 日本銅学会誌「銅と銅合金」: 55 : 86-88 2016

4 Risk of salmonella in a suburban region of Vientiane, Lao People ' s democratic Republic

Midorikawa Y, Nakamura S, Phetsouvanh R, Vongsouvaht M, Midorikawa K.

Southeast Asian Journal of Tropical
Medicine and Public Health.;47:
970-975, 2016

5 APOE Genotype in the Ethnic Majority
and Minority Groups of Laos and the
Implications for Non-Communicable
Diseases

Kaoru Midorikawa, Douangdao Soukaloun,
Kongsap Akkhavong, Bouavanh
Southivong, Oudayvone Rattanavong,
Vikham Sengkhaynavong, Amphay
Pyaluanglath, Saymongkhonh
Sayasithsena, Satoshi Nakamura,
Yutaka Midorikawa, Mariko Murata, Plos
One.11 Doi10.1372/ Journal pone
0155072 2016

6 開発途上国ラオス首都ビエンチャン・
タートルアン湿原におけるサルモネラの
検出, **翠川裕** 日本衛生学雑誌 72,
95-100, 2017

7 ラミネートろ紙を用いた銅の抗菌性評
価方法
翠川裕、仲井正昭、新家光雄、 日本銅
学会誌「銅と銅合金」56 巻 318-322、
2017

8 サルモネラ硫化水素産生による銀お
よび銅の抗菌性比較評価 **翠川裕**、仲井
正昭、新家光雄
日本銅学会誌「銅と銅合金」56 巻
318-322、2017

〔学会発表〕(計 6 件)

1 食中毒菌サルモネラを用いた銅の抗菌
性評価方法, **翠川裕** 仲井正昭 新家光
雄 日本銅学会 大阪
2015-11-02 2015-11-02

2 サルモネラ菌の硫化水素産性能を用い
た銅の抗菌性評価、**翠川裕** 仲井正昭、
新家光雄 日本細菌学会 大阪
2516-3-23 3-25

3 開発途上国ラオス首都ビエンチャン・
タートルアン湿原におけるサルモネラ菌
の検出 **翠川裕**、日本衛生学会 旭川 自
由集会シンポジウム 「開発途上国にお
ける感染症研究支援」 2016 - 5-11
5.13

4 ラミネートろ紙を用いた銅の抗菌性評
価方法
翠川裕、仲井正昭、新家光雄 日本銅学
会 東京 2016-10 29 10 30

5 サルモネラ硫化水素産生で銅と銀の
抗菌性を比較 **翠川裕**、仲井正昭、新家
光雄 日本銅学会、富山
2017-10 18 10 19

6 サルモネラの保菌と地球温暖化、**翠川
裕** 日本衛生学会 東京、自由集会シン
ポジウム「地球温暖化と感染症」
2018-3-22 3-24

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

1 名称:名称:菌の検査方法

発明者:**翠川裕**、田中 淳貴

権利者:**翠川裕**、

種類:特許

番号:特開 2017-99305(P2017-99305A)

出願年月日:平成 27 年 11 月 30 日
(2015.11.30)

国内外の別: 国内

2 名称: 銀耐性菌又は銀感受性菌の判定方法、及び銀耐性菌又は銀感受性菌の判定キット

発明者: **翠川裕**、月井真郁賀、仲井正昭
 権利者: **翠川裕**、近畿大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-218109

出願年月日: 平成 29 年 11 月 13 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

翠川 裕 (MIDORUKAWA YUTAKA)
 鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部
 准教授 研究者番号: 10209819

(2) 研究分担者

中村 哲 (NAKAMURA SATOSHI)
 広島文化学園大学, 看護学部, 教授
 研究者番号: 40207874

翠川 薫 (MIDORIKAWA KAORU) 三重大学, 医学系研究科, リサーチアソシエイト 20393366

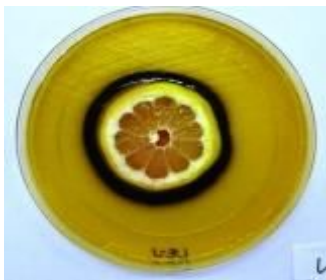


図 MY 現象 1 ミドリリング形成

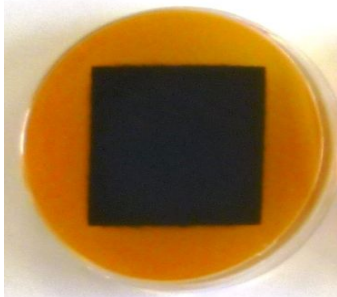


図 2 MY 現象 2 嫌気性により黒色可視化

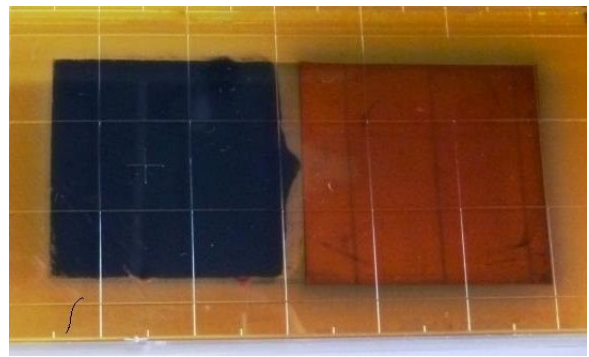


図 3 左: アルミニウムには抗菌性がないためにサルモネラの黒色可視化が、右: 銅には抗菌性があるために可視化が起こらない。



Fig.4 Comparison of sensitivity between the new method and the Kirby-Bauer method under CuCl_2 treatment Upper: New method using the DHL medium Lower: Kirby-Bauer method using the Mueller Hinton medium

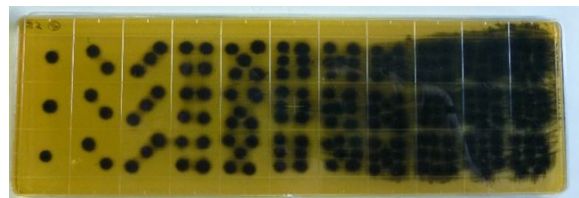


図 5 サルモネラを全面培養した上に大腸菌を接種し 24 時間後 大腸菌が混ざった周囲が黒色化する。

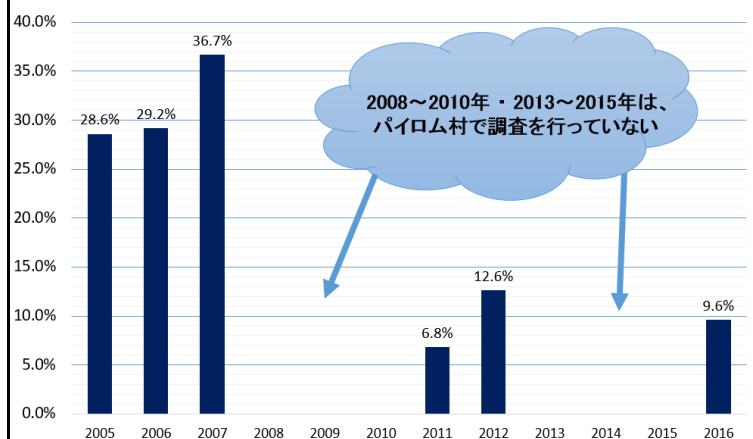


図 6 ラオス農村におけるサルモネラ保菌率 経年変化