

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22500783

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）The mechanism elucidation and spread of new laboratory procedure of the food poisoning *Salmonella* using citrus extractions

研究代表者：翠川 裕 (MIDORIKAWA YUTAKA)

研究者番号：10209819

研究成果の概要（和文）：サルモネラが、クエン酸アスコルビン酸などの柑橘成分によって硫化水素が産生促進された結果生じた硫化鉄による黒環をミドリリングと命名した。本研究による新たな知見として、サルモネラの硫化水素の産生は、塩分濃度による影響を受けることと、高塩分濃度で阻害されることが判明した。さらに、サルモネラを嫌気状態にすることで、硫化水素産生と硫化鉄産生が顕著に目視することが可能となった。サルモネラを用いた金属のOligodynamic effectの検定など、抗菌性検査システム構築の可能性を示唆する結果を得ることができた。本研究のサルモネラ検査法をラオスで実践し、サルモネラの罹患率の経年変化を求めた。

研究成果の概要（英文）： We referred to this phenomenon that *Salmonella* forms a black ring due to the production of H₂S as the “MY Phenomenon” and the black ring was designated as the MIDO Ring. The new finding that H₂S production was suppressed by adding NaCl was shown during this study. Furthermore, hydrogen sulfide production and iron sulfide production became viewing notably by making *Salmonella* cultural condition into the anaerobic condition. The results made it possible to suggest the developing an antibacterial inspection system such as Oligodynamic effect of the metal by using *Salmonella*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1200000	360000	1560000
2011年度	900000	270000	1170000
2012年度	1300000	390000	1690000
年度			
年度			
総計	3400000	1020000	4420000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：サルモネラ、柑橘、クエン酸、アスコルビン酸、塩化ナトリウム、MY現象、ミドリリング、Oligodynamic Effect、ラオス

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌の中で、サルモネラは、我が国における細菌性の食中毒発生件数の最も多い起因菌であり、食生活や食品産業に多大な損害を与えている。食品衛生法では、食事を提供することを生業としている従業員は、サルモネラを保菌していないことを検査で明らかにする義務がある。サルモネラの菌検出方法は、食品衛生検査指針では、セテナイト培地等で培養した後、Deoxycholate Hydrogen sulfide Lactose (DHL) 寒天培地等に細菌を塗抹して分離培養することとなっている。

腸内細菌のうち、サルモネラ、プロテウス、シトロバクター等は、分離培地上で硫化水素を産生し、培地に含まれる鉄成分と反応して黒色の硫化第1鉄を生成する。このためこれらの菌は、肉眼で区別がつかない場合が多いことが難点である。更に、サルモネラの同定のためには、TSI 寒天培地、LIM 寒天培地、シモンズのクエン酸培地等を高温高圧蒸気滅菌機（オートクレーブ）を用いて作成しなければならない。このように現在、細菌種をスクリーニングするには、多種類の確認培地に接種して、細菌学に精通した技術者が判定する方法がとられている。

我々はラオスでサルモネラの高リスクの高さを長年の食肉の汚染調査と住民の保菌率調査で明らかにしてきた。レモンの抗菌効果を調べるために、腸内細菌分離用の DHL 寒天培地にサルモネラを接種し、輪切りにしたレモンを寒天表面に置いたところ、24 時間後にレモン外周部に黒環が観察されたことを新しい検査法として開発する着想にいたった。そして申請者を発明者とし、“サルモネラ菌検出用デバイス及びその利用方法”と題して特許出願し公報に掲載された。

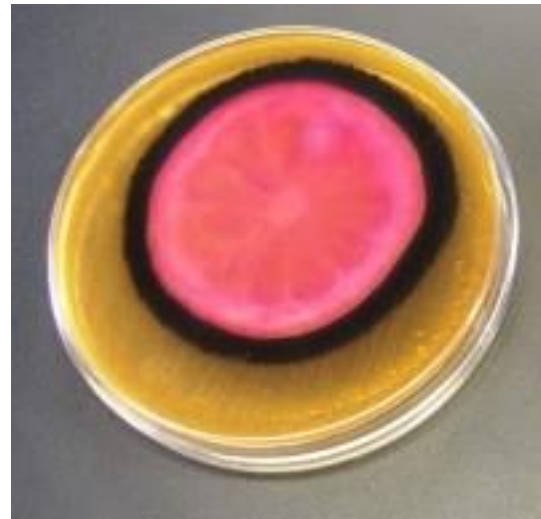


図1 サルモネラが輪切りレモンによるMY現象ミドリリング形成

この知見を基に様々な植物成分を検討した結果、アスコルビン酸又はクエン酸が主要な役割を果たしていることが明らかになった。サルモネラが柑橘成分によって DHL 寒天培地上に黒環を形成する現象を発見者の名前を取って MY 現象、形成された黒環をミドリリング (MID0 Ring) と命名した。

そこで本研究では DHL 培地のような、滅菌が不必要な培地 1 種類だけを用い、特に熟練を要さずとも、視覚的の形状を見てサルモネラ等をスクリーニングできる簡便で安価な方法の開発を目指した。

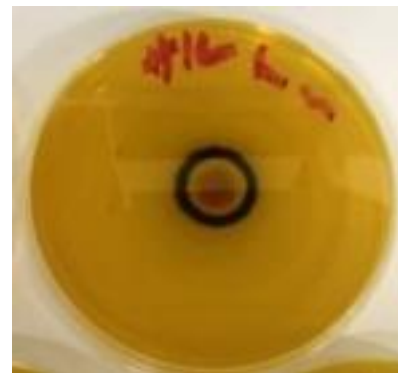




図2 アスコルビン酸(上)およびクエン酸(下)によるサルモネラミドリリング形成

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の4つである。

- ①世界中で多発する食中毒原因菌であるサルモネラを、柑橘抽出物によって簡便で安価に検出する方法を確立する。
- ②申請者が発見したMY現象、すなわち柑橘抽出物の影響で、サルモネラが鉄源を含む分離培地に黒環を形成する現象の化学的な機構を解明する。
- ③本法による知見を応用して、サルモネラだけでなく、あらゆる食中毒菌について、簡便で安価な検出法を開発する。
- ④さらにこの新規検出法を、日本および細菌性食中毒のリスクの高い開発途上国に広く普及させることにより、途上国での食中毒リスクを軽減させ、世界の食の安全の向上を目指した国際貢献に寄与する。
- ⑤上記の点以外にも新たな実験で得た知見を基にサルモネラの検出・予防対策などに寄与することを目指す。

3. 研究の方法

三重県の公的機関保健環境研究所・保健所

等で検出・保存されているサルモネラ株およびシトロバクター株を実験に供試した。

従来の確認培地として、TSI 寒天培地 LIM 半流動寒天培地およびシモンズのクエン酸培地を用いる方法と柑橘抽出デバイスを用いる方法とで比較した。本方法を翠川裕が担当し、従来法を中村が、ラオスにおける調査を翠川薫が分担した。

柑橘成分をろ紙にしみこませ、再び乾燥させこれを分離培地に接種したサルモネラに乗せ、24時間培養することで同現象を引き起こす物質を特定した。

アスコルビン酸、クエン酸をはじめとする各物質（柑橘抽出成分あるいはそれ以外の物質）を直接培地中央にのせ、本現象を引き起こす可能性を探った。

食中毒に関わる硫化水素産生菌および硫化水素非産生菌（大腸菌、赤痢、ビブリオ、）を供試した。各菌を培養する際に、サルモネラにおける DHL 培地のように、最も一般的に利用されている分離培地を用いた。

培養後各分離培地における柑橘抽出デバイスの菌増殖への影響を肉眼的に観察した。

世界に本法を普及するにあたりまず、申請者らが長年調査実績を有するラオスで実施した。食品を原因とする下痢患者便が多数入手される現地の病院の検査室で、開発した方法を用いてサルモネラのスクリーニングを実施した。ラオスは日本より相対的にサルモネラのリスクが高いとされていたので、調査フィールドとして最適と判断した。

東洋濾紙株式会社と共同で、「サルモネラ検出用ディスク」として製品モデルを試作し、取り扱い説明書も作成に着手した。

さらに、本法を用いた場合、抗菌性や硫化水素産生に各種物質が及ぼす影響を調べた。

具体的には、サルモネラ菌を含む病原性腸内細菌類を、DHL寒天培地に接種し、該DHL寒天培地上に、各硬貨を留置し、37℃で24時間培養した。培養後、各硬貨直下の寒天培地上に顕在する現象を目視にて観察した。

4. 研究成果は以下に要約する。

① ラオスにおけるサルモネラ保菌調査：本検出法が有効であることを確認するために、サルモネラの検出率の高い開発途上国ラオスの国立病院と共同で、検証を行なった結果、ラオス住民のサルモネラ保菌が日本の数百倍である調査結果を得た。

図1 ラオス首都近郊農村パイロム村におけるサルモネラの陽性率(%)経年変化
サルモネラ罹患率経年変化(住民便)



② MY現象のメカニズムと培地塩分濃度：さらに、本研究課題に取り組む中で、既存の培地に新たに塩化ナトリウムを添加して濃度を上昇させサルモネラの硫化水素産生を制御するという以下の知見を得た。

サルモネラ同定のためには、トリシュガーアイアン(TSI)寒天培地を用いるが、培養後の同培地では過剰に産生された硫化水素による硫化鉄の黒色のために高層部の色の変化を判定できない(糖分解による酸の産生を目視できない：3および4図参照)、という弱点があった。この弱点は塩化ナトリウム添加で克服されることを証明した。

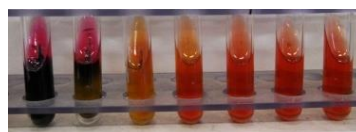


図3 サルモネラが塩化ナトリウム濃度の増加(左から右)によって硫化水素産生を阻害



図4 左：従来のTSI寒天培地を用いた場合。右：塩化ナトリウムを3%まで増加させたTSI寒天培地を用いた場合。

本研究で判明した塩化ナトリウム添加で硫化水素産生を抑制する現象もMY現象の一種と定義した。この研究結果を基に、2011年12月に“塩化ナトリウムを含むサルモネラ菌検出用培地”と題して特許出願した。

③ 菌を嫌気条件下で培養した際のMY現象と硫化水素産生：

1円硬貨の直下の培地にのみ、硫化鉄の黒色変化が出現した。一方、5、10、50、100、500円硬貨の直下の培地においては、黒色変化の現象が認められなかった。1円硬貨直下の培地では、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DHL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と考えられる。以上の結果から、1円硬貨は抗菌性を有さず、5、10、50、100、500円硬貨には抗菌性(Oligodynamic Effectという)

があることが判明した。また、この結果から、アルミニウムは、サルモネラに対する抗菌性を有さず、銅、亜鉛、ニッケルのいずれかにサルモネラに対する Oligodynamic Effect があると結論付けることができた。この研究結果を基に、“抗菌性検査方法”と題して特許出願した。

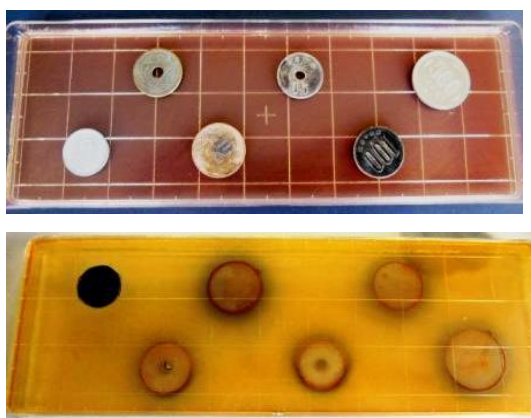


図5 各種硬貨がサルモネラの増殖に及ぼす影響。一円玉以外はサルモネラに対し、Oligodynamic Effect を示した。上：培養前硬貨。下：培養後硬貨を除いたもの。一円玉のみ MY 現象硫化水素産生を認めた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- 1) Detection of non-typhoid Salmonella infection by citrus and citrus extracts in Lao PDR, Yutaka Midorikawa, Satoshi Nakamura, Rattanaphone Phetsouvanh, Kaoru Midorikawa, Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 3, 939-942, 2010
- 2) Cultivating Nature, Adopting to Nature: Dynamics of Lao Livelihood” Water, livelihood and health in Attapeu province in Lao PDR.

Yutaka Midorikawa, Kaoru Midorikawa, Bounphenh Sangsomsack, ToruWatanabe, Satoshi Nakamura, 他10名 Southeast Asian Studies 47, 478-495, 2010

[学会発表] (計3件)

- 1) ビタミンC (アスコルビン酸) を用いた新サルモネラの検出法, 翠川裕, 第132回ビタミンC研究委員会 2010 招待講演
- 2) Detection of Non-typhoid Salmonella infection in Lao P.D.R. Using new screening method by citrus and citrus extracts, Yutaka Midorikawa, Kaoru Midorikawa, Manivanh Vongsouvaht, Rattanaphone P. Phethsouvanh, Paul Newton, Bounnong Boupaha, Kongsap Akkhavong, Satoshi Nakamura, 10th ISSEAWA Hanoi 2012 Proceeding
- 3) 東南アジア、ラオス国における感染症リスクとその管理. 食中毒原因菌サルモネラの罹患, 翠川裕 第83回日本衛生学会感染症連携研究会シンポジウム 2013

[図書] (計2件)

- 1) ビタミンC (アスコルビン酸) による食中毒原因菌検出への応用, 翠川裕, ビタミンの科学と最新応用技術, 第二章, 新しいビタミンの機能, シーエムシー出版, 47-56. 2011
- 2) Application of citrus fruits and

their extracts for detection of food poisoning caused by bacteria. Citric Acid: Synthesis, Properties and Applications. Y. Midorikawa. Nova Science Publishers. 183-195, 2012

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：塩化ナトリウムを含むサルモネラ菌検出用培地

発明者：翠川裕、伊藤佳代

権利者：翠川裕

種類：特許

番号：特開 2013-106587

出願年月日：平成 23 年 11 月 24 日

国内外の別：国内

名称：抗菌性検査方法

発明者：翠川裕、西野 彩水

権利者：翠川裕

種類：特許

番号：特願 2013-104162

出願年月日：平成 25 年 5 月 16 日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

1) シンポジウム『食環境の安全・安心』

翠川裕 組織的な大学院教育改革推進プログラム「健康環境リスクマネジメント専門家育成」第3回国際シンポジウム大阪大学 2012 特別(招待)講演、

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

① 中村哲 (NAKAMURA SATOSHI)

国立国際医療研究センター研究
所・マラリア・熱帯医学研究部・
熱帯医学研究室長

研究者番号：40207874

② 翠川薫 (MIDORIKAWA KAORU)

三重大学・大学院医学系研究科・
リサーチアソシエイト

研究者番号：20393366

(3)連携研究者

なし