

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450278

研究課題名(和文) 溶菌性ファージを利用したヒスタミン生成菌の制御

研究課題名(英文) Control of histamine-producing bacteria using bacteriophages

研究代表者

山崎 浩司 (YAMAZAKI, Koji)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：40250500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒスタミン生成菌に感染する新しい溶菌ファージを分離し、その性質を調べるとともに、これらファージの利用によって食品でのヒスタミン蓄積が抑制されるか調べた。本研究では *Morganella morganii* に感染するファージ3株、*Photobacterium damsela* に感染するファージ1株の分離に成功した。特に、*M. morganii* 溶菌性ファージFSP1は魚肉に接種すると、保存中において *M. morganii* の発育とヒスタミンの蓄積を効果的に抑制できるファージであった。したがって、水産食品におけるヒスタミン食中毒予防に溶菌性ファージの利用が有効な手法となることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study was investigated the characterization of newly isolated bacteriophages infected to histamine-producing *Morganella morganii* and *Photobacterium damsela*, and utilization of bacteriophages for control of the pathogens and histamine accumulation. Three strains, FSP1, MV-1 and MV-4, for *M. morganii* and a strain, Phda1, for *P. damsela* were successfully isolated from river waters in this study. The viable count of *M. morganii* and histamine accumulation inhibited on tuna meat by the FSP1 treatment. This result suggests that bacteriophages such as FSP1 and Phda1 could be used as a biocontrol agent against *M. morganii* and *P. damsela* for treatment of infectious disease treatment or food decontamination.

研究分野：食品微生物学

キーワード：ヒスタミン ヒスタミン生成菌 バクテリオファージ 微生物制御 ヒスタミン食中毒 ファージセラピー

1. 研究開始当初の背景

水産食品におけるグラム陰性菌を原因とする食中毒の一つにアレルギー様症状を発症するヒスタミン食中毒が挙げられる。ヒスタミン食中毒は、魚介類の不適切な温度管理のために増殖した腸内細菌科の *Morganella morganii* や海洋細菌の *Photobacterium damsela*、*P. phosphoreum* などの産生するヒスチジン脱炭酸酵素の関与によって遊離ヒスチジンからヒスタミンが合成され、このヒスタミンが蓄積した食品の摂食によって発症する。原因物質のヒスタミンは熱に安定なため、ヒスタミン蓄積が起ると、加熱調理済食品でも食中毒が発生する。また、ヒスタミン食中毒の症状は軽微なものが多いため、食中毒事例として報告されないこともあり、実際の患者数は厚生労働省の食中毒統計での報告数よりも多いと推察される。そこで、申請者はヒスチジンを多く含有する マグロ、カツオ、サバなどの水産物を好む日本では、ヒスタミンによる食中毒リスクの低減は急務と考えた。そこで、新しい食品中での微生物制御法としてファージの溶菌活性を利用するファージセラピー（ファージ療法）に着目した。ファージの感染は極めて特異性が高いため、危害微生物だけをピンポイントで制御可能であり、安全性も高いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、水産食品で頻発するヒスタミン食中毒の発生を低減するため、ヒスタミン生成菌に感染するファージを新たに探索し、それらの性質、感染様式を調べ、溶菌性ファージを利用した食品でのヒスタミン生成菌制御の有効性を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株

Morganella morganii subsp. *morganii* NBRC3848^T、NBRC3168 および ATCC25829 の3株を、また *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* JCM 8967、JCM8968、JCM8969 を使用した。*Morganella* は、Tryptic Soy Broth (TSB) で30、18時間、*Photobacterium* は1.5% NaCl 添加 TSB (TSBS) で25、15時間培養したものを集菌洗浄し、以後の実験に用いた。

(2) *M. morganii* および *P. damsela* 溶菌性ファージの分離

ファージの分離は、400 µg/ml の CaCl₂ および MgSO₄ を添加した2倍濃度の TSB 培地または TSBS に河川水を同量加え、これに *M. morganii* 培養液を 10⁶⁻⁷ CFU/ml となるように接種し、30、6時間培養または *P. damsela* 培養液を 10⁴ CFU/ml となるように接種し、20、24時間培養した。この培養液 10ml にクロロホルムを5%となるよう加え、良く攪拌後、遠心分離した。上清を採取し、濾過滅菌（孔径 0.45 µm, PVDF, ミリポア）したものを

ファージ分離用試料液とした。この溶液中の *M. morganii* に感染するファージの有無は軟寒天液を使用するスポットテストによって調べた。

(3) ファージの形態観察

ファージ溶液を炭素被覆グリッド（エクセルサポートフィルム、日新 EM）に載せ、5分間保持してグリッドにファージを吸着させた。その後、2.5% 酢酸サマリウムを重層し、1秒間ネガティブ染色した。余剰の水分を除去後、透過型電子顕微鏡 (TEM, JEM-1011, 日本電子) で観察した。

(4) 分離ファージの溶菌スペクトル測定

各供試菌株の新鮮培養菌液 100 µl を軟寒天 3ml に接種し、TSA 平板、1.5% NaCl 添加 TSA (TSAS) 平板または 0.6% 酵母エキス添加 TSA (TSAYE) 平板に重層した。軟寒天の固化後、ファージ溶液 10 µl を接種し、各菌株の最適培養温度で24時間培養後、プラーク形成の有無を評価した。

(5) ファージの一段増殖実験

TSB に *M. morganii* NBRC3848^T を 10⁶ CFU/ml または TSBS に *P. damsela* JCM8969 を 10⁵ CFU/ml となるよう接種し、*M. morganii* では30 で OD₆₆₀ が 0.1 となるまで、また *P. damsela* では25 で OD₆₆₀ が 0.2 となるまで培養した。これに、各ファージを MOI=0.1 となるように接種後、各々の温度で5分間保持し、ファージを菌体に吸着させた。その後、遠心分離し、ペレットを新鮮な TSB または TSBS に懸濁後、30 または25 で培養した。5分または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、その変化量からファージの潜伏期、上昇期およびバーストサイズを算出した。

(6) ファージ安定性試験

ファージの各種条件における安定性は以下のように調べた。耐熱性は、TSB または TSBS にファージを 10⁷ または 10⁵ PFU/ml となるように懸濁後、各温度で加熱した。所定の時間経過後、懸濁液の一部を採取し、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安定性を評価した。耐 pH 性は、塩酸または水酸化ナトリウムで pH を調整した TSB または TSBS にファージを 10⁷ または 10⁵ PFU/ml となるように懸濁後、30 で24時間保持した。その後、懸濁液の一部を採取し、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安定性を評価した。耐塩性は、0.1~3.0M NaCl 含有 TSB に FSP1、MV-1 または MV-4 を 10⁷ PFU/ml となるように FSP1 を懸濁後、30 で24時間保持した。その後、懸濁液の一部を採取し、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安定性を評価した。耐凍性は、

は、TSBS に $10^3, 10^5, 10^7$ PFU/ml となるように Phda1 を懸濁し、-20, -40, -80 で 4 週間凍結した。一方、MV-1, MV-4 は TSB に 10^7 PFU/ml となるように接種し、4, -20, -45 で保持した。解凍は 20 で 30 分間行い、解凍後の TSBS または TSB 中に含まれる Phda1 または MV-1 および MV-4 のプラーク形成数をプラークアッセイ法で求めた。凍結期間におけるプラーク形成数の変化から各々の耐凍性を評価した。

(7) MV-1, MV-4 の吸着部位の解明 宿主の酵素および過ヨウ素酸ナトリウム 処理後のファージ吸着分析

M. morgani NBRC3848^T を集菌洗浄後、菌体をリン酸緩衝液に溶解した proteinase K (0.2mg/ml, pH7.5), Trypsin (0.3mg/ml, pH8.0), papain (0.2mg/ml, pH7.0) で 30, 2 時間酵素処理した。また、同様に調製した菌体を 50mM 酢酸ナトリウム (pH5.2) に溶解した 100mM 過ヨウ素酸ナトリウムで 30, 2 時間 (暗所) 処理した。これら処理した菌体を TSB で 3 回集菌洗浄後、宿主細胞への吸着率を測定した。吸着率の測定は *M. morgani* NBRC3848^T 培養液を 2 回集菌洗浄後、TSB に $OD_{600}=0.1$ となるように再懸濁した。これに MV-1 または MV-4 を $MOI=0.01$ となるように接種後、30 で宿主細胞に吸着させた。経時的に懸濁液 1ml を採取し、遠心分離後、その上清を濾過滅菌して遊離ファージを得た。遊離ファージ数は、プラークアッセイ法で測定し、これを接種ファージ量から差し引いて吸着ファージ量を求め、吸着率 (%) を算出した。

糖処理における MV-1, MV-4 の溶菌活性 評価

11 種類の糖 (キシロース, マンノース, マンニトール, アラビノース, フルクトース, ガラクトース, ラムノース, マルトース, ソルビトール, スクロース) を 500mM となるように添加した TSB 組成の Sugar Broth に MV-1 および MV-4 を約 10^7 PFU/ml となるよう接種した。30, 6 時間保持後、プラークアッセイ法でプラーク形成数を測定した。なお、糖非添加の TSB でのファージ活性を 100% とした。

MV-1 耐性株の作出

TSB に *M. morgani* NBRC3848^T を約 10^6 CFU/ml となるよう接種し、30 で培養した。 $OD_{660}=0.1$ となった時点で MV-1 を $MOI=100$ となるよう接種し、経時的にバイオフォトレコーダー (TN-1506, アドバンテック) で OD_{660} を測定した。ファージによる溶菌によって濁度が一度低下し、再び上昇したところで培養液 1ml を採取した。これを PBS で 3 回、集菌洗浄後、TSA 平板培地に表面塗抹し、純粋菌株を得た。MV-1 および MV-4 に対する感受性をスポットテストで調べ、MV-1 耐性

M. morgani NBRC3848^{R1} 株を得た。

M. morgani NBRC3848^{R1} へのファージの吸着
M. morgani NBRC3848^T と NBRC3848^{R1} 培養液を 2 回集菌洗浄後、TSB に $OD_{600}=0.1$ となるように再懸濁した。これに MV-1 または MV-4 を $MOI=0.01$ となるように接種後、30 で宿主細胞に吸着させた。経時的に懸濁液 1ml を採取し、遠心分離後、その上清を濾過滅菌して遊離ファージを得た。遊離ファージ数は、プラークアッセイ法で測定し、これを接種ファージ量から差し引いて吸着ファージ量を求め、吸着率 (%) を算出した。

(8) *M. morgani* の発育に及ぼすファージ MV-1 および MV-4 の影響

1% ヒスチジン塩酸塩添加 TSB に *M. morgani* NBRC3848^T および NBRC3168 を各々約 5.0×10^5 CFU/ml となるように接種し、30 で培養した。 $OD_{660}=0.1$ となった時点で MV-1 ($MOI=100$), MV-4 ($MOI=100$) または MV-1 および MV-4 を $MOI=50$ ずつのカクテル接種し、経時的にバイオフォトレコーダーで *M. morgani* の発育状態を濁度で測定した。

(9) 食品でのチャレンジテスト

マグロ肉 5g に *M. morgani* NBRC3848^{cr} (クロラムフェニコール耐性株) 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 50 μ l 滴下し、室温で 30 分間放置した。その後、ファージ FSP1 が 10^8 PFU/g となるように、FSP1 懸濁液を 100 μ l 接種した。4, 12, 20 で魚肉を保存し、所定時間経過後、取り出し、10mM リン酸緩衝食塩水 45ml 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. morgani* 数を測定した。ヒスタミン濃度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。一般生菌数は TSA を用いた表面塗抹法 (30, 48 時間) *M. morgani* 数は 25 μ g/ml クロラムフェニコール含有 Niven's 寒天培地を用いた表面塗抹法 (30, 24-48 時間) で測定した。

(10) ファージ処理魚肉からのファージ耐性 菌の分離

FSP1 処理した 20, 60 時間保存後のマグロ魚肉から FSP1 耐性株の分離を試みた。すなわち、25 μ g/ml クロラムフェニコール含有 Niven's 寒天培地上に形成した *M. morgani* のコロニーを無作為に釣菌し、純粋分離後、スポットテスト法によって FSP1 に対する感受性を評価した。

4. 研究成果

(1) ヒスタミン生成菌溶菌ファージの分離
M. morgani subsp. *morgani* および *P. damsela* subsp. *damsela* に感染するファージの分離を試み *M. morgani* ファージ FSP1, MV-1, MV-4 および *P. damsela* ファージ

Phda1 の分離に成功した。また、感染宿主域を検討した結果、これらファージの感染は、各々の菌種に対して特異的に感染するファージであることが確認された。

(2)分離ファージの形態学的特徴

透過型電子顕微鏡での観察結果から、*M.morganii* 溶菌性ファージ FSP1 は、平均 119.8 nm の頭部と平均 117.5 nm の伸縮性尾部を持つ *Myoviridae* 科ファージ、また MV-1 は平均 96.1 nm の頭部と 304.0 nm の非伸縮性尾部を持つ *Siphoviridae* 科ファージ、MV-4 は、平均 121.2 nm の頭部と 114.4 nm の伸縮性尾部を持つ *Myoviridae* 科ファージであることが明らかになった。また、*P.damselfae* 溶菌性ファージ Phda1 は、62 nm の頭部および 110 nm の鞘のある尾部が観察されたことから、*Myoviridae* 科ファージと考えられた。

(3)分離ファージの一段増殖曲線

ファージの増殖特性を示す潜伏期、上昇期およびバーストサイズを調べた結果、FSP1 の潜伏期、上昇期およびバーストサイズは、30 分間、15 分間、42 phages/infected cell であった。また、MV-1 および MV-4 では、各々、30 分間-30 分間-68 PFU/infected cell および 60 分間-30 分間-36 PFU/infected cell と評価された。さらに、Phda1 の潜伏期、上昇期およびバーストサイズは、60 分間、50 分間および 19 PFU/infected cell となった。

(4)分離ファージの安定性

FSP1 は 50、60 分間の加熱、pH 5~10 および 3M NaCl、24 時間の処理に安定であった。また、MV-1 および MV-4 はいずれも 50 の加熱に耐性を持ち、また低温(4℃)、pH 5~9 または 1M NaCl に対しても耐性を示した。さらに、Phda1 は 60、30 分間の加熱、pH 4.0~10.0 で 24 時間処理、および -20℃~-80℃ で 1 か月の凍結処理に対して安定であった。したがって、これらファージが、宿主細菌の発育環境で十分に抑制効果を発揮する可能性が示唆された。

(5)ファージ MV-1 と MV-4 の吸着部位

MV-1 および MV-4 の吸着レセプター部位を調べるため、宿主細胞表面にある外膜タンパク質の構造をタンパク分解酵素処理したところ、Proteinase K、Trypsin および papain のいずれで処理しても宿主細胞へのファージの吸着率には変化が見られなかった。一方、細胞表面に存在する LPS の構造を分解するため過ヨウ素酸ナトリウム処理を行ったところ、MV-1 と MV-4 の宿主細胞への吸着量が、それぞれ 3~10% および 32~39% まで低下した。よって、MV-1 と MV-4 の吸着部位が、宿主細胞の LPS である可能性が強く示唆された。

ファージ MV-1 および MV-4 の溶菌活性に及ぼす糖の影響

MV-1 および MV-4 が宿主細胞の LPS をレセプターとしている可能性が示唆されたため、宿主細胞への吸着に及ぼす糖の影響を調べた結果、MV-1 では、キシロースとアラビノースの添加によって溶菌活性が大きく低下した(約 10%)。一方、MV-4 では MV-1 と同様にキシロースとアラビノースの添加によって溶菌活性の低下は見られたが、MV-1 ほど著しい活性の低下は見られず各々 50% と 63% に留まった。

M.morganii MV-1 耐性株に対するファージの吸着

本研究では、MV-1 に対する *M.morganii* NBRC3848^T の耐性株 NBRC^{R1} の作出に成功した。作出した耐性株 NBRC^{R1} に対する MV-1 の吸着率は 60% から 10% に低下していたが、MV-4 の吸着率は親株と変わらなかった。この親株と耐性株に対して MV-1 と MV-4 を作用させたところ、この耐性株は MV-1 に対して溶菌スポット(プラーク)を形成しなかったが、MV-4 に対しては溶菌スポットが形成された。したがって、MV-1 と MV-4 では宿主細胞である *M.morganii* NBRC3848^T に対する感染様式が一部異なることが推察された。

(6) *M.morganii* の発育に及ぼすファージ MV-1 および MV-4 の影響

MV-1 および MV-4 で処理していない場合には、培養開始後 12 時間で大幅な濁度の上昇が見られ、*M.morganii* の発育が観察された。

ファージ処理区では、MV-4 接種の場合、24 時間目以降に一時的な濁度の低下が見られ、宿主の溶菌現象が観察された。培養 24 時間以降は、再び濁度が上昇し、120 時間後にはファージ未処理区と同程度まで *M.morganii* は発育した。すなわち、MV-4 の単独処理では *M.morganii* の発育を遅延させることは可能であったが、それは一時的なものであった。一方、MV-1 単独処理の場合、MV-4 処理の場合よりも *M.morganii* の発育を遅延し、*M.morganii* の発育は培養期間を通して遅くなった。さらに、MV-1 と MV-4 で同時に処理した場合には、*M.morganii* の発育はさらに遅くなった。したがって、2 つの異なるファージをカクテルとして利用することは、各々の単独利用よりも優れた発育抑制効果を生ずる方法であることが明らかになった。

(7) 魚肉での *M.morganii* の発育抑制に及ぼすファージ FSP1 処理の影響

魚肉におけるヒスタミン生成菌の発育抑制にファージ処理が有効な手法となり得るか、*M.morganii* に感染する FSP1 を使用して検証した。その結果、FSP1 処理によって、低汚染モデル(10^3 CFU/g *M.morganii* 接種)およ

び高汚染モデル(10^5 CFU/g *M.morganii* 接種)の両方で初発 *M.morganii* 菌数が大幅に減少した。特に、低汚染モデルでは、FSP1 処理後に *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量は大きく遅延した。高汚染モデルでは、FSP1 処理によって *M.morganii* の初発菌数が約 $2.5\log$ 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した。以上の結果から、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方法となる可能性が示唆された。しかし、12 では対照区と FSP1 処理区のヒスタミン濃度の差は他の条件より小さかった。これは、FSP1 により菌が死滅した後も、*M.morganii* のヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) が活性を保っているためと推察された。したがって、ファージ処理を行う前に *M.morganii* の初発菌数を増加させないため衛生的な食品の取り扱いも重要であることが明らかになった。

(8) マグロ魚肉からのファージ FSP1 耐性菌の分離

FSP1 処理したマグロ魚肉において FSP1 耐性株が出現するか調べた。上述の低汚染モデルおよび高汚染モデル実験の試料から合計 114 株の *M.morganii* を再分離し、FSP1 感受性を調べた結果、再分離株の中に耐性菌は存在しなかった。

以上の結果から、本研究で新規に分離したファージ FSP1 は、魚肉における *M.morganii* によるヒスタミン蓄積の制御に有効なファージであることが証明され、水産食品のヒスタミン蓄積抑制にファージの利用が有効な手法となり得ることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Yamaki Shogo, Kawai Yuji, Yamazaki Koji: Characterization of a novel bacteriophage Phda1 active against histamine-producing *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, *Journal of Applied Microbiology*, 118, 1541-1550(2015) (査読あり)。

[学会発表](計 12 件)

山木将悟, 川合祐史, 山崎浩司: *Morganella morganii* 溶菌バクテリオファージ FSP1 を利用したマグロ魚肉によるヒスタミン食中毒のリスク低減, 日本食品科学工学会 2017 北海道支部大会, 北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市) (2017,2,20)。

Yamaki Shogo, Yamazaki Koji, Kawai Yuji: Utilization of bacteriophages

for the inhibition of histamine accumulation by histamine-producing bacteria on fishery products, 9th Joint Symposium on Food Science and Technology among NUS, TUMSAT and HU, 北海道大学水産学部 (北海道函館市) (2016,12,2)。

山木将悟, 川合祐史, 山崎浩司: *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* 溶菌ファージ Phda10 株の感染特性を利用したヒスタミン生成抑制, 日本食品科学工学会第 63 回大会, 名城大学 (愛知県名古屋市) (2016,8,27)。

Yamaki Shogo, Kawai Yuji, Yamazaki Koji: Isolation of bacteriophage Phda10 and combined effect of Phda10 and calcium acetate for growth inhibition of histamine-producing *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, The IFT Annual Meeting (Chicago,USA) (2016,7,18)。

Yamazaki Koji, Kuronuma Soya, Yamaki Shogo, Kawai Yuji: Isolation and partial characterization of two bacteriophages MV-1 and MV-4 of histamine-producing *Morganella morganii*, The IFT Annual Meeting (Chicago,USA) (2016,7,17)。

黒沼宗弥, 山木将悟, 久保田光也, 川合祐史, 山崎浩司: ファージカクテルによるヒスタミン産生 *Morganella morganii* の発育抑制, 日本食品科学工学会第 62 回大会, 京都大学 (京都府京都市) (2015,8,29)。

山木将悟, 黒沼宗弥, 川合祐史, 山崎浩司: 広宿主域を示す *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* 溶菌バクテリオファージの探索とその性状, 日本食品科学工学会第 62 回大会, 京都大学 (京都府京都市) (2015,8,29)。

山崎浩司: 微生物由来の抗菌物質を利用した食品微生物制御, 日本食品科学工学会北海道支部大会シンポジウム, ロワジュールホテル (北海道函館市) (2015,2,28)。
Yamazaki Koji: Growth inhibition of food-borne pathogens using biopreservatives of microbial origin in food, The First Myanmar-Japan Symposium, Patheingyi University (Patheingyi, Myanmar) (2014,11,30)。

黒沼宗弥, 山木将悟, 大町拓生, 山崎浩司, 川合祐史: *Morganella morganii* 溶菌性 *Siphoviridae* 科バクテリオファージ MV-1 の性状, 日本食品科学工学会第 61 回大会, 中村学園大学 (福岡県福岡市) (2014,8,30)。

大町拓生, 山木将悟, 黒沼宗弥, 山崎浩司, 川合祐史: *Morganella morganii* 溶菌性バクテリオファージ FSP1 による食品中におけるヒスタミン蓄積抑制, 日本

食品科学工学会第 61 回大会,中村学園大学(福岡県福岡市)(2014,8,30)。

Yamaki Shogo,Omachi Takuo,Kuronuma Souya,Kawai Yuji, Yamazaki Koji: Isolation and characterization of a bacteriophage PhDa1 active against histamine-producing *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, The IFT Annual Meeting, New Orleans, USA (2014.6.23)。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山崎 浩司 (YAMAZAKI Koji)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：40250500