

2020年度日本食品微生物学会賞受賞総説

人の健康障害に係わる微生物の疫学並びに その制御に関する研究

Studies on Epidemiology of Microorganisms Related to Human Health Disorders, and Their Control

五十君静信

(東京農業大学)

Tokyo University of Agriculture

はじめに

2020年度の日本食品微生物学会賞を受賞することとなり、この分野の研究を行う研究者として大変光栄に思う。おりしも新型コロナウイルスの流行を受け、2020年度の日本食品微生物学会の学術集会の開催は中止となってしまったが、個人的には関係各位から祝福をいただくことができた。受賞対象となった研究は、人の健康障害に係わる微生物の疫学並びにその制御に関する研究である。これらの研究は大学・同大学院時代の細菌分類学に関する研究から始まる。学位論文で行った臨床検査由来*Staphylococcus*属細菌の分類学研究はその後の研究の基盤となる研究であった。ブドウ球菌の新菌種・新亜種を報告し、博士号を取得した。1989年4月から、国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）食品衛生部に入所し、食品を介して健康障害を起こす細菌の分類学、病原性および環境抵抗性に関わる因子等の疫学に関する研究を行いながら、これらの病原細菌の食品を介したヒトへの危害の制御に関する調査・研究を進めてきた。加えて、当時新しい技術として注目されていた遺伝子組換え技術を食品に応用した場合の安全性に関する研究を担当し、遺伝子組換え細菌の安全性、腸内細菌叢を介したヒトや動物への健康影響評価に関する研究を行った。2002年4月に国立医薬品食品衛生研究所に移動後も一貫して食中毒菌の制御に関する研究と遺伝子組換え微生物の安全性に関する研究を並行して展開していくこととなる。現在は東京農業大学で教鞭をとりながら、これまで展開してきた2つの研究分野を合体させた、遺伝子組換え乳酸菌を用いた経口粘膜ワクチンの実用化にむけた研究をこれまでの研究の集大成として展開している。本総説では受賞対象となった研究のうち、特に思い出深い研究を

中心にその概要を紹介する。

1. 臨床検査由来*Staphylococcus*属細菌の 分類学的研究

大学・大学院修士課程まで、東京大学農学部家畜微生物学研究室、後期博士課程では同実験動物学研究室に所属し光岡知足教授の指導の下、病原細菌の分類学研究を行い、*Staphylococcus*属の新菌種及び新亜種を報告、博士号を取得した。家畜微生物学研究室では、大学付属の家畜病院から日々送られてくる臨床検体から、病原微生物の分離・同定を行う微生物検査に従事した。どのような病原微生物が分離されるかは不明であることが普通である臨床検査は、細菌学を志すものにとっては、貴重な体験であった。日々検出される病原微生物は多種多様であり、臨床検体から細菌を分離・同定することは筆者にとって謎解きを行う感覚であった。分離された細菌の性状を詳しく調べれば調べるほど、細菌への興味は深まり研究者として細菌学を志すきっかけとなった。臨床検査で鍛えられたこともあり、多種多様な病原細菌や常在菌を経験することができ、この経験はその後の微生物研究展開の基盤となった。この時期は病原微生物から常在細菌に至るまでどのような細菌であっても抵抗なく扱うことのできる技術を身に付けたといえる。

卒業論文では、動物由来の臨床材料から分離されたカタラーゼ陽性グラム陽性球菌に関する研究を行った。当時は動物由来の病原菌の分類に関する書籍はなく、臨床検査ではヒト臨床材料から分離される病原細菌同定のバイブルとされていた洋書Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteriaの初版を基に菌種同定を行っていた。臨床分離株として保存されていた菌株をグラム染色、菌形、カタラーゼ、オキシダーゼ、OFテストなどの生化学性状でグループ分けした後、同僚と分担してそれぞれ異なったグループを各自の卒論

* 連絡先

〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

テーマとして研究を行った。筆者はカタラーゼ陽性グラム陽性球菌を担当した。分離株はそのほとんどが *Staphylococcus* 属で、コアグララーゼ陽性であることから、*S. aureus* と同定・保存されていた。筆者はこれらの保存株について、菌の同定に有用と思われる生化学性状試験等の結果から菌種の同定を試みた。Cowan and Steel's Manual では、*S. aureus* は“寒天平板上に黄色の集落を形成”と最初に記載されており、ここでまずつまづいてしまった。動物由来臨床株では灰白色の集落ばかりが分離されており、黄色の集落は100株に数株しか分離されていなかった。コアグララーゼ試験は陽性である。そこで、研究室に所蔵の細菌分類のバイブルとされる書籍 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology にて精査したところ、動物からは *S. aureus* 以外のコアグララーゼ陽性 *Staphylococcus* 属菌が分離されており、新菌種の報告もあることが記載されていた。ちなみに Bergey's manual は、1984年の改訂では Bergey's manual of systematic bacteriology と改名されている。現在はさらにその改訂版が出版されている。2012年にグループごと細分化され分冊化されている Volume 5が発刊されている。

さて、卒論研究では、細菌分類学の最も権威ある専門雑誌 (International Journal of Systematic Bacteriology: IJSB) を参照し研究を進めることになる。*Staphylococcus* 属菌は、卒論当時に IJSB にすでに十数菌種の報告があり、新菌種が毎年のように複数報告されている状況であった。当時新菌種として認知されるためには、同属の菌種全ての Type strain との DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果が必要であり、次々と IJSB に新菌種が報告される中、Type strain を入手することに苦労したことを覚えている。研究の成果として *Staphylococcus felis* という新菌種を報告することができた¹⁾。疫学情報から、*S. felis* は、ネコの臨床材料から最も頻繁に分離される重要な菌種であることを報告した²⁾。さらに、イヌの外耳炎から分離されている菌株は新菌種 *Staphylococcus coagulans* であると学会発表した。この菌群は、コアグララーゼ陽性であるが、イヌから分離されるコアグララーゼ陽性菌種である *S. intermedius* とは明らかに異なる生化学性状を示す菌群であった。学会で新菌種発表を行った直後に IJSB にヒト臨床分離株の新菌種 *S. schleiferi* が報告された。この新菌種とはコアグララーゼ産生能や、いくつかの生化学性状が異なっていたが、分与を受けた Type strain は遺伝子レベルで我々の新菌種と同一性が高いことが明らかとなった。そのため、最終的に、新亜種 *S. schleiferi* subsp. *coagulans* とし、IJSB に論文として発表した³⁾。その後の疫学的研究によりイヌの外耳炎から高頻度で分離される亜種であった⁴⁾。

Staphylococcus 属の分類は、現在、49菌種が報告されている。分離頻度が高いと思われる主要なコアグララーゼ陽性菌種だけでも4菌種が知られており、*Staphylococcus*

属の菌種の同定は生化学性状では困難な状況である。

コアグララーゼ陽性菌株はヒトや動物の病巣との関わりが強いと考えられており、食中毒やヒト臨床では、*S. aureus* がやはり重要である。そこで、*S. aureus* の迅速検出法として、プロテインAをターゲットとした迅速法⁵⁾、生物発光酵素免疫測定などを応用した方法を開発・報告した^{6,7)}。*S. aureus* の食品における汚染については、コアグララーゼ陽性菌種が多様化したことから、動物からは、しばしば *S. aureus* 以外のコアグララーゼ陽性菌種が分離されてくる。動物性食品についてはその影響がどの程度あるかを確認するために、市販の食品について汚染実態を調べ、食肉、調理済み食品の汚染実態を報告した⁸⁻¹⁰⁾。分離株の抗生物質耐性獲得状況についても報告した¹¹⁾。食品からの *S. aureus* 分離に関する報告はかつては多かったが1980~90年代に急速に *Staphylococcus* 属菌種が増えてから後の汚染実態に関する報告は少ない。特に生鮮魚類からの報告がなかったことから、魚からの分離について報告した¹²⁾。これらの調査・研究を通した結論としては、食品から分離されるコアグララーゼ陽性 *Staphylococcus* 属菌は *S. aureus* であり、それ以外のコアグララーゼ陽性菌種はほとんど分離されない。食品を介したヒトの健康障害に係わる主なコアグララーゼ陽性菌種は分類が変わった現在も *S. aureus* であると言える。

動物では、イヌ臨床ではコアグララーゼ陽性の *S. intermedius* が頻度高く分離されており、*S. aureus* が分離されることは非常に希である。外耳炎からは *S. schleiferi* subsp. *coagulans* が分離される。動物由来の *S. intermedius* の分離株のエンテロトキシン産生について調べると *S. aureus* と同様にエンテロトキシンを産生する株が存在する。ヒトの食中毒の原因となる可能性について検討したが、これまでに、*S. intermedius* が原因となったヒトの食中毒事例は確認できていない。その理由は不明であるが、*S. intermedius* は、ヒトの食中毒には関与していないと思われる。ブタ、鶏、ウシなどからは、*S. hycus* が分離されているが、こちらもヒトへの健康影響に関するリスクは低い。

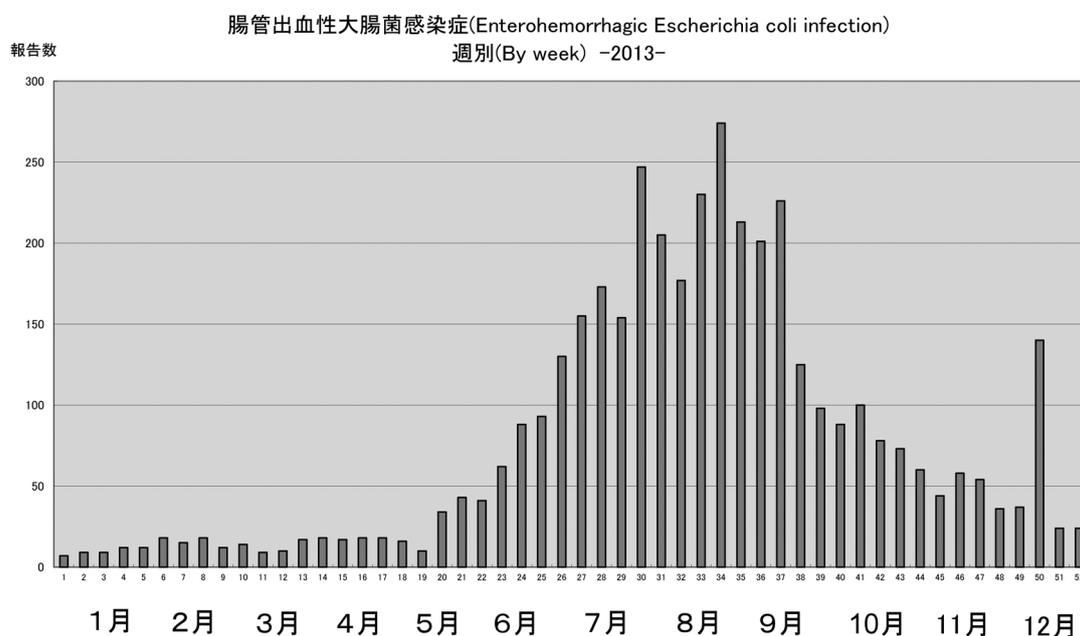
2. 食品を介して健康障害を起こす細菌の疫学、病原性に関する研究

1989年4月から、国立予防衛生研究所（現国立感染症研究所）食品衛生部に入所し、研究員として食品を介してヒトに健康被害を起こす細菌の分類と当該菌の疫学、病原性および環境抵抗性に関わる因子解明、食中毒起因細菌の試験法開発等に関する研究を行った。2002年4月からは厚生労働省の研究機関の再編成により、所属は国立医薬品食品衛生研究所に移動したが、引き続き同様な調査・研究を行った。これらの調査・研究から病原細菌の食品を介したヒトの健康障害の原因となる病原微生物の制御に関する科学的知見を行政に提供し、食品衛生政

表1. と畜場における腸管出血性大腸菌の月別分離状況報告集計

検査月	STEC O157			STEC O26		
	検査頭数	陽性頭数	陽性率	検査頭数	陽性頭数	陽性率
1月	64	1	1.6%	62	1	1.6%
2月	74	3	4.1%	74	0	—
3月	59	0	—	59	0	—
4月	56	4	7.1%	56	0	—
5月	40	5	12.5%	40	3	7.5%
6月	40	10	25.0%	40	0	—
7月	74	14	18.9%	74	3	4.1%
8月	130	27	20.8%	130	1	0.8%
9月	183	45	24.8%	183	1	0.5%
10月	99	11	11.1%	99	6	6.1%
11月	88	12	13.6%	88	0	—
12月	118	16	13.6%	95	0	—
合計	1025	148	14.4%	1000	15	1.5%

データ及び調査結果提供：厚生労働省科学研究班品川邦汎博士の研究報告より作製



感染症発生動向調査事業年報(厚生労働省健康局結核感染症課)を基に作製

図1. 2013年の感染症発生動向調査による三類感染症としての腸管出血性大腸菌報告数

策に貢献した。

具体的な病原細菌に関する主な研究は、以下の項目である。①旅行者下痢症の患者から分離された菌株を空港検疫所から提供を受け菌種の同定及び病原性に関する調査・研究、②検疫所におけるコレラ菌の検査法の開発及びコレラ菌の基礎研究¹³⁾、③ボツリヌス菌の毒素に関する基礎研究¹⁴⁾とボツリヌス食中毒事例対応¹⁵⁾、④腸管出血性大腸菌の集団事例を受けて、生食用食肉の微生物基準策定に必要な科学的知見を提供するための調査・研究¹⁶⁾、腸管出血性大腸菌の疫学や環境抵抗性に係わる基礎研究^{17~21)}、⑤模擬プラントを用いた牛乳中の *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* の加熱殺菌条件に関する検証実験²²⁾、⑥ *Campylobacter jejuni* の

酸素感受性²³⁾や凍結による低減効果²⁴⁾、及びココイド化に関する基礎研究^{25~28)}、⑦ *Campylobacter jejuni* の腸管定着に關与する因子の研究^{29~33)}、⑧地方衛生研究所と共同で検討した *Campylobacter jejuni/coli* の標準試験法の開発³⁴⁾、並びに抗生物質耐性に関する調査・研究^{35, 36)}、⑨黄色ブドウ球菌の食品の汚染実態調査及び迅速検査法の開発(1章参照)、⑩ *Salmonella* Enteritidis の鶏卵における制御、ヒトや動物への病原性並びに試験法の検討とその制御に関する調査・研究^{37~46)}、⑪ *Salmonella* 属菌集団食中毒分離株の病原性の解明⁴⁷⁾、⑫ 乳児用調製粉乳中の *Enterobacter*(*Cronobacter*) *sakazaki* の危害防止に関する調査・研究^{48~52)}、⑬ 食品における細菌の汚染実態調査^{53~55)}、⑭ 低温増殖性細菌 *L.*

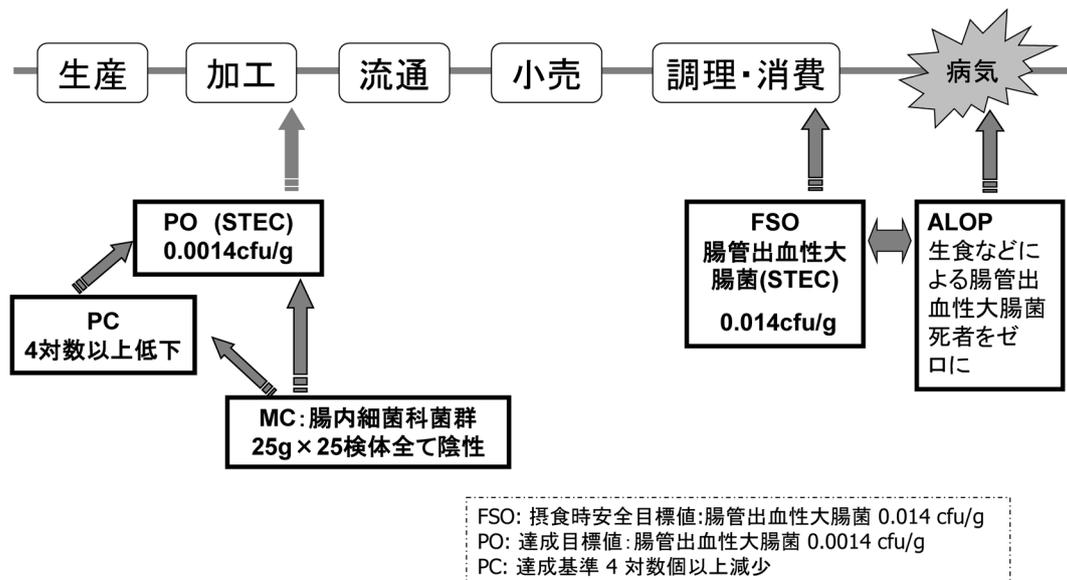


図2. 生食用食肉の基準における、(FSO, PO, PC)から微生物学的基準(MC)の設定

*monocytogenes*の疫学並びに微生物基準策定に必要な科学的知見の提供に関する調査・研究(詳しくは3章に後述)、⑮食中毒起因細菌の国際整合性のある標準試験法の整備並びに代替迅速検査法に関する研究(詳しくは4章に後述)等を実施した。それぞれの調査・研究内容の詳細については、本文では省略させていただく。これらの研究は主に厚生労働科学研究で実施しており、投稿論文として公開されている内容も含め、研究報告書としてwebから閲覧が可能である。詳しい研究内容は厚生労働科学研究成果データベース(<https://mhlw-grants.niph.go.jp/>)から確認していただきたい。

旅行者下痢症として空港検疫所の検査室で分離された分離株の約700株について、菌種同定を行い、既知の食中毒関連細菌を除いた分離株について、10種類の細胞を用いてその病原性のスクリーニングを行い、細胞毒性から病原性の疑われる約50株を特定した。この中から、複数の株の分離があり新規の食中毒起因菌と疑われた*Providencia alcalifaciens*について研究し下痢症の原因となる新規な因子を報告した⁵⁶⁾。

腸管出血性大腸菌の集団事例を受けて、生食用食肉の微生物基準策定に必要な科学的知見を提供するための調査・研究を厚生労働研究費で行った。この研究班では、全国のと畜場におけるウシからの腸管出血性大腸菌の検出状況について集計し、月別の検出状況をまとめた(表1)。驚くことに、検出状況は、月ごとに差があり、6月から9月にかけて最高25%もの保菌を確認した。研究班では、感染症発生動向調査事業年報より、2013年の三類感染症としての腸管出血性大腸菌患者報告数を基に週ごとの患者数を図にした。ヒト患者数は6月から急激に上昇し、8月後半をピークに減少を示していることが明らかとなった。(図1)表1と図1を見比べると、と畜場のウシからの腸管出血大腸菌の検出率の増加に伴っ

て、ヒトでの患者数が増加し7月から9月は患者数が高値を維持した。と畜場のウシからの検出率の低下とあわせて、患者数の減少の起こっていることを確認した。ウシの保菌状況が患者数と相関しており、その感染経路は不明で食品とは限らないが、ウシの保菌がヒトの腸管出血性大腸菌の患者数に反映していることが示された。その他、研究班の研究成果と文献調査により、生食用牛肉基準策定のための腸管出血性大腸菌の調査・研究を行い、これらの結果を基にCODEXが2007年に微生物学的基準設定に求めている数的指標(Metrics)を算出したものが、図2である。

ヒト腸管上皮細胞Caco-2細胞を用いて、臨床分離株*Pseudomonas aeruginosa*の接着・進入に関する検討を行い報告した⁵⁷⁾。また、この細胞を用いて*Escherichia coli* O157と腸管上皮細胞との相互作用にfosfomycinの与える影響について報告した⁵⁸⁾。さらにこの細胞の派生株であるC2BBel細胞を分化させ、Raji細胞と共培養することによって腸管内での免疫刺激の入り口となるヒトM細胞モデルを作成することに成功し報告した⁵⁹⁾。

3. 低温増殖性細菌*Listeria monocytogenes*に関する研究

リステリアに関する研究では、リスク評価に必要な食品の汚染実態調査^{60~63)}、国内のヒトのリステリア症の発生状況に関する研究^{64, 65)}、国内のナチュラルチーズにおける集団事例の報告⁶⁶⁾、制御方法に関する研究^{67~72)}、分離株の抗生物質耐性獲得状況調査^{73, 74)}、分離株の遺伝子レベルでの検討^{75, 76)}、病原性や環境抵抗性に関する基礎研究^{77~80)}などを行った。

食品の汚染実態調査では国内の市販の調理済み食品(Ready to Eat)について汚染実態を集計したものを表2に示した。どのカテゴリーの食品でも汚染が確認され、

平均2%程度の汚染が認められる。加工魚介類、肉加工品、スモークサーモンで、4~5.4%と高い汚染率が示された。国産のナチュラルチーズからは、本菌は分離されなかったが、調査により国内製品では最終段階で加熱処理が行われていることが判明した。海外のナチュラルチーズではこのような処理が行われないことから、輸入チーズには2.4%の汚染が見られた。

患者数の推定では国内初の試みとなるアクティブサーベランスを行い、2000年当時、国内で毎年平均83名のリステリア症患者発生が推定されることを示した⁶⁴⁾。その後、2010年には、JANIS-netのデータを基に患者数の推定が行われ、年間200人ほどの患者が推定された。これら2つのデータは単純に比較できないが、リステリア症は60歳以上の高齢者の患者が多いことから、高齢者の人口の増加によりリステリアの患者数は増加しているものと思われる。

国内の調理済食品における汚染実態調査を実施し、各種食品からの分離が確認され、その平均汚染率は2%程度認められることを総説として発表した⁶¹⁾。研究班では2001年に北海道で発生したナチュラルチーズを原因とする有症者38名の事例がわが国初のリステリアの集団事例であることを報告した⁶⁶⁾。これら一連の研究は、食品安全委員会のリスク評価の基礎データとして活用さ

れ、行政的には国内のリステリアの微生物基準の策定に寄与した。

リステリアの菌株の病原性の違いに注目した調査を行った。食品以外（主に環境由来）株、食品由来株、ヒト臨床分離株ごとに、血清型を調べた結果を、図3に示した。上段に集計した血清型別の菌株数を表として示し、下段にその割合を図として示した。食品以外の環境由来株では、血清型1/2cが圧倒的に多いが食品由来株では、1/2a、1/2b、1/2cがほぼ同率で分離されており、次いで4bが分離されていた。一方、ヒト臨床分離株では、6割以上が血清型4bと圧倒的に多く、次いで1/2b、1/2aが分離されていた。リステリアは血清により病原性の強弱があり、4bは、ヒトに対して病原性が強いと思われる。1/2b、1/2aについては、株によって病原性が異なり、強毒株と弱毒株が存在するようである。1/2cは、病原性がほとんど無いと思われる。

4. 国際整合性のある食品の微生物標準試験法の整備と迅速試験法の開発

わが国の食品における微生物検査は、これまで試験法は公定法を重視しており、それを補う書籍として厚生労働省監修の食品衛生検査指針微生物編により行われてきた。公定法は微生物の規格基準の判定に用いる試験法のため、微生物基準が作られてから相当の年月が経っているにもかかわらず、法律に示されていることから試験法が変更されることはなかった。この間に国際的には微生物試験法に関する議論が進んでおり、食品衛生における微生物試験法に関しては、科学的根拠のある妥当性確認が強く求められるようになった。また、国際貿易機関（World Trade Organization: WTO）の強制力のある協定では、食品の安全性に係る協定に、食の安全については食品の国際標準を策定するCODEX（Codex Alimentarius Commission）、規格適合性については国際標準化機構（International Organization for Standardization: ISO）の示す規格を国際標準とすることが示されている。食品のリスクマネジメントについても国際整合性の重要性と国

表2. 国内の市販調理済み（ready-to-eat）食品の *Listeria monocytogenes* 汚染実態

	サンプル数	Lm分離数	Lm陽性率
ナチュラルチーズ			
国産	1,075	0	0
輸入	1,387	33	2.4
その他			
生鮮魚介類	2,659	41	1.5
加工魚介類	526	21	4.0
総菜	613	6	1
肉加工品	246	12	4.8
野菜	314	1	0.3
スモークサーモン	92	5	5.4

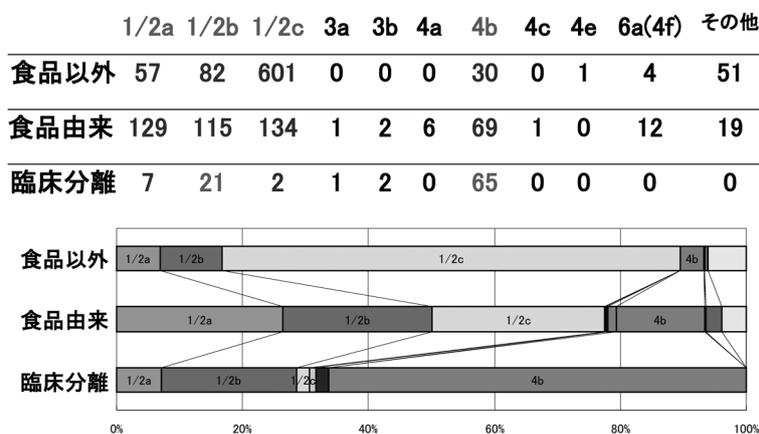


図3. 由来別リステリア分離株の血清型別集計



図4. 食品からの微生物標準試験法に関するホームページ <http://www.nihs.go.jp/fhm/mmef/index.html>

家レベルの科学的根拠のある対応が求められている。そのため、国内の食品の微生物試験法も妥当性確認と国際標準であるISO法との整合性の面で早急に対応する必要があった。2005年10月から国立医薬品食品衛生研究所に標準試験法検討委員会を立ち上げ、国家レベルの公定法として求められている要件を満たす標準試験法の整備を行った。国際整合性のある科学的な妥当性確認の行われた標準試験法はNIHSJ-MMEF: National Institute of Health Sciences Japan—The Methods for the Microbiological Examination of Foods, 略称NIHSJ法として整備されている。検討委員会の議論は公開し一般の方も聴講可能とし、試験法の検討状況はwebを通じて情報を公開・提供した(図4)。ホームページには、NIHSJ標準試験法の作成方針が明示され、4つのステージで検討を進め、NIHSJ法は策定されている⁸¹⁾。現在、検討の終了したNIHSJ法のうち、食品の微生物基準のある病原菌については、すでにNIHSJ法の内容が公定法として変更されている。法律の中に微生物試験法が示されている大腸菌群と一般生菌数については行政的に今後どのような扱いとするか検討されていくものと思われる。

NIHSJ-02カンピロバクター試験法は、地方衛生研究所との共同研究により食鳥肉の試験法として提案した⁸²⁾。この論文を基にカンピロバクターのISO法は改訂されている。2018年6月に公布された改正食品衛生法に示されたHACCPの制度化についても猶予期間を経て2021年6月から本施行となる。これによりわが国の食品のリスクマネジメントの基盤がようやく国際整合性を持つことになる。自主衛生管理であるHACCP制度化に伴って、食品の微生物検査の考え方も国際整合性のあるものに変わる必要がある。これまでの公定法が唯一の微生物試験法であるとの考え方から、検査の目的に最も適する妥当性確認された試験法を自らが選択活用していくことになる。試験法選択における目的適合性である。

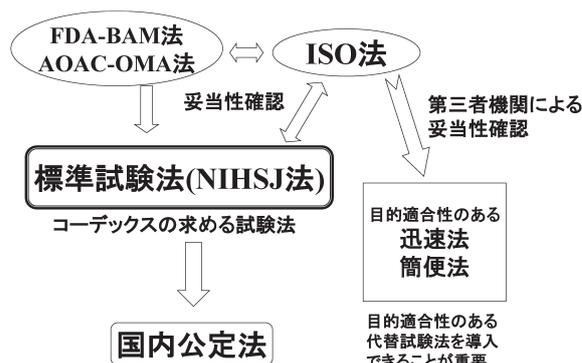


図5. NIHSJ標準試験法と国内の公定法および主要試験法との連携の考え方

HACCPなどの検査としては、目的適合性の観点から公定法の代替となる妥当性確認された迅速・簡便法への要求は増している。食品における微生物試験法の妥当性確認は容易ではなく、専門家による検討と評価が必須である。ヨーロッパでは、Afnor, Microval, Nordvalの3か所、米国ではAOAC Internationalといった第三者機関がその役目を果たしている。国内にそのような機関は現在存在しない。公定法に移行しているNIHSJ法はISO法との妥当性確認を行っていることから、しばらくはISO法との妥当性確認を行っているこれらの第三者機関の認証などを活用して判断していくとよい(図5)。

標準試験法検討委員会のホームページには、これらの第三者機関により妥当性確認の行われた代替法に関する情報が示されているので、参考としていただきたい。また、食品衛生協会の発行している食品衛生検査指針微生物編2015、さらに改訂第2版2018は、妥当性確認の考え方を大幅に取り入れた編集となっている⁸³⁾。

食品の検査法関連では、以下の研究を行い、その成果を論文として報告した。食品の標準試験法の検討にあたって、微生物試験法における標準物質の重要性から、微生物の標準物質について研究を行った^{84, 85)}。培養法では、黄色ブドウ球菌の畜産物の検査に有用な選択分離培地の検討を行った⁸⁶⁾。PCRによるリステリアの検査法⁸⁷⁾、ルシフェラーゼとジンクフィンガープロテインを融合させ、特定の遺伝子配列を標的とする高感度検出法の検討^{88, 89)}、蛍光グルコースや蛍光アミノ酸を用いた生きた細菌の判定法⁹⁰⁾、ナチュラルチーズからのリステリアの検出法として自動免疫蛍光測定装置の利用の可能性⁹¹⁾などについて論文として報告した。

5. ワクチン開発の基礎となった 遺伝子組換え食品の安全性に関する研究

1989年国立予防衛生研究所入所と同時に、育種技術として1980年代から新しい注目されていた遺伝子組換え技術を食品に応用した場合の安全性に関する研究を担当した。当時わが国が食品の国際標準を策定するCODEXの特別部会の議長国となったことから、組換え

表3. 遺伝子組換え及び食品安全性評価制度の歴史 (年表)

1973	大腸菌を用いて遺伝子組換え実験に初めて成功
1976~	各国で組換えDNA実験に関する指針の策定
1979	組換えDNA実験指針の決定
1982	経済協力開発機構(OECD): 組換え体の産業利用のための検討開始 → 勧告, レポートの公表
1989	農林水産省: 組換え体の野外利用のための安全性評価指針策定
1991	厚生省: 組換えDNA技術応用食品・添加物の安全性評価指針を策定
1994	厚生省: 組換えDNA技術応用添加物(キモシン)の安全性を初めて確認
1996	厚生省: 安全性評価指針改正(組換え体を食する種子植物に対応) 遺伝子組換え食品(7品種)の安全性を初めて確認
2000	CODEX委員会: バイオテクノロジー特別部会での検討開始 LMOの国境間移動に関する「カルタヘナ議定書」が合意 厚生省: 食品衛生法の規格基準改正 組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査基準策定
2001	遺伝子組換え食品の安全性評価の法的義務化の施行
2003	食品安全委員会設置(遺伝子組換え食品等専門調査会) CODEX委員会: 組換えDNA植物及び微生物ガイドライン策定 農水省: 組換え飼料の安全性評価義務化 カルタヘナ議定書発効, 国内法制定

食品の安全性評価の科学的根拠の支援に関する研究を行った。国内では広く知られていないが、日本は遺伝子組換え食品の安全性に関わる国際標準となるガイドラインの策定に中心的な働きをした。日本が議長国を務めたCODEX特別部会により、筆者が主に担当した微生物については、2003年に遺伝子組換え微生物食品の安全性評価に関するガイドラインが策定された。この詳細については、乳酸菌学会誌に解説⁹²⁾としてまとめたので興味のある方は参考にいただきたい。また、国内では2008年6月に示された食品安全委員会の遺伝子組換え食品(微生物)の安全性評価基準の起草にも貢献した。

遺伝子組換え関連の主要な動向を表3で示す。大腸菌で初めて遺伝子組換えが成功したのは1973年である。このように遺伝子組換え技術はまさに新しい技術であるが、その後この技術を用いた研究は短期間で急速に展開していくことになる。1970年代は、この技術が非常に有用な技術であると同時に研究の方向性によってはヒトや動物そして環境に対して危害を及ぼすモンスターを作り出してしまう恐れのある技術でもあるという認識が広がった。研究者自らの提案により、遺伝子組換え実験は規制が必要でコントロールされるべきだといった議論が続けられた。各国は指針として安全性が担保されるまでは組換え実験は実験室内の封じ込めを徹底し、環境への漏出が起らない制御のもとで適切に行うことを示した。

有用性が高く活用が期待される技術であることから、行政などが主導的に安全性に関わる研究を進める必要があった。たとえば、そもそも通常我々が口にしている生きた乳酸菌は何をもって安全であるといえるのといった考え方が明確でなく、安全性をどのように評価すればよ

いかという方向性は定まっていなかった。食品としてすでに“安全”なものとして流通している乳酸菌を科学的に安全であると証明することは難しく、さらに遺伝子操作という育種をおこなった乳酸菌など有用な微生物組換え体の安全性をどのように評価し安全であると判断することが適切であるのかといった議論に結論をだすことは困難であった。

経済開発機構(OECD: Organisation for Economic Cooperation and Development)は、組換え体の産業利用のための検討を進め、1993年にバイオ食品の安全性を判断する基本となる考え方として、類似既存食品との実質的同等性(Substantial equivalence)の概念を提唱した。多種多様な食品そのものの安全性は、同一の尺度で評価することは困難である。そもそも既存食品は、安全性を評価して安全としているわけではない。従来から安全に食べられてきたという歴史(食経験)があるものが食品であり、適切な加工や調理などの工程を経て安全に食されているのが実情である。食経験のある既存食品を基準とし、遺伝子組換え等の新規に開発された食品は、類似の既存食品との相対評価により、実質的に同等とみなせることをもって安全であるという判断を行うという考え方である。OECDが示した“実質的同等性”という考えは、以後の食品の組換え体の安全性評価の考え方に影響を与えた。

遺伝子組換え微生物の安全性に関する研究では、モデルとなる組換え細菌を作出し、安全性評価法に関する研究を行った。モデル組換え細菌を評価するために、腸内細菌叢を介した健康影響にも着目し研究を行った。自然界に存在する各種細菌に高頻度に接合伝達を起こすpAMβ1という接合伝達性プラスミドは、常在菌から組換えに用いる乳酸菌*Lactococcus lactis*に伝達され、さらに腸内棲息菌である*Enterococcus faecalis*にプラスミドを伝達することを定量的に観察できることを報告した⁹³⁾。マウス腸管内でもこのような接合伝達は定量的に確認された。2段階連続流動培養装置を製作し、人工的なヒト腸内細菌叢を形成させることに成功し、マイコトキシンが腸内菌叢を介しどのように代謝されるかを報告した⁹⁴⁾。この装置により、腸内細菌叢とモデル組換え体の相互作用について検討した。また乳酸菌等遺伝子組換えに用いる可能性の高い乳酸菌株について、全ゲノム解析を行い、ゲノム中に有害な遺伝子配列が存在しないかの検討を行った^{95, 96)}。

6. 乳酸菌を用いた

遺伝子組換え経口粘膜ワクチンの開発

モデル組換え体として作出した組換え乳酸菌が、経口粘膜ワクチンとしての機能することを明らかとし、病原菌の感染予防などの分野で活用することが期待できることを示した^{97, 98)}。これにより、病原微生物の制御と遺伝子組換え食品の安全性という異なった領域を融合した

学際的な境界領域研究として遺伝子組換え乳酸菌を用いた経口粘膜ワクチン研究は進められた。乳酸菌を抗原運搬体とするワクチン研究ではまず、*L. lactis* IL1403株を宿主とする遺伝子組換えに成功し、菌体表面に抗原を固定化して発現させるベクタープラスミドを開発した⁹⁹⁾。豚丹毒菌に対するワクチンでは、当該菌の菌体表面抗原であるSpaAを用いたところ、その抗原性が高いこともありマウス実験で十分な感染防御効果が得られた¹⁰⁰⁾。HIVに対するワクチンでは抗原自体の抗原性は弱く、マウス実験では、コレラトキシンをアジュバントとして用いることにより免疫効果が得られた¹⁰¹⁾。コレラトキシンは粘膜免疫で有効な強力なアジュバントである。粘膜ワクチン用の他の実用的なアジュバントは皆無であるためマウス実験には用いられるが、残念ながらヒトに用いることはできない。

研究に用いた*L. lactis* IL1403株の菌体には免疫調節作用は乏しいため、このような細菌を宿主とすると、得られたワクチンの効果は菌体表面に提示する抗原の免疫原性の強弱に依存するようである。すなわち感染防御抗原の免疫原性の強い抗原を用いると一定の免疫効果が得られるが、一般的な抗原では、免疫効果を得られるような工夫、たとえば、抗原量を多くする、アジュバントとなるような機能を付与するなどを検討しないと十分な免疫効果は得られない。

第二世代の宿主として、免疫調節作用の強い*L. casei* 393株を用い、ワクチン開発を行った。当該株は、マウスなどへ投与し評価するとTh1型の免疫応答を強く誘導する株である。サルモネラのワクチンとして鞭毛抗原を用いた実験で効果が認められた成果¹⁰²⁾を受けて、鞭毛を構成するフラジェリンFliCを抗原とする乳酸菌組換え体¹⁰³⁾や、サルモネラ表面抗原であるOmpCを用いた乳酸菌ワクチンを作成¹⁰⁴⁾し、細胞レベルの評価やマウス投与実験等によりサルモネラの感染防御に効果があることを明らかにした。この宿主ベクター系を用いて、組み込む抗原を変えマウスにおける免疫効果を検討した。TLR5のリガンドとして機能するサルモネラのフラジェリンと感染防御抗原の融合タンパクを用いた組換え体の免疫効果の評価¹⁰⁵⁾、抗原の分泌効率を高めた組換え体の評価¹⁰⁶⁾、IL-1 β をアジュバントとして分泌させる組換え体の評価¹⁰⁷⁾などについて論文として報告した。その後宿主乳酸菌を変える、表面抗原量を上げるなどの工夫をしながら検討を続けた^{108~110)}。

リステリアに対する乳酸菌組換えワクチンの開発では、最も主要な病原因子であるListeriolysin O (LLO)を抗原とし、ワクチン開発を検討した。LLOを変異させ溶血性を失わせたmLLOや、溶血に係わるドメインを欠損させたshortLLOを組込み、乳酸菌菌体表面に固定化した組換え体を用いてマウスに対する免疫効果を定量的に評価した。マウスが100%致死する菌数の強毒株を腹腔内に投与（チャレンジ）し、2日後の脾臓中の菌数

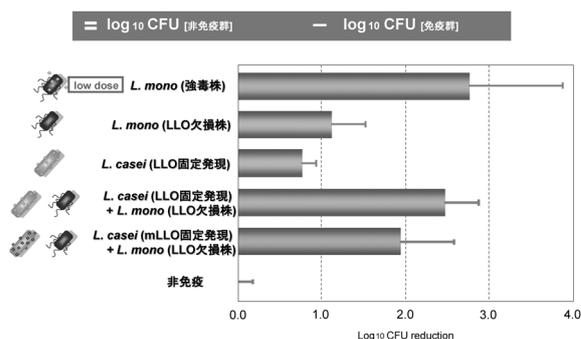


図6. マウス実験によるリステリアに対するワクチンの評価結果

の対数値を用いて定量的に評価した。ワクチン投与は、チャレンジ投与の7日前に行った。コントロールとして、マウスが死なないレベルの低菌数でリステリア株を投与したグループを陽性コントロールとし、生理食塩水投与群を陰性コントロールとして実験を行った。数値の計算式と免疫効果は図6に示した。チャレンジ投与に用いた強毒株をあらかじめ低菌数で投与した群が最も良好なワクチン効果の値3を示した。リステリアのLLO欠損株（リステリア弱毒株）では、値1を、乳酸菌にLLOを固定した組換え体ではほぼ同じレベルの免疫効果を示した。LLO, mLLO, shortLLOと抗原を代えてもほぼ同様な効果が得られた。面白いことに、リステリア弱毒株とLLO固定乳酸菌を同時に投与すると値2前後の高い免疫効果が得られた。リステリアのLLO欠損株と乳酸菌組換え体に発現しているLLOの組み合わせで、リステリア強毒株の少量投与に近い免疫効果が確認できた。これらの実験から、LLO固定化乳酸菌組換えワクチンの効果が認められたと同時に、リステリアはあらかじめ少量摂取または接種していると、高菌数のリステリアの暴露を受けてもワクチン効果により発症しなくなることが明らかになった。われわれが、調理済み食品から日常的に低い菌数のリステリアの暴露を受けていることは、おそらくワクチン効果となりリステリア症の発症を抑えている可能性が高いことを示唆した。

ヒトパピローマウイルス(HPV)のワクチンでは、*L. casei*株にHPV16型E7タンパク質(HPV16E7)を発現させ、加熱により死菌化した菌体そのものを原薬としその効果が検討された。この薬剤は、筆者の共同研究者らにより「子宮頸がん前がん病変(CIN3)患者を対象とした臨床研究（先行的な検証試験：フェーズI/IIa相当）」が実施され、大量投与群でCIN3の病巣が消失するという治療成績が得られた。このワクチンでは死菌として経口投与によりヒトへのHPV-E7特異的CTLの誘導が可能であることが示されたが、投与量がかなり多くないとその効果が得られなかった。その製剤の提供を受け、抗原発現量を評価したところ、E7抗原の菌体表面への発現量はわずかであった。そこでより実用性の高い改良型組換え体を我々の宿主ベクター系を用いて作出し直し、マ

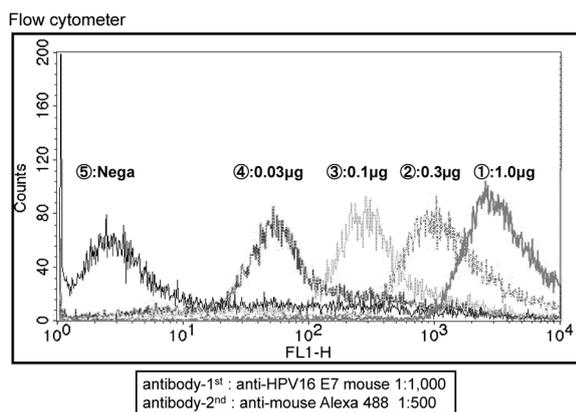


図7. HPV-E7抗原を異なる量比で乳酸菌に固定した場合のFACSによる評価

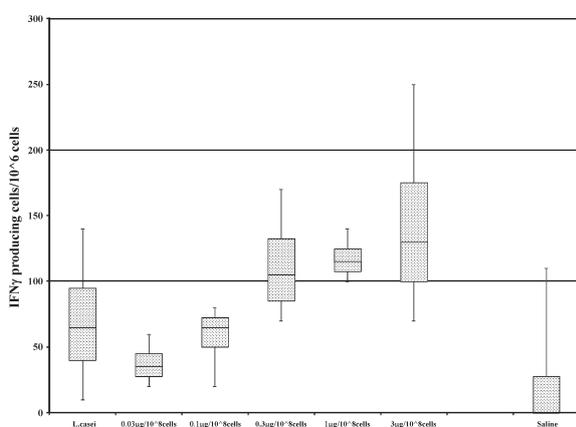


図8. HPV-E7菌体表層固定化乳酸菌（固定化したE7量が、0.3~3.0 mg/10⁸cells）は、固定量が0.3 µgまで濃度依存的に特異的IFN γ 産能が増大

ウスにおける実験を行った¹¹⁾。大腸菌であらかじめ作製したアンカー付E7抗原を異なる量比で乳酸菌菌体表層に固定化することができた(図7)。これらのE7表層固定乳酸菌を用いて、E7抗原固定化量を変化させて免疫したマウスでの結果が図8である。E7抗原量を増加していくと免疫効果が増強し、乳酸菌10⁸個あたり0.3 µgのE7抗原量を超えれば、特異的CTLによる免疫効果はほぼ一定となることが判明した。この抗原量を目安に乳酸菌に直接発現を試みその増殖条件を検討した結果、E7抗原量が特異的CTL誘導に十分な組換え体を取得することができた。この改良型組換え体では、マウス実験で先行研究の5倍以上の特異的CTL誘導が得られた。先行研究では治療効果が得られた患者は4カプセルの連続投与群であったことから、改良型株では1カプセルの連続投与で充分有効な治療効果が期待できることになる。現在、この改良型株IGMKK16E7製剤を用いたヒト臨床試験が進められている。このワクチンは、HPV感染後期の病変患者に適用が可能で、がんへと進行する可能性の高い重度異形成(CIN3)患者に投与した場合、E7特異的なCTLにより、外科的手術による子宮頸部の病変の除去を必要とせず、患者の病巣は消失し子宮頸がん

への進行を阻止することが可能である。

IGMKK16E7の検討を進める中で、宿主乳酸菌の安全性が高いことは利点であったと考えられるが、IGM-KK16E7では加熱による不活化処理が行われても免疫効果が得られたことは重要である。これまでに紹介してきた生菌の遺伝子組換え体を利用する他の開発候補品とは異なり、IGMKK16E7は死菌化により遺伝子組換え体ではなく、タンパク質性の医薬品候補物質として評価が行われるものと思われる。また、経口剤としての用いることから、注射剤に比べ高度な精製を必須としない点で製造コストは非常に低く抑えることができる。現在、IGM-KK16E7は治験薬GMP製造、GLP安全性試験が終了し、ヒトパピローマウイルス(HPV)を標的とした免疫療剤IGMKK16E7による子宮頸部高度上皮内腫瘍病変(HSIL/CIN2-3)患者を対象とした第I/II相医師主導試験が国内複数の大学病院にて実施されている。特にHPVの経口粘膜ワクチンについては、前癌病変CIN3ステージの外科手術を必要とする患者に投与することにより病変が消失、手術の必要がなくなることが確認されており、実用化に向けて5大学医学部においてヒトの臨床試験が進められている。

おわりに

受賞対象となった研究の関連論文のリストを整理してみると、これらの研究は大変多くの研究者の協力により成果を上げることができたことを痛感した。食品衛生に係わる微生物試験法としてNIHSJ標準試験法の整備を行うことができた。食品衛生法が改正され国際整合性のある食品のリスクマネジメントの基盤となるHACCPの制度化が進む中で、微生物試験法に対する考え方も変わっていくことになる。NIHSJ標準試験法は今後、目的適合性のある代替法である迅速・簡便法の活用や普及に貢献できることを期待したい。

また、病原微生物は食品から検出されてはならないという常識が、われわれの研究成果からリステリアについては、正しいとは言えないという結果が示された。おそらく低い菌数の汚染を受けた食品を日常的に摂取していることが、ワクチン効果として働き高い菌数の汚染を受けた食品を食べてしまっても発症を抑えることに寄与している可能性がある。日本のリステリアの微生物基準が科学的根拠のあるリスク評価により、ゼロトレランスではなく、基準値を100 CFU/gと設定したことは歓迎したい。さらに、食中毒菌の制御に関する研究と遺伝子組換え微生物の安全性に関する研究といった全く異なる領域の研究を続けてきたことにより、乳酸菌組換え経口粘膜ワクチン開発が可能となったと思われる。今後、このようなワクチンが製剤として認められ、ヒトの健康に寄与することを期待したい。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、大変多くの研究者にご指導をいただきました共同研究を行うことができた。まず、筆者の細菌研究の方向性を決める基盤となる細菌分類学と腸内細菌学をご指導いただいた恩師故岡岡知教授に御礼を申し上げたい。先生は奇しくも筆者の学会賞受賞の年にご逝去された。ご冥福をお祈りいたします。厚生労働省の研究機関に在職中は、熊谷進氏、山本茂貴氏、春日文子氏、小西良子氏、朝倉 宏氏、岡田由美子氏、百瀬愛佳氏とともに研究を行うことができた。研究生やポスドクとして、実際に研究を進めてくれた朴 仙姫氏、柳 忠湖氏、長原 歩氏、福田 賢氏、金 台運氏、奥谷晶子氏、添田(浅井)美里氏、山本詩織氏、榊田和彌氏、榎木真吾氏、並びに大学院生、卒論生として研究に係わった学生たちに御礼申し上げる。お酒を飲みながら研究に貴重なアドバイスをいただいた小沼博隆氏に深謝する。

黄色ブドウ球菌の研究では清水晃氏、サルモネラ研究では天野富美夫氏、カンピロバクター研究では山崎 学氏、クロノバクター研究では萩原博和氏、腸管出血性大腸菌では品川邦汎氏、リステリア研究では牧野壮一氏、故武士甲一氏、木村 凡氏、仲真晶子氏、乳酸菌組換えワクチン研究では川名 敬氏、樋脇智満氏、故佐々木隆氏、佐藤英一氏、梶川揚申氏、東京農大での研究では横田健治氏に厚く御礼申し上げます。

また最後に、筆者の研究を評価していただき学会賞に推薦して下さった三宅眞実氏、そして大学院時代からのこれらの研究を陰で支えてくれた妻八千代に深く御礼申し上げます。

参考文献

- Igimi, S., Kawamura, S., Takahashi, E. and Mitsuoka, T.: *Staphylococcus felis*, a New species from clinical specimens from cats. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 373-377 (1989).
- Igimi, S., Atobe, H., Tohya, Y., Inoue, A., Takahashi, E. and Konishi, S.: Characterization of the most frequently encountered *Staphylococcus* sp. in cats. *Vet. Microbiol.*, **39**, 255-260 (1994).
- Igimi, S., Takahashi, E. and Mitsuoka, T.: *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* subsp. nov., Isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **40**, 409-411 (1990).
- Yamashita, K., Shimizu, A., Kawano, J., Uchida, E., Haruna, A. and Igimi, S.: Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. *J. Vet. Med. Sci.*, **67**, 263-268 (2005).
- 長原 歩, 福田 賢, 菊池 護, 五十君静信, 五十嵐英夫: 抗プロテインA鶏卵抗体を用いた黄色ブドウ球菌の簡易検出法. *食衛誌*, **39**, 318-323 (1998).
- Fukuda, S., Tatsumi, H., Igarashi, H. and Igimi, S.: Rapid detection of *Staphylococcus aureus* using bioluminescent enzyme immunoassay. *Lett. Appl. Microbiol.*, **31**, 134-138 (2000).
- Fukuda, S., Masuda-Nishimura, I., Tatsumi, H., Igarashi, H. and Igimi, S.: Rapid detection of *S. aureus* and coliforms using firefly luciferase. *Bioluminescence and Chemiluminescence*, **11**, 1-4 (2000).
- 中 峰松, 清水 晃, 河野潤一, 五十君静信: 市販ミンチ肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状. *日食微誌*, **23**, 217-222 (2006).
- 清水 晃, 松村浩介, 藤尾公輔, 河野潤一, 北井 智, 五十君静信: 綿棒を用いたふき取り増菌培養法による市販豚および牛スライス肉における黄色ブドウ球菌汚染調査と分離株の性状. *日食微誌*, **23**, 242-246 (2006).
- 清水 晃, 市場智子, 河野潤一, 五十君静信: 調理済み食品における黄色ブドウ球菌の汚染実態. *食衛誌*, **48**, J341-J344 (2007).
- 藤尾公輔, 清水 晃, 松村浩介, 河野潤一, 北川 浩, 五十君静信: 市販食肉, ヒト, 豚および鶏から分離された黄色ブドウ球菌の薬剤感受性. *日食微誌*, **24**, 100-106 (2007).
- Saito, E., Yoshida, N., Kawano, J., Shimizu, A. and Igimi, S.: Isolation of *Staphylococcus aureus* from raw fish in relation with culture methods. *J. Vet. Med. Sci.*, **73**, 287-292 (2011).
- Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S. I., Okada, Y., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Gene Expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology*, **9**, 869-879 (2007).
- Kitamura, M., Igimi, S., Furukawa, K. and Furukawa, K.: Different response of the knockout mice lacking b-series of gangliosides against botulinum and tetanus toxins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1741**, 1-3 (2005).
- Momose, Y., Asakura, H., Kitamura, M., Okada, Y., Ueda, Y., Hanabara, Y., Sakamoto, T., Matsumura, T., Iwaki, M., Kato, H., Shibayama, K. and Igimi, S.: Food-borne botulism in Japan in March 2012. *Int. J. Infect. Dis.*, **24**, 20-22 (2014).
- 山本茂貴, 春日文子, 五十君静信, 岡田由美子, 百瀬愛佳, 朝倉 宏: 生食用食肉の規格基準の考え方. *日食微誌*, **29**, 98-100 (2012).
- Asakura, H., Igimi, S., Kawamoto, K., Yamamoto, S. and Makino, S.: Role of *in vivo* passage on the environmental adaptation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: Cross-induction of the viable but nonculturable state by osmotic and oxidative stresses. *FEMS Microbiology Letters*, **253**, 243-249 (2005).
- Asakura, H., Panutdaporn, N., Kawamoto, K., Igimi, S., Yamamoto, S. and Makino, S.: Proteomic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the oxidation-induced viable but non-culturable state. *Microbiol. Immunol.*, **51**, 875-881 (2007).
- Asakura, H., Kawamoto, K., Haishima, Y., Igimi, S., Yamamoto, S., and Makino, S.: Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7

- corresponds to the viable but non-culturable state. Res. Microbiol., **159**, 709–717 (2008).
- 20) Asakura, H., Saito, E., Momose, Y., Ekawa, T., Sawada, M., Yamamoto, S., Hasegawa, A., Iwahori, J., Tsutsui, T., Osaka, K., Matsushita, T., Kakinuma, M., Motoyama, K., Hayama, T., Kitamoto, H., Igimi, S. and Kasuga, F.: Prevalence and growth kinetics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine offal products in Japan. Epidemiol. Infect. **140**, 655–664 (2011).
 - 21) Asakura, H., Masuda, K., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Molecular approach for tracing dissemination routes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in bovine offal at slaughter. Biomed. Res. Int., **2014**, e739139 (2014).
 - 22) Igimi, S., Iriguchi, S., Monden, S., Okada, Y., Yamamoto, S. and Mori, Y.: Study on the effects of HTST pasteurization temperatures on *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in an industrial fluid milk-processing system. Bull. Natl. Inst. Health Sci., **128**, 81–84 (2010).
 - 23) 山崎 学, 天野富美夫, 山本茂貴, 五十君静信: カンピロバクターの酸素ストレス下での生残. 獣医畜産新報, **60**, 906–910 (2007).
 - 24) 朝倉 宏, 山本詩織, 橋 理人, 吉村昌徳, 山本茂貴, 五十君静信: 冷凍処理による鶏肉中でのカンピロバクター汚染低減効果に関する検討. 日食微誌, **32**, 159–166 (2015).
 - 25) Pinto, A. F., Todorovic, S., Hildebrandt, P., Yamazaki, M., Amano, F., Igimi, S., Romão, C. V. and Teixeira, M.: Desulforubrythrin from *Campylobacter jejuni*, a novel multidomain protein. J. Biol. Inorg. Chem., **16**, 501–510 (2011).
 - 26) Yamasaki, M., Igimi, S., Katayama, Y., Yamamoto, S. and Amano, F.: Effect of anaerobic preculture on aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni*. Bioscience Microflora, **22**, 21–25 (2003).
 - 27) Yamasaki, M., Igimi, S., Katayama, Y., Yamamoto, S. and Amano, F.: Identification and characterization of an oxidative stress-responsive protein from *Campylobacter jejuni*, homologous to rubredoxin oxidoreductase/rubrythrin. FEMS Microbiol. Lett., **235**, 57–63 (2004).
 - 28) 山崎 学, 五十君静信, 山本茂貴: カンピロバクターの酸素ストレスに対する応答性. 日食微誌, **23**, 114–117 (2006).
 - 29) Asakura, H., Yamasaki, M., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Deletion of *peb4* gene impairs cell adhesion and biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. FEMS Microbiology Lett., **275**, 278–285 (2007)
 - 30) Asakura, H., Brueggemann, H., Sheppard, S. K., Ekawa, T., Meyer, T. F., Yamamoto, S. and Igimi, S. Molecular evidence for the thriving of *Campylobacter jejuni* ST-4526 in Japan. PLOS ONE, **7**, e48394 (2012).
 - 31) Asakura, H., Taguchi, M., Ekawa, T., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Continued widespread dissemination and increased poultry host fitness of *Campylobacter jejuni* ST-4526 and ST-4253 in Japan. J. Appl. Microbiol., **114**, 1529–1538 (2013).
 - 32) Asakura, H., Hashii, N., Uema, M., Kawasaki, N., Sugita-Konishi, Y., Igimi, S. and Yamamoto, S.: *Campylobacter jejuni* *pdxA* affects flagellum-mediated motility to alter host colonization. PLOS ONE, **8**, e70418 (2013).
 - 33) Asakura, H., Kawamoto, K., Murakami, S., Tachibana, M., Kurazono, H., Makino, S., Yamamoto, S. and Igimi, S.: *Ex vivo* proteomics of *Campylobacter jejuni* 81–176 reveal that FabG affects fatty acid composition to alter bacterial growth fitness in the chicken gut. Res. Microbiol., **167**, 63–71(2016).
 - 34) Momose, Y., Okada, Y., Asakura, H., Ekawa, T., Masuda, K., Matsuoka, H., Yokoyama, K., Kai, A., Saito, S., Hiramatsu, R., Taguchi, M., Ishimura, K., Tominaga, K., Yahiro, S., Fujita, M. and Igimi, S.: Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272–1:2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: collaborative study. J. AOAC Int., **96**, 991–997 (2013).
 - 35) Igimi, S., Okada, Y., Ishiwa, A., Yamasaki, M., Morisaki, N., Kubo, Y., Asakura, H. and Yamamoto, S.: Antimicrobial resistance of *Campylobacter*: prevalence and trends in Japan. Food Addit. Contam., **25**, 1080–1083 (2008).
 - 36) 山本詩織, 朝倉 宏, 五十君静信: 基質特異性拡張型βラクタマーゼ(ESBL)産生菌に関わる最近の動向とその拡散に関する考察 ～食品汚染実態とその危害性について～. 食衛誌, **58**, 1–11 (2017).
 - 37) Sugita-Konishi, Y., Ogawa, M., Arai, S., Kumagai, S., Igimi, S. and Shimizu, M.: Blockade of *Salmonella enteritidis* passage across the basolateral barriers of human intestinal epithelial cells by specific antibody. Microbiol. Immunol., **44**, 473–479 (2000).
 - 38) 天野富美夫, 唐橋久恵, 石井克幸, 五十君静信: サルモネラ(*Salmonella enteritidis*)のヒト上皮系細胞株T-84への接着を阻害する抗体の開発とサルモネラの増殖期による反応性の違いに関する研究. Bacterial Adherence 研究, **14**, 71–75 (2000).
 - 39) Tanaka, Y., Takizawa, M., Igimi, S. and Amano, F.: Enhanced release of prostaglandin D2 during re-incubation of RAW264.7 macrophage-like cells after treatment of both lipopolysaccharide and non-steroidal anti-inflammatory. Drugs. Biol. Pharm. Bull., **27**, 985–991 (2004).
 - 40) Fukuda, S., Tatsumi, H., Igimi, S. and Yamamoto, S.: Improved bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of *Salmonella* in chicken meat samples. Lett. Appl. Microbiol., **41**, 379–384(2005).
 - 41) Terai, S., Yamasaki, M., Igimi, S. and Amano, F.: Expression of SEp22, a pathogenicity-related protein of *Salmonella* Dps, in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from the poultry farms in Japan. Bioscience and Microflora, **24**, 113–118 (2005).
 - 42) Igimi, S., Yamasaki, M., Yamamoto, S. and Amano, F.: An anti-Salmonella antibody prevents the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from infecting a human intestinal epithelial cell line, Caco-2, by interacting with flagella. Bioscience and Microflora, **25**, 117–119 (2006).
 - 43) Toyota-Hanatani, Y., Ekawa, T., Ohta, H., Igimi, S., Hara-Kudo, Y., Sasai, K. and Baba, E.: An assessment of inactivated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) vaccine treatment in layer flocks with regard to public

- health. Appl. Environment. Microbiol., **75**, 1005-1010 (2009).
- 44) Tamura, A., Yamasaki, M., Okutani, A., Igimi, S., Saitoh, N., Ekawa, T., Ohta, H., Katayama, Y. and Amano, F.: Dry-resistance of *Salmonella enteritidis* subsp. *enterica* serovar Enteritidis is regulated by both SEp22, a novel pathogenicity-related factor of *Salmonella*, and nutrients. Microbes and Environments, **24**, 121-127 (2009).
 - 45) Tamura, A., Nishio, E., Fujimori, K., Igimi, S. and Amano F.: Lactoferrin inhibits the acquisition of dry-resistance by *Salmonella* spp. Bioscience and Microflora, **28**, 81-88 (2009).
 - 46) Asakura, H., Ekawa, T., Sugimoto, N., Momose, Y., Kawamoto, K., Makino, S., Igimi, S. and Yamamoto, S.: Membrane topology of *Salmonella* invasion protein SipB confers osmotolerance. Biochemical and Biophysical Research Communications, **426**, 654-658 (2012).
 - 47) Asakura, H., Panutdaporn, N., Kawamoto, K., Igimi, S., Yamamoto, S. and Makino, S. Isolation of mini-Tn5Km2 Insertion mutants of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg sensitive to NaCl-induced osmotic stress. Microbiol. Immunol., **48**, 981-984 (2004).
 - 48) 五十君静信, 朝倉 宏: 乳児用調製粉乳中の *Enterobacter sakazakii* による感染. 食衛誌, **48**, J-229-J-233 (2007).
 - 49) Asakura, H., Morita-Ishihara, T., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Genetic characterization of thermal tolerance in *Enterobacter sakazakii*. Microbiol. Immunol., **51**, 671-677 (2007).
 - 50) 萩原博和, 露木朝子, 古川壮一, 森永 康, 五十君静信. 乳児用調製粉乳 (PIF) の調乳および保存方法が *Enterobacter sakazakii* の生残と増殖に及ぼす影響. 食衛誌, **50**, 109-116 (2009).
 - 51) 五十君静信: 新しい食中毒菌 *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). 日食微誌, **27**, 75-79 (2010).
 - 52) Ogihara, H., Kiribe, N., Fukuda, N., Furukawa, S., Morinaga, Y. and Igimi, S.: *Cronobacter* spp. In commercially available dried food in Japan. Biocontrol Sciences., **19**, 209-213 (2014).
 - 53) 鈴木穂高, 土屋 禎, 田中廣行, 今溝洋子, 佐々木直, 森 曜子, 五十君静信, 豊福 肇, 春日文子, 山本茂貴: 国内の冷凍パン生地, ならびに原材料の汚染実態調査. 食衛誌, **48**, J278-J283 (2007).
 - 54) Masuda, K., Yamamoto, S., Kubota, K., Kurazono, H., Makino, S., Kasuga, F., Igimi, S. and Asakura, H.: Evaluation of the dynamics of microbiological quality in lightly pickled napa cabbages during manufacture. J. Food Safety (2015) doi: 10.1111/jfs.12195 (2015)
 - 55) Asakura, H., Kawase, J., Ikeda, T., Honda, M., Sasaki, Y., Uema, M., Kabeya, H., Sugiyama, H., Igimi, S. and Takai, S.: Microbiological quality assessment of game meats at retail in Japan. J. Food Prot., 2119-2126 (2017)
 - 56) Asakura, H., Momose, Y., Ryu, C. H., Kasuga, F., Yamamoto, S. and Igimi, S.: *Providencia alcalifaciens* causes barrier dysfunction and apoptosis in tissue cell culture: potent role of lipopolysaccharides on diarrheagenicity. Food Additives & Contaminants: Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess., **30**, 1459-1466 (2013).
 - 57) Hirakata, Y., Izumikawa, K., Yamaguchi, T., Igimi, S., Furuya, N., Maesaki, S., Tomono, K., Yamada, Y., Kohno, S., Yamaguchi, K. and Kamihira, S.: Adherence to and penetration of human intestinal Caco-2 epithelial cell monolayers by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun., **66**, 1748-1751 (1998).
 - 58) Izumikawa, K., Hirakata, Y., Yamaguchi, T., Takemura, H., Maesaki, S., Tomono, K., Igimi, S., Kaku, M., Yamada, Y., Kohno, S. and Kamihira, S.: *Escherichia coli* O157 interactions with human intestinal Caco-2 cells and the influence of fosfomycin. J. Antimicrobial Chemotherapy, **42**, 341-347 (1998).
 - 59) Masuda, K., Kajikawa, A. and Igimi, S.: Establishment and evaluation of an in vitro M cell model using C2B-Be1 cells and Raji cells. Bioscience and Microflora, **30**, 37-44 (2011)
 - 60) Ryu, C.H., Igimi, S., Inoue, S. and Kumagai, S.: The incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. Int. J. Food Microbiol., **16**, 157-160 (1992).
 - 61) Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan. Int. J. Food Microbiol., **93**, 131-140 (2004).
 - 62) Takeshi, K., Kitagawa, M., Kadohira, M., Igimi, S. and Makino S.: Hazard analysis of *Listeria monocytogenes* contaminations in processing of salted roe from Wall-eye Pollock (*Theragra chalcogramma*) in Hokkaido, Japan. J. Vet. Med. Sci., **71**, 87-91 (2009).
 - 63) Okada, Y., Monden, S., Igimi, S. and Yamamoto, S.: The Occurrence of *Listeria monocytogenes* in imported ready-to-eat foods in Japan. J. Vet. Med. Sci., **74**, 373-375 (2012).
 - 64) Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Nationwide survey of *Listeria monocytogenes* infection in Japan. Epidemiol. Infect., **132**, 769-772 (2004)
 - 65) 五十君静信: 国内のリステリア症の現状とその制御に向けて. 日食微誌, **23**, 190-193 (2006).
 - 66) Makino, S., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S. and Igimi, S.: An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. Int. J. Food Microbiol., **104**, 189-196 (2005).
 - 67) Hara, H., Ohashi, Y., Sakurai, T., Yagi, K., Fujisawa, T. and Igimi, S.: Effect of Nisin (Nisaplin) on the Growth of *Listeria monocytogenes* in Karashi-mentaiko (Red-pepper Seasoned Cod Roe). Journal of the Food Hygienic Society of Japan., **50**, 173-177 (2009).
 - 68) Okada, Y., Ohnuki, Suzuki H. and Igimi, S.: Growth of *Listeria monocytogenes* in refrigerated ready-to-eat foods in Japan. Food Additives & Contaminants: Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess., **30**, 1446-1449 (2013).
 - 69) 上崎(堀越)菜穂子, 鮫島 隆, 大森康雄, 府中英孝, 三明清隆, 森岡 豊, 小谷健二, 小齊喜一, 後藤清太郎, 渡辺 至, 中島誠人, 猪口由美, 西坂嘉代子, 五十君静信, 新村 裕, 服部昭仁: 生ハムにおける水分活性と乳酸ナトリウムによる *Listeria monocytogenes* の制御. 日本食品科学工学会誌, **60**, 347-356 (2013).
 - 70) 森岡 豊, 小谷健二, 小齊喜一, 大森康雄, 府中英孝, 三明清隆, 後藤清太郎, 渡辺 至, 上崎(堀越)菜穂子, 鮫島 隆, 中島誠人, 猪口由美, 西坂嘉代子, 五十君静

- 信, 新村 裕, 服部昭仁: 生ハムにおける *Listeria monocytogenes* の増殖に及ぼす水分活性とナイシンの影響. 日本食品科学工学会誌, **60**, 619-627 (2013).
- 71) 後藤清太郎, 渡辺 至, 大森康雄, 府中英孝, 三明清隆, 森岡 豊, 小谷健二, 小齋喜一, 上崎(堀越)菜穂子, 鮫島 隆, 猪口由美, 中島誠人, 西坂嘉代子, 五十君静信, 新村 裕, 服部昭仁: 生ハムにおける *Listeria monocytogenes* の挙動に対する水分活性とくん煙の影響. 日本食品科学工学会誌, **61**, 9-18 (2014).
- 72) 萩原博和, 渡邊嵩之, 堀川俊暢, 古川壮一, 岡田由美子, 五十君静信: 非加熱喫食調理済み食品に接種した *Listeria monocytogenes* の低温保存中における増殖. 日本食品保蔵科学会誌, **42**, 155-163 (2016).
- 73) Okada, Y., Okutani, A., Suzuki, H., Asakura, H., Monden, S., Nakama, A., Maruyama, T., and Igimi, S.: Antimicrobial Susceptibilities of *Listeria monocytogenes* Isolated in Japan. J. Vet. Med. Sci., **73**, 1681-1684 (2011).
- 74) Okada, Y., Monden, S., Suzuki, H., Nakama, A., Ida, M. and Igimi, S.: Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated from the imported and the domestic foods in Japan. J. Food Nutr. Sci., **3**, 70-73 (2015).
- 75) Kyoui, D., Takahashi, H., Miya, S., Kuda, T., Igimi, S. and Kimura, B.: Genetic distance in the whole-genome perspective on *Listeria monocytogenes* strains F2-382 and NIHS-28 that show similar subtyping results. BMC Microbiol. **14**, 309 (2014).
- 76) Miya, S., Takahashi, H., Nakagawa, M., Kuda, T., Igimi, S. and Kimura, B.: Genetic characteristics of Japanese clinical *Listeria monocytogenes* isolates. PLOS ONE. **10**, e0122902 (2015).
- 77) Asakura, H., Kawamoto, K., Igimi, S., Yamamoto, S. and Makino, S.: Enhancement of mice susceptibility to infection with *Listeria monocytogenes* by the treatment of morphine. Microbiol. Immunol., **50**, 543-547 (2006).
- 78) Okada, Y., Okada, N., Makino, S., Asakura, H., Yamamoto, S. and Igimi, S.: The sigma factor, RpoN (sigma54) is involved in osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett., **263**, 54-60 (2006).
- 79) Okada, Y., Makino, S., Okada, N., Asakura, H., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Identification and analysis of the osmotolerance associated genes in *Listeria monocytogenes*. Food Addit. Contam., **25**, 1089-1094 (2008).
- 80) Asakura, H., Kawamoto, K., Okada, Y., Kasuga, F., Makino, S., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Intrahost passage alters SigB-dependent acid resistance and host cell-associated kinetics of *Listeria monocytogenes*. Infection, Genetics and Evolution, **12**, 94-101 (2012).
- 81) 五十君静信: 微生物試験の標準化・日本の状況と今後. 日食微誌, **25**, 18-22 (2008).
- 82) Momose, Y., Okada, Y., Asakura, H., Ekawa, T., Masuda, K., Matsuoka, H., Yokoyama, K., Kai, A., Saito, S., Hiramatsu, R., Taguchi, M., Ishimura, K., Tominaga, K., Yahiro, S., Fujita, M. and Igimi, S.: Evaluation of the culture method NIHSJ-02 alternative to ISO 10272-1:2006 for the detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in chicken: collaborative study. J. AOAC Int., **96**, 991-997 (2013).
- 83) 朝倉 宏, 岡田由美子, 五十君静信: 食品・医薬品・環境分野等の微生物試験法および微生物汚染の制御に関する最近の話題「食品衛生検査指針 微生物編2015」収載試験法. 日本防菌防黴学雑誌, **45**, 225-229 (2017).
- 84) Matsuoka, H., Shigetomi, T., Funabashi, H., Saito, M. and Igimi, S.: Tryptic soy medium is feasible for the in situ preparation of standards containing small defined numbers of microbial cells. J. Microbiol. Method., **93**, 49-51 (2013).
- 85) Matsuoka, H., Nakano, K., Takatani, N., Yoshida, T., Igimi, S. and Saito, M.: Flow cytometric method for *in situ* preparation of standard materials of a small defined number of microbial cells with colony-forming potentiality. J. AOAC Int., **97**, 479-483 (2014).
- 86) 松村浩介, 清水 晃, 河野潤一, 五十君静信: 畜水産食品からの黄色ブドウ球菌検出のための選択分離培地および選択増菌培地の検討. 日食微誌, **26**, 23-27 (2009).
- 87) Ryu, C. H., Cho, S. W., Inoue, S., Igimi, S. and Kumagai, S.: The most specific primers for the identification of *Listeria monocytogenes* by the polymerase chain reaction method. Foods and Biotechnology. **5**, 30-33 (1996).
- 88) Yoshida, W., Kezuka, A., Murakami, Y., Lee, J., Abe, K., Motoki, H., Matsuo, T., Shimura, N., Noda, M., Igimi, S. and Ikebukuro, K.: Automatic polymerase chain reaction product detection system for food safety monitoring using zinc finger protein fused to luciferase. Analytica. Chimica. Acta, **801**, 78-83 (2013).
- 89) Abe, K., Kumagai, T., Takahashi, C., Kezuka, A., Murakami, Y., Osawa, Y., Motoki, H., Matsuo, T., Horiuchi, M., Sode, K., Igimi, S. and Ikebukuro, K.: Detection of pathogenic bacteria by using zinc finger protein fused with firefly luciferase. Anal. Chem., **84**, 8028-8032 (2012).
- 90) Matsuoka, H., Oishi, K., Watanabe, M., Kozone, I., Saito, M. and Igimi, S.: Viable cell detection by the combined use of fluorescent glucose and fluorescent glycine. Biosci. Biotechnol. Biochem., **67**, 2459-2462 (2003).
- 91) 酒井史彦, 青山顕司, 篠澤映子, 山縣 尚, 丸山 務, 五十君静信, 柳平修一: ナチュラルチーズからの *Listeria monocytogenes* 検出における自動免疫蛍光測定装置の利用. 日食微誌, **22**, 17-23 (2005).
- 92) 五十君静信: Codexにおける遺伝子組換え微生物利用食品の安全性に関するガイドライン作り. 日本乳酸菌学会誌, **14**, 89-93 (2003).
- 93) Igimi, S., Ryu, C. H., Park, S. H., Sasaki, Y., Sasaki, T. and Kumagai, S.: Transfer of conjugative plasmid pAMBeta1 from *Lactococcus lactis* to mouse intestinal bacteria. Lett. Appl. Microbiol., **23**, 31-35 (1996).
- 94) Akiyama, H., Toyoda, M., Kato, M., Igimi, S. and Kumagai, S.: The degradation of several mycotoxins by human intestinal microflora cultured by continuous flow culture system. Mycotoxins, **44**, 21-27 (1997).
- 95) Morita, H., Toh, H., Oshima, K., Murakami, M., Taylor, T. D., Igimi, S. and Hattori, M.: Complete genome sequence of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103. J. Bacteriol., **191**, 7630-7631 (2009).
- 96) Toh, H., Oshima, K., Nakano, A., Takahata, M., Murakami, M., Takaki, T., Nishiyama, H., Igimi, S., Hattori, M. and Morita, H.: Genomic adaptation of the *Lactobacillus*

- casei* group. PLOS ONE, **8**, e75073 (2013).
- 97) 五十君静信: 乳酸菌を抗原運搬体とする経口ワクチンの開発. 日本乳酸菌学会誌, **8**, 101-105 (1998).
- 98) Igimi, S., Kajikawa, A. and Okutani, A.: Development of oral vaccines based on lactic acid bacteria. Milk Science, **52**, 185-187 (2003).
- 99) Kim, T. W., Igimi, S., Kajikawa, A. and Kim, H. Y.: Display of heterologous proteins on the surface of *Lactococcus lactis* using the H and W domain of PrtB from *Lactobacillus delburueckii* subsp. *bulgaricus* as an anchoring matrix. J. Appl. Microbiol., **104**, 1636-1643 (2008).
- 100) Cheun, H. I., Kawamoto, K., Hiramatsu, M., Tamaoki, H., Shirahata, T., Igimi, S. and Makino, S.: Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. J. Appl. Microbiol., **96**, 1347-1353 (2004).
- 101) Xin, K. Q., Hashino, Y., Toda, Y., Igimi, S., Kojima, Y., Jounai, N., Ohba, K., Kushiro, A., Kiwaki, M., Hamajima, K., Klinman, D. and Okuda, K.: Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. Blood., **102**, 223-228 (2003).
- 102) Toyota-Hanatani, Y., Inoue, M., Ekawa, T., Ohta, H., Igimi, S., and Baba, E.: Importance of The Major Fli C Antigenic Site of *Salmonella* Enteritidis as A Subunit Vaccine Antigen. Vaccine, **26**, 4135-4137 (2008).
- 103) Kajikawa, A., Satoh, E., Leer, R. J., Yamamoto, S. and Igimi, S.: Intra-gastric immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Vaccine, **25**, 3599-3605 (2007).
- 104) Kajikawa, A. and Igimi, S.: Reduction of TNF- α inducing capacity of recombinant *Lactobacillus casei* caused by the expression of *Salmonella* OmpC. Appl. Environment. Microbiol., **75**, 2727-2734 (2009).
- 105) Kajikawa, A. and Igimi, S.: Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. Vaccine, **28**, 3409-3415 (2010).
- 106) Kajikawa, A., Ichikawa, E. and Igimi, S.: Development of a highly efficient protein-secreting system in recombinant *Lactobacillus casei*. J. Microbiol. Biotech., **20**, 375-382 (2010).
- 107) Kajikawa, A., Masuda, K., Katoh, M. and Igimi, S.: Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1 beta. Clinical and Vaccine Immunology, **17**, 43-48 (2010).
- 108) Kajikawa, A., Midorikawa, E., Masuda, K., Kondo, K., Irisawa, T., Igimi, S. and Okada, S.: Characterization of flagellins isolated from a highly motile strain of *Lactobacillus agilis*. BMC Microbiol., **16**, 49 (2016).
- 109) Kajikawa, A., Suzuki, S. and Igimi, S.: The impact of motility on the localization of *Lactobacillus agilis* in the murine gastrointestinal tract. BMC Microbiol., **18**, 68 (2018).
- 110) Suzuki, S., Yokota, K., Igimi, S. and Kajikawa, A.: Comparative analysis of immunological properties of S-layer proteins isolated from *Lactobacillus* strains. Microbiology, 2019 Jan 8. doi: 10.1099/mic.0.000766.
- 111) Komatsu, A., Igimi, S. and Kawana, K.: Optimization of human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing lactobacillus-based vaccine for induction of mucosal E7-specific IFN γ -producing cells. Vaccine, **36**, 3423-3426 (2018).