HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	バクテリオファージを利用したヒスタミン生成菌の発育抑制とヒスタミン蓄積の制御
Author(s)	山木, 将悟
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第12662号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12662
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65348
Type	doctoral thesis
File Information	Shogo_Yamaki.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

主論文

バクテリオファージを利用したヒスタミン生成菌の発育抑制とヒスタミン蓄積の制御
(Biocontrol of histamine-producing bacteria and histamine accumulation using bacteriophages)

北海道大学大学院水産科学院
海洋応用生命科学専攻
Graduate School of Fisheries Sciences
Division of Marine Life Science

山木 将悟
Shogo Yamaki

平成 29 年（2017）

目　次

略語表

緒言.....1

第 1 章 *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda1 の性状および発育抑制能.....7

第 1 節 *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda1 の性状

試料および方法

1-1-1. 供試菌株.....8

1-1-2. *P. damseale* subsp. *damselae* ファージの分離.....8

1-1-3. ファージ Phda1 の宿主域分析.....9

1-1-4. ファージ Phda1 の精製.....9

1-1-5. ファージ Phda1 の透過型電子顕微鏡観察.....10

1-1-6. ファージ Phda1 のプラークアッセイ用最適培地の検討.....10

1-1-7. ファージ Phda1 の吸着率測定.....10

1-1-8. ファージ Phda1 の一段増殖実験.....11

1-1-9. ファージ Phda1 の安定性試験.....11

1-1-10. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育に及ぼすファージ Phda1 の影響.....12

結果および考察

1-1-1. *P. damselae* subsp. *damselae* ファージの分離.....15

1-1-2. ファージ Phda1 の宿主域.....15

1-1-3. ファージ Phda1 の形態学的特徴.....16

1-1-4. ファージ Phda1 のプラークアッセイ用最適培地.....16

1-1-5. ファージ Phda1 の菌体への吸着率.....17

1-1-6. ファージ Phda1 の一段増殖曲線.....17

1-1-7. ファージ Phda1 の安定性.....18

1-1-8. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育に及ぼす Phda1 の影響.....18

第 2 節　ファージ Phda1 の感染サイクルに及ぼす化学的要因の影響
試料および方法
1-2-1. ファージ Phda1 の吸着率に及ぼす pH および二価カチオンの影響.....28
1-2-2. ファージ Phda1 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響.....29
結果および考察
1-2-1. ファージ Phda1 の吸着率に及ぼす pH の影響.....31
1-2-2. ファージ Phda1 の吸着率に及ぼす二価カチオンの影響.....31
1-2-3. ファージ Phda1 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響.....32

第 3 節　ファージ Phda1 による *P. damselae* subsp. *damselae* の発育制御
試料および方法
1-3-1. ファージ Phda1 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼすカルシウムの影響.....38
1-3-2. ファージ Phda1 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼす pH の影響.....38
1-3-3. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育およびヒスタミン生成に及ぼすファージ Phda1 の影響.....38
結果および考察
1-3-1. ファージ Phda1 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼすカルシウムの影響.....41
1-3-2. ファージ Phda1 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼす pH の影響.....41
1-3-3. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育およびヒスタミン生成に及ぼすファージ Phda1 の影響.....42

第 2 章　*P. damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda10 の性状および発育抑制能 48
第 1 節　*P. damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda10 の性状
試料および方法

2-1-1. *P. damselae* subsp. *damselae* ファージの分離.....49
2-1-2. ファージ Phda10 の宿主域分析.....49
2-1-3. ファージ Phda10 の精製.....49
2-1-4. ファージ Phda10 の吸着率測定.....50
2-1-5. ファージ Phda10 の一段増殖実験.....50
2-1-6. ファージ Phda10 の安定性試験.....51
2-1-7. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育に及ぼす Phda10 の影響.....51
結果および考察
2-1-1. *P. damselae* subsp. *damselae* ファージの分離.....54
2-1-2. ファージ Phda10 の宿主域.....54
2-1-3. ファージ Phda10 の吸着率.....55
2-1-4. ファージ Phda10 の一段増殖曲線.....55
2-1-5. ファージ Phda10 の安定性.....55
2-1-6. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育に及ぼすファージ Phda10 処理の影響.....56

第 2 節　ファージ Phda10 の感染サイクルに及ぼす物理的および化学的要因
試料および方法
2-2-1. ファージ Phda10 の吸着率に及ぼす pH, 温度, 二価カチオンの影響.....63
2-2-2. ファージ Phda10 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響.....63
結果および考察
2-2-1. ファージ Phda10 の吸着率に及ぼす pH の影響.....65
2-2-2. ファージ Phda10 の吸着率に及ぼす温度の影響.....65
2-2-3. ファージ Phda10 の吸着率に及ぼす二価カチオンの影響.....65
2-2-4. ファージ Phda10 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響.....66

第 3 節　ファージ Phda10 による *P. damselae* subsp. *damselae* の発育制御
試料および方法
2-3-1. ファージ Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼすカルシウムの影響.....72

2-3-2. ファージ Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼす pH の影響.....72
2-3-3. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育およびヒスタミン生成に及ぼすファージ Phda10 と酢酸カルシウム併用の影響.....72
結果および考察
2-3-1. ファージ Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育制御能に及ぼすカルシウムおよびマグネシウムの影響.....74
2-3-2. ファージ Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育制御能に及ぼす pH の影響.....74
2-3-3. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育およびヒスタミン生成に及ぼすファージ Phda10 と酢酸カルシウム併用の影響.....75

第 3 章　*Morganella morganii* subsp. *morganii* ファージ FSP1 の分離とその感染メカニズムおよび耐性菌に関する検討.....83
第 1 節　*M. morganii* subsp. *morganii* ファージ FSP1 の分離とその性状
試料および方法
3-1-1. *M. morganii* subsp. *morganii* ファージの分離.....84
3-1-2. ファージ FSP1 の宿主域分析.....84
3-1-3. ファージ FSP1 の TEM 観察.....85
3-1-4. ファージ FSP1 の一段増殖実験.....85
3-1-5. ファージ FSP1 の安定性試験.....85
3-1-6. ファージ FSP1 の *M. morganii* 発育抑制能の分析.....85
結果および考察
3-1-1. ファージ FSP1 の宿主域.....86
3-1-2. ファージ FSP1 の形態学的特徴.....86
3-1-3. ファージ FSP1 の一段増殖曲線.....86
3-1-4. ファージ FSP1 の安定性.....87
3-1-5. *M. morganii* の発育に及ぼすファージ FSP1 処理の影響.....87

第 2 節　ファージ FSP1 のレセプター分析

試料および方法

3-2-1. プロテアーゼ処理したホスト細胞に対する吸着率の測定.....93

3-2-2. 過ヨウ素酸ナトリウム処理したホスト細胞に対する吸着率の測定.....94

3-2-3. *M. morganii* 外膜タンパク質による FSP1 不活化試験 94

3-2-4. *M. morganii* リポ多糖による FSP1 不活化試験 95

結果および考察

3-2-1. プロテアーゼまたは過ヨウ素酸ナトリウム処理したホスト細胞に対する FSP1 の吸着率.....96

3-2-2. *M. morganii* subsp. *morganii* 外膜タンパク質およびリポ多糖の存在下における FSP1 のプラーク形成性.....96

第 3 節　ファージ FSP1 耐性株の分離および耐性獲得機構

試料および方法

3-3-1. ファージ FSP1 耐性株の分離 102

3-3-2. ファージ FSP1 耐性株の種同定 102

3-3-3. ファージ FSP1 耐性株に対する FSP1 の吸着率測定 103

3-2-4. ファージ FSP1 耐性株の *M. morganii* ファージ感受性 103

結果および考察

3-3-1. ファージ FSP1 耐性株の分離 105

3-3-2. ファージ FSP1 耐性株に対する FSP1 の吸着率 105

3-3-3. ファージ FSP1 耐性株の *M. morganii* ファージの感受性 106

第 4 章　ファージを利用したマグロ魚肉のヒスタミン蓄積制御.....111

試料および方法

4-1-1. 液体培地での *M. morganii* 殺菌能の測定 112

4-1-2. 魚肉系における最適 FSP1 濃度の決定 112

4-1-3. 魚肉における FSP1 による *M. morganii* の発育とヒスタミン蓄積量の測定 112

4-1-4. マグロ魚肉中のファージ FSP1 の安定性の測定 113
4-1-5. 魚肉からのファージ FSP1 耐性株の分離 113
結果および考察
4-1-1. 液体培地での *M. morganii* 殺菌能に及ぼす温度およびファージ濃度の影響 115
4-1-2. 魚肉での *M. morganii* 殺菌能に及ぼすファージ濃度の影響 115
4-1-3. ファージ FSP1 を利用した *M. morganii* によるヒスタミン蓄積制御 115
4-1-4. マグロ魚肉中のファージ FSP1 の安定性 116
4-1-5. 魚肉からのファージ FSP1 耐性株の分離 116

第 5 章　総括 126

謝辞 137

文献 138

略　語　表

本論文においては以下の略語を用いた。

ASW	Artificial sea water
Cas	CRISPR-associated genes
CFU	Colony forming unit
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
HDC	Histidine decarboxylase
HPLC	High performance liquid chromatography
MOI	Multiplicity of infection
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PFU	Plaque forming unit
TEM	Transmission electron microscope
TSA	Tryptic soy agar
TSAS	Tryptic soy agar supplemented with 1.5% sodium chloride
TSB	Tryptic soy broth
TSBS	Tryptic soy broth supplemented with 1.5% sodium chloride

緒　言

昨今の食品に関する加工流通技術の発達は, 地理的または季節的な流通制限のあった食品を世界中の消費者に届けることを可能とした。しかし, 消費者への食品の流通過程は複雑化するため, 適切な温度管理からの逸脱や不衛生な取り扱いなど, 流通過程の各段階で食品の健全性を損なう可能性も指摘されている。このような危険性を排除するために食品の加工保蔵技術, コールドチェーン, HACCP システムなどが考案されてきたが, 腸管出血性大腸菌, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* などによる食中毒は未だ世界規模で問題となっている。これら食中毒細菌による重篤な大規模食中毒事件の発生などによって, 食の安全性に対する消費者の意識は非常に高い。このような状況の中, 食品製造者の責務は年々高まっており, 食品の安全性を保証するための技術があらゆる場面で必要とされている。

日本では, 古くから魚食文化が根強く浸透しており, 刺身や寿司, 魚肉加工品を喫食する機会が非常に多い。水産物に関わる食性病害は多岐にわたるが, 腸炎ビブリオ（*Vibrio parahaemolyticus*）等に代表される細菌性食中毒, フグ毒テトロドトキシンなどの自然毒による食中毒, またアニサキスなどによる寄生虫症が挙げられる。これらの食中毒に加え, 現在世界中で頻発している水産食品に由来する食性病害にヒスタミン食中毒がある。

ヒスタミン食中毒は, 食品中で過剰に蓄積したヒスタミンを経口摂取することにより発症する化学性食中毒の一種である。一般的に本食中毒は, 嘔吐, 頭痛, 下痢, 蕁麻疹, 顔面紅潮などのアレルギー様症状を呈するが, 比較的軽微な症状で快復する（Hungerford, 2010）。しかし, まれに命の危険に関わる重篤な症状を呈する場合もあることが報告されており（Sánchez-Guerrero *et al*., 1997; D'Aloia *et al*., 2011）, 本食中毒の危険性が低いとは断定できない。本食中毒の原因物質となるヒスタミンは, 食品中に含まれる遊離ヒスチジンが細菌の持つヒスチジン脱炭酸酵素（Histidine decarboxylase, HDC）によって変換され生成する。そのため, 本食中毒の主な原因食品は遊離ヒスチジン含量の多い赤身魚（マグロ, カツオ, サバ, アジ, イワシなど）である。日本のヒスタミン食中毒発生状況は Fig. 1 に示した通り, 年間数件から十数件発生しているが, 事件数に対する患者数が非常に多いことを特徴とする。例えば, 2009

年のヒスタミン食中毒発生件数は 12 件であるが, 患者数は 550 人であり, 1 件あたりの患者数は他の食中毒事例と比較しても多いと言える。これはヒスタミンの加熱や凍結に対する高い安定性に起因すると考えられる。すなわち, 食品中に蓄積したヒスタミンは調理加工過程での除去または分解が困難なため, 大規模な飲食店や給食調理施設などで調理・提供された食品での発生例が多くなる。そのため, ヒスタミン食中毒の防止には, 食品でのヒスタミン蓄積が起こる前に, ヒスタミン生成菌の発育を制御することが必須である。

現在, 魚肉に関わるヒスタミン生成菌として様々な菌種が報告されている。例えば, 海洋細菌の *Photobacterium phosphoreum*, *P. damselae* subsp. *damselae*, 腸内細菌科の *Enterobacter aerogenes, Morganella morganii* subsp. *morganii*, *Proteus vulgaris, Raoultella planticola* などである（Bermejo *et al.*, 2003; Kanki *et al*., 2004; Rodtong *et al.* 2005; Ferrario *et al*., 2012a）。Bjornsdottir-Butler ら（2015）は, 計 235 の赤身魚試料のうち 49%から *P. damselae* subsp. *damselae* が, 14%から *M. morganii* が分離され, 分離菌株はいずれも強力なヒスタミン生成能を有していたと報告している。Kim ら（2003）は, アジ, イワシ, マグロのエラおよび体表に *M. morganii* が存在し, また, これら魚類の加工工場からも同様に *M. morganii* が検出されたとしている。すなわち, ヒスタミン生成菌は赤身魚の魚肉からそれを加工する工場を広く汚染しており, 衛生的な取扱いのみでは最終製品の汚染を防ぐことは困難である。また, *P. phosphoreum* や *Morganella psychrotolerans* は 4°C という低温環境下でもヒスタミンを生成するため（Emborg and Dalgaard, 2008; Torido *et al*., 2012）, 低温管理のみに依存した手法ではヒスタミン食中毒を防止することはできないと考えられる。そのため, 水産食品におけるヒスタミン食中毒を確実に防止するためには, 従来の低温管理に加えて新たなヒスタミン生成菌の制御方法の開発が必要である。

昨今の食品微生物制御の分野では, 食品の味や香り, 色調, テクスチャー, 栄養素に影響を与えない安全性保証技術が重要視されているため, ハードルテクノロジー理論に基づく手法が採用されている（Leistner and Gorris, 1995）。ハードルテクノロジー理論とは, 温度, pH, 水分活性の管理, 抗菌物質の添加などの比較的温和な複数の加工処理の組み合わせによって, 食品の品質を損なわずに微生物の発育を効率良く制御しようとする手法である。現在では, これら従来から存在するハードルの他に, バク

テリオシン, エッセンシャルオイル, パルスライトなどの新たな抗微生物技術を取り入れた方法の発展も期待されている（Cleveland *et al*., 2001; Burt, 2004; Gómez-López *et al*., 2007）。その中で新たな微生物制御手法のひとつとして, 溶菌性バクテリオファージの利用が期待されている。

バクテリオファージ（ファージ）は, 細菌を標的として感染するウイルスの総称である。ファージは核酸（DNA または RNA）とそれを包むタンパク質から成り（エンベロープを持つものも存在する）, 主に溶菌サイクルと溶原サイクルという 2 種類の感染サイクルを持つ。代表的な *Caudovirales* 目ファージの感染サイクルは Fig. 2 に示した。ファージの感染はホスト細胞の表面に存在するレセプターへの特異的結合および DNA 注入に始まる。その後, 溶菌サイクルでは DNA 複製, タンパク質複製, ファージ組立て, そしてファージ溶菌酵素（ホリンおよびエンドライシン）によるホストの溶菌に終わる。一方, 溶原サイクルでは注入されたファージゲノムがホストゲノムに組み込まれ, ホストとともに増殖する。このファージによる溶原化は細菌間の遺伝子水平伝播に寄与すると言われている。一般に, 溶菌サイクルのみで増殖するファージをビルレントファージ, 溶菌サイクルと溶原サイクルの両方で増殖するファージをテンペレートファージと呼ぶ。地球上には, 10^{30} を超えるファージが存在すると試算され（Brüssow and Hendrix, 2002）, ファージによる細菌への感染および溶菌は遺伝子伝播や物質循環に非常に大きな影響を及ぼすと考えられている。

ファージは Frederick W. Twort および Félix d'Herelle によりそれぞれ独立に発見され（Twort, 1915; d'Herelle, 1917）, d'Herelle によりバクテリオファージと命名された。また, d'Herelle はファージの細菌に対する特異的な作用を利用した感染症治療法「ファージセラピー」の提唱者でもあった。ファージセラピーは一定の成果を収め, 1900 年代初めには製薬会社から感染症治療用のファージ製剤が販売されていたが, ペニシリンを代表とする抗生物質の発見とその有効性の高さから近年までファージセラピーに関する研究は衰退していた。しかし, 昨今の度重なる抗生物質耐性菌の出現によって, 抗生物質とは異なる作用機序を有する手法としてファージセラピーへの関心が集まり, 新たな感染症治療法として注目を浴びている（Kutateladze and Adamia, 2010）。現在, *Acinetobacter baumannii* や *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* などの抗生物質耐性菌へのファージセラピーの研究が盛んに進

められている（Biswas *et al*., 2002; Matsuzaki *et al*., 2003; Hung *et al*., 2011; Shen *et al*., 2012）。

ファージセラピーの理論は食品微生物制御においても応用可能である。食品微生物制御へファージを利用する利点には, 以下のものが挙げられる。①ファージ感染の宿主特異性が高いため, 標的とする細菌のみを制御可能, ②ファージが食品の味や香り, 外観, 栄養素に影響を及ぼさない, ③ファージ溶液の調製が比較的安価に行える点である。現在, *L. monocytogenes* や *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp.を溶菌するファージ製剤が販売されており, 欧米では食品添加物として使用可能なものも存在する。例えば, *L. monocytogenes* ファージ P100 を用いたファージ製剤 Listex P-100（Micreos Food Safety, Wageningen, The Netherlands）は米国 FDA より GRAS（Generally Recognized As Safe）物質として認証を受けており, Micreos Food Safety 社のホームページによると米国, カナダ, スイス, オランダ, イスラエル, ノルウェー, オーストラリアおよびニュージーランドで利用が認可されている。

そこで本研究では, ファージの溶菌作用を利用した微生物制御法をヒスタミン生成菌の制御に応用し, 魚肉における新しいヒスタミン食中毒制御法を構築することを目的とした。第 1 章では赤身魚より高頻度に分離される海洋性ヒスタミン生成菌 *P. damselae* subsp. *damselae* に感染するファージの分離を試み, 選抜したファージ Phda1 の性状を調べ, 第 2 章では Phda1 よりも広い宿主域を示す *P. damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda10 を見出したのでその性質について調べた。第 3 章では, 強力なヒスタミン生成能を示す腸内細菌 *M. morganii* subsp. *morganii* に感染するファージ FSP1 の性状, 感染メカニズムおよび耐性菌の耐性獲得機構について調べ, 第 4 章では, マグロ切り身における *M. morganii* の発育およびヒスタミン生成に及ぼす FSP1 処理の影響について評価を行った。

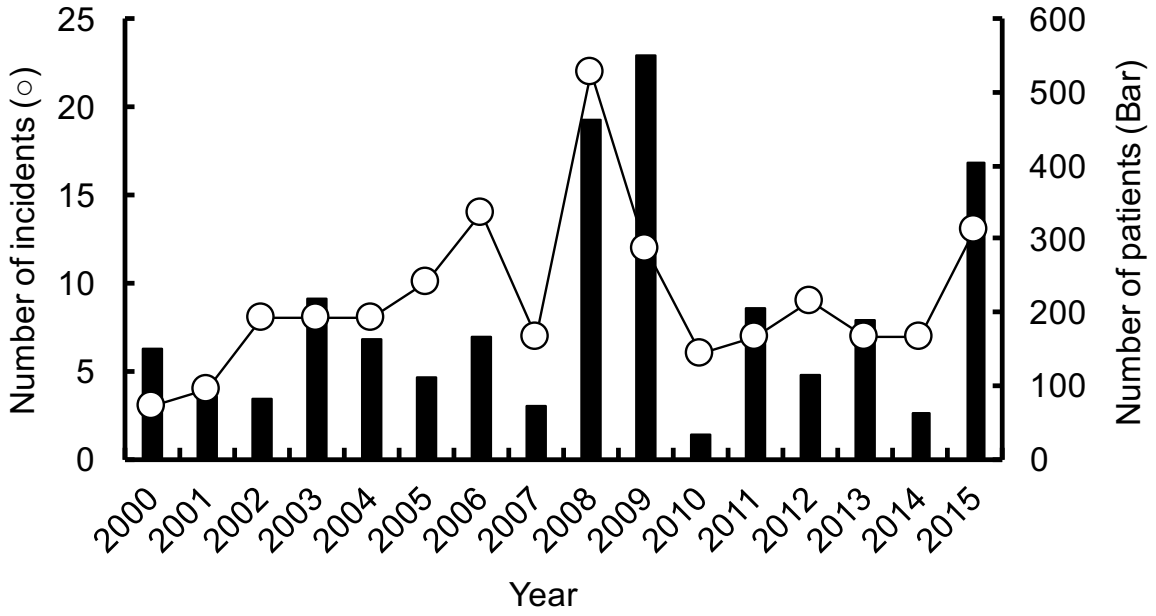


Fig. 1. Numbers of incidents and patients of histamine poisonings developed in Japan between 2000 and 2015.

Symbols and columns represent number of incidents and patients, respectively. The data used in this figure were from the lists of food poisoning occurrences from Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan (http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryou/shokuhin/syokuchu/04.html).

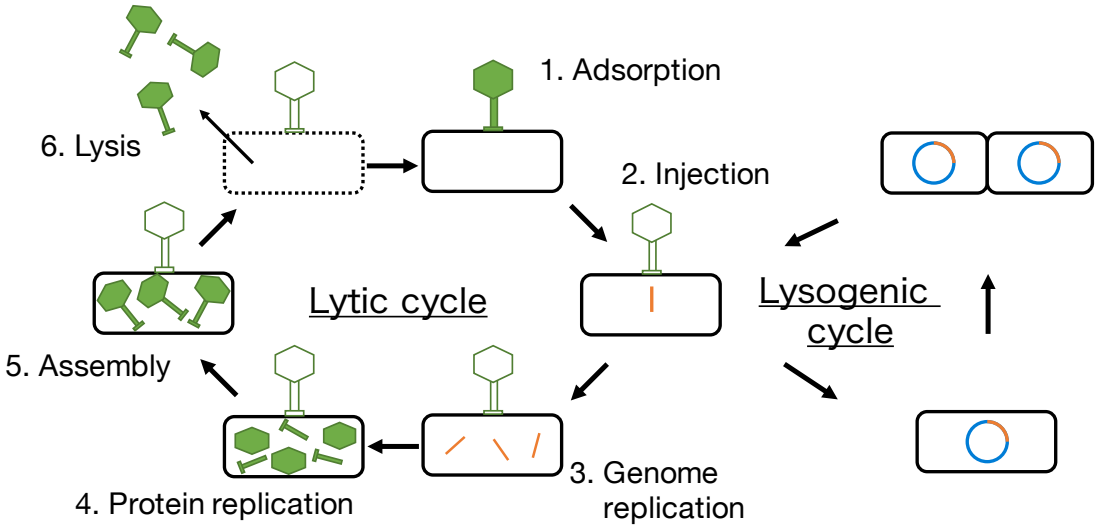


Fig. 2. The infection cycles of bacteriophages.

第 1 章　*Photobacterium damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda1 の性状および発育抑制能

海洋細菌の一種である *P. damselae* subsp. *damselae* は強力なヒスタミン生成能を有する中温性細菌である。PCR 法を用いた分析によると, *P. damselae* はメキシコ湾の赤身魚 235 サンプルのうち 49%で検出され（Bjornsdottir-Butler *et al*., 2015）, また増菌培養法を用いた分析では, 東京都内の水産物卸売市場に流通していた鮮魚 54 検体中 3 検体, 調味生魚 13 検体中 1 検体, 鮮魚漬け水 30 検体中 20 検体から検出されている（新井ら, 2007)。分離された *P. damselae* はいずれも強力なヒスタミン生成能を示すことも報告されている。このように, *P. damselae* は魚肉の一次汚染菌として広く分布しており, ヒスタミン食中毒を引き起こす原因菌のひとつと考えられる。本研究では *P. damselae* を制御対象菌に設定し, ファージを利用した *P. damselae* 制御を試みることにした。

本章では, 第 1 節で *P. damselae* ファージの分離および獲得・選抜したファージの性状について検討し, 第 2 節では *P. damselae* ファージ Phda1 の感染過程に及ぼす化学的要因の影響を調べた。また第 3 節では *P. damselae* ファージ Phda1 による *P. damselae* 発育抑制効果について評価した。

第 1 節　*Photobacterium damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda1 の性状

P. damselae subsp. *damselae* は強力なヒスタミン生成能を持つ海洋細菌である。*P. damselae* はメキシコ湾の赤身魚 235 サンプルのうち 49%で検出されている（Bjornsdottir-Butler *et al*., 2015）。すなわち, *P. damselae* subsp. *damselae* は一時汚染菌として魚肉に広く分布し, ヒスタミン食中毒の主要な原因菌の一種と考えられる。本節では, *P. damselae* subsp. *damselae* をヒスタミン食中毒防止のための制御対象として設定し, 本菌に感染するファージの分離およびその性状の分析を行った。

試料および方法

1-1-1. 供試菌株

供試菌株および培養条件は, Table 1-1 に示した。*P. damselae* subsp. *damselae* は, 1.5%NaCl 添加 Tryptic Soy Broth（TSBS; Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA）で 25°C, 15 時間培養し, 以後の実験に供した。

1-1-2. *P. damselae* subsp. *damselae* ファージの分離

ファージの分離には, Carvalho ら（2010）の方法に準じて 530 µg/ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 819 µg/ml $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ 含有 TSBS を使用した培養法により行った。食品サンプルに 9 倍量の培地を混合し, ホモジナイズ後, 対数増殖期の *P. damselae* JCM8969 懸濁液を約 10^4 CFU/ml となるように接種した。20°C で 24 時間培養後, 培養液 10 ml にクロロホルム（5%（v/v））を加えてよく振盪し, 菌体を溶菌した。遠心分離（10,000×*g*, 30 min, 4°C）後, 得られた上清をファージ分離用のサンプルとした。

ファージの検出は次の通りに行った。すなわち, 2.0% NaCl 含有 0.5%軟寒天 3.5 ml に *P. damselae* JCM8969 新鮮培養菌液を 100 µl 接種し, 1.5% NaCl 添加 Tryptic Soy Agar（TSAS; Becton-Dickinson）平板に重層した。軟寒天が固化した後, ファージ分離用サンプル 10 µl を平板上に滴下し, 25°C で 24 時間培養した。培養後, プラーク形成の有無によりファージの存在を判断した。

ファージの存在が確認できた場合,プラークアッセイ法によりファージを分離した。すなわち, 2.0% NaCl 含有軟寒天 3.5 ml に *P. damselae* JCM8969 培養液を 100 µl, 段階希釈したサンプル溶液 100 µl を接種し, TSAS 平板に重層した。25°C で 24 時間培養後, 出現したプラークを分離し, SM buffer (Table 1-2) に懸濁した。4°C で 30 分間保持した後, フィルター濾過（孔径; 0.45 µm, PVDF; Merck Millipore, Billerica, MA, USA）により細菌を除去したものをファージ溶液とした。この操作（単一プラークの分離）を最低 3 回繰り返してファージを純化した。

1-1-3. ファージ Phda1 の宿主域分析

Table 1-1 に示した供試菌株を用いて Phda1 の宿主域を調べた。0.5%軟寒天 3.5 ml に供試菌の新鮮培養菌液 200 µl を接種し, 平板培地に重層した。室温で軟寒天を固化させた後, Phda1 懸濁液 10 µl を平板上にスポットし, 各菌株の適温にて培養した。プラーク形成の有無から Phda1 の宿主域を判定し, 透明なプラークを +, 不透明なプラークを +/–, プラークのできなかったものを – とした。

1-1-4. ファージ Phda1 の精製

Phda1 は, ポリエチレングリコール（PEG）による濃縮後, 塩化セシウム密度勾配超遠心により精製した。すなわち, *P. damselae* JCM8969 を TSBS で対数増殖期になるまで培養した後, 感染多重度（MOI, Multiplicity of Infection）= 0.1 となるように Phda1 を接種した。25°C で培養し Phda1 を増殖させた後, 培養液を遠心分離（10,000×*g*, 30 min, 4°C）し, フィルター濾過（孔径; 0.45 µm）により菌体を除去した。上清に含まれる菌体由来の DNA および RNA は, 1 µg/ml DNase I および RNase A（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）処理（室温, 1 h）により分解後, この上清に NaCl を 1 M となるように添加した。氷上で 1 時間保持した後, PEG6,000（Wako Pure Chemical Industries, Osaka）を 10%となるように添加し, 4°C で 12 時間以上保持した。この混合液を遠心分離（10,000×*g*, 20 min, 4°C）し, ペレットを SM buffer に懸濁後, 4°C で 12 時間保持した。懸濁液に等量のクロロホルムを混合後, 遠心分離（10,000×*g*, 10 min, 4°C）を行い, PEG を除去し, ファージ濃縮液を得た。

ファージ濃縮液は塩化セシウム密度勾配超遠心（100,000×*g*, 2 h, 4°C, d = 1.3, 1.5, 1.7）により精製し, SM buffer を用いて透析（MWCO 50,000, Spectrum Laboratories; Rancho Dominguez, CA, USA）により塩化セシウムを除去した。透析後のファージ溶液を精製ファージ溶液として以後の実験に供した。

1-1-5. ファージ Phda1 の透過型電子顕微鏡観察

透過型電子顕微鏡（TEM）によりファージの形態を観察した。Phda1 溶液 10 µl をシャーレ上に滴下し, グリッド（エクセルサポートフィルム; Nisshin EM, Tokyo）を載せ, 5 分間の保持によってファージをグリッドに吸着させた。余剰なファージ溶液を濾紙により除去後, 2.5%酢酸サマリウム（III）によるネガティブ染色を行った（Nakakoshi *et al*., 2011）。染色液はグリッドに接触後すぐに濾紙で除去し, 同様の染色操作を再度行った。試料は TEM（JEM-1011; JEOL, Tokyo）により観察し, ファージの形態から科レベルの同定を行った。

1-1-6. ファージ Phda1 のプラークアッセイ用最適培地の検討

Phda1 のプラーク形成数測定の最適化のため, プラークアッセイ法に用いる最適培地の検討を行った。10^8 PFU/ml に調整した Phda1 溶液を TSAS 平板培地または 1–50 mM $CaCl_2$ または $MgSO_4$ 含有 TSAS 平板培地を用いたプラークアッセイによりプラーク形成数を測定した。各培地におけるプラーク形成数は, TSAS 平板でのプラーク形成数を 100 とした相対値で表し, プラーク形成数測定のための最適培地を決定した。

1-1-7. ファージ Phda1 の吸着率測定

TSBS 24.75 ml に *P. damselae* JCM8969 の新鮮培養菌液を 10^5 CFU/ml となるように 250 µl 接種した。25°C で培養し, 培養液の OD_{600} が 0.2 となった時点で, Phda1 を MOI = 0.1 となるように接種した。25°C で培養し, 培養液を継時的に 1 ml 採取した。採取した培養液は遠心分離（10,000×*g*, 1 min, 4°C）後, フィルター濾過（孔径; 0.45 µm, PVDF; Merck Millipore）により菌体および菌体に吸着したファージを除去した。その後, 濾液中に含まれるファージの数を *P. damselae* JCM8969 を用いたプラークアッセイ法により測定した。培養 0 分時のプラーク形成数と各培養時間におけるプラーク形

成数を比較し, Phda1 の吸着率（%）を算出した。これ以降, 断りのない限りは Phda1 のプラークアッセイには 2%NaCl 含有 0.5%軟寒天 3.5 ml および 25 mM $MgSO_4$ 含有 TSAS 平板培地を用い, 25°C で 24 時間培養後, プラーク形成数を測定した。

1-1-8. ファージ Phda1 の一段増殖実験

TSBS 9.9 ml に 10^5 CFU/ml となるように *P. damselae* JCM8969 懸濁液 100 µl を接種し, OD_{600} が 0.2 となるまで 25°C で培養した。Phda1 を MOI = 0.1 となるように接種後, 25°C で 5 分間保持し菌体にファージを吸着させた。遠心分離（10,000×*g*, 2 min, 4°C）によりファージが吸着した菌体を沈殿させ, ペレットを新鮮な TSBS 10 ml により懸濁後, 25°C で 150 分間培養した。10 分毎に培養液を採取し, プラークアッセイ法によりプラーク形成数を測定後, プラーク形成数の変化から Phda1 の潜伏期, 上昇期, バーストサイズを算出した。

1-1-9. ファージ Phda1 の安定性試験

Phda1 の耐熱性, 耐 pH 性および耐凍性を以下のように測定した。

耐熱性は, TSBS 900 µl に Phda1 を 10^7 PFU/ml となるように 100 µl 懸濁し, 各温度（60〜85°C）で 30 分間加熱した。加熱中 5 分毎に懸濁液を採取し, プラークアッセイ法によりプラーク形成数を測定した。プラーク形成数の変化から Phda1 の耐熱性を評価した。

耐 pH 性は次のように行った。塩酸または水酸化ナトリウムにより pH を調整した TSBS 950 µl に Phda1 を 10^7 PFU/ml となるように 50 µl 接種し, 30°C で 24 時間保持した。その後, プラークアッセイ法により培養液のプラーク形成数を測定し, Phda1 の耐 pH 性を評価した。

耐凍性試験は次のように行った。TSBS 995 µl に 10^3, 10^5, 10^7 PFU/ml となるように Phda1 懸濁液を 5 µl 接種し, –20, –40, –80°C で 0〜4 週間凍結した。解凍は 20°C で 30 分間行い, 解凍後の TSBS 中に含まれる Phda1 のプラーク形成数をプラークアッセイ法により求めた。凍結期間におけるプラーク形成数の変化から Phda1 の耐凍性を評価した。

1-1-10. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育に及ぼすファージ Phda1 の影響

TSBS 4.5 ml に 10^5 CFU/ml となるよう *P. damselae* JCM8969 を接種し, バイオフォトレコーダー（TN-1506; Advantec, Tokyo）にて 25°C で静置培養した。OD_{660} が 0.2 となった時に Phda1 を MOI = 1, 10, 100 となるように接種し, バイオフォトレコーダーで OD_{660} を継時的に測定した。

Table 1-1. Bacterial strains used in this study and culture conditions

Bacterial species	Strain	Used medium	Culture condition
Gram-negative bacteria			
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	JCM8967	TSBS	25°C, 15 h
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	JCM8968	TSBS	25°C, 15 h
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	JCM8969	TSBS	25°C, 15 h
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	MA1	TSBS	25°C, 15 h
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	MA2	TSBS	25°C, 15 h
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	MA3	TSBS	25°C, 15 h
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	OY1	TSBS	25°C, 15 h
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	OY2	TSBS	25°C, 15 h
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	SW1	TSBS	25°C, 15 h
Photobacterium damselae subsp. *piscicida*	Dpp-1	TSBS	25°C, 15 h
Photobacterium phosphoreum	JCM20393	TSBS	20°C, 18 h
Photobacterium phosphoreum	NBRC13896	TSBS	20°C, 18 h
Photobacterium phosphoreum	NBRC103031^T	TSBS	20°C, 18 h
Photobacterium ganghwense	JCM12487	TSBS	25°C, 18 h
Photobacterium lutimaris	JCM13586	TSBS	20°C, 18 h
Cronobacter muytjensii	ATCC51329	TSB	30°C, 18 h
Escherichia coli	RIMD0509939	TSB	30°C, 18 h
Morganella morganii subsp. *morganii*	NBRC3848^T	TSB	30°C, 18 h
Proteus vulgaris	ATCC33420	TSB	30°C, 18 h
Salmonella enterica serovar Enteritidis	NBRC3313	TSB	30°C, 18 h
Salmonella enterica serovar Typhimurium	IID1000	TSB	30°C, 18 h
Yersinia enterocolitica	ATCC9610^T	TSB	30°C, 18 h
Vibrio alginolyticus	LMG4409^T	TSBS	25°C, 18 h
Vibrio anguillarum	LMG4437^T	TSBS	25°C, 18 h
Vibrio cincinnatiensis	LMG7891^T	TSBS	25°C, 18 h
Vibrio fluvialis	LMG7894^T	TSBS	25°C, 18 h
Vibrio harveyi	LMG4044^T	TSBS	25°C, 18 h
Vibrio metschnikovii	LMG11664^T	TSBS	25°C, 18 h
Vibrio natriegens	LMG10935^T	TSBS	25°C, 18 h
Vibrio furnissii	LMG7910^T	TSBS	25°C, 18 h
Vibrio parahaemolyticus	NBRC12711^T	TSBS	30°C, 18 h
Vibrio vulnificus	LMG13545^T	TSBS	25°C, 18 h
Gram-positive bacteria			
Bacillus cereus	JCM2152^T	TSB	30°C, 18 h
Listeria grayi	ATCC25401	TSBYE	30°C, 18 h
Listeria innocua	ATCC33090^T	TSBYE	30°C, 18 h
Listeria monocytogenes	ATCC7644	TSBYE	30°C, 18 h
Staphylococcus aureus	NBRC14462	TSB	30°C, 18 h

TSB; Tryptic soy broth, TSBS; TSB supplemented with 1.5% NaCl, TSBYE; TSB supplemented with 0.6% yeast extract.

Table 1-2. Composition of SM buffer

Ingredient	
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	6.06 g
NaCl	5.84 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.97 g
Gelatin (Wako)	0.1 g
Distilled water	1000 ml
	(pH 7.5)

pH was adjusted with HCl.

結果および考察

1-1-1. *P. damselae* subsp. *damselae* ファージの分離

本研究では, Carvalho ら（2010）の報告に基づき, 培養法によりファージの分離を試みた。ファージの分離方法には, サンプルの乳剤を直接プラークアッセイに供してファージを分離する方法と, サンプルの乳剤を指標菌と培養することによりファージを増殖させた後に検出する方法がある。培養法では, ファージ増殖の過程でホストへの感染および溶菌が必要であるため, 溶菌力の高いファージが優先して増殖してくると期待できる。Carvalho ら（2010）は, *Campylobacter* ファージの分離法について鶏肉を SM buffer で保持後にファージを検出する方法と, 400 μg/ml $CaCl_2$ および $MgSO_4$ を加えた液体培地で培養後にファージを分離する手法を比較した。その結果, 前者では *Campylobacter* ファージは分離できなかったが, 後者では 43 株のファージを分離できたと報告している。このことは培養法が直接分離法よりも高感度にファージを分離可能であることを示している。また, 2 価カチオン, 特に Ca^{2+}および Mg^{2+}イオンの存在がファージの感染を促進することが過去に報告されており（Rountree, 1955; Landry and Zsigray, 1980; Bandara *et al*., 2012; Chhibber *et al*., 2014）, 培地への $CaCl_2$ および $MgSO_4$ の添加によりファージの増殖促進が期待される。本研究では, 培養法を用いた *P. damselae* subsp. *damselae* ファージのスクリーニングの結果, 130 サンプル中 7 サンプルで *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 に感染するファージを検出し, 生牡蠣より Phda1, Phda2, Phda3, Phda4, Phda5 の 5 株の分離に成功した。分離したファージのうち, 継代培養の安定性や, プラークの透明度・大きさから Phda1 を以後の性状検査に用いることとした。

1-1-2. ファージ Phda1 の宿主域

Phda1 の溶菌スペクトルを Table 1-3 に示した。実験に用いたグラム陰性菌 32 株, グラム陽性菌 5 株のうち Phda1 に感受性を示した株は *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 のみであった。*P. damselae* JCM8969 以外の *P. damselae* subsp. *damselae* 8 株には Phda1 はプラークを形成しなかった。したがって, Phda1 は宿主特異性の極めて高いファージであると示唆された。ファージの感染はホスト細胞への吸着に始まり,

宿主特異性はホスト細胞表面のレセプターの特性に依存する（Kutter *et al*., 2004）。ファージ吸着のレセプターには細胞表面のタンパク質やリポ多糖, 鞭毛, 繊毛, 莢膜多糖など様々な物質が知られており, Phda1 は *P. damselae* JCM8969 に特異的なレセプターに対して吸着を行っていると推察される。

1-1-3. ファージ Phda1 の形態学的特徴

TEM により, ファージの形態観察および同定を行った。通常, ファージのネガティブ染色では酢酸ウラニルを用いることが多いが, 酢酸ウラニルは放射性物質であるため人体に有害であり取扱いが難しい。そこで本研究では, 酢酸ウラニルと同等の染色性を有すると報告されている酢酸サマリウム（III）をネガティブ染色に用いた（Nakakoshi *et al*., 2011）。2.5%酢酸サマリウム（III）を用いたネガティブ染色後の TEM 観察像は Fig. 1-1 に示した。Phda1 は頭部および尾部から成る *Caudovirales* 目のファージであり, 頭部は 62 ± 4.6 nm（mean ± SD）, 尾部は 110 ± 4.9 nm（mean ± SD）であった（n = 32）。通常, ファージの TEM 観察では科レベルまでの同定が可能である。*Caudovirales* 目ファージには *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* の 3 つの科が存在し, それぞれの尾部の形状から判別が可能である。*Siphoviridae* は長い非伸縮性の尾部, *Myoviridae* は鞘のある伸縮性の尾部, そして *Podoviridae* は短い非伸縮性の尾部を有する（Ackermann, 2004）。これまで TEM により観察されたファージのうち, 96%は尾部を有する *Caudovirales* 目ファージであり, そのうち *Siphoviridae* は約 61%, *Myoviridae* は約 25%, *Podoviridae* は約 14%であると報告されている（Ackermann, 2001）。本研究で分離された *P. damselae* ファージ Phda1 は, 頭部とともに鞘のある尾部が観察され, *Caudovirales* 目 *Myoviridae* 科ファージに属すると同定した（Fig. 1-1）。

1-1-4. ファージ Phda1 のプラークアッセイ用最適培地

一部のファージは, Ca^{2+}や Mg^{2+}の二価カチオンにより増殖が活性化されることが知られており（Rountree, 1955; Landry and Zsigray, 1980; Bandara *et al*., 2012; Chhibber *et al*., 2014）, ファージ数を測定するためのプラークアッセイ法においても, 培地組成の変化によりファージのプラーク形成数が変化することが推察される。そこで, 培地に Ca^{2+}または Mg^{2+}を添加し, Phda1 のプラーク形成数測定を行うための適切な培地を決

定した。Phda1 のプラーク形成数は Ca^{2+}または Mg^{2+}イオンの添加により大きく向上し, Ca^{2+}イオンでは 25 mM の添加で 172%, Mg^{2+}イオンでは 182%となった。しかし, 50 mM Ca^{2+} または Mg^{2+}イオンの添加区では, Phda1 のプラーク形成数は 25 mM 添加区よりも低くなった（Table 1-4）。そのため, 今後の実験では Phda1 のプラークアッセイに 25 mM $MgSO_4$ 含有 TSAS 平板培地を用いることとした。

1-1-5. ファージ Phda1 の菌体への吸着率

P. damselae subsp. *damselae* JCM8969 菌体に対する Phda1 の TSBS 中 25°C における吸着率の時間変化を Fig. 1-2 に示した。Phda1 は, 接種後すぐに菌体に吸着を始め, その吸着率は培養 30 分で 40%, 培養 60 分で 66%となった。過去のビブリオ科感染ファージの例では, sea water broth での培養 20 分後の *V. parahaemolyticus* ファージ Vp15P, Vp17P, Vp25P, Vp33P の吸着率がそれぞれ 100, 92, 96, 98%と報告されている（Hidaka and Tokushige, 1978）。本研究で用いた培地は TSBS であるが, これらのファージと比較すると Phda1 の吸着率は低いものであった。

1-1-6. ファージ Phda1 の一段増殖曲線

ファージの一段増殖曲線を調べることによって, ファージ感染時の潜伏期, 暗黒期, 上昇期, バーストサイズを求めることが可能である。ファージが吸着してから菌体内で複製を終了するまでを暗黒期, 吸着から溶菌を開始するまでを潜伏期, 溶菌が開始してから終了するまでを上昇期, そして 1 つの感染細胞中で複製されるファージ粒子の数をバーストサイズという。

TSBS での Phda1 の一段増殖曲線を Fig. 1-3 に示した。Phda1 は感染開始後 60 分までは溶菌を開始しなかった。それ以降 Phda1 による溶菌が始まり, 培養 110 分で溶菌が終了し Phda1 濃度は一定となった。すなわち, TSBS における Phda1 の潜伏期は 60 分間, 上昇期は 50 分間, バーストサイズは 19 phages / an infected cell と決定した。*V. parahaemolyticus* ファージ Vp15P, Vp17P, Vp25P, Vp33P の潜伏期はそれぞれ 95 分, 80 分, 120 分, 110 分であり, 上昇期は 40 分, 70 分, 60 分, 65 分であった。また, 各ファージのバーストサイズは 5, 300, 7, 150 particles / cell と報告されている（Hidaka and Tokushige, 1978）。ファージの利用を考えた際, 短い潜伏期と大きいバーストサイズを

持つファージが抗菌物質として適していると考えられる。これらのファージと比較すると, Phda1 の潜伏期は短く優れているものの, バーストサイズは Vp17P や Vp33P に劣ると言える。

1-1-7. ファージ Phda1 の安定性

TSBS での Phda1 の熱安定性および pH 安定性を Fig. 1-4 に示した。Phda1 は 60°C, 30 分間までの加熱ではほぼ安定であったが, 70°C, 30 分間の加熱でプラーク形成数が 4.7 log PFU/ml まで減少した。75°C および 80°C, 20 分間の加熱で検出限界未満（1 log PFU/ml）となり, 85°C では 5 分間の加熱で検出限界未満となった（Fig. 1-4A）。また, pH 耐性に関しては, Phda1 は pH4.0～10.0, 30°C, 24 時間の保持に安定であった。しかし, pH3.0 以下の酸性下, pH11.0 以上のアルカリ性下ではプラーク形成数が大きく減少した （Fig. 1-4B）。

Phda1 の凍結耐性を Fig. 1-5 に示した。–20°C, –40°C および–80°C における Phda1 の凍結耐性は接種濃度によらず一定であり, 凍結 4 週間後においてもプラーク形成数の減少は認められなかった（Fig. 1-5）。

E. coli および *S. enterica* に感染するファージ SFP1 は 70°C の加熱により 54%が失活し, 75°C の加熱により完全に失活したと報告されている（Park *et al*., 2012）。また, pH 耐性に関しては, pH4～10 で安定であり, Phda1 とほぼ同等であった。水産物への接種を想定した場合, 本研究で明らかとなった熱耐性, pH 耐性および凍結耐性より Phda1 は低温流通時に魚肉中で安定であると考えられる。

1-1-8. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育に及ぼす Phda1 の影響

TSBS 系において濁度法（OD_{660}）により, *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 に対する Phda1 の発育抑制能を種々の MOI で評価した。Phda1 未接種のコントロールでは, *P. damselae* の OD_{660} は培養 24 時間で 1.0 まで上昇した。MOI = 1.0 で Phda1 を接種した場合, ファージによる発育抑制効果はほとんど見られなかった。MOI = 10 で接種した場合においても発育抑制能はほとんどなかったが, OD_{660} は 0.6 で一定となった。Phda1 の MOI = 100 での接種時でのみ発育抑制能が確認され, ファージ接種後に *P. damselae* の発育がわずかに遅延された。しかし, 培養 9 時間目から再び増殖が始まり,

OD_{660} は最終的に 0.6 で一定となった (Fig. 1-6)。そのため, Phda1 による *P. damselae* 制御には MOI = 100 以上での使用が適切と判断された。

Phda1 による発育遅延後に見られたような再増殖は他のファージを用いた研究においても多数報告されている（Morita *et al*., 2002; Carey-Smith *et al*., 2006; Park *et al*., 2012）。これらの研究では, ファージ接種により遅延または低下した生菌数および濁度が培養の継続により再上昇したことが示されており, 単一のファージ処理では細菌の完全な発育阻害が困難なことを示唆している。一方, ファージを複数株混合したファージカクテルを用いることにより, これを解決できるとする報告も存在する。Tanji ら（2004）は, *E. coli* O157:H7 ファージによる発育抑制を検討し, ファージ SP21 と SP22 を混合したカクテルによって *E. coli* O157:H7 の再増殖が単独接種した場合よりも大幅に遅延できることを示している。したがって, *P. damselae* 制御においても, ファージカクテルの利用によって, Phda1 の宿主域を補うことや再増殖の抑制を行うことが可能であると推察される。

Table 1-3. Host range of Phda1

Bacterial species	Strains	Plaque formation
Gram-negative bacteria		
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	JCM8967	-
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	JCM8968	-
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	JCM8969	+
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	MA1	-
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	MA2	-
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	MA3	-
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	OY1	-
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	OY2	-
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	SW1	-
Photobacterium damselae subsp. *piscicida*	Dpp-1	-
Photobacterium phosphoreum	JCM20393	-
Photobacterium phosphoreum	NBRC13896	-
Photobacterium phosphoreum	NBRC103031^T	-
Photobacterium ganghwense	JCM12487	-
Photobacterium lutimaris	JCM13586	-
Cronobacter muytjensii	ATCC51329	-
Escherichia coli	RIMD0509939	-
Morganella morganii subsp. *morganii*	NBRC3848^T	-
Proteus vulgaris	ATCC33420	-
Salmonella enterica serovar Enteritidis	NBRC3313	-
Salmonella enterica serovar Typhimurium	IID1000	-
Yersinia enterocolitica	ATCC9610^T	-
Vibrio alginolyticus	LMG4409^T	-
Vibrio anguillarum	LMG4437^T	-
Vibrio cincinnatiensis	LMG7891^T	-
Vibrio fluvialis	LMG7894^T	-
Vibrio harveyi	LMG4044^T	-
Vibrio metschnikovii	LMG11664^T	-
Vibrio natriegens	LMG10935^T	-
Vibrio furnissii	LMG7910^T	-
Vibrio parahaemolyticus	NBRC12711^T	-
Vibrio vulnificus	LMG13545^T	-
Gram-positive bacteria		
Bacillus cereus	JCM2152^T	-
Listeria grayi	ATCC25401	-
Listeria innocua	ATCC33090^T	-
Listeria monocytogenes	ATCC7644	-
Staphylococcus aureus	NBRC14462	-

+, clear plaque; -, no plaque.

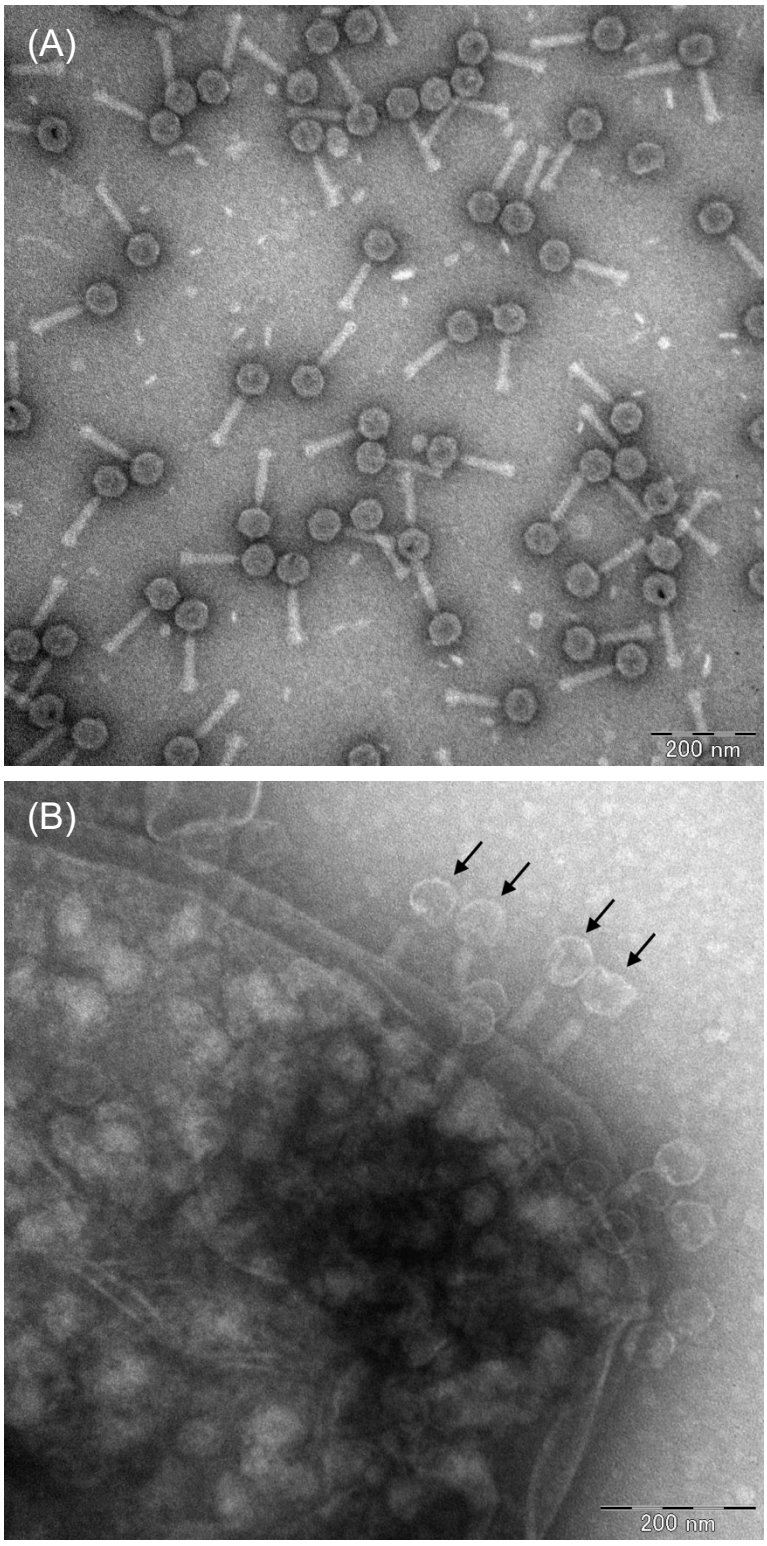


Fig. 1-1. Transmission electron microscopic images of Phda1 (A) and adsorbed Phda1 to *P. damselae* JCM8969 (B).

Arrows indicate Phda1 adsorbed to the host cell. The scale bars indicate 200 nm.

Table 1-4. Effect of divalent cations on relative plaque forming unit (%) of phage Phda1

	0 mM	1.0 mM	10 mM	25 mM	50 mM
Ca^{2+}	100	130 ± 12.3	148 ± 10.1	172 ± 7.3	160 ± 7.3
Mg^{2+}	100	105 ± 11.2	156 ± 9.1	182 ± 2.0	169 ± 13.3

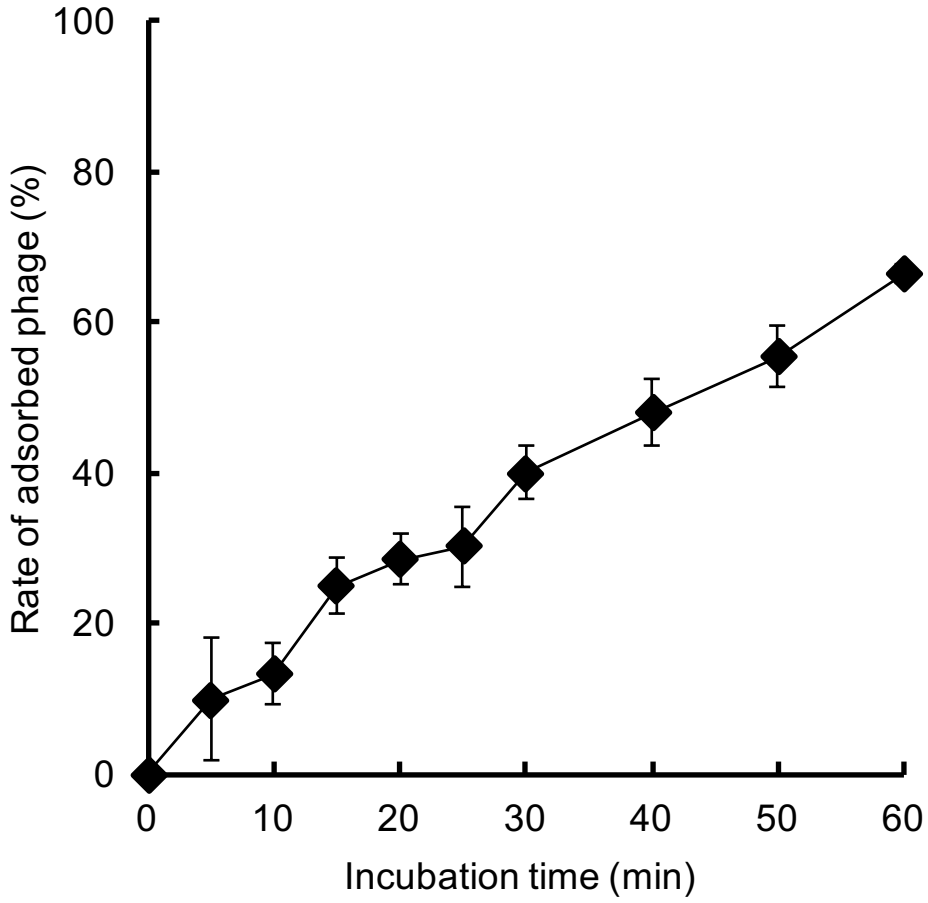


Fig. 1-2. Changes in adsorption rate of Phda1 against *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 during incubation in TSBS at 25°C.

Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

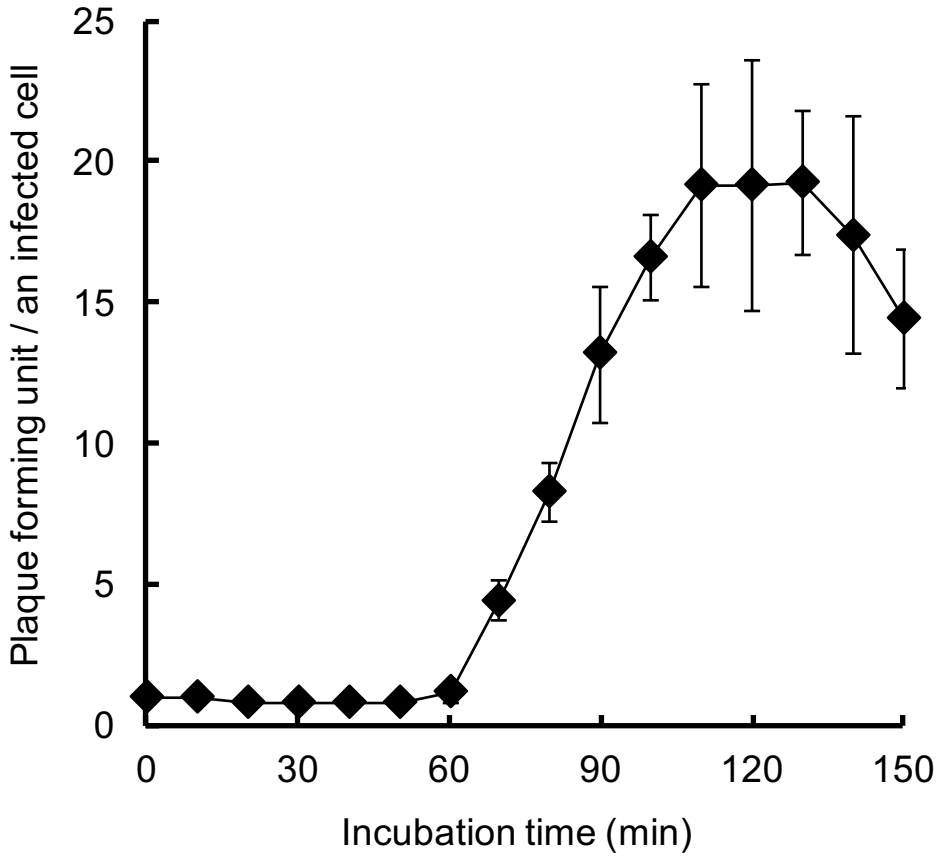


Fig. 1-3. One-step growth curve of Phda1 on *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 incubated in TSBS at 25°C.

Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

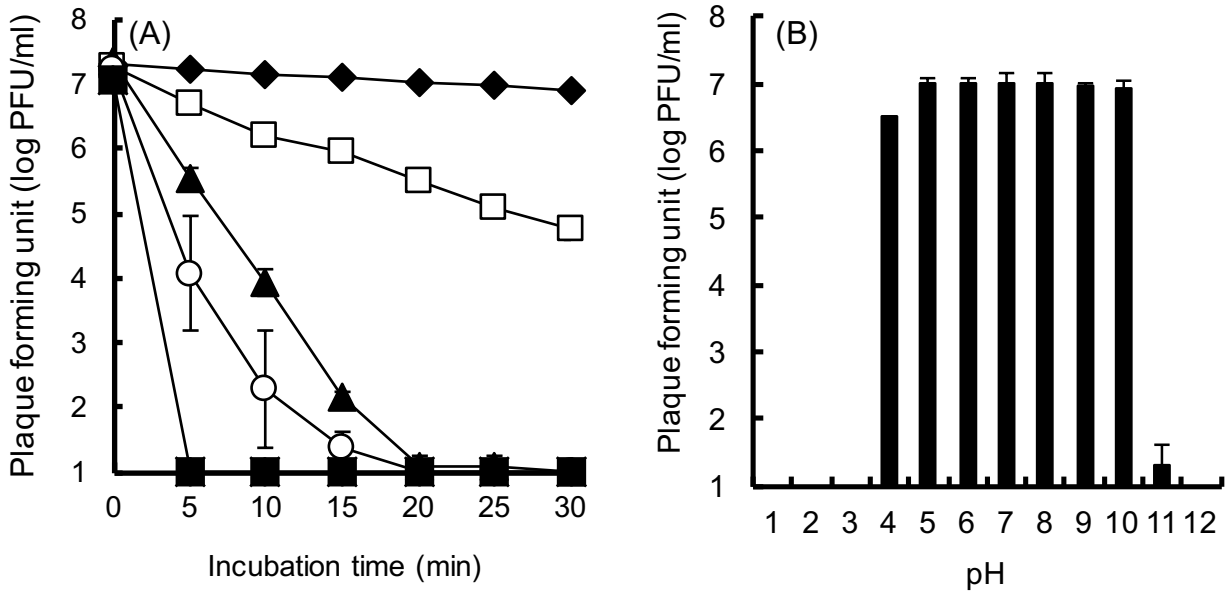


Fig. 1-4. Thermal stability in TSBS at pH7.3 (A) and pH stability in TSBS at 30°C for 24 h (B) of Phda1.

Symbols represent the phages heated at 60°C (◆), 70°C (□), 75°C (▲), 80°C (○) and 85°C (■). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

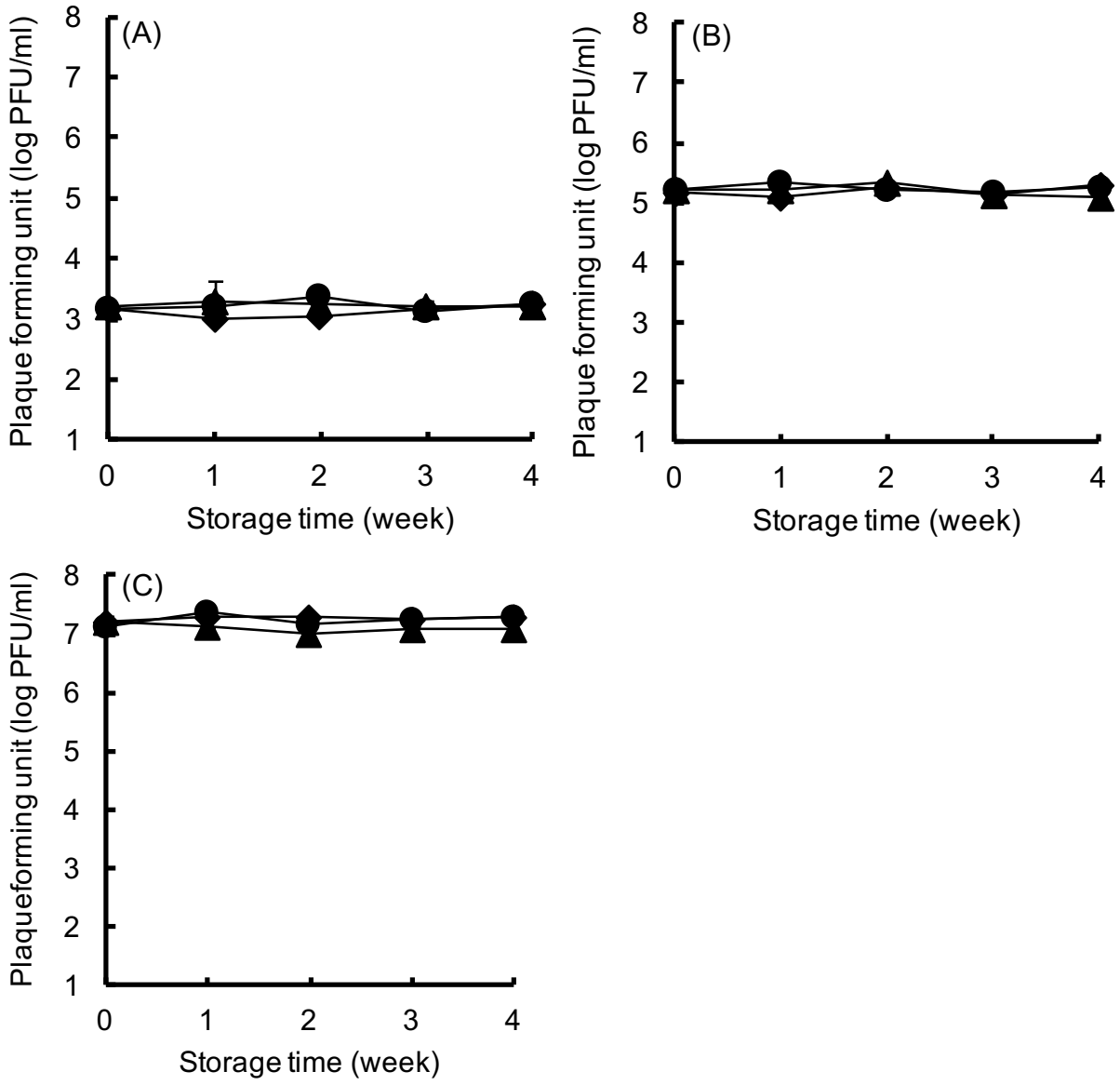


Fig. 1-5. Freezing stability of Phda1 in TSBS inoculated at 10^3 (A), 10^5 (B) or 10^7 (C) PFU/ml in TSBS.

Symbols represent the phages frozen at –20°C (●), –40°C (▲) and –80°C (◆). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

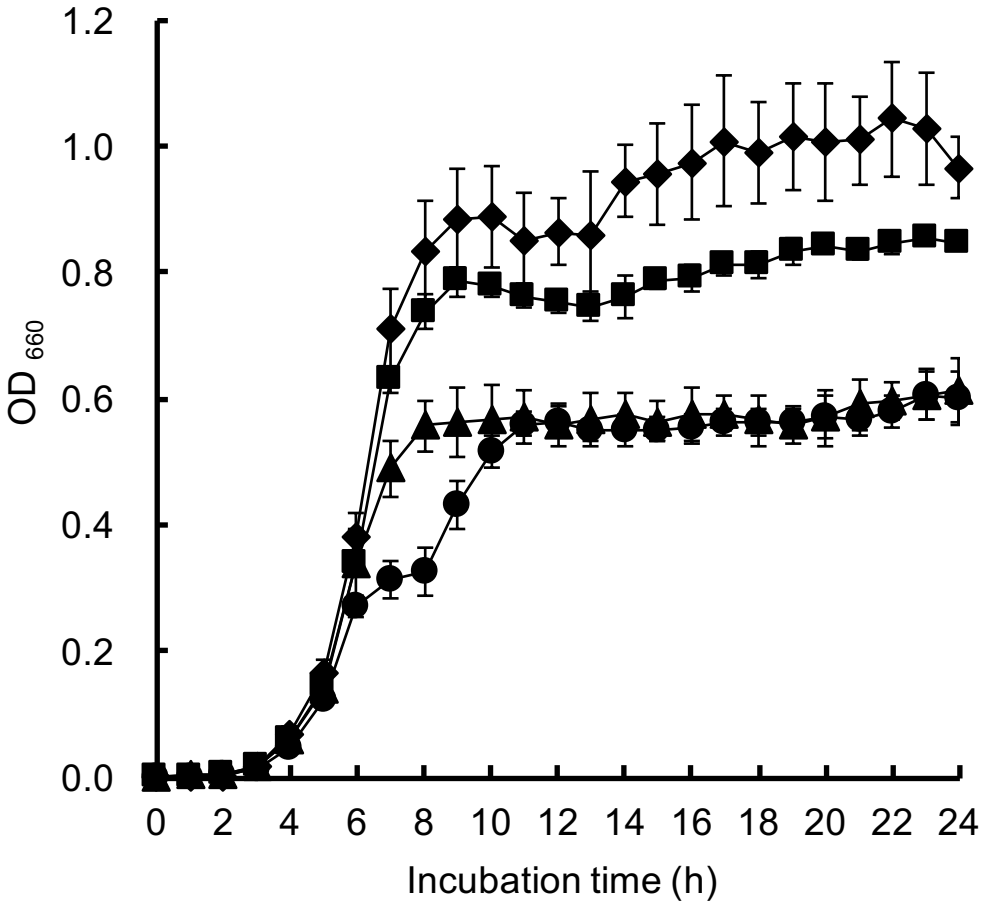


Fig. 1-6. Changes in the growth of *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 at 25°C with Phda1 treatment.

Symbols represent control (◆), Phda1 treatment at MOI = 1 (■), 10 (▲) or 100 (●). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

第 2 節　ファージ Phda1 の感染サイクルに及ぼす化学的要因の影響

前節では, ヒスタミン生成菌 *P. damselae* subsp. *damselae* に感染するファージ Phda1 を分離し, 吸着率や一段増殖曲線などの性状を調べた。しかし, ファージの吸着や増殖は pH や二価カチオンの存在に影響を受けることが知られている（Binetti *et al*., 2002; Marcó *et al*., 2010; Chhibber *et al*., 2014）。本節では, ファージ Phda1 の吸着および増殖に及ぼす pH と二価カチオンの影響について調べた。

試料および方法

1-2-1. ファージ Phda1 の吸着率に及ぼす pH および二価カチオンの影響

Phda1 の吸着率に及ぼす pH の影響については次のように評価した。すなわち, *P. damselae* subps. *damselae* JCM8969 を 10^5 CFU/ml となるように TSBS 5 ml に接種し, OD_{600} が 0.2 となるまで 25°C で培養した。その後, TSBS（pH5.0～9.0）で集菌洗浄（10,000×*g*, 2 min, 4°C）し, Phda1 を MOI = 0.1 となるように培養液に接種した。25°C で 30 分間培養後, 培養液を 1 ml 採取し, 遠心分離（10,000×*g*, 1 min, 4°C）およびフィルター濾過（孔径; 0.45 μm）により菌体に吸着したファージを除去した。濾液に含まれる遊離ファージ数をプラークアッセイ法により測定し, 0 分目の遊離ファージ数との比較から吸着率を算出した。

Phda1 の吸着率に及ぼす二価カチオンの影響については次のように評価した。すなわち, *P. damselae* subps. *damselae* JCM8969 を 10^5 CFU/ml となるように 1 mM $CaCl_2$, $MgSO_4$, $FeCl_2$, $MnCl_2$ または $ZnCl_2$ を含有した改変 TSBS（Table 1-5）に接種し, OD_{600} が 0.2 となるまで 25°C で培養した。これに Phda1 を MOI = 0.1 となるように接種し, 25°C で 5 分間培養後, 培養液を 1 ml 採取した。遠心分離（10,000×*g*, 1 min, 4°C）およびフィルター濾過（孔径; 0.45 μm）により菌体に吸着したファージを除去し, 濾液に含まれる遊離ファージ数をプラークアッセイ法により測定し, Phda1 の吸着率に及ぼす二価カチオンの影響について調べた。

また, 1, 10, 25 mM $CaCl_2$ または $MgSO_4$ を含有した改変 TSBS を用いて, Phda1 の吸着率に及ぼす Ca^{2+}および Mg^{2+}濃度の影響も同様に調べた。

1-2-2. ファージ Phda1 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響

1 mM $CaCl_2$, $MgSO_4$ または $FeCl_2$ を含有した改変 TSBS 9.9 ml に 10^5 CFU/ml となるように *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 菌液を 100 µl 接種した。OD_{600} が 0.2 となるまで 25°C で培養し, Phda1 を MOI = 0.1 となるように接種した。これを 25°C で 5 分間培養し菌体にファージを吸着させた後, 遠心分離（10,000×*g*, 2 min, 4°C）と上清の除去により未吸着ファージを除去した。二価カチオンを含んだ新鮮な改変 TSBS 10 ml にペレット（沈殿）を懸濁し, 25°C で培養した。培養液を継時的に採取し, プラークアッセイ法によりプラーク形成数を測定し, 得られた一段増殖曲線から Phda1 の潜伏期, 上昇期, バーストサイズを算出した。

また, 1, 10, 25 mM $CaCl_2$ または $MgSO_4$ 含有改変 TSBS を用いて, Phda1 の増殖に及ぼす Ca^{2+}, Mg^{2+}濃度の影響も同様に調べた。

Table 1-5. Composition of modified TSBS

Ingredient	
Tryptone (BD)	17 g
Phytone peptone (BD)	3.0 g
Glucose	2.5 g
NaCl	20 g
Distilled water	1000 ml
	(pH 7.3)

Medium was autoclaved at 121°C for 15 min.

結果および考察

1-2-1. ファージ Phda1 の吸着率に及ぼす pH の影響

細菌細胞に対するファージの吸着は, ファージの持つレセプター結合タンパク質とホスト細胞表面のファージレセプターとの結合により行われる。そのため, レセプター結合タンパク質とファージレセプターの親和性は pH などの環境条件の変化により大きく変動すると考えられる。しかし, ファージの吸着率に及ぼす pH の影響に関する情報は多くはない。例えば, Binetti ら（2002）は, *Streptococcus thermophilus* ファージの吸着に関して pH6～7 が最適としており, Marcó ら（2010）は *Lactobacillus plantarum* ファージの吸着は pH5～7 が最適であると報告している。異なる pH 条件下での TSBS における Phda1 の吸着率を Fig. 1-7 に示した。pH7 での Phda1 は, 33.7%が *P. damselae* JCM8969 細胞に吸着したが, pH8～9 では吸着率が約 7%にまで減少した。一方, pH6 での吸着率は 96.3%, pH5 では 99.4%まで上昇した。すなわち, 前述した *S. thermophilus* ファージや *L. plantarum* ファージの例とは異なり, Phda1 のレセプター結合タンパク質とホスト表面上のレセプターの親和性は pH5～6 の弱酸性環境下で向上することが明らかとなった。

1-2-2. ファージ Phda1 の吸着率に及ぼす二価カチオンの影響

ファージの感染の第一ステップとして, ホスト細胞に対するファージの吸着は非常に重要である。これまで, 様々なファージの吸着に関して二価カチオンの影響が報告されている。二価カチオンがファージの吸着を促進するメカニズムとして, 負にチャージするファージに二価カチオンが付着し, 負にチャージしている細菌細胞表面への吸着を静電気的に援助すると考えられているが（Puck *et al*., 1951）, 詳細なメカニズムは不明である。これまで, 二価カチオンによる吸着促進効果は *Staphylococcus* ファージ（Rountree, 1951）や *Bacillus cereus* ファージ（Bandara *et al*., 2012）でも報告されているが, *S. thermophilus* ファージでは Ca^{2+}イオンの影響はないとされている（Binetti *et al*., 2002）。すなわち, ファージの吸着に及ぼす二価カチオンの影響は各ファージによって様々であると推察される。

そこで, Phda1 の吸着に及ぼす二価カチオンの影響について調べた結果, 25°C, 5 分間培養後の Phda1 の吸着率は, コントロールで 3.1%となったが, 1 mM Ca^{2+}, Mg^{2+}および Fe^{2+}イオン存在下では, それぞれ 17.7%, 18.9%, 24.0%となった。しかし, Mn^{2+}では 10.0%, Zn^{2+}では 0.5%であり, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}イオンほどの吸着促進効果はなかった（Fig. 1-8）。このように, Phda1 においても二価カチオンによる吸着の影響があることが明らかとなり, 特に Ca^{2+}, Mg^{2+}および Fe^{2+}イオンにより菌体への吸着が大きく促進されることが示された。

次に, ファージの吸着作用を促進するとの報告が多い Mg^{2+}および Ca^{2+}イオンの濃度の影響について検討した。本研究では, 1〜50 mM $CaCl_2$ または $MgSO_4$ を用いて Phda1 の吸着率と Ca^{2+}, Mg^{2+}イオン濃度の関係を調べ Table 1-6 に示した。Ca^{2+}および Mg^{2+}イオンのいずれも濃度依存的に Phda1 の吸着率を向上させ, 1 mM Ca^{2+}, Mg^{2+}の添加により吸着率は未添加コントロールの 6 倍程度まで向上した。Phda1 の *P. damselae* に対する吸着率は, 25 mM Mg^{2+}存在下で 74.1%, 25 mM Ca^{2+}存在下で 79.3%と最も高くなった。すなわち, これら二価カチオンを用いることにより, ホスト細胞への Phda1 の吸着率を大きく向上させられることが確認された。

1-2-3. ファージ Phda1 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響

前項でファージのホストに対する吸着率に及ぼす二価カチオンの影響を調べた結果, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}イオンが Phda1 のホスト細胞に対する吸着を促進することが判明した。そこで, 一段増殖実験で Phda1 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響を調べた。ファージ増殖に及ぼす二価カチオンの影響について調べた既報では（Rountree, 1955; Landry and Zsigray, 1980; Chhibber *et al*., 2014）, いずれも Ca^{2+}がファージの増殖の活性化に適していると結論づけている。

Phda1 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響を Fig. 1-9 に示した。Phda1 の増殖は 1 mM Fe^{2+}存在下では活性化されず, 1 mM Ca^{2+}または Mg^{2+}の存在によって大きく向上した。すなわち, コントロールでの Phda1 の潜伏期, 上昇期, バーストサイズはそれぞれ 60 分, 50 分, 19 phages / an infected cell だったのに対し, 1 mM Ca^{2+}存在下では 40 分, 30 分, 58 phages / an infected cell, 1 mM Mg^{2+}存在下では 50 分, 40 分, 52 phages / an infected cell となった（Table 1-7）。そこで, Phda1 の増殖に及ぼす Ca^{2+}および Mg^{2+}濃度の影響

を調べた。1〜25 mM $CaCl_2$ および $MgSO_4$ を添加した培地を使用して一段増殖実験を行った結果, Phda1 の潜伏期および上昇期は $CaCl_2$ または $MgSO_4$ の濃度依存的に短縮された。すなわち, 10 または 25 mM $CaCl_2$ 添加時の Phda1 の潜伏期および上昇期は 30 分, 25 mM $MgSO_4$ 添加時の潜伏期および上昇期は 30 分まで短縮された。しかし, 25 mM $MgSO_4$ 添加時のバーストサイズは 46.0 phages / an infected cell となり, 10 mM $MgSO_4$ でのバーストサイズ（67.0 phages / an infected cell）と比較して減少した。一方, 25 mM $CaCl_2$ 添加によりバーストサイズは最も大きくなり 83.9 phages / an infected cell であった（Table 1-8）。このように, 二価カチオンの存在によって Phda1 の潜伏期, 上昇期, バーストサイズが向上したことから, Phda1 においても二価カチオンはホスト細胞に対する吸着促進のほか, 吸着後における菌体内でのファージ複製に正の効果をもたらすことが明らかとなった。また, Phda1 の増殖活性化に最も適した二価カチオンは Ca^{2+}であると判断した。

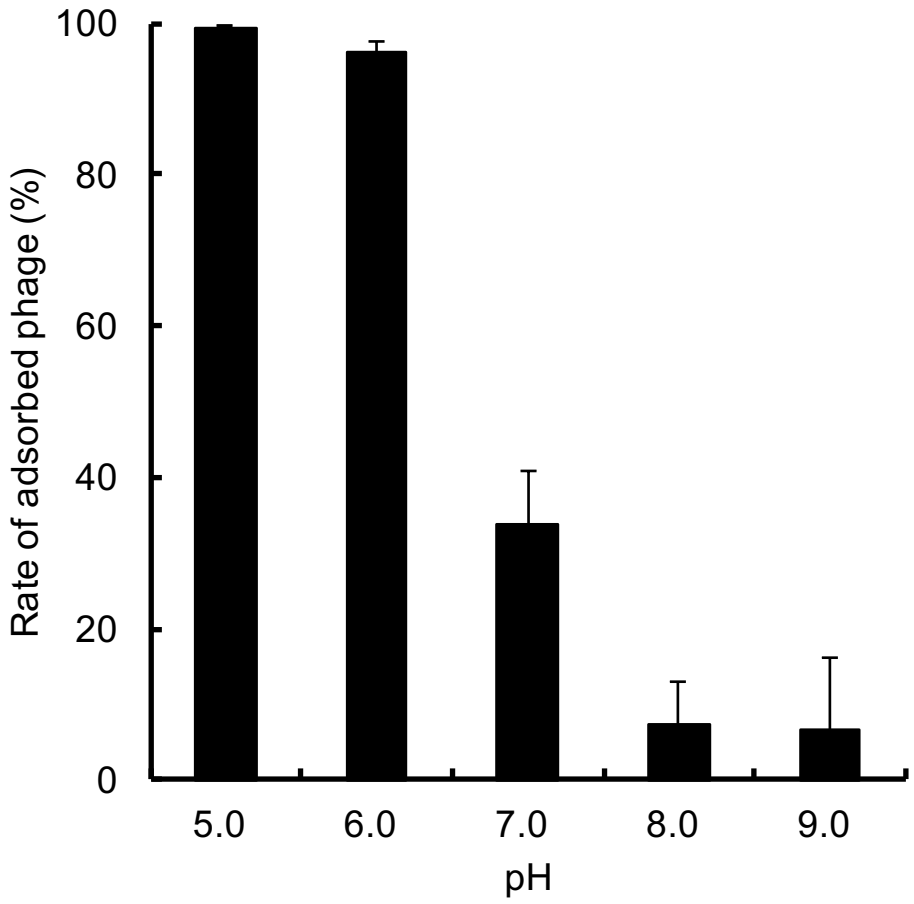


Fig. 1-7. Effect of pH on adsorption of Phda1 against *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969. Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

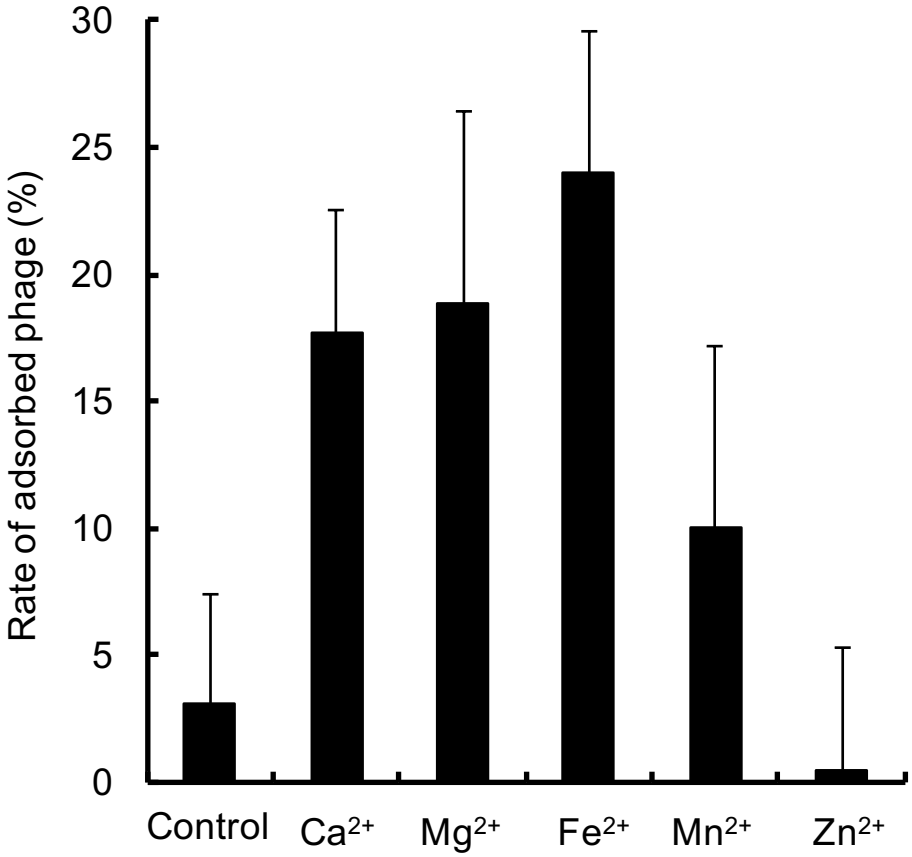


Fig. 1-8. Effect of divalent cations on adsorption of Phda1 against *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969.

Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

Table 1-6. Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration on adsorption rate (%) of phage Phda1

	0 mM	1.0 mM	10 mM	25 mM	50 mM
Ca^{2+}	3.1 ± 4.32	17.7 ± 4.89	59.5 ± 11.5	79.3 ± 2.29	N. D.
Mg^{2+}	3.1 ± 4.32	18.9 ± 7.56	42.1 ± 1.83	74.1 ± 2.27	69.7 ± 7.17

N.D.; Not determined

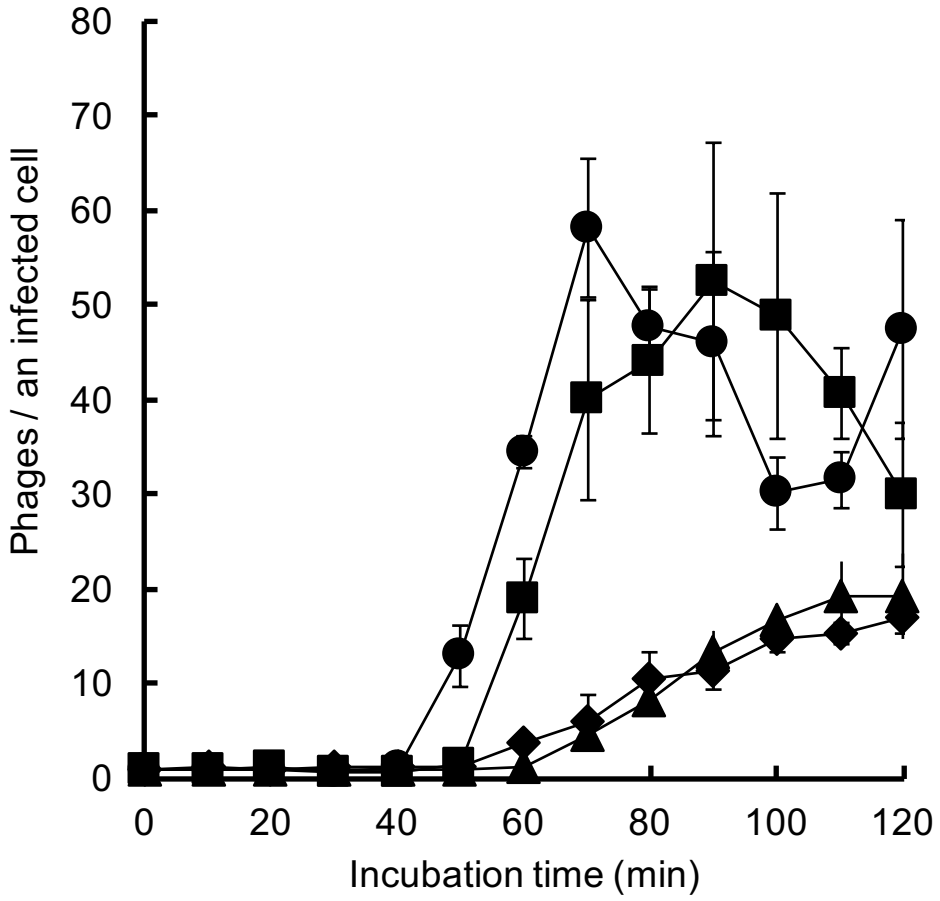


Fig. 1-9. Effect of divalent cations on the one-step growth of Phda1.

Symbols represent control (◆), $CaCl_2$ (●), $MgSO_4$ (■), $FeCl_2$ (▲). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

Table 1-7. Effect of divalent cations on latent period, rise period and burst size of Phda1

		Latent period (min)	Rise period (min)	Burst size (phages / an infected cell)
Control		60	50	19.1 ± 3.62
1 mM	Fe^{2+}	50	70	16.9 ± 1.81
1 mM	Ca^{2+}	40	30	58.1 ± 7.30
1 mM	Mg^{2+}	50	40	52.4 ± 14.63

Table 1-8. Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration on latent period, rise period and burst size of Phda1

		Latent period (min)	Rise period (min)	Burst size (phages / an infected cell)
Control		60	50	19.1 ± 3.62
1 mM	Ca^{2+}	40	30	58.1 ± 7.30
	Mg^{2+}	50	40	52.4 ±14.6
10 mM	Ca^{2+}	30	30	72.8 ± 4.61
	Mg^{2+}	40	40	67.0 ± 13.4
25 mM	Ca^{2+}	30	30	83.9 ± 21.5
	Mg^{2+}	30	30	46.0 ±17.3

第 3 節　ファージ Phda1 による *P. damselae* subsp. *damselae* の発育制御

前節では, ファージ Phda1 の吸着および増殖に及ぼす pH と二価カチオンの影響について調べた。その結果, Phda1 の吸着率は pH5.0 で最も高く, Ca^{2+}の存在により吸着率および増殖が促進されることが明らかとなった。そこで本節では, Phda1 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼす pH と Ca^{2+}濃度の影響について調べ, 液体培地の系において *P. damselae* subsp. *damselae* によるヒスタミン蓄積を阻害可能か検討した。

試料および方法

1-3-1. ファージ Phda1 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼすカルシウムの影響

1.0, 10, 25 mM $CaCl_2$ 含有改変 TSBS に 1.0×10^3 CFU/ml となるように *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 を接種し, これに Phda1 を MOI = 100 となるよう接種した。バイオフォトレコーダーにより 25°C で培養し, OD_{660} の継時的な測定により Phda1 による *P. damselae* の発育抑制能に及ぼすカルシウムの影響を調べた。

1-3-2. ファージ Phda1 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼす pH の影響

pH5.0, 6.0, 7.0 に調整した 25 mM $CaCl_2$ 含有改変 TSBS に 1.0×10^3 CFU/ml となるように *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 を接種し, これに Phda1 を MOI = 100 となるよう接種した。バイオフォトレコーダーにより 25°C で培養し, OD_{660} の継時的な測定により Phda1 による *P. damselae* の発育抑制能に及ぼす pH の影響を調べた。

1-3-3. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育およびヒスタミン生成に及ぼすファージ Phda1 の影響

1%L-ヒスチジン塩酸塩および 25 mM $CaCl_2$ を含有した改変 TSBS（pH6.5）に *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 を 1.0×10^3 CFU/ml となるように接種した。これに Phda1 を MOI = 100 となるよう接種し, 8, 12, 20°C で培養した。*P. damselae* JCM8969 の

生菌数は TSAS を用いた表面塗抹法（25°C, 24 h）により継時的に測定した。また, 培養液のヒスタミン濃度は, 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって測定した（Mett and Sturgeon, 1982）。すなわち, 試料溶液に等量の 10%トリクロロ酢酸を混合後, 濾過（孔径; 0.2 μm, PTFE, Millipore）し, この濾液を HPLC 分析に供した。HPLC の条件は Table 1-9 に示した通りである。また, 20°C 培養の培地 pH の変化も調べた。すなわち, 培養液を濾過滅菌（孔径; 0.45 μm）後, コンパクト pH メーター（Laqua twin B-71X, Horiba）を使用して濾液の pH を測定した。

Table 1-9. Condition of HPLC analysis for histamine determination

Pump	PU-2089 plus (Jasco)
Detector	UV-2075 intelligent UV/VIS detector (Jasco)
Column	Particil 10 SCX (i.d. 4.6 mm × 250 mm) (Hichrom)
Guard column	Particil 10 SCX (i.d. 4.6 mm × 50 mm) (Hichrom)
Frow rate	1.0 ml/min
Solvent	0.03M K_2HPO_4-0.25%ethylamine hydrochloride (pH4.5)
Detection	UV 210 nm

結果および考察

1-3-1. ファージ Phda1 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼすカルシウムの影響

二価カチオンによるファージの発育抑制効果の向上はすでに知られており, 例えば *B. cereus* ファージ BCP8-1 および BCP8-2 は Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}の添加によって発酵食品における *B. cereus* の増殖を効果的に阻害できるようになると報告されている（Bandara *et al*, 2012）。本研究においても, Phda1 の吸着および増殖が Ca^{2+}により促進されたため, Phda1 による *P. damselae* の発育抑制も Ca^{2+}の存在によって向上する可能性が推察できる。よって, Phda1 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼすカルシウムの影響について検討した。

Phda1（MOI = 100）による *P. damselae* の発育抑制に及ぼす Ca^{2+}の影響を Fig. 1-10 に示した。Phda1 未処理のコントロールおよび Ca^{2+}非存在下の Phda1 処理区では, 培養 8 時間目から OD_{660} が上昇し始めた。すなわち, Ca^{2+}が存在しない状態での Phda1 による発育抑制は認められないことを確認した。一方, 1, 10, 25 mM $CaCl_2$ 存在下の Phda1 処理区では, *P. damselae* の発育に遅延が見られ, 発育に伴う OD_{660} の上昇が見られるまでの時間が約 4 時間遅延した。これは, Ca^{2+}による Phda1 の吸着能の向上（Fig. 1-8, Table 1-6）と増殖促進効果（Fig. 1-9, Table 1-8）によるものと考えられる。しかし, Ca^{2+}濃度の違いによる Phda1 による *P. damselae* の発育抑制効果には差は認められなかった。

1-3-2. ファージ Phda1 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制能に及ぼす pH の影響

前節において, Phda1 の吸着は pH5～6 で大きく上昇した。そこで, pH5.0, 6.0, 7.0 に調整した液体培地を用いて Phda1 処理による *P. damselae* 発育抑制に及ぼす pH の影響を調べ, その結果を Fig. 1-11 に示した。Phda1 は, pH6.0 および 7.0 では *P. damselae* の発育を阻害したが, pH5.0 では発育抑制効果は認められなかった。よって, Phda1 は pH6 以上の中性域で使用する必要がある。前節において, Phda1 は pH5.0 で最も高い吸着率を示したが, 本実験では pH5.0 において *P. damselae* の発育を効果的に抑制することはできなかった。pH5.0 の培地中においても菌体内 pH は概ね中性に保たれていると

推察される。そのため, ファージ DNA が正常に菌体内に注入されるとファージの複製は正常に働くと考えられる。したがって, pH5.0 では Phda1 の吸着は大きく促進されるが, 菌体への DNA の注入が阻害され溶菌が起こらないのではないかと推察できる。

1-3-3. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育およびヒスタミン生成に及ぼすファージ Phda1 の影響

P. damselae の発育およびヒスタミン蓄積に及ぼす Phda1（MOI＝100）の影響について, 25 mM $CaCl_2$ 含有 TSBS を用いて評価を行った。8°C, 12°C, 20°C における *P. damselae* の発育を Fig. 1-12 に示した。8°C 培養では, ファージ処理の有無に関わらず *P. damselae* の発育は認められず, ヒスタミンについても実験期間を通じて検出限界未満（20 mg/l）であった（Fig. 1-12A）。12°C 培養においては, Phda1 処理によって *P. damselae* の発育遅延が認められ, 最大 1 log CFU/ml 程度の *P. damselae* の発育遅延が見られた。ヒスタミン濃度は, ファージ未処理区では 96, 120 時間目にそれぞれ 94.7 mg/l, 1138.2 mg/l だったのに対し, ファージ処理区では 20.4 mg/l, 458.4 mg/l となり, *P. damselae* の発育遅延に伴うヒスタミン蓄積の遅延が認められた（Fig. 1-12B）。さらに 20°C 培養では 12°C での場合よりも大きな発育抑制効果が見られた。ファージ未処理区とファージ処理区の生菌数の差は, 培養 18 時間目に最大 3 log CFU/ml 程度となり *P. damselae* の発育が大きく阻害された。*P. damselae* の発育阻害に伴い, ヒスタミン蓄積の遅延も見られた。すなわち, ファージ未処理区のヒスタミン濃度は, 培養 24 時間目に 161.1 mg/l, 30 時間目に 906.8 mg/l だったのに対し, ファージ処理区では各々の時間において検出限界未満, 33.2 mg/l であった（Fig. 1-12C）。以上の結果より, Phda1 による処理はホストの発育至適温度に近い 20°C で最も高い発育抑制効果を示し, Ca^{2+}存在下で *P. damselae* の発育およびヒスタミン蓄積を共に抑制することが示唆された。

ヒスタミンは, ヒスタミン生成菌の HDC により作られるため, HDC 遺伝子の発現量がそのヒスタミン生成能に大きく影響することが推察される。*P. damselae* subsp. *damselae* の HDC 産生について, Kimura ら（2009）は *P. damselae* の HDC 遺伝子発現が低 pH 環境下および細胞外ヒスチジンの存在により誘導されると報告している。そこで, *P. damselae* の発育が最も良い 20°C 培養における培地 pH の変化を追跡した。培

地 pH は, *P. damselae* の発育に伴い低下し, ファージ未処理区では 30 時間目に 5.9 となったが, その後はヒスタミンの蓄積によって 6.2 まで上昇した。一方, ファージ処理区においては, *P. damselae* の発育遅延により pH 低下も未処理区よりも遅く, 培養 42 時間目に 6.0 となり, その後のヒスタミン蓄積により上昇した（Table 1-10)。したがって, *P. damselae* の発育に伴う酸の生成による pH 低下が HDC 遺伝子の発現を誘導する可能性は存在するが, 本研究においてはヒスタミン生成の開始以前に大きな pH 低下が起きていないため低pH によるHDC遺伝子の発現誘導は少ないと考えられる。

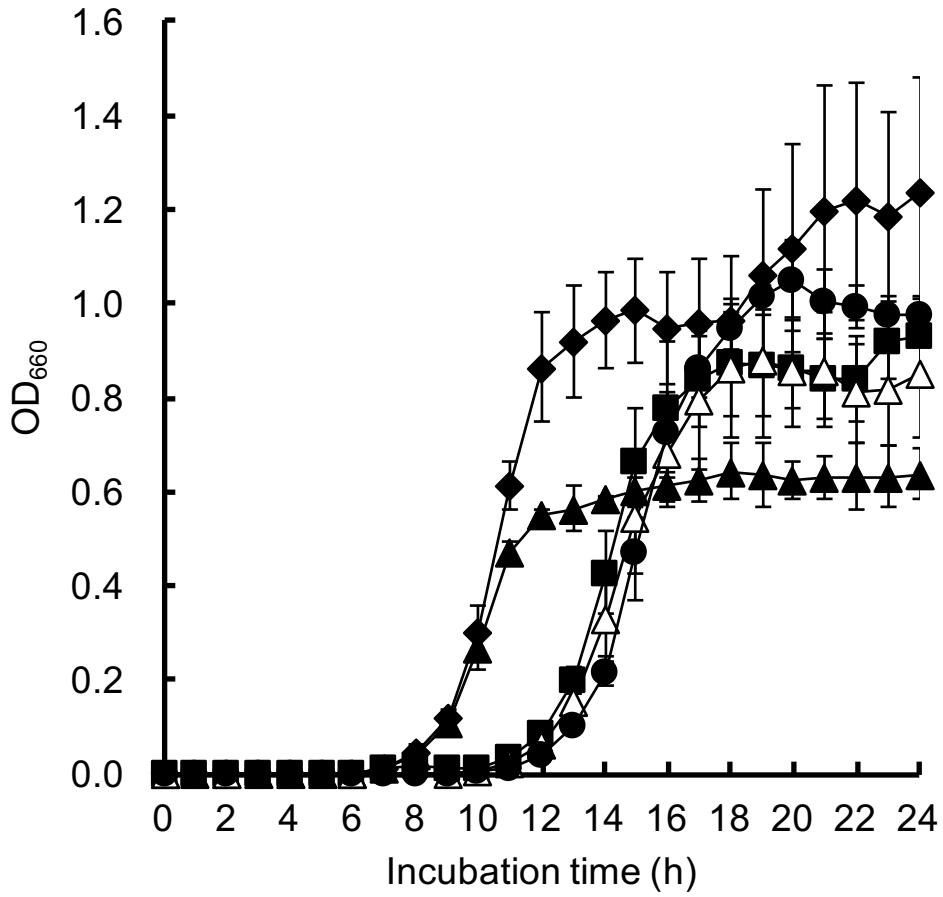


Fig. 1-10. Changes in the growth of *P. damselae* subsp. *damselae* by Phda1 treatment (MOI = 100) in the presence of 1.0–25 mM Ca^{2+}.

Symbols represent control without Phda1 (◆), Phda1 treatment without Ca^{2+} (▲), Phda1 treatment with 1.0 mM Ca^{2+} (■), Phda1 treatment with 10 mM Ca^{2+} (△) and Phda1 treatment with 25 mM Ca^{2+} (●). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

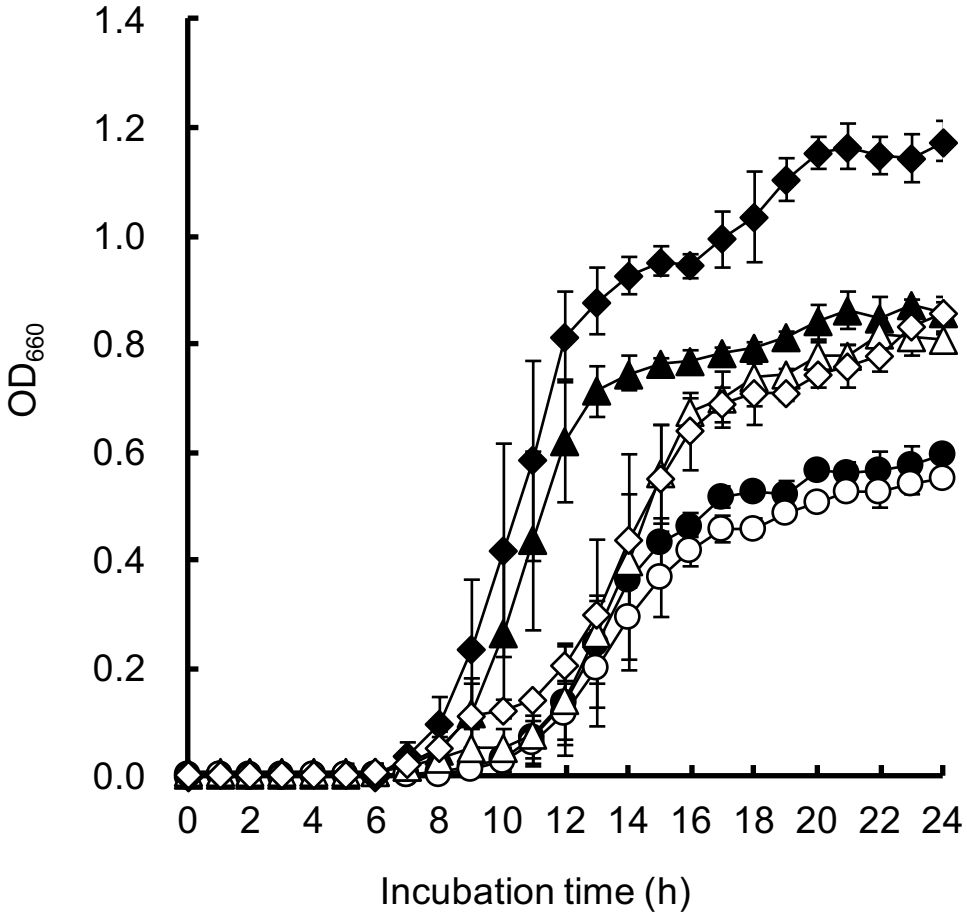


Fig. 1-11. Changes in the growth of *P. damselae* subsp. *damselae* by Phda1 treatment (MOI = 100) at pH5.0–7.0.

Symbols represent control without Phda1 at pH 7.0 (◆), Phda1 treatment at pH 7.0 (◇), control without Phda1 at pH 6.0 (▲), Phda1 treatment at pH 6.0 (△), control without Phda1 at pH 5.0 (●) and Phda1 treatment at pH 5.0 (○). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

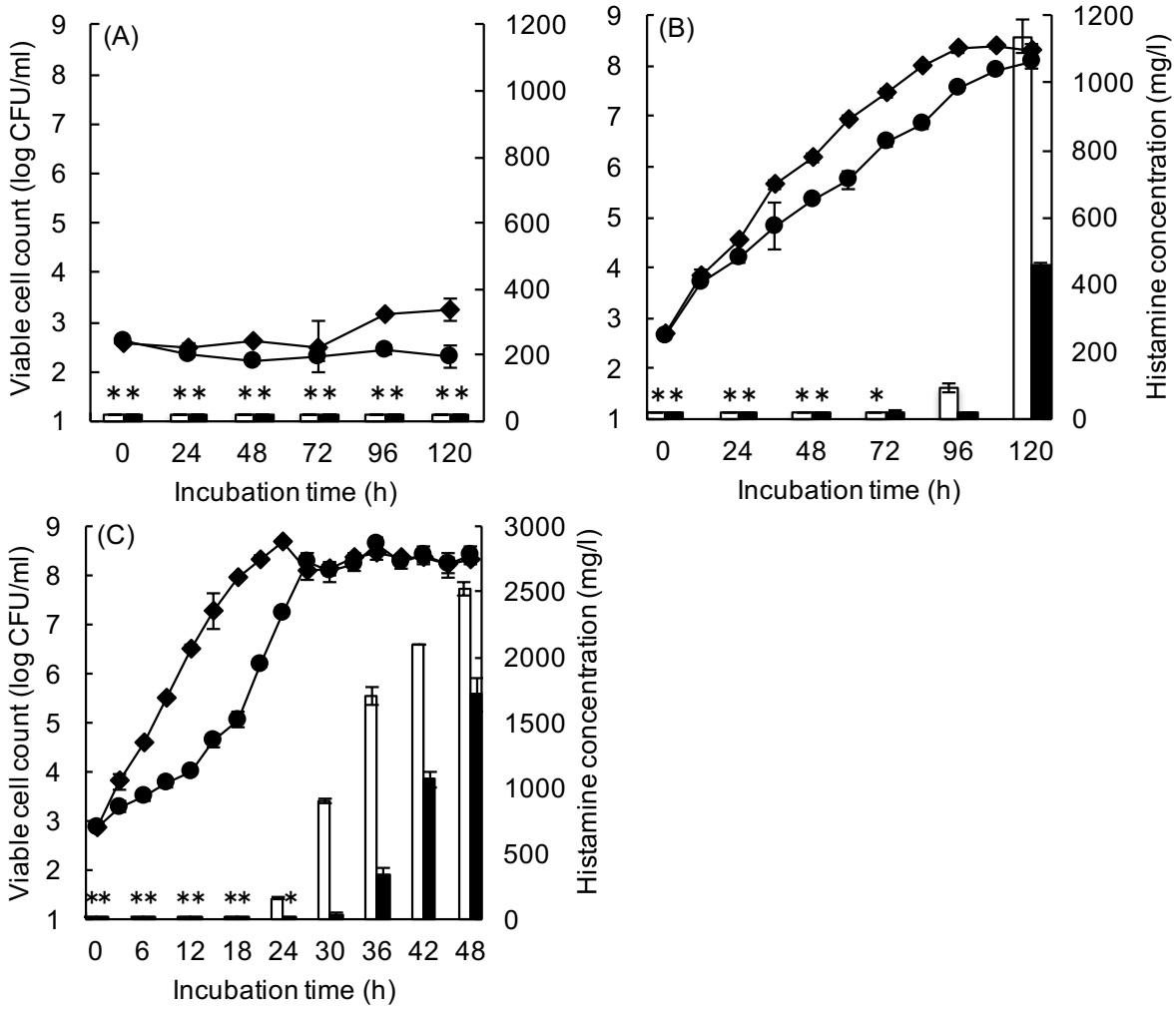


Fig. 1-12. Effect of Phda1 treatment on the growth and histamine accumulation by *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 at 8°C (A), 12°C (B) or 20°C (C).

Symbols represent viable cell count of control (◆) and Phda1 treatment (●), and columns represent histamine concentration of control (open column) and Phda1 treatment (closed column). Asterisk (*) means histamine concentration was below detection limit (20 mg/l). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

Table 1-10. Changes of pH during incubation in modified TSBS containing 25 mM Ca^{2+} and 1% histidine (pH6.5) at 20°C

	Incubation time (h)								
	0	6	12	18	24	30	36	42	48
Without Phda1	6.4	6.4	6.4	6.3	6.2	5.9	6.0	6.2	6.2
Phda1 treatment†	6.4	6.4	6.4	6.4	6.5	6.3	6.1	6.0	6.2

†Bacterial culture was treated with Phda1 (MOI = 100) in the presence of 25 mM Ca^{2+}.

第 2 章　*P. damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda10 の性状および発育抑制能

第 1 章では, 生牡蠣より分離した *P. damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda1 の性状とその *P. damselae* 制御能について調べた。Phda1 は *P. damselae* の発育とヒスタミン蓄積を抑制するが, その宿主域は非常に狭いという欠点があった。通常, ファージの宿主域は株または種レベルであるが, ファージを微生物制御に用いる際には, 広宿主域を示すファージを用いることが望ましい。その点を考慮すると, Phda1 の単独利用は実用に耐えないと考えられる。そこで第 2 章では, Phda1 よりも広い宿主域を示す *P. damselae* ファージの分離を試み, 獲得・選抜したファージの *P. damselae* 制御能について検討を行った。

第 1 章では, ファージの分離に際して, *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 の 1 株のみを用いた。すなわち, 第 1 章のスクリーニングではファージの広宿主域特性を評価できず, 結果として得られたファージは *P. damselae* JCM8969 の 1 株のみに感染するもののみであった。そこで本章ではファージの分離に由来の異なる様々な *P. damselae* 株を用い, 広い宿主域を示す *P. damselae* ファージの分離を試みた。また, Phda1 が Ca^{2+}および Mg^{2+}により吸着および増殖が促進されたため, ファージ分離効率の上昇を期待して人工海水ベースの液体培地を用いたファージの分離を試みた。

第 1 節　*P. damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda10 の性状

第 1 章では, 分離した *P. damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda1 の性状および *P. damselae* subsp. *damselae* の発育抑制能を評価した。Phda1 は *P. damselae* の発育とヒスタミン蓄積を阻害したが, その宿主域は非常に狭く, *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8969 のみに感染するという欠点があった。本節では, より広い宿主域を持つ *P. damselae* ファージの分離を目的として, サバ, カキ, 海水より分離した様々な *P. damselae* 株を使用し, 人工海水ベースの培地により広宿主域を示す *P. damselae* ファージを分離し, その性状を調べた。

試料および方法

2-1-1. *P. damselae* subsp. *damselae* ファージの分離

P. damselae ファージの分離には, ホストとして *P. damselae* subsp. *damselae* JCM8967, JCM8968, JCM8969, MA1, MA2, MA3, OY1, OY2, SW1 の 9 株（Table2-1）を使用した。人工海水（ASW）broth（Table 2-2）に食品や海水のサンプルを混合し, ホモジナイズ後, 対数増殖期の供試菌培養液を約 10^4 CFU/ml となるように接種した。これを 20°C で 24 時間培養後, 培養液 10 ml にクロロホルム 500 µl を加えよく振盪し細菌細胞を溶菌した。遠心分離後（10,000×*g*, 30 min, 4°C）, 上清を回収しファージ検出用のサンプルとした。

ファージの検出および純化は第 1 章第 1 節と同様の方法で行った。

2-1-2. ファージ Phda10 の宿主域分析

分離した *P. damselae* subsp. *damselae* ファージ（Phda1～Phda16）の宿主域を調べた。宿主域の評価には, TSAS および ASW agar（Table 2-3）を用い, 第 1 章第 1 節と同様の方法で行った。

2-1-3. ファージ Phda10 の精製

Marine broth（Becton-Dickinson） 200 ml に *P. damselae* OY2 を接種し, 10^7～10^8

CFU/ml となるまで 25°C で培養した。Phda10 を MOI = 0.1〜1 となるように接種し, 25°C で約 4 時間培養して Phda10 を増殖させた。遠心分離（10,000×*g*, 10 min, 4°C）後, 得られた上清をフィルター濾過（孔径; 0.45 μm）して Phda10 の二次培養に用いた。すなわち, 10^7〜10^8 CFU/ml となるまで *P. damselae* OY2 を培養した Marine broth 800 ml に Phda10 溶菌液 200 ml を混合し, 25°C で約 4 時間培養した。得られた溶菌液を遠心分離（10,000×*g*, 10 min, 4°C）し, フィルター濾過（孔径; 0.45 μm）後, 1 μg/ml DNase I および RNase A（Sigma-Aldrich）処理（30°C, 1 h）を行いホスト由来の DNA と RNA を分解・除去した。これに PEG6,000 を 12%となるように混合し, 4°C で 12 時間保持後, 遠心分離（8,000×*g*, 30 min, 4°C）によりファージペレットを得た。ペレットを SM buffer に懸濁し, 4°C で 12 時間保持した後, 回収した Phda10 懸濁液を塩化セシウム密度勾配超遠心（100,000×*g*, 3 h, 4°C, d = 1.3, 1.5, 1.7）に供した。精製度を上昇させるため, 塩化セシウム密度勾配超遠心は同条件で 2 回繰り返した。超遠心後, Phda10 の白色バンドを回収し, SM buffer に対して透析（MWCO 8,000, Spectrum Laboratories）を行った。透析後の溶液を精製 Phda10 溶液とした。

2-1-4. ファージ Phda10 の吸着率測定

P. damselae subsp. *damselae* OY2 を 10^5 CFU/ml となるように TSBS に接種し, OD_{600} が 0.2 となるまで 25°C で培養した。Phda10 を MOI = 0.1 となるように培養液に接種後, 25°C で培養し, 継時的に培養液を採取した。採取した培養液はフィルター濾過（孔径; 0.45 μm）を行い, 上清の遊離ファージ数をプラークアッセイ法により計測した。Phda10 のプラークアッセイ法には, 培地として 25 mM $MgSO_4$ 含有 TSAS, 25 mM $MgSO_4$ および 2% NaCl 含有 0.5%軟寒天, ホストとして *P. damselae* subsp. *damselae* OY2 を使用した。25°C で 24〜48 時間培養し, 得られたプラーク形成数より Phda10 の吸着率を算出した。

2-1-5. ファージ Phda10 の一段増殖実験

P. damselae subsp. *damselae* OY2 を 10^5 CFU/ml となるように TSBS に接種し, OD_{600} が 0.2 となるまで 25°C で培養した。Phda10 を MOI = 0.1 となるように接種し, 25°C で 5 分間培養することにより菌体にファージを吸着させた後, 遠心分離（10,000×*g*, 2

min, 4°C）により菌体に吸着したファージのみをペレットとして回収した。ペレットを新鮮な TSBS に懸濁後, 25°C で培養し継時的にプラーク形成数を測定した。プラーク形成数の変化より潜伏期, 上昇期, バーストサイズを算出した。また, Marine broth を用いて同様に一段増殖実験を行った。

2-1-6. ファージ Phda10 の安定性試験

Phda10 の耐熱性, 耐 pH 性を測定した。耐熱性測定では, 30〜50°C にプレインキュベートした SM buffer 950 µl に 10^7 PFU/ml となるように Phda10 懸濁液を 50 µl 接種後, 30〜50°C で 30 分間加熱しプラーク形成数を測定した。耐 pH 性測定では, pH1.0〜12.0 の 2%NaCl 含有リン酸緩衝生理食塩水（PBS）950 µl に 10^7 PFU/ml となるように Phda10 懸濁液を 50 µl 接種後, 30°C で 24 時間保持プラーク形成数を測定した。処理前後のプラーク形成数の変化より, Phda10 の耐熱性および耐 pH 性を評価した。

2-1-7. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育に及ぼす Phda10 の影響

P. damseale subsp. *damselae* OY2 を 10^5 CFU/ml となるように TSBS に接種し, OD_{600} が 0.2 となるまで 25°C で培養した。10^5 CFU/ml となるように培養液を改変 TSBS に接種し, Phda10 を MOI = 1, 10, 100 となるように接種した後, 96 穴マイクロプレートに 150 µl/well となるように分注した。12°C および 25°C で培養し, マイクロプレートリーダー（Model 550; Bio-Rad, Hercules, CA, USA）を使用して, OD_{595} の継時的な測定により *P. damselae* の発育に及ぼす Phda10 の影響を評価した。

Table 2-1. Bacterial strains used for isolation of *P. damselae* subsp. *damselae* phage

Bacterial species	Strain	Origin
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	JCM8967	Seawater
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	JCM8968	Labracoglossid fish
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	JCM8969	Seawater
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	MA1	Raw mackerel
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	MA2	Raw mackerel
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	MA3	Raw mackerel
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	OY1	Raw oyster
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	OY2	Raw oyster
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	SW1	Seawater

Table 2-2. Composition of ASW broth

Ingredient	
Tryptone (BD)	17 g
Phytone peptone (BD)	3.0 g
Glucose	2.5 g
Marine art SF-10 (Tomita Pharmaceutical)	36.82 g
Distilled water	1000 ml
	(pH 7.3)

Medium was autoclaved at 121°C for 15 min.

Table 2-3. Composition of ASW agar

Ingredient	
Tryptic soy agar (BD)	40 g
Marine art SF-10 (Tomita Pharmaceutical)	36.82 g
Distilled water	1000 ml
	(pH 7.3)

Medium was autoclaved at 121°C for 15 min.

結果および考察

2-1-1. *P. damselae* subsp. *damselae* ファージの分離

第 1 章で使用した *P. damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda1 は宿主域が極めて狭く, 実用性に乏しかった。第 2 章では, 広宿主域を示すファージの分離・獲得を目的として, ファージの分離に使用する供試菌株を増やし, 人工海水ベースの ASW broth を用いた分離方法を試みた。その結果, 生牡蠣および函館市近郊の海水より *P. damselae* ファージ 11 株（Phda6〜16）を得た。第 1 章では, 130 個のサンプルからの 7 サンプルでファージを検出できたのに対し, 本節で用いた方法では 174 サンプル中の 25 サンプルからファージを回収することができた。したがって, *P. damselae* subsp. *damselae* ファージの分離には TSBS よりも人工海水ベースの培地が適していると考えられる。

2-1-2. ファージ Phda10 の宿主域

P. damselae ファージの分離に際して ASW broth の使用が優れていたため, 使用する培地によって宿主域が変化する可能性を検証するため, TSAS と ASW agar の 2 種類の培地を用いて宿主域を判定し, それぞれ Table 2-4 と Table 2-5 に示した。多くの *P. damselae* ファージは TSAS と ASW agar で宿主域の変化はなかったが, Phda9 と Phda10 は ASW agar でより広い宿主域を示した。ASW agar の使用により, Phda9 では *P. damselae* JCM8968, JCM8969, MA2, MA3, OY1 の 5 株に, また Phda10 では *P. damselae* JCM8968, MA2, OY1 の 3 株に感受性ありと判定された。

ASW agar を用いて宿主域が拡大した理由には, 第 1 章の Phda1 の場合と同様に培地中の二価カチオンの存在が考えられる。人工海水を用いた ASW agar には TSAS よりも多くの二価カチオンが含まれているため, ファージの感染および溶菌が促進され, 宿主域の拡大が見られたと考えられる。一方, 宿主域が拡大しなかったファージに関してはレセプター結合タンパク質の特異性が極めて高く, 感染サイクル活性化の有無に関わらず宿主域が変化しなかったと推察される。すなわち, ファージの感染に適した培地を使用しなければ, ファージの宿主域を過小評価してしまう可能性のあることが強く示唆された。

宿主域の評価より，本研究において *P. damselae* subsp. *damselae* の制御に使用可能なファージとして，広い宿主域を示し安定した継代培養が可能であった Phda10 を使用することとし，本ファージの性状検査を行った。

2-1-3. ファージ Phda10 の吸着率

P. damselae OY2 に対する Phda10 の吸着率を Fig. 2-1 に示した。Phda10 は培養 5 分間で 25%，培養 10 分間で 39%が菌体に吸着したが，その後は吸着率の変化はなかった。第 1 章での Phda1 と比較すると，培養初期の吸着率の上昇率は Phda10 が優れていたが，Phda1 は培養 60 分まで吸着率が上昇し続けた（Fig. 1-2）。また，使用した培地が異なるが，既報の *V. parahaemolyticus* ファージ（Hidaka and Tokushige, 1978）と比較しても Phda10 の吸着率は劣っていた。

2-1-4. ファージ Phda10 の一段増殖曲線

Phda10 の一段増殖曲線を Fig. 2-2 に示した。TSBS を使用した場合，Phda10 は培養 150 分までに増殖を開始しなかった。そこで，Marine broth を用いた一段増殖実験を行ったところ，Phda10 は培養 20 分以降に増殖を開始し 40 分後には溶菌を終了した。したがって，Phda10 の Marine broth 中での潜伏期，上昇期，バーストサイズはそれぞれ 20 分，20 分，13 phages / an infected cell と見積もられた。人工海水ベースの培地を用いた *V. parahaemolyticus* ファージ Vp15P, Vp17P, Vp25P, Vp33P の一段増殖実験では，それぞれ潜伏期が 95 分，80 分，120 分，110 分，上昇期が 40 分，70 分，60 分，65 分であり，各ファージのバーストサイズは 5, 300, 7, 150 particles / cell と報告されている（Hidaka and Tokushige, 1978）。これら *V. parahaemolyticus* ファージと比べると，Phda10 のバーストサイズは小さいが，より短い潜伏期と上昇期を持つファージであることが明らかとなった。ファージの潜伏期と上昇期の短さは，短時間でのホストの殺菌が可能であることを示している。そのため，Phda10 は微生物制御への利用に適するファージであると考えられる。

2-1-5. ファージ Phda10 の安定性

第 1 章では，安定性試験の溶媒として TSBS を用いたが，培地中の成分が熱および

pH ストレスからファージを保護する可能性があるため, 本節では SM buffer を用いて安定性試験を行った。Phda10 の耐熱性および耐 pH 性を Fig. 2-3 に示した。SM buffer 中では, Phda10 は 30〜45°C, 30 分間までの加熱に安定であったが, 50°C, 30 分間の加熱では検出限界未満（1 log PFU/ml）にまで減少した。耐 pH 試験では, Phda10 は 2%NaCl-PBS 中で pH4.0〜10.0, 24 時間の保持には安定であった。しかし, pH3.0 では 1.7 log PFU/ml に, pH2.0 以下, pH11.0 以上では検出限界未満にまで減少した。バッファーを用いた場合, Phda10 の耐熱性はやや低かったが, 優れた耐 pH 性を示した。一次汚染菌として魚肉に存在する *P. damselae* の制御を想定した場合, ファージの処理は原料の加工前に行うことが適切と考えられる。そのため, 本研究によって得られた Phda10 は魚肉への使用に問題ない特性を備えていると考えられる。

2-1-6. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育に及ぼすファージ Phda10 処理の影響

P. damselae subsp. *damselae* OY2 の発育に及ぼす Phda10 処理の影響について Fig. 2-4 に示した。Phda10 を MOI = 1, 10, 100 で接種し, 12°C, 20°C における *P. damselae* OY2 の発育を調べたところ, MOI = 1 では Phda10 は *P. damselae* の発育を阻害できなかった。MOI = 10 の場合では, 12°C において 48 時間目に *P. damselae* の発育阻害が見られたが, その OD_{595} の上昇抑制はわずかであった。一方, MOI = 100 で Phda10 を接種した場合においては 12°C および 20°C の両方で *P. damselae* の発育に対する大きな阻害が見られ, 12°C では 48 時間, 20°C では 7 時間にわたって濁度の上昇が遅延した。したがって, Phda10 は MOI = 100 以上で使用すれば, *P. damselae* の発育を大きく抑制できることが明らかとなった。

Table 2-4. Host range of *P. damselae* subsp. *damselae* phages, as determined by spot tests using TSAS agar plate and soft agar supplemented with 2.0% NaCl

	Photobacterium damselae subsp. *damselae*								
	JCM8967	JCM8968	JCM8969	MA1	MA2	MA3	OY1	OY2	SW1
Phda1	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phda2	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phda3	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phda4	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phda5	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phda6	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Phda7	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Phda8	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Phda9	-	-	-	+/-	-	-	-	+/-	+/-
Phda10	-	-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-
Phda11	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-
Phda12	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Phda13	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Phda14	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Phda15	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Phda16	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Clear plaque was marked as +, turbid plarque was represented as +/-, absence of plaque was marked as -.

Table 2-5. Host range of *P. damselae* subsp. *damselae* phages, as determined by spot tests using ASW agar plate and ASW soft agar

	Photobacterium damselae subsp. *damselae*								
	JCM8967	JCM8968	JCM8969	MA1	MA2	MA3	OY1	OY2	SW1
Phda1	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phda2	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phda3	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phda4	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phda5	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Phda6	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Phda7	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Phda8	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Phda9	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
Phda10	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+
Phda11	+	-	+/-	-	-	-	-	-	-
Phda12	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Phda13	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Phda14	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Phda15	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Phda16	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Clear plaque was marked as +, turbid plarque was represented as +/-, absence of plaque was marked as -.

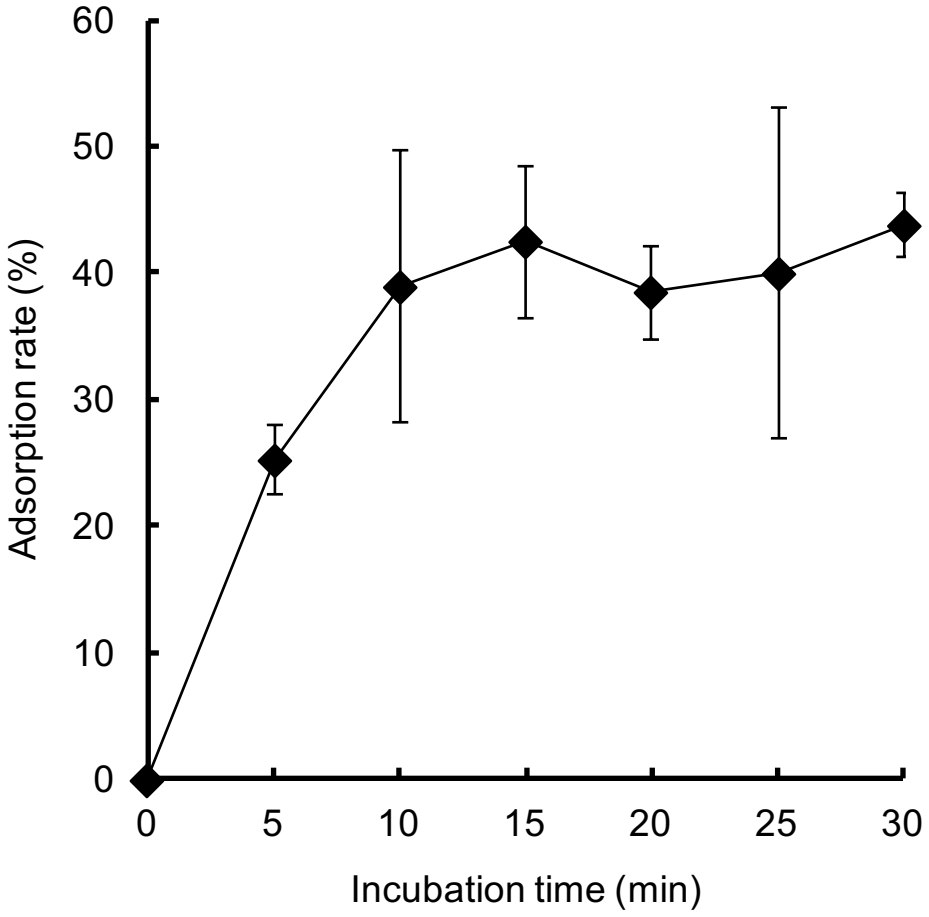


Fig. 2-1. Adsorption rate of Phda10 against *P. damselae* subsp. *damselae* OY2 in TSBS at 25°C. Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

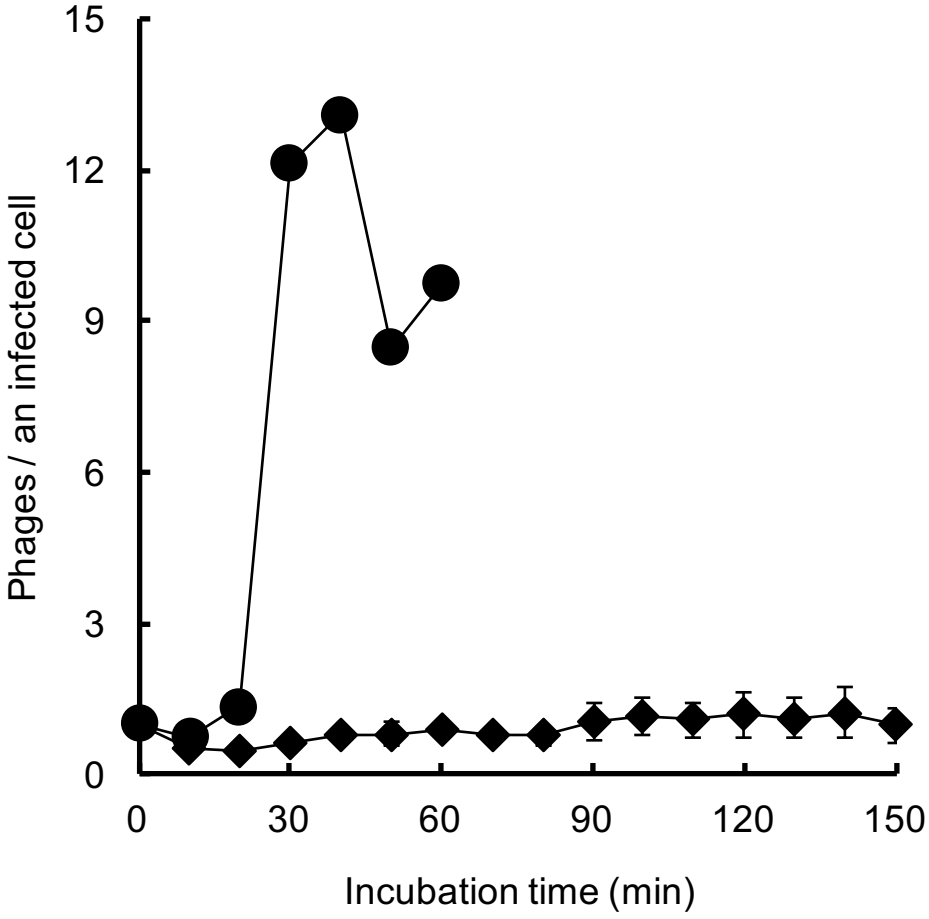


Fig. 2-2. One-step growth curve of Phda10 on *P. damselae* subsp. *damselae* OY2 incubated in TSBS (◆) or marine broth (●) at 25°C.

Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

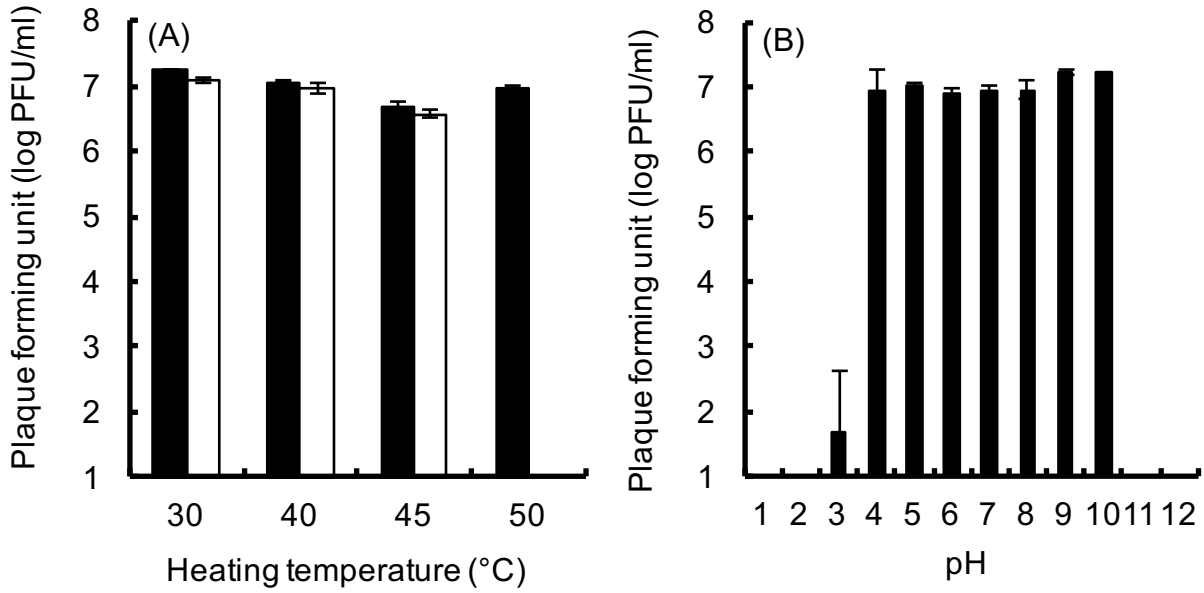


Fig. 2-3. Thermal stability in SM buffer at pH7.5 (A) and pH stability in PBS at 30°C for 24 h (B) of Phda10.

In Fig. 2-3(A), closed and open column represent plaque forming unit of Phda10 befer and after heating. Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

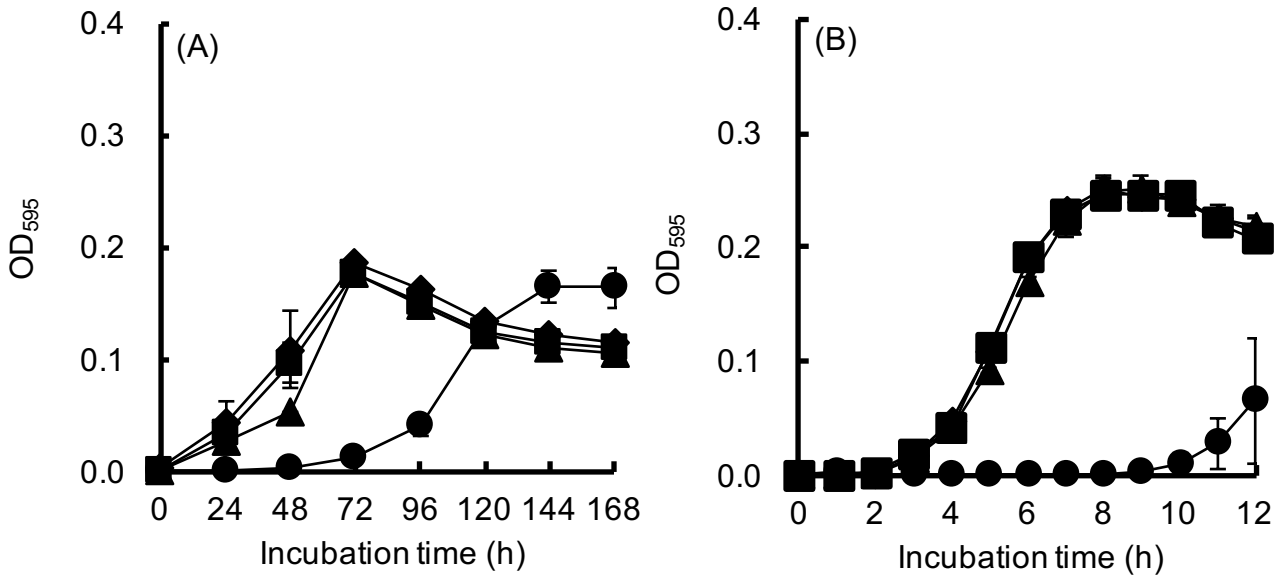


Fig. 2-4. Effect of Phda10 treatment on the growth of *P. damselae* subsp. *damselae* OY2 at 12°C (A) or 25°C (B).

Symbols represent control (◆), Phda1 treatment at MOI = 1 (■), 10 (▲) or 100 (●). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

第 2 節　ファージ Phda10 の感染サイクルに及ぼす物理的および化学的要因

前節では, 宿主域の広い *P. damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda10 を海水より分離し, 吸着率や一段増殖曲線などの性状を調べた。第 1 章で調べたファージ Phda1 は, その吸着や増殖が pH や二価カチオンの存在により変化したため, Phda10 においてもこれらの要因により吸着および増殖が変化すると推察される。そこで本節では, Phda10 の吸着および増殖に及ぼす pH, 温度, 二価カチオンの影響について調べた。

試料および方法

2-2-1. ファージ Phda10 の吸着率に及ぼす pH, 温度, 二価カチオンの影響

P. damselae subsp. *damselae* OY2 を 10^5 CFU/ml となるように TSBS に接種し, OD_{600} が 0.2 となるまで 25°C で培養後, 吸着率測定に使用した。pH の影響を調べる際には pH5.0〜9.0 に調整した TSBS を, 温度の影響を調べる際には 4〜40°C にプレインキュベートした TSBS, 二価カチオンの影響を調べる際には 1 mM $CaCl_2$, $MgSO_4$, $ZnCl_2$, $MnCl_2$ または $FeCl_2$ 含有改変 TSBS を使用した。上述の培地で集菌洗浄（10,000×*g*, 2 min, 4°C）後, Phda10 を MOI = 0.1 となるように接種した。25°C で 5 分間または 30 分間培養し, フィルター濾過（孔径; 0.45 μm）後, 上清中のプラーク形成数（未吸着ファージ数）を測定し, 吸着率を算出した。

2-2-2. ファージ Phda10 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響

1 mM $CaCl_2$, $MgSO_4$, $ZnCl_2$, $MnCl_2$ または $FeCl_2$ 含有改変 TSBS 9.9 ml に 10^5 CFU/ml となるように *P. damselae* subsp. *damselae* OY2 懸濁液を 100 μl 接種した。OD_{600} が 0.2 となるまで 25°C で培養し, Phda10 を MOI = 0.1 となるように接種後, 25°C で 5 分間培養しファージを菌体に吸着させた。遠心分離（10,000×*g*, 2 min, 4°C）により菌体に吸着したファージのみを回収し, 新鮮な 1 mM $CaCl_2$, $MgSO_4$, $ZnCl_2$, $MnCl_2$ または $FeCl_2$ 含有改変 TSBS に懸濁後, 25°C で培養した。継時的にプラーク形成数を測定し, プラーク形成数の変化から各二価カチオン存在下における Phda10 の潜伏期, 上昇期, バーストサイズを算出した。また, $MgSO_4$, $CaCl_2$ については, 25 mM の濃度において

も一段増殖実験を行った。

結果および考察

2-2-1. ファージ Phda10 の吸着率に及ぼす pH の影響

pH5.0〜9.0 での Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* に対する吸着率を Fig. 2-5 に示した。pH8.0 と 9.0 の TSBS 系における Phda1 の吸着率は, 約 10%であり, pH6.0 と 7.0 では約 40%であった。一方, pH5.0 の場合では Phda1 の吸着率は大きく上昇し 99%となった。この結果は, 第 1 章の Phda1 の吸着率と同様の傾向を示しており, ホスト細胞に対する Phda10 の吸着は pH5.0 の酸性条件下が最適であることが示された。Phda10 のレセプター結合タンパク質とホスト細胞表面のレセプターの親和性は, 酸性条件下で上昇するものと推察される。

2-2-2. ファージ Phda10 の吸着率に及ぼす温度の影響

4〜40°C における Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* に対する吸着率の変化を Fig. 2-6 に示した。Phda10 の吸着率は 4〜30°C では温度による影響を受けずに約 15%だったが, 40°C では 97%にまで上昇した。これまでに, *S. thermophilus* ファージおよび *E. coli* ファージλの吸着率についても培養温度の上昇に伴い大きく上昇すると報告されている（Binetti *et al*., 2002; Moldovan *et al*., 2007）。食品にファージを使用する際には, 低温下でファージが機能するかどうかが問題となる。Phda10 の吸着率は 40°C で最大となったが, 食品への利用を想定した際にはホストの増殖に最適な 20〜30°C での吸着率と 4°C での吸着率に差がなく, 低温でも中温域と同等に感染が可能と示唆された。

2-2-3. ファージ Phda10 の吸着率に及ぼす二価カチオンの影響

Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* に対する吸着率に及ぼす二価カチオンの影響について Fig. 2-7 に示した。二価カチオンを添加しないコントロールでは, Phda10 の吸着率は 8.1%であった。1 mM Ca^{2+}, 1 mM Mg^{2+}の添加では吸着率はそれぞれ 24.8%, 21.6%にまで上昇した。一方, 1 mM Fe^{2+}, 1 mM Mn^{2+}, 1 mM Zn^{2+}での吸着率はそれぞれ 8.0%, 12.9%, 12.6%でありコントロールと比べて吸着率の上昇はあまり見られなかった。よって, Phda10 の吸着率向上に適した二価カチオンは Ca^{2+}および Mg^{2+}であると判断した。Phda1 においては Ca^{2+}と Mg^{2+}に加えて Fe^{2+}も吸着率上昇に寄与したが, Phda10

では Fe^{2+}による吸着率向上は認められなかった。

2-2-4. ファージ Phda10 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響

Phda10 の一段増殖に及ぼす二価カチオンの影響については Fig. 2-8 に示した。二価カチオンによる影響を見るため 1 mM の Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}の 5 種類のイオンを使用したが, Phda10 の増殖を促進したものは Ca^{2+}のみであった。コントロールの TSBS では Phda10 は培養 150 分後まで増殖せず, Ca^{2+}を除く他の二価カチオンにおいても培養 150 分後までに Phda10 は増殖しなかった。一方, 1 mM Ca^{2+}の添加により, Phda10 は培養 20 分以降に溶菌を開始し, 40 分には溶菌を終了した（Fig. 2-8）。すなわち, 1 mM Ca^{2+}存在下での Phda10 の潜伏期, 上昇期およびバーストサイズは 20 分, 20 分, 14.5 phages / an infected cell と評価された。

第 1 章で調べた Phda1 では, Ca^{2+}に加え Mg^{2+}の添加でも増殖が促進された。そこで, Ca^{2+}, Mg^{2+}の濃度を 25 mM に増大し, Phda10 の増殖に及ぼす影響を検討した。TSBS, Marine broth, 1, 25 mM $CaCl_2$, $MgSO_4$ 含有改変 TSBS における, Phda10 の潜伏期, 上昇期およびバーストサイズを Table 2-6 に示した。25 mM Ca^{2+}含有改変 TSBS での Phda10 の潜伏期, 上昇期, バーストサイズはそれぞれ 20 分, 20 分, 63.6 phages / an infected cell であったが, 25 mM Mg^{2+}含有改変 TSBS では 1 mM Mg^{2+}と同様に Phda10 の増殖は見られなかった。したがって, Phda10 は Ca^{2+}特異的にその増殖を促進され, 25 mM Ca^{2+}の存在によって *P. damselae* の発育制御効果を上昇させられる可能性が示唆された。Ca^{2+}は静電気的なファージ吸着の補助のほか, ホスト細胞内へのファージゲノムの注入に関わると報告されている（Weinberg, 1966）。ファージゲノム注入に関わるミオシン様タンパク質が外部からの Ca^{2+}添加により活性化されファージ感染効率が向上するとされており, Mg^{2+}, Mn^{2+}が Ca^{2+}の代わりになる場合があるとも報告されている（Weinberg, 1966）。本研究では, 詳細なメカニズムは検討していないが, これらの検討が行われたファージと同様のメカニズムでの吸着が推定されることから, Phda1 や Phda10 においても同様の感染促進メカニズムが関与している可能性が考えられる。また, Phda10 のバーストサイズが大きく上昇したため, ゲノム注入後のファージ複製に関しても Ca^{2+}が関与していると推察される。

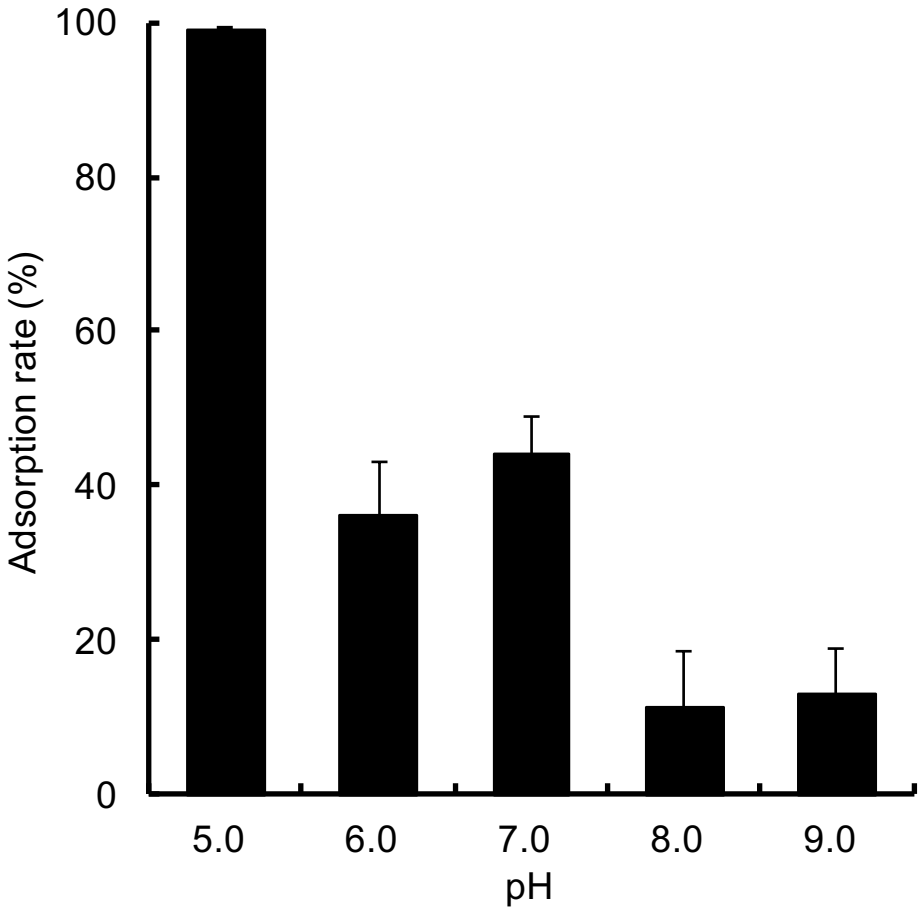


Fig. 2-5. Effect of pH on adsorption of Phda10 against *P. damselae* subsp. *damselae* OY2. Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

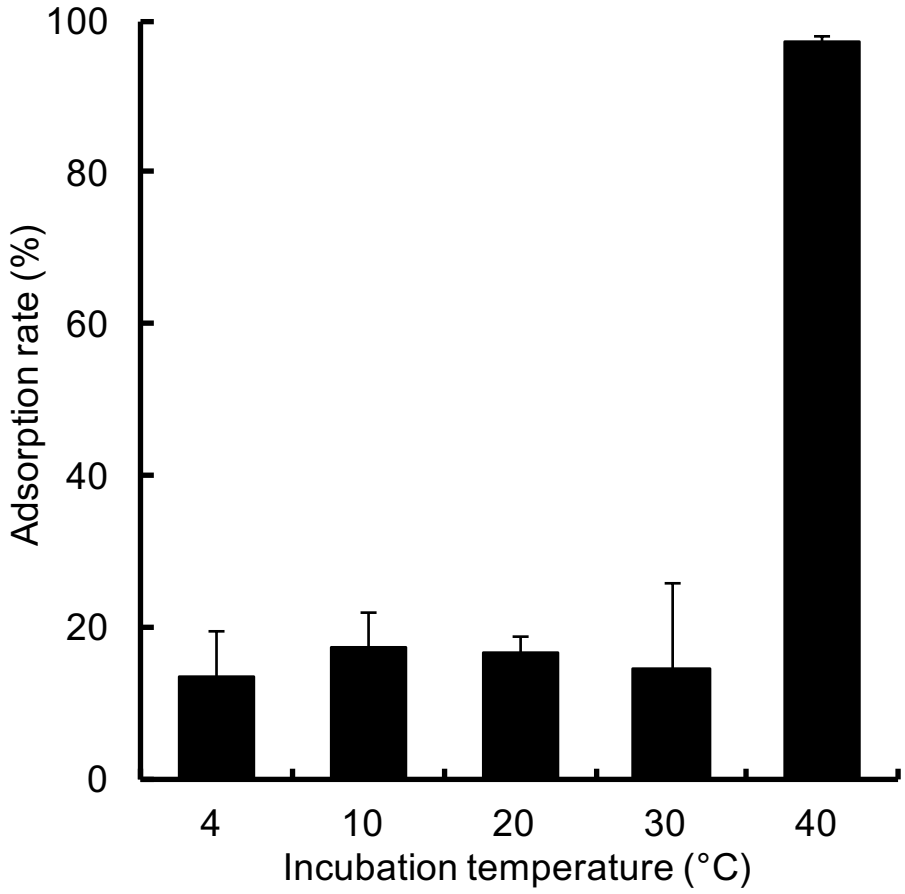


Fig. 2-6. Effect of temperature on adsorption of Phda10 against *P. damselae* subsp. *damselae* OY2.

Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

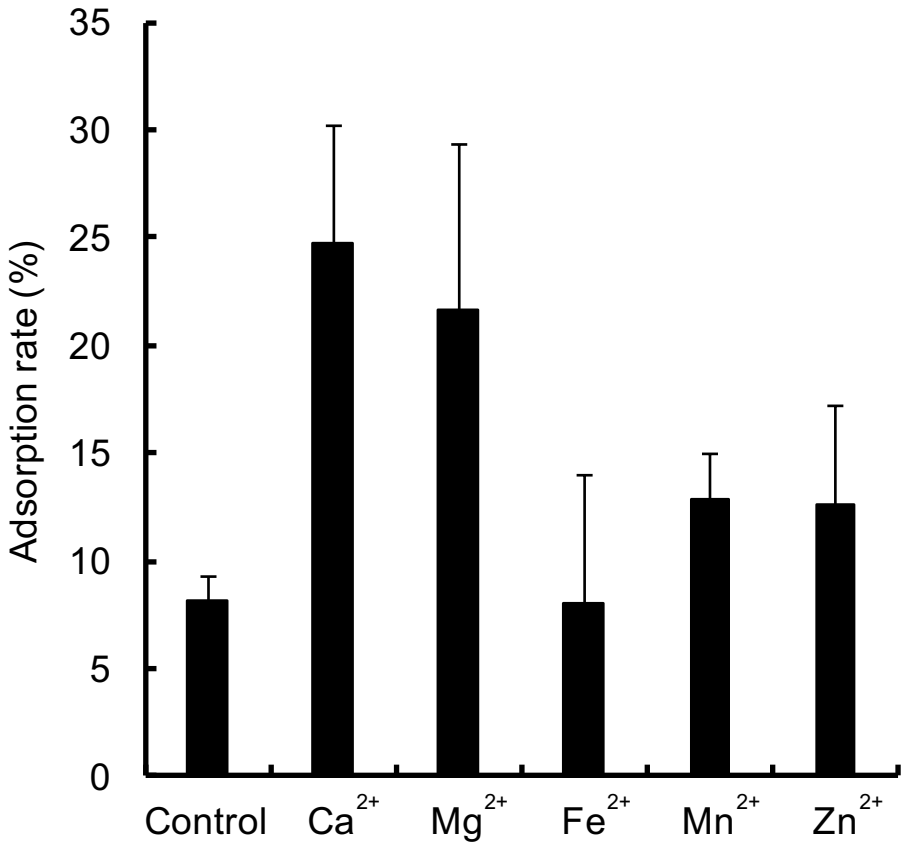


Fig. 2-7. Effect of divalent cations (1 mM) on adsorption of Phda10 against *P. damselae* subsp. *damselae* OY2.

Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

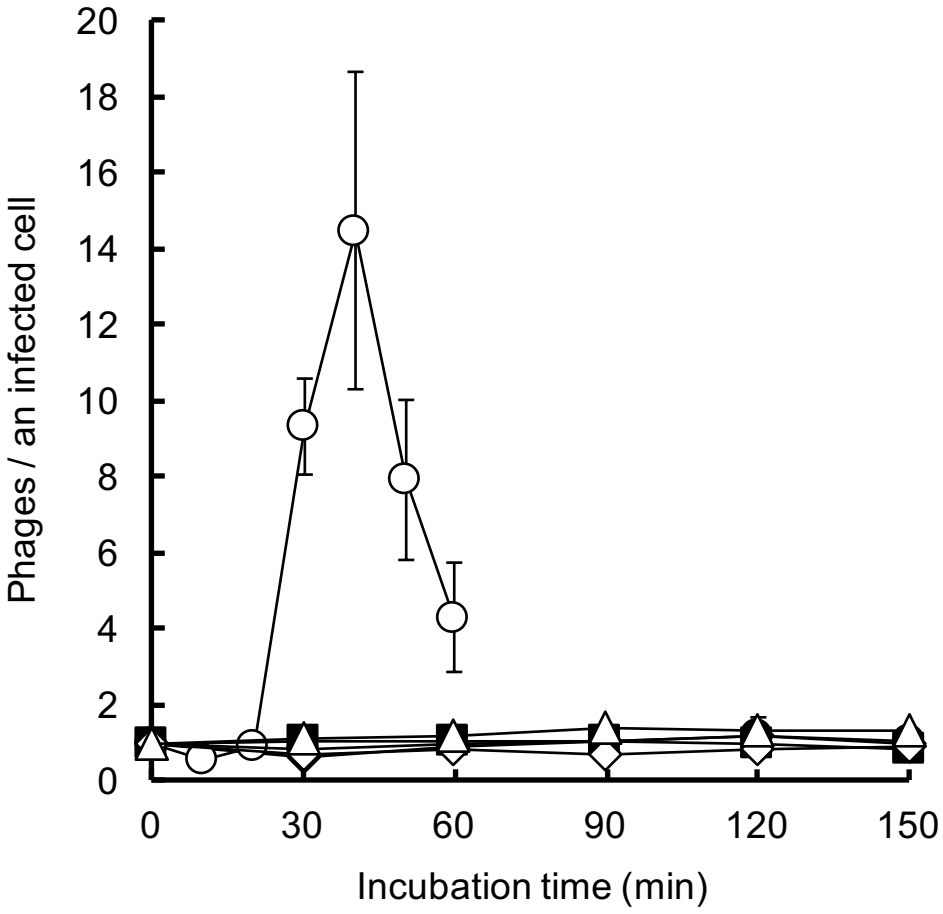


Fig. 2-8. Effect of divalent cations on the one-step growth of Phda10.

Symbols represent control (◆), $CaCl_2$ (○), $MgSO_4$ (■), $FeCl_2$ (●), $MnCl_2$ (◇) and $ZnCl_2$ (△). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

Table 2-6. Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration on latent period, rise period and burst size of Phda10

	Latent period (min)	Rise period (min)	Burst size (phages / an infected cell)
TSBS	N.G.	N.G.	N.G.
Marine broth	20	20	13.1 ± 1.1
1 mM Ca^{2+}	20	20	14.5 ± 4.2
25 mM Ca^{2+}	20	20	63.6 ± 6.8
1 mM Mg^{2+}	N.G.	N.G.	N.G.
25 mM Mg^{2+}	N.G.	N.G.	N.G.

N.G.; No growth.

第 3 節　ファージ Phda10 による *P. damselae* subsp. *damselae* の発育制御

前節では, ファージ Phda10 の吸着および増殖が pH や温度, Ca^{2+}の存在により変化することを明らかにした。本節では, Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育制御能に及ぼす Ca^{2+}, pH の影響について調べ, 酢酸カルシウムと Phda10 の併用が液体培地系における *P. damselae* subsp. *damselae* のヒスタミン蓄積を阻害するかどうか評価した。

試料および方法

2-3-1. ファージ Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育制御能に及ぼすカルシウムの影響

P. damselae subsp. *damselae* OY2 を 10^5 CFU/ml となるように TSBS に接種後, OD_{600} が 0.2 となるまで 25°C で培養した。10^5 CFU/ml となるように *P. damselae* OY2 を 25 mM $CaCl_2$ または 25 mM $MgSO_4$ 含有改変 TSBS に接種し, Phda10 を MOI = 1, 10, 100 となるように接種した。96 穴マイクロプレートの各ウェルに 150 µl 分注後, 12°C および 25°C で培養しマイクロプレートリーダー（Model 550; Bio-Rad）により継時的に OD_{595} を測定した。

2-3-2. ファージ Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育制御能に及ぼす pH の影響

P. damselae subsp. *damselae* OY2 を 10^5 CFU/ml となるように TSBS に接種後, OD_{600} が 0.2 となるまで 25°C で培養した。10^5 CFU/ml となるように 25 mM $CaCl_2$ 含有 TSBS（pH5.0, 6.0, 7.0）に *P. damselae* OY2 を接種し, Phda10 を MOI = 1, 10, 100 となるように接種した。96 穴マイクロプレートの各ウェルに 200 µl 分注後, 25°C で培養しマイクロプレートリーダーにより継時的に OD_{595} を測定した。

2-3-3. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育およびヒスタミン生成に及ぼすファージ Phda10 と酢酸カルシウム併用の影響

96 穴マイクロプレートのウェルに 2 倍濃度改変 TSBS（pH6.5）を 100 µl 分注後，酢酸または酢酸カルシウム 100 µl を分注し 2 倍段階希釈液列を作製した。10^5 CFU/ml となるように *P. damselae* subsp. *damselae* OY2 を接種後, Phda10 を MOI = 100 となるように接種した。12°C および 25°C で培養し，マイクロプレートリーダーにより継時的に OD_{595} を測定し, *P. damselae* の発育に及ぼす Phda10 と酢酸カルシウム併用の影響について調べた。

また, *P. damselae* の発育およびヒスタミン蓄積に及ぼす Phda10 と酢酸カルシウム併用の影響は，次のように調べた。25 mM 酢酸カルシウム, 1%L-ヒスチジン塩酸塩含有改変 TSBS（pH6.5）に, 1.0×10^3 CFU/ml となるように *P. damselae* OY2 を接種した。10^7 PFU/ml となるように Phda10 を接種後, 12°C または 20°C で培養し，継時的に生菌数およびヒスタミン濃度を測定した。生菌数は TSAS を用いた表面塗抹法（25°C, 24 h）により測定し，ヒスタミン濃度は HPLC を用いて第 1 章第 3 節と同様の方法により測定した。また, 20°C 培養における培養液の pH も測定した。

結果および考察

2-3-1.ファージ Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育制御能に及ぼすカルシウムおよびマグネシウムの影響

25 mM Ca^{2+}, Mg^{2+}含有改変 TSBS での Phda10 存在下における *P. damselae* subsp. *damselae* の発育動態を Fig. 2-9 に示した。25 mM Ca^{2+}を添加した改変 TSBS では, 両温度帯で MOI に関わらず Phda10 による *P. damselae* の発育阻害が確認され, 12°C では 48 時間, 25°C では 7 時間の間 OD_{595} の上昇が遅延した（Fig. 2-9A, C)。一方, 25 mM Mg^{2+}を添加した改変 TSBS では, 12°C と 25°C の両温度ともに Phda10 による発育阻害効果が見られたのは MOI＝100 のみであった(Fig. 2-9B, D)。第 2 章第 1 節では, Phda10 は TSBS において MOI = 100 で接種した時のみ *P. damselae* の発育阻害が確認された（Fig. 2-4)。すなわち, Mg^{2+}の添加は Phda10 による *P. damselae* の発育阻害効果に影響を及ぼさず, これは第 2 章第 2 節の結果 (Table 2-6) からも妥当であると考えられる。一方, Ca^{2+}添加区と Mg^{2+}添加区（MOI = 100）での *P. damselae* の発育曲線を比較すると大きな違いはなかった。また, Ca^{2+}添加区で MOI の違いによる発育阻害効果にも大きな差がなかった。よって, Ca^{2+}の添加は, より低濃度の Phda10 によって *P. damselae* に対する発育抑制効果を発揮させることが可能と示された。

2-3-2. ファージ Phda10 の *P. damselae* subsp. *damselae* 発育制御能に及ぼす pH の影響

pH5.0, 6.0, 7.0 の 25 mM $CaCl_2$ 含有改変 TSBS での Phda10 による *P. damselae* subsp. *damselae* 発育抑制を Fig. 2-10 に示した。pH5.0 では, MOI = 1, 10, 100 のいずれの条件においても *P. damselae* の発育は阻害されず（Fig. 2-10A）, pH6.0 では Phda10 による発育阻害効果が確認されたのは MOI＝100 の条件のみであった（Fig. 2-10B)。しかし, pH7.0 では Phda10 を接種した全ての条件で *P. damselae* の発育が阻害された（Fig. 2-10C)。すなわち, Phda10 の *P. damselae* 発育抑制効果は pH により大きく影響を受け, pH の低下に伴いその発育阻害効果が減少することが示唆された。第 2 章第 2 節では, ホスト細胞に対する Phda10 の吸着率は pH5.0 で大きく上昇したが, 本実験では *P. damselae* の発育阻害効果は pH5.0 では認められなかった。これは, 第 1 章の Phda1 と同様の結果となっている。加えて, *L. monocytogenes* ファージの例では, ファージの殺

菌効果が確認できたのはpH5.5〜8の間であり, pH7.0〜8.0で最もその効果が高いと報告されている（Leverentz *et al*., 2003）。そのため, 抗菌物質としてのファージの利用環境には制約があり, 中性域のpH環境下が適していると推察される。

2-3-3. *P. damselae* subsp. *damselae* の発育およびヒスタミン生成に及ぼすファージPhda10と酢酸カルシウム併用の影響

これまでの結果より, Phda10はCa^{2+}の存在により *P. damselae* subsp. *damselae* に対する発育抑制効果が増強されるが, 低 pH 環境下ではその発育抑制効果が低下することも明らかとなった。そこで, Phda10と有機酸塩のひとつである酢酸カルシウムの併用によって, *P. damselae* の発育およびヒスタミン蓄積を阻害できるのではないかと考えた。酢酸はpHの低下によりその抗菌力が増すことが知られているため（Brul and Coote, 1999）, Ca^{2+}塩の利用によってファージの発育抑制能を高めつつ, 低pH環境下では酢酸による *P. damselae* の発育阻害が期待できると予想した。

まず初めに, 酢酸カルシウムと Phda10 の併用効果について, 濁度法（OD_{595}）により評価を行った。なお, 比較対照としてPhda10と酢酸の併用も同様に評価した。25°Cでの酢酸, 酢酸カルシウムと Phda10 の併用効果について Fig. 2-11 に示した。酢酸および酢酸カルシウムは25〜100 mMで使用したが, 酢酸を添加した場合にはどの濃度においてもPhda10との併用効果は見られなかった（Fig. 2-11A）。一方, 酢酸カルシウムとの併用では, 酢酸カルシウムの濃度依存的に Phda10 との併用効果が確認された（Fig. 2-11B）。すなわち, 50 mM 酢酸カルシウムとPhda10の併用では, 酢酸カルシウム単独処理に比べて, 約30時間にわたってOD_{595}の上昇が遅延された。100 mM 酢酸カルシウム添加区では, Phda10接種の有無によらず *P. damselae* は発育しなかった。

そこで, 12°C での酢酸カルシウムと Phda10 の併用効果を検討したところ, 低温環境下ではより低濃度の酢酸カルシウムとの併用により *P. damselae* の発育が阻害された（Fig. 2-12）。したがって, 酢酸カルシウムとPhda10の併用は, Phda10単独処理よりも長期的に *P. damselae* の発育を阻害できる可能性が示唆された。

酢酸カルシウムと Phda10 の併用効果について, 生菌数とヒスタミン濃度の観点からも同様に評価した。12°Cと25°Cでの *P. damselae* の改変TSBSにおける発育およびヒスタミン蓄積に及ぼす酢酸カルシウムとPhda10の併用処理の影響をFig. 2-13に示

した。12°C では, 25 mM 酢酸カルシウム単独処理区の生菌数は未処理コントロールの生菌数とほぼ同等であり, Phda10 単独処理区の生菌数もコントロールよりもわずかに低いのみであった。しかし, 25 mM 酢酸カルシウムと Phda10 の併用処理区では *P. damselae* の生菌数は大きく低下し, 培養 48 時間目では検出限界未満（< 1 log CFU/ml）となった（Fig. 2-13A）。コントロール, 25 mM 酢酸カルシウム単独処理区, Phda10 単独処理区の 192 時間目におけるヒスタミン濃度はそれぞれ 2156.4 mg/l, 603.5 mg/l, 292.2 mg/l だったが, 25 mM 酢酸カルシウムと Phda10 の併用処理区では培養期間を通じてヒスタミンは検出限界未満（< 20 mg/l）となった（Fig. 2-13B）。同様に, 20°C においても酢酸カルシウムと Phda10 の併用処理は *P. damselae* の発育を大きく阻害し, 併用処理区の生菌数は 0 時間目を除きすべて検出限界未満となった（Fig. 2-13C）。それぞれの単独処理区では多くのヒスタミンの蓄積が確認され, 培養 48 時間目のコントロール, 酢酸カルシウム単独処理区, Phda10 単独処理区におけるヒスタミン濃度はそれぞれ 5219.2 mg/l, 2655.6 mg/l, 5722.7 mg/l であったが, 併用処理区では培養期間を通じてヒスタミン濃度は検出限界未満（< 20 mg/l）となった（Fig. 2-13D）。また, 20°C での培地 pH の変化を追跡したところ, *P. damselae* の発育に応じ, 酸生成に伴う pH 低下およびヒスタミン蓄積に伴う pH 上昇が確認された（Table 2-7）。以上より, 酢酸カルシウムと Phda10 の併用処理は, *P. damselae* の発育と, それに伴うヒスタミンの蓄積も効果的に抑制可能であることが明らかである。

食品加工におけるファージと抗菌物質の併用処理に関する報告は未だ少なく, これまでに知られているものは, ナイシン, シンナムアルデヒド, 乳酸カリウム, 二酢酸ナトリウム等との組み合わせである（Leverentz *et al*., 2003; Viazis *et al*., 2011; Chibeu *et al*., 2013）。酢酸カルシウムと Phda10 の組み合わせは, ファージの感染サイクルを活性化し, 相乗的な発育抑制能を示す新たな併用処理であると言える。

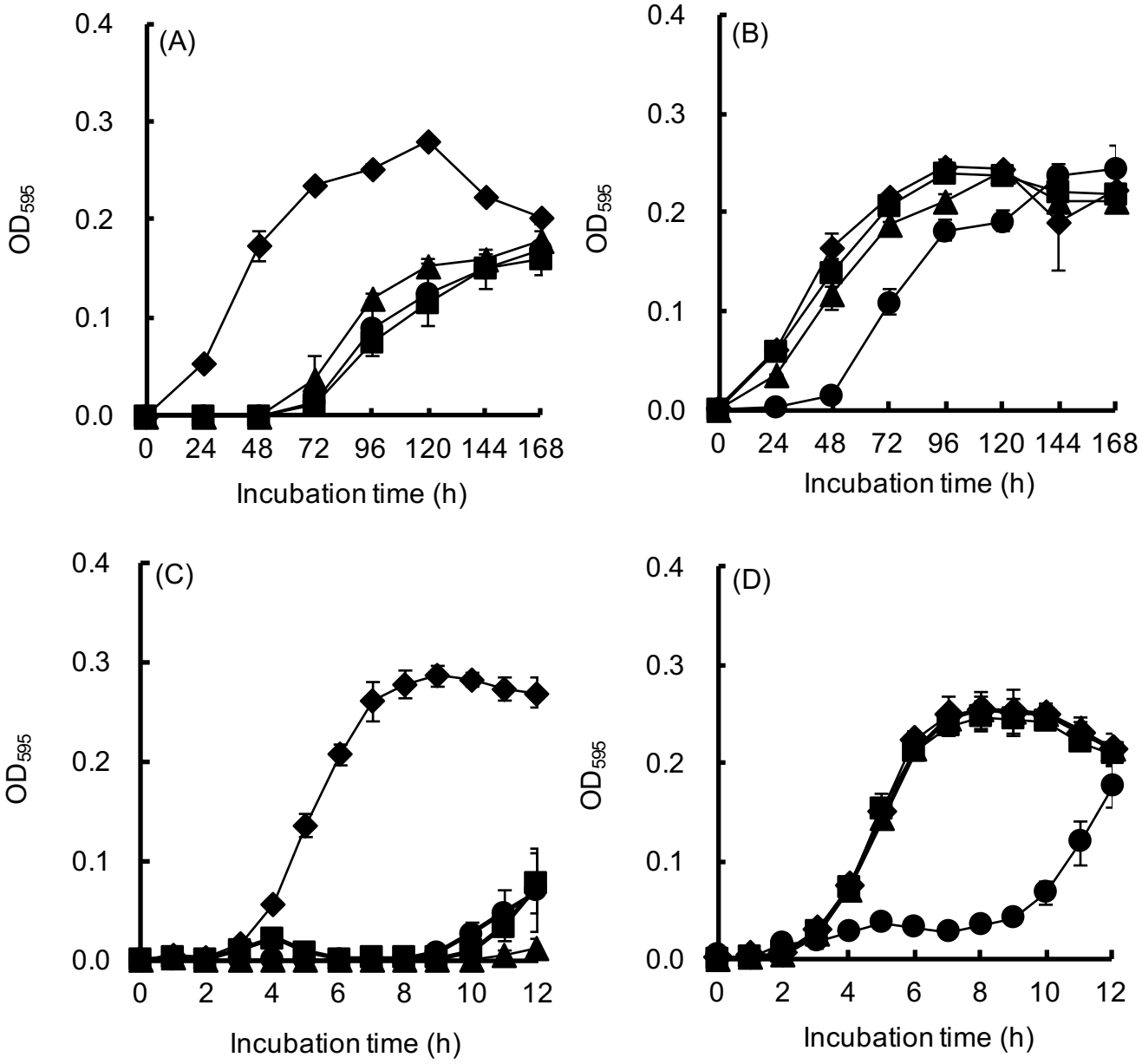


Fig. 2-9. Effect of Ca^{2+} (A, C) and Mg^{2+} (B, D) on the antimicrobial effects of Phda10 treatment against *P. damselae* subsp. *damselae* at 12°C (A, B) or 25°C (C, D).

Symbols represent control without Phda10 (◆), Phda10 treatment at MOI = 1.0 (■), 10 (▲) and 100 (●). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

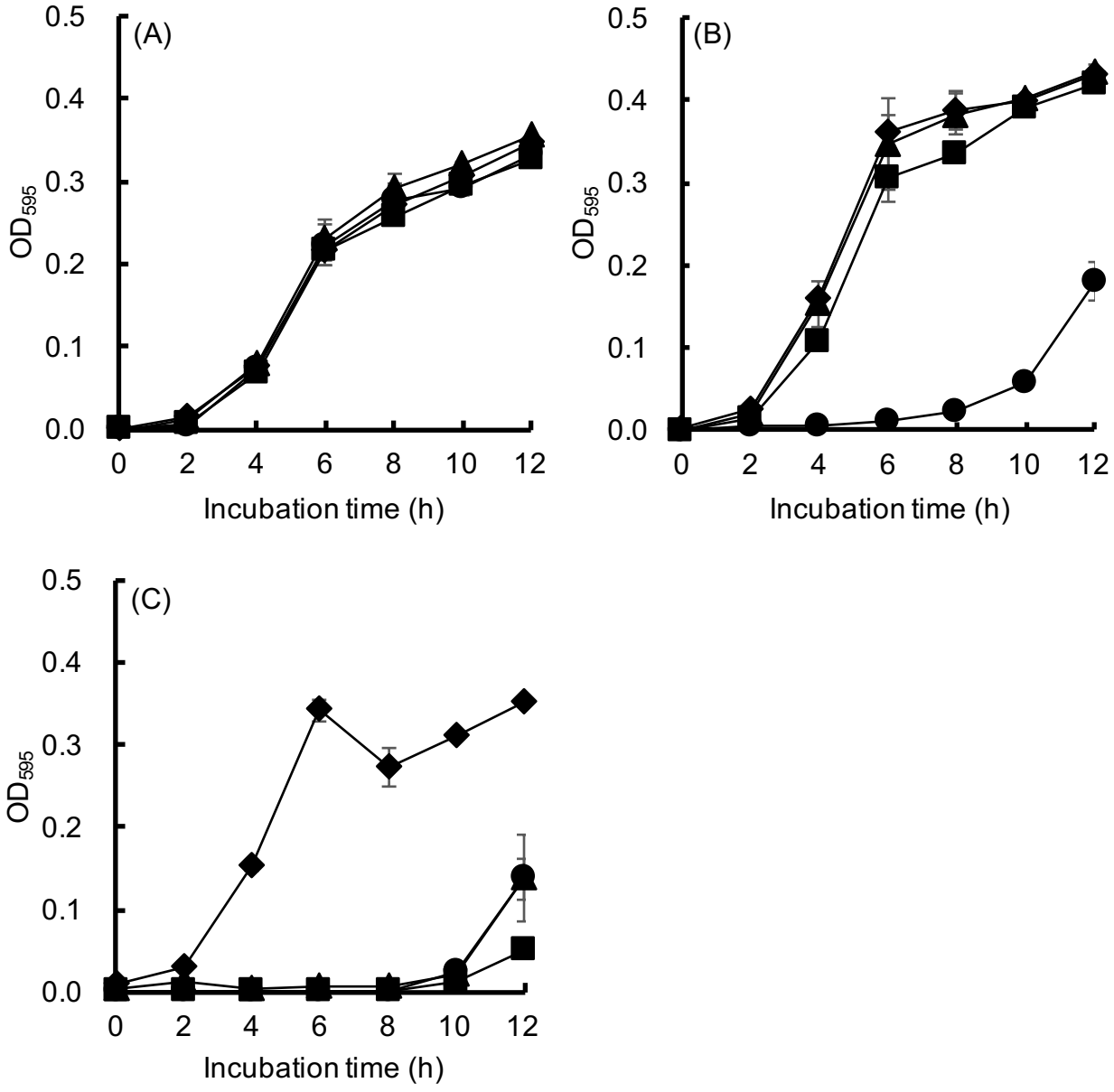


Fig. 2-10. Antimicrobial effect of Phda10 on the growth of *P. damselae* subsp. *damselae* incubated in modified TSBS supplemented with 25 mM $CaCl_2$ at pH5.0 (A), 6.0 (B) and 7.0 (C).

Symbols represent control without Phda10 (◆), Phda10 treatment at MOI = 1.0 (▲), 10 (■) and 100 (●). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

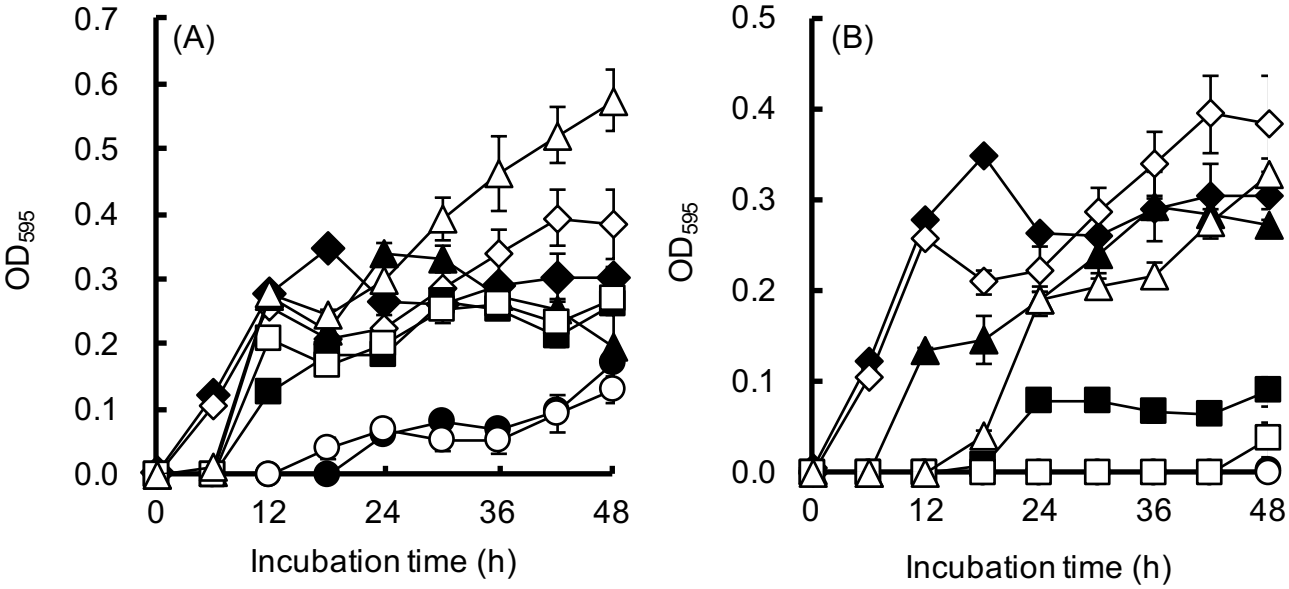


Fig. 2-11. Effect of combined treatment with Phda10 and acetic acid (A) or calcium acetate (B) on the growth of *P. damseale* at 25°C.

Symbols represent control with (◇) or without (◆) Phda10, 25 mM acetic acid or calcium acetate with (△) or without (▲) Phda10, 50 mM acetic acid or calcium acetate with (□) or without (■) Phda10, 100 mM acetic acid or calcium acetate with (○) or without (●) Phda10. Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

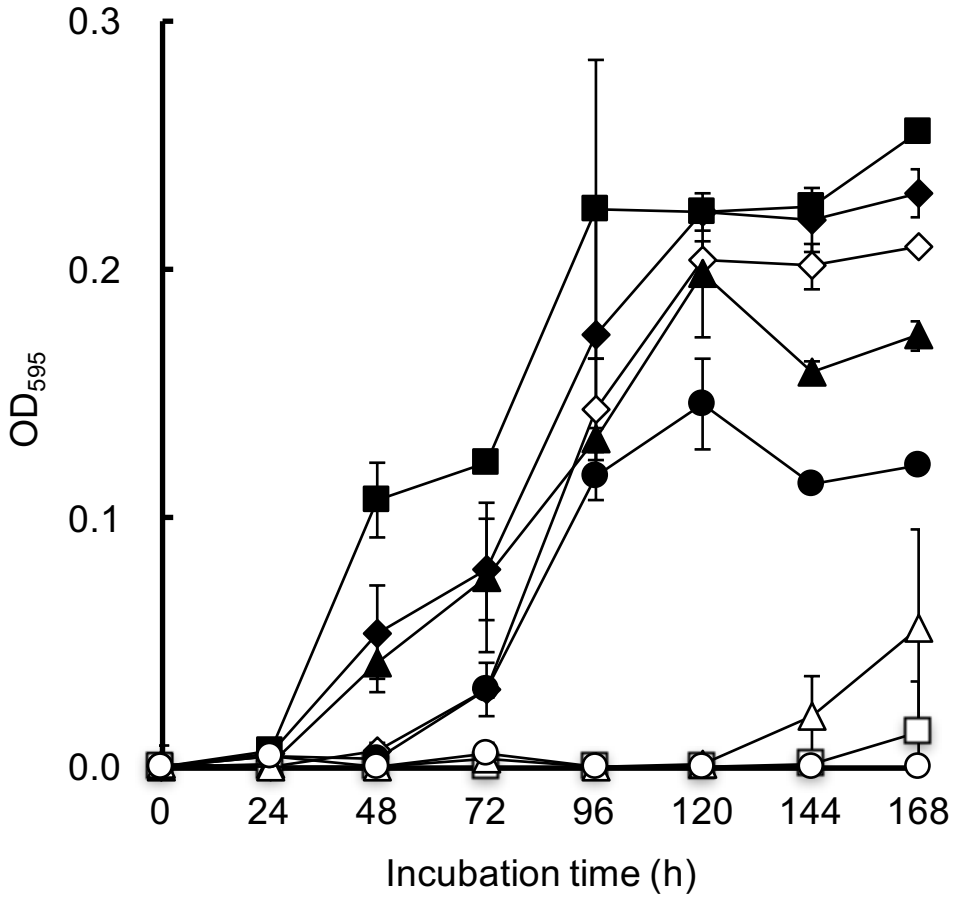


Fig. 2-12. Effect of combined treatment with Phda10 and calcium acetate on the growth of *P. damseale* at 12°C.

Symbols represent control with (◇) or without (◆) Phda10, 6.25 mM calcium acetate with (□) or without (■) Phda10, 12.5 mM calcium acetate with (△) or without (▲) Phda10, 25 mM calcium acetate with (○) or without (●) Phda10. Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

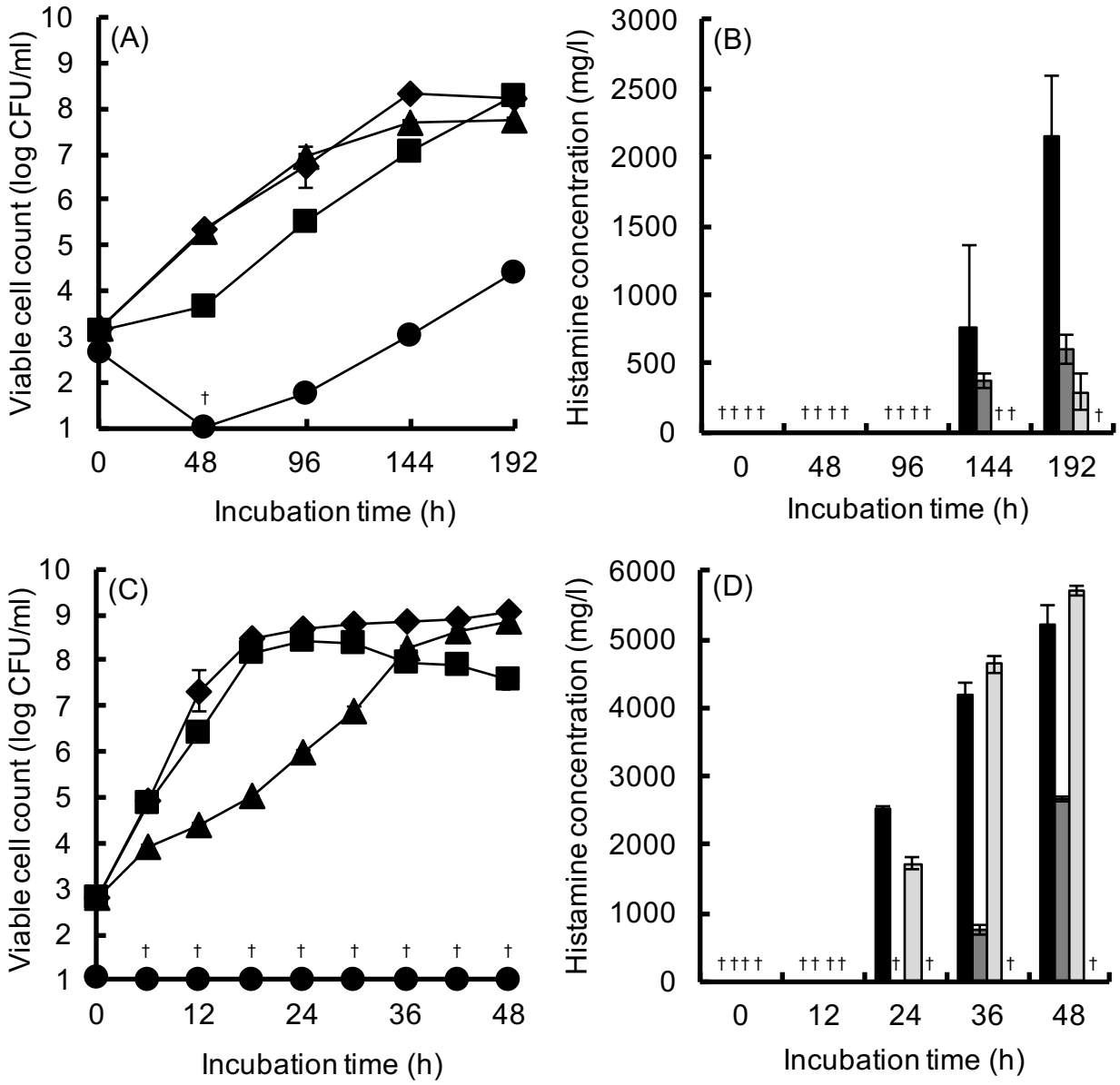


Fig. 2-13. Effect of combined treatment with Phda10 and calcium acetate on the growth of (A, C) and histamine accumulation (B, D) by *P. damselae* incubated at 12°C (A, B) or 20°C (C, D).

Symbols represents viable cell count of control (◆), calcium acetate (▲), Phda10 treatment (■) and combined treatment with calcium acetate and Phda10 (●). Columns represents histamine concentration of control (black), calcium acetate (dark gray), Phda10 treatment (light gray) and combined treatment with calcium acetate and Phda10 (white). Dagger (†) represents under detectable limit of viable cell count (1 log CFU/ml) or histamine concentration (20 mg/l). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

Table 2-7. Changes of pH during incubation of *P. damselae* OY2 under each treatment conditions at 20°C

Treatment	Incubation time (h)				
	0	12	24	36	48
Control	6.4	6.4	6.2	6.8	7.1
Calcium acetate	6.4	6.4	6.4	6.4	6.5
Phda10	6.4	6.5	6.1	6.7	7.1
Calcium acetate + Phda10	6.4	6.4	6.4	6.5	6.4

第 3 章　*Morganella morganii* subsp. *morganii* ファージ FSP1 の分離とその感染メカニズムおよび耐性菌に関する検討

第 2 章では, 海洋細菌 *P. damselae* subsp. *damselae* ファージ Phda10 によるヒスタミン蓄積制御の可能性を示した。しかし, 魚肉に関わるヒスタミン生成菌には様々な種が報告されている。*P. damselae* の他には同じ海洋細菌の *P. phosphoreum*, 腸内細菌科の *E. aerogenes, M. morganii* subsp. *morganii*, *P. vulgaris, R. planticola* などがある（Bermejo *et al.*, 2003; Kanki *et al*., 2004; Rodtong *et al.* 2005; Ferrario *et al*., 2012a）。これらの中でも, *M. morganii* は魚肉からの分離例も多く, 非常に強力なヒスタミン生成能を有する。PCR-southern hybridization 法によって, 魚体および水産物加工工場における *M. morganii* の汚染状況を調べた報告（Kim *et al*., 2003）では, *M. morganii* は, サバ, イワシ, マグロのエラや表皮を汚染しており, 魚肉加工工場内でも汚染が拡大していることが明らかとなっている。したがって, 衛生的な取扱いのみでは *M. morganii* による魚肉の汚染を回避することは困難であると考えられる。そこで *P. damselae* の他にヒスタミン生成菌として極めて重要な *M. morganii* を制御対象菌として選定した。

M. morganii ファージに関する研究は乏しく, ファージ MmP1 のゲノム解析に関する報告（Zhu *et al*., 2010）しか見当たらない。そこで本章では, *M. morganii* subsp. *morganii* ファージを分離し, 獲得した *M. morganii* ファージ FSP1 の感染メカニズム, FSP1 耐性菌の耐性獲得機構の解明および FSP1 耐性菌の制御方法の検討を行った。

第 1 節　*M. morganii* subsp. *morganii* ファージ FSP1 の分離とその性状

M. morganii subsp. *morganii* は魚肉からの分離例が多く, 非常に強力なヒスタミン生成能を持つグラム陰性細菌である。PCR-southern hybridization 法による分析では, *M. morganii* はサバ, イワシ, マグロのエラや表皮, 魚肉加工工場内を汚染していることが明らかとなっており（Kim *et al*., 203）, 衛生的な取り扱いのみでは食品の汚染を防ぐことは困難であると推察される。そこで, 第 2 章までの *P. damselae* subsp. *damselae* に加えて, *M. morganii* subsp. *morganii* を制御対象菌として選定した。そこで本節では, *M. morganii* subsp. *morganii* の制御に有用なファージの分離および分離ファージの性状について調べた。

試料および方法

3-1-1. *M. morganii* subsp. *morganii* ファージの分離

ファージの分離は, Carvalho ら（2010）の方法に準じて 530 μg/ml $CaCl_2$・$2H_2O$, 819 μg/ml $MgSO_4$・$2H_2O$ 含有 TSB を使用した。2 倍濃度の 530 μg/ml $CaCl_2$・$2H_2O$, 819 μg/ml $MgSO_4$・$2H_2O$ 含有 TSB 300 ml に函館市河川水を 300 ml 混合し, 対数増殖期の *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^T, NBRC3168, ATCC25829 菌液を接種した。30°C で 12 時間培養後, 培養液を遠心分離（3,500×*g*, 30 min, 4°C）し, フィルター濾過（孔径; 0.45 μm）した。TSA, 0.5%軟寒天および *M. morganii* NBRC3848^T を用いたプラークアッセイ法により, 濾液中に含まれるファージを検出し, 単一プラークを分離し純化したものを *M. morganii* subsp. *morganii* ファージ FSP1 として以後の実験に供した。

FSP1 は対数増殖期の *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^T 菌液を用いて増殖させ, PEG 沈殿および塩化セシウム密度勾配超遠心により濃縮・精製した。

3-1-2. ファージ FSP1 の宿主域分析

FSP1 の宿主域は, TSA および 0.5%軟寒天を用いて, 第 1 章第 1 節と同様の方法で行った。

3-1-3. ファージ FSP1 の TEM 観察

FSP1 の形態観察は第 1 章第 1 節と同様の方法で行った。

3-1-4. ファージ FSP1 の一段増殖実験

TSB 9.9 ml に 10^5 CFU/ml となるように *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^T 懸濁液 100 µl を接種し, OD_{600} が 0.1 となるまで 30°C で培養した。FSP1 を MOI = 0.1 となるように接種後, 25°C で 5 分間保持し菌体にファージを吸着させた。遠心分離（10,000×*g*, 2 min, 4°C）によりファージが吸着した菌体を沈殿させ, ペレットを新鮮な TSB により懸濁後, 30°C で培養した。継時的に培養液を採取し, プラーク形成数を測定し, プラーク形成数の変化から FSP1 の潜伏期, 上昇期, バーストサイズを算出した。同時に, 採取した培養液をクロロホルム処理し, 菌体を破壊して細胞内のファージを取り出した後, プラークアッセイ法によりプラーク形成数を測定することにより暗黒期を求めた。

3-1-5. ファージ FSP1 の安定性試験

第 1 章第 1 節と同様の方法で TSB における FSP1 の耐熱性（50～70°C）および耐 pH 性（pH1.0～12.0, 30°C, 24 h）を評価した。

3-1-6. ファージ FSP1 の *M. morganii* 発育抑制能の分析

TSB に 10^6 CFU/ml となるように *M. morganii* NBRC3848^T を接種し, 30°C で培養した。継時的に培養液を採取し, TSA を用いた表面塗抹法（37°C, 24 h）により *M. morganii* の生菌数を測定した。OD_{600} が 0.1 に達した時点で FSP1 を MOI = 1.0, 10 となるように接種後, 30°C で培養し, 継時的に *M. morganii* の生菌数を測定した。

結果および考察

3-1-1. ファージ FSP1 の宿主域

北海道函館市内の河川水より *M. morganii* subsp. *morganii* ファージの分離を試みた結果, 小田島川河川水試料より *M. morganii* に感染するファージの分離に成功した。

M. morganii を含むグラム陰性菌 26 株, グラム陽性菌 4 株に対してスポットテスト法により FSP1 の宿主域を調べた結果, FSP1 は *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^{T}, NBRC3168, ATCC25829 の 3 株のみにプラークを形成し, 他のグラム陰性菌およびグラム陽性菌に対してはプラークを形成しなかった（Table 3-1）。したがって, FSP1 は *M. morganii* に特異的に感染するファージであることが示され, *M. morganii* subsp. *morganii* 制御に用いるため以後の性状検査に供した。

3-1-2. ファージ FSP1 の形態学的特徴

TEM により, FSP1 の形態観察および科レベルでの同定を行った。TEM 観察像は Fig. 3-1 に示した。FSP1 は頭部および鞘のある尾部から成るファージであり, 頭部は 110 ± 7.2 nm（mean ± SD）, 尾部は 114 ± 5.5 nm（mean ± SD）であった（n = 8）。したがって, FSP1 は *Caudovirales* 目 *Myoviridae* 科に属するファージであると同定した。

3-1-3. ファージ FSP1 の一段増殖曲線

TSB での FSP1 の一段増殖曲線を Fig. 3-2 に示した。一段増殖実験の際に, 培養液をクロロホルム処理後にプラーク形成数を測定することによりファージの暗黒期を知ることができる。暗黒期とは, ファージが感染してから菌体内でファージ粒子の形成を完了するまでの時間である。FSP1 は感染開始 20 分でファージ粒子を完成させ, 30 分以降に溶菌を開始し, 培養 45 分で溶菌を完了した。すなわち, FSP1 の暗黒期, 潜伏期, 上昇期, バーストサイズはそれぞれ 20 分間, 30 分間, 15 分間, 42 phages / an infected cell と決定した。これまでに分離された *Myoviridae* ファージの潜伏期, 暗黒期, バーストサイズは 15〜50 分間, 10〜40 分間, 50〜150 phages / an infected cell であった（Raya *et al*., 2006; Carey-Smith *et al*., 2006; Uchiyama *et al*., 2008; Hsieh *et al*., 2011; Park *et al*.,

2012)。これらのファージと比較した結果, FSP1 は既知ファージと同等の潜伏期, 暗黒期, バーストサイズを持つことが明らかとなった。

3-1-4. ファージ FSP1 の安定性

TSB における FSP1 の安定性を Fig. 3-3 に示した。FSP1 は 50°C, 60 分間の加熱にはほぼ安定であったが, 55°C および 60°C, 60 分間の加熱ではプラーク形成数が 3〜3.5 log PFU/ml 減少した。さらに, 65°C および 70°C での加熱では FSP1 のプラーク形成数は検出限界未満（< 1 log PFU/ml）まで減少した。pH 耐性については, FSP1 は pH5.0〜10.0 で安定であり, pH3.0 以下の酸性および pH12.0 でプラーク形成数が検出限界未満（< 1 log PFU/ml）となった。すなわち, 加工原料としての魚肉への接種を想定した場合, FSP1 は魚肉中で安定してホストへの感染性を維持できると考えられる。

3-1-5. *M. morganii* の発育に及ぼすファージ FSP1 処理の影響

M. morganii の発育に及ぼすファージ FSP1 処理の影響について Fig. 3-4 に示した。FSP1 は, *M. morganii* の培養液の OD_{600} が 0.1 となった時点で MOI = 1.0 または MOI = 10 となるように接種した。MOI = 1.0 で接種した場合, *M. morganii* の生菌数は FSP1 接種 1 時間後に 7.2 log CFU/ml から 3.7 log CFU/ml に減少した。さらに, MOI = 10 で接種した場合は, *M. morganii* の生菌数は FSP1 接種 1 時間後に検出限界未満（< 1 log CFU/ml）まで減少した。よって, FSP1 の利用は *M. morganii* を制御するための有効な手段となる可能性が示唆された。

しかし, MOI = 1.0 では FSP1 接種後 2 時間, MOI = 10 では FSP1 接種後 5 時間で *M. morganii* の再増殖が確認された。これは, 第 1 章での Phda1 の実験の際に見られた *P. damselae* subsp. *damselae* の再増殖（Fig. 1-6）と同様に, ファージ耐性菌の発生によるものであると考えられる。よって, 前述の通り, ファージカクテルを用いることにより FSP1 耐性菌の出現および再増殖を阻止することが可能であると推察される。

Table 3-1. Host range of FSP1

Bacterial speacies	Strain	Plaque formation
Gram-negative bacteria		
Morganella morganii subsp. *morganii*	NBRC3848^T	+
Morganella morganii subsp. *morganii*	NBRC3168	+
Morganella morganii subsp. *morganii*	ATCC25829	+
Aeromonas hydrophila	NBRC3820	-
Citrobactor freundii	JCM1657^T	-
Cronobactor sakazakii	ATCC51329	-
Enterobacter gergotiae	JCM1234	-
Escherichia coli	JCM1649^T	-
Escherichia coli	ATCC51446	-
Escherichia coli	ATCC51813	-
Hafnia alvei	JCM1666	-
Klebsiella pneumoniae	ATCC13883	-
Photobacterium damselae subsp. *damselae*	JCM8969	-
Proteus hauseri	ATCC13315	-
Proteus mirabillis	JCM1669	-
Proteus vulgaris	ATCC33420	-
Providencia alcalifaciens	ATCC9886	-
Providencia rettgeri	ATCC9250	-
Providencia rustigianii	JCM3953	-
Providencia stuartii	ATCC33672	-
Pseudomonas fluorescens	JCM5963	-
Raoultella ornithiolytica	ATCC31896	-
Salmonella Enteritidis	NBRC3313	-
Salmonella Infantis	ATCC51741	-
Salmonella Typhimurium	IID1000	-
Yersinia enterocolitica	ATCC9610	-
Gram-positive bacteria		
Bacillus cereus	JCM2152^T	-
Paenibacillus chibensis	NBRC15958^T	-
Paenibacillus favisporus	E123	-
Staphylococcus aureus	NBRC14462	-

+, clear plaque: -, no plaque

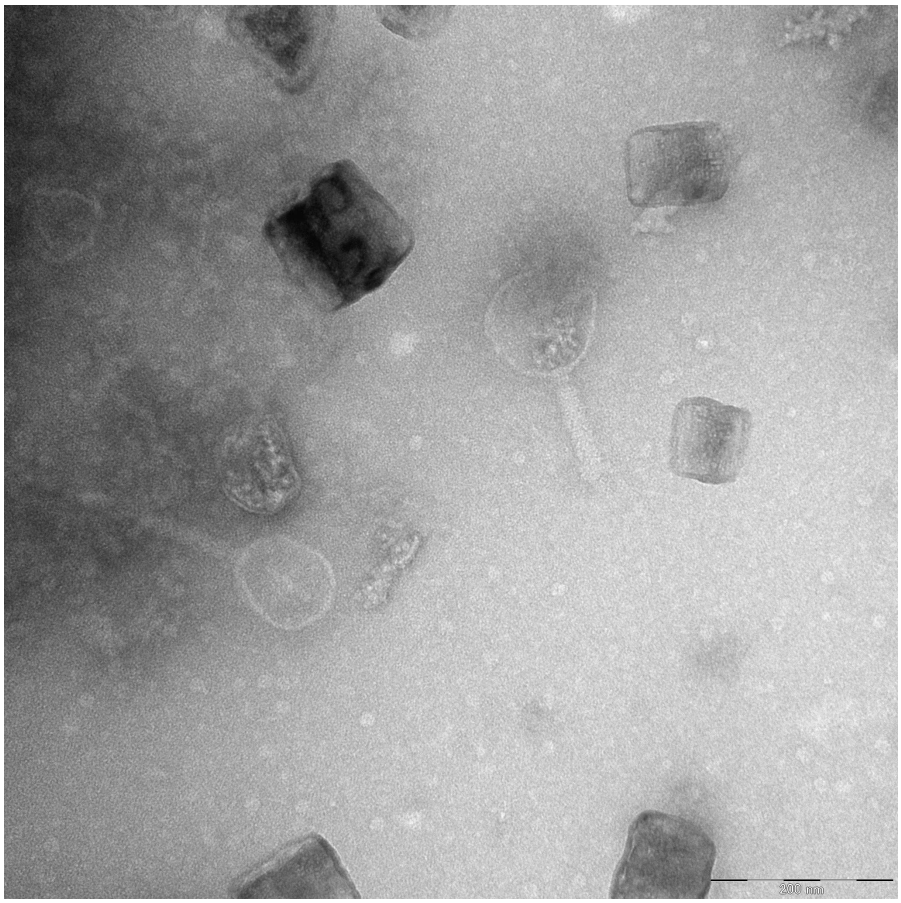


Fig. 3-1. Transmission electron microscopic image of FSP1. The scall bar indicates 200 nm.

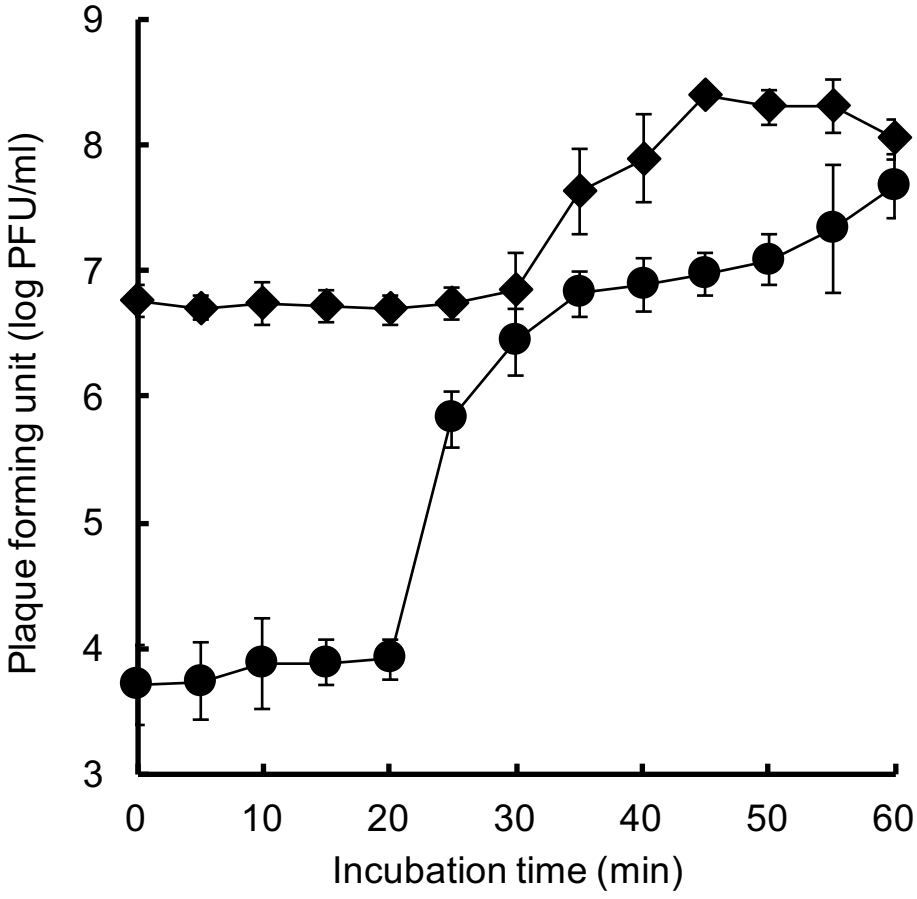


Fig. 3-2. One-step growth curve of FSP1 on *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^{T} incubated in TSB at 30°C.

Symbols represent plaque forming unit of FSP1 of not treated (◆) and chloroform treated (●) samples. Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

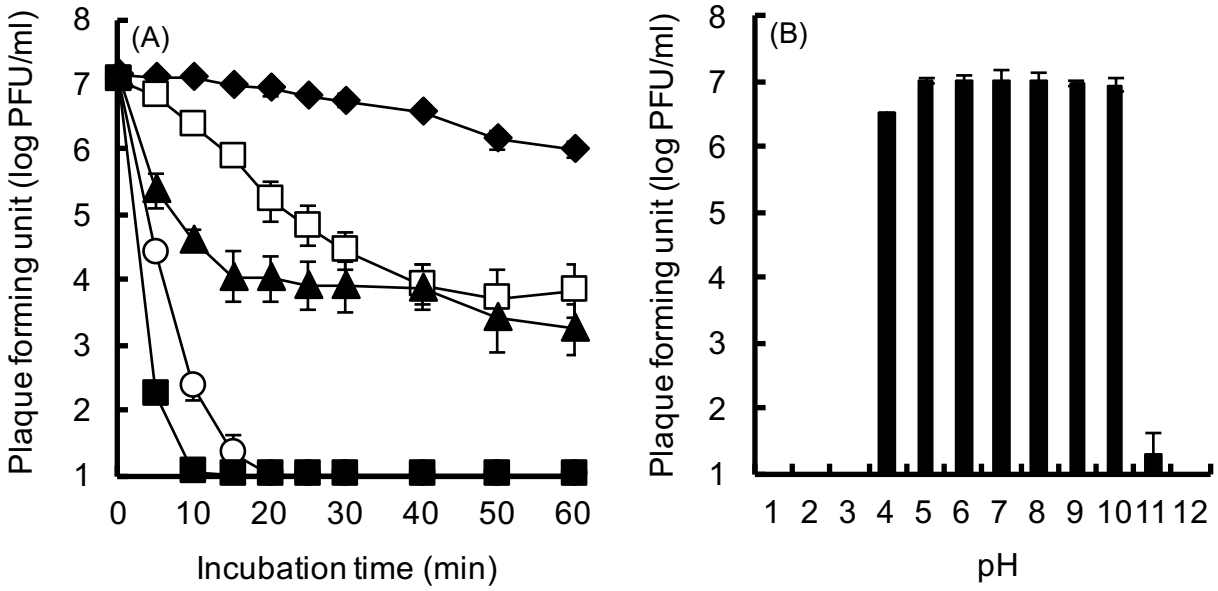


Fig. 3-3. Thermal stability (A) and pH stability (B) of FSP1 in TSB.

Symbols represent the phages heated at 50°C (◆), 55°C (□), 60°C (▲), 65°C (○) and 70°C (■). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

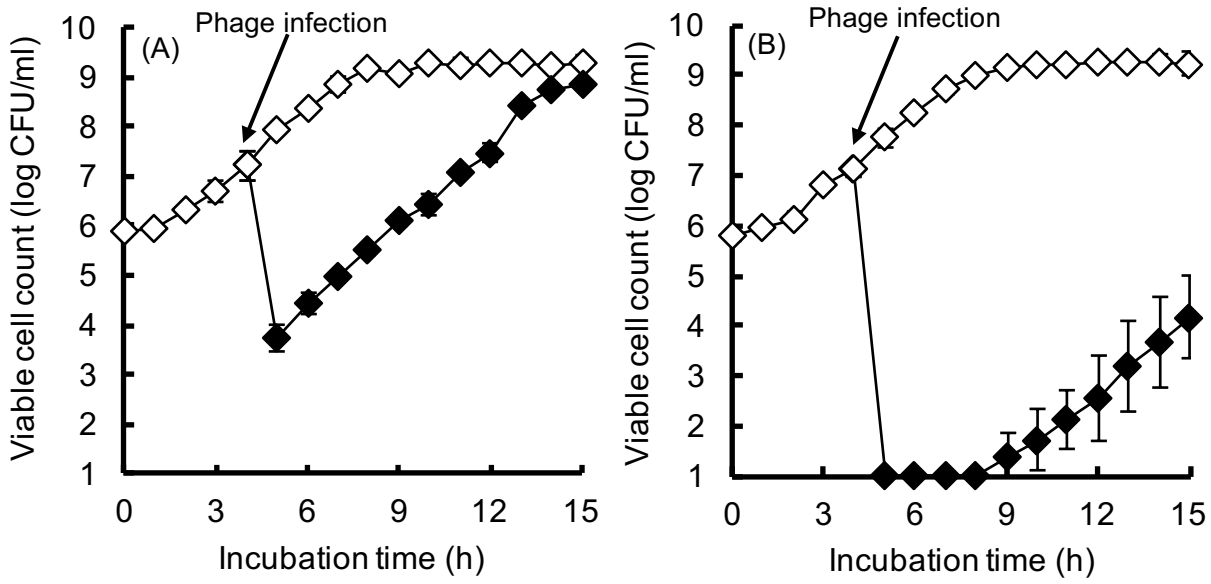


Fig. 3-4. Changes in the growth of *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^{T} at 30°C with FSP1 treatment at MOI = 1.0 (A) and MOI = 10 (B).

FSP1 was inoculated when OD_{600} was reached at 0.1 which correspond to approximately 10^{7} CFU/ml of viable cell count. Symbols represent control (◇), FSP1 treatment (◆). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

第 2 節　ファージ FSP1 のレセプター分析

前節では, 函館市河川水より *M. morganii* subsp. *morganii* ファージ FSP1 を分離し, その性状について分析した。その結果, FSP1 は *M. morganii* に特異的な *Myoviridae* 科ファージであり, 液体培地系で *M. morganii* の生菌数を大きく減少させ, *M. morganii* の制御に有用なファージであることが示唆された。そこで本節では, FSP1 の感染メカニズムを解明するためレセプターの分析を行った。

ファージは, 感染の初めに, ホスト細胞表面のレセプターを用いて特異的にホストを認識して吸着する。ホスト細胞表面の物質がレセプターとして機能するため, グラム陰性菌では外膜タンパク質やリポ多糖が主要なレセプターであると推察される。本節では, 2 種類の方法で FSP1 のレセプター分析を試みた。1 つ目は, 細胞表面のプロテアーゼ処理および過ヨウ素酸ナトリウム処理によりホスト細胞表面の外膜タンパク質およびリポ多糖を破壊し, FSP1 の吸着率を測定する方法, 2 つ目はホスト細胞より外膜タンパク質およびリポ多糖を抽出し, 抽出した外膜タンパク質およびリポ多糖により FSP1 の不活化試験を行う方法である。外膜タンパク質またはリポ多糖がレセプターであった場合, FSP1 のレセプターにこれらの物質が吸着し, プラーク形成数が減少することが考えられる。

試料および方法

3-2-1. プロテアーゼ処理したホスト細胞に対する FSP1 吸着率の測定

ホスト細胞表面のタンパク質をプロテアーゼにより処理した時の, FSP1 吸着率の変化を調べた。すなわち, TSB で 30°C, 18 時間培養した *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^{T} の新鮮培養菌液を PBS で集菌洗浄（10,000×*g*, 2 min, 4°C）し, 0.1 または 1 mg/ml プロテイナーゼ K で 30°C, 3 時間の処理を行った。TSB 900 µl で集菌洗浄（10,000×*g*, 2 min, 4°C）後, TSB に懸濁した FSP1 を 10^5 PFU/ml となるように 100 µl 添加した。37°C で 10 分間培養し, 遠心分離（10,000×*g*, 1 min, 4°C）後, 上清の遊離ファージ数をプラークアッセイ法により測定した。*M. morganii* を加えていない TSB（ホスト未吸着状態）でのプラーク形成数をブランクとし, 吸着率を算出した。

3-2-2. 過ヨウ素酸ナトリウム処理したホスト細胞に対する FSP1 吸着率の測定

ホスト細胞表面のリポ多糖を過ヨウ素酸ナトリウムにより処理した時の, FSP1 吸着率の変化を調べた。すなわち, TSB で 30°C, 18 時間培養した *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^{T} の新鮮培養菌液を 50 mM 酢酸ナトリウム（pH5.2）で集菌洗浄（10,000×*g*, 2 min, 4°C）し, 10 または 100 mM 過ヨウ素酸ナトリウム含有酢酸ナトリウムで 30°C, 2 時間（暗所）の処理を行った。TSB 900 µl で集菌洗浄（10,000×*g*, 2 min, 4°C）後, TSB に懸濁した FSP1 を 10^5 PFU/ml となるように 100 µl 添加した。37°C で 10 分間培養し, 遠心分離（10,000×*g*, 1 min, 4°C）後, 上清の遊離ファージ数をプラークアッセイ法により測定した。*M. morganii* を加えていない TSB（ホスト未吸着状態）でのプラーク形成数をブランクとし, 吸着率を算出した。

3-2-3. *M. morganii* subsp. *morganii* 外膜タンパク質による FSP1 不活化試験

M. morganii の外膜タンパク質処理による FSP1 のプラーク形成能の変化を調べた。すなわち, *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^{T} の新鮮培養菌液 400 ml を 20 mM リン酸緩衝液（PB, pH7.0）で集菌洗浄（10,000×*g*, 15 min, 4°C）し濃縮後, 超音波（30 W, 30 min）により菌体を破砕した。これを遠心分離（3,000×*g*, 15 min, 4°C）し, 未破砕細胞を沈殿させ, 上清を回収後, さらに超遠心分離（100,000×*g*, 30 min, 6°C）により破砕画分を沈殿させた。ペレットを 2%*N*-ラウロイルサルコシン含有 PB（pH7.0）に懸濁し, 再び超遠心分離（100,000×*g*, 30 min, 6°C）した。超遠心分離により得られたペレットを 0.5% スルホベタイン 3-14, 50 mM NaCl 含有 PB に懸濁し, これを *M. morganii* 外膜タンパク質懸濁液として以後の実験に供した。調製した外膜タンパク質懸濁液のタンパク質濃度は, ウシ血清アルブミン（Wako Pure Chemical Industries）を標準としたビシンコニン酸法（BCA 法）により測定した。

次に外膜タンパク質懸濁液による, FSP1 の不活化試験を行った。100〜1000 µg/ml 外膜タンパク質懸濁液 150 µl に 2.0×10^3 PFU/ml となるように FSP1 懸濁液 150 µl を接種した。30°C で 1 時間保持後, プラーク形成数を測定した。保持 0 分時のプラーク形成数を 100%とした相対値により FSP1 の不活化率を評価した。また, プロテイナーゼ K（Wako Pure Chemical Industries）処理を行った外膜タンパク質溶液の FSP1 不活

化試験も行った。すなわち, 1000 μg/ml 外膜タンパク質溶液を 100 μg/ml プロテイナーゼ K 処理（55°C, 60 min）後, 加熱（95°C, 10 min）によりプロテイナーゼ K を失活させ, 前述と同様の方法で FSP1 不活化試験を行った。

3-2-4. *M. morganii* subsp. *morganii* リポ多糖による FSP1 不活化試験

M. morganii のリポ多糖処理による FSP1 のプラーク形成能の変化を調べた。リポ多糖はホットフェノール法により抽出した。すなわち, *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^{T} の新鮮培養菌液 400 ml を 15 mM PBS（pH7.0）で集菌洗浄（10,000×*g*, 15 min, 4°C）し濃縮後, 超音波（30 W, 30 min）により菌体を破砕した。100 μg/ml プロテイナーゼ K（Wako Pure Chemical Industries）処理（65°C, 1 h）によりタンパク質を分解後, 等量の 90%ホットフェノールを添加し 68°C で 30 分間培養した。遠心分離（8,500×*g*, 15 min, 4°C）後, 上層を回収した。同様の抽出操作をもう一度行った後, 蒸留水を用いて透析（2,000 MWCO, 4 days, 4°C, Spectrum Laboratories）を行い, 凍結乾燥したものを *M. morganii* リポ多糖として以後の実験に供した。

抽出したリポ多糖を用いて, FSP1 の不活化試験を行った。2〜2000 μg/ml リポ多糖を懸濁した SM buffer 150 μl に 2.0×10^{3} PFU/ml となるように FSP1 懸濁液 150 μl を接種した。30°C で 1 時間保持し, プラーク形成数を測定した。保持 0 分時のプラーク形成数を 100%とした相対値により FSP1 の不活化率を評価した。

結果および考察

3-2-1. プロテアーゼまたは過ヨウ素酸ナトリウム処理したホスト細胞に対する FSP1 の吸着率

過ヨウ素酸ナトリウムは, リポ多糖に含まれる糖の 1, 2-diol 構造を開裂することによりリポ多糖の構造を破壊する。T7 様 *Yersinia pestis* ファージ Yep-phi は, レセプター結合タンパク質である尾部繊維タンパク質により外膜タンパク質 Ail, OmpF およびリポ多糖を認識すると報告されており, ホスト細胞のプロテイナーゼ K 処理または過ヨウ素酸ナトリウム処理により吸着率が大きく減少した（Zhao *et al*, 2013）。また, *Salmonella* ファージ SSU5 では過ヨウ素酸ナトリウム処理でのみ吸着率が減少することから, リポ多糖のみをレセプターとするファージであると結論づけられている（Kim *et al*., 2014）。そこで, 同様の手法によって *M. morganii* ファージ FSP1 のレセプター部位について調べることにした。

プロテイナーゼ K 処理または過ヨウ素酸ナトリウム処理した菌体に対する FSP1 の吸着率をそれぞれ Fig. 3-5 と Fig. 3-6 に示した。未処理コントロールおよびプロテイナーゼ K 処理を行った *M. morganii* 細胞では, 処理の有無に関わらず FSP1 は 10 分間で 99%が吸着した。また, 過ヨウ素酸ナトリウム処理を行った菌体での FSP1 の吸着率も 99%を示した。これらのことは, 本実験で使用した方法が FSP1 のレセプター分析に適切な方法ではない, または FSP1 は外膜タンパク質およびリポ多糖をレセプターとして使用しない可能性を示唆している。

3-2-2. *M. morganii* subsp. *morganii* 外膜タンパク質およびリポ多糖の存在下における FSP1 のプラーク形成性

ホスト細胞表面のプロテイナーゼ K 処理および過ヨウ素酸ナトリウム処理では FSP1 のレセプターが推定できなかったため, *M. morganii* より抽出した外膜タンパク質およびリポ多糖を用いた FSP1 の不活化試験を行った。これまで, 細胞壁（Yu and Mizushima, 1982）, リポ多糖（Jarrell and Kropinski, 1977）, 外膜タンパク質-リポ多糖複合体（Hantke, 1978）を利用したファージの不活化試験によるレセプター分析の例が報告されている。抽出した外膜タンパク質またはリポ多糖をレセプターとして FSP1

が使用する場合, FSP1 のレセプター結合タンパク質がブロックされ, プラーク形成能を失うと考えられる。抽出した外膜タンパク質およびリポ多糖を作用させた場合の FSP1 によるプラーク形成性の変化を Fig. 3-7, Fig. 3-8 に示した。外膜タンパク質を添加しないコントロールでは培養 60 分後においても FSP1 のプラーク形成数は減少しなかったが, 外膜タンパク質を作用させると, 濃度依存的に FSP1 のプラーク形成数は減少し, 500 μg/ml 外膜タンパク質添加区のプラーク形成数はコントロールの 52% となった。また, プロテイナーゼ K 処理を施した外膜タンパク質溶液処理では, FSP1 のプラーク形成数は減少しなかった。よって, FSP1 のプラーク形成数の減少にタンパク質性の物質が関与していると考えらえる。一方, 1〜1000 μg/ml リポ多糖を作用させた場合における FSP1 のプラーク形成数はコントロールと大きな違いはなかった（Fig. 3-4）。したがって, FSP1 は外膜タンパク質をレセプターの一つとして利用するファージであることが強く示唆された。

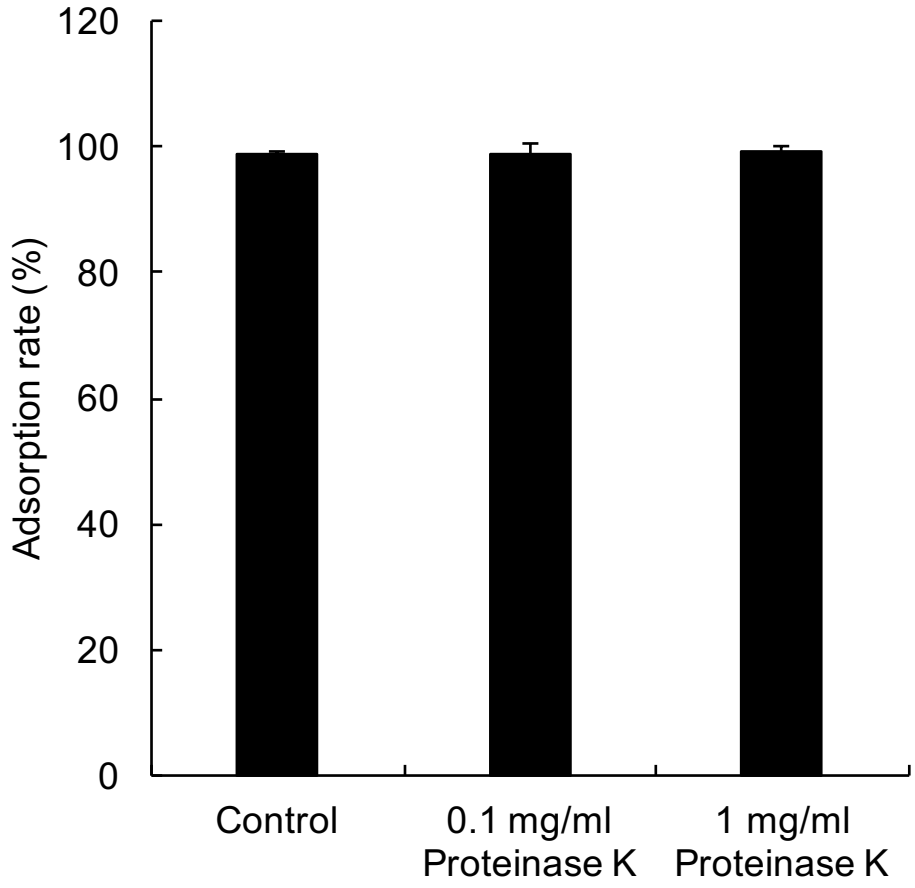


Fig. 3-5. Effect of proteinase K treatment of host cell surface on adsorption rate of FSP1. Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

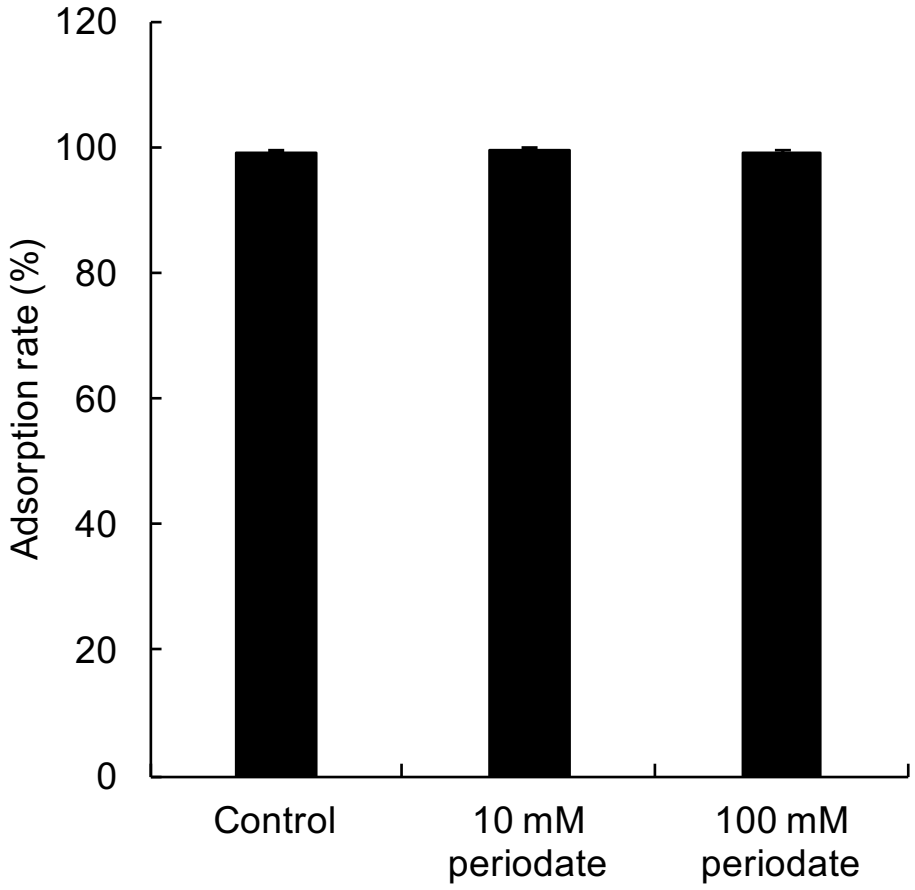


Fig. 3-6. Effect of periodate treatment of host cell surface on adsorption rate of FSP1.

Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

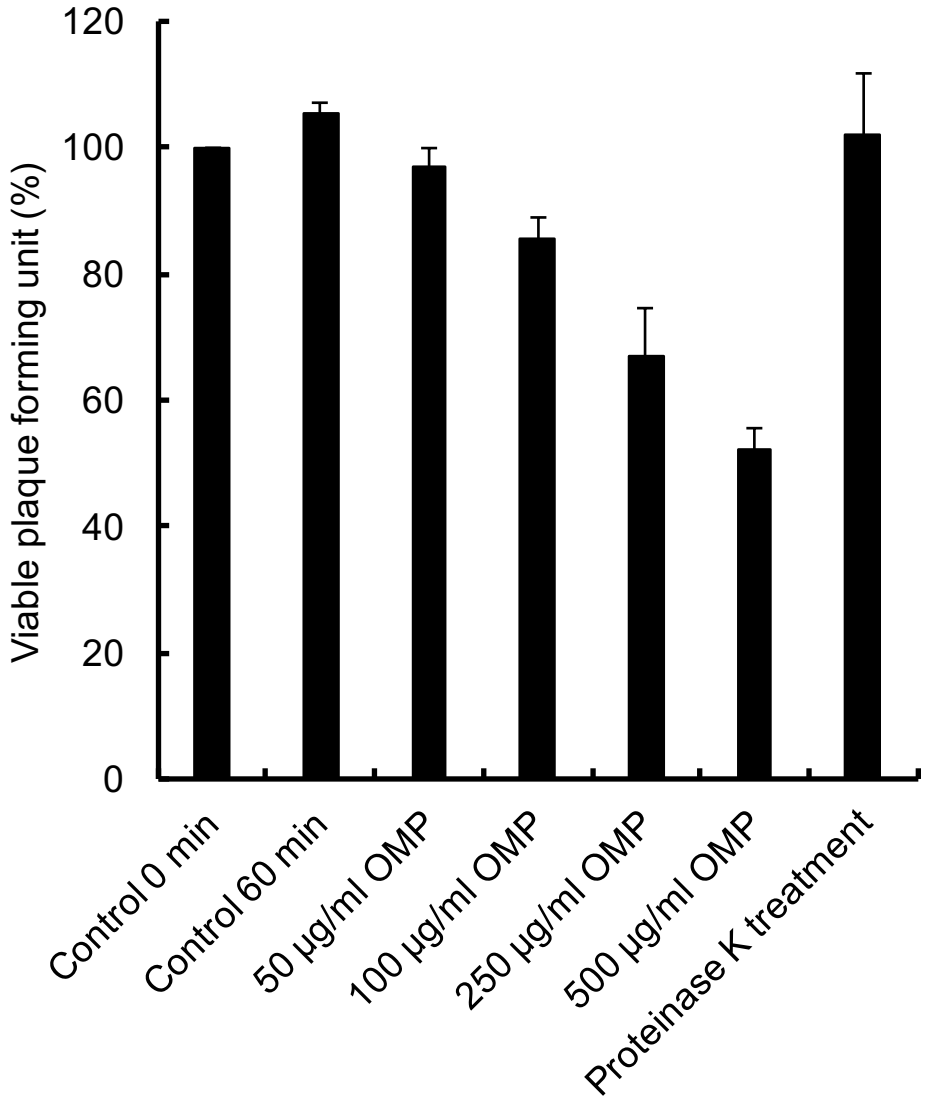


Fig. 3-7. Effect of *M. morganii* outer membrane protein (OMP) on plaque forming unit of FSP1. FSP1 was treated with OMP at 30°C for 60 min. Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

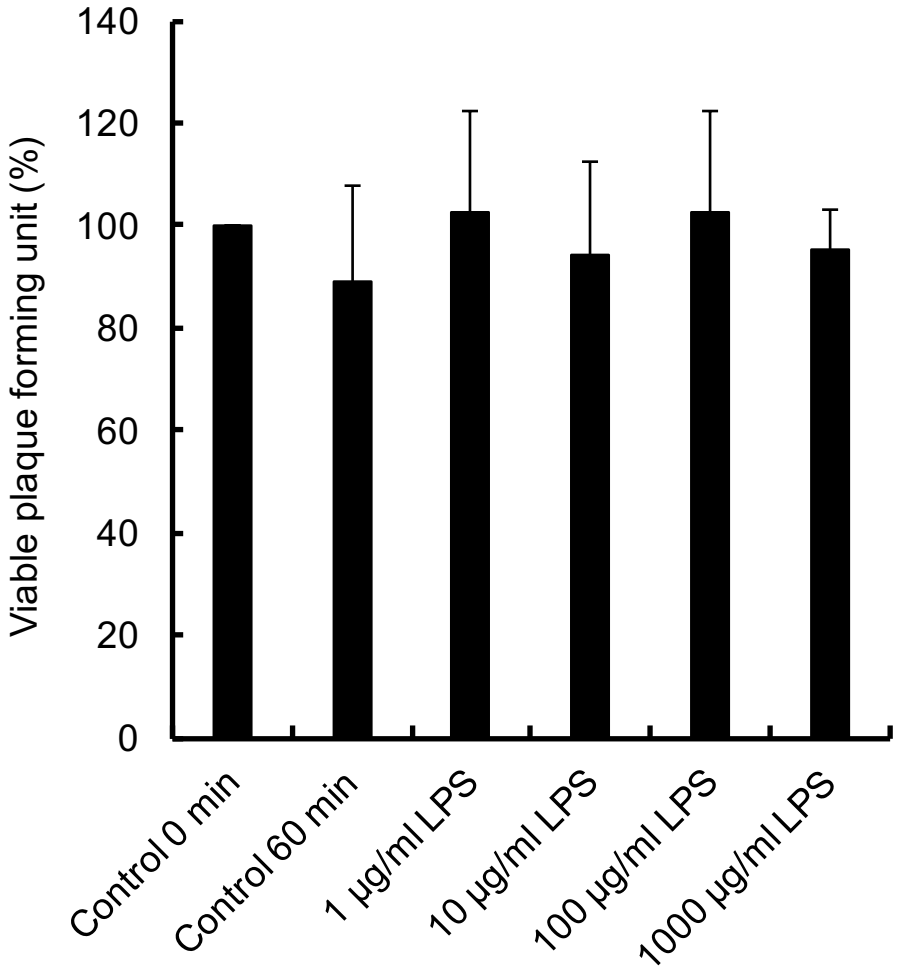


Fig. 3-8. Effect of *M. morganii* lipopolysaccharide (LPS) on plaque forming unit of FSP1. FSP1 was treated with LPS at 30°C for 60 min. Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

第 3 節　ファージ FSP1 耐性株の分離および耐性獲得機構

ファージ利用による微生物制御法の欠点の一つにファージ耐性菌の出現が挙げられる（Matsuzaki *et al*., 2005）。そのため, ファージの利用に際して, あらかじめどのような性質を持つ耐性菌が出現するか情報を得ることは非常に重要であると考えられる。本節では, 液体培地中で FSP1 耐性 *M. morganii* を作出し, その耐性獲得機構を調べた。また, FSP1 耐性株の持つ耐性機構が FSP1 以外の *M. morganii* ファージにおいても有効であるかを調べた。

試料および方法

3-3-1. ファージ FSP1 耐性株の分離

96 穴マイクロプレートの各ウェルに *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^{T} の新鮮培養菌液を $10〜10^{9}$ CFU/ml となるように分注し, それぞれの菌濃度のウェルに FSP1 懸濁液を $10〜10^{8}$ PFU/ml となるように接種した。30°C で培養し, *M. morganii* の発育により濁度が上昇したウェルより菌液を採取した。菌液を TSA 平板上に塗抹し, 純粋分離を行った後, スポットテスト法により FSP1 への感受性を調べた。FSP1 に感受性を示さなかった菌株を選抜し, 10 回継代培養を行った後, FSP1 耐性を保持している株を FSP1 耐性株として以後の実験に供した。

3-3-2. ファージ FSP1 耐性株の種同定

分離した FSP1 耐性株が *M. morganii* subsp. *morganii* であるかどうかを PCR 法により確認した。プライマーは *M. morganii* 16S rRNA 遺伝子の V3 および V4 領域に特異的なプライマーMm453F および Mm631R（Table 3-2）を用い（Ferrario *et al*., 2012b）, PCR 反応液の組成は Table 3-3 に示した。PCR はサーマルサイクラーGeneAtlas G（ASTEC; Fukuoka, Japan）により, 95°C, 4 分間の変性の後, 95°C, 30 秒間, 65°C, 45 秒間, 72°C, 1 分間の増幅反応を 30 サイクル行い, 72°C, 7 分間の伸長反応を行った。PCR 後, 1.5%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色に供し, PCR 産物の生成を確認した。

3-3-3. ファージ FSP1 耐性株に対する FSP1 の吸着率測定

M. morganii NBRC3848^{T}, NBRC3848 Fr1, NBRC3848 Fr2, NBRC3848 Fr3, NBRC3848 Fr17, NBRC3848 Fr20 の新鮮培養菌液 1 ml を TSB 900 µl で集菌洗浄（10,000×*g*, 2 min, 4°C）した。10^5 PFU/ml となるように TSB に懸濁した FSP1 溶液 100 µl を接種し, 37°C で 10 分間培養した。遠心分離（10,000×*g*, 1 min, 4°C）により菌体に吸着したファージを沈殿させ, 上清に含まれる遊離ファージの数をプラークアッセイ法により測定した。*M. morganii* を加えていない TSB でのプラーク形成数と遊離ファージによるプラーク形成数との差から, 吸着率を算出した。

3-3-4. ファージ FSP1 耐性株の *M. morganii* ファージ感受性

供試ファージには, 函館市河川水より分離された *M. morganii* ファージΦMV-1 およびΦMV-4（黒沼, 2016）を用いた。*M. morganii* NBRC3848^{T} および FSP1 耐性株を重層した TSA 平板に 10^6〜10^9 PFU/ml となるよう希釈したファージ懸濁液 5 µl をスポットし, 30°C で 24 時間培養した。プラーク形成の有無より FSP1 耐性株に対する各ファージの感染性を評価した。

Table 3-2. Oligonucleotide sequence of primers used for the identification of FSP1-resistant strains (Ferrario *et al*., 2012b)

Primer		Nucleotide sequences
Forward primer	Mm453F	5'-TTTCAGTCGGGAGGAAGGTG-3'
Reverse primer	Mm631R	5'-GGGGATTTCACATCTGACTC-3'

Table 3-3. Composition of PCR reaction mixture

Ingredient	
Forward primer (Mm453F, 5 pmol/µl)	2.0 µl
Reverse primer (Mm631R, 5 pmol/µl)	2.0 µl
10 × Ex Taq buffer (20 mM Mg^{2+} plus)	2.5 µl
dNTP mixture (2.5 mM each)	2.0 µl
Takara Ex Taq HS (5 U/µl, Takara)	0.2 µl
DNA template	2.0 µl
Distilled water	14.3 µl
Total	25.0 µl

結果および考察

3-3-1. ファージ FSP1 耐性株の分離

抗菌物質としてのファージ利用の欠点の一つにファージ耐性菌の出現が挙げられる（Matsuzaki *et al*., 2005）。そのため, ファージ利用に際して, 出現が予想されるファージ耐性菌の性状および耐性獲得機構を調べることは重要である。そこで, 液体培地系で FSP1 耐性菌の分離を試み, その耐性獲得機構の解明を試みた。ホストである *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^{T} と FSP1 を共培養した結果, 計 5 株の FSP1 耐性株を分離することができた。これら分離株が *M. morganii* であるかどうかを PCR により確認した結果, 全ての耐性株で *M. morganii* であることを示す 179 bp のバンドを確認することができた（Fig. 3-9）。したがって, 分離した FSP1 耐性株 5 株は全て *M. morganii* であり, *M. morganii* NBRC3848 Fr1, NBRC3848 Fr2, NBRC3848 Fr3, NBRC3848 Fr17, NBRC3848 Fr20 と命名し, 以後の実験に供した。

3-3-2. ファージ FSP1 耐性株に対する FSP1 の吸着率

現在, ファージ耐性菌の耐性獲得機構には様々な種類のものが知られている。耐性獲得機構を大まかに分類すると, ファージの吸着阻害, DNA 注入阻害, ファージゲノムの切断（制限修飾系, CRISPR-Cas system）, 不稔感染の 4 種類である (Labrie *et al*., 2010)。さらに, 近年ではクオラムセンシングを利用したファージレセプターの発現制御によるファージ耐性獲得機構なども知られてきており（Høyland-Kroghsbo *et al*., 2013）, さらに未知の耐性獲得機構が存在すると考えられる。これらのファージ耐性機構の中で最も主要なものがファージの吸着阻害であり, 細菌はレセプターを変異させたり, 他の物質によりレセプターをブロックすることによりファージの吸着を阻害する。

そこで, 本研究で分離された FSP1 耐性株の耐性獲得機構を検討するため, 各耐性株に対する FSP1 の吸着率を測定した。*M. morganii* NBRC3848^{T} に対する FSP1 の吸着率は 99%だったが, FSP1 耐性株に対しては吸着率が大きく低下していた。*M. morganii* NBRC3848 Fr1, NBRC3848 Fr2, NBRC3848 Fr3, NBRC3848 Fr17, NBRC3848 Fr20 に対する FSP1 の吸着率は, それぞれ 7%, 6%, 1%, 0%, 0%であった（Fig. 3-10）。したがって,

本研究で分離された FSP1 耐性株の耐性機構はファージの吸着阻害である。前節では, FSP1 は *M. morganii* の外膜タンパク質をレセプターとして利用することが示唆されている。よって, FSP1 耐性株はレセプターとなるタンパク質の変異またはブロッキングにより FSP1 耐性を獲得したと推察される。

3-3-3. ファージ FSP1 耐性株の *M. morganii* ファージの感受性

ファージ耐性菌の効果的な制御方法のひとつにファージカクテルの利用があげられる。ファージ耐性菌の制御にファージカクテルの利用が有効となる理由は, ひとつのファージに耐性を獲得した細菌であっても, カクテル中の他のファージが殺菌できるためである。すなわち, 有効なファージカクテルを構成するファージはそれぞれ異なるレセプターを認識する必要があると考えられる。ファージカクテルの有効性について, O'Flynn ら（2004）は *E. coli* O157:H7 に対するファージカクテルの耐性菌発生率が 1.1×10^{-6}〜1.5×10^{-6} であり, 単一ファージの耐性菌発生率は 1.2×10^{-6}〜3.3×10^{-4} であったと報告している。また, Tanji ら（2004）は, ファージカクテルの利用により耐性菌発生までに要する時間が延長されるが,ファージの組み合わせによってはファージカクテルが効果を成さないと報告している。

本研究により分離された FSP1 耐性株はいずれも吸着阻害により耐性を獲得していた。そのため, これら耐性株を有効に制御するためには FSP1 と異なる吸着メカニズムを示すファージを利用する必要がある。前述のように, FSP1 は *M. morganii* の外膜タンパク質をレセプターとして利用するファージであることが示唆された。そこで, FSP1 耐性株に対する他の *M. morganii* ファージの感染性を検討した。実験には, 過去に我々が函館市河川水より分離した *M. morganii* ファージΦMV-1 およびΦMV-4 を使用した。ΦMV-1 およびΦMV-4 はそれぞれ *Siphoviridae* 科および *Myoviridae* 科に属するファージであり, リポ多糖をレセプターとして利用すると推察されている（黒沼, 2016）。すなわち, FSP1 とレセプターの異なる両ファージは FSP1 耐性株に感染が可能であるかもしれない。

各ファージの FSP1 耐性株に対する感染性を Fig. 3-11 に示した。FSP1 およびΦMV-1, ΦMV-4 は, 親株の *M. morganii* NBRC3848^{T} に対してプラークを形成した（Fig. 3-11A）。一方, FSP1 はどの接種濃度においても FSP1 耐性株に対してプラークを形成し

なかったが, ΦMV-1 とΦMV-4 は全ての FSP1 耐性株に対してプラークを形成した（Fig. 3-11B–F）。このことは, FSP1 とΦMV-1 およびΦMV-4 は異なる吸着メカニズムを有すること, FSP1 耐性株はΦMV-1 とΦMV-4 を組み合わせたファージカクテルにより制御可能であることを示唆している。

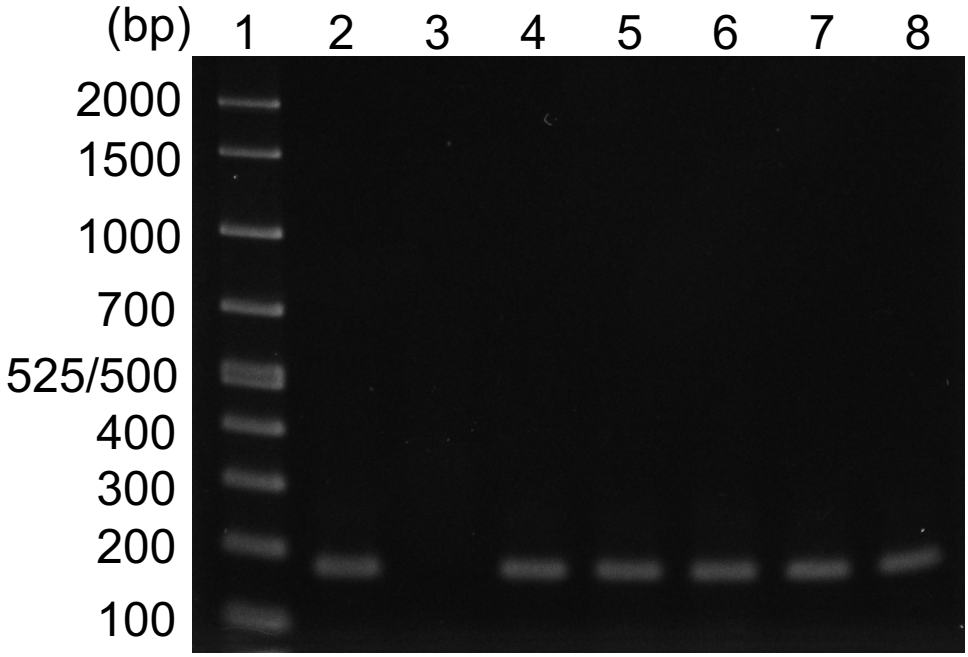


Fig. 3-9. Identification of FSP1-resistant strains using *M. morganii* specific primers.

Lane 1: BioMarker EXT (BioVentures; Murfreesboro, TN, USA), lane 2: *M. morganii* NBRC3848^{T} as a positive control, lane 3: *Proteus vulgaris* ATCC33420 as a negative control, lane 4: *M. morganii* NBRC3848 Fr1, lane 5: *M. morganii* NBRC3848 Fr2, lane 6: *M. morganii* NBRC3848 Fr3, lane 7: *M. morganii* NBRC3848 Fr17, lane 8: *M. morganii* NBRC3848 Fr20.

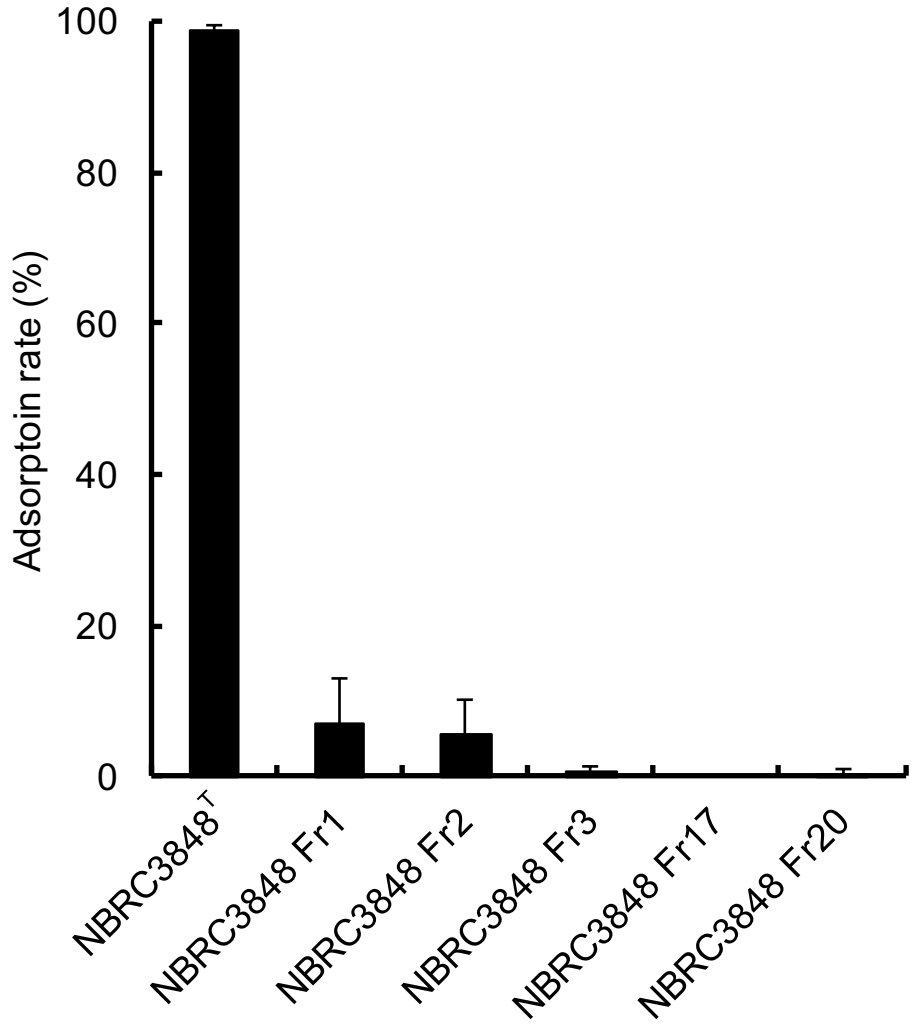


Fig. 3-10. Adsorption rate of FSP1 against *M. morganii* NBRC3848^{T} and its FSP1-resistant strains.

Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

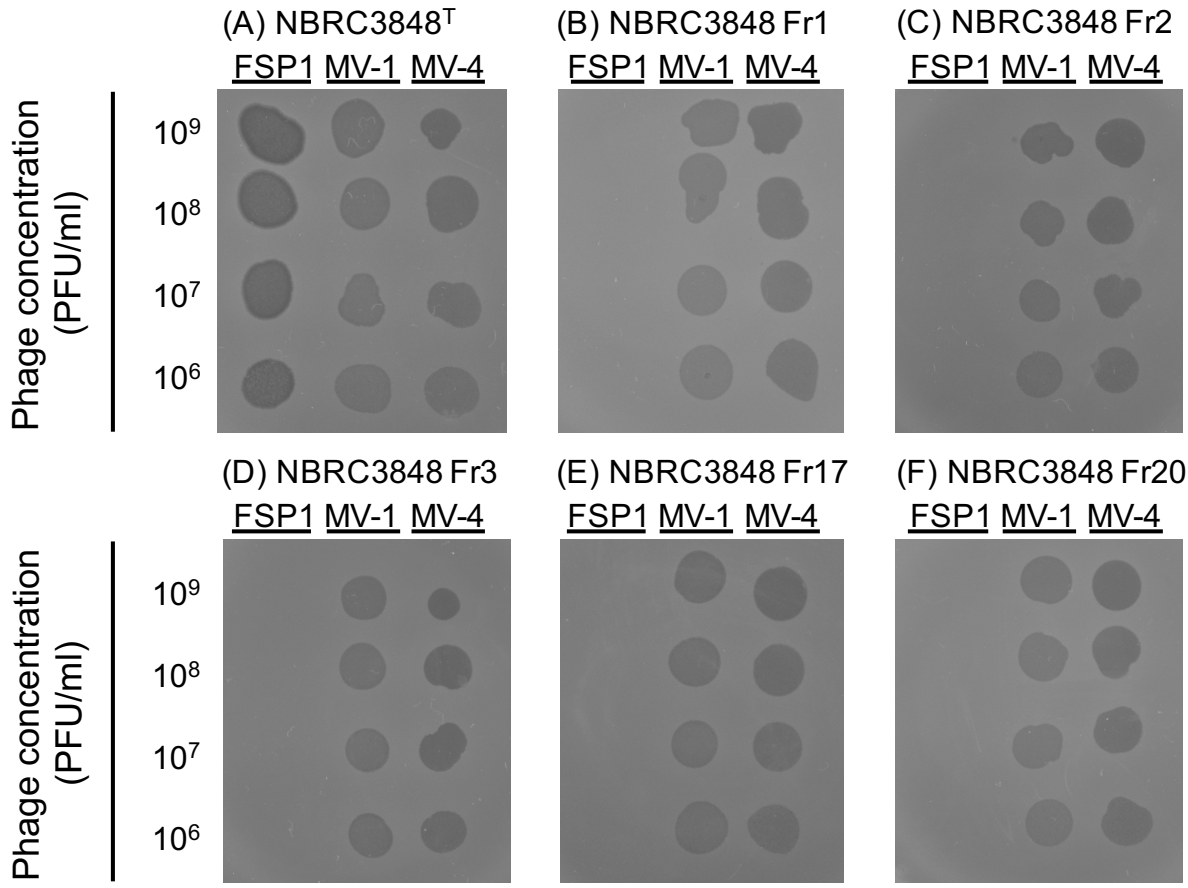


Fig. 3-11. Sensitivity of *M. morganii* NBRC3848^T (A) and its FSP1-resistant strains, NBRC3848 Fr1 (B), NBRC3848 Fr3 (C), NBRC3848 Fr3 (D), NBRC3848 Fr17 (E) and NBRC3848 Fr20 (F) to *M. morganii* phage FSP1, ΦMV-1 and ΦMV-4.

Bacterial strains formed plaques showed the sensitivity to used phages.

第 4 章　ファージを利用したマグロ魚肉のヒスタミン蓄積制御

第 3 章では, *M. morganii* ファージ FSP1 のレセプターおよび FSP1 耐性株の耐性獲得機構を明らかとし, ファージカクテルの利用によって FSP1 耐性株も含めた *M. morganii* subsp. *morganii* の制御が可能であることを示した。しかし, FSP1 による *M. morganii* の発育抑制効果に及ぼす温度やファージ濃度の影響については検討されていない。また, FSP1 が液体培地と同様に魚肉においても *M. morganii* の発育を抑制できるかどうかは不明である。これまで, バイオジェニックアミンの制御にファージを利用した研究は 1 報のみであり, *E. faecalis* によるチーズのチラミン蓄積がファージ利用で防止可能であるとされており（Ladero *et al*., 2016）, 魚肉のヒスタミンの蓄積制御に関するファージ利用の研究は見当たらない。

一般に, 液体培地の系と比べて食品の系ではファージの殺菌能が著しく低下すると考えられており, その理由のひとつにファージと細菌の接触効率の問題が挙げられる。これは, 食品中でのファージの拡散性に起因する。液体とは違い, 食品の個体表面上ではファージの拡散が著しく阻害され, 食品を汚染する標的細菌とファージが食品上で接触しづらいためである（Hagens and Loessner, 2010）。そのため, 食品へのファージ利用には適切なファージの接種濃度を検討する必要がある。また, 食品中でのファージの安定性も細菌の発育制御に大きく影響する。

そこで本章では, ファージ FSP1 の液体培地およびマグロ切り身における *M. morganii* 制御能の比較, 魚肉での *M. morganii* 制御に最適な接種濃度, そして *M. morganii* によるマグロ魚肉のヒスタミン蓄積に及ぼす FSP1 処理の効果について検討し,ヒスタミン食中毒のリスク低減にファージ処理が有効な手法となり得るかを検討した。

試料および方法

4-1-1. 液体培地での *M. morganii* 殺菌能の測定

液体培地を用いて, FSP1 の *M. morganii* 殺菌能に及ぼす温度とファージ濃度の影響について検討した。すなわち, TSB 4.5 ml に 10^3 CFU/ml となるように *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^T を接種後, 10^3, 10^5, 10^7 PFU/ml となるように FSP1 を接種した。4, 12, 20°C で培養し, TSA を用いた表面塗抹法（30°C, 24 h）により継時的に生菌数を測定した。

4-1-2. 魚肉系における最適 FSP1 濃度の決定

マグロ魚肉のファージ処理に適した FSP1 濃度を決定するため, マグロ魚肉に様々な濃度で FSP1 を接種し, *M. morganii* の発育動態を調べた。

魚肉はスーパーマーケットで購入したマグロの切り身を 5 g にカットし, シャーレに静置したものを実験に使用した。50 μg/ml クロラムフェニコール, 1%L-ヒスチジン塩酸塩含有 TSB（pH6.5）で 30°C, 18 時間培養したクロラムフェニコール耐性 *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^{cr} の新鮮培養菌液を 10^3 CFU/g となるように 50 μl 魚肉表面に滴下し, 室温で 30 分間おいた後, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 PFU/g となるように FSP1 懸濁液 100 μl を魚肉表面に滴下した。この魚肉を 20°C を保存し, 継時的に *M. morganii* の生菌数を測定した。生菌数は, 魚肉を 10 mM PBS（pH7.2）45 ml でホモジナイズし, 25 μg/ml クロラムフェニコール含有 Niven's agar（Table 4-1; Niven *et al*., 1981）を用いた表面塗抹法（30°C, 24～48 h）により測定した。これにより, マグロ魚肉のファージ処理に適した FSP1 濃度を決定した。

4-1-3. 魚肉における FSP1 による *M. morganii* の発育とヒスタミン蓄積量の測定

マグロ魚肉 5 g に *M. morganii* subsp. *morganii* NBRC3848^{cr} の新鮮培養菌液を 10^3 または 10^5 CFU/g（低汚染または高汚染モデル）となるように 50 μl 滴下し, 室温で 30 分間おいた後, 10^8 PFU/g となるように FSP1 懸濁液を 100 μl 滴下した。4, 12, 20°C で魚肉を保存し, 10 mM PBS（pH7.2）45 ml で魚肉をホモジナイズした。調製した乳剤を用いて, ヒスタミン濃度, 一般生菌数, *M. morganii* 数を測定した。ヒスタミン濃度

は第 1 章第 3 節と同様の方法により HPLC で測定した。一般生菌数は TSA を用いた表面塗抹法（30°C, 48 h）, *M. morganii* 数は 25 µg/ml クロラムフェニコール含有 Niven's agar を用いた表面塗抹法（30°C, 24〜48 h）によりそれぞれ測定した。

4-1-4. マグロ魚肉中のファージ FSP1 の安定性の測定

魚肉に接種した FSP1 の濃度を継時的に測定し, マグロ魚肉での FSP1 安定性を評価した。FSP1 のプラーク測定には, 生菌数測定に用いた乳剤を使用した。乳剤 1 ml をフィルター濾過（孔径; 0.45 µl）し, 濾液に含まれる FSP1 のプラーク形成数をプラークアッセイ法により測定した。プラーク形成数の変化より FSP1 の安定性を評価した。

4-1-5. 魚肉からのファージ FSP1 耐性株の分離

FSP1 処理を施したマグロ魚肉に FSP1 耐性株が出現する可能性を検証した。20°C で 60 時間培養した低汚染および高汚染モデルの魚肉より FSP1 耐性株の分離を試みた。すなわち, 25 µg/ml クロラムフェニコール含有 Niven's agar に形成した *M. morganii* のコロニーを無作為に釣菌し, 純粋分離をした後, スポットテスト法により FSP1 への感受性を確認した。

Table 4-1. Composition of Niven's agar

Ingredient	
Tryptone (BD)	5 g
Yeast extract (BD)	5 g
$CaCO_3$	1 g
L-Histidine hydrochloride monohydrate	25 g
NaCl	5 g
Bromocresol purple	0.06 g
Agar	20 g
Distilled water	1000 ml
	(pH 5.1)

Medium was autoclaved at 121°C for 15 min.

結果および考察

4-1-1. 液体培地での *M. morganii* 殺菌能に及ぼす温度およびファージ濃度の影響

液体培地での FSP1 の *M. morganii* 殺菌能に及ぼす温度およびファージ濃度の影響を Fig. 4-1 に示した。10^7 PFU/ml FSP1 処理では 4°C, 12°C, 20°C の全ての温度で *M. morganii* の生菌数が著しく早く減少した。10^3 および 10^5 PFU/ml FSP1 処理区では, 12°C と 20°C でのみ培養途中に *M. morganii* の生菌数が大幅に減少したが, 4°C では 10^3, 10^5 PFU/ml FSP1 処理区の生菌数の減少は認められなかった。すなわち, 低濃度のファージ処理区では, ファージの殺菌作用を効果的に発揮するために一定量のホスト細胞が必要と示唆された。ホストの生菌数が増加することにより細菌とファージ FSP1 の接触効率が上昇し, 殺菌作用が現れたと考えられる。また, *M. morganii* の発育が不可能な 4°C においても 10^7 PFU/ml FSP1 処理区で生菌数の減少が確認されたことより, ホストが活動しない低温下においても FSP1 は *M. morganii* を殺菌可能であるが, ファージの感染を成立させるためには高いファージ濃度が必要と示唆された。

4-1-2. 魚肉での *M. morganii* 殺菌能に及ぼすファージ濃度の影響

液体培地と食品表面上のファージの効果は大きく異なる。これまで, メロン, スモークサーモン, ホットドッグ, チョコレートミルク, キャベツ, ミートボール等の食品でファージの効果が濃度依存的に上昇すると報告されている（Leverentz *et al*., 2004; Guenther *et al*., 2009; Gencay *et al*., 2015; Perera *et al*., 2015）。魚肉での *M. morganii* 殺菌能に及ぼす FSP1 接種濃度の影響について Fig. 4-2 に示した。FSP1 処理区では, 供試したいずれのファージ濃度においても *M. morganii* の生菌数を減少させたが, その殺菌効果はファージ濃度依存的であった。10^8 PFU/g FSP1 処理区のみ 0 時間目の生菌数が検出限界未満（< 2 log CFU/g）となり, 実験期間を通じて最も *M. morganii* の生菌数が少なかった。したがって, 本研究ではマグロ魚肉のファージ処理に有効な FSP1 濃度を 10^8 PFU/g として実験を進めた。

4-1-3. ファージ FSP1 を利用した *M. morganii* によるヒスタミン蓄積制御

10^8 PFU/g FSP1 処理がマグロ魚肉のヒスタミン蓄積を制御可能かどうか検証した。

低汚染モデル（10^3 CFU/g *M. morganii* 接種）の結果を Fig. 4-3 に，高汚染モデル（10^5 CFU/g *M. morganii* 接種）の結果を Fig. 4-4 に示した。FSP1 処理は低汚染および高汚染モデルの両方で初発の *M. morganii* の生菌数を大きく減少させた。特に，低汚染モデルでは FSP1 処理後, *M. morganii* の生菌数は検出限界未満（< 2 log CFU/g）まで減少し，それに伴いヒスタミン蓄積が大きく遅延した。高汚染モデルでは, FSP1 処理により初発の *M. morganii* の生菌数が 2〜2.5 log CFU/g 減少し，低汚染モデルと同様にヒスタミン蓄積が遅延された。しかし, 12°C ではコントロールとファージ処理区のヒスタミン濃度の差が他の条件よりも小さかった（Fig. 4-4D）。これは, FSP1 により菌が死滅した後も *M. morganii* の HDC が活性を保っているためであると推察される。*M. morganii* の HDC は 5〜50°C で活性を示し, –20°C〜40°C で数日から数週間安定である。さらに, *P. phosphoreum*, *P. damselae*, *R. planticola* の HDC はマグロ魚肉で酵素単独でヒスタミンを蓄積すると報告されている（Kanki *et al*., 2007）。以上の結果, FSP1 により *M. morganii* の発育およびヒスタミン蓄積は遅延可能であるが，ファージ処理を行う前に *M. morganii* を増やさないための衛生的取り扱いが従来通り重要となることが示唆された。なお，一般生菌数は FSP1 処理の有無によらず一様に増加し，処理による違いはなかったが，これはファージの殺菌作用が宿主特異的であるためである。

4-1-4. マグロ魚肉中のファージ FSP1 の安定性

マグロ魚肉中の FSP1 のプラーク形成数の変化を Fig. 4-5 に示した。FSP1 は 4°C, 12°C, 20°C のどの温度においてもマグロ魚肉中で安定であった。食品中のファージの安定性はファージの殺菌効果に大きな影響を与えることが知られている。通常，多くの食品でファージは安定であるが（Guenther *et al*, 2009; Soni and Nannapaneni, 2010; Soni *et al*., 2012; Oliveira *et al*., 2014），低 pH を示すリンゴではファージが急速に不活化され，ファージによる殺菌効果も見られなかったと報告されている（Oliveira *et al*., 2014）。FSP1 は実験期間を通じて安定であったため，魚肉の pH では問題なく生存可能であると考えらえる。

4-1-5. 魚肉からのファージ FSP1 耐性株の分離

ファージ処理後の食品からのファージ耐性菌分離に関しては数例の報告が存在する。Guenther ら（2012）はファージ処理後のチョコレートミルクや卵黄より分離された *S.* Typhimurium のすべてがファージ耐性菌であると報告しており, Tomat ら（2013）はファージ処理後の肉より分離された *E. coli* の 25%がファージ耐性菌だったと報告している。一方で, ファージ処理後のホットドッグ, 七面鳥, スモークサーモン, ミックスシーフード, キャベツ, レタスからはファージ耐性菌は分離されなかった（Guenther *et al*., 2009）。

FSP1 処理をしたマグロ魚肉において FSP1 耐性株が発生するかどうかを調べるため, 低汚染モデルおよび高汚染モデルの培養 60 時間目の *M. morganii* を分離して FSP1 感受性を調べた。低汚染モデルで 37 株, 高汚染モデルで 77 株の分離株を調べたが, すべての株が FSP1 感受性を示した（Table 4-2）。したがって, 本研究においてはマグロの FSP1 処理後に発育した *M. morganii* はファージと接触せずに生き残った細菌であり, 耐性菌ではないと推察された。一方, 第 3 章では, 液体培地での *M. morganii* と FSP1 の共培養により FSP1 耐性菌が出現したが, 本実験の食品モデルで耐性菌が出現しなかった理由のひとつには, 食品上での細菌とファージの接触率の低さが挙げられる。液体培地中では細菌とファージはより頻繁に接触するため, 結果としてファージ耐性菌が出現する可能性が高まるのではないかと考えられる。

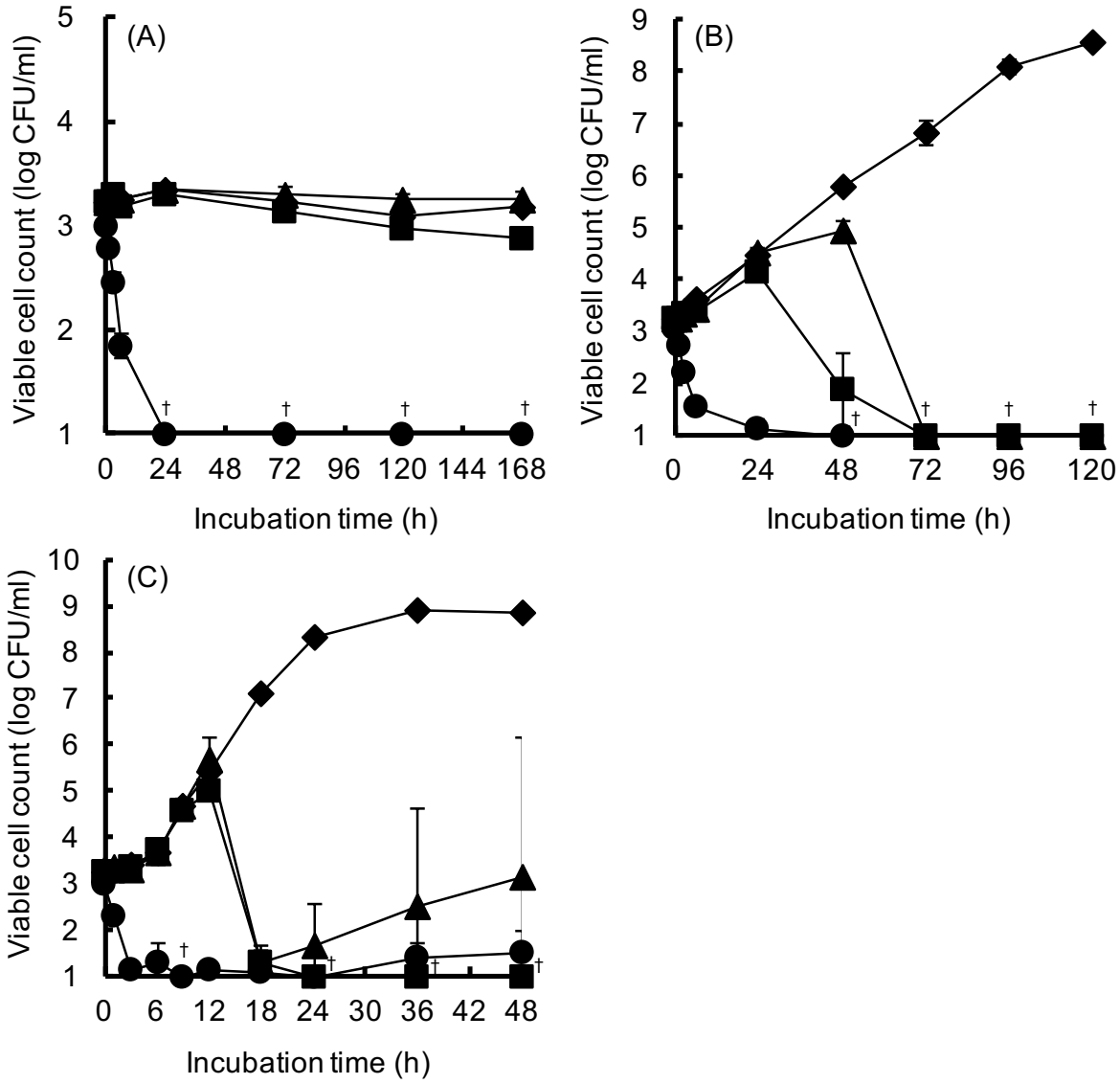


Fig. 4-1. The growth of *M. morganii* NBRC3848^T in liquid medium treated with various concentration of FSP1 at 4°C (A), 12°C (B) and 20°C (C).

Symbols represents control (◆), 10^3 PFU/ml FSP1 treatment (▲), 10^5 PFU/ml FSP1 treatment (■) and 10^7 PFU/ml FSP1 treatment (●). Dagger (†) represents under detectable limit of viable cell count (1 log CFU/ml). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

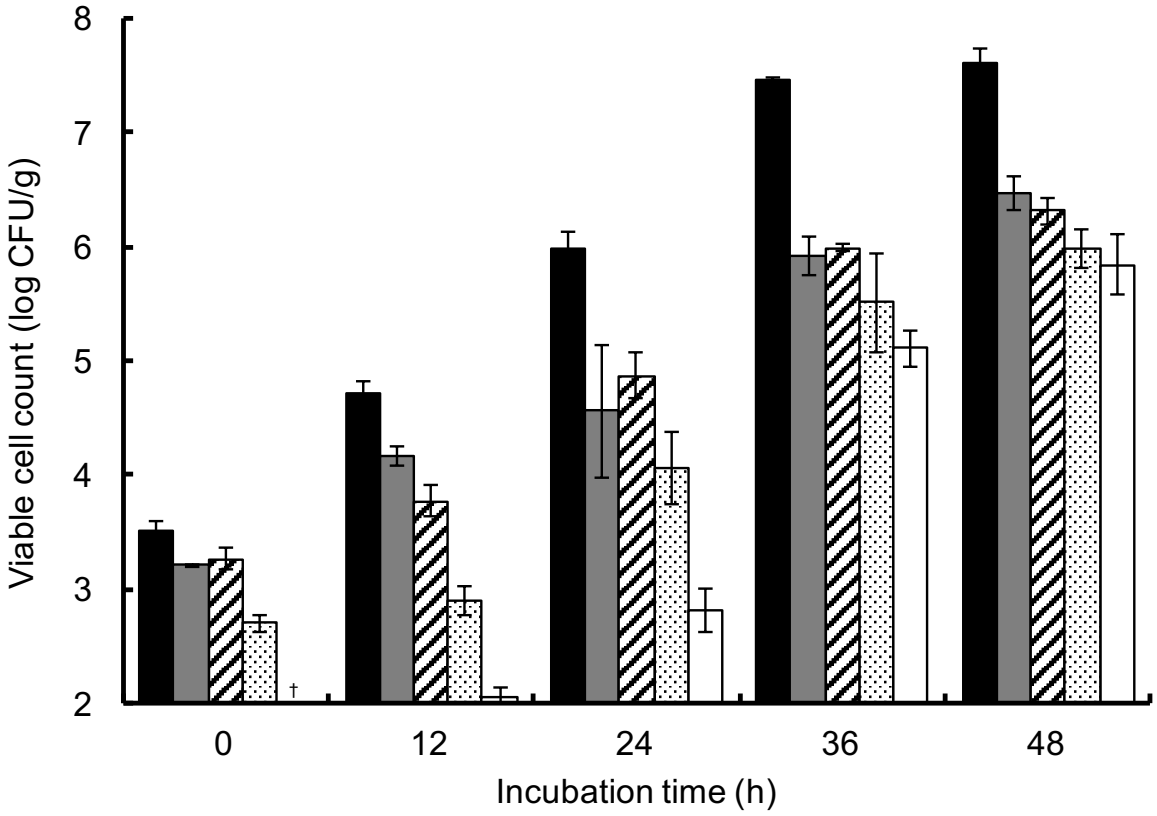


Fig. 4-2. The growth of *M. morganii* NBRC3848^{cr} on tuna meats treated with various concentration of FSP1.

Columns represent viable cell count of *M. morganii* NBRC3848^{cr} treated with 10^5 (gray), 10^6 (slashed), 10^7 (dotted), 10^8 PFU/g (white) and without (black) FSP1. Dagger (†) represents under detectable limit of viable cell count (2 log CFU/g). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

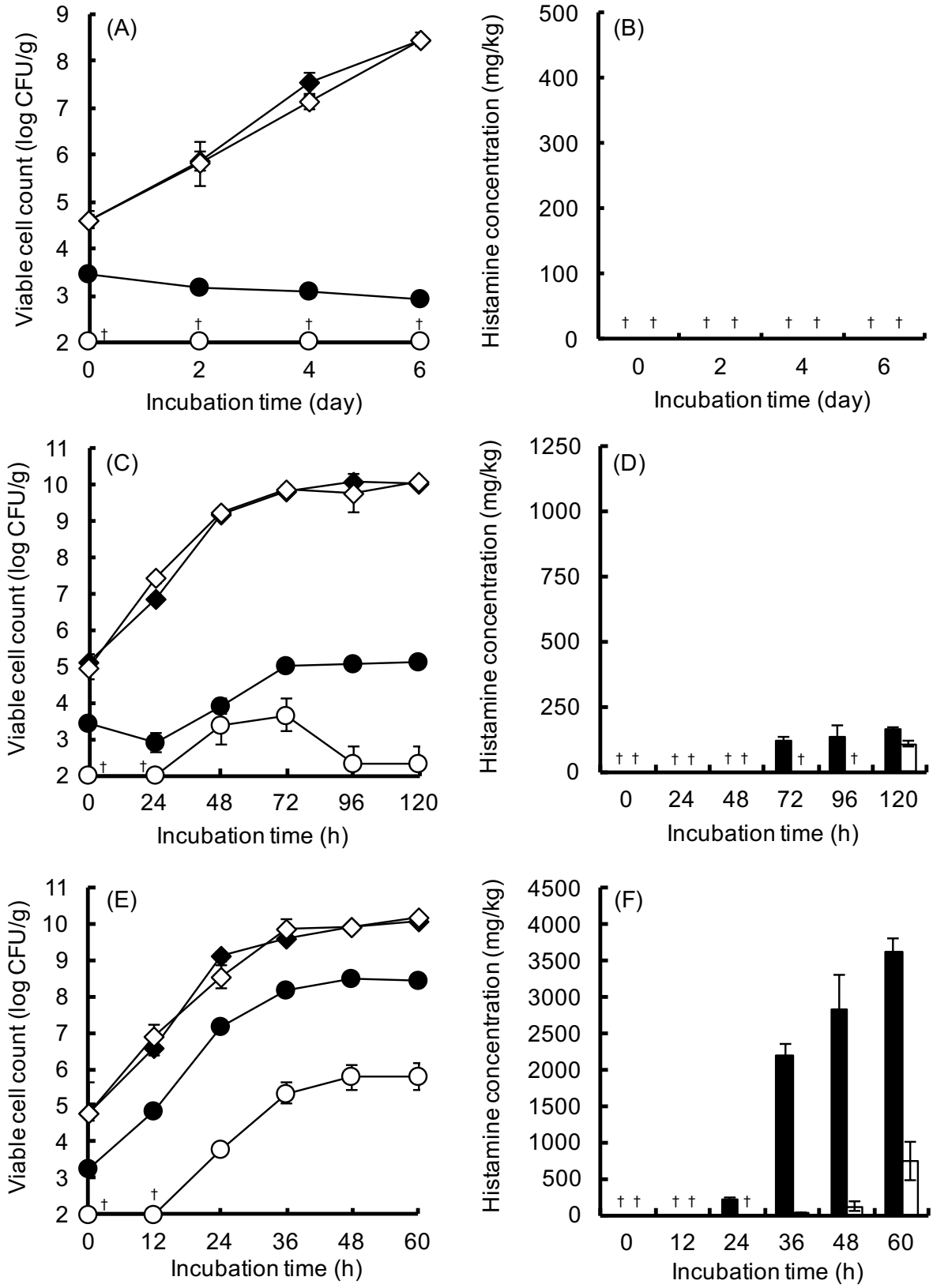


Fig. 4-3. The bacterial growth of (A, C, E) and histamine accumulation (B, D, F) in raw tuna meats inoculated with low concentration level (10^3 CFU/g) of *M. morganii* NBRC3848^{cr} incubated at 4°C (A, B), 12°C (C, D) and 20°C (E, F).

Symbols represent total plate counts of control (◆), total plate count of FSP1 treatment (opened diamonds), *M. morganii* counts of control (●) and *M. morganii* counts of FSP1 treatment (opened circles). Columns represent histamine concentration of control (black) and histamine concentration of FSP1 treatment (white). Dagger (†) represents under detectable limit of viable cell count (2 log CFU/g) or histamine concentration (20 mg/kg). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

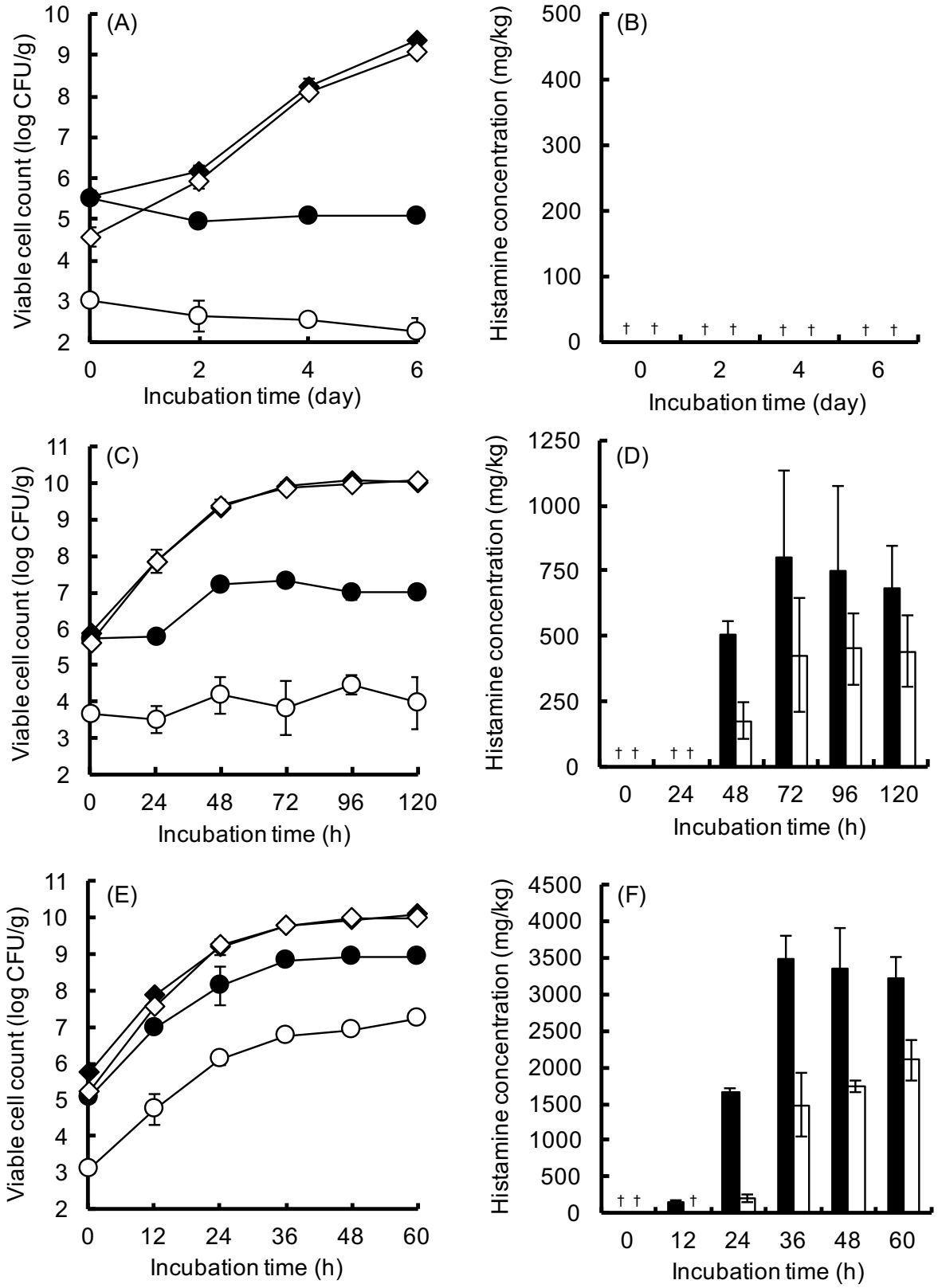


Fig. 4-4. The bacterial growth of (A, C, E) and histamine accumulation (B, D, F) in raw tuna meats inoculated with high concentration level (10^5 CFU/g) of *M. morganii* NBRC3848^{cr} incubated at 4°C (A, B), 12°C (C, D) and 20°C (E, F).

Symbols represent total plate counts of control (◆), total plate count of FSP1 treatment (opened diamonds), *M. morganii* counts of control (●) and *M. morganii* counts of FSP1 treatment (opened circles). Columns represent histamine concentration of control (black) and histamine concentration of FSP1 treatment (white). Dagger (†) represents under detectable limit of viable cell count (2 log CFU/g) or histamine concentration (20 mg/kg). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

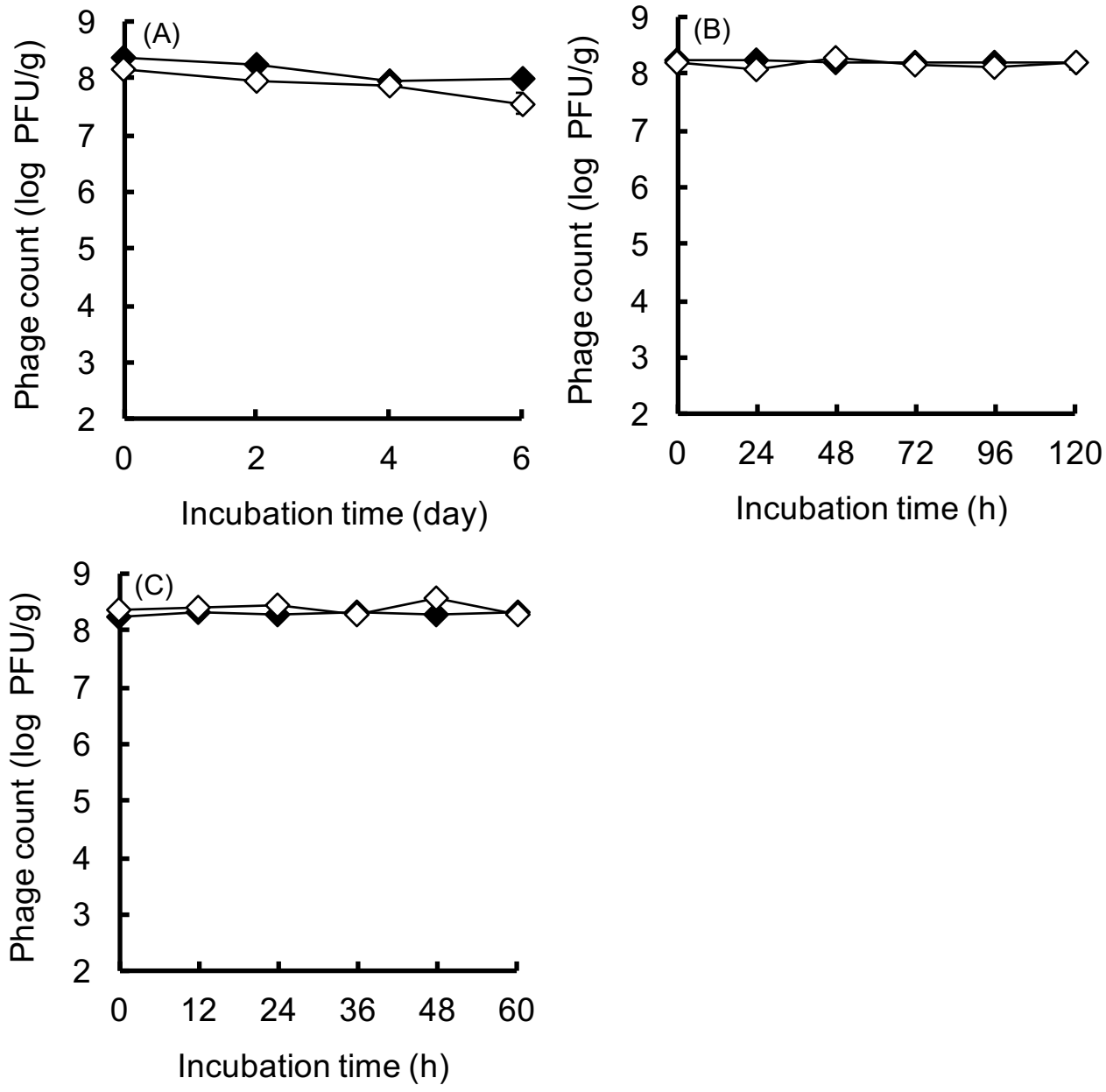


Fig. 4-5. Viability of FSP1 on tuna meat incubated at 4°C (A), 12°C (B) and 20°C (C). Symbols represent plaque forming unit of FSP1 on tuna meat at low *M. morganii* inoculated (◆) and high *M. morganii* inoculated model (◇). Data are shown as the mean ± standard deviation from three independent experiments.

Table 4-2. Developmental rates of FSP1-resistant *M. morganii* after FSP1 treatment on tuna meats

	The number of tested strains[†]	Susceptibility to FSP1[‡]		Developmental rate of FSP1 resistance
		Positive	Negative	
Low contamination model	37	37	0	0%
High contamination model	77	77	0	0%

[†]*M. morganii* formed on Niven's agar from samples incubated at 20°C for 60 h were randomly isolated and tested. The isolated strains were purified with streaking on TSA plate for removal of phages

[‡]Susceptibility of FSP1 was analyzed with plaque forming ability of FSP1 to isolated *M. morganii*

第 5 章　総括

ヒスタミンの蓄積した食品を摂取することにより発症するヒスタミン食中毒は, 我が国において毎年数件から十数件発生している。ヒスタミン食中毒の特徴は食中毒件数に対して患者数が非常に多くなる傾向にある, すなわち集団食中毒事件の多いことである。化学物質としてのヒスタミンは加熱や凍結に安定なため, 食品原料に蓄積したヒスタミンは通常の調理加工により除去または分解できずに大規模調理施設（学校・施設給食や飲食店）での食中毒につながる。したがって, ヒスタミン食中毒の制御には, 魚肉におけるヒスタミンの蓄積を防ぐことが肝要である。魚肉でのヒスタミン蓄積は, 細菌のヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）により行われ HDC を産生する細菌をヒスタミン生成菌と呼ぶ。魚肉のヒスタミン蓄積に関わる細菌には, 海洋細菌の *P. phosphoreum*, *P. damselae* subsp. *damselae*, 腸内細菌科の *E. aerogenes, M. morganii* subsp. *morganii*, *P. vulgaris, R. planticola* などが知られている（Bermejo *et al.*, 2003; Kanki *et al*., 2004; Rodtong *et al.* 2005; Ferrario *et al*., 2012a）。特に, 強力なヒスタミン生成能を持つ *P. damselae* subsp. *damselae* や *M. morganii* subsp. *morganii* は赤身魚やその加工工場より高頻度で検出されている（Kim *et al*., 2003; Bjornsdottir-Butler *et al*., 2015）。さらに, HDC は−20°C で数週間安定であることや酵素単体で魚肉のヒスタミン蓄積を引き起こす能力があることも示されている（Kanki *et al*., 2007）。すなわち, 魚肉中でヒスタミン蓄積を防ぐには多量の HDC が産生されるより前にヒスタミン生成菌を殺菌することが重要である。

本研究では, バクテリオファージ（ファージ）を用いたヒスタミン生成菌の制御を試みた。ファージは宿主特異的に細菌に感染し, 溶菌を引き起こすウイルスである。ファージは優れた宿主特異性を示すため, 標的とする病原細菌のみを選択的に殺菌することが可能であり, 食品の味や香り, 色調, テクスチャーに影響を及ぼさない。現在, 食品微生物制御の分野においても *L. monocytogenes* や *E. coli* O157:H7 を対象としたファージ製剤の利用が欧米諸国の一部で認可されており, 医療分野を含め, 微生物制御を目的としたファージの利用はより一層拡大するものと考えられる。そこで本研究では, ファージを利用してヒスタミン生成菌を制御し, 魚肉における新しいヒスタミン食中毒制御法の構築を目標に, 有効ファージの探索と性状およびヒスタミン生成制御

に関する一連の研究を行った。

第 1 章では, 強力なヒスタミン生成能を有する海洋細菌 *P. damselae* subsp. *damselae* に感染するファージの分離およびその性状分析を行った。ファージの分離は, *P. damselae* JCM8969 を指標菌として培養法により行った。その結果, *P. damselae* ファージ Phda1, Phda2, Phda3, Phda4, Phda5 を分離することに成功し, Phda1 を選抜して各種性状を分析した。グラム陰性菌 32 株, グラム陽性菌 5 株を使用し Phda1 の宿主域を調べたところ, Phda1 の宿主域は極めて狭く, *P. damselae* subsp. *damselae* 9 株のうち JCM8969 の 1 株のみに感染した（Table 1-3）。ファージの宿主特異性は, ファージの持つレセプター結合タンパク質と細菌の持つレセプターに依存する。レセプターとなる物質は細菌細胞の表面に存在するタンパク質, リポ多糖, 鞭毛, 繊毛, 細胞外多糖等である。このレセプターが細菌種内で広く保存されているものであれば, そのファージはレセプターを持つ種に広く感染することとなる。Phda1 は, *P. damselae* JCM8969 だけに感染するため, JCM8969 に極めて特異的なレセプターを認識・結合して感染するものと推察される。

透過型電子顕微鏡による形態観察の結果, Phda1 は *Caudovirales* 目 *Myoviridae* 科に属し, 頭部は 62 ± 4.6 nm（mean ± SD）, 尾部は 110 ± 4.9 nm（mean ± SD）のファージであった（n = 32; Fig. 1-1）。一段増殖曲線からは, ファージの増殖に関わる潜伏期, 上昇期, バーストサイズの情報を得ることができる。ファージの吸着から溶菌を開始するまでを潜伏期, 溶菌が開始してから終了するまでを上昇期, そして 1 つの感染細胞中で複製されるファージ粒子の数をバーストサイズという。TSBS 中での Phda1 の潜伏期, 上昇期, バーストサイズはそれぞれ 60 分, 50 分, 19 phages / an infected cell となった（Fig. 1-3）。また, TSBS 中で 60°C, 30 分間の加熱, pH4.0〜10.0, 24 時間の保持に安定であった（Fig. 1-4）。したがって, 低温保存前の魚肉への接種を想定すると, Phda1 の温度安定性と pH 安定性は一般的な低温流通条件でも適用可能であることを示唆している。

これまで, ファージの吸着および増殖が二価カチオンの添加によって促進される場合のあることが報告されている（Bandara *et al*., 2012; Chhibber *et al*., 2014）。そこで, Phda1 についても二価カチオンによって増殖が促進するか検討した。Phda1 のホスト細胞に対する吸着率は, 1 mM Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}の添加により大きく上昇し, 25 mM Ca^{2+}

存在下で 79.3%と最も高くなった（Fig. 1-8, Table 1-6）。さらに, Phda1 の増殖に及ぼす 1 mM Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}の影響を, 一段増殖実験より検討したところ, Fe^{2+}を添加した場合には Phda1 の一段増殖曲線がカチオン未添加のコントロールと変わらなかったが, Ca^{2+}および Mg^{2+}存在下では Phda1 の増殖が活性化することが確認された（Fig. 1-9, Table 1-7）。また, 25 mM Ca^{2+}の存在下で最も短い潜伏期および上昇期, そして最も大きいバーストサイズが得られ, それぞれ 30 分, 30 分, 84 phages / an infected cell となった（Table 1-8）。すなわち, Phda1 の増殖活性化には Ca^{2+}の存在が有効であることが確認された。

第 3 節では, 液体培地の系を用いて, Phda1 による *P. damselae* subsp. *damselae* 制御を試みた。Phda1 による *P. damselae* の発育抑制効果は, その増殖と同様に Ca^{2+}により上昇した（Fig. 1-10）。8, 12, 20°C における 25 mM $CaCl_2$ 含有改変 TSBS での Phda1 による *P. damselae* の発育抑制効果を調べた。8°C 培養では, ファージ処理の有無に関わらず *P. damselae* の発育は認められず, ヒスタミンについても実験期間を通じて検出限界未満 (< 20 mg/l) となった。12°C 培養では最大 1 log CFU/ml, 20°C 培養では最大 3 log CFU/ml 程度の生菌数の差が見られ, *P. damselae* の発育遅延に応じて培地中のヒスタミン蓄積も遅延した（Fig. 1-12）。したがって, Phda1 は Ca^{2+}存在下で *P. damselae* の発育およびヒスタミン蓄積を抑制可能であると示唆された。しかし, Phda1 の宿主域は極めて狭く, 本研究に用いた *P. damselae* 9 株のうち 1 株にしか感染しなかった。そのため, 微生物制御への実用性に乏しく, Phda1 よりも広い宿主域を示す *P. damselae* ファージを分離することが必要であると考えられた。

第 2 章では, Phda1 よりも広い宿主域を示す *P. damselae* ファージ Phda10 の性状について分析し, *P. damselae* の発育抑制効果について調べた。第 1 章とは違い, 本章でのファージの分離には計 9 株の *P. damselae* subsp. *damselae*（Table 2-1）を指標菌として用いた。また, ファージの増殖に用いる培地は Ca^{2+}などを含む人工海水（ASW）ベースの ASW broth（Table 2-2）とした。その結果, 第 1 章よりも多くの *P. damselae* ファージ（11 株, Phda6～16）の分離に成功し, その中で最も宿主域が広く安定して継代が可能であった Phda10 を選抜し性状検査を行った。Phda10 は, TSAS 系を用いた場合（Table 2-4）よりも ASW agar 系において広い宿主域を示した（Table 2-5）。したがって, 人工海水ベースの培地の利用はファージの分離効率の向上と宿主域の改善に有効

であることが示唆された。増殖サイクルについて調べるための一段増殖実験において, Phda10 は第 1 章と同様の TSBS 系で増殖せずに Marine broth で迅速に増殖し, 潜伏期, 上昇期, バーストサイズがそれぞれ 20 分, 20 分, 13 phages / an infected cell となった（Fig. 2-2）。よって, Phda10 も二価カチオンによりその増殖が活性化されると推察された。

宿主域の評価において, Phda10 は ASW agar 系で宿主域の改善が見られたが, Phda1 の宿主域は改善されなかった（Tables 2-4, 5）。すなわち, Phda1 の宿主域は二価カチオンによる感染サイクルの活性化に関わらず狭いことが明らかとなった。ファージの宿主域は, ホスト表面のレセプターとファージのレセプター結合タンパク質の結合に依存することは前述した。しかし, ホストに対して感染可能なレセプター結合タンパク質を持つファージであっても, 感染ができないことがある。これは, ホストが自らのファージレセプターを他の物質によりブロッキングし, ファージの接触を物理的に阻害する場合に発生する（Labrie *et al*., 2010）。例えば, *E. coli* ファージ T7 はリポ多糖をレセプターとしてホストに結合するが, 莢膜を持つ *E. coli* には感染ができない。そこで, *E. coli* の莢膜を加水分解酵素により除去すると T7 は菌体表面の露出したリポ多糖を用いて感染が可能となる（Scholl *et al*., 2005）。また, Born ら（2013）は, 莢膜を有する植物病原菌 *Erwinia amylovora* に感染するファージの宿主域について, 莢膜の物理的障害により感染が不可能であった *E. amylovora* ファージ Y2 の感染を, 莢膜分解酵素を持つ *E. amylovora* ファージ L1 との併用により可能とした。すなわち, ホスト細胞表面の物理的障害により感染が不可能なファージについては, ファージカクテルを使用することにより宿主域が改善される可能性があり, これはファージ利用の可能性を大きく拡大すると考えられる。Phda1 のようなファージの宿主域の狭さはファージ利用の欠点のひとつだが, このような欠点を克服するためにも, 有用酵素を持つファージの分離, 性状解析, そしてカクテルとしての応用研究の更なる展開が必要である。

第 2 章第 2 節では, Phda10 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響について詳しく調べた。まず, 1 mM $CaCl_2$, $MgSO_4$, $ZnCl_2$, $MnCl_2$ または $FeCl_2$ を含有する改変 TSBS を用いて, Phda10 の吸着を検討した。Phda10 の吸着率は 1 mM Ca^{2+} または Mg^{2+} の添加により上昇したが, 1 mM Fe^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+} の添加ではあまり上昇しなかった（Fig. 2-7）。次に, Phda10 の増殖に及ぼす二価カチオンの影響についても同様に一段増殖曲線の変化よ

り調べた。その結果, Ca^{2+}を添加した場合は Phda10 が増殖したが, 吸着促進効果のみられた Mg^{2+}では 25 mM まで濃度を上昇させても Phda10 の増殖を活性化しなかった（Fig. 2-8, Table 2-6）。したがって, 二価カチオンによる Phda10 の増殖活性化は Ca^{2+}で特異的に誘発する効果である可能性が示唆された。これまで, Ca^{2+}によるファージ増殖の活性化機構については, ホスト細胞内へのファージゲノムの注入に関わる報告されている（Weinberg, 1966）。本研究では詳細な分子学的メカニズムについては検討していないが, Phda1 および Phda10 についてもこのような機構が働いている可能性は十分に考えられる。また, Ca^{2+}の添加で Phda10 のバーストサイズが大きく上昇したため, ゲノム注入後のファージ複製に関しても Ca^{2+}が関与していると推察される。

第 3 節では, Phda10 による *P. damselae* subsp. *damselae* の発育制御を試みた。Phda10 は Phda1 と同様に Ca^{2+}の添加により *P. damselae* の発育抑制効果が上昇した（Fig. 2-9）。さらに, 実際的に有効な使用法として抗菌作用のある有機酸の一種である酢酸と Ca^{2+}の効果を期待して酢酸カルシウムを Phda10 と併用することを考え, その併用効果を検証した。25 mM 酢酸カルシウム含有 TSBS 系での Phda10 による *P. damselae* の発育抑制効果を OD_{595} を用いた濁度法により評価したところ, 酢酸カルシウムと Phda10 の併用はそれぞれの単独処理に比べて *P. damselae* の発育による濁度上昇を大きく抑制した（Figs. 2-11, 12）。また, 生菌数とヒスタミン生成量の変化より評価したところ, Phda10 と酢酸カルシウムの併用処理により *P. damselae* の発育だけでなく, ヒスタミン蓄積も大きく抑制可能であった（Fig. 2-13）。したがって, 酢酸カルシウムと Phda10 の併用は, *P. damselae* の発育を効果的に阻害しヒスタミン食中毒のリスクを低減することが可能であることを示唆した。

現在の食品微生物制御の分野では, 比較的温和な加工処理を複数組み合わせるハードルテクノロジー理論に基づいた手法が主流である。しかし, ファージ利用の分野においては, まだまだファージ単独使用の研究例が多数である。これまでにファージと併用された抗菌物質の例は非常に少なく, ナイシン（Leverentz *et al*., 2003）, シンナムアルデヒド（Viazis *et al*., 2011）, 二酢酸ナトリウム（Chibeu *et al*., 2013）等があるが, これらの抗菌物質についても併用時の作用機序は未だ不明である場合が多い。そのため, 今後のファージ利用の展開において, 抗菌物質とファージの併用処理の効果, そして併用処理時の作用機序についての研究は非常に重要な位置付けにあると考えら

れる。本研究において提案した酢酸カルシウムと Phda10 の併用は, Ca^{2+}が Phda10 の増殖を大きく促進する点から, 相加的ではなく相乗的な効果を示す併用であった。現在市販されているファージ製剤 Listex^{TM} P100（Micreos Food Safety; Wageningen, The Netherlands）や EcoShield^{TM}（Intralytix; Baltimore, MD, USA）はいずれもファージ単独の製剤である。ファージと抗菌物質を共に含有した製剤の研究開発は, 現在よりも簡便かつ効果的な食品微生物制御を提供するものであると推察される。

第 3 章では, *P. damselae* subsp. *damselae* に加えて非常に強力なヒスタミン生成能を持つ *M. morganii* を制御対象菌として選定し, 函館市河川水より分離した *M. morganii* subsp. *morganii* ファージ FSP1 の性状, 感染機構の分析および耐性菌の耐性獲得機構について調べた。FSP1 は *M. morganii* に特異的に感染する（Table 3-1）*Myoviridae* 科ファージであり（Fig. 3-1）, 潜伏期, 暗黒期, 上昇期およびバーストサイズはそれぞれ 30 分間, 20 分間, 15 分間, 42 phages / an infected cell であった（Fig. 3-2）。また, 液体培地中でのチャレンジテストでは *M. morganii* の生菌数を大幅に減少させ（Fig. 3-4）, *M. morganii* の制御に非常に有用なファージであることが明らかとなった。

第 2 節での FSP1 のレセプター分析には, 2 種類の方法を用いた。1 つは *M. morganii* の細胞表面をプロテアーゼまたは過ヨウ素酸ナトリウムで処理を行い, タンパク質またはリポ多糖を破壊した後に吸着率を測定する方法である。もう一方は, *M. morganii* 細胞から外膜タンパク質およびリポ多糖を抽出し, FSP1 と培養後, FSP1 の生残率を測定する方法である。もし抽出した外膜タンパク質やリポ多糖が FSP1 のレセプターであれば, FSP1 のレセプター結合タンパク質がブロックされ, プラーク形成数が減少すると推察される。*Y. pestis* ファージ Yep-phi および *Salmonella* ファージ SSU5 は, ホスト細胞のプロテアーゼ処理や過ヨウ素酸ナトリウム処理により吸着率が減少することを利用して, それぞれのレセプター分析が行なわれている（Zhao *et al*., 2013; Kim *et al*., 2014）。また, 菌体からレセプターとなる物質を抽出する方法では, これまで細胞壁（Yu and Mizushima, 1982）, リポ多糖（Jarrell and Kropinski, 1977）, 外膜タンパク質-リポ多糖複合体（Hantke, 1978）を利用したレセプター分析の例が報告されている。

プロテアーゼおよび過ヨウ素酸ナトリウム処理後の *M. morganii* 細胞に対する FSP1 の吸着率は未処理細胞に対するものと同等であった（Figs. 3-5, 6）。このことから, 本実験で使用した方法が適切でない, または FSP1 のレセプターが外膜タンパク質やリ

ポ多糖でない可能性が示唆された。しかし, *M. morganii* より抽出した外膜タンパク質で FSP1 を処理した後では, FSP1 のプラーク形成数が大きく減少した（Fig. 3-7)。リポ多糖を用いた同様の試験では FSP1 のプラーク形成数が減少しなかったため（Fig. 3-8）, FSP1 のレセプターには外膜タンパク質が関与することが強く示唆された。

ファージ利用による微生物制御法の欠点の一つにファージ耐性菌の出現が挙げられる（Matsuzaki *et al*., 2005)。そのため, ファージの利用に際して, あらかじめどのような性質を持つ耐性菌が出現するか情報を得ることは非常に重要であると考えられる。第 3 節では, 液体培地の系で FSP1 の耐性菌の分離を試み, 5 株の FSP1 耐性株（*M. morganii* NBRC3848 Fr1, NBRC3848 Fr2, NBRC3848 Fr3, NBRC3848 Fr17, NBRC3848 Fr20）を分離した。これらの FSP1 耐性株は PCR 法を用いて本菌種に特異的な配列の存在が確認でき（Fig. 3-9）, *M. morganii* であった。

現在知られている細菌のファージ耐性機構は, ファージの吸着阻害, DNA 注入阻害, ファージゲノムの切断（制限修飾系, CRISPR-Cas system）, 不稔感染の 4 種類である（Labrie *et al*., 2010)。さらに, クオラムセンシングを利用したファージ耐性機構も近年新たに発見されている（Høyland-Kroghsbo *et al*., 2013)。これらのファージ耐性獲得機構の中で最も主要なメカニズムが吸着阻害であるため, 本研究で分離した FSP1 耐性菌の耐性獲得機構についても吸着阻害の観点から検討した。FSP1 は親株の *M. morganii* NBRC3848^{T} に対して 99%が吸着したが, FSP1 耐性株に対しては吸着率が 10%以下になった（Fig. 3-10)。よって, 本研究での FSP1 耐性株の耐性獲得機構はファージの吸着阻害を含むことが明らかとなった。

ファージ耐性菌に対する有効な制御法の一つとしてファージカクテルの利用があげられる。ファージを複数株組み合わせるカクテル利用と耐性菌の出現との関係を検討した報告によれば, ファージカクテルの有効性には適切なファージの組み合わせが必要であり, 不適切な組み合わせでは効果を示さないとされている（O'Flynn *et al*., 2004; Tanji *et al*., 2004)。そこで, 本研究で分離した FSP1 耐性菌がファージカクテルにより制御可能か調べたところ, FSP1 耐性株は FSP1 とは異なる *M. morganii* ファージΦMV-1 およびΦMV-4 に対して感受性を示した（Fig. 3-11)。すなわち, FSP1 とΦMV-1 およびΦMV-4 はホスト細胞に対して異なる吸着メカニズムを持つことが明らかとなり, FSP1 耐性菌がファージカクテルにより制御可能であることが示唆された。

第 3 章では, 吸着阻害によるファージ耐性菌制御におけるファージカクテルの意義を示した。ファージカクテルの利用により, 第 1 章（Figs. 1-6, 12）および第 2 章（Fig. 2-13）で見られたようなファージ処理後のホストの増殖が制御できる可能性が示唆される。ファージ耐性菌は, ゲノム塩基配列の突然変異や, 細菌が備えるファージ耐性機構の発現により出現し, 前者は吸着阻害（レセプターの変異）による耐性菌の出現であり, 後者はファージゲノムの切断（制限修飾系, CRISPR-Cas system）による耐性菌の出現にあたる。制限修飾系および CRISPR-Cas system は対象となるファージゲノムの配列に特異的な耐性機構である。そのため, 異なる塩基配列を持つファージ, すなわち異なる株のファージを併用することで容易に耐性菌の出現が抑制可能であると推察できる。吸着阻害による耐性菌制御には, 適切な組み合わせのファージカクテルが必要な点を考えると, ファージゲノムの切断による耐性菌は吸着阻害による耐性菌の制御よりも容易である。ファージ利用の有効性の観点から考えると, 前述の宿主域の改善に加え様々な耐性機構の耐性菌を克服可能なため, ファージカクテルの利用はファージの有効性を大きく拡大する技術であると判断される。

第 4 章では, FSP1 を利用したマグロ魚肉のヒスタミン蓄積制御を試み, ヒスタミン食中毒のリスク低減にファージ処理が有効な手法となり得るか検討した。マグロ魚肉上の *M. morganii* の発育抑制効果に及ぼす FSP1 濃度の影響について調べた結果, *M. morganii* の生菌数は FSP1 の濃度依存的に減少したが, マグロ魚肉の FSP1 処理においては 10^8 PFU/g 以上の濃度が必要であると示された（Fig. 4-2）。そこで, マグロ魚肉における *M. morganii* の発育と同様にヒスタミン蓄積に及ぼす 10^8 PFU/g FSP1 処理の影響について評価した。10^3 CFU/g または 10^5 CFU/g となるように *M. morganii* をマグロに接種した後, FSP1 を 10^8 PFU/g となるように接種し, 4°C, 12°C, 20°C の各温度で保存した。保存温度および *M. morganii* の接種濃度に関わらず, FSP1 処理区ではコントロールと比べて *M. morganii* の生菌数増加程度が大きく低下し, *M. morganii* の生菌数増加抑制に伴いマグロのヒスタミン蓄積も大きく抑制された（Figs. 4-3, 4）。したがって, ヒスタミン食中毒のリスク低減にファージ処理が有効な手法となる可能性が示唆された。

一般に, 多くの食品中でファージは安定であるが（Guenther *et al*, 2009; Soni and Nannapaneni, 2010; Soni *et al*., 2012; Oliveira *et al*., 2014）, リンゴなどの低 pH を示す食

品ではファージが接種後に死滅し，その殺菌作用を示さないことが知られている（Oliveira *et al*., 2014）。マグロ中での FSP1 の安定性を調べた結果, FSP1 は 4°C, 12°C, 20°C の全ての温度で実験期間を通じて安定であった（Fig. 4-5）。FSP1 は pH5.0〜10.0 で安定なため，通常の流通過程における魚肉の pH では問題なく生存可能と考えらえる。また, FSP1 処理により，魚肉で FSP1 耐性株が発生するかを調べた。20°C, 60 時間保存後の FSP1 処理マグロ魚肉より分離した生残 *M. morganii* 合計 114 株は全て FSP1 に対して感受性を示し（Table 4-2），本実験条件の FSP1 処理後も FSP1 耐性株の発生は確認できなかった。

第 2 章および第 4 章の結論から，液体培地系およびマグロ切り身におけるヒスタミン生成菌の発育およびヒスタミン蓄積においてファージ処理が有効な制御手法となる可能性が示唆された。ヒスタミン生成菌の制御を目的としてファージを使用する場合には，魚体の水揚げおよび解体時にファージを使用することが適切であると考えられる。これは, *M. morganii* や *P. damselae* が 1 次汚染菌として魚体に付着しており（Kim *et al*., 2003; Bjornsdottir-Butler *et al*., 2015），HDC およびヒスタミンが食品に蓄積してしまうと細菌の制御ではヒスタミン食中毒のリスクを低減することが困難なためである。流通過程の初期段階でヒスタミン生成菌を殺菌することで，流通時の温度上昇等によるヒスタミン生成菌の発育およびヒスタミン蓄積のリスクを最小限にとどめることが可能となる。さらに, *M. morganii* は魚肉の加工工場も魚体と同様に汚染しているため（Kim *et al*., 2003），工場のライン洗浄剤として FSP1 を利用できる可能性も考えられる。

FSP1 はマグロ魚肉において *M. morganii* の優れた発育抑制効果を示した。しかし，ファージ処理後の *M. morganii* の増殖を制御することはできなかった（Figs. 4-3, 4）。FSP1 処理後に耐性菌の出現が確認されなかったため（Table 4-2），本研究においてはマグロの FSP1 処理後に発育した *M. morganii* はファージと接触せずに生き残った細菌であると推察された。これは，ファージ処理単独では，初発の *M. morganii* 数は低減可能であるが，その後の発育抑制は見込めないことを示唆している。さらに，ファージの殺菌作用は宿主特異性を示すため，ファージ処理単独では魚肉の一般生菌数を減少することは不可能であった（Figs. 4-3, 4）。すなわち，ファージ処理単独では食品のシェルフライフを延長することは困難である。ファージ処理後のホストの発育を抑制

しつつシェルフライフを延長するためには, 前述の通り他の抗菌物質との併用が肝要である。つまり, ファージによる初発菌数の減少と抗菌物質による持続的な静菌作用を組み合わせることにより, 食品微生物制御の確実性を高めることが可能だと考えられる。

食品, 獣医学, そして医学等のあらゆる分野で, ファージによる微生物制御手法は選択的に有害細菌を殺菌できる優れた手法であると考えられている（Kutateladze and Adamia, 2010; Goodridge and Bisha, 2011）。しかし, ファージ利用にはまだまだ克服すべき欠点があることも事実である。その大きな欠点はファージの宿主特異性の高さと耐性菌の出現の問題である。ファージの分離は比較的容易に行うことが可能である。しかし, 分離したファージが必ずしも微生物制御に適しているとは限らず, 本研究で分離した Phda1 のように非常に狭い宿主域を示すファージも多数存在する。そのため, 様々な性状検査を経て抗菌物質として優れたファージを選定しその安全性を一株ずつ確認する必要がある。また, 第 3 章における FSP1 耐性菌の出現のように, 細菌は容易にファージ耐性を獲得する。ファージカクテルの利用により耐性菌の出現は抑制可能であるが, 複数株の優れたファージの収集, 性状検査, そして安全性の分析はコストと手間のかかる作業である。これらの問題を解決するための手法が現在研究され始めている。Ando ら（2015）は *E. coli* ファージの尾部遺伝子を改変することにより, *Klebsiella* や *Yersinia* に感染が可能なようにファージを設計することに成功した。レセプター結合タンパク質のアミノ酸配列とレセプターへの特異性の関係は未だ不明な部分が多いが, 両者に関する知見を蓄積することにより, 特定のレセプターを認識するファージを容易に設計可能となることが予想され, ファージ利用がより低コストで確実な微生物制御手法となることが期待される。

本研究ではヒスタミン食中毒のリスク低減のため, 強力なヒスタミン生成能を持つ海洋細菌 *P. damselae* subsp. *damselae* および腸内細菌 *M. morganii* subsp. *morganii* の効果的な制御法としてファージの利用を検討した。本研究で分離した *P. damselae* ファージ Phda10 は *P. damselae* に対し広い宿主域を示し, 酢酸カルシウムとの併用により液体培地での *P. damselae* の発育およびヒスタミン蓄積を大きく抑制した。さらに, 函館市河川水より分離した *M. morganii* ファージ FSP1 はマグロ魚肉で *M. morganii* の発育およびヒスタミン蓄積を大きく抑制した。一方で, ヒスタミン生成菌には *P.*

phosphoreum や *M. psychrotolerans* 等, 4℃ で発育可能な低温性ヒスタミン生成菌も存在する。本研究で用いたファージでは, これらの細菌の発育を制御することは不可能であるため, より確実なヒスタミン食中毒の制御法確立のためにこれら低温性ヒスタミン生成菌に感染するファージの研究が今後必要である。

以上, 本研究では水産物のヒスタミン食中毒のリスク低減にファージ処理が有効な手法となり得る可能性を示した。ファージを利用した微生物制御手法は, 食品分野だけでなく今後様々な分野で発展することが予想される。本研究により得られた結果は水産物のヒスタミン食中毒制御におけるファージ利用の基礎的な知見を提供するものである。

謝　辞

本研究の遂行および論文作成にあたり，懇篤なる御指導と御鞭撻を賜り，精細なご校閲を頂いた北海道大学大学院水産科学研究院　佐伯宏樹 教授，川合祐史 教授ならびに山崎浩司 准教授に深甚なる謝意を表します。さらに，本研究の遂行にあたり，有益なご助言を頂きました一色賢司 北海道大学名誉教授ならびに北海道大学大学院水産科学研究院　澤辺智雄 教授に心から感謝致します。

最後に，本研究を遂行するにあたり御理解と御配慮を賜りました北海道大学大学院水産科学院 水産食品科学講座 食品衛生学研究室および安全管理保障科学講座 フードチェーン保全学研究室諸氏に御礼申し上げます。

文　献

Ackermann, H.-W. (2001). Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. *Arch. Virol.*, **146**, 843–857.

Ackermann, H.-W. (2004). Bacteriophage classification. “Bacteriophages: Biology and Applications (Edited by Kutter, E. and Sulakvelidze, A.)”, pp. 30–63, CRC Press, Boca Raton.

Ando, H., Lemire, S., Pires, D.P. and Lu, T.K. (2015). Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing. *Cell systems*, **1**, 187–196.

新井輝義, 池内容子, 岸本泰子, 石崎直人, 柴田幹良, 観公子, 下井俊子, 牛山博文, 立田真弓, 白石典太, 甲斐明美, 矢野一好 (2007). 卸売市場で流通する鮮魚, 魚介類加工品及び浸け水のヒスタミン生成菌汚染状況. *東京都健康安全研究センター研究年報*, **58**, 245–250.

Bandara, N., Jo, J., Ryu, S. and Kim, K.-P. (2012). Bacteriophage BCP1-1 and BCP8-2 require divalent cations for efficient control of *Bacillus cereus* in fermented foods. *Food Microbiol.*, **31**, 9–16.

Bermejo, A., Mondaca, M.A., Roeckel, M. and Marti, M.C. (2003). Growth and characterization of the histamine-forming bacteria of jack mackerel (*Trachurus Symmetricus*). *J. Food Process. Preserv.*, **26**, 401–414.

Binetti, A.G., Quiberoni, A. and Reinheimer, J.A. (2002). Phage adsorption of *Streptococcus thermophilus*. Influence of environmental factors and characterization of cell-receptors. *Food Res. Int.*, **35**, 73–83.

Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A.N., Powell, B., Carlton, R. and Merril, C.R. (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.*, **70**, 204–210.

Bjornsdottir-Butler, K., Bowers, J.C. and Benner, R.A.Jr. (2015). Prevalence and characterization of high histamine-producing bacteria in gulf of mexico fish species. *J. Food Prot.*, **78**, 1335–1342.

Born, Y., Fieseler, L., Klumpp, J., Eugster, M.R., Zurfluh, K., Duffy, B. and Loessner, M.J. (2013). The tail-associated depolymerase of *Erwinia amylovora* phage L1 mediates host cell adsorption and enzymatic capsule removal, which can enhance infection by other phage. *Environ. Microbiol.*, **16**, 2168–2180.

Brul, B. and Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.*, **50**, 1–17.

Brüssow, H. and Hendrix, R. W. (2002). Phage genomics: small is beautiful. *Cell*, **108**, 13–16.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.*, **94**, 223–253.

Carey-Smith, G.V., Billington, C., Cornelius, A.J., Hudson, A. and Heinemann, J.A. (2006). Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Micobiol. Lett.*, **258**, 182–186.

Carvalho, C., Susano, M., Fernandes, E., Santos, S., Gannon, B., Nicolau, A., Gibbs, P., Teixeira, P. and Azeredo, J. (2010). Method for bacteriophage isolation against target *Campylobacter* strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, **50**, 192–197.

Chhibber, S., Kaur, T. and Kaur, S. (2014). Essential role of calcium in the infection process of broad-spectrum methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteriophage. *J. Basic Microbiol.*, **54**, 775–780.

Chibeu, A., Agius, L., Gao, A., Sabour, P.M., Kropinski, A.M. and Balamurugan, S. (2013). Efficacy of bacteriophage LISTEX^{TM}P100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. *Int. J. Food Microbiol.*, **167**, 208–214.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.*, **71**, 1–20.

D'Aloia, A., Vizzardi, E., Pina, P.D., Bugatti, S., Del Magro, F., Raddino, R., Curnis, A. and Cas, L.D. (2011). A scombroid poisoning causing a life-threatening acute pulmonary edema and coronary syndrome in a young healthy patient. *Cardiovasc. Toxicol.*, **11**, 280–283.

d'Herelle, F. (1917). An invisible microbe that is antagonistic to the dysentery bacillus. *C. R. Hebd. Acad. Sci.*, **165**, 373–375.

Emborg, J. and Dalgaard, P. (2008). Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. *Int. J. Food Microbiol.*, **128**, 226–233.

Ferrario, C., Pegollo, C., Ricci, G., Borgo, F. and Fortina, G. (2012a). PCR detection and identification of histamine-forming bacteria in filleted tuna fish samples. *J. Food Sci.*, **77**, 115–120.

Ferrario, C., Ricci, G., Borgo, F. and Fortina, M.G. (2012b). Species-specific DNA probe and development of a quantitative PCR assay for the detection of *Morganella morganii*. *Lett.*

Appl. Microbiol., **54**, 292–298.

Gencay, Y.E., Ayaz, N.D., Copuroglu, G. and Erol, I. (2015). Biocontrol of shiga toxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in turkish raw meatball by bacteriophage. *J. Food Safety*, **36**, 120–131.

Gómez-López, V.M., Ragaert, P., Devevere, J. and Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends Food Sci. Technol.*, **18**, 464–473.

Goodridge, L.D. and Bisha, B. (2011). Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, **1**, 130–137.

Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S. and Loessner, M.J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 93–100.

Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J. and Loessner, M.J. (2012). Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int. J. Food Microbiol.*, **154**, 66–72.

Hagens, S. and Loessner, M.J. (2010). Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **11**, 58–68.

Hantke, K. (1978). Major outer membrane proteins of *E. coli* K12 serve as receptors for the phages T2 (protein Ia) and 434 (protein Ib). *Molec. Gen. Genet.*, **164**, 131–135.

Hidaka, T. and Tokushige, A. (1978). Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages in sea water. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, **27**, 79–90.

Høyland-Kroghsbo, N.M., Mærkedahl, R.B. and Svenningsen, S.L. (2013). A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *mBio* **4**, e00362-12.

Hsieh, S.-E., Lo, H.-H., Chen, S.-T., Lee, M.-C. and Tseng, Y.-H. (2011). Wide host range and strong lytic activity of *Staphylococcus aureus* lytic phage Stau2. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 756–761.

Hung, C.-H., Kuo, C.-F., Wang, C.-H., Wu, C.-M. and Tsao, N. (2011). Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae*-mediated liver abscesses and bacteremia in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 1358–1365.

Hungerford, J.M. (2010). Scombroid poisoning: A review. *Toxicon*, **56**, 231–243.

Jarrell, K. and Kropinski, A.M. (1977). Identification of the cell wall receptor for bacteriophage E79 in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO. *J. Virol.*, **23**, 461–466.

Kanki, M., Yoda, T., Ishibashi, M. and Tsukamoto, T. (2004). *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. *Int. J. Food Microbiol.*, **92**, 79–87.

Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T. and Baba, E. (2007). Histidine decarboxylases and their role in accumulation of histamine tuna and dried saury. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 1467–1473.

Kim, S.-H., An, H., Wei, C.-I., Visessanguan, W., Benjakul, S., Morrissey, M.T., Su, Y.-C. and Pitta, T.P. (2003). Molecular detection of a histamine former, *Morganella morganii*, in albacore, mackerel, sardine, and a processing plant. *J. Food Sci.*, **68**, 453–457.

Kim, M., Kim, S., Park, B. and Ryu, S. (2014). Core lipopolysaccharide-specific phage SSU5 as an auxiliary component of a phage cocktail for *Salmonella* biocontrol. *Appl. Environ.*

Microbiol., **80**, 1026–1034.

Kimura, B., Takahashi, H., Hokimoto, S., Tanaka, Y. and Fujii, T. (2009). Induction of the histidine decarboxylase genes of *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* (formally *P. histaminum*) at low pH. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 485–497.

黒沼宗弥 (2016). 「*Morganella morganii* 溶菌性バクテリオファージΦMV-1 とΦMV-4 の性状および食品保蔵への応用」 (修士論文, pp 1–103). *北海道大学大学院水産科学院*, 函館.

Kutateladze, M. and Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.*, **28**, 591–595.

Kutter, E., Raya, R. and Carlson, K. (2004). Molecular mechanisms of phage infection. “Bacteriophages: Biology and Applications (Edited by Kutter, E. and Sulakvelidze, A.)”, pp. 165–222, CRC Press, Boca Raton.

Labrie, S.J., Samson, J.E. and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* **8**, 317–327.

Ladero, V., Gómez-Sordo, C., Sánchez-Llana, E., del Rio, B., Redruello, B., Fernández, M., Martin, M.C. and Alvarez, M.A. (2016). Q69 (an *E. faecalis*-infecting bacteriophage) as a biocontrol agent for reducing tyramine in dairy products. *Front. Microbiol.*, **7**, 445.

Landry, E.F. and Zsigray, R.M. (1980). Effects of calcium on the lytic cycle of *Bacillus subtilis* phage 41c. *J. Gen. Virol.*, **51**, 125–135.

Leistner, L. and Gorris, L.G.M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 41–46.

Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R. and Sulakvelidze, A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 4519–4526.

Leverentz, B., Conway, W.S., Janisiewicz, W. and Camp, M.J. (2004). Optimizing concentration and timing of a phage spray application to reduce *Listeria monocytogenes* on honeydew melon tissue. *J. Food Prot.*, **67**, 1682–1686.

Marcó, M.B., Reinheimer, J.A. and Quiberoni, A. (2010). Phage adsorption to *Lactobacillus plantarum*: influence of physiological and environmental factors. *Int. J. Food Microbiol.*, **138**, 270–275.

Matsuzaki, S., Yasuda, M., Nishikawa, H., Kuroda, M., Ujihara, T., Shuin, T., Shen, Y., Jin, Z., Fujimoto, S., Nasimuzzaman, M.D., Wakiguchi, H., Suhigara, S., Sugiura, T., Koda, S., Muraoka, A. and Imai, S. (2003). Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage ϕMR11. *J. Infect. Dis.*, **187**, 613–624.

Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H. and Imai, S. (2005). Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J. Infect. Chemother.*, **11**, 211–219.

Mett, C.L. and Sturgeon, R.J. (1982). Cation-exchange chromatography of histamine in the presence of ethylammonium chloride. *J. Chromatogr.*, **235**, 536–538.

Moldovan, R., Chapman-McQuiston, E. and Wu, X.L. (2007). On kinetics of phage adsorption. *Biophys. J.*, **93**, 303–315.

Morita, M., Tanji, Y., Mizoguchi, K., Akitsu, T., Kijima, N. and Unno, H. (2002). Characterization of a virulent bacteriophage specific for *Escherichia coli* O157:H7 and analysis of its cellular receptor and two tail fiber genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **211**, 77–83.

Nakakoshi, M., Nishioka, H. and Katayama, E. (2011). New versatile staining reagents for biological transmission electron microscopy that substitute for uranyl acetate. *J. Electron. Microsc.*, **60**, 401–407.

Niven, C.F., Jeffrey, M.B. and Corlett, D.A. (1981). Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 321–322.

O'Flynn, G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Coffey, A. (2004). Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3417–3424.

Oliveira, M., Viñas, I., Colàs, P., Anguera, M., Usall, J., Abadias, M. (2014). Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juices. *Food Microbiol.*, **38**, 137–142.

Park, M., Lee, J.-H., Shin, H., Kim, M., Choi, J., Kang, D.-H., Heu, S. and Ryu, S. (2012). Characterization and comparative genomic analysis of a novel bacteriophage, SFP10, simultaneously inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 58–69.

Perera, M., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J. and Sulakvelidze, A. (2015). Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. *Food Microbiol.*, **52**, 42–48.

Puck, T.T, Garen, A. and Cline, J. (1951). The mechanism of virus attachment to host cells: I. The role of ions in the primary reaction. *J. Exp. Med.*, **93**, 65–88.

Raya, R.R., Varey, P., Oot, R.A., Dyen, M.R., Callaway, T.R., Edrington, T.S., Kutter, E.M. and Brabban, A.D. (2006). Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 6405–6410.

Rodtong, S., Nawong, S. and Yongsawatdigul, J. (2005). Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus inducus*). *Food Microbiol.*, **22**, 475–482.

Rountree, P.M. (1951). The role of certain electrolytes in the adsorption of Staphylococcal bacteriopahges. *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 673–680.

Rountree, P.M. (1955). The role of divalent cations in the multiplication of Staphylococcal bacteriophage. *J. Gen. Microbiol.*, **12**, 275–287.

Sánchez-Guerrero, I.M., Vidal, J.B. and Escudero, A.I. (1997). Scombroid fish poisoning: A potentially life-threatening allergic-like reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **100**, 433–434.

Scholl, D., Adhya, S. and Merril, C. (2005). *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 4872–4874.

Shen, G.-H., Wang, J.-L., Wen, F.-S., Chang, K.-M., Kuo, C.-F., Lin, C.-H., Luo, H.-R. and Hung, C.-H. (2012). Isolation and characterization of ϕkm18p, a novel lytic phage with therapeutic potential against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLOS ONE*, **7**, e46537.

Soni, K.A. and Nannapaneni, R. (2010). Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *J Food Prot* **73**, 32–38.

Soni, K.A., Desai, M., Oladunjoye, A., Skrobot, F., Nannapaneni, R. (2012). Reduction of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese by a combination of listericidal and listeriostatic GRAS antimicrobials. *Int. J. Food Microbiol.*, **155**, 82–88.

Tanji, Y., Shimada, T., Yoichi, M., Miyanaga, K., Hori, K. and Unno, H. (2004). Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 270–274.

Tomat, D., Migliore, L., Aquili, V., Quiberoni, A. and Balagué, C. (2013). Phage biocontrol of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat products. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **3**, 20.

Torido, Y., Takahashi, H., Kuda, T. and Kimura, B. (2012). Analysis of the growth on histamine-producing bacteria and histamine accumulation in fish during storage at low temperature. *Food Control.*, **26**, 174–177.

Twort, F.W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet*, **2**, 1241–1243.

Uchiyama, J., Rashel, M., Maeda, Y., Takemura, I., Sugihara, S., Akechi, K., Muraoka, A., Wakiguchi, H. and Matsuzaki, S. (2008). Isolation and characterization of a novel *Enterococcus faecalis* bacteriophage ϕEF24C as a therapeutic candidate. *FEMS Microbiol. Lett.*, **278**, 200–206.

Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F. (2011). Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viabillity on leafy green vegetables by treatment with a bacteriophage mixture

and *trans*-cinnamaldehyde. *Food Microbiol.*, **28**, 149–157.

Weinberg, E.D. (1966). Roles of metallic ions in host-parasite interactions. *Bacteriol. Rev.*, **30**, 136–151.

Yu, F. and Mizushima, S. (1982). Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T4. *J. Bacteriol.*, **152**, 718–722.

Zhu, J., Rao, X., Tan, Y., Xiong, K., Hu, Z., Chen, Z., Jin, X., Li, S., Chen, Y. and Hu, F. (2010). Identification of lytic bacteriophage MmP1, assigned to a new member of T7-like phages infecting *Morganella morganii*. *Genomics*, **96**, 167–172.

Zhao, X., Cui, Y., Yan, Y., Du, Z., Tan, Y., Yang, H., Bi, Y., Zhang, P., Zhou, L., Zhou, D., Han, Y., Song, Y., Wang, X. and Yang, R. (2013). Outer membrane proteins Ail and OmpF of *Yersinia pestis* are involved in the adsorption of T7-related bacteriophage Yep-phi. *J. Virol*., **87**, 12260–12269.