



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）

氏名： 山 木 将 悟

	主査 教授	佐 伯 宏 樹
審査委員	副査 教授	川 合 祐 史
	副査 准教授	山 崎 浩 司

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ヒスチジン脱炭酸酵素によりヒスチジンから変換され、食品中に蓄積されるため、遊離ヒスチジンの多い赤身魚が原因食品となる場合が多い。ヒスタミンは調理や加工処理などの条件に安定であるため、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、すなわちヒスタミン生成菌の制御が肝要である。本論文では、バクテリオファージ(ファージ)を利用した新しいヒスタミン食中毒制御法の構築を目標に、水産物に関連する強力なヒスタミン生成菌として海洋細菌の *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* と腸内細菌科の *Morganella morganii* subsp. *morganii* に対する有効ファージの探索とヒスタミン蓄積制御に関する研究を行っている。

第1章では、ヒスタミン生成菌 *P. damsela* subsp. *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* subsp. *damsela* JCM8969 を宿主とする培養法により、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、一段増殖曲線より、Phda1の潜伏期、上昇期、バーストサイズがそれぞれ、60分、50分、19 phage/infected cellであることを明らかにし、Mg²⁺およびCa²⁺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が活性化されることを認めた。次に、Ca²⁺添加液体培地でPhda1は *P. damsela* subsp. *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が、Phda1は宿主域が非常に狭く実用性に乏しいと判断した。

第2章では、Phda1よりも広い宿主域を示す *P. damsela* subsp. *damsela* ファージをあらためて探索した。人工海水系の培地と多くの対象菌株を用いてファージの分離を試みたところ、Phda 6～16を獲得し、最も宿主域の広いPhda10を選抜した。Marine broth におけるPhda10 の潜伏期、上昇期、バーストサイズがそれぞれ、20分、20分、13 phage/ infected cell であり、またPhda1と同様に、Phda10はCa²⁺によって感染サイクルが活性化され、25 mM Ca²⁺ 存在下でバーストサイズが 63.6 phag/infected cell に上昇することを明らかにした。そこで、このCa²⁺の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* subsp. *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することを観察し、これらの併用が本菌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を明らかにした。

第3章では、函館市内の河川水より分離した *M. morganii* subsp. *morganii* ファージ FSP1 の性状と感染機構、およびFSP1耐性株の耐性獲得機構の解明を試みた。FSP1は、本菌種に特異的なMyoviridae科ファージであり、潜伏期 30分、暗黒期 20分、上昇期 15分、バーストサイズ 42 phage/infected cell という増殖特性を有することを明らかにした。また、液体培地系においてFSP1は *M. morganii* subsp. *morganii* の発育を有意に抑制可能であることを確認した。次に、FSP1の感染と宿主の耐性獲得について検討した。FSP1の感染機構として、宿主細胞に対するFSP1の吸着には外膜タンパク質がレセプターとして関与することを示唆した。*M. morganii* subsp. *morganii* のFSP1耐性株を作出して、その耐性がファージの吸着阻害であることを確認した。また、FSP1耐性株は感染機構の異なる他の *M. morganii* subsp. *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耐性株を制御できることを示した。

第4章では、マグロ魚肉を用いてチャレンジテストを行った。*M. morganii* subsp. *morganii* の接種濃度と保存温度に関わらず、10⁸ PFU/g のFSP1処理によりマグロ魚肉における本菌の発育とヒスタミン蓄積が大きく遅延することを観察し、FSP1は本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いことを確認した。FSP1処理は魚肉における *M. morganii* subsp. *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を示した。

本研究の成果は、水産物における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ことを実証し、水産物の安全確保に貢献するものと高く評価される。よって審査員一同は、申請者が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。