

2019年度日本食品微生物学会賞受賞総説

水産食品を中心とした危害微生物とその制御に関する研究

Study on Harmful Microorganisms and Their Control on Seafood

木村 凡*

(東京海洋大学学術研究院)

Laboratory of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology,
Tokyo University of Marine Science and Technology: 4-5-7 Konan, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan

はじめに

このたび第1回日本食品微生物学会賞を受賞することになり、大変光栄に思う。以下に、受賞対象となった研究の概要を紹介する。受賞対象の研究内容の大半は東京海洋大学（旧東京水産大学）に着任した以降の仕事になる。しかし一部はその前任校である農林水産省水産大学校勤務時に着手したものもある。以下に順を追って振り返ってみたい。

ガス置換包装

もともと私は1985年に京都大学で博士課程を終えるまでは琵琶湖における淡水赤潮藻類の増殖生理の研究を行い、また、その後助手として採用された農林水産省水産大学校においても、当時の微生物学研究室教授の藤沢浩明先生のもとで瀬戸内海における石油分解細菌など、環境微生物分野の研究を行っていた。しかし水産大学校での所属学科は食品系の学科だった関係で、食品のテーマにも着手することとなった。その最初のテーマがガス置換包装である。特に二酸化炭素を食品の包装気相に一

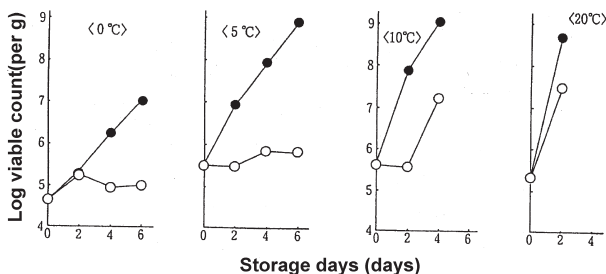


Fig. 1. Changes in the number of spoilage bacteria when Japanese mackerel fillet is packaged in air (●) and carbon dioxide (40% carbon dioxide, 60% nitrogen) (○) and stored at different storage temperatures

定の割合に混合する二酸化炭素包装の研究に1988年に着手した。将来的には真空包装だけではなくガス置換包装が食品の1つの主要な流通形態になるだろうと予測してのことであった。手始めにマアジの切り身を二酸化炭素40%（残りは窒素60%）包装をすると腐敗細菌の増殖が抑制され賞味期限が延びることを明らかにした³⁾

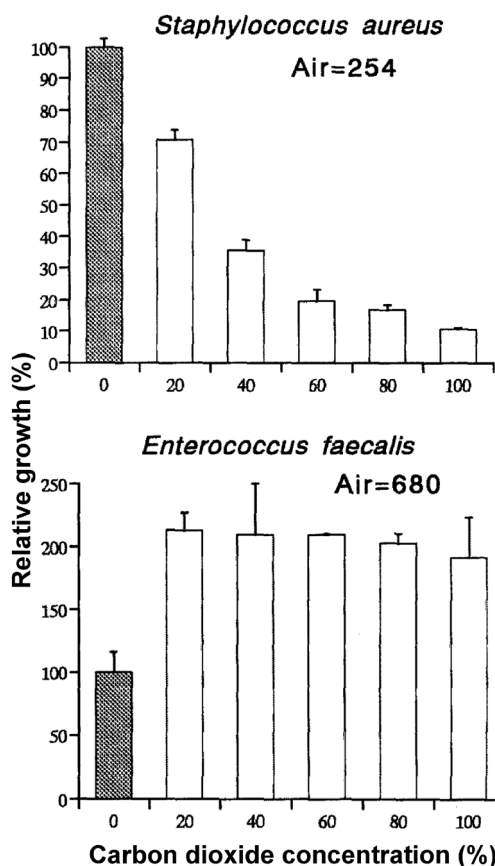


Fig. 2. Growth of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* on agar surface at 30°C with different concentrations of carbon dioxide packaging (in nitrogen gas)
Growth refers to the relative percentage of growth in 100% nitrogen packaging.

* 連絡先

〒108-8477 東京都港区港南4-5-7

(Fig. 1). その後の研究においても、鮮魚の切り身の賞味期限の延長に二酸化炭素包装が効果的であることを確認した⁴⁾. また、東京水産大学へ転勤後、*in vitro*における各種微生物の増殖における各種二酸化炭素濃度の影響の研究を進めた結果、微生物の種類によって二酸化炭素の感受性が異なることも見いだした^{5,8)}. 特に興味深かったのは、乳酸菌のグループは高濃度の二酸化炭素包装でもその増殖を制御されず、むしろ増殖が促進されてしまうということであった⁸⁾ (Fig. 2). 当時は現在のように包装食品における変敗乳酸菌の問題は顕在化していなかったが、この研究を通じて、将来的に包装食品において乳酸菌の制御が最も難しい課題になるであろうことを予測した. また、二酸化炭素が微生物の増殖を抑制するメカニズムを明らかにするために、まずは二酸化炭素の溶解によるpHの影響を排除した実験系を組んだ. 緩衝材によってpHを一定にした平板培地上で大腸菌と黄色ブドウ球菌の増殖に対する二酸化炭素による影響について調べた結果、pHによる影響を排除しても二酸化炭素によってどちらの細菌も増殖が抑制されることが分かった⁹⁾. 二酸化炭素と微生物の増殖については本学会誌の総説にまとめた⁷⁾.

またガス置換包装を実用的に展開させるためには、賞味期限の延長だけでなく、食中毒リスクの観点での研究も必要であったので、包装食品における最大の危害であるクロストリジウム属の増殖挙動についても研究を行った. まずはウエルシュ菌の研究⁶⁾を行っていたが、ボツリヌス菌のリスク解析を行う必要があると考え、当時の予防衛生研究所の五十君静氏にボツリヌス菌をご分与いただき、研究を進めた. これらの研究成果の延長として、2003年に厚生労働省が問題提起を行った無菌米飯などの無菌包装食品のリスク評価へとつながった^{2,15)}.

TaqManPCRとの出会い

1994年より東京水産大学（現：東京海洋大学）の藤井建夫教授のもとで食品微生物学研究室の助教授に着任することになった. 当時は、PCR法と蛍光DNAシーケンサーが登場し分子生物学的手法が各応用科学分野へ

応用され始める黎明期であった. 転勤直前に、日本微生物生態学会の懇親会で、旧知の山本啓之氏（現：海洋開発研究機構）から、「メリーランド大学のRita Colwell教授のところで博士号を取得したPerkin-Elmer社のR&DのChristine Paszko-Kolvaが、食品微生物分野での共同研究相手を探している」との話があり、彼女と会うことにした. 1995年5月、Paszko-KolvaならびにPerkin-Elmer社のR&Dの他2名が来日し、東京水産大学の研究室で打ち合わせた. その内容は、1993年に同社のLeeらがFRET（蛍光共鳴エネルギー転移）に関するものであった. すなわち、のちのTaqMan PCRである. 食品微生物学分野での共同研究を提案され、手始めにサルモネラの検出に本技術に応用することになった. といっても、菌株を持ち合わせていなかったのので、藤井先生とともに東京都立衛生研究所の伊藤 武先生、楠 淳先生をお訪ねし、血清型の異なるサルモネラ菌株40株を分けていただいた. 当時はまだTaqMan PCR専用の検出装置は存在していなかったのので、とりあえず、Perkin-Elmer社から借りた蛍光測定装置LS50Bでエンドポイントの測定を始めた. 当時の研究課題は、プローブ上での蛍光色素と消光色素との位置関係が問題で(Fig. 3)、種々の改良プローブを米国から送ってもらい、その都度、種々のサルモネラ菌株のPCR蛍光の差異を測定した. これらの研究は、この年の4年生として入室してきた川崎晋君（現：(独)食品総合研究所）に卒論テーマとして取り組んでもらった. その後、Perkin-Elmer本社の研究の進捗により、消光色素の位置とレポーター色素の位置はプローブの両端につけプローブを短くすれば問題ないことが判明した. 最終的に、研究成果は同社のサルモネラ検出キット開発へとつながった¹⁰⁾. この論文を発表した当時は、RQ+をサンプルの（reporterの波長放射強度）／（quencherの波長放射強度）の値で定義していた. Fig. 4はそうにして測定したサルモネラのdRQ値と培養法で測定したサルモネラ菌量との関係を示したものである¹⁰⁾.

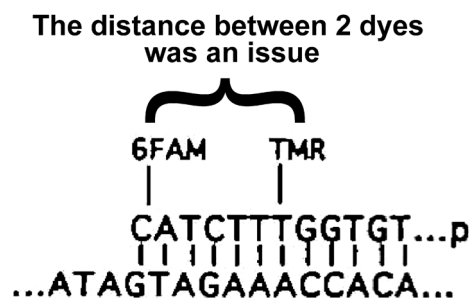


Fig. 3. Prototype TaqMan probe in 1995
The reporter and quencher dye were placed at a fixed distance from the tip of the probe instead of both ends.

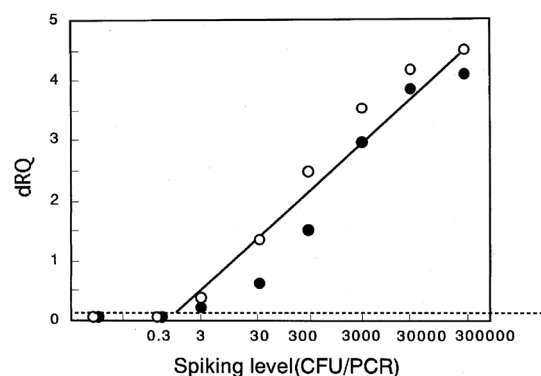


Fig. 4. Detection of *Salmonella* Typhimurium in a pure culture (TSB) using 5' nuclease assay
EnviroAmp method, ○; Chelex method, ●; Dotted line indicates the detection limit.

リアルタイム定量PCRへの展開

Taqman PCRが開発されて間もなく、この原理を利用したリアルタイム定量PCRの原理が登場した。そこでこの技術を食品微生物分野にも導入したいと考えたが、いくつかの課題もあった。その1つは食品微生物の検査分野においては、当時は定性的な検査が主流であり定量のニーズはそれほど大きくないと考えたことである。また、定量が可能だったとしても、生菌・死菌の判別が困難であるという問題もあった。そこで、まずは定量の必要性があり、かつ、生菌死菌の問題が生じないテーマにこの技術を応用してみようと考えた。

そこで、包装食品などでのボツリヌス菌の増殖をリアルタイム定量PCRで迅速測定する手法の開発を行うことにした。従来のボツリヌスリスクの検査は、ボツリヌス毒素の検出法としてマウスを用いる毒性試験及びボツリヌス菌の培養など、測定の手間、迅速性の問題からも、大量のサンプルのボツリヌスリスク評価には向いていなかった。リアルタイム定量PCRによるリスク評価法により、様々な条件を組み合わせた食品にボツリヌス菌を植菌して、様々な温度管理下で保存した多数のサンプルを凍結貯蔵し、1日の実験日で一斉分析（リアルタイム定量解析）を行うことが可能となった。その成果を、2001年に発表した¹²⁾ (Fig. 5)。論文タイトルに「real time PCR」を使わず、「rapid quantitative PCR」という言葉を使ったのは、当時はまだリアルタイム定量PCRという言葉が普及していなかったからである。

その後、リアルタイム定量PCRは、この技術の有する定量性の利点よりも、PCR反応に伴う蛍光シグナルのデジタル情報の利便性に基づく定性分析において食品微生物

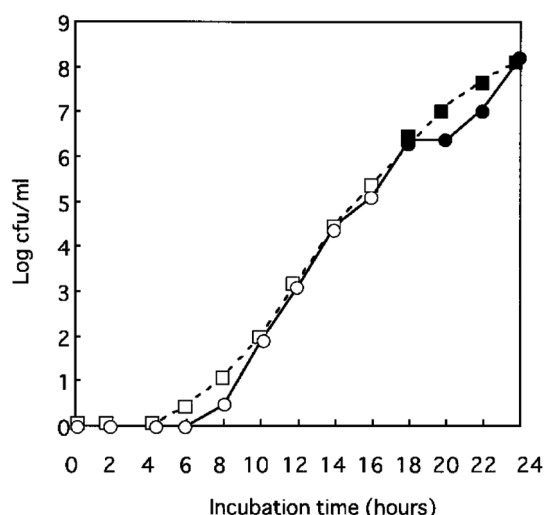


Fig. 5. Growth curves constructed by culture methods (□) and the rapid, quantitative PCR assay (○) with a pure culture of *Clostridium botulinum* type E (Iwanai). The culture (in TSB) was incubated at 30°C. Solid symbols denote the samples detected with BoNT by mouse assay.

分野で広く応用されるようになり、今日に至っている。

ヒスタミン生成菌の分子機構

鮮魚におけるヒスタミンの生成細菌については、私が東京水産大学に転勤する直前まで微生物学研究室で教授を務められていた奥住昌世教授のライフワークであった。私が着任した当時、後任教授である藤井建夫教授が、水産発酵食品のグラム陽性ヒスタミン生成菌の研究を進めていた。ヒスタミンの問題は水産学分野においても食品衛生分野において重要なテーマであったので、私もヒスタミン生成菌の研究に加わることにした。

まず手始めに行なったのが、海洋性の中温性グラム陰性ヒスタミン生成細菌の細分類である。当時、ヒスタミン生成能のある海洋細菌として *Photobacterium histaminum* が提案されていた。これを、魚病細菌としてよく知られている *Photobacterium damsela* と同種であることを、DNA-DNAハイブリダイゼーションなどの実験により証明し、再分類を行った¹¹⁾。また、ヒスタミン生成菌はなぜヒスチジンを細胞内に取り込んでヒスタミンを細胞外に出すのかということに興味を持った。一般的にアミノ酸を細菌が取り込んで脱アミノ反応を行う場合は有機酸に変換されたアミノ酸がエネルギー源へと変換される。しかし、脱炭素反応によって生じたアミンを細胞外に放出するだけではその細菌にとってエネルギー収支的には寄与するところがない。当時、サルモネラや大腸菌などの耐酸性のメカニズムとしてアミノ酸脱炭酸酵素の役割の研究結果が国際的に発表されるようになっていた。そこでヒスチジン脱炭酸酵素の役割もヒスタミン生成菌の耐酸性に関与しているのではないかと考えた。この仮説を証明するためには、ヒスチジン脱炭酸酵素の遺伝子のクローニングを行い、その発現機構を詳細に調べる必要があった。しかし当時はヒスチジン脱炭酸酵素の遺伝子については、グラム陽性菌の酵素についてはその遺伝子配列が明らかになっていたが、グラム陰性菌については未知であった。

そこでまずは *Photobacterium damsela* のヒスチジン脱炭酸酵素のクローニングから始めることにした。*Photobacterium damsela* のヒスチジン脱炭酸酵素と関連遺伝子のクローニングを行い、*hdcT*、*hdcA* および *hisRS* と名付けた3つのオープンリーディングフレームを同定した¹⁷⁾ (Fig. 6)。*hdcA* 遺伝子は377アミノ酸のポリペプチドをコードし、ピリドキサルP依存性ヒスチジン脱炭酸酵素であると推定した。*hdcT* 遺伝子はヒスチジン/ヒスタミンアンチporterであると想定され、*hisRS* 遺伝子はヒスチジル tRNA シンターゼであると推測した。また、*P. damsela* *hdc* 遺伝子を運ぶプラスミドを保有する組換え大腸菌株は、細胞外でヒスタミンを過剰排出することが示された。ノーザンブロット分析および定量的RT-PCRにより、低pHおよびヒスチジン過剰の条件下で *hdcA*、*hdcT* および *hisRS* 遺伝子の高レ

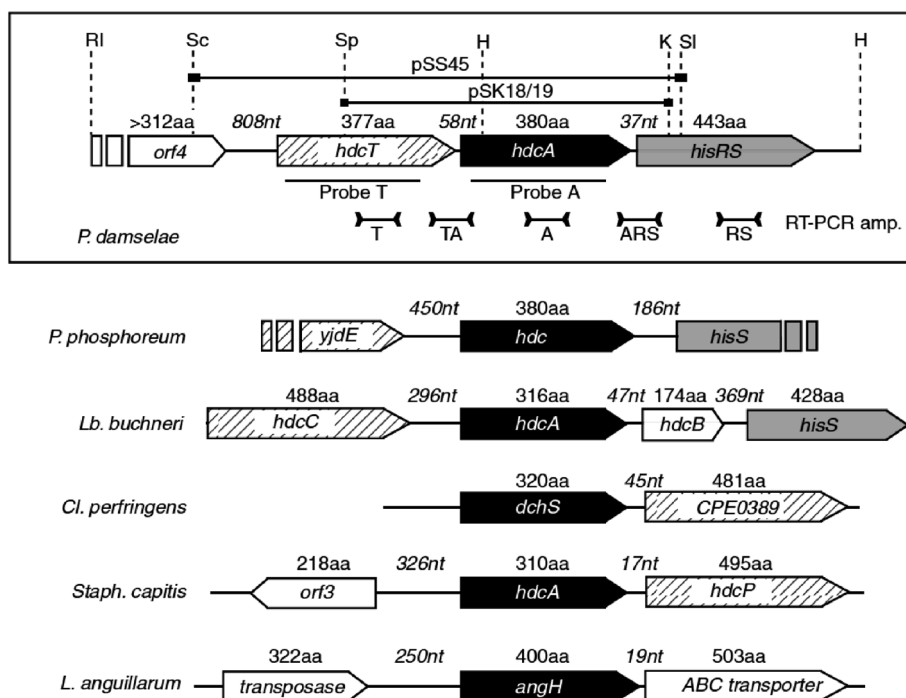


Fig. 6. Schematic representation of the histidine decarboxylase gene clusters of *Photobacterium damsela* (in the box), *P. phosphoreum*, *Lactobacillus buchneri*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus capitis* and *Listonella anguillarum*. Genes with identical putative functions are depicted by identical shading.

ベルのモノおよびバイシストロン性転写産物が明らかになった¹⁷⁾ (Fig. 7). 以上の研究の結果, グラム陰性ヒスタミン生成細菌のヒスチジン脱炭酸酵素遺伝子の発現は確かに酸によって誘導され, その目的が耐酸性に関与していることを明らかにすることができた.

また水産発酵食品においてヒスタミン生成の原因となるグラム陽性菌のヒスタミン生成菌の *Tetragenococcus muriticus* のヒスタミンの生成機構や, 遺伝子の発現機構などについての研究も行った^{13,19)}.

腸炎ビブリオの耐酸歳の分子機構

ヒスタミン生成菌のヒスチジン脱炭酸酵素と耐酸性の研究を進めていく過程で, 腸炎ビブリオの耐酸性のメカニズムにも興味を持つようになった. 当時大腸菌やサルモネラについての耐酸性に関する研究が行われ始めていたが, 腸炎ビブリオについてはまだ行われていなかった. そこで腸炎ビブリオのリジン脱炭酸酵素の遺伝子をクローニングしその発現機構を詳細に調べることにした. この際腸炎ビブリオ菌株は血清型 O3:K6 を東京都立健康安全センターの諸角 聖, 甲斐明美, 尾畑浩魅氏から分与していただいた. 実験に用いた *V. parahaemolyticus* の 11 株すべてが, 酸適応後の致死的酸性条件で生残し, その際培地中にカダベリンの蓄積が検出された. また, リジンの添加により生存率が向上し, リジンデカルボキシラーゼが適応耐酸性応答に役割を果たすことが示唆された. そこで, リジン脱炭酸構造の遺伝子のクローニングを行うことにした. 2つのオープンリーディング

フレーム (ORF) は, 非コーディング領域によって分離され, リジン脱炭酸酵素 (*cadA*) およびリジナーカダベリンアンチポーター (*cadB*) 遺伝子と高度に相同であることがわかった. オペロンの転写分析により, 酸の誘導と, 外部リジンによる誘導が認められた²¹⁾ (Fig. 8). また, *cadA* 遺伝子の破壊変異株では, 酸の生存が弱くなることも明らかとなった. これらの実験結果から, 腸炎ビブリオは, 酸性条件下での生存のためにリジン脱炭酸酵素を利用していることを証明できた²¹⁾ (Fig. 9).

腸炎ビブリオの MLVA 解析

上述してきた研究の流れからは若干横道に逸れるが, 腸炎ビブリオ血清型 O3:K6 株の遺伝学的な近縁性について興味を持ち, 反復配列多型解析法 (multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis; MLVA 法) 解析を行った. 1996~2003 年の期間中に東京で異なる発生または散发性の症例から得られた独立したヒト分離株を対象とした. 28 株のパンデミック *V. parahaemolyticus* O3:K6 株の MLVA 分析は, 28 の異なる VNTR パターンを示した. VNTR 遺伝子座は, Nei の多様性指数が 0.35~0.91 の範囲で, 8 つの遺伝子座のそれぞれで 2~15 の対立遺伝子が認められた. 腸炎ビブリオにおいても MLVA の遺伝子型別検査法として有効であることを証明した¹⁶⁾.

水産食品のリステリアリスク解析

東京水産大学に転勤し数年経った頃, 新しいテーマに

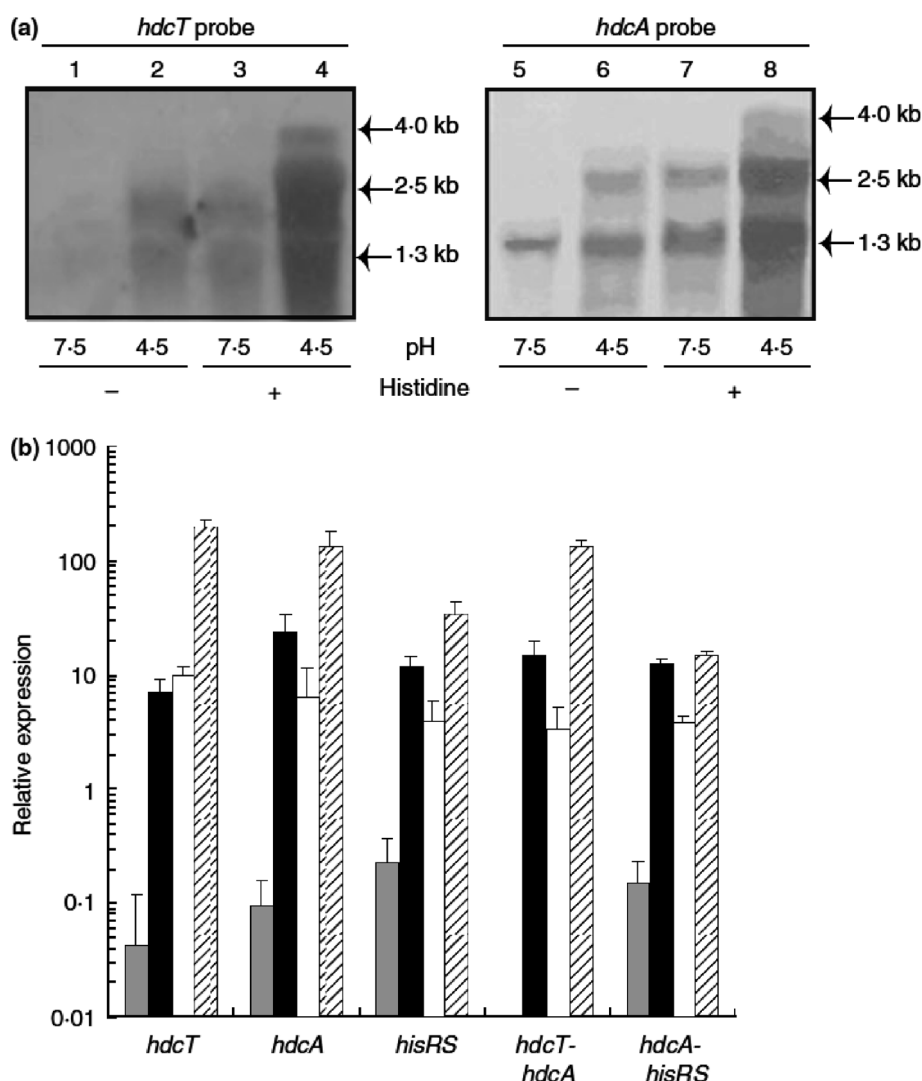


Fig. 7. Transcriptional analyses of the *hdc* genes of *Photobacterium damsela* under different culture conditions (a) Northern blot hybridization. (b) Quantification of mRNA extracted from cells treated with pH 7.5 (grey bars), pH 4.5 (solid bars), pH 7.5 with histidine (white bars), and pH 4.5 with histidine (hatched bars).

取り組みたいと考えるようになった。1990年代後半の頃であるが、まだインターネット検索が現在ほど発展していなかった時代なので、食品微生物学に関する英語専門書籍を多数買い集めていた。そこで出会ったのが、1998年に出版された「*LISTERIA—A practical approach to the organism and its control in foods*」¹⁾という本である。Ready to eat食品ということであれば、生食文化の日本の食品は本当に大丈夫なのだろうかと思ったのがきっかけである。しかし、3年間ほどは新しいテーマを担当できる学生がいなかったため、このテーマに着手することができなかった。

2001年にノースカロライナ大学に早稲田大学から留学していた宮 聡子さんから、われわれの研究室の大学院に進学したいのとメールを受け取った。彼女とは面識もなかったが、大学院の修士課程および博士課程で研究を行いたいとの意向であったため、リステリアのテーマに取り組むチャンスだと考え、彼女に取り組んでもら

うことにした。そこで、わが国は魚介類を中心とした生食文化であることから、わが国特有のready-to-eat食品である生鮮用魚介類について調査することにした。1都3県内のスーパーマーケットなどから生食用魚介類48種を購入し、リステリア汚染菌を調査したところ、ほとんどの製品からリステリアは検出されなかったもの、ネギトロと魚卵製品鶏のみにおいては高い確率で検出された。そこでこれらの食品から分離されたリステリアの血清型を調べたところ、血清型1/2a, 1/2b, 4bの3血清型の菌株が全体の79%を占めていた。すなわち血清型に関しては、水産食品を汚染していた株と米国などで重篤な食中毒を引き起こした臨床株との間に明確な違いが認められなかった^{22,25)} (Table 1)。そこで、分離株の病原性や分子タイピング的な性状を詳細に明らかにすることにした。ただしこのような研究を進めるためには、対照株として米国や欧州などで重篤な食中毒を起こしてきた臨床株を手元に入手する必要がある。そこで、米国

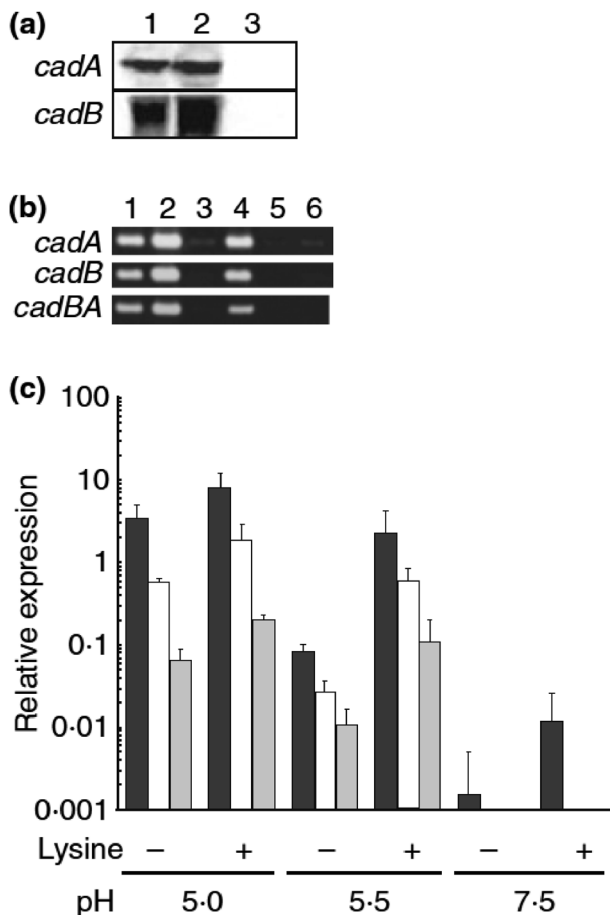


Fig. 8. Transcriptional analysis of *cadBA* genes
(a) Northern blot hybridization analysis for *cadA* or *cadB* mRNA of *Vibrio parahaemolyticus* V02-64. lane 1, pH 5.5; lane 2, pH 5.5 supplemented with 1% lysine; and lane 3, pH 7.5 with lysine.
(b) Agarose gel images after 25 cycles of reverse transcriptase (RT)-polymerase chain reaction (PCR) under the following conditions: lane 1, pH 5.0; lane 2, pH 5.0 with lysine; lane 3, pH 5.5; lane 4, pH 5.5 with lysine; lane 5, pH 7.5; lane 6, pH 7.5 with lysine.
(c) Relative expression analysis of *V. parahaemolyticus* lysine decarboxylase genes as detected by SYBR Green I real-time quantitative PCR under three pH conditions in the absence and presence of lysine.

コーネル大学のWiedmann博士に菌株を分与してもらった。

臨床株が手元に入手できたので、水産分離株と臨床株の病原性の違いについて、細胞侵襲性、マウス毒性、遺伝子正常などの角度から詳細に明らかにすることとした。水産分離株および米国の臨床株をマウス尾静脈から接種し、3日後の肝臓および脾臓を摘出し、両臓器内のリステリア菌数を比較した。その結果全てのマウスの肝臓および脾臓から、本菌が検出されたが、各臓器に感染した方菌の数は食品分離株と臨床株との間に有意差は認められず、水産分離株は同程度の病原性を有しているということが示唆された²⁵⁾ (Fig. 10)。

リステリアは腸管上皮細胞に侵入する際にリステリア

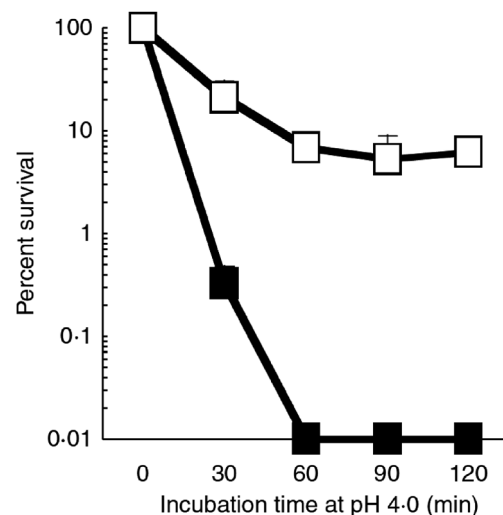


Fig. 9. Acid resistance of the *Vibrio parahaemolyticus* *cadA* gene mutant and wild-type strains
Cells were all acid adapted in LB (pH 5.5) for 1 h to induce the acid-shock proteins. Acid-adapted cells were acid challenged in no citrate E medium (phosphate buffer, pH 4.0) with lysine at 37°C. The survival of wild-type strain cells (open boxes) was reduced to one-tenths after 120 min, although survival of *cadA*-inactivated strain cells decreased immediately (closed boxes).

Table 1. Serotype distribution of *L. monocytogenes* isolates from minced tuna and fish roe samples^a

Sample type	No. of isolates					
	Total	By serotype				
		1/2a	3a	1/2b	3b	4b
Minced tuna	15	12		2		1
Salmon roe	6	4		2		
Cod roe	18	5	7	3	1	2
Total	39	21	7	7	1	3

^a From 36 *L. monocytogenes*-positive samples (14 minced tuna, 7 salmon roe, and 15 cod roe samples) determined by mini-VIDAS LMO (Table 1), 39 isolates were obtained, with 3 food samples producing no isolates. Two isolates with different subtypes (serotypes and/or MLSTs) were obtained from six food samples.

菌体表層蛋白質であるインターナリン A (Internalin A, InlA) を用いて、宿主側腸管上皮細胞上の受容体 E-カドヘリンと結合する (Fig. 11)。当時パスツール研究所の研究者や米国のウィードマンらが、食品から分離されたリステリアについては、この internalin をコードする *inlA* 遺伝子中にナンセンス変異を起こして終止コドンができていた場合が多いということを報告していた。そこでわれわれも水産分離株についてこの点について調べることにした。生産分離株について検討した結果では、ネグトロや魚卵製品から分離された株の 98.3% (58/59) が野生型 *inlA* を有していた。さらにこれらの株について腸管上皮細胞のモデルである Caco-2 細胞を用いて侵

L. monocytogenes

inlA

Non-invasive

inlA mutant

inlA Receptor

intestinal epithelial cells

入性を調べたところ、変異型 *inlA* を有する1株は侵入率が減少していたのに対し、野生型 *inlA* を有する他の株は、過去に米国でリステリア症を引き起こしたリステリア株と同等の侵入率を有していた。これらの結果から *inlA* の欠損率の観点から見ても日本の水産分離株は米国での臨床と差異がないという結論に至った²³⁾。

Phylogenetic tree showing the relationships between various sequences, grouped into four clusters:

- Cluster 1 (1038 complex)** (Sequences in black):
 - FSL F2-021 1038B
 - FSL F2-037 1038B
 - FSL F2-243 1038B
 - FSL F2-372 1038B
 - FSL NA-299 1038B
 - FSL F2-658 1038B
 - FSL F2-281 1027B
 - NOTC4895 1038B
 - FSL C1-132 1038A
 - ATCC51777 1038B
 - NOTC11994 1038B
 - FSL J1-110 1038B
 - FSL J1-119 1038B
 - FSL J1-653 1038B
 - FSL E1-055 1038B
 - FSL E1-124 1038B
 - CIP10302 1038B
 - FSL F1-012 1038B
 - FSL C1-134 1038B
 - FSL F2-382 1038B
 - FSL F2-480 1038B
 - FSL F2-889 1027C
 - CIP102551 1038B
- Cluster 2A (1042)** (Sequences in red):
 - LinB15 1042A
 - LinB17 1042A
 - 20-5-1 1042A
 - 36-F-2 1042A
 - FSL F2-140 110-363-9-2
 - FSL E1-125 1042B
 - FSL F2-475 1042B
 - FSL F2-642 1042B
 - FSL F2-601 1042B
 - FSL F2-002 1042B
 - FSL JZ-039 1042B
 - FSL F2-672 1044A
 - LinB00 1044A
 - LinB5 1044A
 - LinB7 1044A
- Cluster 2B (1042 & 1044)** (Sequences in green):
 - FSL F2-420 1044A
 - FSL F2 001 1044A
 - FSL F2-024 1044A
 - FSL F2-627 1044A
 - FSL F2-637 1044A
 - FSL N1-225 1044A
 - FSL J1-116 1042B
 - FSL J1-620 1042B
 - NCTC3963 1042B
 - ATCC19115 1042B
 - NCTC10927 1042B
- Cluster 3 (1042)** (Sequences in blue):
 - LinC1 172-75-5-1
 - LinC9 172-75-5-1
 - FSL F2-656 1042A
 - FSL F2-661 1042B
 - FSL MD-042 1042B
 - CIP102575 1042B
 - LinC26 1042B
 - LinC32 1042B
 - FSL ND-013 1042B
 - CIP101821 1042B
 - FSL F2-081 1042B

Fig. 12. MLVA-based dendrogram for 60 *Listeria monocytogenes* serotype 4b isolates

性関連遺伝子をターゲットとする多遺伝子座配列タイピング(MLST)スキームと比較した。その結果、MLVAの識別力(Simpson Index of Discriminationで決定)は、他の3つの方法のいずれの識別力よりも高かった。また、対象となるMLVAマーカーは安定していることがわかり、3つの分離株を70日間毎日継代しても変化しないことを明らかにした²⁴⁾。

なお、リステリアの研究については、本学会誌にもシンポジウム原稿¹⁴⁾やバイオフィームに関する研究²⁰⁾なども発表した。

最 後 に

受賞対象となった研究の文献リストを改めて眺めみると、最初のガス置換包装に関する論文が1989年であり³⁾、これは平成元年に当たる。そして一番最近の論文として、次世代シーケンサーの登場とともに微生物の分子タイピング技術がどのように変化していくかについて未来予測を記述した総説を2018年に出版している¹⁸⁾。つまり私の食品微生物学に関する研究は、平成とともに歩んできたということになる。平成初期にDNAシーケンサーが登場し、DNAを用いたPCR法などの方法が広く使われるようになり、平成時代は分子生物学的手法が微生物学分野に導入された時代であった。

さて、令和の時代で微生物学はどのように発展するだろうか。私は研究の前線からは退くことになるが、現在、微生物の遺伝子の解読が進んでいるのは、病原性遺伝子や抗生物質耐性遺伝子などほんの一部であり、ほとんどはその機能が未解明である。私の予想ではこれらの遺伝子の1つ1つの解析を進めていくという方向性もあるが、むしろ、AIの導入によって、計算機科学や心理学の分野で用いられるヒューリスティックアプローチ(heuristic approach)が大きな働きをするのではないかと考えている。令和には、DNAのゲノム翻訳も同様な革新が起きるのではないかと楽しみにしている。

謝 辞

最後に、本研究を遂行するにあたり、筆者を東京海洋大学(旧東京水産大学)へ助教授として採用していただいた藤井建夫前東京海洋大学教授、タックマンPCRのテーマのきっかけをつくっていただいた山本啓之氏(現:海洋開発研究機構)、Christine Paszko-Kolva氏(当時Perkin-Elmer社)、サルモネラ菌株のご提供をいただいた伊藤 武氏、楠 淳氏(当時、東京都立衛生研究所)、ボツリヌス菌株のご提供いただいた五十君静信氏(当時、国立予防衛生研究所)、中野宏幸氏(広島大学)、ヒスタミン生成菌や腸炎ビブリオの耐酸性機構の研究において腸炎ビブリオの菌株を提供いただいた諸角 聖氏、甲斐明美氏、尾畑浩魅氏(いずれも東京都健康安全研究センター)、さらに、リステリアの研究においては、米国の臨床株の分与とともに共同研究に加わってもらっ

たM. Wiedmann氏(コーネル大学)の諸氏に厚く御礼を申し上げたい。

また、本研究結果は、里見正隆君、川崎 晋君、葛西慶明君、田中悠一郎君、保木本悟志君、宮 聡子さんをはじめ、その他多くの研究室の当時の学生諸君のご協力のおかげで成し得た。また、大学院時代から助教着任後までにわたって一貫して実験の下支えしていただいた高橋 肇准教授(現在)の助力なしにはこれらの一連の研究はなしえなかったであろう。氏に厚く御礼を申し上げておきたい。

また最後に、筆者の拙い研究を学会賞に推薦してくださった宮本敬久氏(九州大学)に深く御礼を申し上げます。

参考文献

- 1) Bell and Kyriakides: *Listeria*: A practical approach to the organism and its control in foods. Blackwell Publishing, UK (1998)
- 2) Kasai, Y., Kimura, B., Kawasaki, S., Fukaya, T., Sakuma, K., and Fujii, T. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in steamed rice aseptically packed under modified atmosphere. *J. Food Prot.*, **68**, 1005–1011 (2005).
- 3) 木村 凡, 村上正忠, 藤沢浩明: ガス充填包装貯蔵した海産魚フィレの細菌数. 水大校研報, **37**, 129–136 (1989).
- 4) Kimura, B., Murakami, M. and Fujisawa, H. Microbial flora of jack mackerel *Trachurus japonicus* stored in retail packages containing different gas atmospheres at 5°C. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 573–573 (1991)
- 5) Kimura, B. and Murakami, M. Fate of food pathogens in gas-packaged Jack Mackerel fillets. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 1163–1169 (1993).
- 6) Kimura, B., Kuroda, S., Murakami, M., and Fujii, T. Growth of *Clostridium perfringens* in fish fillets packaged with a controlled carbon dioxide atmosphere at abuse temperatures. *J. Food Prot.*, **59**, 704–710 (1996).
- 7) 木村 凡, 藤井建夫, CO₂ガスと微生物の増殖. 日食微誌, **13**, 1–8(1996).
- 8) Kimura, B., Murakami, M., and Fujii, T. Growth of selected food spoilage and pathogenic bacteria under modified atmosphere. *Fish Sci.*, **63**, 1030–1034 (1997).
- 9) Kimura, B., Yoshiyama, T., and Fujii, T. Carbon dioxide inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on a pH-adjusted surface in a model system. *J. Food Sci.*, **64**, 367–370 (1999).
- 10) Kimura, B., Kawasaki, S., Fujii, T., Kusunoki, J., Itoh, T., and Flood S., J. Evaluation of TaqMan PCR assay for detecting Salmonella in raw meat and shrimp. *J. Food Prot.*, **62**, 329–335 (1999).
- 11) Kimura, B., Hokimoto, S., Takahashi, H., and Fujii, T. *Photobacterium histaminum* Okuzumi *et al.* 1994 is a later subjective synonym of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (Love *et al.* 1981) Smith *et al.* 1991. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 1339–1342 (2000)
- 12) Kimura, B., Kawasaki, S., Nakano, H., and Fujii, T. Rap-

- id, quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified-atmosphere-packaged fish. Appl. Environ. Microbiol., **67**, 206–216 (2001).
- 13) Kimura, B., Konagaya, Y., Fujii, T. Histamine formation by *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium isolated from fish sauce. Int. J. Food Microbiol., **70**, 71–77 (2001).
 - 14) 木村 凡, リステリアゲノム解析とタイピング, 日食微誌, **23**, 194–198(2006).
 - 15) Kimura, B., Kimura, R., Fukaya, T., Sakuma, K., Miya, S., and Fujii, T. Growth and toxin production of proteolytic *Clostridium botulinum* in aseptically steamed rice products at pH 4.6 to 6.8, packed under modified atmosphere, using a deoxidant pack. J. Food Prot., **71**, 468–472 (2008).
 - 16) Kimura, B., Sekine, Y., Takahashi, H., Tanaka, Y., Obata, H., Kai, A., Morozumi, S., and Fujii, T. Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains. J. Microbiol. Meth., **72**, 313–320 (2008).
 - 17) Kimura, B., Takahashi, H., Hokimoto, S., Tanaka, Y., and Fujii, T. Induction of the histidine decarboxylase genes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (formally *P. histaminum*) at low pH. J. Appl. Microbiol., **107**, 485–497 (2009).
 - 18) Kimura, B., Will the emergence of core genome MLST end the role of *in silico* MLST? Food Microbiol., **75**, 28–36 (2018).
 - 19) Konagaya, Y., Kimura, B., Ishida, M. and Fujii, T. Purification and properties of a histidine decarboxylase from *Tetragenococcus muriaticus*, a halophilic lactic acid bacterium. J. Appl. Microbiol., **92**, 1136–1142 (2002).
 - 20) 京井大輔, 大貝真実, 廣川絵梨, 高橋 肇, 久田 孝, 木村 凡. *Listeria monocytogenes*のバイオフィルム形成に工場常在菌が与える影響に関する研究, 日食微誌, **32**, 131–136(2015).
 - 21) Tanaka, Y., Kimura, B., Takahashi, H., Watanabe, T., Obata, H., Kai, A., Morozumi, S., and Fujii, T. Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: kinetics of transcription and role in acid resistance. J. Appl. Microbiol., **104**, 1283–1293 (2008).
 - 22) Handa, S., Kimura, B., Takahashi, H., Koda, T., Hisa, K., and Fujii, T. Incidence of *Listeria monocytogenes* in raw seafood products in Japanese retail stores. J. Food Prot., **68**: 411–415 (2005).
 - 23) Handa-Miya, S., Kimura, B., Takahashi, H., Sato, M., Ishikawa, T., Igarashi, K., Fujii, T. Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan. Int. J. Food Microbiol., **117**, 312–318 (2007).
 - 24) Miya, S., Kimura, B., Sato, M., Takahashi, H., Ishikawa, T., Suda, T., Takakura, C., Fujii, T., Wiedmann, M. Development of a multilocus variable-number of tandem repeat typing method for *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains. Int. J. Food Microbiol., **124**, 239–249 (2007).
 - 25) Miya, S., Takahashi, H., Ishikawa, T., Fujii, T., and Kimura, B. Risk of *Listeria monocytogenes* contamination of raw ready-to-eat seafood products available at retail outlets in Japan. Appl. Environ. Microbiol., **76**, 3383–3386 (2010).