低線量放射線による微生物毒素産生能の変化に関する研究(1)

ベロ毒素を産生する腸管出血性大腸菌Escherichia coli O157:H7に及ぼす影響

誌名	食品照射
ISSN	03871975
著者名	菊池,裕 伊藤,均 高鳥,浩介 小沼,博隆
発行元	日本食品照射研究協議会
巻/号	36巻1-2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 23-25
発行年月	2001年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

[Note]

低線量放射線による微生物毒素産生能の変化に関する研究 1 ベロ毒素を産生する腸管出血性大腸菌 *Escherichia coli* O157 : H7 に及ぼす影響

菊池　裕，伊藤　均*，高鳥浩介，小沼博隆

国立医薬品食品衛生研究所　（〒 158-8501　東京都世田谷区上用賀 1-18-1）
*日本原子力研究所高崎研究所（〒 370-1292　群馬県高崎市綿貫町 1233）

Effects of gamma irradiation on verotoxin production by food-borne pathogen, *Escherichia coli* O157 : H7

Yutaka Kikuchi, Hitoshi Ito *, Kosuke Takatori and Hirotaka Konuma

National Institute of Health Sciences, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
** Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, Japan Atomic Energy Research Institute, Takasaki, Gunma 370-1292, Japan*

Summary

The effect of irradiation was examined on the sensitivity and verotoxin production of *Escherichia coli* O157 : H7, using 13 clinical isolates. All isolates were sensitive to gamma irradiation compared with normal type *E. coli*. D_{10} values of 0.05-0.1 kGy were obtained in 0.067 M phosphate buffer at room temperature in an air-equilibrium atmosphere. Irradiation at 0.1 kGy produced no noticeable effect on verotoxin production in any isolates.

緒　言

微生物への放射線照射効果の研究は主に殺菌を目的とするものが多く，ガンマ線照射による殺菌に関する数多くの研究がなされてきた。現在ではその高い殺菌効率から医療用具等の滅菌法として広く用いられている。一方で致死を伴わない低線量の放射線が微生物に及ぼす研究は，主に DNA 損傷に基づく変化や，照射によって特異的に誘導されるタンパク質の研究が行われている。しかし，微生物が産生する微生物毒素の代謝や産生量に及ぼす影響に関する研究は少ない。そこで医療用具及び照射食品等の微生物学的安全性を評価することを目的とし，微生物の毒素産生機構に及ぼす低線量の放射線の影響について研究することとした。本研究では病原性微生物の一つである腸管出血性大腸菌 *Escherichia coli* O157 : H7 に着目し，ガンマ線照射による放射線殺菌効果及びベロ毒素産生能の変化を調べた。

実験方法

ベロ毒素産生能が明らかな 9 株の *E. coli* O157 : H7 を ATCC から購入し，標準菌株として用いた。また，国内の感染症患者から分離した 13 株の *E. coli* O157 : H7 を国立感染症研究所より入手し，臨床分離菌株として用いた。

ガンマ線照射実験は，既報[1,2]に従って行った。トリプティックソイブロス (TSB)(Difco) で増菌した定常期の *E. coli* O157 : H7 を，0.067 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に 1×10^9 個 /ml になるように懸濁し，2.0 ml の懸濁液を滅菌プラスチック製試験管 (12 $\phi \times$ 75 mm)

に入れ，室温で溶存空気平衡下，^{60}Co (100 kCi) ガンマ線を線量率1.2 kGy/hとなる位置で，0-2.0 kGy照射した。

各線量で照射した菌株の懸濁液を希釈し，トリプティックソイアガー (TSA)(Difco) 及びセフィキシムおよび亜テルル酸カリウム添加 Sorbitol MacConky agar (CT-SMAC) 寒天平板培地に塗抹して培養後，生存率を求めた。

照射した *E. coli* O157：H7のベロ毒素産生能の変化は，既報[3]に従って逆受身ラテックス凝集反応で調べた。菌株をTSBで培養後，培養液の各希釈液を調製し，大腸菌ベロ毒素検出用キット VTEC-RPLA (デンカ生研) を用いて測定した。

実験結果および考察

1．標準菌株の放射線感受性とベロ毒素産生能

E. coli O157：H7標準菌株に各線量のガンマ線を照射後，TSA及びCT-SMAC寒天平板培地で培養し，生存菌数を求めた。TSAで培養した際の生存曲線から求めた D_{10} 値を表1に示した。用いた9株の *E. coli* O157：H7標準菌株に対して0.1-2.0 kGyのガンマ線を照射すると，本実験の条件下では1.0 kGyの照射によって，全ての *E. coli* O157: H7が死滅し，D_{10} 値は0.05-0.12 kGyとなった。本実験にはTSA及びCT-SMAC寒天平板培地を用いたが，TSAでの D_{10} 値がCT-SMAC寒天平板培地より若干高かったが，菌株間における D_{10} 値の傾向に変わりはなかった。

Pattersonは wild-type *E. coli* を接種した鶏挽き肉にガンマ線を照射し，0.26-0.27 kGyの D_{10} 値を報告している[4]。また，ThayerらはATCC 43895を接種した牛挽き肉や鶏挽き肉に様々な条件下でガンマ線を照射し，その D_{10} 値 (0.16-0.44 kGy) から *E. coli* O157: H7は一般の大腸菌に比べ放射線感受性が著しく高いと報告している[5]。本研究でも標準菌株の D_{10} 値は低い値を示し，低線量のガンマ線で殺菌可能なことを示している。

次に照射した標準菌株のベロ毒素産生能を調べた。ガンマ線照射後に生存した0.1 kGy照射菌株のベロ毒素産生能を表1に示した。ベロ毒素を産生する菌株は，ガンマ線照射後もベロ毒素を産生し，その種類にも変化はなかった。

2．臨床分離菌株の放射線感受性とベロ毒素産生能

同様の実験を臨床分離菌株を用いて行った。表2に，感染症の発症地域及び染色体DNAを *XbaI* 消化してパルスフィールドゲル電気泳動を行って分類したDNA型別[6]を示した。

次に，各線量のガンマ線照射した13株の *E. coli* O157: H7臨床分離菌株を，TSA及びCT-SMAC寒天平板培地で培養し，生存菌数を求めた。TSAで培養した際の生存曲線から求めた D_{10} 値を表2に示した。臨床分離菌株に対して0.1-2.0 kGyのガンマ線を照射すると，本実験の条件下では0.8 kGyで全ての *E. coli* O157: H7が死滅し，その D_{10} 値は0.05-0.1 kGyとなり，伊藤らの報告[7]と同様の感受性を示した。CT-SMAC寒天平板培地を用いてガンマ線照射した菌株の培養でも，TSAと同様な D_{10} 値を示した。表2に示したように，本実験では国内各地で発症した個別の感染症事例に由来し，DNA型別が全て異なる臨床分離菌株にガンマ線照射を行った。しかし，発症地及びDNA型別の違いによる顕著な D_{10} 値の差は見られず，ATCC標準菌株の D_{10} 値 (0.05-0.12 kGy) とほぼ同じ値を示した。

次に，臨床分離菌株のベロ毒素産生能を調べた。ガンマ線照射後に生存した0.1 kGy照射菌株のベロ毒素産生能を表2に示した。本実験に用いた臨床分離菌株は，標準菌株の10倍以上のベロ毒素産生能を示した。ベロ毒素産生能を有する菌株は，ガンマ線照射後もベロ毒素を産生し，その種類にも変化はなかった。また，ガンマ線0.1 kGy照射後のベロ毒素の産生量は，非照射群に比較して，顕著な産生量の増加はなかった。

以上の結果より，国内の感染症事例で分離した腸管出血性大腸菌 *E. coli* O157:H7は，低線量のガンマ線で殺菌可能なことが示された。また，0.1 kGy照射後のベロ毒素産生能に顕著な変動が認められなかった。

謝　辞

本研究の遂行に当たり，腸管出血性大腸菌を御供与して頂いた国立感染症研究所細菌部長渡邉治雄博士に，深く謝意を称します。

文　献

1）伊藤　均，K.-J. Chun, 石垣　功：食品照射，24, 12 (1989).
2）瀧上真知子，伊藤　均：食品照射，30, 11 (1996).

3）小沼博隆：食品衛生研究，47 (10), 67 (1997).
4）M. Patterson: *Lett. Appl. Microbiol.*, 7, 55 (1988).
5）D. W. Thayer and G. Boyd: *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1030 (1993).
6）伊豫田淳，寺嶋　淳，和田昭仁，泉谷秀昌，田村和満，渡邉治雄：日本細菌学雑誌，55, 29 (2000).
7）伊藤　均，Harsojo: 食品照射，33, 29 (1998).

(2001年7月9日受理)

表1　*E. coli* O157：H7 標準菌株の D_{10} 値とベロ毒素産生能の変化

菌株	D_{10} 値 kGy	ベロ毒素産生能* VT1/VT2	
		0 kGy	0.1 kGy
ATCC 35150	0.08	2 / 16	2 / 64
ATCC 43888	0.12	− / −	− / −
ATCC 43889	0.08	− / 256	− / 64
ATCC 43890	0.09	8 / −	16 / −
ATCC 43894	0.05	16 / 256	16 / >256
ATCC 43895	0.10	8 / −	128 / −
ATCC 51657	0.05	16 / 16	4 / 64
ATCC 51658	0.08	16 / 16	16 / 16
ATCC 51659	0.07	2 / 4	16 / 16

* VT 検出最低希釈倍率

表2　*E. coli* O157：H7 臨床分離菌株の D_{10} 値とベロ毒素産生能の変化

菌株	発症地	DNA 型別	D_{10} 値 kGy	ベロ毒素産生能* VT1/VT2	
				0 kGy	0.1 kGy
9	神奈川	Va	0.06	− / 4096	− / 2048
11	福岡	Ia	0.06	− / 2048	− / 4096
19	岐阜	Ib	0.05	− / 4096	− / 4096
23	岡山	Ic	0.05	− / 2048	− / 4096
55	静岡	IIb	0.05	− / 1024	− / 512
183	長崎	Dcg	0.10	− / −	− / −
190	広島	IIIb	0.08	− / 512	− / 512
194	埼玉	IIIc	0.07	− / 512	− / 1024
196	埼玉	IIIf	0.06	− / 2048	− / 2048
298	群馬	IV	0.06	− / 2048	− / 1024
437	東京	IId	0.05	4096 / 512	4096 / 1024
946	大阪	IIa	0.08	128 / 2048	128 / 4096
1092	神奈川	IIIa	0.06	512 / −	256 / −

* VT 検出最低希釈倍率