

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07931

研究課題名(和文) ヒスタミンを生成するモルガネラ・サイクロトレランスの動態解明とファージによる制御

研究課題名(英文) Growth characterization of histamine producing *Morganella psychrotolerans* and bacteriophage therapy in seafood

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低温増殖性の *Morganella psychrotolerans* (Mp) の食品汚染状況を調べ、本菌に感染する新規溶菌性バクテリオファージ(ファージ)を分離し、その感染特性とファージを利用した新規微生物制御法について検討した。Mpは国内流通の水産食品を高頻度で汚染していた。Mpに感染するファージの分離に成功し、特にMPV5株は魚肉に接種すると保存中のMpの発育とヒスタミン蓄積を抑制した。さらに酢酸ナトリウムとの併用によってその効果は強くなった。したがって、水産食品におけるMpによるヒスタミン食中毒予防にファージMPV5を利用したファージセラピーが有効であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒスタミンによる食中毒は日本だけでなく、水産物取扱いの衛生状態が良くない欧米でも頻発している。本研究では低温増殖性の *M. psychrotolerans* がヒスタミン中毒を視点に入れた場合の新しい制御対象細菌であることを示し、またヒスタミン中毒を予防するための手法としてバクテリオファージを利用した新しい微生物制御法の有効性を示した。したがって、水産食品の食品安全性を向上させる技術開発のための基礎的知見として貢献度は大きい。

研究成果の概要(英文)：This study was investigated the contamination status of *Morganella psychrotolerans* in detail seafood product in Japan, and the characterization and utilization of a newly isolated bacteriophage, MPV5, for preventing the growth and histamine accumulation. *M. psychrotolerans* was widely distributed in retail seafood product. An effective bacteriophage, MPV5, was successfully isolated from river water in this study. The viable count and histamine accumulation of *M. psychrotolerans* inhibited in broth and tuna meat by the phage MPV5 treatment. The combined treatment of MPV5 and sodium acetate enhanced to prevent the growth and histamine accumulation in tuna meat. These results suggest that phage treatment with MPV5 could be an effective biocontrol method to prevent the histamine poisoning by *M. psychrotolerans* in seafood.

研究分野：食品微生物学

キーワード：ヒスタミン食中毒 *Morganella* 水産食品 バクテリオファージ ヒスタミン 微生物制御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒスタミン食中毒は、魚介類の不適切な温度管理によって増殖した腸内細菌科の *Morganella morganii* (モルガン菌) や海洋細菌の *Photobacterium phosphoreum* などが産生するヒスチジン脱炭酸酵素の作用によって遊離ヒスチジンがヒスタミンに変換され、このヒスタミンが蓄積した食品の喫食により発症する。しかし、モルガン菌と *M. psychrotolerans* の一般性状は極めて類似しているため、培養法に依存した従来の同定法ではモルガン菌と *M. psychrotolerans* を見誤っている可能性が強く疑われる。したがって、*M. psychrotolerans* の水産食品の低温保存時に見られる汚染量、発育動態とヒスタミン蓄積との因果関係を明確にし、さらに低温環境下においても有効な溶菌性バクテリオファージ (ファージ) を利用した新しい発育制御法の確立は *M. psychrotolerans* によるヒスタミン食中毒の発生リスクを低減するために必要と考えた。

### 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、新たに新種として登録された 2°C でも増殖可能なヒスタミン生成菌である *M. psychrotolerans* の水産物における汚染量と発育動態およびヒスタミン産生量を調べ、水産食品でのリスクの有無を評価する。さらに、*M. psychrotolerans* に感染するファージを新たに探索・分離し、このファージの性質と分離ファージを利用した水産食品でのファージ療法による *M. psychrotolerans* の制御法の構築とその有効性を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 供試検体と検体原液の調製

北海道内で購入した食品 185 検体、および河川水 7 検体、海水 2 検体の 194 検体を供試した。供試検体は無菌的に 10g (または 10ml) 採取し、9 倍量のリン酸緩衝液 (pH7.2) を加え、ストマッカーで混合したものを試料原液とした。

#### (2) *M. psychrotolerans* の MPN-PCR 法による検出と定量

検体中の *M. psychrotolerans* 検出および定量は、3 本法の MPN 法と PCR 法を組み合わせで行った。すなわち、培地には *Morganella* enrichment (MoE) 培地 (Tryptone 10g, 酵母エキス 5g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  7g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g, L-ヒスチジン塩酸塩・ $\text{H}_2\text{O}$  10g, コリスチン硫酸塩 32mg, 蒸留水 1,000ml, pH6.5) にプロモクレゾールパーブを 0.003% となるよう加え pH を調整した改変 MoE 培地 (pH5.1) を使用した。まず、常法に従い試料原液 10ml, 1ml, 0.1ml を改変 MoE 培地に接種し、12、7 日間培養した。pH 上昇により変色の見られた試験管から培養液を 1ml 採取し、集菌洗浄 (10,000xg, 2 分) 後、菌体に TritonX-100 400 $\mu$ l を加え、99、10 分間加熱して DNA を抽出した。*M. psychrotolerans* の検出は、VI 型分泌機構をコードする VasD 遺伝子に特異的なプライマーである VasD-F4 (AAA TCG CCA TCA CAC TCC TTG) と VasD-R4 (TTC AAA ACG GGA GTC CTC ACT G) を用い、Emerald Amp Max PCR Master mix (Takara) 12.5 $\mu$ l, 各プライマー (5pmol/l) 1 $\mu$ l, DNA テンプレート 2 $\mu$ l および滅菌蒸留水 8.5 $\mu$ l を混合し、PCR 反応を行った。PCR 反応は、95、4 分の熱変性後、30 サイクル (95、30 秒-62、30 秒-72、30 秒、最終伸長のみ 4 分) とした。PCR 産物は、1.5% アガロースゲルで電気泳動した後、臭化エチジウム染色によって確認した。この PCR 法での陽性菅数から、試料 100g (または 100ml) 当たりの MPN 値を算出した。

#### (3) 分離菌株の増殖挙動とヒスタミン生成量の測定

*M. psychrotolerans* JCM 16473<sup>T</sup> および分離菌 37 株または *P. phosphoreum* NBRC103031<sup>T</sup> の希釈培養液 0.1ml を 0.1% NaCl とした改変 TSBH (pH6.0) 9.9ml に接種した (初発菌数: 10<sup>3</sup>CFU/ml)。これを、4 で静置培養し、経日的に試料を採取して生菌数とヒスタミン量を測定した。また、2.0% NaCl とした改変 TSBH (pH6.0) においても同様の実験を行った。生菌数測定は、表面塗抹法で行い、培養は *Morganella* では Tryptic soy agar (TSA) で 25、48 時間、*Photobacterium* では 2% NaCl 添加 TSA で 20、48 時間とした。また、ヒスタミン量は、チェックカラーヒスタミンを用いて定量した。

#### (4) *M. psychrotolerans* 溶菌性ファージの分離

400 $\mu$ g/ml  $\text{CaCl}_2$  および 400 $\mu$ g/ml  $\text{MgSO}_4$  を添加した TSB に食品または河川水の検体を等量加え、これに宿主の新鮮培養菌液を接種し、25、6 時間培養した。この培養液 10ml を採取し、遠心分離 (6,000xg, 20 分) 後、上清を孔径 0.45 $\mu$ m のメンブレンフィルターで濾過し、試料液とした。次に、重層寒天平板を用いたスポットテストでファージの存在を確認した。すなわち、スポットテストは、0.5% 軟寒天に宿主の新鮮培養菌液 100 $\mu$ l を加え、TSA 平板に重層後、室温で固化させて重層寒天平板を作成した。これに、試料液 10-20 $\mu$ l を滴下し、25、24 時間培養後、ファージの感染によって形成する宿主細菌の透明帯 (プラーク) を確認した。プラーク形成の見られた試料溶液は SM 緩衝液で希釈し、同様な重層寒天平板法を繰り返して行った。単一のプラークを採取して SM 緩衝液に懸濁し、これを遠心分離 (10,000xg, 2 分) した上清を濾過滅菌したものをファージ溶液として使用した。

#### (5) 分離ファージの溶菌スペクトル分析

上述のプラークアッセイ法で分離したファージのうち、プラークの透明度の高い(溶菌力が強い)ものを、3回以上純粋分離し、*Morganella* 属細菌および *M. psychrotolerans* 分離株を含むグラム陰性菌および陽性菌に対する溶菌スペクトル分析に供した。スペクトル分析は、0.5%軟寒天に各供試菌株の新鮮培養菌体と分離ファージを加え、TSA 平板に重層後、固化させ、各供試菌株の最適発育温度で 24 時間培養し、プラーク形成の有無とその透明度から評価した。

#### (6) ファージの精製と形態観察

ファージ MPV5 の精製は、CsCl 密度勾配遠心法によって行った。また、MPV5 の形態観察は、精製 MPV5 を透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察した。すなわち、MPV5 懸濁液を炭素被膜グリッドに載せ、室温に放置してグリッドに吸着させた後、2.5%酢酸サマリウム(III)で 1 秒間ネガティブ染色した。これを、TEM (JEM-1011, 日本電子) で観察し、ファージの形態から科を同定した。

#### (7) ファージ MPV5 の耐熱性、耐塩性、pH 安定性、温度耐性試験

TSB 培地を各温度 (40~70 ) に予備保温し、これに MPV5 株を  $1 \times 10^7$  PFU/ml となるよう接種し、経時的に試料を取り出し、急冷後、プラークアッセイに供し、プラーク形成数から耐熱性を評価した。耐 pH 性は、pH3-12 に調整した TSB 培地に MPV5 株を同様接種し、25 , 24 時間保持後、プラークアッセイを行い、評価した。また、耐塩性は、0-3.0M NaCl となるよう調製した TSB 培地を使用して、耐 pH 性試験と同様の条件で行った。さらに、同様の条件で、4 , -20 , および -45 で 4 週間保持した場合のファージ安定性についても調べた。なお、-20 および -45 の凍結試料では 20 , 30 分間の解凍処理後のプラーク形成数を測定し、評価した。

#### (8) ファージ MPV5 株の一段増殖実験

MPV5 株の増殖サイクルは、一段増殖実験によって評価した。すなわち、TSB に *M. psychrotolerans* JCM16473<sup>T</sup> の新鮮培養菌体を  $1 \times 10^6$  CFU/ml となるように接種し、25 で培養した。OD<sub>660nm</sub> が 0.1 に達した時 (約  $1 \times 10^7$  CFU/ml), MPV5 株を  $1 \times 10^6$  PFU/ml となるように接種し、25 , 5 分間保持してファージを菌体に吸着させた。これを、遠心分離 (10,000g, 2 分間) 後、遊離ファージを含む上清を除去し、ペレットを TSB10ml に再懸濁した。これを 25 で培養し 30 分毎に溶液を採取してプラークアッセイによりプラーク形成数を測定した。得られたプラーク形成数から一段増殖曲線を作成し、潜伏期、上昇期およびバーストサイズを算出した。

#### (9) 培地におけるファージ MPV5 株の *M. psychrotolerans* 発育およびヒスタミン蓄積抑制試験

0.1%NaCl に調整したヒスチジンプロス (pH6.0) に *M. psychrotolerans* JCM 16473<sup>T</sup> の新鮮培養菌体を  $10^3$  CFU/ml となるように接種後、ファージ MPV5 株を  $10^7$  PFU/ml となるように接種した。これを 4 で保持し、経時的に *M. psychrotolerans* 数とヒスタミン量を測定した。

#### (10) ファージ MPV5 の発育抑制効果を増強する物質の探索

有機酸塩(酢酸ナトリウム, 酢酸マグネシウム, 乳酸ナトリウム)を所定の濃度で添加した TSB 培地に *M. psychrotolerans* の新鮮培養菌体を  $1 \times 10^5$  CFU/ml (または  $10^3$  CFU/ml) となるように接種後、ファージ MPV5 株を  $1 \times 10^7$  PFU/ml となるよう接種し 25 で培養した。経時的に試料を取り出し、平板塗抹法によって *M. psychrotolerans* を測定した。得られた生菌数の挙動から併用効果の有無を評価した。また、その他の併用に有効な物質の探索は、各種抗菌物質 (有機酸塩 10 種類, 精油成分 6 種類, グリシン, ポリリジン, 緑茶成分, 食品用乳化剤, 食品保存料 2 種類) を *M. psychrotolerans* に対する最小発育阻止濃度を上限として設定した濃度を含有した TSB 培地に *M. psychrotolerans* の新鮮培養菌体を  $4 \times 10^5$  CFU/ml となるように接種後、ファージ MPV5 株を  $4 \times 10^7$  PFU/ml となるよう接種したものを 25 で培養した。経時的に OD<sub>595nm</sub> を測定し、*M. psychrotolerans* の発育挙動から併用効果のあるものを評価した。なお、実験方法 (8) と同様な方法でファージの吸着や安定性、バーストサイズに及ぼす酢酸ナトリウムの影響も調べた。

#### (11) 食品におけるファージ MPV5 による *M. psychrotolerans* の発育抑制効果の検証

市販の食塩不使用水煮マグロ肉フレーク 75g に酢酸ナトリウム (25mM または 50mM) と *M. psychrotolerans* JCM 16473<sup>T</sup> の新鮮培養菌体を  $10^6$  CFU/g となるよう接種し、これにファージ MPV5 株を  $10^7$  PFU/g となるように接種した。これを 20 で保存し、経時的に試料の一部を取り出し、生菌数測定とヒスタミン量を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 食品における *M. psychrotolerans* の汚染率

全試料 192 検体中 85 検体で MPN-PCR 陽性なり、汚染率 44.3%と評価された。したがって、国内で市販されている水産食品が高い頻度で *M. psychrotolerans* の汚染を受けていることが明らかになった。また、この汚染について魚種、産地、購入地域で比較したが、明瞭な差は見られなかった。よって *M. psychrotolerans* による汚染は広範囲にわたる可能性が強く示唆された。

## (2) *M. psychrotolerans* 分離株のヒスタミン生成量

MPN-PCR 法で陽性となった検体から *M. psychrotolerans* の分離を試み合計 37 株の分離菌株を得た。これら 37 菌株のヒスタミン産生能を調べたところ、いずれの菌株でも 25℃, 48 時間後のヒスタミン生成量が 4,000mg/l を超え、強力なヒスタミン産生菌として認められた。さらに、ヒスタミン産生菌として著名な *M. morgani* と *P. phosphoreum* のヒスタミン産生量と比較したところ、*M. psychrotolerans* のヒスタミン産生量はこれら 2 菌種の場合とほぼ同等であったことから、*M. psychrotolerans* も極めて重要なヒスタミン産生菌であることが明らかになった。

## (3) *M. psychrotolerans* 感染ファージの分離と溶菌スペクトル

分離した 37 菌株と標準菌株の *M. psychrotolerans* を宿主細胞とし、食品および環境中から *M. psychrotolerans* に感染する溶菌性バクテリオファージの分離を試み、146 検体から 114 株のバクテリオファージの分離に成功し、この中から *M. psychrotolerans* の基準株に対し透明度の高いプラークを形成（溶菌力の強いファージ）する 6 株（MPV1-MPV6 株）を選抜した。次に、これら選抜したバクテリオファージ 6 株の溶菌スペクトルを調べた結果、MPV5 株が最も溶菌スペクトルを示すことが明らかになった。

## (4) *M. psychrotolerans* 溶菌性ファージ MPV5 株の性質

MPV5 株を CsCl 密度勾配超遠心分離法によって精製し、TEM による形態学的な観察を行ったところ *Caudovirales* 目 *Myoviridae* 科のバクテリオファージと同定された。次に、このファージの一段増殖曲線の結果から、MPV5 株の感染様式は、潜伏期 90 分、上昇期 120 分、バーストサイズ 1,023 PFU/infected cell であることが明らかになった。さらに、MPV5 株は 40℃, 30 分間の加熱に安定であり、また、pH5~10 では 24 時間後でも安定であった。耐塩性は 1.0M NaCl、低温耐性は 4℃ 保存で 4 週間にわたって安定であった。しかし、-20℃ で凍結保存すると感染効率が悪くなることが判明した。したがって、MPV5 株の保存は冷蔵保存が適していると結論した。

MPV5 株の *M. psychrotolerans* 細胞への吸着特性を調べた結果、温度の低下とともに MPV5 株の吸着率がわずかに低下すること、pH5~8 での吸着速度には変化はないが、pH9 では吸着速度が低下すること、また、NaCl 濃度の上昇によって吸着速度が低下することが明らかになった。さらに、MPV5 株の宿主細胞への吸着に 2 価カチオン ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) の影響のないことも明らかになった。

## (5) ファージ MPV5 株による *M. psychrotolerans* の発育抑制

液体培地において *M. psychrotolerans* の発育に及ぼす MPV5 株の影響を調べた結果、MPV5 株の接種によって *M. psychrotolerans* の発育は抑制され、またヒスタミンの蓄積も大きく抑制された。したがって、*M. psychrotolerans* によるヒスタミン蓄積を初めて示された。

## (6) ファージ MPV5 の発育抑制効果を増強する物質の探索とその有効性

ファージ MPV-5 株の抗菌力を増強する物質（有機酸塩）の探索を行った。その結果、MPV-5 株と 25mM 酢酸ナトリウムとの併用によって *M. psychrotolerans* によるヒスタミンの蓄積が効果的に抑制できることが見出された。また、この酢酸ナトリウムの併用によって、ファージの吸着や安定性、バーストサイズに大きな変化はなかった。しかし、ファージと酢酸ナトリウムの併用効果は、*M. psychrotolerans* の初発菌数が少ない場合に優れた効果が発揮されることも明らかになったことから、ファージ処理の効果を最大に引き出すには、*M. psychrotolerans* の初発菌数を少なくすることが重要であると示唆された。さらに、酢酸ナトリウム以外の MPV-5 株との併用に有効な抗菌物質の検索も行い、MPV-5 株 ( $1 \times 10^7$  PFU/ml) とポリリジン (250 $\mu$ g/ml) の併用も有効である可能性を初めて見出した。

## (7) 食品におけるファージ MPV5 による *M. psychrotolerans* の発育抑制効果

実際の食品でのファージと酢酸ナトリウムの併用効果を調べるため、マグロフレークに人為的にファージ MPV-5 株と酢酸ナトリウムを添加し調べたところ、25mM 酢酸ナトリウムを併用した試料では、20℃ 保存で 48 時間後においてもファージを単独で接種した試料と比較して、*M. psychrotolerans* の発育が抑制され、ヒスタミンの蓄積もほとんど起こらなかった。

したがって、本研究で新規に分離したファージ MPV-5 株は水産食品における *M. psychrotolerans* によるヒスタミン蓄積抑制に有効なファージであること証明され、また、酢酸ナトリウムの併用によって長期間にわたってヒスタミンの蓄積抑制が続くことから、ファージと他の抗菌物質を組み合わせによって、従来にない新しいヒスタミン蓄積抑制法となり得ることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang Di, Yamaki Shogo, Kawai Yuji, Yamazaki Koji	4. 巻 77
2. 論文標題 Histamine production behaviors of a psychrotolerant histamine-producer, <i>Morganella psychrotolerans</i> , at various environmental conditions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Microbiology	6. 最初と最後の頁 460-467
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00284-019-01853-y	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 -

1. 著者名 Wang Di, Yamaki Shogo, Kawai Yuji, Yamazaki Koji	4. 巻 126
2. 論文標題 Sanitizing efficacy and antimicrobial mechanism of peracetic acid against histamine producing bacterium, <i>Morganella psychrotolerans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 LWT-Food Science and Technology	6. 最初と最後の頁 No. 109263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lwt.2020.109263	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Di Wang, Shogo Yamaki, Yuji Kawai, Koji Yamazaki
2. 発表標題 Histamine production of <i>Morganella psychrotolerans</i> and antibacterial effect of peracetic acid to bacterial cells
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井友輔, 山木将悟, 川合祐史, 山崎浩司
2. 発表標題 バクテリオファージと有機酸塩を利用したヒスタミン産生菌 <i>Morganella psychrotolerans</i> の発育抑制
3. 学会等名 日本食品科学工学会第66回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山木将悟, 加藤莉子, 川合祐史, 山崎浩司
2. 発表標題 Morganelia psychrotoleransに感染するバクテリオファージの分離と性状
3. 学会等名 日本食品科学工学会第65回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Di Wang, Shogo Yamaki, Riko Kato, Yuji Kawai, Koji Yamazaki
2. 発表標題 Growth behavior and control of Morganelia psychrotolerans related to scombroid food poisoning in seafood
3. 学会等名 The 8th Academic Exchange for Collaborative Research Between ETHZ and Hokkaido University (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Di Wang, Shogo Yamaki, Yuji Kawai, Koji Yamazaki
2. 発表標題 Effects of environmental factors on histamine production in psychrotolerant Morganelia psychrotolerans
3. 学会等名 平成30年日本食品科学工学会北海道支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤莉子, 王 迪, 山木将悟, 川合祐史, 山崎浩司
2. 発表標題 低温性ヒスタミン生成菌Morganelia psychrotoleransの水産食品における分布と発育挙動
3. 学会等名 第38回日本食品微生物学会学術総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----