

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05873

研究課題名（和文）損傷大腸菌の検出に及ぼす培地内活性酸素の影響評価と有効な活性酸素消去剤の探索

研究課題名（英文）Evaluation of the effect of reactive oxygen species in the medium on the growth of damaged Escherichia coli and search for an effective reactive oxygen scavenger

研究代表者

亀谷 宏美（KAMEYA, HIROMI）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・本部・上級研究員

研究者番号：20585955

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：培地に活性酸素種が蓄積すると、微生物の増殖が抑制され、食品中の有害な細菌の検出が妨げられる可能性がある。本研究では、電子スピン共鳴法で培地内活性酸素が損傷大腸菌の検出に及ぼす影響を評価した。その結果、培地中に蓄積されたヒドロキシラジカルの減少と損傷した菌の回復にある程度の相関が見られ、加熱損傷した大腸菌では、6種の活性酸素消去剤の添加によって損傷大腸菌の検出率を向上させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食中毒を疑う事件が発生した場合、原因となる微生物の種類や混入経路を明らかにすることは、その後の食中毒対策のために重要である。しかし、実際には2割程度の食中毒事例において原因食材及び混入経路が不明のままとなっている。この原因として、環境ストレスによって原因微生物が損傷状態にあり、既存の培地及び培養法では損傷菌の検出が難しいこと、が挙げられている。本研究結果により損傷菌の検出率を向上させることで、食中毒の原因を明確にし、その発生の減少に貢献する。

研究成果の概要（英文）：Accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the culture medium may inhibit the growth of microorganisms and prevent the detection of harmful bacteria in foods. In this study, we evaluated the effect of ROS in the culture medium on the detection of damaged Escherichia coli growth using electron spin resonance. As a result, the correlation was found between the decrease in hydroxyl radicals in the medium and the recovery of damaged bacteria. We revealed that the addition of 6 reactive oxygen scavenging reagents improves the detection rate of heat-damaged E. coli.

研究分野：食品化学

キーワード：大腸菌 損傷菌 活性酸素 電子スピン共鳴

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食中毒を疑う事件が発生した場合、原因となる微生物の種類や混入経路を明らかにすることは、その後の食中毒対策のために重要である。しかし、実際には2割程度の食中毒事例において原因食材及び混入経路が不明のままとなっている¹⁾。この原因として、環境ストレスによって原因微生物が損傷状態にあること、既存の培地及び培養法では損傷菌の検出が難しいこと、が挙げられている。そのため、食中毒の原因を明確にし、その発生を減少させるためには、食中毒の原因となった損傷菌の検出率向上が重要となる。

損傷菌の生育を阻害する要因の一つとして培地中に蓄積する活性酸素の関与が疑われている。これまで、細菌細胞内で発生する活性酸素に関する研究は数多く行われており、それらが細胞生理に及ぼす様々な影響が明らかにされている。通常、細胞内の活性酸素はスーパーオキシドディスムターゼなどの活性酸素消去システムにより速やかに除去されると考えられており、活性酸素が培地中に蓄積されることは想定されていなかった。ところが近年になり、培地中には活性酸素が存在しており、それらが微生物の生育を阻害することが報告²⁾されてきた。すなわち、活性酸素を消去することで損傷菌の検出率が向上する可能性がある。しかし、活性酸素が微生物の生育に与える影響について体系的にまとめられた報告はない。また、先の報告²⁾では、活性酸素の分析に発光法が用いられているが、発光法では複数の活性酸素を同時に同定、定量することはできない。そのような研究開始当初の背景から、我々は、複数の活性酸素を同時に検出することができる唯一の分析機器である電子スピン共鳴分光器 (Electron Spin Resonance : ESR) を活用し、培地内の活性酸素種の同定や定量を行い、微生物の検出率との関係性を評価する本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、ESR スピントラップ法で培地内の活性酸素の種類を同定して定量する。培地内活性酸素が損傷大腸菌の検出に及ぼす影響を評価する、という研究目標を達成することで、損傷大腸菌の検出率向上に有効な活性酸素消去剤を探索することが目的である。目的達成のため、これまで微生物分野への導入例がほとんどないESR スピントラップ法を用いて、培地中の活性酸素の同定および定量を行い、新たな知見を獲得する。

3. 研究の方法

(1) 培地内活性酸素の解析

本研究では食中毒原因菌として「大腸菌」を用いて検討する。この理由として、大腸菌による食中毒が発生した場合、その原因となる食材や混入経路の可能性が多岐に渡るため、損傷菌となって検出できずに原因不明とされる事例¹⁾が他の食中毒原因菌より多いためである。

培地をESRで測定した報告はほとんどないため、培地内の活性酸素を捉えることができるESR測定条件の至適化を行う。培地は種類によって成分組成が異なるため、全ての培地で観測される活性酸素種が同一なのか不明である。そのため、大腸菌培養に用いられる複数の培地で実験を行い、ESRスペクトルの波形解析による培地内活性酸素種の同定や定量結果と、大腸菌の検出率の関係性について評価する。

(2) 損傷大腸菌の培養と培地内活性酸素の測定

本研究では、まず寒天培地を用いて大腸菌を培養して菌数をカウントする。次にその培地をESRスピントラップ法の測定に供する。この手順では同じ培地から菌数と活性酸素量のデータを取得するので、2つの相関を明確に解析することが可能となる。また、10種類程度の活性酸素消去剤を様々な濃度で加えた培地で、損傷させた大腸菌を培養し、活性酸素の測定及び菌数のカウントを行う。得られた様々なデータ(培地内活性酸素の種類や量、活性酸素消去剤の効果、大腸菌の損傷の種類、培養した大腸菌の生菌数)を解析し、包括的に考察することで、損傷大腸菌の検出に及ぼす培地内活性酸素の影響について評価する。また、大腸菌の培養に使用した活性酸素消去剤の種類と濃度の評価から、損傷大腸菌の検出率を向上させる活性酸素消去剤を決定する。

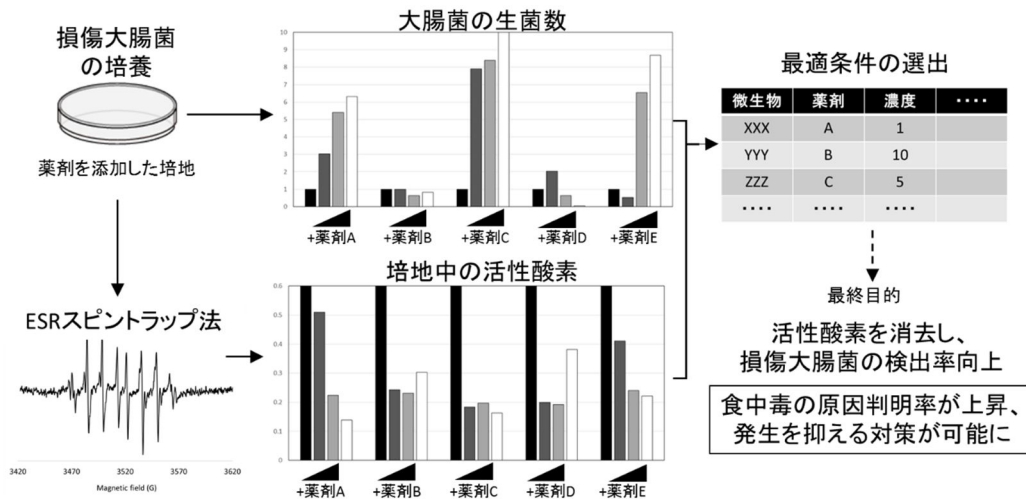


図1 本研究の方法

4. 研究成果

(1) 培地内活性酸素の解析

大腸菌を対象微生物とし、培養には EM9 寒天培地(半合成培地)を選択した。図1に示すように、寒天培地が含有する水分を抽出し、液状の試料にスピントラップ剤(CYPMPPO)を加えてアダクト(付加物)として ESR 測定に供した。観測された信号は超微細構造定数からヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)(AH = 1.37、AN = 1.37、AP = 4.88 ; AH = 1.23、AN = 1.35、AP = 4.70)とスーパーオキシドラジカル(O_2^-)(AH = 1.11、AN = 1.26、AP = 5.25 ; AH = 1.04、AN = 1.27、AP = 5.10)であると同定した。しかしながら、 O_2^- の信号は非常に微小で解析に用いるのは困難であった。 $\cdot\text{OH}$ と O_2^- の信号強度比を検討したところ、ほぼ同一の挙動を示したことから、以降の検討解析には $\cdot\text{OH}$ に着目して行うこととした。微生物培養には様々な種類の培地が使用されることから、培地間で観測されるラジカルに違いがあるかどうか、複数の培地(LB、TSB、YPD)やゲル化剤(ゲランガム、ゼラチン)で検討したがラジカルの種類と量に有意差はなかった。

培地内の活性酸素を ESR スピントラップ法で測定した結果、活性酸素を捉えることができたので、ESR 測定条件の至適化を行った。また、大腸菌を培養した EM9 培地では観測される活性酸素量が増加することが明らかになった。

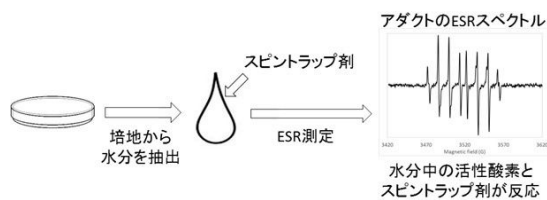


図2 ESR スピントラップ法での測定手順

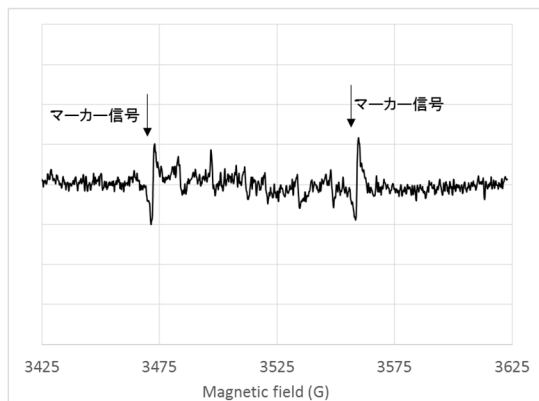


図3 EM9 寒天培地の抽出液と CYPMPPO の ESR スペクトル

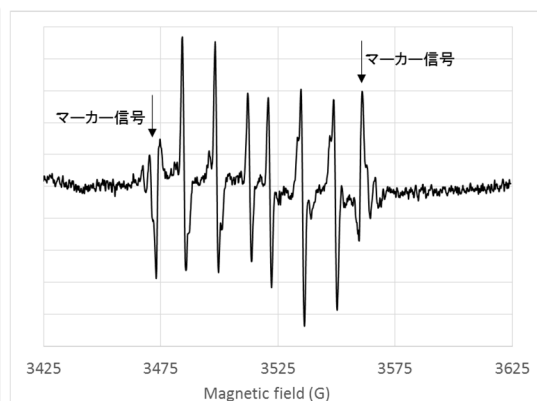


図4 大腸菌培養後の EM9 寒天培地の抽出液と CYPMPPO の ESR スペクトル

(2) 損傷大腸菌の培養と培地内活性酸素の測定

損傷大腸菌の培養と培地内活性酸素の測定を行った。手順としては、まず EM9 寒天培地(半合成培地)を用いて大腸菌を培養して菌数をカウントする。次にその培地を ESR スピントラップ法の測定に供する。この手順では同じ培地から菌数と活性酸素量のデータを取得するので、2つの相関を明確に解析することが可能となる。無添加および12種類の活性酸素消去剤を様々な濃度で加えた培地で、加熱損傷させた大腸菌を培養し、活性酸素の測定及び菌数のカウントを行った。その結果、正常な大腸菌の生存細胞数は、消去剤を添加した培地で培養しても増減せず、正常な大腸菌はこの実験条件下で、細胞の外にある活性酸素に対して感受性がないことが示された。一

方、加熱損傷した大腸菌では、6種の活性酸素消去剤(ピルビン酸ナトリウム、チオグリコール酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、L-グルタミン酸ナトリウム、コハク酸2ナトリウム、グリシン)の添加によって菌数がおおよそ1log増加した。また、これらの薬剤はヒドロキシラジカル量を有意に減少させたことから、ヒドロキシラジカルは菌増殖に重要な影響を及ぼしている可能性を示唆しており、特定の活性酸素消去剤を添加した寒天培地を培養に用いることで、加熱損傷した大腸菌の検出が向上する傾向があることが明らかになった。

表1 活性酸素消去剤0.5%を添加した培地で培養した損傷大腸菌のコロニー数と・OH量

試薬名	コロニー数 (log CFU / mL)	・OH量
ピルビン酸ナトリウム	5.80	0.20
チオグリコール酸ナトリウム	5.97	0.34
チオ硫酸ナトリウム	5.78	0.11
尿素	4.73	N.D.
L-システイン	4.30	N.D.
L-グルタミン酸ナトリウム	5.08	0.31
L-アスパラギン酸ナトリウム	4.70	0.80
マンニトール	3.82	0.27
ラクトース	4.82	0.14
フルクトース	4.67	0.22
コハク酸2ナトリウム	5.05	N.D.
グリシン	5.36	0.41
無添加	4.37	0.83

以上の成果は論文として公表した。

Kameya, H. et al., *Food Scie. Tech. Res.*, **25**(3), 443-448 (2019)

(3)カンピロバクターへの応用

本課題は研究が順調に進んだことから、同様の実験をカンピロバクター(ATCC 33560株)で行った。培養培地中からは大腸菌と同様にヒドロキシラジカルが検出された。22種の薬剤を培地に添加して培養し、培地中に蓄積されたヒドロキシラジカルの減少と加熱損傷したカンピロバクターの回復の相関を検討したが関係性が認められなかった。本結果から、大腸菌と異なり、カンピロバクターの生育にはラジカルよりも、薬剤の作用及び濃度による影響が大きいことが明らかとなった。特に、クエン酸回路に関わる因子の培地への添加は、カンピロバクターの検出率向上に有効となる可能性が示された

表2 活性酸素消去剤0.5%を添加した培地で培養した損傷カンピロバクターのコロニー数

試薬名	コロニー数 (log CFU / mL)	・OH量
グルコース	6.6	0.28
マンノース	6.6	0.31
L-アスパラギン酸ナトリウム	N.D.	0.70
チオ硫酸ナトリウム	N.D.	0.13
乳酸ナトリウム	5.1	0.31
酪酸ナトリウム	N.D.	0.16
尿素	N.D.	N.D.
フルクトース	6.0	0.26

グリシン	N.D.	0.33
L-システイン	6.5	0.06
3,4,5 トリヒドロキシ安息香酸	N.D.	N.D.
酢酸ナトリウム	N.D.	0.23
ギ酸ナトリウム	N.D.	0.23
ラクトース	6.6	0.16
マンニトール	6.2	0.19
L-グルタミン酸ナトリウム	5.9	0.23
スキムミルク	6.7	0.10
アスコルビン酸	6.5	N.D.
プロピオン酸ナトリウム	N.D.	0.23
チオグリコール酸ナトリウム	N.D.	0.22
コハク酸ナトリウム	7.8	N.D.
クエン酸ナトリウム	7.0	N.D.
L-リンゴ酸ナトリウム	7.2	0.25
フマル酸ナトリウム	6.8	0.31
無添加	6.5	0.70

引用文献

- 1) 厚生労働省 HP, 食中毒統計資料 (2018.09.20)
- 2) Takahashi, Y. et al., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **49**, 263-266 (2003)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 大下 誠一、上條 雄樹、ファム ティ クィン アン、吉村 正俊、五月女 格、亀谷 宏美、藤田 俊弘、リュウ シュ	4. 巻 34
2. 論文標題 オオムギ種子発芽促進に効果を示すウルトラファインバブルの個数濃度	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 混相流	6. 最初と最後の頁 194-204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3811/jjmf.2020.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 亀谷 宏美、細谷 幸恵	4. 巻 54
2. 論文標題 ESRスピントラップ法による活性酸素消去能と味噌の明度の相関	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本調理科学会誌	6. 最初と最後の頁 266-269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11402/cookeryscience.53.266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kameya Hiromi, Kanazaki Mika, Okamoto Susumu	4. 巻 25
2. 論文標題 Evaluation of the Effects of Reactive Oxygen Species on Growth of Escherichia coli by Electron Spin Resonance Spin Trapping	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Food Science and Technology Research	6. 最初と最後の頁 443 ~ 448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3136/fstr.25.443	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wakita Yoshihisa, Saiki Asako, Kaneda Hirotaka, Segawa Shuichi, Tsuchiya Youichi, Kameya Hiromi, Okamoto Susumu	4. 巻 9
2. 論文標題 Analysis of free radical production capacity in mouse faeces and its possible application in evaluating the intestinal environment: a pilot study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-019-56004-x	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 亀谷 宏美、金崎美香、細谷 幸恵、川崎 晋、岡本 晋
2. 発表標題 カンピロバクターの培養効率を高める薬剤の探索
3. 学会等名 日本食品衛生学会創立60年記念第116回学問会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細谷 幸恵、前田憲成、亀谷 宏美、Fia Noviyanti、稲津 康弘、川崎 晋
2. 発表標題 豚肉混入下で加熱損傷を被った大腸菌O157:H7の各種増菌培地による増殖遅延時間の検討
3. 学会等名 日本食品衛生学会創立60年記念第116回学問会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀谷 宏美、金崎未香、岡本 晋
2. 発表標題 ESRスピントラップ法を用いた培地中の酸素フリーラジカルが大腸菌の生育に与える影響の評価
3. 学会等名 日本食品科学工学会 第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiromi Kameya, Susumu Okamoto
2. 発表標題 Evaluation of the effects of reactive oxygen species on growth of Escherichia coli by electron spin resonance spin trapping
3. 学会等名 48th Annual Meeting of Food and Agriculture Panel United States-Japan Cooperative Program in Natural Resources (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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