

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02912

研究課題名(和文)「ファージが守る食の安全」に寄与する学術基盤の構築

研究課題名(英文) Establishment of an academic basis contributing to "Food safety by phage "

研究代表者

宮本 敬久 (Miyamoto, Takahisa)

九州大学・農学研究院・教授

研究者番号：70190816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：食中毒細菌の非加熱制御法開発の基礎となる学術的基盤確立を目的とした。種々の食品から、抗生物質耐性菌を含む種々の食中毒細菌に対する溶菌ファージの単離に成功し、その特性を解明した。これらには低温でも溶菌活性を示すものが含まれた。大腸菌一遺伝子欠損株ライブラリーから、野生株に比べファージ感受性の高い遺伝子欠損株を10株同定した。このうちDnaK及びPriAタンパク質に対する機能阻害が報告されているミリスチンおよびクロラムフェニコールは、それぞれファージとの併用は細菌のファージ感受性を高め、耐性菌の再増殖を抑制した。食品添加物EDTAとの併用もファージ感受性向上と耐性菌の生育抑制に有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は以下の点で学術的、社会的な意義がある。海外で流行している食中毒細菌の菌株(遺伝子型や表現型)は、日本で食中毒を起こしている菌株とは異なるため、日本で問題となっている食中毒細菌の菌株に対して有効なファージを日本で分離して実用化する必要がある。今後、チルド流通による加熱殺菌後の高品質な食品のロングライフ化が期待されている。従って、低温保存中にも食中毒細菌を効率的に制御できるファージはチルド流通食品の安全性確保に必要である。ファージ感受性に関与する遺伝子の同定は細菌のファージ耐性化機構の抑制を可能とする学術的基盤となるもので食中毒細菌制御におけるファージ実用化のためには重要である。

研究成果の概要(英文)：Lytic phage against various food-poisoning bacteria including antibiotic-resistant bacteria have been successfully isolated from various foods, and elucidated their characteristics. The phages included the phages showing lytic activity even at low temperatures. From the Escherichia coli single gene-deficient strain library, 10 gene-deficient strains with higher phage sensitivity than wild-type strains were identified. Of these gene-encoded proteins involved in the phage resistance, myristin and chloramphenicol, which have been reported to inhibit the functions of DnaK and PriA proteins, respectively, increased the phage sensitivity of bacteria and suppressed the re-growth of resistant bacteria when used in combination with phages. The combined use with the food additive EDTA at 0.26 to 1.3 mmol/L was also effective in improving phage sensitivity and suppressing the growth of resistant bacteria. These results will contribute to establish methods to control food-poisoning bacteria.

研究分野：食品衛生化学、食品微生物学及び食品保蔵学

キーワード：ファージ ファージ耐性菌 抗生物質耐性菌 EDTA ファージカクテル 最適化 ファージ耐性
関与遺伝子

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌やサルモネラ等の食中毒細菌による健康危害（感染症、食中毒）が絶えず国民に不安を与えている。腸管出血性大腸菌を原因とする食中毒は、飲食チェーン店の食事（サイコロステーキ）や焼き肉、ユッケのような畜肉製品だけでなく、野菜類や総菜類を原因としても発生している。特に小児や高齢者は本菌の産生するベロ毒素の細胞毒性により溶血性尿毒症症候群などを発症して重症化し、死亡することもある。広範な抗生物質に耐性な食中毒細菌の割合も増えてきており（モダンメディア 55 巻 7 号 179 ページ, 2009 年）、感染者の治療において大きな問題となっている。このため抗生物質に依存しない食中毒細菌対策が必要とされている。この解決にファージの利用が期待されており、欧米では食中毒細菌を溶菌するファージについての多くの研究が行われているが、我が国で食中毒細菌を標的にしたファージ研究はほとんど行われていない。また、海外で流行している食中毒細菌の菌株（遺伝子型や表現型）は、日本で食中毒を起こしている菌株とは異なる。このため日本で問題となっている食中毒細菌の菌株に対して有効なファージを日本で分離して研究し、実用化する必要がある。細菌は感染したファージに対して耐性化し、再度、同じファージを感染させても溶菌しないことが知られている。これを克服するために、標的細菌に対して溶菌活性を示す複数種のファージ混合物が製剤として実用化されてきた。また、細菌のファージ耐性化には獲得免疫機構以外にもファージレセプターとなる細菌表層部の構造を変異（相変異）させて耐性化する機構も有り、細菌のファージ耐性化機構の抑制を可能とする学術的基盤が食中毒細菌制御におけるファージ実用化のためには必要である。

2. 研究の目的

食中毒細菌を低温下で効果的に制御できるファージおよび細菌のファージ耐性化を抑制する天然物を併用した食中毒細菌の非加熱制御法開発の基礎となる学術的基盤を確立する。このため、主要な食中毒細菌、抗生物質耐性菌に 4℃という低温でも感染力のある溶菌ファージを単離して活用する点、比較的近縁の異種細菌を同時に溶菌可能なファージ取得を試みる。得られたファージについて、近縁の異種細菌に感染し、複数感染により複製無しに細菌細胞を溶菌できるファージの遺伝情報について調べると共に、ファージ耐性化に関与する遺伝子群を見出して耐性化の機構を理解する。このため、約 4000 株の大腸菌の遺伝子欠損株ライブラリーについてファージ感受性を調べてファージ耐性化に関与する遺伝子を同定し、その耐性化関与遺伝子の機能を阻害してファージ耐性化を抑制する物質を食品成分、安全性の高い食品添加物や天然成分からスクリーニングする。これらの成果を基にして食品におけるファージによる食中毒細菌の効果的な制御方法を構築する計画である。

3. 研究の方法

(1) ファージの分離と同定

種々の生肉試料 50 g と薬剤耐性菌を含む各食中毒細菌の懸濁液 500 μ L を各細菌の増菌培地（1 mM CaCl_2 含有）100 mL と混合し、2 分間ストマッカー処理後、37℃、一晚嫌気培養した。培養液 10 mL を遠心分離（4℃, 12,000 $\times g$, 20 min）後、上清をフィルターろ過（0.22 μ m）してファージ検出液を得た。ホスト菌液をそれぞれ個別に接種した重層培地にファージ検出液を 10 μ L 滴下した後、最適条件で培養し、培地上に生じた透明帯の有無によって溶菌ファージの存在を判断した。透明帯はくりぬいて、常法に従ってファージを精製した。精製ファージについては、溶菌スペクトル及び種々の温度における溶菌活性を調べ、形態観察、ゲノム解析を行った。溶菌活性が高く、低温でも有効なファージを中心に広い溶菌スペクトルを示すファージ

ジの組合せを明らかにした。

(2) ファージ耐性化に関与する遺伝子群の同定とその機能解明

E. coli BW25113 (野生株, WT) および *E. coli* BW25113 単一遺伝子欠損株 3,909 菌株は国立遺伝学研究所から購入した。1 mM CaCl₂ 含有 LB 200 μL を添加した 96 ウェルプレートに、爪楊枝を用いて野生株と欠損株を播種し、37°C で 2 時間振とう培養した。ファージ S127 BCL3 (市販の鶏肝臓より 0157 を宿主として分離されたファージ) 懸濁液 10 μL を添加して 37°C で 48 時間振とう培養し、0, 6, 48 時間目に濁度測定した。48 時間目に野生株と比較して濁度が低かった欠損株について、同様に二次スクリーニングを行った。

(3) 大腸菌のファージ耐性化抑制物質のスクリーニングと阻害機構解明

二次スクリーニングの結果、大腸菌親株よりもファージ感受性の高い計 10 欠損株 ($\Delta ubiE$, $\Delta tolA$, $\Delta yaiW$, $\Delta yfcD$, Δrpe , Δgor , $\Delta priA$, $\Delta tolR$, $\Delta ybcH$, $\Delta dnaK$) を同定した。これらのうち、 $\Delta dnaK$ および $\Delta priA$ について、DnaK の機能を阻害することが報告されているミリスチン、および PriA に対する機能阻害を示すクロラムファンコール、カナマイシンなどについて、ファージとの併用による溶菌活性の増大効果、耐性菌の生育抑制効果を調べた。

(4) ファージと食品添加物の併用効果

ファージと併用することで、耐性菌の生育を抑制する効果を示す食品添加物、天然由来成分について検討した。細菌培養液にファージ及び添加物を添加して培養し、経時的に生菌数の変化を平板培養法にて測定した。

4. 研究成果

(1) 薬剤耐性食中毒菌特異的ファージおよび宿主特異性の広いファージの分離と同定分離した管出血性大腸菌特異的ファージ13株のうち、7株はピペラシリン耐性の大腸菌0157:H7にも強い溶菌活性を示した。また、広範なベータラクタム剤耐性の大腸菌に対しても有効なファージを取得した。得られた *Campylobacter coli* 特異的な溶菌ファージ26株のうち、12株は6剤(セファゾリン、スルファメトキサゾール:トリメトプリム、ミノサイクリン、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、レボフラキサシン)耐性菌にも有効で、24株は5剤(セファゾリン、スルファメトキサゾール:トリメトプリム、ナリジクス酸、シプロフロキサシン、レボフラキサシン)耐性菌を溶菌した。また、さらに、黄色ブドウ球菌特異的な溶菌ファージも29株分離できており、これらは、多剤耐性黄色ブドウ球菌に対しても有効であった。さらにウェルシュ菌標準菌株 JCM 1290^T および分離株を宿主菌とし、市販鶏肉などからウェルシュ菌特異的ファージ14株を分離した。さらに、魚や肉の腐敗で問題となる *Pseudomonas* 属細菌に特異的なファージ13株を単離し、このうちの2株の組合せが溶菌活性も高く、耐性菌の再増殖も抑制されることを示した。分離された腸管出血性大腸菌および過去に分離した *C. jejuni* 特異的溶菌ファージのうち、4°Cの低温でも効果を示すファージ株を見出している。さらに、ウェルシュ菌特異的ファージについて効果の高いファージの組合せの最適化を行い、**図1**に示すように4種のファージで作製したファージカクテルを用いて実際にカレーラー中でのウェルシュ菌溶菌効果を確認した。

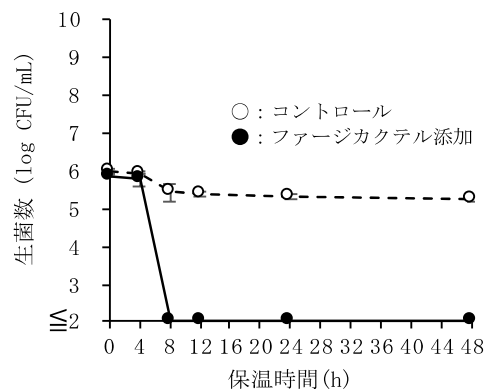


図1. カレーラー中におけるファージカクテルのウェルシュ菌殺菌効果

主要なファージについてはゲノム配列を決定し、GenBankにてデータ公開している。

(2) ファージ耐性化に関与する遺伝子群の同定とその機能解明

試験に用いたファージ S127 BCL3 についてゲノム解析を行った結果、ゲノムサイズは 135,530 bp、ORF は 215、GC 含量は 43.22%であった。さらに電子顕微鏡観察の結果、収縮性の尾部を有したことから、本ファージは *Myoviridae* 科に属することが示された。3,909 種類の大腸菌の一遺伝子欠損株についてファージ S127 BCL3 に対する感受性を 96 ウェルプレートを用いて調べた結果、10 欠損株 ($\Delta ubiE$, $\Delta toIA$, $\Delta yaiW$, $\Delta yfcD$, Δrpe , Δgor , $\Delta priA$, $\Delta toIR$, $\Delta ybcH$, $\Delta dnaK$) が強いファージ感受性を示した。ファージ添加に伴う生菌数の経時変化を調べた結果、野生株にファージを添加した場合と比較して、 Δrpe では培養 12 時間後には 4.7 桁、培養 24 時間後においても生菌数は 2.6 桁低かった。他の 9 菌株においても同様の傾向を示したことから、これらの遺伝子の機能を抑制することによりファージ耐性菌の増殖を抑制できる可能性が示唆された。

(3) 大腸菌のファージ耐性化抑制物質のスクリーニングと阻害機構解明

ファージ感受性の向上した欠損株のうち、まず、DnaK の機能を阻害する効果が高いことが報告されているミリセチン (Myr) を用い

て、ファージとの併用効果を検討した。大腸菌 BW25113 野生株について Myr (終濃度 500 μ M) で処理後、ファージを添加したところ、Myr で 6 h 処理した菌体では Myr 未処理に比べてファージ添加後の生菌数が約 2 log CFU/ml 低かった (図 2)。この結果より、Myr 添加数時間後にファージを添加するとファージ感受性が向上した。

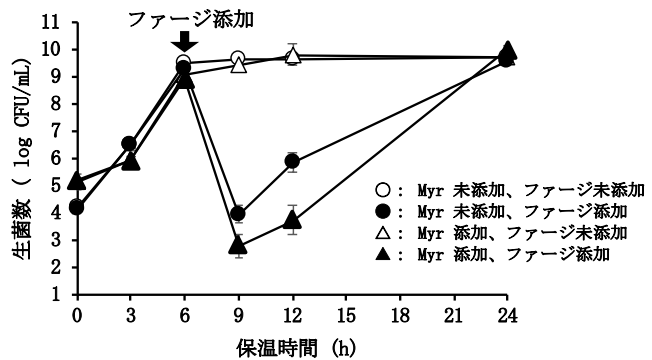


図2. 大腸菌のファージ感受性に対するミリセチンの前処理効果

ミリセチン処理は、サルモネラにおいても同様の効果を示した。

次に、遺伝子産物 PriA の機能阻害の可能性が報告されている物質 (クロラムフェニコール、カナマイシン、ケンフェロール) とファージとの併用が大腸菌のファージ感受性および耐性化に与える影響を調べた。その結果、単独では抗菌作用を示さない濃度でクロラムフェニコール、カナマイシン、ケンフェロールとファージとの併用は大腸菌のファージ感受性を高め、ファージ耐性菌の増殖を抑制する事が示唆された。特にクロラムフェニコール処理では、ファージ単独処理と比較して耐性菌増殖抑制効果が認められた (図 3)。

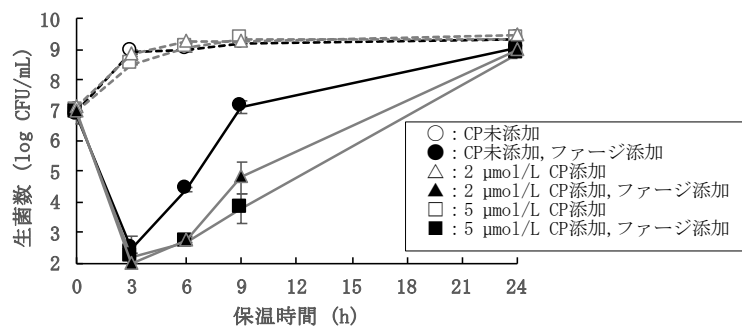


図3. 大腸菌のファージ感受性に対するクロラムフェニコール (CP) の効果

(4) ファージと食品添加物の併用効果

種々の食品添加物とファージを同時に添加して調べた結果、0.67~1.3mmol/L EDTA を併用すると、ファージ殺菌後に生残したカンピロバクター (図4) およびサルモネラ (図5) の再増殖が抑制される事が示された。

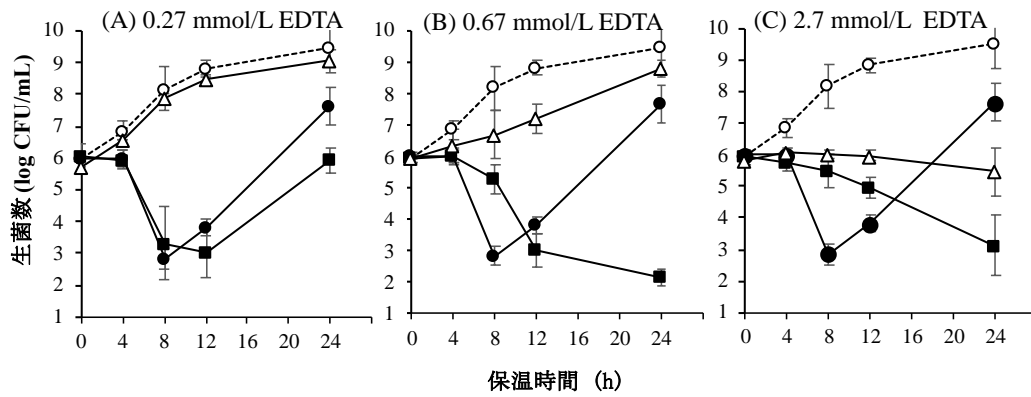


図4. *C. jejuni* に対するファージとEDTAの併用効果

図4. *C. jejuni* に対するファージとEDTAの併用効果

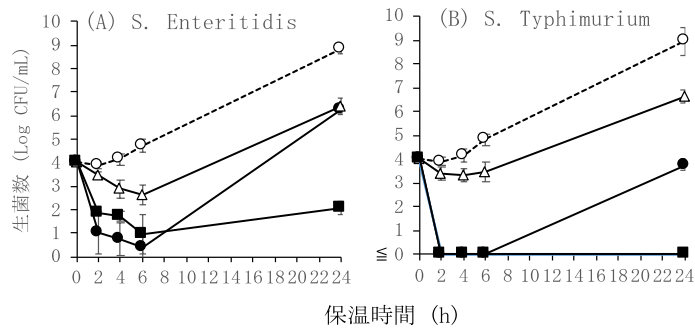


図5. サルモネラ属菌に対するファージとEDTAの併用効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Huang Hung-Hsin, Furuta Munenori, Nasu Takayuki, Hirono Miku, Pruet Jaroenkolkkit, Duc Hoang Minh, Zhang Yu, Masuda Yoshimitsu, Honjoh Ken-ichi, Miyamoto Takahisa	4. 巻 100
2. 論文標題 Inhibition of phage-resistant bacterial pathogen re-growth with the combined use of bacteriophages and EDTA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 103853 ~ 103853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fm.2021.103853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhang Yu, Shigemura Kumiko, Duc Hoang Minh, Shen Cunkuan, Huang Hung-Hsin, Sato Jun, Masuda Yoshimitsu, Honjoh Ken-ichi, Miyamoto Takahisa	4. 巻 134
2. 論文標題 Effects of bacteriophage on inhibition and removal of mixed biofilm of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and O91:H-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 LWT	6. 最初と最後の頁 109945 ~ 109945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lwt.2020.109945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhang Yu, Huang Hung-Hsin, Duc Hoang Minh, Masuda Yoshimitsu, Honjoh Ken-ichi, Miyamoto Takahisa	4. 巻 98
2. 論文標題 Endolysin LysSTG2: Characterization and application to control Salmonella Typhimurium biofilm alone and in combination with slightly acidic hypochlorous water	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Food Microbiology	6. 最初と最後の頁 103791 ~ 103791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fm.2021.103791	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件／うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Tahir Noor Mohammadi, Yuncheng Li, Cunkuan Shen, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto,
2. 発表標題 Application of the bacteriophage cocktails to control Clostridium perfringens in food,
3. 学会等名 (公社)日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Su Zar Chi Lwin, Miku Hirono, Takayuki Nasu, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 Study on Bacteriophage for Controlling Campylobacter jejuni,
3. 学会等名 (公社) 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村山友香, 益田時光, 本城賢一, 宮本敬久
2. 発表標題 PriAの機能阻害に基づく大腸菌バクテリオファージ耐性菌集団の制御に関する研究
3. 学会等名 (公社) 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菅本晃子, 古田宗宜, 奈須敬之, Hoang Minh Duc, Jaroenkolkkit Pruet, 廣野未来, Huang Hung Hsin, 益田時光, 本城賢一, 宮本敬久
2. 発表標題 食中毒細菌特異的溶菌ファージの利用に関する研究
3. 学会等名 (公社) 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 城野大輔, 益田時光, 本城賢一, 宮本敬久
2. 発表標題 新規Pseudomonas溶菌ファージの食品からの分離とその特性解析
3. 学会等名 (公社) 日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Zhang, Hung-Hsin Huang, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 The characterization of endolysin LysSTG2 and its antibacterial activity against Gram-negative bacteria
3. 学会等名 (公社)日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Phyo Htet Htet Kyaw, Tomoka Murayama, Shota Tanaka, Koshiro Futada, Jun Sato, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 Study on control of bacteriophage-resistant bacterial populations
3. 学会等名 (公社)日本食品科学工学会第68回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hung-Hsin Huang, Yu Zhang, Nanami Asoshima, Hoang Minh Duc, Jun Sato, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh & Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 Characterization and utilization of phages specific to campylobacter coli,
3. 学会等名 WORLD MICROBE FORUM, 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Phyo Htet Htet Kyaw, Tomoka Murayama, Shota Tanaka, Koshiro Futada, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 Effect of myricetin on the phage susceptibility and gene expression of Escherichia coli
3. 学会等名 WORLD MICROBE FORUM, 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Su Zar Chi Lwin, Miku Hirono, Takayuki Nasu, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 Genetic characterization of Campylobacter jejuni phages and biocontrol of C. jejuni using the phages and EDTA
3. 学会等名 WORLD MICROBE FORUM, 2021. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tahir Noor Mohammadi, Cunkuan Shen, Yuncheng Li, Mahmoud Gamaleldin Zayda, Jun Sato, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 Effectiveness of isolated and characterized phages in reducing Clostridium perfringens in food
3. 学会等名 WORLD MICROBE FORUM, 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Zhang, Hung-Hsin Huang, Hoang Minh Duc, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 A novel bacteriophage endolysin Lysstg2 with high antibacterial and antibiofilm activity against Salmonella Typhimurium and Pseudomonas on various food and food contact surfaces,
3. 学会等名 WORLD MICROBE FORUM, 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Zhang, Minh Duc Hoang, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 Effects of Bacteriophage on Inhibition and Removal of Multispecies Biofilms of Escherichia coli O157 and Non-O157
3. 学会等名 ASM Microbe 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hung-Hsin Huang, Nanami Asoshima, Hoang Min Duc, Jun Sato, Yu Zhang, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 Characterization and Utilization of Phages Specific to Campylobacter Coli
3. 学会等名 ASM Microbe 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古田宗宜、本城賢一、宮本敬久
2. 発表標題 販鶏肉類からの Campylobacter coli 特異的溶菌ファージの分離
3. 学会等名 第40回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二田昂志郎、田中翔大、益田 時光、本城 賢一、宮本 敬久
2. 発表標題 大腸菌におけるバクテリオファージ耐性化機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度西日本・中四国支部合同沖縄大会、
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣野未来、古田宗宜、奈須敬之、Hoang Minh Duc、Jaroenkolkkit Pruet、益田時光、本城賢一、宮本敬久
2. 発表標題 溶菌ファージおよび食品添加物によるCampylobacterの制御
3. 学会等名 日本防菌防黴学会第46回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Minh Duc Hoang, Minh Son Hoang, Yoshimitsu Masuda, Ken-ichi Honjoh, Takahisa Miyamoto
2. 発表標題 Biocontrol of Staphylococcus aureus planktonic and biofilm cells using lytic bacteriophage
3. 学会等名 FEMS 2019 8th Congress of European Microbiologists (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 バイオフィルムの除去方法及び除去キット	発明者 宮本敬久	権利者 九州大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-126753	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	本城 賢一 (Honjoh Ken-ichi) (00264101)	九州大学・農学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	益田 時光 (Masuda Yoshimitsu) (90778060)	九州大学・農学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ベルギー	University of Liege		
オーストラリア	University of New South Wales		