総説

新しい食品微生物制御の展開—バクテリオファージの利用

山木将悟, 山崎浩司*

北海道大学大学院水産科学研究院

Development of a Novel Food Antimicrobial Technology: Application of Bacteriophages

Shogo Yamaki and Koji Yamazaki*

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

Bacteriophages (phages) are viruses that infect bacteria. Phages can replicate in host cells and lyse the cells after replication. The antimicrobial potential of phages has been a focus of medical research to combat multi-drug resistance to antibiotics in bacteria. Their use in controlling pathogens in the field of food science is also expected. In the USA and parts of Europe, phage utilization has been approved for inhibiting the growth of foodborne pathogens such as *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, and *Listeria monocytogenes* in food. In this paper, we introduced phage utilization as a novel antimicrobial technology for killing bacteria in food. Some tailed phages belonging to *Caudovirales* have been used as components of antimicrobial phage products. The phage products targeting *E. coli*, *Salmonella*, and *L. monocytogenes* show effective antibacterial activities in food. However, the antimicrobial effects of phages are not without drawbacks, including the development of phage-resistant strains and the low contact rates between phage and host in food. Phage cocktails are effective for expanding the host range and reducing the emergence of phage-resistant bacteria. Combinations of phage treatment and other preservation technologies can suppress the emergence of resistant strains and further promote food safety.

(Accepted May 29, 2020)

Keywords : Bacteriophage, Antimicrobial Technology, Food Safety

キーワード : バクテリオファージ, 微生物制御, 食品衛生

1. はじめに

食品の安全性は社会的に大きな関心事のひとつであり、ひとたび集団食中毒が発生すると連日大きな報道がなされる。商品の価格や鮮度とともに、食品の安全・安心は消費者が食品を購入する際に強く重視する事象であり、消費者の購買意欲を支える重要な要素のひとつである。このような背景のもと、食品に関連する企業には、食品の安全・安心に対する責任と取り組みが求められており、特に食品の安全への取り組みは消費者に対する企業のアピールポイントにもなると考えられる。

ここ数十年の科学技術の発展とともに、近年の食品加工・保蔵技術の発展は目覚ましいものがある。日本にしながら、世界の食材や加工食品をスーパーマーケットで購入することは容易となった。これは、添加物の使用や殺菌技術、保蔵技術の発展だけでなく、原料の生産から食卓までのコールドチェーンが整備されたことの貢献は大きい。中食や外食が進む昨今、コンビニエンスストアではチルド弁当やチルド惣菜の開発が進み、美味しく安全な食事は手軽

なものとなってきた。

一方、健康志向により減塩化など、消費者の健康に配慮した食品も求められるようになってきている。例えば、イカ塩辛は従来高塩分で雑菌の繁殖を防ぐ発酵食品であるが、現在スーパーマーケットで手に入るイカ塩辛の殆どが低塩分塩辛であり調味されたものである。伝統的な塩辛は常温保存で流通が可能であるが、低塩分塩辛の流通はコールドチェーンに強く依存し、設定された温度からの逸脱は食中毒リスクを大きく高める。また、添加物使用量や加熱強度の低減なども食中毒リスクを高める要因となるが、現代では温和な加工処理を複数組み合わせるハードルテクノロジー理論¹⁾に基づき食品の微生物制御が行われることが多い。特に、購入後に消費者による調理加工を経ずに喫食可能な非加熱喫食食品 (Ready-to-eat 食品) では、加工工程の厳密な衛生管理と低温保存により食中毒リスクを低減することが求められる。しかし、*Listeria monocytogenes* など、低温下で増殖可能な食中毒細菌も存在し、新たな微生物制御技術の開発は常に求められてきた。

近年、急速に発展してきた微生物制御技術のひとつにバ

〒041-8611 北海道函館市港町 3-1-1

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

クテリオファージの溶菌活性を利用した手法が挙げられ、感染症の治療分野²⁾だけでなく食品微生物制御においても注目されはじめています。バクテリオファージは、単にファージとも呼ばれ、細菌に感染するウイルスである。元来、食品製造分野ではファージは厄介者として扱われてきた。現在、欧米の一部の国では、食品加工において *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *L. monocytogenes* の殺菌を目的としたファージ製剤の利用が認められている。本稿では、微生物制御技術としてのファージの利用について概略する。

2. バクテリオファージとは

バクテリオファージ（ファージ）は細菌に感染するウイルスである。ファージは 1915 年と 1917 年に Frederick W. Twort と Félix d'Hérelle によりそれぞれ独立に発見された³⁾⁴⁾。ファージには様々な分類群が存在し、分類群によりその形態が大きく異なる。また、分類群により保有する核酸の種類も異なり、dsDNA, ssDNA, dsRNA, ssRNA などファージにより様々である。これまでに分離され形態が観察されてきたファージの約 96% は頭部と尾部からなる *Caudovirales* 目のファージである⁵⁾。すなわち、微生物制御に用いられるファージのほとんどが *Caudovirales* 目に該当すると言ってよい。ファージの形態学的な分類は Hans-W. Ackermann 博士らにより進められてきた⁶⁾。 *Caudovirales* 目のファージの特徴はゲノム（直鎖状の dsDNA）を包む頭部と宿主への吸着に必要な尾部からなる構造であり、tailed phage と呼ばれる（図 1）。透過型電子顕微鏡による形態観察により、 *Caudovirales* 目ファージは *Myoviridae* 科、 *Siphoviridae* 科、 *Podoviridae* 科の 3 つの科に分類される⁷⁾。これらの科はファージの尾部の構造により分類され、 *Siphoviridae* 科は長い非収縮性の尾部、 *Myoviridae* 科は長い収縮性の尾部、 *Podoviridae* 科は短い尾部を持つ。しかし、次世代シーケンス解析技術の発展とともに、今ではファージのゲノム塩基配列を利用した分類が進んできている。近年、国際ウイルス分類委員会（International Committee on Taxonomy of Viruses : ICTV）では上記の 3 つの

科に加えて複数の科を含む分類群が提案され、 *Caudovirales* 目ファージの分類体系の再編成が行われている⁸⁾¹⁾。今後ファージの分類は透過型電子顕微鏡による単純な形態学的分類だけでなく、ゲノムシーケンス解析による分類が中心となることが推察される。

3. バクテリオファージの感染

ファージの生活環は、溶菌サイクルと溶原サイクルに分けられる⁹⁾。図 2 に溶菌サイクルと溶原サイクルの簡単な模式図を示した。ファージが宿主に感染する際、はじめに細胞への吸着が必要である。宿主細胞に吸着したファージは細胞内に自己のゲノム核酸を注入する。その後、細胞内でファージ DNA とタンパク質が複製され、ファージ粒子が組み立てられる。最後に、ファージゲノムにコードされる溶菌酵素により宿主細胞が溶菌され、ファージは細胞外へ放出される。宿主細胞の溶菌はホリンとエンドライシンという 2 種類の酵素により達成される。ホリンはエンドライシンの細胞膜透過を可能とし、細胞壁に到達したエンドライシンによりペプチドグリカンが分解され、宿主細胞は溶菌する^{10)~12)}。このような一連の流れを溶菌サイクルと呼ぶ。一方、一部のファージは溶菌サイクルに加えて溶原サイクルと呼ばれる生活環もとる。これは図 2-⑥~⑧にあるように、宿主細胞内に注入されたファージのゲノムが宿主のゲノムに組み込まれ（溶原化）、宿主の細胞分裂とともに増殖する生活環を指す。溶原化されたファージをプロファージと呼ぶ。抗生物質や酸化ストレス、DNA 損傷により宿主細胞の SOS 応答が活性化されると、プロファージは再び溶菌サイクルへと誘導される¹³⁾。溶菌サイクルのみで増えるファージをビルレントファージ、溶菌サイクルと溶原サイクルの両方で増えるファージをテンプレートファージと呼ぶ。毒素遺伝子や抗生物質耐性遺伝子の伝播の危険性から、微生物制御に用いるファージはビルレントファージのみである。代表的なビルレントファージには T4 ファージ、テンプレートファージには λ ファージなどが知られている。このような生活環を経て、ファージは短時間で著しく増殖する。特に、溶菌サイクルでは、数十分

図 1 著者らがこれまでに分離した *Caudovirales* 目ファージの透過型電子顕微鏡観察画像
それぞれ、 *Morganella morganii* (A, B) と *Escherichia coli* (C) に感染するファージである。

図2 ファージの生活環

ビルレントファージは溶菌サイクルのみ、テンペレートファージは溶菌サイクルと溶原サイクルの両方で増殖する。

図3 ファージの一段増殖曲線

宿主細胞に吸着しDNAを細胞内に注入後、宿主細胞内でファージ粒子が組み立てられるまで、ファージは感染性を喪失する。この期間を暗黒期と呼び、培養液中の細胞をクロロホルムで溶菌することにより確認できる。細胞内での感染性ファージの増加に遅れて、溶菌による細胞外へのファージの放出が起こる。細胞の溶菌が始まるまでの時間を潜伏期と呼ぶ。

程度で宿主細胞あたり数十から百程度の娘ファージが放出される^{14)~16)}。ファージの一段増殖曲線の模式図を図3に示した。宿主細胞への吸着後、感染性を喪失する暗黒期を細胞内で経て、ファージ粒子の組み立て後、多数の娘ファージが溶菌により細胞外へ放出される。

宿主細胞へのファージの吸着は、ファージの感染を開始するための重要な要素のひとつである。これはファージの持つレセプター結合タンパク質が宿主細胞表面上に存在するレセプターに結合することにより成立する。宿主細胞表面上のタンパク質やリポ多糖、タイコ酸、鞭毛や線毛などがレセプターとなる^{17)~21)}。このレセプターとファージのレセプター結合タンパク質の組み合わせによりファージの宿主域が決定される。一般に、ファージの宿主域は細菌の種または株レベルの範囲にとどまる。

4. バクテリオファージによる食品微生物制御

この項では、既にファージ製剤として利用されているファージを中心に、食品中での殺菌効果を検証した研究を紹介する。

(1) *L. monocytogenes*

*L. monocytogenes*に感染するファージ製剤 PhageGuard Listex™ (オランダ Micros Food Safety 社)に含まれるファージが *Listeria* ファージ P100²²⁾である。Listex™は米国食品医薬品局 (FDA) より GRAS (Generally Recognized As Safe) 認定を受けた初めてのファージ製品である。ファージ P100 を 3×10^8 PFU/g でホットドック、スモークサーモン、シーフードミックス、キャベツに接種し6℃で保存した試験²³⁾では、スモークサーモンを除き食品中の *L. monocytogenes* の生菌数が $2\text{--}2.5 \log \text{CFU/g}$ 程度減少した。また、ファージ P100 を生のサーモンフィレに処理した試験²⁴⁾では、処理1日後の *L. monocytogenes* の生菌数は $1.4 \log \text{CFU/g}$ 減少し、その後4℃で10日間保存した試料の生菌数は $0.3 \log \text{CFU/g}$ 未満で推移することが報告されている。一方、ファージ未処理の試料では *L. monocytogenes* の生菌数は約 $1 \log \text{CFU/g}$ 増加していた。ファージ P100 を乳酸カリウムや二酢酸ナトリウムと併用した研究²⁵⁾では、真空包装された七面鳥肉とローストビーフにおける *L. monocytogenes* の生菌数が約 $1.5 \log \text{CFU/cm}^2$ 減少し、七面鳥肉では4℃で10日間、ローストビーフでは4℃で28日間にわたって *L. monocytogenes* の生菌数の増加を防いだ。この時、ファージ接種後の生菌数減少は抗菌物質併用の有無により大きな違いはなかったが、ファージ単独使用の場合は抗菌物質併用時よりも早く *L. monocytogenes* の regrowth が起こった。すなわち、ファージは接種後の生菌数減少に貢献し、その後の食品中での増殖の抑制は併用した抗菌物質の貢献が大きいと考えられる。

(2) *E. coli* O157 : H7

ファージ混合物 (ファージカクテル) ECP-100 は EcoShield™ として米国 Intralytix 社より販売されるファージ製剤であり, *E. coli* O157 : H7 に特異的に感染する 3 株 (ECML-4, ECML-117, ECML-134) のファージが混合されている²⁶⁾. ECP-100 は, 10℃ で保存したブロッコリー, トマト, ホウレン草, 牛肉の *E. coli* O157 : H7 の生菌数を概ね 95–99% 減少させた²⁶⁾. カンタロープメロンとレタスを用いた試験²⁷⁾ では, カンタロープメロンにおいてファージ未処理と比べてファージ処理した試料で有意に生菌数が減少し, レタスでも約 1.9logCFU/cm² の生菌数が減少したと報告されている. また, レタスと牛肉に対しての EcoShield™ の効果を報告した他の論文²⁸⁾ では, ファージ処理 5 分後の *E. coli* O157 : H7 の生菌数減少量は, 牛肉で 94%, レタスで 87% だった. この報告では, 細菌の再汚染を想定した試験も行なっている. すなわち, *E. coli* O157 : H7 を接種した牛肉にファージ処理を施し 24 時間低温保存後, 挽肉とし *E. coli* O157 : H7 を再汚染させた実験である. 初期の汚染細菌は ECP-100 処理により生菌数が有意に減少したが, その後の再汚染菌に対してはファージによる発育抑制効果は認められなかった. したがって, ファージによる殺菌効果は, 既に汚染した細菌に対しては強いが, その効果は持続的でないことが推察される.

腸管出血性大腸菌の中でも, *E. coli* O157 : H7 は最も主要な血清型のひとつである²⁹⁾. 一方, 近年は血清型 O26 や O111 などの血清型による食中毒も増えてきている³⁰⁾³¹⁾. Intralytix 社は *E. coli* O157 : H7 ファージカクテルの EcoShield™ を改良し, 宿主域がより広く, 血清型 O26, O45, O111, O103, O121, O145 および O157 の *E. coli* に感染するファージカクテル (EcoShield PX™) を開発した³²⁾. この EcoShield PX™ は, 様々な食品 (牛挽肉, 鶏胸肉, チーズ, サーモン, レタス, カンタロープメロンなど) で有意に *E. coli* O157 : H7 の生菌数を減少させるものであると報告されている³²⁾.

(3) *S. enterica*

SalmoFresh™ (Intralytix 社) は *S. enterica* に感染するファージカクテル³³⁾ である. Sukumaran ら³⁴⁾ は鶏胸肉の *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg* に対する SalmoFresh™ の殺菌効果を検証した. 4℃, 24 時間の保存で, SalmoFresh™ 処理は単独で *Salmonella* の生菌数を 0.8logCFU/g 減少させたが, ガス置換包装 (MAP) との併用により, わずかではあるがその効果が増加することを見出した. 同様に, SalmoFresh™ の効果をロメインレタスと緑豆スプラウトで試験した研究³⁵⁾ は, *S. Newport*, *S. Braenderup*, *S. Typhimurium*, *S. Kentucky*, *S. Heidelberg* のカクテルに対し SalmoFresh™ 処理が *Salmonella* の生菌数を減少させることを認めているが, 塩素水処理後にファージ処理を行うことで殺菌効果が向上することを報告

している. また, Zhang ら³⁵⁾ は同論文で, SalmoFresh™ によるロメインレタスとスプラウトの *Salmonella* 制御は完璧ではないが, 有効なハードルのひとつとして期待できると述べている. このように, ファージ処理は従来の殺菌処理との併用により, ハードルテクノロジーにおける有効なハードルとなり得る.

(4) その他の細菌

その他にも, *Shigella* spp.³⁶⁾ や *Campylobacter jejuni*³⁷⁾, *Staphylococcus aureus*³⁸⁾, *Bacillus cereus*³⁹⁾ など多くの食中毒細菌に対するファージの殺菌効果が検証されている. Tabla ら³⁸⁾ は, 低温殺菌乳における高静水圧処理と *S. aureus* ファージカクテル (phiIPLA35, phiIPLA88 の 2 株のファージ混合物) の併用効果について調べた. ファージカクテルに用いた両ファージは 400 MPa までの高静水圧処理に安定であり, ファージ単独と高静水圧処理単独に比べて併用処理の発育抑制効果は極めて優れていた. 韓国の発酵食品 (チョングッチャン) より分離されたファージ BCP1-1 は, Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺ の二価カチオン存在下で, 発酵細菌として添加された *B. subtilis* の生菌数には影響を及ぼさず大豆中の *B. cereus* の発育を大きく抑制した. この時, 二価カチオンはファージ BCP1-1 の *B. cereus* 細胞への吸着を促進していた³⁹⁾. 二価カチオンによるファージ吸着の促進効果は, 著者らの研究⁴⁰⁾ においても確認されており, ヒスタミン生成菌 *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* に感染するファージ Phd1 の吸着と細胞内での増殖が Ca²⁺ と Mg²⁺ の添加により促進された. このように, 一般にファージは二価カチオン存在下で感染が活性化される場合がある^{41)–44)}.

著者らは, 水産物のヒスタミン食中毒の原因となるヒスタミン生成菌に感染するファージについて研究を行ってきた. *Morganella morganii* に感染するファージを生体のマグロに接種した実験⁴⁵⁾ では, 4℃, 12℃, 20℃の全ての温度で, マグロ切り身に接種した *M. morganii* の増殖とヒスタミン生成を有意に抑制することに成功した. また, 2 株の *M. morganii* ファージ ΦMV-1 と ΦMV-4 の併用処理について調べた結果, 単独処理より長期的な発育抑制効果が得られることを示した¹⁶⁾.

5. バクテリオファージの殺菌効果に影響を及ぼす要素

ファージによる宿主の殺菌は様々な要素に影響を受け, その効果はファージとその使用方法により大きく変化する. 最も重要な要素のひとつが使用するファージの宿主域である. 先に述べた通り, ファージの宿主認識機構は極めて厳密であり, 一般にファージの宿主域は宿主の種または株のレベルに限定される. そのため, 微生物制御に使用されるファージは対象とする細菌に広く感染する株が望ましい. このような観点から, 宿主域の広いファージを選定し使用することが望まれる. 一方, 複数のファージを混合す

るファージカクテルを利用することで互いのファージの宿主域を補い合い、カクテルとして広い宿主域を持たせることも可能である。先に紹介した *E. coli* ファージ製剤 EcoShield PX^{TM(32)} は、*E. coli* O157:H7 を殺菌する EcoShieldTM の構成ファージを変更し、血清型 O157 に加え血清型 O26 や O111 などの重要な *E. coli* にも感染するように改良したものである。

ファージ処理に用いるファージ濃度は殺菌効果に強く影響する。Guenther ら²³⁾ は *L. monocytogenes* の殺菌効果に及ぼすファージ A511 接種濃度の影響について調べた。ホットドック、チョコレートミルク、キャベツに接種した *L. monocytogenes* (10^3 CFU/g or mL) の殺菌効果はファージ A511 の濃度依存的に増加することを示し、 10^6 PFU/g or mL のファージ A511 処理は食品中での殺菌効果が小さく、 10^8 PFU/g or mL のファージ A511 処理区ではホットドックとチョコレートミルクで *L. monocytogenes* は検出限界未満となった。著者らの実験⁴⁵⁾ においても同様の傾向が確認されており、マグロ切身の *M. morganii* (10^3 CFU/g) に対してファージ濃度を 10^8 PFU/g とした際に最も高い殺菌効果が得られた。しかし、ファージの感染機構を考慮すると、宿主と同程度または多少多い程度のファージ量で十分に殺菌できると考えられる。なぜ宿主に対して極めて多量のファージを使用しなければならないのだろうか。これは、食品上での宿主とファージの接触効率に問題があると推察される。通常、食品を汚染する食中毒細菌の量は極めて少なく、低濃度のファージでは食品上で効率良く宿主に接触できない。一方、高いファージ濃度は宿主とファージを効率よく遭遇させるために重要と考えられる。Hagens and Loessner⁴⁶⁾ はこの問題について詳述し、対象細菌量が少ない時にはファージ濃度を十分高く (10^8 PFU/mL 以上) 設定すべきと述べている。

食品中でのファージの安定性も重要な要素である。例えば、メロン、ナシ、リンゴにおける *Listeria* ファージ P100 の効果を調べた研究⁴⁷⁾ では、リンゴとリンゴジュースでのみ *L. monocytogenes* の生菌数を減少させられなかった。これは、食品の pH が低くファージが急速に不活化したためである。同様の結果が他の論文⁴⁸⁾ で報告されている。使用する食品の pH はファージの有効性に大きく影響を及ぼすため、ファージの利用にあたっては留意する必要がある。

6. バクテリオファージ耐性菌

ファージの利用は効果的な微生物制御手法であるが、細菌はファージの感染に対してしばしば耐性を獲得する。これまで、様々なファージ耐性機構が研究されてきた。ファージ耐性機構を大まかに分類すると、①ファージの吸着阻害、②ファージの DNA 注入阻害、③注入されたファージ DNA の分解、④不稔感染（細菌の自殺）である⁴⁹⁾。ファージの吸着阻害では、宿主細胞表面上のレセプターとなるタン

パク質の変異や、他の物質によるレセプターのブロックングにより吸着を阻害する。ファージ DNA の分解では、制限修飾系と CRISPR-Cas システムが働く。CRISPR-Cas システムでは、外来 DNA 断片の獲得と獲得配列を基にした外来 DNA の切断が行われる。そのため、CRISPR-Cas システムは原核生物の獲得免疫機構とも呼ばれている。不稔感染では、ファージに感染した宿主細胞が自殺を行うことにより、細胞内でのファージの複製を阻害する。すなわち、自己を犠牲として集団を守る耐性機構である。また、細菌のクオラムセンシングを利用し、レセプターの発現量を変化させるファージ防御機構⁵⁰⁾⁵¹⁾ も見つかった。ファージと細菌の戦いは古くから続いてきた生存競争であり、ファージ耐性の獲得は細菌にとって重要な生存戦略のひとつである。一方、ファージ耐性に打ち勝つため、ファージは様々な策を講じる⁵²⁾。今後も興味深い多くのファージ耐性機構が発見されると考えられる。ファージ耐性機構の研究により、より効果的なファージ利用法が開発されることが期待される。

ファージ耐性菌の出現を抑制するためにはファージカクテルの利用が有効である。Tanji ら⁵³⁾ はファージ 1 株の単独使用に比べて、2 株を併用することにより *E. coli* O157:H7 の培養液での regrowth が遅れることを示した。また、O'Flynn ら⁵⁴⁾ もファージの混合によりファージ耐性菌の出現率が減少することを報告している。著者らも、*M. morganii* ファージ ΦMV-1 と ΦMV-4 の併用により、培養液中での regrowth が遅れることを経験している¹⁶⁾。ファージカクテルにより耐性菌の出現が抑制される理由は、ひとつのファージに耐性を獲得した菌株を、異なるファージが殺菌することができるためである（図 4）。また、ファージカクテルには上述の通りファージの宿主域を補い合うという効果もある。そのため、ファージを食品に用いる際には、ファージカクテルとして用いることが望ましい。

ファージ耐性菌は、実験的には比較的容易に分離することができる。著者らの研究¹⁶⁾ においても、宿主とファージを液体培地で共培養した際に宿主の regrowth が確認されている。しかし、食品の系（マグロ）で、ファージ処理後の増殖細菌を平板より分離し、ファージ感受性を確認した結果、分離した全ての株がファージ耐性を示さなかった。これは、他のファージを利用した著者らの研究⁴⁵⁾ でも同じである。また、ホットドックやターキー、スモークサーモンなどを使用した *Listeria* ファージの研究²³⁾ においても、ファージ処理後の耐性菌は分離されていない。同論文では、食品中で増殖した細菌はファージの感染から逃れた細菌達と考察している。これは、上述のファージ濃度の重要性とも関連し、食品上の細菌に対し、接種したファージが遭遇できなかったことを意味する。すなわち、食品中でファージ処理後に増殖する細菌の大部分は、ファージが到達しない箇所集落を形成していると考えられる。このこ

図 4 ファージカクテルによるファージ耐性菌の制御

ファージを一株のみ使用した場合、耐性菌が出現するまでファージは宿主を殺菌できるが (A)、レセプターの変異等により耐性菌が出現すると感染が不可能となる (B)。ファージカクテルでは、あるファージの耐性菌を別のファージで殺菌することが可能となる (C)。

とからも、食品微生物制御において、ファージの利用は完壁な手法ではなく、既存の微生物制御手法との併用によりその効果が最大限発揮されると言えるだろう。

先に紹介した研究は固体の食品にファージを応用した研究であるが、液体食品にファージを使用した研究⁵⁵⁾ではファージ耐性菌の出現を認めている。液体食品では、熱力学的な運動により液体中でのファージ-細菌の接触機会が多いためと考えられる。一方、*E. coli* ファージ 6 株を混合したカクテルを牛乳に応用した研究⁵⁶⁾では、保存後にファージカクテルに対する耐性菌は出現しなかった。以上より、液体食品は固体食品に比べファージ耐性菌の出現率が高いと考えられるが、ファージカクテルにより耐性菌出現率が低減できる可能性がある。

7. 終わりに

ファージは食品製造分野では厄介者として扱われてきたが、食中毒細菌を制御するための有益な存在として認知されてきている。ファージの利用は効果的な微生物制御手法のひとつであり、既存の手法との併用によりその効果はより大きくなる。国内でも、食品微生物制御を目的とした研究³⁷⁾⁵⁷⁾⁵⁸⁾だけでなく、感染症療法へのファージ研究⁵⁹⁾⁶⁰⁾も進められており、今後ファージの応用研究は広く展開すると期待される。現在、国内ではファージの利用は認められていないが、ファージの可能性に期待し、著者らもファージ利用の研究を続けたいと考えている。紙面の都合上紹介できなかったが、ファージを利用した微生物制御技術には、溶菌酵素エンドライシンの利用も検討されており、またファージを利用した細菌検出技術の開発も期待できる。これらの研究を紹介した優れた総説¹²⁾⁶¹⁾⁶²⁾が存在するので、興味がある方は是非参照されたい。

文 献

- 1) Leistner, L. and Gorris, L.G.M. (1995). Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Tech.*, **6**, 41-46.
- 2) Reardon, S. (2014). Phage therapy gets revitalized. *Nature*,

- 510, 15-16.
- 3) Twort, F.W. (1915). An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet*, **186**, 1241-1243.
- 4) d'Hérelle, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, **165**, 373-375.
- 5) Ackermann, H.-W. and Prangishvili, D. (2012). Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch. Virol.*, **157**, 1843-1849.
- 6) Ackermann, H.-W. (2012). Life in Science. *Bacteriophage*, **2**, 207-207.
- 7) Ackermann, H.-W. (2009). Phage classification and characterization. *Methods Mol. Biol.*, **501**, 127-140.
- 8) Barylski, J., Enault, F., Dutilh, B. E., Schuller, M. B. P., Edwards, R.A., Gillis, A., Klumpp, J., Knezevic, P., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Lavigne, R., Oksanen, H.M., Sullivan, M.B., Jang, H. B., Simmonds, P., Aiewsakun, P., Wittmann, J., Tolstoy, I., Brister, J.R., Kropinski, A.M., and Adriaenssens, E.M. (2020). Analysis of Spounaviruses as a case study for the overdue reclassification of tailed phages. *Syst. Biol.*, **69**, 110-123.
- 9) Nakonieczna, A., Cooper, C.J., and Gryko, R. (2015). Bacteriophages and bacteriophage-derived endolysins as potential therapeutics to combat Gram-positive spore forming bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, **119**, 620-631.
- 10) Wang, I.-N., Smith, D.L., and Young, R. (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.*, **54**, 799-825.
- 11) Fischetti, V.A. (2008). Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 393-400.
- 12) Schmelcher, M. and Loessner, M.J. (2016). Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **37**, 76-87.
- 13) Penadés, J.R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N., and Novick, R.P. (2015). Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. *Curr. Opin. Microbiol.*, **23**, 171-178.
- 14) Park, M., Lee, J.-H., Shin, H., Kim, M., Choi, J., Kang, D.-H., Heu, S., and Ryu, S. (2012). Characterization and comparative genomics analysis of a novel bacteriophage, SFP10, simultaneously inhibiting both *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157: H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 58-69.
- 15) Cha, Y., Chun, J., Son, B., and Ryu, S. (2019). Characterization and genome analysis of *Staphylococcus aureus* podovirus CSA13 and its anti-biofilm capacity. *Viruses*, **11**, 54.
- 16) Yamaki, S., Kuroshima, S., Kawai, Y., and Yamazaki, K. (2020). Inhibitory effect of a combination with jumbo bacte-

- riophage Φ MV-1 and Φ MV-4 on *Morganella morganii* subsp. *morganii* growth and histamine accumulation. *Int. J. Food Microbiol.*, **317**, 108457.
- 17) Bradbeer, C., Woodrow, M.L., and Khalifah, L.I. (1976). Transport of vitamin B₁₂ in *Escherichia coli*: common receptor system for vitamin B₁₂ and bacteriophage BF23 on the outer membrane of the cell envelope. *J. Bacteriol.*, **125**, 1032–1039.
 - 18) Raimondo, L.M., Lundh, N.P., and Martinez, R.J. (1968). Primary adsorption site of phage PBS1: the flagellum of *Bacillus subtilis*. *J. Virol.*, **2**, 256–264.
 - 19) Sandulache, R., Prehm, P., Expert, D., Toussaint, A., and Kamp, D. (1985). The cell receptor for bacteriophage Mu G (-) in *Erwinia* and *Escherichia coli* C. *FEMS Microbiol. Lett.*, **28**, 307–310.
 - 20) Takeuchi, I., Osada, K., Azam, A.H., Asakawa, H., Miyana, K., and Tanji, Y. (2016). The presence of two receptor-binding proteins contributes to the wide host range of Staphylococcal T wort-like phages. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 5763–5774.
 - 21) Nobrega, F.L., Vlot, M., de Jonge, P.A., Dreesens, L.L., Beaumont, H.J.E., Lavigne, R., Dutilh, B.E., and Brouns, S.J.J. (2018). Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. *Nat. Rev. Microbiol.*, **16**, 760–773.
 - 22) Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., de Meester, E.D., and Loessner, M.J. (2005). Bacteriophage P. 100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analysis, oral toxicity study, and application. *Regul. Toxicol. Pharm.*, **43**, 301–312.
 - 23) Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., and Loessner, M.J. (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 93–100.
 - 24) Soni, K.A. and Nannapaneni, R. (2010). Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *J. Food Prot.*, **73**, 32–38.
 - 25) Chibeu, A., Agius, L., Gao, A., Saboor, P.M., Kropinski, A.M., and Balamurugan, S. (2013). Efficacy of bacteriophage LISTEX™P. 100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. *Int. J. Food Microbiol.*, **167**, 208–214.
 - 26) Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M.Y., Dean, T., Senecal, A., and Sulakvelidze, A. (2008). Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157: H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6230–6238.
 - 27) Sharma, M., Patel, J.R., Conway, W.S., Ferguson, S., and Sulakvelidze, A. (2009). Effectiveness of bacteriophage in reducing *Escherichia coli* O157: H7 on fresh-cut cantaloupes and lettuce. *J. Food Prot.*, **72**, 1481–1485.
 - 28) Carter, C.D., Parks, A., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., Magnone, J., Senecal, A., Kropinski, A.M., and Sulakvelidze, A. (2012). Bacteriophage cocktail significantly reduces *Escherichia coli* O157: H7 contamination of lettuce and beef, but does not protect against recontamination. *Bacteriophages*, **2**, 178–185.
 - 29) Vally, H., Hall, G., Dyda, A., Raupach, J., Knope, K., Combs, B., and Desmarchelier, P. (2012). Epidemiology of Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Australia, 2000–2010. *BMC Public Health*, **12**, 63.
 - 30) Luna-Gierke, R.E., Griffin, P.M., Gould, L.H., Herman, K., Bopp, C.A., Strockbine, N., and Mody, R.K. (2014). Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiol. Infect.*, **142**, 2270–2280.
 - 31) Fruth, A., Prager, R., Tietze, E., Rabsch, W., and Flieger, A. (2015). Molecular epidemiological view on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* causing human disease in Germany: diversity, prevalence, and outbreaks. *Int. J. Med. Microbiol.*, **305**, 697–704.
 - 32) Vikram, A., Tokman, J.I., Woolston, J., and Sulakvelidze, A. (2020). Phage biocontrol improves food safety by significantly reducing the level and prevalence of *Escherichia coli* O157: H7 in various foods. *J. Food Prot.*, **83**, 668–676.
 - 33) Woolston, J., Parks, A.R., Abuladze, T., Anderson, B., Li, M., Carter, C., Hanna, L.F., Heyse, S., Charbonneau, D., and Sulakvelidze, A. (2013). Bacteriophages lytic for *Salmonella* rapidly reduce *Salmonella* contamination on glass and stainless steel surfaces. *Bacteriophage*, **3**, e25697.
 - 34) Sukumaran, A.T., Nannapaneni, R., Kiess, A., and Sharma, C.S. (2016). Reduction of *Salmonella* on chicken breast fillets stored under aerobic or modified atmosphere packaging by the application of lytic bacteriophage preparation SalmoFresh™. *Poult. Sci.*, **95**, 668–675.
 - 35) Zhang, X., Niu, Y.D., Nan, Y., Stanford, K., Holley, R., McAllister, T., and Narváez-Bravo, C. (2019). SalmoFresh™ effectiveness in controlling *Salmonella* on romaine lettuce, mung bean sprouts and seeds. *Int. J. Food Microbiol.*, **305**, 108250.
 - 36) Zhang, H., Wang, R., and Bao, H. (2013). Phage inactivation of foodborne *Shigella* on ready-to-eat spiced chicken. *Poult. Sci.*, **92**, 211–217.
 - 37) Furuta, M., Nasu, T., Umeki, K., Minh, D.H., Honjoh, K., and Miyamoto, T. (2017). Characterization and application of lytic bacteriophages against *Campylobacter jejuni* isolated from poultry in Japan. *Biocontrol Sci.*, **22**, 213–221.
 - 38) Tabla, R., Martínez, B., Rebollo, J.E., González, J., Ramírez, M.R., Roa, I., Rodríguez, A., and García, P. (2012). Bacteriophage performance against *Staphylococcus aureus* in milk is improved by high hydrostatic pressure treatments. *Int. J. Food Microbiol.*, **156**, 209–213.
 - 39) Bandara, N., Jo, J., Ryu, S., and Kim, K.-P. (2012). Bacteriophages BCP1-1 and BCP8-2 require divalent cations for efficient control of *Bacillus cereus* in fermented foods. *Food Microbiol.*, **31**, 9–16.
 - 40) Yamaki, S., Kawai, Y., and Yamazaki, K. (2015). Characterization of a novel bacteriophage, Phd1, infecting the histamine-producing *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *J. Appl. Microbiol.*, **118**, 1541–1550.
 - 41) Rountree, P.M. (1951). The role of certain electrolytes in the adsorption of staphylococcal bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 673–680.
 - 42) Potter, N.N. and Nelson, F.E. (1953). Role of calcium and related ions in proliferation of lactic streptococcus bacteriophage. *J. Bacteriol.*, **66**, 508–516.
 - 43) Landry, E.F. and Zsigray, R.M. (1980). Effects of calcium on the lytic cycle of *Bacillus subtilis* phage 41c. *J. Gen. Virol.*, **51**, 125–135.
 - 44) Chhibber, S., Kaur, T., and Kaur, S. (2014). Essential role of calcium in the infection process of broad-spectrum methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteriophage. *J. Basic Microbiol.*, **54**, 775–780.
 - 45) Yamaki, S., Kawai, Y., and Yamazaki, K. (2018). Biocontrol of *Morganella morganii* subsp. *morganii* and histamine accumulation in tuna meat by treatment with a lytic bacteriophage. *Food Sci. Tech. Res.*, **24**, 329–337.
 - 46) Hagens, S. and Loessner, M.J. (2010). Bacteriophage for

- biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **11**, 58–68.
- 47) Oliveira, M., Viñas, I., Colàs, P., Anguera, M., Usall, J., and Abadias, M. (2014). Effectiveness of a bacteriophage in reducing *Listeria monocytogenes* on fresh-cut fruits and fruit juice. *Food Microbiol.*, **38**, 137–142.
- 48) Leverentz, B., Conway, W.S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W.J., Fuchs, Y., Camp, M.J., Chighladze, E., and Sulakvelidze, A. (2001). Examination of bacteriophage as a biocontrol method for *Salmonella* on fresh-cut fruit: a model study. *J. Food Prot.*, **64**, 1116–1121.
- 49) Labrie, S.J., Samson, J.E., and Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 317–327.
- 50) Høyland-Kroghsbo, N.M., Mærkedahl, R.B., and Sørensen, S.L. (2013). A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *mBio*, **4**, e00362–12.
- 51) Tan, D., Sørensen, S.L., and Middelboe, M. (2015). Quorum sensing determines the choice of antiphage defense strategy in *Vibrio anguillarum*. *mBio*, **6**, e00627–15.
- 52) Samson, J.E., Magadán, A.H., Sabri, M., and Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat. Rev. Microbiol.*, **11**, 675–687.
- 53) Tanji, Y., Shimada, T., Yoichi, M., Miyanaga, K., Hori, K., and Unno, H. (2004). Toward rational control of *Escherichia coli* O157: H7 by a phage cocktail. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 270–274.
- 54) O'Flynn, G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Coffey, A. (2004). Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157: H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3417–3424.
- 55) Guenther, S., Herzig, O., Fieseler, L., Klumpp, J., and Loessner, M. J. (2012). Biocontrol of *Salmonella* Typhimurium in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2. *Int. J. Food Microbiol.*, **154**, 66–72.
- 56) Tomat, D., Casabonne, C., Aquili, V., Balagué, C., and Quiberoni, A. (2018). Evaluation of a novel cocktail of six lytic bacteriophages against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in broth, milk and meat. *Food Microbiol.*, **76**, 434–442.
- 57) Duc, H.M., Son, H.M., Honjoh, K., and Miyamoto, T. (2018). Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat. *LWT-Food Sci. Technol.*, **91**, 353–360.
- 58) Duc, H.M., Son, H.M., Yi, H.P.S., Sato, J., Ngan, P.H., Masuda, Y., Honjoh, K., and Miyamoto, T. (2020). Isolation, characterization and application of a polyvalent phage capable of controlling *Salmonella* and *Escherichia coli* O157: H7 in different food matrices. *Food Res. Int.*, **131**, 108977.
- 59) Furusawa, T., Iwano, H., Hiyashimizu, Y., Matsubara, K., Higuchi, H., Nagahara, H., Niwa, H., Katayama, Y., Kinoshita, Y., Hagiwara, K., Iwasaki, T., Tanji, Y., Yokota, H., and Tamura, Y. (2016). Phage therapy is effective in a mouse model of bacterial equine keratitis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 5332–5339.
- 60) Iwano, H., Inoue, Y., Takasago, T., Kobayashi, H., Furusawa, T., Taniguchi, K., Fujiki, J., Yokota, H., Usui, M., Tanhi, Y., Hagiwara, K., Higuchi, H., and Tamura, Y. (2018). Bacteriophage ΦSA012 has a broad host range against *Staphylococcus aureus* and effective lytic capacity in a mouse mastitis model. *Biology*, **7**, 8.
- 61) Oliveira, H., Azeredo, J., Lavigne, R., and Kluskens, L.D. (2012). Bacteriophage endolysins as a response to emerging foodborne pathogens. *Trends Food Sci. Tech.*, **28**, 103–115.
- 62) Schmelcher, M. and Loessner, M.J. (2014). Application of bacteriophages for detection of foodborne pathogens. *Bacteriophage*, **4**, e28137.

引用 URL

- i) <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (2020. 6. 16)

(令和2年5月29日受理)