シリーズ特集「損傷菌」

解 説

水産物における損傷菌の発生と対策

山崎浩司¹, 竹内勘太郎², 山崎耀平², 美野さやか²,
笠井久会², 澤辺桃子³, 澤辺智雄^{2*}, 里見正隆⁴

¹ 北海道大学大学院水産科学研究院水産食品科学分野

² 北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物工学分野

³ 函館短期大学食物栄養学科

⁴ 水産研究・教育機構中央水産研究所水産物応用開発研究センター衛生管理グループ

Occurrence and Prevention of Injured Bacterial Cells in Fisheries

Koji Yamazaki¹, Kantaro Takeuchi², Yohei Yamazaki², Sayaka Mino²,
Hisae Kasai², Toko Sawabe³, Tomoo Sawabe^{2*} and Masataka Satomi⁴

¹ Laboratory of Marine Food Science, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University,
3-1-1, Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611

² Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University,
3-1-1, Minato, Hakodate, Hokkaido 041-8611

³ Department of Food Nutrition, Hakodate Junior College Hakodate, Hokkaido 042-0955

⁴ National Research Institute of Fisheries Science, Japan Fisheries Research and
Education Agency, Fukuura 2-12-4 Kanagawa 236-8648

The control of food poisoning associated with fish and fish products is challenging, even in the developed world. Injured cells of bacterial pathogens, generated by various stressors during food processing, are considered to be an important risk factor in food poisoning incidents. It is important to accumulate more knowledge on the physiology, genetics, and molecular biology of injured bacterial cells related to fish and fish products, and also to apply this knowledge to the development of new technologies. Here, we introduce recent advances in the physiology and genetics of *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* and discuss future directions of the risk control of pathogens in fisheries. (Accepted Nov. 17, 2017)

Keywords : fishery products, injured cells, stress, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*

キーワード : 水産物, 損傷菌, ストレス, 腸炎ビブリオ, リステリア

1. はじめに

細菌は環境変化に伴う様々なストレスに日常的にさらされており, その強度や暴露時間に依存して細胞の生理状態を変化させストレスに対処している¹⁾. ストレスを受けた細胞は様々な損傷度を取り, 条件次第で生存性を回復する亜致死性損傷菌(損傷菌), 回復不能な致死性損傷菌(死細胞), その後の増殖はほとんど影響を受けない非致死性損傷菌に大別される²⁾. また, 生きているが培養できない状態(viable but non-culturable: VBNC)の細胞の存在も知られている. 栄養の欠乏, 低温, 高圧, pHや塩分濃度の急激な変化などによるストレスによりVBNC状態への細胞生理

反応が開始され, 細胞の形態変化やタンパク質・膜脂質・核酸などの生体高分子の濃度や構造の変化が生じ, 平板培地や液体培地での増殖能が観察されなくなる³⁾. これは, *Escherichia coli*や*Vibrio cholerae*を低栄養・低温下で培養し続けた時に初めて観察された現象である⁴⁾. 現在では多くのグラム陰性従属栄養細菌やグラム陽性芽胞非形成性細菌でも同様の状態に陥ることから, VBNC状態への移行は細菌の一般的な環境適応戦略として認識されている³⁾. また, これは遺伝的に制御されていることも示唆されている³⁾. このような生理状態の細菌は, 既存の検出法では十分に検出されないことから, 食品において潜在的な病原性リスクとなるため, 食品微生物学上, 特性を知ることは極め

¹ 〒041-8611 北海道函館市港町 3-1-1, ² 〒041-8611 北海道函館市港町 3-1-1, ³ 〒042-0955 北海道函館市高丘町 52-1

⁴ 〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦 2-12-4

*連絡先 (Corresponding author), sawabe@fish.hokudai.ac.jp

て重要である³⁾。

我が国では、水産物の生食習慣が伝統的な食文化の一つであるが、腸炎ビブリオを原因とした大規模な食中毒事故の苦い経験から食品衛生行政主導のもと安全な水産物を流通できる体制を構築してきた⁵⁾。しかし、水産物を原因とした旧来から知られる食中毒は未だ完全に抑止されていない。したがって、食中毒の発生に繋がる可能性が示唆される損傷菌のような潜在的リスクを完全に取り除くための知見の集積と新しい制御技術の開発は必要である。また、水産物の生産・加工・消費の動向は時代とともに大きく変化するため、衛生的に付加価値の高い水産物供給システムの開発、燻煙品や魚卵加工品などの水産加工食品における新興食中毒菌（リステリアなど）による汚染、ヒスタミン生成菌による水産物汚染の深刻化、そして水産物輸出拡大や国際的巨イベント開催に伴うより高度な水産物の安全性保証など、損傷菌の制御を考慮すべき課題が山積している。例えば、①漁港・食品加工場で問題となる病原性ビブリオや大腸菌などの食中毒菌に各種殺菌・静菌処理を行い、生じた損傷菌の特性を明らかにし、これらの細菌についての制御法を確立すること、②水産物の漁獲から加工後までを通してどの過程でどの様な損傷菌が存在し、それらは危害因子と成り得るのかを明らかにすること、③損傷に対する細菌側の生理応答および損傷回復過程における生理応答を理解すること、はより安全性の高い食品の製造・流通するための方策を構築する上で意義深い。本稿では、これらの問いに答えるための一助として、水産物の危害要因として古くから知られる腸炎ビブリオと近年新たに注視されているリステリアの損傷菌研究の最新知見を取り上げ、損傷菌の特性を加味した次世代の水産物の安全確保について考える。なお、漁港の衛生管理⁶⁾やヒスタミン制御⁷⁾に関しては優れた研究報告があるので、参照されたい。

2. 損傷菌が生じる低容量ストレス下における 腸炎ビブリオの遺伝子発現応答

Vibrio cholerae, *Vibrio vulnificus* および *Vibrio parahaemolyticus* はヒトへの病原性が知られる三大ビブリオ種であるため、VBNC 状態への移行と回復、および回復株の病原性保持などの観点から、損傷菌や VBNC 状態の細胞の生理応答に関する多くの知見がある³⁾。低温や低栄養など物理化学環境に加え、殺菌剤や抗生物質などの化学物質は、損傷菌や VBNC 状態を誘導するストレスとして報告されている。*V. cholerae* ではストレス応答に対する遺伝子発現解析がいち早く取り入れられ、低温ストレスにより VBNC 状態に移行した *V. cholerae* では、鉄 (III) ABC トランスポーター、DNA ポリメラーゼ II、鞭毛タンパク質をコードする遺伝子などが高発現することが観察されている⁸⁾。また、*V. cholerae* は、ヒト株化細胞と共培養することにより、VBNC 状態から回復することが観察されてい

る⁹⁾。*V. cholerae* 以外の種においても、*V. vulnificus* は低温ストレス下では細胞のカタラーゼ活性が下がること¹⁰⁾、や *V. parahaemolyticus* も低温 (4℃) で、1 カ月前後で VBNC 状態へと移行すること¹¹⁾、VBNC 状態では脂肪酸、リン脂質および DNA 代謝に関わる遺伝子が上方発現し、アミノ酸合成、タンパク質合成、エネルギー代謝などに関わる遺伝子が下方発現すること¹²⁾、が報告されている。また、*V. parahaemolyticus* は、凍結すると損傷菌が生じることも知られている¹³⁾。しかしながら、*V. parahaemolyticus* においては、損傷菌や VBNC 状態への移行時、また回復時における生理応答メカニズムは未知の部分が多く、かつ RNA シークエンステクノロジー (RNA-Seq) 等を用いた網羅的遺伝子発現応答を調べた例は少なく、知見の集積が必要であった。

V. parahaemolyticus は、1950 年にシラスを原因とする集団食中毒の原因細菌であり、我が国で発見された唯一無二の食中毒菌である。本菌に汚染された魚介類の生食などが本食中毒の主因である。O3:K6 血清型の世界流行により、1998 年には本食中毒事故は 839 件に達し最も重要な細菌性食中毒として知られるに至った⁵⁾。その後、食品衛生法施行規則の一部改正も相まって、事故数は順調に減衰し、現在では 10 件程度に抑えられている。ゆでかきやゆでたこなどや仕出し弁当が原因食品として同定されることが多く、加工・調理過程における損傷菌の発生条件の明確化は未だに意義がある。諸外国では集団事例の発生も多く、1998 年をピークとした世界流行株の苦い経験もあり、依然として新規な世界流行株の出現動態には注視しなければならない。特に、食品加工過程 (温度や天然抗菌剤などの食品環境ストレス) や調理環境 (調理環境ストレス) において、損傷細胞がどのようなダイナミクスで生じるのかは未解明のままであり、腸炎ビブリオ食中毒の終焉にむけて、損傷菌対策は重要性が高い。筆者らは、腸炎ビブリオでは初めて、水産物の加工過程で想定される 5 種類のストレス (加熱、低温、低塩分、銀イオン、酸) を与えた場合に損傷菌が生じる条件を検討し、それらストレス条件下とその後の回復条件下における網羅的遺伝子発現の解析を行った。いずれのストレスを与えた場合においても、損傷菌が生じる条件が見いだされた。半分の細胞が損傷する条件としては、加熱 (40℃, 20 分)、低温 (5℃, 24 時間)、低塩分 (0.8 % 塩化ナトリウム, 10 分)、銀イオン (0.03 M, 室温で 10 分) および酸 (塩酸 pH4, 15 分) による低容量ストレス処理を施した場合であった。加工や調理環境で想定されるこれら 5 つのストレスに対する遺伝子発現応答を Table 1 にまとめた。目新しい知見として、①低温処理に対しては、プトレシン利用経路にかかわる遺伝子の上方発現や N-アセチルグルコサミンの取り込み遺伝子の上方発現など、細胞構成物質のリサイクルが示唆され、さらに、その回復時には、カタラーゼ遺伝子の発現が上昇し、低温損傷回復に

Table 1 Outline of stress responses of *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633

Stressor	Up-regulated	Down-regulated	Recovery	Vp-PAI
Heat (H)	Protein repair Ion acquisition, T6SS Cell wall biosynthesis Biofilm formation Polyamine biosynthesis		Cell wall biosynthesis	Up (H, HR)
Low temperature (C)	Putrescine utilization N-acetyl-glucosamine utilization	Protein biosynthesis Ion acquisition	Catalase	Down (C, CR)
Low salinity (O)	Ion acquisition Cell wall biosynthesis K ⁺ transport Betaine biosynthesis		Ectoin synthesis	Up (O)
Silver ion (Ag)	Multi drug resistance Oxidative stress resistance	Biofilm formation	Multi drug resistance Oxidative stress resistance	Down (Ag)
Acid (Ac)	Protein repair Polyamine biosynthesis Na ⁺ -NQR, ATP synthesis	Biofilm formation	Protein biosynthesis Cell wall biosynthesis	—

Fig. 1 Reduction of injured cells of *Vibrio parahaemolyticus* treated with different kinds of stressors

Different alphabet indicates statistical significance ($P < 0.05$). Abbreviations of each stressor are indicate in Table 1.

におけるカタラーゼの重要性を支持したこと、②低塩分ストレスでは細胞壁・外膜合成遺伝子の上方発現とともに、カリウムイオン輸送やグリシンベタイン取り込みおよび生合成遺伝子の上方発現を行い、浸透圧調整に対応しているものと示唆されたこと、③酸ストレス下では、ナトリウム輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素、ATP シンターゼ、Na⁺/H⁺ アンチポーター遺伝子を上方発現させ、海洋細菌独特の呼吸鎖を活用した酸性環境での生存戦略を行っているものと推測されたこと、④低温、低温回復および銀イオン処理時に本菌の病原性遺伝子領域 (VP-PAI) で下方発現する遺伝子の比率が高まったこと、が挙げられる。

これらストレスの併用効果を検証したところ、酸あるいは銀イオンと低塩分は、損傷菌残存率の低減に相乗効果を

示した (Fig. 1)。RNA-Seq の遺伝子発現の結果とあわせて検討すると、酸ストレス下では、Na⁺ の輸送を介する海洋細菌特有の呼吸鎖を活用した酸ストレス応答を行っていることが推測されたが、低塩分下では細胞質膜の機能不全を誘起することで、酸ストレスへの応答を効果的に抑制しているものと考えられた。

以上、水産物の加工過程で想定され、損傷菌が生じる 5 種類のストレスを与えた場合の腸炎ビブリオのストレス応答とその後の回復条件下における遺伝子発現の解析を進め、知識基盤を拡充することができた。さらに面白いことに、低容量の酸と低塩分のストレスの組み合わせは相乗的に作用し、遺伝子発現応答の面からも説明できることから、ゲノムワイドな遺伝子発現データは効果的な損傷菌低減策

Fig. 2 Lethal and injured cell rates of *Listeria monocytogenes* exposed with the combination of food-grade antibacterial substances at the concentration of each minimal inhibitory concentration

に活用可能なものと考えている。

3. 食品加工処理で使用する抗菌物質による リステリアの損傷菌発生とその制御

リステリア (*Listeria monocytogenes*) は、芽胞を形成しない通性嫌気性のグラム陽性桿菌であり、低温環境 (4℃) でも増殖可能なことを特徴とする食中毒菌である。食品由来のリステリア症は、幸いなことに日本での発生事例は厚生労働省の食中毒統計にはなく、唯一、北海道で 2001 年にソフトセミハードタイプチーズが原因のリステリア食中毒の報告事例があるのみである (<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzanbu/0000070322.pdf>) が、欧米では頻発しており重篤化した場合には致死率が高い疾患を引き起こす¹⁴⁾。リステリア食中毒は、非加熱喫食食品 (Ready-to-eat 食品, RTE 食品) を介した事例が多く報告されており、これは本菌が河川水や動物の腸管内などの環境中に広く分布することに起因する。日本で流通する食品においても畜肉、野菜およびその加工品から汚染菌量は少ないが容易に検出され¹⁵⁾¹⁶⁾、燻煙品や魚卵加工品などの水産加工食品からもしばしば検出される^{17)~19)}。食品でのリステリア汚染率は欧米とほぼ同程度なことから、日本で流通する水産食品を介したリステリア症が発生する可能性が強く懸念されている。本項では、食品加工において使用される微生物制御技術を用いた時に発生する損傷リステリアの発生状況を調べていた時に見られた現象から、より安全な食品を製造・流通するために考慮すべき点について紹介することにする。

食品に生残する微生物による食中毒や腐敗の発生を抑制するために、食品製造現場では様々な微生物制御の手法が取り入れる。しかし、最近では消費者が自然嗜好や添加物フリーを欲していると捉え、可能な限り添加物や加熱等の物理的な処理を行わず、または最小限度に留めた食品製造を行おうとする傾向にある。特に RTE 食品では、食品自体の外観、食感、風味を維持したまま微生物制御を行いたいため各種微生物制御技術を複合的に組み合わせたハードル理論に基づいた手法が採用されている²⁰⁾。リステリアにおける各種物理的および化学的な非致死処理を行った時の損傷菌の発生についてはこれまで多くの報告はあるが、食品保存に使用される保存料や日持ち向上剤を複合的に使用した時の損傷菌発生についてはほとんど検討されてこなかった。そこで、食品に使用される抗菌物質 (グリシン、酢酸ナトリウム、リゾチーム、ポリリジン、ナイシン) をリステリアに対して最少発育阻止濃度 (MIC) で併用 (pH 6) した時の死滅率 (殺菌率) と生残菌に占める損傷菌の割合を非選択寒天培地とリステリア用選択培地 (ALOA 寒天培地または PALCAM 寒天培地) で得た生残菌数の差から求めた。その結果 (Fig. 2), グリシン-ポリリジン, グリシン-ナイシン, 酢酸ナトリウム-ナイシンおよびグリシン-ナイシンではいずれも死滅率は 99.9% 以上とほぼ同様となり抗菌効果は類似したものであったが、生残菌に占める損傷菌の割合は大きく異なるものとなった。一般に、食品微生物制御に使用する抗菌剤は作用後の生残菌数が少なくなるものを選択することが多い。しかし、強く損傷を受けた生残菌は一般的な食品微生物検査では検出されない。

Fig. 3 Scanning electron microscopy of *Listeria monocytogenes* grown in Tryptic Soy Broth supplemented with 0.6% yeast extract and 9% NaCl at 37°C for 3 days

Fig. 4 Cell length of *Listeria monocytogenes* in sample suspended in Tryptic Soy Agar supplemented with 0.6% yeast extract and 9% NaCl at 37°C for 3 days

したがって、より安全性の高い食品の製造を行うには、微生物に対する死滅率だけでなく損傷菌を発生させない微生物制御法の組み合わせについても考慮すべき必要があると考えられる。

4. 食品加工処理によるリステリア細胞のフィラメント形成とその問題点

水産食品の加工で行われる塩蔵を想定して、リステリアにおける食塩存在下での損傷菌発生状況を調べていたところ、高濃度食塩存在下 (9% NaCl, 水分活性, $A_w=0.94$) に置いたリステリア細胞が Fig. 3 に示したような伸長した細胞となることを経験した。寒天平板上で形成されたこのリステリア細胞の長さを測定したところ、4 μm 以上の長さの細胞が全体の 50% 以上を占め、最大で 160 μm の長さのものが認められた (Fig. 4)。この伸長したリステリア細

胞を DAPI 染色したところ、Fig. 5 (A, D) に示したように伸長した細胞内に DAPI で染色された核酸が不鮮明に見られた。しかし、この伸長した細胞を 0.6% 酵母エキス加 Tryptic Soy Broth (pH 7.2) に接種し 37°C で培養したところ、時間の経過とともに細胞内で DAPI によって染色される部位が明瞭に分かれはじめた (Fig. 5-B, C, E, F)。したがって、この伸長した細胞は一つの細胞が伸長したものではなく、個々の細胞が多数連なって形成されている (フィラメント状) と推察された。このフィラメント状の細胞は、ボルトエクスマキサーや超音波処理による撹拌を行っても分断しないものであった。リステリアの細胞長は 1~2 μm である²¹⁾ ことからこの最大長を示したフィラメント状の細胞には理論上 80 個以上の細胞が数珠状に連なっていることになる。このようなリステリアのフィラメント形成は、食塩ストレスだけでなくアルカリストレス²²⁾ や酸ストレ

Fig. 5 Phase contrast (A,B,C) and DAPI-staining (D,E,F) images of filamentous *Listeria monocytogenes* in Tryptic Soy Broth supplemented with 0.6 % yeast extract at 37°C

ス²³⁾などの非致死的なストレス処理を行った場合にも発生することは報告されている。さらに、非致死のストレス環境下における細菌のフィラメント形成はリステリアだけに見られる形態変化ではなく、大腸菌やサルモネラなど他の細菌でも見られるものであることが知られている^{24)~27)}。リステリアの発育限界食塩濃度は 10% (Aw 0.92) である²⁸⁾。したがって、この 9% NaCl 環境はリステリアにとって発育可能な上限に極めて近い環境といえる。このような細菌細胞の形態変化はストレス応答の一つと考えられている。

それでは、このフィラメント状となった細菌が食品内に存在した時にどのような問題が発生するのだろうか。まず、第一に生菌数の過小評価に繋がると推察できる。Fig. 5で示した通り、このフィラメント状リステリアは、容易に発育できる環境へ移されるとフィラメントが分断され、増殖を開始してしまう。一方、フィラメント状リステリアは通常の寒天平板培地へ接種されると寒天平板上では多数の細胞が連なった一つの長いフィラメント状細胞から一つのコロニーしか形成されない (Fig. 6)。すなわち、食品内でリステリア細胞がフィラメント状となった場合、従来の平板法による生菌数測定では正確な生細胞数の測定ができないことを意味している。

次に、食品での微生物制御は一般に各々の食品における制御対象微生物の汚染菌数を考慮して制御手法や制御強度を設定する。すなわち、制御対象菌の汚染菌数が少なければ、当然、加熱殺菌条件の緩和や抗菌物質の濃度を少なくすることが可能となる。しかし、前述のようなフィラメント状となった細胞が存在した場合、汚染菌量を平板培養法で求め、その結果に基づいた殺菌・制御条件の決定を行うと実際の生細胞数を過少評価しているため殺菌条件不足に

Fig. 6 Colony formation of filamentous *Listeria monocytogenes* on Tryptic Soy Agar plate supplemented with 0.6 % yeast extract at 25°C

よる制御対象菌の残存に繋がると推察できる。実際に、フィラメント状リステリア細胞をリン酸緩衝液に懸濁し、50°Cで加熱した時の生残菌数を寒天平板法による生菌数測定で調べたところ、通常の細胞では50°Cでの加熱時間の経過とともに生残菌数の減少が見られたが、フィラメント状細胞では加熱 60 分後においても生残菌数は初発菌数と変

Fig. 7 Survival curves of normal (○) and filamentous (●) *Listeria monocytogenes* during heating at 50°C

化は認められなかった (Fig. 7). この場合, 単純にフィラメント状細胞に存在する生細胞数が多いためか, フィラメント状となった細胞を構成する個々の細胞の耐熱性上昇も関連するのかはまだ明らかではない. したがって, 食品内に存在する細菌を確実に制御するためには, このようなフィラメント状細胞内に存在する生細胞数をも正しく測定する方法の開発も重要な事象と考えられる.

5. おわりに

水産物は我が国の重要食資源であり, かつ生食の美味しさと優れた健康機能を有することが国際的にも認知されるようになったため, 世界各国での消費量の増大は著しい. 水産物は畜肉製品に比べ, 安定性が乏しくまた食中毒菌や腐敗細菌などの汚染を受けやすい環境で製造されることが多い. したがって, 品質と安全を両立させた水産物の供給には, これまで以上の高いレベルでの衛生管理が求められている. 食品微生物学の分野では, 損傷菌に関する多くの知見が既に集積しているが, 本稿で示した腸炎ビブリオやリステリアを対象とした知見が示すように, 新技術の導入や株レベルでの緻密な生理特性比較によって損傷菌研究の新たな1ページを追加する予期しない成果が得られたものと考えている. 水産物の品質保証は, 漁獲から食卓まで持続可能な形で進める必要があり, 今後も, 水産物の食中毒起因菌に関するシームレスな新知見の集積と現場へのフィードバックに尽力することが肝要である.

本稿で紹介した内容は「食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト」の支援のもと実施した.

文 献

1) Storz, G. and R. Hengge-Aronis, R. (2000). Bacterial Stress Responses. ASM Press.

2) Tsuchido, T. (2003). Properties of injured bacteria occurring in inactivation processes. *Japanese Journal of Food Microbiology*, **20**, 141-149 (土戸哲明, 殺菌プロセスにおいて発生する損傷菌の特性, 日本食品微生物学会誌).

3) Colwell, R.R. and Grimes, D.J. (2004). 培養できない微生物たち. 学会出版センター.

4) Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J., and Colwell, R.R. (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.*, **8**, 313-323.

5) 甲斐明美, 尾畑浩魅, 小西典子 (2008). ビブリオ感染症の疫学. 化学療法の領域, **24**, 56-61.

6) 吉水 守, 笠井久会 (2007). 水産物の品質管理—秋サケとホタテ・カキを例に. 『食の安全を担う科学研究の新たな展開』, 食の安全研究センター設立記念シンポジウム組織委員会編, 東京大学大学院農学生命科学研究科附属食の安全研究センター, 東京, pp. 117-127.

7) 里見正隆 (2011). 魚醤油から分離されたヒスタミン生成菌について. 醤油の研究と技術, **37**, 357-363.

8) Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S.I., Okada, Y., Yamamoto, S., and Igimi, S. (2007). Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. *Environ. Microbiol.*, **9**, 869-879.

9) Senoh, M., Ghosh-Banerjee, J., Ramamurthy, T., Colwell, R. R., Miyoshi, S.I., Nair, G.B., and Takeda, Y. (2012). Conversion of viable but nonculturable enteric bacteria to culturable by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiol. Immunol.*, **56**, 342-345.

10) Kong, I.S., Bates, T.C., Hülsmann, A., Hassan, H., Smith, B.E., and Oliver, J.D. (2004). Role of catalase and *oxyR* in the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **50**, 133-142.

11) Wong, H.C. and Wang, P. (2004). Induction of viable but non-culturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.*, **96**, 359-366.

12) Meng, L., Alter, T., Aho, T., and Huehn, S. (2015). Gene expression profiles of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **91**, fiv035.

13) Ray, B., Hawkins, S.M., and Hackney, R. (1978). Method for the detection of injured *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 1121-1127.

14) Buchanan, R.L., Gorris, L.G. M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., and Whiting, R.C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Cont.*, **75**, 1-13.

15) Iida, T., Kanzaki, M., Nakama, A., Kokubo, Y., Maruyama, T., and Kaneuchi, C. (1998). Detection of *Listeria monocytogenes* in humans, animals and foods. *J. Vet. Med. Sci.*, **60**, 1341-1343.

16) Inoue, S., Nakama, A., Arai, Y., Kokubo, Y., Maruyama, T., Saito, A., Yoshida, T., Terao, M., Yamamoto, S., and Kumagai, S. (2000). Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. *Int. J. Food Microbiol.*, **59**, 73-77.

17) Masuda, T., Iwaya, M., Miura, H., Kokubo, Y., and Maruyama, T. (1992). Occurrence of *Listeria* species in fresh seafood. Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi), **33**, 599-602 (増田十茂子, 岩谷美枝, 三浦平吉, 小久保彌太郎, 丸山 務, 海産鮮魚介類における *Listeria* 菌の汚染実態, 食品衛生学雑誌).

18) Yamazaki, K., Tateyama, T., Kawai, Y., and Inoue, N. (2000).

- Occurrence of *Listeria monocytogenes* in retail fish and processed seafood products in Japan. *Fisheries Sci.*, **66**, 1191–1193.
- 19) Miya, S., Takahashi, H., Ishikawa, T., Fujii, T., and Kimura, B. (2010). Risk of *Listeria monocytogenes* contamination of raw ready-to eat seafood products available at retail outlets in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 3383–3386.
- 20) Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.*, **55**, 181–186.
- 21) McLauchlin, J. and Ree, C.E.D. (2009). Genus *Listeria*, In “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edition, Vol. 3” ed. by Vos, P.D., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. and Whitman, W. B., Springer, New York pp. 244–257.
- 22) Giotis, E.S., Blair, I.S., and McDowell, D.A. (2007). Morphological changes in *Listeria monocytogenes* subjected to sublethal alkaline stress. *Int. J. Food Microbiol.*, **120**, 250–258.
- 23) Vail, K.M., McMullen, L.M., and Jones, T.H. (2012). Growth and filamentation of cold-adapted, log-phase *Listeria monocytogenes* exposed to salt, acid, or alkali stress at 3°C. *J. Food Prot.*, **12**, 2142–2150.
- 24) Jones, T.H., Vail, K.M., and McMullen, L.M. (2013). Filament formation by foodborne bacteria under sublethal stress. *Int. J. Food Microbiol.*, **165**, 97–110.
- 25) Mattick, K.L., Phillips, L.E., Jorgensen, F., Lappin-Scott, H.M., and Humphrey, T.J. (2003). Filament formation by *Salmonella* spp. inoculated into liquid food matrices at refrigeration temperatures, and growth patterns when warmed. *J. Food Prot.*, **66**, 215–219.
- 26) Pratt, Z.L., Chen, B., Czuprynski, C.J., Wong, A.C. L., and Kaspar, C.W. (2012). Characterization of osmotically induced filaments of *Salmonella enterica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 6704–6713.
- 27) Hazeleger, W.C., Dalvoorde, M., and Beumer, R.R. (2006). Fluorescence micro-scopy of NaCl-stressed, elongated *Salmonella* and *Listeria* cells reveals the presence of septa in filaments. *Int. J. Food Microbiol.*, **112**, 288–290.
- 28) Nolan, D.A., Chamblin, D.C., and Troller, J.A. (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Int. J. Food Microbiol.*, **16**, 323–335.

(平成 29 年 11 月 17 日受理)