



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 [論文内容及び審査の要旨]
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
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65349
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shogo_Yamaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名：山 木 将 悟

学 位 論 文 題 目

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

ヒスタミン食中毒は、ヒスタミンの蓄積した食品を喫食することにより発症する化学性食中毒である。ヒスタミンは、細菌の産生するヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）により、魚肉中の遊離ヒスチジンから変換される。魚肉に関わるヒスタミン生成菌は複数種報告されており、海洋細菌の *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* や腸内細菌科の *Morganella morganii* subsp. *morganii* は強力なヒスタミン生成能を持つ。ヒスタミンは、加熱や凍結に安定であるため、食品に蓄積すると調理加工により除去または分解できない。したがって、ヒスタミン食中毒の制御には、魚肉のヒスタミン蓄積を防ぐことが肝要であり、過剰なヒスタミンが食品に蓄積するより前に、ヒスタミン生成菌の制御が必要である。

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。ファージは高い宿主特異性を示すため、標的細菌のみを選択的に殺菌可能であり、食品の味や香り、色調に影響を及ぼさない。現在、*Listeria monocytogenes* や *Escherichia coli* O157:H7 を対象としたファージ製剤の利用が欧米諸国で認可されている。そこで本研究では、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蓄積制御に関する一連の研究を行った。

第1章では、ヒスタミン生成菌 *P. damsela* に感染するファージの分離および性状解析を行った。*P. damsela* JCM8969 を用いた培養法により、溶菌活性を有する5株のファージ（Phda1～5）を分離し、選抜した Phda1 の性状を分析した。透過型電子顕微鏡観察により、Phda1 は頭部と鞘を持つ尾部からなる *Caudovirales* 目 *Myoviridae* 科ファージと同定した。また、一段増殖実験より、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 であった。 Mg^{2+} および Ca^{2+} の添加により、Phda1 の宿主細胞への吸着率の向上と感染サイクルの活性化が認められた。次に、 Ca^{2+} 添加液体培地で Phda1 は *P. damsela* の発育およびヒスタミン蓄積を遅延させることを確認した。しかし、Phda1 は宿主域が非常に狭く実用性に乏しいという欠点が存在した。

第2章では、Phda1 よりも広い宿主域を示す *P. damsela* ファージの探索と分離を試みた。人工海水系の培地を用い、第1章よりも多くの *P. damsela* 株を用いてファージを分離した結果、Phda6～16 を獲得し、そのうち宿主域の広い Phda10 を以後の性状検査に供した。Marine broth 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、13 phages / an infected cell となった。また、Phda1 と同様に、Phda10 は Ca^{2+} による感染サイクルの活性化が認められ、25 mM Ca^{2+} 存在下での 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 となった。そこで、この Ca^{2+} のファージ感

染サイクル活性化作用と酢酸の抗菌作用を期待して、食品添加物の酢酸カルシウムと Phda10 の併用による複合効果を液体培地の系で検証した。25 mM 酢酸カルシウムと Phda10 の併用処理は、*P. damsela* の発育だけでなく、培地中のヒスタミン蓄積を大きく抑制した。したがって、これらの併用は *P. damsela* によるヒスタミン食中毒のリスクを低減するのに有効であることが示唆された。

第3章では、函館市内の河川水より分離した *M. morganii* ファージ FSP1 の性状解析、感染機構および FSP1 耐性株の耐性獲得機構の解明を試みた。FSP1 は *M. morganii* に特異的な *Myoviridae* 科ファージであり、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、20 分、15 分、42 phages / an infected cell であった。また、液体培地でのチャレンジテストの結果、FSP1 は *M. morganii* の制御に有用なファージであると示唆された。さらに、FSP1 の感染機構解明のため、宿主細胞上の FSP1 レセプターの特異性を試みた。*M. morganii* 細胞より外膜タンパク質とリポ多糖を抽出し、FSP1 に作用させた結果、外膜タンパク質の濃度依存的に FSP1 の生残率が減少したことから、宿主細胞に対する FSP1 の吸着には外膜タンパク質が関与することが示唆された。さらに、*M. morganii* の FSP1 耐性株を作出し、その耐性獲得機構を調べたところ、ファージの吸着阻害であることが確認された。また、FSP1 耐性株は感染機構の異なる他の *M. morganii* ファージにより殺菌可能であり、ファージカクテルの使用により FSP1 耐性株を制御可能であることを明らかにした。

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。*M. morganii* の接種濃度と保存温度に関わらず、 10^8 PFU/g の FSP1 処理によりマグロ魚肉における *M. morganii* の発育とヒスタミン蓄積が大きく遅延した。FSP1 は実験期間を通じて安定であり、FSP1 処理後の耐性菌の出現は認められなかった。したがって、FSP1 処理は魚肉における *M. morganii* によるヒスタミン食中毒のリスク低減に大きく寄与する可能性が示唆された。

以上本研究では、水産物におけるヒスタミン食中毒リスクの低減を目的に、ヒスタミン生成菌 *P. damsela* および *M. morganii* に対するファージを利用した制御手法を検討し、ファージ処理が液体培地、魚肉の両方の系でヒスタミン生成菌の発育とヒスタミン蓄積を大きく抑制することを明らかにした。ここで得られた成果は、水産物のヒスタミン食中毒制御におけるファージの効果的利用法に関する知見を提供するものである。