

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18762

研究課題名(和文)低温における損傷菌の回復及びその検出法の開発

研究課題名(英文)Recovery and detection of sub-lethal injured bacteria at low temperature

研究代表者

森松 和也(Morimatsu, Kazuya)

愛媛大学・農学研究科・助教

研究者番号：70746742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：種々の菌における高圧損傷菌の動態について調べた。その結果、高圧損傷した大腸菌及びサルモネラ属菌の標準寒天培地による検出の際には培養温度を25℃近傍にすることで検出菌数が最大となる一方、培養温度が上昇すると検出菌数が減少することを明らかにした。次に、高圧損傷した大腸菌及びサルモネラ属菌、リステリア菌について、液体培地中では増殖温度以下であっても損傷回復が起きるが、温度の上昇により損傷回復がより活発になることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate behavior of high hydrostatic pressure (HHP)-injured bacteria during storage on standard method agar (SMA) or in Trypticase soy broth (TSB). For *Escherichia coli* and *Salmonella enteridis*, maximum numbers of these HHP-injured bacteria could be detected by cultivating on SMA at 25 degrees C of storage temperature respectively. While, detection numbers of these HHP-injured bacteria could be decreased according to elevating storage temperature. For *E. coli* and *S. enteritidis* and *Listeria monocytogenes*, recovery of these HHP-injured bacteria could be occurred in TSB at lower temperature than these bacterial growth temperatures respectively. And, elevating temperature could activate the recovery of these HHP-injured bacteria.

研究分野：微生物制御

キーワード：損傷菌 大腸菌 サルモネラ属菌 リステリア菌 高圧処理

1. 研究開始当初の背景

食品中の細菌数を制御することが極めて重要であることから、食品製造工程では食品の殺菌が一般的に行われている。このとき、目的に適した平板培地による培養を行うことで一般生菌や大腸菌、真菌等の菌数測定が一般的に行われている。しかしながら、殺菌処理等のストレスに曝された際に一部の菌体は死には至らないが生理的機能に障害を持つ損傷菌となり、菌数測定では検出することができないことが近年明らかとなった。損傷菌は条件次第で損傷を回復し、健常菌同様に増殖することが知られている。また、食中毒事故の原因として食中毒菌の損傷菌化が少なからず関わっていることが指摘され、損傷菌を考慮した食品の衛生管理の確立が求められている。このような背景の中、損傷菌の動態に関する研究が活発に行われている。しかしながら、その多くが熱損傷菌に関する研究が主であり、非熱的殺菌技術として普及しつつある高圧処理の際に発生する高圧損傷菌の性状についてはほとんど明らかになっていないのが現状である。

2. 研究の目的

食品衛生学において高圧損傷菌の動態に非常に大きな関心が寄せられているものの、その危険性の実態に関しては未だ掴めていないのが現状である。これに対して、本申請研究では損傷菌を考慮した食品製造における微生物管理の高度化を目指し、種々の菌における高圧損傷菌の動態について調べた。

3. 研究の方法

(1) 高圧損傷大腸菌の検出における培養温度の影響

PBS に懸濁した大腸菌 (*Escherichia coli* ATCC25922) へ高圧処理 (500 MPa) を施し、標準寒天培地へ塗布後、各種温度 (20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、37 °C、40 °C) で培養し、検出菌数をそれぞれ算出した。また、検出時間の短縮を行うため、15 °C または 25 °C における 3~6 時間の一次培養後、37 °C での二次培養を行う二段階培養を行った。

(2) 大腸菌の高圧損傷・熱損傷とその回復

PBS に懸濁した大腸菌へ高圧処理 (500 MPa) または熱処理 (55 °C) を施し、高圧損傷大腸菌または熱損傷大腸菌を調製した。これらの損傷菌液を 10 倍量の TSB にそれぞれ接種し、5 °C または 25 °C でそれぞれ保存し、高圧損傷大腸菌及び熱損傷大腸菌の損傷回復動態の違いを調べた。このとき、標準寒天培地に菌液を塗布し、37°C で培養することで菌数の動態を追跡した。

また、高圧損傷大腸菌及び熱損傷大腸菌の検出における培養温度の影響を調べるため、各損傷菌を標準寒天培地へ塗布し、各種温度 (20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、37 °C、40 °C) で培養後、検出菌数をそれぞれ算出した。

(3) 高圧損傷サルモネラ属菌の損傷回復

PBS に懸濁したサルモネラ属菌 (*Salmonella enteritidis* IF03313) へ高圧処理 (600 MPa) を施し、高圧損傷菌の調製を行った。高圧損傷菌液を 10 倍量の TSB に接種し、5 °C または 15 °C で保存し、液体培地中の損傷回復を調べた。このとき、標準寒天培地に菌液を塗布し、37°C で培養することで菌数の動態を追跡した。

また、高圧損傷サルモネラ属菌の検出における培養温度の影響を調べるため、高圧損傷菌を標準寒天培地へ塗布し、各種温度 (20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、37 °C、40 °C) で培養後、検出菌数をそれぞれ算出した。

(4) 高圧損傷リステリア菌の損傷回復

PBS に懸濁したリステリア菌 (*Listeria monocytogenes* ATCC19117) へ高圧処理 (500 MPa) を施し、高圧損傷菌の調製を行った。高圧損傷菌液を 10 倍量の PBS または TSB に接種後に 5 °C で保存し、栄養条件の違いが高圧損傷菌の液体培地中の動態に及ぼす影響を調べた。このとき、標準寒天培地に菌液を塗布し、37°C で培養することで菌数の動態を追跡した。

4. 研究成果

(1) 高圧損傷大腸菌の検出における培養温度の影響

高圧損傷大腸菌を標準寒天培地上で培養し、コロニー形成を目視で確認可能となるまでに要した時間は、20 °C で 3 日、25 °C で 2 日、30 °C~40 °C では 1 日であった。また、培養時間を 6 日間までに延長することで、全ての温度条件で検出菌数の増加が見られた。このとき、高圧損傷大腸菌の最終的な検出菌数は温度の低下と共に増加し、25 °C において検出菌数が最大となった。一般的な菌数検査では 35 °C~37 °C の培養が行われるが、25 °C における検出菌数はこれらの温度における検出菌数の百倍~千倍となった。一方、健常な大腸菌では培養温度による検出菌数の違いはなかった。したがって、高圧損傷菌の検出には 25°C 近傍が適しているものと考えられる。しかしながら、25 °C では検出に要する時間が従来と比べ長くなるため、二段階培養による検出期間の短縮を試みた。

高圧損傷大腸菌の二段階培養では、培養期間が 1 日であってもコロニーの目視が可能となり、37 °C の検出菌数を上回る検出が可能であった。一方、二段階培養における検出菌数は、一次培養温度・時間の増加と共に大きくなった。このとき、一次培養で 25 °C・6 時間、二次培養で 37 °C・18 時間を行った処理区では、25 °C・2 日間と同等の検出菌数を示した。そのため、高圧損傷菌の二段階培養は検出期間の短縮に有効であるものと考えられる。

(2) 大腸菌の高圧損傷・熱損傷とその回復
各損傷菌を TSB 中で保存した場合、培養温度に関わらず、熱損傷大腸菌では菌数の減少が、高圧損傷大腸菌では菌数の増加が保存初期にそれぞれ示された。一方、健全な大腸菌ではこれらのような動態は示されなかった。そのため、損傷菌の動態は健全菌とは異なること、また、損傷要因により損傷菌の動態が大きく異なることが明らかとなった。

これまでと同様に、高圧損傷大腸菌の最終的な検出菌数は温度の低下と共に増加し、25℃において検出菌数が最大となった。一方、熱損傷菌では真逆の傾向を示し、最終的な検出菌数は温度の上昇と共に増加し、37℃において検出菌数が最大となった。以上のことから、損傷菌検出について損傷要因に応じて条件の検討を行う必要があるものと考えられる。

(3) 高圧損傷サルモネラ属菌の損傷回復

高圧損傷サルモネラ属菌を TSB へ接種後に 15℃及び 5℃で保存した場合、保存開始直後から標準寒天培地での検出菌数が保存時間の経過と共に約千倍に増加した。健全なサルモネラ属菌は 5℃以下での増殖ができなかったことから、菌数増加は損傷回復に起因したものと考えられ、サルモネラ属菌の損傷回復は増殖可能温度以下でも進行していくものと考えられた。一方、15℃では 5℃に比べてより短時間で標準寒天培地での検出菌数が増加したことから、損傷回復は温度による影響を大きく受けるものと考えられた。

高圧損傷サルモネラ属菌を標準寒天培地へ接種した場合、コロニー形成の目視に要する時間は高圧損傷大腸菌と同様であった。また、最終的な検出菌数は温度の低下と共に増加し、25℃において検出菌数が最大となった。35℃～37℃の検出菌数に比べ、25℃での検出菌数は 10 倍程度であった。そのため、高圧損傷サルモネラ属菌では、高圧損傷大腸菌と比べ、培養温度が検出菌数に及ぼす影響は小さいものと考えられる。

(4) 高圧損傷リステリア菌の損傷回復

高圧損傷リステリア菌を 5℃で保存した場合、懸濁溶液に関わらず、保存初期に急激な菌数の増加が示された。健全なリステリア菌では 5℃における各懸濁液中での増殖が示されなかったため、これらの増加は高圧損傷リステリア菌の損傷回復によるものと考えられる。TSB 懸濁における菌数は保存開始直後より 10^6 倍増加した一方、PBS 懸濁における菌数は保存開始直後より 10^3 倍の増加となった。懸濁液により損傷回復による菌数増加幅が大きく異なるため、貧栄養条件では高圧損傷リステリア菌の損傷回復は大きく阻害されるものと考えられる。また、損傷回復後のリステリア菌の動態について、TSB 懸濁では菌数の維持が示される一方で、PBS 懸濁では菌数の減少が示された。したがって、栄養条件

は損傷回復後のリステリア菌の動態にも大きく影響を及ぼすことが示された。

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 3 件)

- ① 山本和貴, 木村啓太郎, 稲岡隆史, 森松和也, 中浦嘉子. 細菌の高圧不活性化における損傷・回復. 日本食品科学工学会誌, 65, 154-162 (2018).
- ② Takashi Inaoka, Keitarou Kimura, Kazuya Morimatsu & Kazutaka Yamamoto. Characterization of high hydrostatic pressure injured *Bacillus subtilis* cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81, 1235-1240(2017).
- ③ Keitarou Kimura, Kazuya Morimatsu, Takashi Inaoka, Kazutaka YAMAMOTO. Injury and recovery of *Escherichia coli* ATCC25922 cells treated by high hydrostatic pressure at 400-600 MPa. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 123, 698-706(2017).

[学会発表] (計 9 件)

- ① 稲岡隆史, Nguyen Thi Minh Huyen, 中井雄治, 森松和也, 木村啓太郎, 中浦嘉子, 山本和貴. 高圧損傷した枯草菌栄養細胞における遺伝子発現解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年 12 月 6 日～9 日, 神戸ポートランド (兵庫県神戸市)
- ② 森松和也. 高圧損傷菌の損傷回復とコロニー形成. 【第 2 回】損傷菌の評価・制御への新しいアプローチ (招待講演), 2017 年 11 月 22 日, フォーラムミカサ エコ (東京都千代田区)
- ③ 森松和也, 中浦嘉子, 山本和貴, 稲岡隆史, 木村啓太郎. 高圧処理により損傷したサルモネラ属菌の平板培養における培養温度の影響, 農業食料工学会 2017 年年度大会, 2017 年 9 月 7 日～9 日, 東京農業大学 (東京都世田谷区)
- ④ 稲岡隆史, Nguyen Thi Minh Huyen, 中井雄治, 森松和也, 木村啓太郎, 中浦嘉子, 山本和貴. 高圧損傷枯草菌の回復過程における遺伝子発現プロファイル. 環境微生物系学会合同大会 2017, 2017 年 8 月 29 日～31 日, 東北大学 (宮城県仙台市)
- ⑤ 中浦嘉子, SOK Claudia, 大脇静香, 森松和也, 稲岡隆史, 木村啓太郎, 山本和貴. 高圧損傷大腸菌の検出に及ぼす培養温度及び冷蔵保存の影響, 損傷菌セミナー 2017, 2017 年 6 月 13 日, 豊洲シビックセンター (東京都江東区)
- ⑥ 中浦嘉子, 森松和也, 廣瀬美佳, 稲岡隆史, 木村啓太郎, 山本和貴. 高圧処理に

よる損傷大腸菌及び損傷リステリアの回復挙動, 損傷菌セミナー2017, 2017年6月13日, 豊洲シビックセンター(東京都江東区)

- ⑦ 森松和也, 中浦嘉子, 山本和貴, 稲岡隆史, 木村啓太郎. サルモネラ属菌の低温での高圧損傷・回復, 損傷菌セミナー2017, 2017年6月13日, 豊洲シビックセンター(東京都江東区)
- ⑧ Kazutaka YAMAMOTO, Yoshiko NAKAURA, Kazuya MORIMATSU, Takashi INAOKA, and Keitarou KIMURA. Injury and Recovery of *Listeria monocytogenes* treated with High Hydrostatic Pressure. 9th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology, 2016年7月25日~29日, University of Toronto (Toronto, Canada)
- ⑨ 森松和也, 中浦嘉子, 山本和貴, 稲岡隆史, 木村啓太郎. サルモネラ属菌の低温での高圧損傷・回復, 農業食料工学会2016年年次大会, 2016年5月27日~30日, 京都大学(京都府京都市)

〔図書〕(計 0件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

なし

○取得状況(計 0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

損傷菌とその回復に関する紹介

<http://web.agr.ehime-u.ac.jp/~ph/itemlist1.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森松 和也 (MORIMATSU, Kazuya)

愛媛大学大学院 農学研究科・助教

研究者番号: 70746742

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

山本 和貴 (YAMAMOTO, Kazutaka)

農研機構 食品研究部門