

<最終年度報告書>

委託プロジェクト研究
「食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト」
平成29年度 最終年度報告書

13406381

損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発

研究実施期間	平成25年度～平成29年度（5年間）
代表機関	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品研究部門
研究開発責任者	稲津 康弘
共同研究機関	国立大学法人 九州大学 農学部
	国立大学法人 北海道大学（水産学部、農学部）
	国立大学法人 東京海洋大学 海洋生命科学部
	公立大学法人 大阪府立大学 生命環境科学域
	学校法人 近畿大学 生物理工学部
	国立研究開発法人 水産研究・教育機構 （中央水産研究所、北海道地区水産研究所）
	地方独立行政法人 北海道立総合研究機構（畜産試験場）
	新潟県農業総合研究所
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 （動物衛生研究部門、野菜花き研究部門）
普及・実用化支援組織	なし
研究開発責任者 連絡先	TEL : 029-838-8067 FAX : 029-838-8067 E-mail : inatu@affrc.go.jp

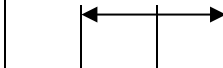










<別紙様式3. 最終年度報告書>

I-1. 年次計画

研究課題	研究年度					担当研究機関・研究室	
	25	26	27	28	29	機関	研究室
1. 大腸菌等有害細菌の物理的・化学的損傷機構の解明 (1) 既存成果の整理と問題の洗い出し(損傷要因の抽出・解析) (2) 細胞損傷の質的分析と評価法の改良(酸化2次損傷の解明と新規損傷菌評価法の構築) (3) 併用効果発現の予測理論(S/Rマトリックスの構築) (4) 大腸菌の酸損傷機構の解明						大阪府立大学	微生物制御研究センター
	←	損傷要因の抽出・解析	→				
			←	損傷の質的分析・評価法	→		
				S/Rマトリックス解析	←		
			←	酸耐性遺伝子の解析	→	農研機構・食品研究部門	食品安全性解析ユニット
2. 食品中の加熱損傷サルモネラによるリスクの低減技術開発 (1) 低水分活性状態における加熱損傷菌発生条件の決定 (2) 加熱損傷からの回復におけるシグマ因子の関与の検証 (3) 異なる水分活性の培地中で加熱損傷からの回復挙動解明 (4) DNAマイクロアレイによる耐性化、回復中に発現する遺伝子の同定 (5) 損傷回復時に発現変化する遺伝子産物の回復における機能解明 (6) 低水分活性食品において加熱損傷を促進させる共存物質(食品添加物や天然由来成分)の検索や物理化学的条件の検討						九州大学	食品衛生化学研究室
	←	損傷条件決定	→				
	←	シグマ因子の関与	→				
	←	回復挙動解明	→				
	←	耐熱性向上・回復関連遺伝子同定	→				
			←	遺伝子機能解明	→		
			←	損傷促進条件回復阻害条件	→		

<p>3. カンピロバクター損傷菌の特性解明と検出技術の開発</p>	<p>損傷菌の増殖に寄与する新規栄養素の探索</p>	<p>農研機構・動物衛生研究部門</p>	<p>腸管病原菌ユニット</p>
	<p>新規栄養素を利用した増菌培養法の開発</p>		
<p>4. 嫌気性芽胞形成食中毒細菌の損傷過程の解析と新規毒素検出法の開発 (1) 芽胞形成の制御と毒素の基礎情報解析 (2) 発芽遺伝子の機能解析 (3) 発芽に対するストレス因子の機能解析</p>	<p>芽胞形成の機序・制御解析</p>	<p>大阪府立大学</p>	<p>生命環境科学研究科</p>
	<p>発芽の機序解析</p>	<p>大阪府立大学</p>	<p>生命環境科学研究科</p>
<p>5. 漁獲段階における漁獲物の細菌数制御技術の開発</p>	<p>発芽制御の標的解析</p>	<p>大阪府立大学</p>	<p>生命環境科学研究科</p>
<p>(1) 実験室内における損傷菌出現頻度の測定 (2) 漁業現場における損傷菌出現頻度の測定 (3) 漁業現場に適用可能な微生物制御技術の開発</p>	<p>光回復の実態調査</p>	<p>北海道大学</p>	<p>水産科学研究院</p>
	<p>漁港における各種海水殺菌方法の特性評価</p>	<p>北海道大学</p>	<p>水産科学研究院</p>
	<p>漁業現場に適用可能な微生物制御技術の開発</p>	<p>北海道大学</p>	<p>水産科学研究院</p>
<p>6. 加工段階における水産物の食中毒ビブリオ損傷菌の汚染動態の解明と制御法の開発</p>	<p>損傷菌の作出法とRNAseq法の確立</p>	<p>北海道大学</p>	<p>水産科学研究院</p>
<p>(1) 損傷メカニズムの分子解析</p>	<p>各種損傷菌の回復機構の解析</p>	<p>北海道大学</p>	<p>水産科学研究院</p>
<p>(2) 加工環境損傷による遺伝子発現変化の解析</p>	<p>効率的な殺菌方法の組み合わせ例を提案</p>	<p>北海道大学</p>	<p>水産科学研究院</p>
<p>(3) 新たな微生物制御法の開発</p>			

<p>7. 損傷リステリアの発生機構の解明と制御法の開発</p> <p>(1) リステリアの損傷程度と損傷リステリアの動態解明</p> <p>(2) 損傷細胞の特性変化と損傷機構の解明</p> <p>(3) 損傷機構を利用したリステリア制御法の確立</p>	<p>加工処理によるリステリアの損傷程度と損傷リステリアの動態</p> <p>←→</p> <p>フィラメント化細胞の特性</p> <p>←→</p> <p>効率的な殺菌方法の組み合わせ例を提案</p> <p>←→</p>	<p>北海道大学</p> <p>北海道大学</p> <p>北海道大学</p>	<p>水産科学研究所</p> <p>水産科学研究所</p> <p>水産科学研究所</p>
<p>8. 各種食品加工処理がヒスタミン生成菌のヒスタミン能に及ぼす影響の解明</p> <p>(1) ヒスタミン生成菌・酵素検出法の作成</p> <p>(2) 損傷メカニズムの解明および関連酵素の不活性化</p> <p>(3) 損傷菌を含めた制御法の確立</p>	<p>酸処理損傷ヒスタミン生成菌の検出法開発</p> <p>←→</p> <p>酸処理損傷菌のヒスタミン生成能評価</p> <p>←→</p> <p>効率的な殺菌方法の組み合わせ例を提案</p> <p>←→</p>	<p>水研機構中央水産研究所</p> <p>水研機構中央水産研究所</p> <p>水研機構中央水産研究所</p>	<p>衛生管理グループ</p> <p>衛生管理グループ</p> <p>衛生管理グループ</p>
<p>9. 野菜の栽培から流通環境における損傷菌の生残性とその制御</p> <p>(1) 栽培および収穫環境中の薬剤損傷菌の実態解明</p> <p>(2) 貯蔵流通中の薬剤損傷菌の実態解明と制御法の検討</p> <p>(3) 栽培から貯蔵流通中の損傷菌の消長の検証と制御法の確立</p>	<p>損傷菌の発生調査</p> <p>←→</p> <p>損傷菌の生残調査</p> <p>←→</p> <p>損傷菌制御の実証</p> <p>←→</p>	<p>近畿大学</p> <p>近畿大学</p> <p>近畿大学</p>	<p>生物工学部</p> <p>生物工学部</p> <p>生物工学部</p>
<p>10. 堆肥化過程における食中毒菌の生残性に関する環境要因の解明と、これら環境ストレスによる損傷菌化メカニズムの解明</p> <p>(1) サルモネラの生残性に関する検討</p>	<p>サルモネラの生残性と損傷菌の発生実態</p> <p>←→</p>	<p>農研機構・野菜花き部門 道総研畜産試験場</p>	<p>野菜生産システム研究領域 基盤研究部飼料環境G・衛生G</p>

<p>(2) リステリアの生残性に関する検討</p>	<p>リステリアの生残性と損傷菌の発生実態</p> 	<p>農研機構・野菜花き部門 道総研畜産試験場</p>	<p>野菜生産システム研究領域 基盤研究部飼料環境G・衛生G</p>
<p>(3) 損傷化せずに食中毒菌を低減するための堆肥化条件の提示</p>	<p>比重による堆肥化条件の特定</p> 	<p>農研機構・野菜花き部門 道総研畜産試験場</p>	<p>野菜生産システム研究領域 基盤研究部飼料環境G・衛生G</p>
<p>1 1. 生食用野菜栽培段階におけるリステリアの損傷菌化機構と可食部汚染機構の解明</p>			
<p>(1) トマト栽培中の損傷菌化と汚染機構解明</p>	<p>トマト栽培</p> 	<p>九州大学</p>	<p>食品衛生化学研究室</p>
<p>(2) リーフレタス栽培中の損傷菌化と汚染機構解明</p>	<p>リーフレタス栽培</p> 	<p>九州大学</p>	<p>食品衛生化学研究室</p>
<p>(3) メロン栽培中の損傷菌化と汚染機構解明</p>	<p>メロン栽培</p> 	<p>新潟県農業総合研究所</p>	<p>基盤研究部</p>
<p>(4) ハツカダイコン栽培中の損傷菌化と汚染機構解明</p>	<p>ハツカダイコン栽培</p> 	<p>九州大学</p>	<p>食品衛生化学研究室</p>
<p>(5) キャベツの栽培中の損傷菌化と汚染機構解明</p>	<p>キャベツ栽培</p> 	<p>新潟県農業総合研究所</p>	<p>基盤研究部</p>
<p>1 2. 保存料、日持ち向上剤を用いた損傷食中毒菌の制御法とその評価法に関する研究</p>			
<p>(1) 損傷菌定量系の構築</p>	<p>核酸結合試薬+qPCR系の確立</p> 	<p>東京海洋大学</p>	<p>食品微生物学研究室</p>
<p>(2) 食品中の添加物による損傷菌発生の評価</p>	<p>評価系の有効性を確認</p> 	<p>東京海洋大学</p>	<p>食品微生物学研究室</p>
<p>(3) 実証試験による確認</p>	<p>殺菌前後のモニタリングに使用可能か評価する</p> 	<p>東京海洋大学</p>	<p>食品微生物学研究室</p>
<p>1 3. 食品加工工程における損傷菌の生残性と挙動の解明</p>			
<p>(1) 食品中における食中毒菌特異的増殖曲線作製手法の構築</p>	<p>増殖曲線取得法開発</p> 	<p>農研機構・食品研究部門</p>	<p>食品衛生ユニット</p>

<p>(2) 損傷菌作製条件と増殖挙動取得の基礎的検討</p>	<p>損傷菌作製条件検討</p>	<p>農研機構・食品研究部門 北海道大学</p>	<p>食品衛生ユニット 食品加工工学研究室</p>
<p>(3) 食品中における損傷度の計測実験および食品製造・貯蔵過程を想定した損傷度計測試験</p>	<p>実食品での検討</p>	<p>農研機構・食品研究部門 北海道大学</p>	<p>食品衛生ユニット 食品加工工学研究室</p>
<p>1 4. 高圧処理を活用した有害細菌の損傷菌調製による機構解明及び損傷菌制御技術の開発</p>	<p>安定的な高圧損傷菌作出法の検討</p>	<p>農研機構・食品研究部門</p>	<p>食品品質評価制御ユニット 微生物機能ユニット</p>
<p>1 5. 国際連携にもとづく損傷食中毒菌検出法および多剤耐性細菌の損傷特性の評価</p>	<p>高圧損傷メカニズムの解明</p>	<p>農研機構・食品研究部門</p>	<p>食品品質評価制御ユニット 微生物機能ユニット</p>
	<p>高圧損傷菌検出のための培養法検討</p>	<p>農研機構・食品研究部門</p>	<p>食品品質評価制御ユニット 微生物機能ユニット</p>
<p>(1) 損傷菌検出法と多剤耐性菌の損傷特性の評価</p>	<p>損傷菌検出と多剤耐性菌収集</p>	<p>農研機構・食品研究部門</p>	<p>食品衛生ユニット 生物機能解析ユニット</p>
<p>1 6. マイクロ流体工学デバイスによる複数食中毒菌の損傷菌同時一斉検出手法と損傷菌発生予測モデルの開発</p>	<p>デバイス開発</p>	<p>農研機構・食品研究部門 北海道大学</p>	<p>食品衛生ユニット 食品加工工学研究室</p>
<p>(2) 損傷菌発生予測モデルの開発</p>			

I - 2. 実施体制

研究項目	担当研究機関・研究室		研究担当者
	機関	研究室	
研究開発責任者	農研機構・食品研	食品衛生ユニット	◎稲津康弘
1. 大腸菌等有害細菌の物理的・化学的損傷機構の解明	大阪府立大学	微生物制御研究センター	○土戸哲明 坂元仁
(1) 既存成果の整理と問題の洗い出し（損傷要因の抽出・解析）	大阪府立大学	微生物制御研究センター	○土戸哲明 坂元仁
(2) 細胞損傷の質的分析と評価法の改良（酸化2次損傷の解明と新規損傷菌評価法の構築）	大阪府立大学	微生物制御研究センター	○土戸哲明 坂元仁
(3) 併用効果発現の予測理論（S/Rマトリックスの構築）	大阪府立大学	微生物制御研究センター	○土戸哲明 坂元仁
(4) 損傷菌検出法の確立と多剤耐性菌の損傷特性の評価	農研機構・食品研	食品衛生ユニット 生物機能解析ユニット	○稲津康弘 岡本晋
(5) 大腸菌の酸損傷機構の解明	農研機構・食品研	食品安全性解析ユニット	○前任者岡本晋 （～2016. 3） 後任者亀谷宏美 （2016. 4～）
2. 食品中の加熱損傷サルモネラによるリスクの低減技術開発	九州大学	食品衛生化学研究室	○宮本敬久
(1) 低水分活性状態における加熱損傷菌発生条件の決定	九州大学	食品衛生化学研究室	○宮本敬久
(2) 加熱損傷からの回復におけるシグマ因子の関与の検証	九州大学	食品衛生化学研究室	○宮本敬久
(3) 異なる水分活性の培地中で加熱損傷からの回復挙動解明	九州大学	食品衛生化学研究室	○宮本敬久
(4) DNAマイクロアレイによる耐性化、回復中に発現する遺伝子の同定	九州大学	食品衛生化学研究室	○宮本敬久
(5) 損傷回復時に発現変化する遺伝子産物の回復における機能解明	九州大学	食品衛生化学研究室	○宮本敬久
(6) 低水分活性食品において加熱損傷を促進させる共存物質（食品添加物や	九州大学	食品衛生化学研究室	○宮本敬久

天然由来成分) の検索や物理化学的条件の検討			
3. カンピロバクター損傷菌の特性解明と検出技術の開発	農研機構・動衛研	腸管病原菌ユニット	○秋庭正人 岩田剛敏
4. 嫌気性芽胞形成食中毒細菌の損傷過程の解析と新規毒素検出法の開発	大阪府立大学	生命環境科学研究科	○三宅眞実 幸田知子 安木真世
(1) 芽胞形成の制御と毒素の基礎情報解析	大阪府立大学	生命環境科学研究科	○三宅眞実 幸田知子 安木真世
(2) 発芽遺伝子の機能解析	大阪府立大学	生命環境科学研究科	○三宅眞実 幸田知子 安木真世
(3) 発芽に対するストレス因子の機能解析	大阪府立大学	生命環境科学研究科	○三宅眞実 幸田知子 安木真世
5. 漁獲段階における漁獲物の細菌数制御技術の開発	北海道大学	水産科学研究院	○笠井久会
6. 加工段階における水産物の食中毒ビブリオ損傷菌の汚染動態の解明	北海道大学	水産科学研究院	○澤辺智雄
7. 損傷リステリアの発生機構の解明と制御法の開発	北海道大学	水産科学研究院	○山崎浩司
8. 各種食品加工処理がヒスタミン生成菌のヒスタミン生成能に及ぼす影響	水研機構	中央水産研究所 北海道区水産研究所	○里見正隆 福井洋平 矢野豊
9. 野菜の栽培から流通環境における損傷菌の生残性とその制御	近畿大学	生物理工学部	○泉秀実
10. 堆肥化過程における食中毒菌の生残性に関する環境要因の解明と、これら環境ストレスによる損傷菌化メカニズムの解明	農研機構・野菜花き研 道総研畜産試験場	野菜生産システム研究領域 基盤研究部飼料環境 G・衛生 G	○木嶋伸行 徳田進一 湊啓子 櫻井由絵
11. 生食用野菜栽培段階におけるリステリアの	九州大学	食品衛生化学	○本城賢一

損傷菌化機構と可食部汚染機構の解明	新潟県農業総合研究所	基盤研究部	前田征之
1 2. 保存料、日持ち向上剤を用いた損傷食中毒菌の制御法とその評価法に関する研究	東京海洋大学	食品微生物学研究室	○高橋 肇 木村 凡
1 3. 食品中における損傷度の計測実験および食品製造・貯蔵過程を想定した損傷度計測試験	農研機構・食品研	食品衛生ユニット	○細谷幸恵 稲津康弘
(1) 高塩濃度での貯蔵条件での損傷度計測	農研機構・食品研	食品衛生ユニット	○細谷幸恵 稲津康弘
(2) 損傷菌発生予測への検討	北大大学院農学研究院	食品加工工学研究室	○小関成樹
1 4. 高圧処理を活用した有害細菌の損傷菌調製による機構解明及び損傷菌制御技術の開発	農研機構・食品研	食品品質評価制御ユニット 微生物機能ユニット	○山本和貴 中浦嘉子 木村啓太郎 稲岡隆史

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
大課題名	食品の安全性と動物衛生の向上のためのプロジェクト		
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
代表機関・研究開発責任者名	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 稲津 康弘・食品研究部門		

I-1. 研究目的

自然環境中または食品の加工・流通中に発生した損傷菌は至適条件において増殖を再開し、その結果、食中毒を起こす可能性がある一方、既存の検査法では十分に検出されていない可能性がある。

このため、本研究ではその機序を明らかにするとともに、現場で発生している問題を早急に解決するため、

1. 大腸菌等有害細菌の物理的・化学的損傷機構の解明
2. 食品中の加熱損傷サルモネラによるリスクの低減技術開発
3. カンピロバクター損傷菌の特性解明と検出技術の開発
4. 嫌気性芽胞形成食中毒細菌の損傷過程の解析と新規毒素検出法の開発
5. 漁獲段階における漁獲物の細菌数制御技術の開発
6. 加工段階における水産物の食中毒ビブリオ損傷菌の汚染動態の解明と制御法の開発
7. 損傷リステリアの発生機構の解明
8. 各種食品加工処理がヒスタミン生成菌のヒスタミン生成能に及ぼす影響の解明
9. 野菜の栽培から流通環境における損傷菌の生残性とその制御
10. 堆肥化過程における食中毒菌の生残性に関与する環境要因の解明と、これら環境ストレスによる損傷菌化メカニズムの解明
11. 生食用野菜栽培段階におけるリステリアの損傷菌化機構と可食部汚染機構の解明
12. 保存料、日持ち向上剤を用いた損傷食中毒菌の制御法とその評価法に関する研究
13. 食品加工工程における損傷菌の生残性と挙動の解明
14. 高圧処理を活用した有害細菌の損傷菌調製による機構解明及び損傷菌制御技術の開発
15. 国際連携にもとづく損傷食中毒菌検出法および多剤耐性細菌の損傷特性の評価
16. マイクロ流体工学デバイスによる複数食中毒菌の損傷菌同時一斉検出手法と損傷菌発生予測モデルの開発

により、損傷菌検出手法と微生物制御手法の開発を同時進行で行うことを目標とする。

その結果、損傷菌に起因する食中毒の発生防止に必要な基礎的知見が得られるとともに、農業・漁業および食品加工現場における食品衛生の向上に寄与する技術が開発されることが期待される。

I-2. 研究結果

(1) 課題1

細菌の物理的・化学的損傷機構の解明に関する研究を行い、二次損傷メカニズムについて明らかにするとともに、その対策に関する基礎的な知見を得た。

(2) 課題2

低水分状態におけるサルモネラの損傷について研究を行い、耐熱性向上や損傷回復に関する遺伝子を特定した。

(3) 課題3

カンピロバクターの損傷について研究を行い、既存のものよりも効果の高い凍結鶏肉用検出培地成分を発見した。

(4) 課題4

ボツリヌスおよびウエルシュ菌の芽胞形成および発芽抑制に関して研究を行い、これらに関わる因子（食品成分を含む）を特定した。

(5) 課題5

漁港用殺菌水中の細菌の損傷について研究を行い、損傷菌の生じない装置の運転条件および漁港や産地市場での使用上の注意点をまとめたマニュアルを作成した。

(6) 課題6

腸炎ビブリオの損傷について研究を行い、ゲノムワイドな応答の解析を通じて、特に低塩分と酸ストレスの組み合わせが効果的な殺菌効果を示す理由を明らかにした。

(7) 課題7

リステリアの損傷について研究を行い、低水分食品中でのフィラメンテーションと酸素の関係性を明らかにした。また殺菌率が変わらない場合でも損傷率が大きく変わることを示した。

(8) 課題8

損傷菌によるヒスタミン生成の抑制に関する研究を行い、シメサバ調味液の組成および管理温度について、具体的な条件を設定した。

(9) 課題9

野菜の栽培から貯蔵・流通過程における薬剤損傷菌の連続的な消長の検証と、貯蔵・流通中の温度とガス濃度の組合せによる損傷菌の制御法を検討し、適切な作業条件を設定した。

(10) 課題10

堆肥製造過程における損傷菌の発生について研究を行い、現場で容易に実行できる、損傷菌を残さずに食中毒菌を低減するための牛ふん堆肥の作り方を提案した。

(11) 課題11

栽培土壌中の損傷菌の発生および損傷菌の土壌・用水を介した野菜への移行について研究を行い、汚染防止のための適切な農作業の条件を提示した。

(12) 課題12

加工野菜殺菌工程を対象として研究を行い、損傷菌をPMA-qPCRによりモニタリングする手法を構築した。一般的な殺菌法で、多くの損傷菌が生まれていることを明らかにした。

(13) 課題13

加工過程で生じる損傷菌の測定について研究を行い、新規な損傷度測定手法を開発した。この手法により、実食品中の損傷菌数の変動を測定する技術を開発した。

(14) 課題14

高圧処理によって発生する損傷菌について研究を行い、そのメカニズムの一部を明らかに

した。また市販培地では高圧損傷大腸菌が適切に検出されないことを明らかにした。

(15) 課題15

海外で分離された多剤耐性菌を対象として、通常菌との損傷度の違いについて研究を行った。効率的な研究推進のため、本課題は3年目より課題1と統合した。

(16) 課題16

多種損傷食中毒菌の一括検出デバイス開発と、それを用いた増殖モデルの作成を目的として研究を行った。3年目より前者は実現可能性が低いため中止、後者は課題13と統合した。

I-3. 今後の課題

損傷菌の発生メカニズムに関しては、5年間の研究を通じて、基本的な部分を相当に明らかにできたものとする。しかし細菌の損傷原因となる物理的、化学的因子は数多く、本研究を通じて、それぞれに応じた個別のメカニズムが働いている可能性が示唆され、今後の検討を要する。

損傷菌の検出に関してはISO標準法が必ずしも最適ともいえないことを示し、その代替となる可能性がある方法を示した。しかし測定法の国際標準化のためには室間コラボレーション試験等の実施が要求される。

損傷菌の制御に関しては、水産、農業現場で適用可能な技術の開発を行ったところであり、その普及に向けた現場実証試験の実施が求められる。

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	1	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	大腸菌等有害細菌の物理的・化学的損傷機構の解明		
小課題責任者名・研究機関	土戸哲明・大阪府立大学		

1) 研究目的

代表的な物理的・化学的細菌制御法である加熱と酸の処理によって発生する大腸菌等の損傷菌の発生機序を解明し、その成果に基づいて有効な対策法を開発することを目的とする。本プロジェクトではとくに、①加熱殺菌処理による細胞膜の損傷とそれに由来する活性酸素を主とする酸化損傷の関与とその修復について、また酸処理損傷菌では耐性（感受性）遺伝子の同定・機能解析から損傷・修復について検討し、それぞれの要因を解明すること、②これらの要因が深く関わって損傷菌の計数や定義概念にも影響を与えることから損傷菌評価法の改良・開発を目指すこと、③加熱・酸を主軸とした関係遺伝子多重欠損株の殺菌処理感受性・耐性化マトリックス（以下、S/Rマトリックス）解析（後述）を基に、損傷菌制御の予測併用処理理論を提出すること、の3つが実施上の具体的な目的である。

2) 研究成果

本研究の核心部分の検討に先立って、熱死滅・損傷への各因子の影響の程度を微生物の熱死滅データベース（ThermoKill Database）上で概観し、主因子として温度・pHを例に選択して加熱時のほか発育時・回復時の影響度を各過程でのz値と新規に定義したLDR(Log D Reduction)の値をもとに、主要な因子の影響の重要度を評価した。次に、上記各項目について検討し、主要な結果を以下に示す。

- ① 加熱損傷大腸菌の2次損傷としての酸化損傷機構・・・報告書らは別途これまでに、好気条件下での大腸菌培養細胞の加熱処理においては加熱自体による1次損傷のほかに、それに基づく2次損傷が発生することを報告している。本研究では、従来から指摘されている活性酸素種（ROS）が関与する2次損傷について、処理後の平板培養時に抗酸化剤を添加して検討した。通常使用の改変最小培地のEM9と天然培地のLBを発育培地および加熱処理後の後培養にピルビン酸ナトリウム（NaP）・チオ硫酸ナトリウム（NaTS）を添加した平板培地を用い、その生存性をcolony forming unit（CFU）によって比較した。その結果、EM9培養の場合にはNaTSの蘇生効果が顕著に現れ、NaP添加はあまりあるいはほとんど影響しないこと、LB培養ではNaPは蘇生効果をもたらしたがNaTSの効果は複雑な様相を示し、その適正濃度域ではNaPと同様な蘇生作用を示したがそれ以外の濃度では逆に死滅促

進作用を示した。一方、報告者ら (Takano and Tsuchido, *J. Ferment. Technol.*, **60**, 189-198, 1982) は以前に、平板法と異なって液体培地を用いる発育遅延解析 (GDA) 法で求める換算生存率 (IV) を提唱しているが、この評価法での NaTS と NaP の添加効果は軽微ないし無効であった。この結果から、寒天平板培養で観察された酸化損傷は加熱作用の 2 次損傷によるものと推察した。またこの 2 次損傷の発生機構として、細胞内酸化還元バランスの崩壊と活性酸素 (過酸化水素) の発生を示唆し、その発生は細胞内と細胞外双方由来の要因が存在する仮説を提示した。これまでの報告者らのプロジェクト以前の熱ショック応答および細胞表層ストレス応答に関する成果も含めた結果を総合して、今なお限定的ではあるが加熱損傷大腸菌における損傷・修復機構についての概念的なモデルを提出した (図 1)。

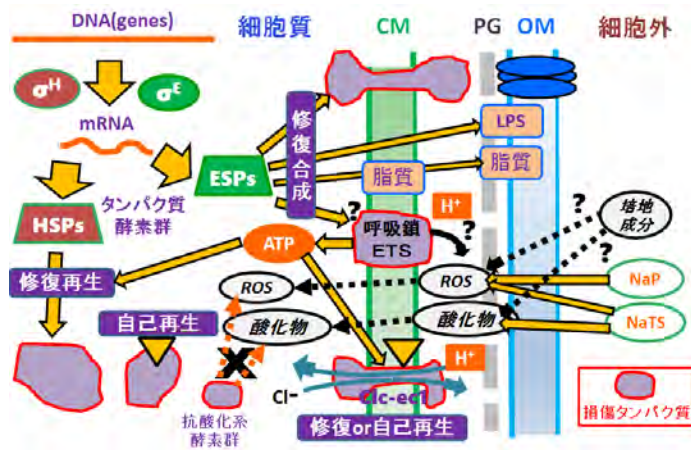


図1 加熱損傷大腸菌における損傷・再生・修復システムの概念図

②損傷菌数評価法の開発・・・上記 2 次損傷を考慮した平板法の改良を目指し、抗酸化剤を添加した強化平板法あるいは最確数法の適用による生菌+損傷菌数の測定と上述の GDA 法による生菌数測定との差から損傷菌数を求める差分後培養 (DS) 法を提唱した。またこれに基づいて計測した加熱処理における損傷菌数を示した (図 2)。

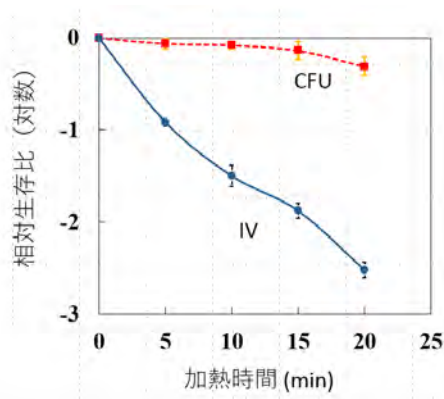


図2 50°Cでの加熱処理による大腸菌損傷菌数 (強化平板法によるCFUとGDA法によるIVの差分) 評価

これらDS法のうち、図2のように固体培養による強化平板法と液体培養によるGDA法で

の生存率差養によるものを液固差分生存性法 (Differential Viabilities between Solid and Liquid method、DiVSaL法) とした。

③抗酸化遺伝子群欠損株利用によるS/Rマトリックス解析・・・枯草菌と大腸菌の抗酸化酵素 (カタラーゼ群、superoxide dismutase群、有機系ROS防御酵素群、低分子酸化還元関係酵素群) の遺伝子群の単独およびそれらの種々の組み合わせの多重欠損株群を作製し、それぞれの株について種々の殺菌法 (加熱、*t*-ブチルヒドロペルオキシド、過酢酸、過酸化水素、パラコート、硝酸銀、クロラミンTなど) に対する感受性/耐性化の程度を定量的に表示したマトリックスを構築した。この表を用いて各殺菌法間の類似性・相違性を評価し、作用機構の比較とともに相乗効果発現の組合せ殺菌法の可能性を推察、示唆した。

酸損傷に関する研究では、最初に銅イオン処理を陽性対照として大腸菌の損傷菌検出技術の確立を行った。0.5 mMの硫酸銅処理3日目以降で平板法での生菌数は検出限界以下となった時、細胞をCYTO 9/Propidium iodide (LIVE/DEAD試薬) 二重染色して蛍光顕微鏡で観察すると7割程度が生細胞と判定されたことから、これらが損傷菌として存在することが示された。さらに、LIVE/DEAD染色した細胞のフローサイトメトリ分析し、各種パラメーターの検討によって損傷菌の定量解析法を確立した。そこで次に、大腸菌を低pH処理および酢酸処理して同様の解析を行ったところ、いずれの処理においても損傷菌の発生を確認した (図3)。さらに酸ストレス応答能欠損変異株の酸ストレス損傷を検討し、野生株とは異なる損傷挙動を示すことを明らかにした。

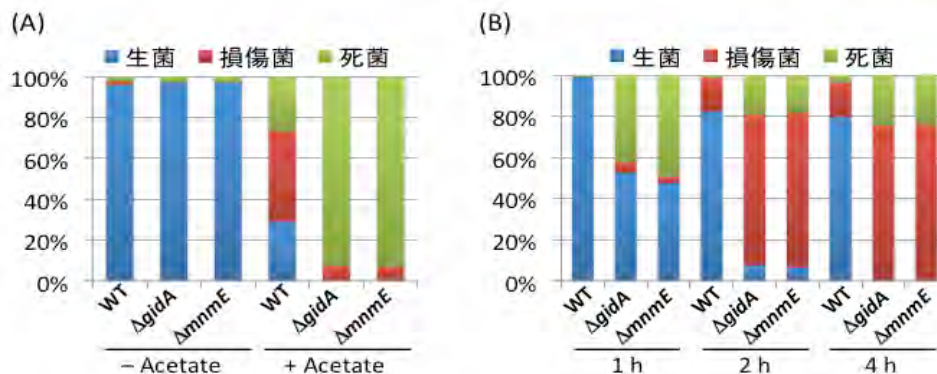


図3 大腸菌の酢酸(25 mM)処理(A)及び低pH(pH 2.5)処理(B)による損傷菌の発生 *gidA*及び*mnmE*の遺伝子は一部のtRNAに見られる*mnm*^s2U修飾に関与する

続いて酢酸感受性 (耐性) を支配する遺伝子 (群) の特定を試みるため遺伝子発現解析を行った。野生株及び酢酸感受性株を酢酸生産培地 (LB+0.4% glucose) 及び酢酸添加培地 (LB+50 mM MES (pH 5.5)+5 mM acetate) で培養し、遺伝子発現プロファイルを比較した結果、野生株において酢酸存在下で発現が上昇する9種類の遺伝子を同定した。酢酸感受性株においてはこれらの遺伝子の発現は酢酸の有無によって変化しなかったが、様々な情報を基に、上記9遺伝子の中から酢酸耐性への関与が予想される候補として4遺伝子 (*asr*, *grcA*, *rpsV*及び*wrbA*) を選抜した。そしてこれらの遺伝子の破壊株を作製して酢酸感受性への影響を検証した

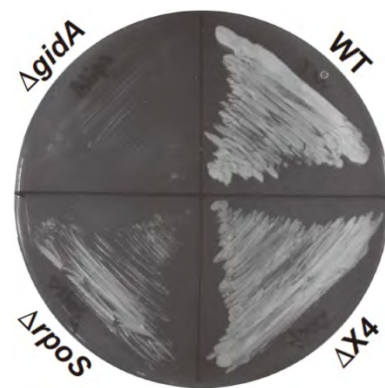


図4 酸ストレス応答遺伝子4重破壊株 (ΔX4) 及び*rpoS*破壊株の酢酸感受性

が、これらの株は目立った酢酸感受性の変化を示さず、4遺伝子多重破壊株にでも同様であったことから、これら4遺伝子の酢酸耐性への寄与は小さいと結論した。そこで様々なストレス応答制御系の酢酸耐性への関与を検証した結果、定常期シグマ因子のRpoSが酢酸耐性に重要であることを見出した（図4）。

3) 成果活用における留意点

加熱損傷研究の成果については、2次損傷としての酸化損傷と活性酸素損傷は反応過程としては連続的で、両者の程度のバランスによってNaPとNaTSの蘇生効果が変動すると推察されるので、発育・蘇生培地組成や蘇生の環境条件に影響を受ける。

4) 今後の課題

分子生物学、ゲノム・ポストゲノム解析などの最近の研究の進展により、細菌細胞自体の損傷・修復機構の概括的な理解はかなり深まったが、単細胞生物と言えども細胞は複雑多様な生命機能と制御ネットワークシステムをもち、それらの間の因果関係や相補性など多彩な相互関連性とその恒常性・復元性を有しているため、分子レベルでの全容解明にはまだかなりの道程がある。

加熱損傷における今後の研究課題として、加熱損傷菌の細胞における酸化状態（酸化還元電位・酸化還元低分子物質）と活性酸素量の測定が必要である。また活性酸素発生機構も解析を要する。DS法は培養法による損傷菌計数法のため、現実の食品での損傷菌発生評価に有効とみられるが、迅速化や省力化への改良への志向が望まれる。

酸損傷機構解明の関係では、酢酸感受性を支配する遺伝子については未だ不明な点が多い。タンパク質合成に関与する遺伝子の変異により酢酸感受性になることが散発的に報告されており、酢酸の抗菌作用の標的としてタンパク質合成系を検討する必要があると考えられる。

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	2	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	食品中の加熱損傷サルモネラによるリスクの低減技術開発		
小課題責任者名・研究機関	宮本敬久・九州大学学院		

1) 研究目的

製造・貯蔵工程で受けるストレスにより回復可能な損傷状態で食品に生残しているサルモネラによる食中毒が発生している。欧米ではシリアル、チョコレート、ピーナッツバター、香辛料等の低水分活性食品によるサルモネラ食中毒が報告されてきた。本研究では、低水分活性食品も含めた食品における損傷サルモネラによるリスクを低減する技術の開発を行う。

2) 研究成果

TSB (コントロール、 $A_w = 0.99 - 1.0$) に35% ショ糖($A_w = 0.95$)、4% NaCl($A_w = 0.97$)、8% NaCl ($A_w = 0.95$)、20% グリセリン ($A_w = 0.94$) をそれぞれ添加した培地で *Salmonella Typhimurium* 野生株の耐熱性を測定した結果、加熱直後のTSB生育菌 (コントロール) では60℃処理により2.5-3.0 log程度生菌数が低下した (図1)。しかし、回復可能な損傷菌の形成は少なかった。これに対し、低水分活性培地生育菌では55℃および60℃加熱において回復可能な損傷菌数が多かった。

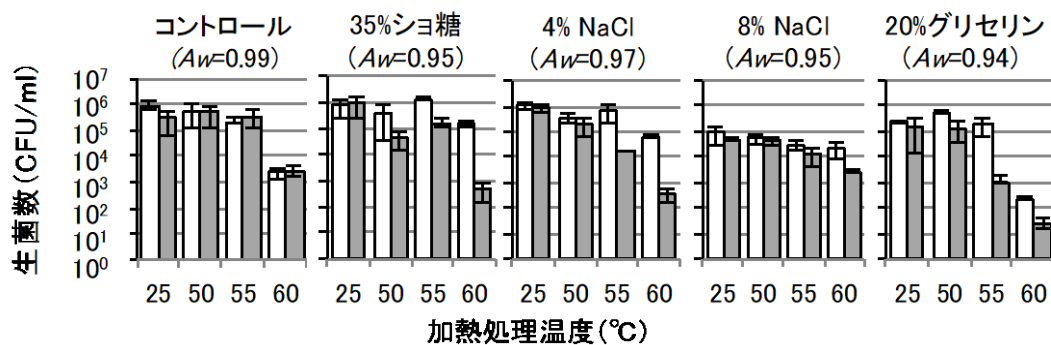


図1. *S. Typhimurium* 野生株に対する異なる水分活性の培地中 (pH 6) における加熱処理の影響

各水分活性の TSB 培地で生育させた菌体を各水分活性の培地中、各温度で 5 分間加熱処理し、TSA 平板 (□) および DHL 平板 (■) に塗抹して培養後のコロニー数から生菌数を測定した。

各低水分活性状態の TSB 中で培養した菌体を 60 °C で 20 分間加熱処理後、それぞれ同一の培地中で回復培養した結果、図 2 に示すように、TSB 培養菌 (コントロール) および 20 % グリセリン馴化菌では損傷菌の発生はほとんど認められなかった。8 % NaCl および 35 % ショ糖添加 TSB 馴化菌では損傷菌の回復は見られなかったが、4 % NaCl 添加 TSB 馴化菌では、5 ~ 6 時間目に損傷を回復した

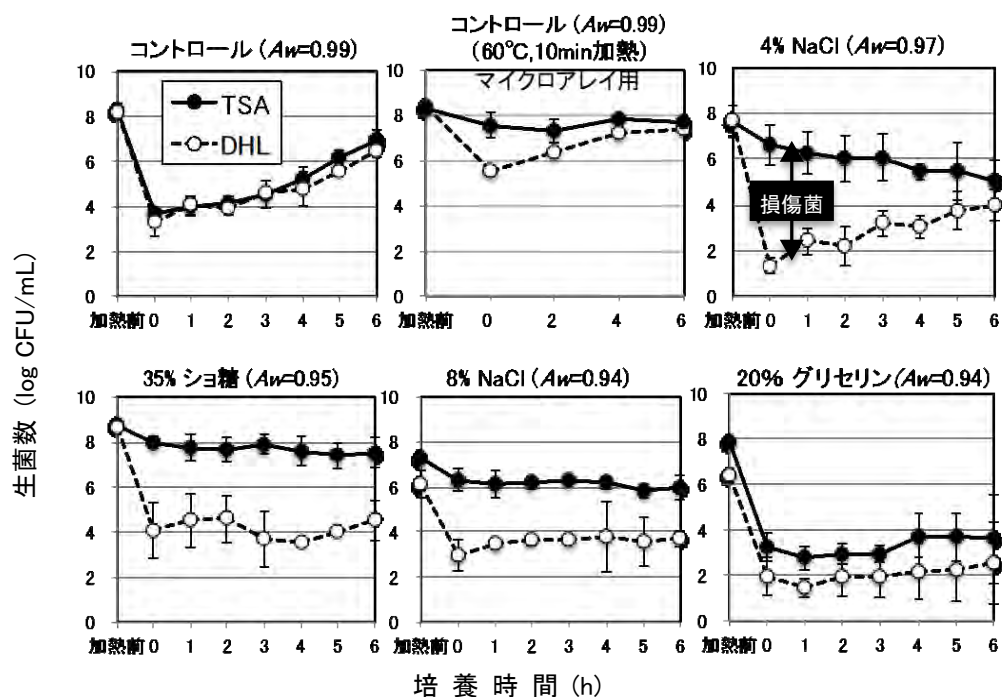


図 2. 低水分活性に馴化したサルモネラの加熱損傷からの回復

各水分活性の TSB で培養した菌体を各水分活性の培地中、60 °C で 20 分間(コントロールは 60 °C で 20 分間および 10 分間)加熱処理し、TSA (●) および DHL (○) を用いて生菌数を測定した。

さらに 4 % NaCl ($A_w = 0.97$)、8 % NaCl ($A_w = 0.95$)、35 % ショ糖 ($A_w = 0.95$) 添加 TSB 培地で培養した *S. Typhimurium* 野生株で、DNA マイクロアレイ解析を行った結果、低水分活性馴化中に転写量が増加する遺伝子としてマルトース輸送や PTS システム (糖の取り込み) およびクエン酸合成に関与する遺伝子が、加熱損傷からの回復培養中に発現量が増加した遺伝子としてフェージショックタンパク質、コラン酸合成、分岐鎖アミノ酸輸送タンパク質および鞭毛タンパク質に関する遺伝子が同定された。*S. Typhimurium* の耐熱性が向上する 4 % または 8 % NaCl 含有低水分活性培地で培養後の菌体では、コラン酸合成系遺伝子群の転写量が増加し、コラン酸含量も高水分活性培地培養菌の約 2 倍多いこと、また、コラン酸合成系遺伝子欠損株では野生株に比べ耐熱性が低下することを明らかにした。

S. Typhimurium の耐熱性が向上する 4 % NaCl 含有低水分活性培地および高水分活性

培地中における加熱損傷回復時に転写量が増加するファージショックタンパク質の加熱損傷回復における機能を明らかにするために、これらのうち *pspA* について遺伝子欠損株および高発現株を作製して検討した。その結果、図 3 に示すように加熱損傷からの回復に対する影響は顕著ではなかったことから、加熱損傷回復における本遺伝子群の機能を明らかにするためには複数の *psp* 遺伝子の欠損株について検討する必要があると思われる。

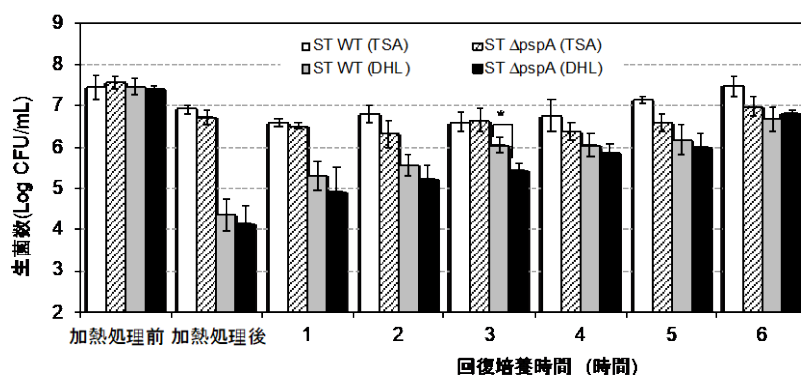


図3. *S. Typhimurium*の加熱損傷回復に対する *pspA*遺伝子欠損の影響

また、図 4 に示すように、高水分活性状態 (TSB 培地) では添加により損傷菌形成を抑制して耐熱性を低下させる複数の食品添加物を見出したが、4 %NaCl を添加した TSB 培地 ($A_w = 0.97$) 中では NaCl との併用効果により添加物の共存下では加熱損傷が大きくなると推定していたが、逆に TSB 中に比べて添加物の効果が低下し、食塩による低水分状態において耐熱性を低下させる添加物は見出されなかった。今後、NaCl 添加による耐熱性向上の詳細な機構解明が必要である。

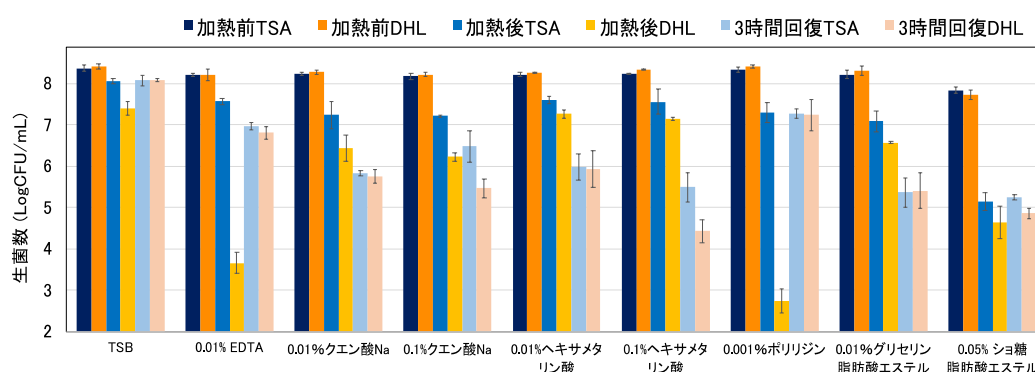


図 4. TSB培地中 ($A_w=0.99$)における *S. Typhimurium*の加熱損傷・回復に対する食品添加物の影響

3) 成果活用における留意点

0.01 %グリセリンモノラウリン酸エステル、0.01 %ヘキサメタリン酸ナトリウム、0.01 %クエン酸、0.05 %ショ糖モノラウリン酸エステル添加区では損傷菌形成は増加させずに加熱損傷回復が阻害され、あるいは回復培養後にはさらに生菌数が低下する結果を得た。高水分活性食品中ではこれらの添加物が存在するとサルモネラの耐熱性低下に有効であるが、高水分活性状態および4 %NaClによる低水分活性状態でも

0.01 %EDTAおよび0.001 %ポリリジンの存在により加熱直後には回復可能な損傷菌数の増加が認められたことから、4 %程度までのNaClを含有する条件では、これらの添加物を含む場合には加熱処理後には回復可能な損傷菌が多く形成されている可能性があることに留意する必要がある。

4) 今後の課題

最終目標の「食品中の加熱損傷サルモネラによるリスクの低減技術開発」の一部は達成されたが、NaClによる低水分活性状態において耐熱性を低下させる効果および回復阻害効果のある添加物を見出すためにはNaCl添加による耐熱性向上の機構を詳細に解明する必要がある。

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	3	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	カンピロバクター損傷菌の特性解明と検出技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	秋庭正人、岩田剛敏・農研機構 動物衛生研究部門		

1) 研究目的

カンピロバクターは世界各国で発生頻度の高い細菌性食中毒の起因菌として重要視されており、わが国では*Campylobacter jejuni*及び*Campylobacter coli*の2菌種が厚生労働省により食中毒菌に指定されている。カンピロバクターは家畜・家禽等、動物の腸管内に高率に保菌されており、本食中毒の原因食品として鶏肉が重要視されている一方で、原因不明となる感染事例が多いことが知られている。本菌は空気中の酸素や凍結融解等のストレスにより傷害を受け、一部が生存はしているものの従来の培養法では検出できない状態となる(損傷菌化)。このことが、家畜・家禽農場への感染源・感染経路が明らかとなっていないことや、本食中毒の原因食品が特定困難であることの一因となっている。そこで本研究では、損傷したカンピロバクターを効率的に検出可能な新規検出技術を確立することを目的とする。

2) 研究成果

平成25年度は、*C. jejuni* 33株の菌液をそれぞれ作製し、好気条件下に静置して生残期間を比較することで酸化ストレスへの感受性株と抵抗性株、計9株を選択した。平成26年度には選択した9株を用いて比較ゲノム解析を行い、酸化ストレス抵抗性への関与が示唆される57遺伝子を見出した。約半数の遺伝子が機能未知であり、その他の遺伝子がコードする因子には*C. jejuni*の酸素ストレス抵抗性因子のレギュレーターであるCj1556、カタラーゼであるKatAが含まれていたほか、グルタミン酸、ケトグルタル酸等の代謝に関与する酵素が多く含まれていた。

平成27年度は、以上の結果と近年の知見をもとに、計47種類の有機物・無機物等を栄養素としてそれぞれ添加したコロンビア血液寒天培地(以下、血液寒天培地)を用い、実験的に好気条件下で損傷させた*C. jejuni* 81-176株及びRM1221株の生育菌数を比較した。栄養素A、ピルビン酸ナトリウム(以下、ピルビン酸)又はケトグルタル酸二ナトリウム(以下、ケトグルタル酸)添加血液寒天培地での*C. jejuni*生育菌数は、栄養素無添加培地と比較して増加傾向が認められた。特に栄養素A添加培地では、既存のカンピロバクター増菌培地に含まれるピルビン酸やケトグルタル酸の添加培地及び無添加培地と比べて生育菌数が有意($p < 0.05$)に多かった(図1)。

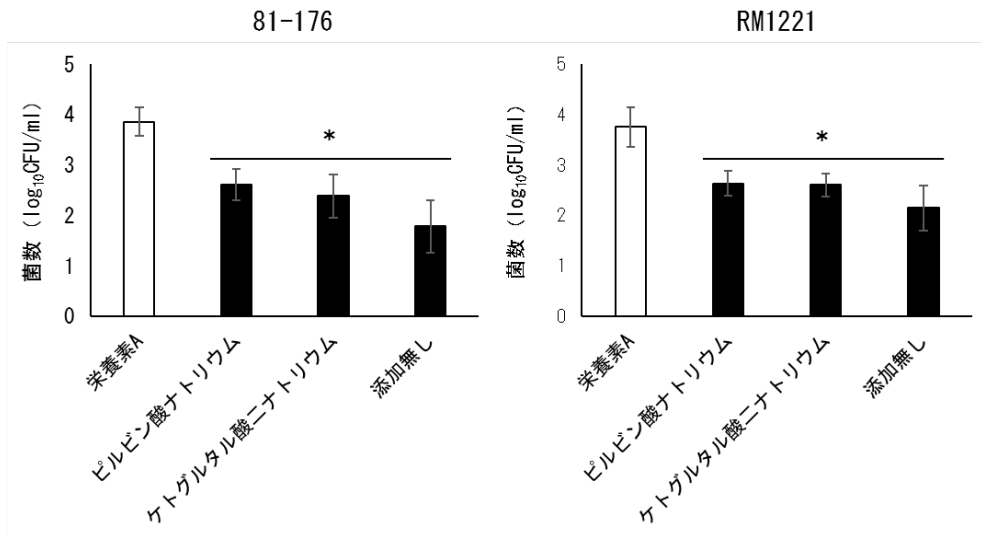


図1 血液寒天培地への栄養素A添加が好気条件下で損傷した*C. jejuni*の生育菌数に及ぼす影響
 栄養素の添加濃度は全て終濃度1mg/ml、* 栄養素A添加と比較して有意差有り(p < 0.05)

平成28年度には、栄養素Aが凍結融解により損傷した*C. jejuni*の生育に及ぼす影響を検討した。ピルビン酸やケトグルタル酸の血液寒天培地への添加は、-20℃で2週間凍結後、融解することにより損傷した*C. jejuni* 81-176株及びRM1221株の生育菌数にほとんど影響を与えなかったが、栄養素Aを添加すると81-176株では19倍、RM1221株では9倍の菌が検出された(図2)。

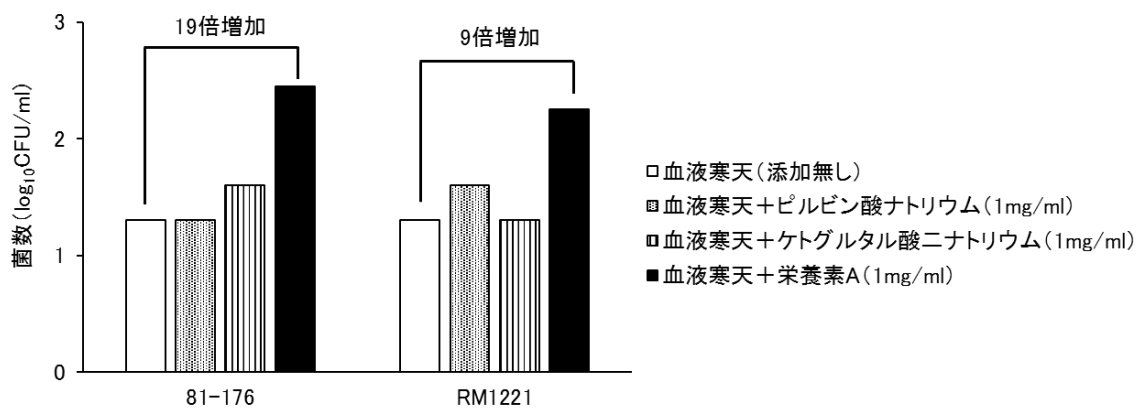


図2 血液寒天培地への栄養素A添加が凍結融解で損傷した*C. jejuni*の生育菌数に及ぼす影響

さらに、既存のカンピロバクター増菌培地への栄養素A添加が、鶏肉からのカンピロバクター検出に与える影響を検討した。市販鶏肉80検体(冷蔵肉60検体、冷凍肉20検体)について、鶏肉のみみ洗い液を栄養素Aの終濃度が0、0.25、1または4 mg/mlとなるように調整した増菌培地(ボルトン又はプレストン培地)に接種する簡易的な培養法を行い、*C. jejuni*及び*C. coli*の検出率を比較した。市販鶏肉80検体中32検体(40.0%)から*C. jejuni*又は*C. coli*が分離された。増菌培地への栄養素Aの添加濃度ごとに陽性検体数を比較すると、ボルトン培地及びプレストン培地ともに栄養素A 1 mg/mlの陽性検体数が最も多く、それぞれ20検体及び24検体であった(図3)。

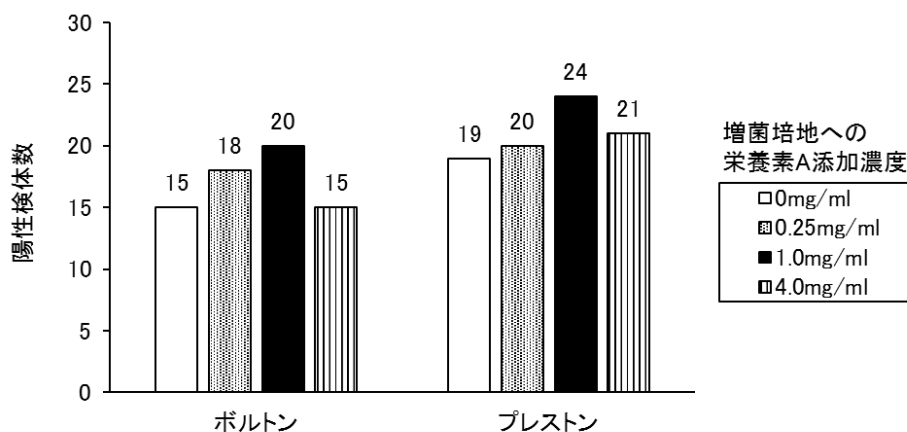


図3 増菌培地への栄養素A添加が市販鶏肉からのカンピロバクター検出に及ぼす影響

平成29年度は、食品のカンピロバクター試験法である、わが国で策定されたカンピロバクター標準試験法（以下、標準試験法）及び、国際的に広く採用されているISO10272-1:20066に準拠した試験法（以下、ISO法）を用いて、栄養素Aの増菌培地への添加が市販冷蔵鶏肉からの本菌の検出率に与える影響を検討し、陽性検体については検食を想定して-20℃で2週間、冷凍保存後、同様の方法で検出を試みた。標準試験法及びISO法において、栄養素Aの増菌培地への添加は冷蔵鶏肉からのカンピロバクターの検出率に大きな影響を与えなかった（図4）。一方、鶏肉を冷凍保存後の検出率は、標準試験法では栄養素A添加時に減少傾向であったのに対し、ISO法では増加傾向であった。

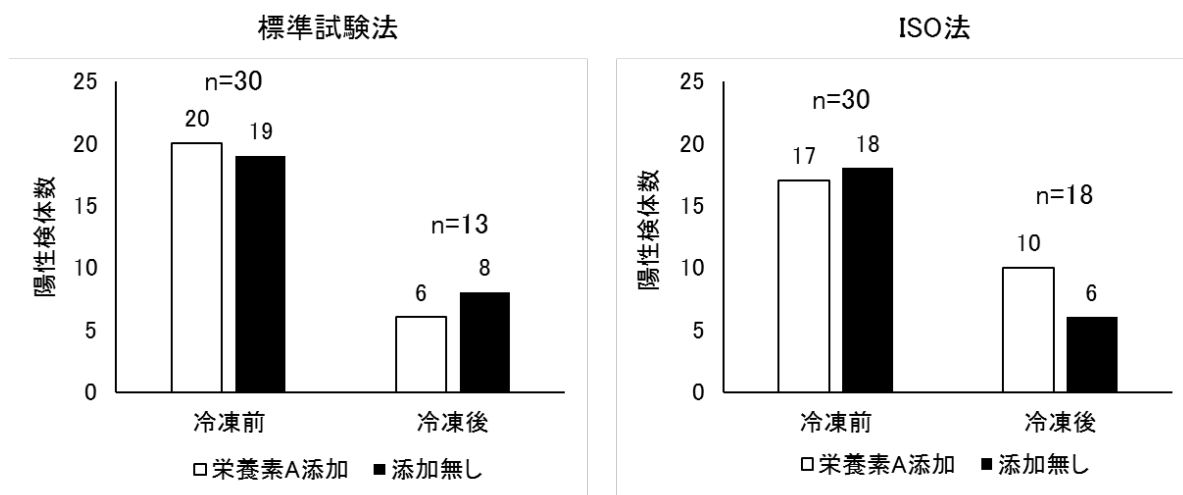


図4 標準試験法及びISO法における栄養素Aの利用が市販冷蔵鶏肉（冷凍前・冷凍後）からのカンピロバクター検出率に与える影響

以上の結果をまとめると、既存のカンピロバクター増菌培地に添加されるピルビン酸等の活性酸素消去剤よりも、効果的に本菌の損傷菌を回復することが示唆される栄養素Aを同定した。ISO法に栄養素Aを利用することで、カンピロバクター損傷菌の検出率を向上できる可能性がある。

3) 成果活用における留意点

食品からのカンピロバクター検出・分離を目的とした定性法である標準試験法とISO法の大きな違いとして、標準試験法では増菌培地としてプレストン培地を使用するのに対し、ISO法ではボルトン培地を使用すること、検体量と増菌培地量の比率が異なること（標準試験法では検体25 gに培地100 mlなのに対し、ISO法では検体と培地の比が1：9）、標準試験法では増菌培養をはじめから42 °Cで、24～48時間行うのに対し、ISO法では37 °C \pm 1 °Cで4～6時間培養した後に、41.5 °C \pm 1 °Cで24～48時間培養する（温度シフト）ことが挙げられる。

本研究では、ISO法における増菌培地への栄養素Aの添加により、カンピロバクター損傷菌の検出率を向上させる可能性が示唆された一方、標準試験法では検出率の向上が認められなかった。その理由として、上記のような培養条件の違いが考えられる。標準試験法の損傷菌検出率を向上させるためには、栄養素Aの濃度、あるいは類似物質の利用等について更なる検討を行う必要がある。

4) 今後の課題

ISO法に栄養素Aを利用することで冷凍鶏肉からのカンピロバクター検出率が向上する可能性が示唆されたため、サンプル数を増やして実験を行い、実用化可能性について検討する。

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	4	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	嫌気性芽胞形成食中毒細菌の損傷過程の解析と新規毒素検出法の開発		
小課題責任者名・研究機関	三宅眞実・大阪府立大学		

1) 研究目的

主要な嫌気性芽胞形成食中毒細菌であるボツリヌス菌（B菌）とウェルシュ菌（W菌）を対象として、それら細菌が芽胞を形成する、あるいは発芽する際のメカニズムを分子レベルで研究した上で、その過程を阻害するという戦略による食中毒制御法を開発するため、基盤情報を収集することが本研究の目的である。

2) 研究成果

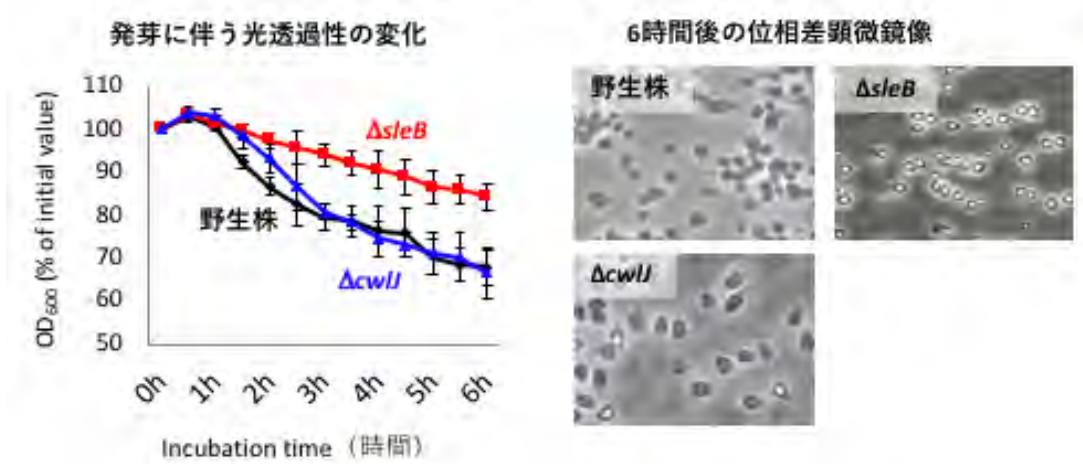
【B菌】

B菌についてはまず、菌株によって食品中で加熱損傷を受ける程度が異なる可能性を疑った。実際、同じ型の毒素産生するB菌であっても菌株により芽胞の熱耐性は幾分異なる。また同じB型菌であっても、産生する毒素の抗原性が若干異なる株が存在することがわかっており（例えばB1型とB2型）、この毒素の抗原性と芽胞の耐熱性の関係を知ることは重要と考えた。そこでB1、B2、B6型毒素を精製し、毒素の抗原性と生物活性の比較を行った結果、いくつかの生物活性の違いを確認し、その違いはHc領域のアミノ酸配列の違いに由来する可能性を見出した。

次にB菌芽胞が発芽するメカニズムの解析を行った。B菌芽胞の発芽については発芽過程に関与する菌側因子がほとんど明らかになっていなかった。そこで、発芽メカニズムが類似すると言われていたバチラス属細菌の情報を基に*in silico*で情報を検索した。その結果、芽胞の発芽に重要な役割を果たす「コルテックス分解酵素（GSLE）」の遺伝子のうち、バチラス属細菌のSleB、CwlJ、SleLに相同性のある遺伝子がB菌ゲノム上に見つかったため、これら遺伝子の単独欠損株を作成した。

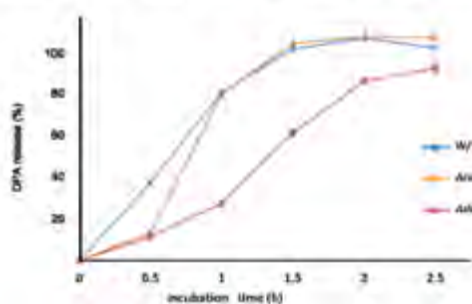
まずB菌芽胞の精製法を確立し、得られた精製芽胞へアミノ酸を作用させて発芽を促すアッセイ系を確立した。この実験系を用いてCwlJ破壊株およびSleL破壊株の芽胞の発芽を検討したところ、元の野生型芽胞の発芽とほとんど変わらない発芽能を示した。一方、SleB破壊株では発芽が有意に抑制されていた。しかしその抑制は完全でなく、遅延しながらも部分的に発芽過程が進行することがわかった（下左図）。これより、SleBは単独で発芽に重要な役割を演じているが、それ以外に発芽にも重要な働きをする因子が存在することが初めて示された。

SleB破壊株は発芽過程が正常に進行しない

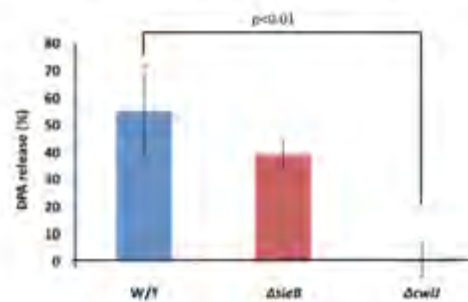


バチラス属細菌では、芽胞の最内部のコア領域にジピコリン酸 (DPA) が大量に蓄積しており、芽胞に対する栄養素等の刺激によってこれがコアから遊離することで、発芽初期過程が開始することがわかっている。また、この初期DPA遊離が次の情報伝達経路を刺激し、大量のDPAの放出やコルテクスの分解が生じて、発芽初期過程が完了していくことも明らかになっている。そこでB菌の発芽過程におけるDPAの挙動を観察したところ、①栄養素添加による総DPA放出量はSleB破壊株では大きく減少しており、これが発芽が起りにくいことと相関していることを確認した (下左図)。②CwlJ破壊株における栄養素誘導性総DPA放出量は野生株とほぼ変わらず、CwlJ破壊株が野生株同様の発芽能を有することと一致していた (下左図)。③外因性DPA添加による大量のDPA放出能を調べてみると、SleB破壊株では放出量が幾分減少するものの十分量のDPA放出が誘導されていた (下右図)。④一方CwlJ破壊株では、外来生DPAを作用させてもほとんどDPA放出が誘導されなかった (下右図)。これはCwlJが内在性DPAの大量放出に重要な役割を演じていることを示すものである。

SleB破壊株は発芽に伴うCa²⁺-DPA放出に異常がある

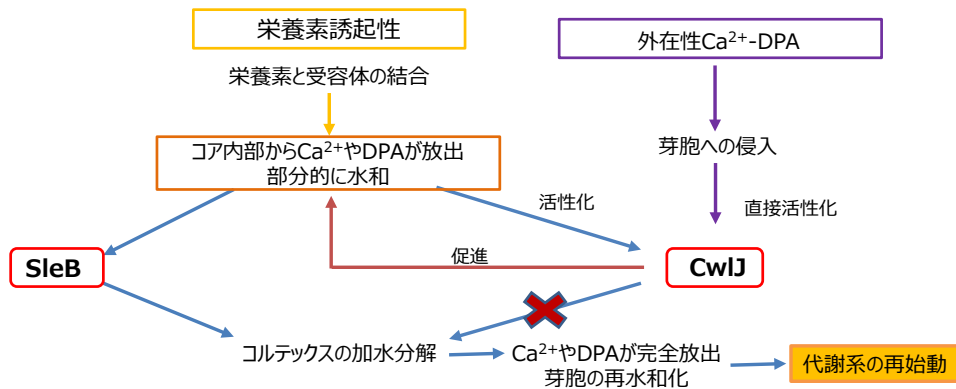


CwlJ破壊株はCa²⁺-DPA処理には反応しない



以上の結果、B菌芽胞の発芽にはSleBとCwlJが重要な役割を演じていることが明らかになった。ただしCwlJの役割はDPA放出に特化しており、発芽過程を実質的に左右するというより、補助的な作用を担当している可能性が示された。一方SleBは発芽過程で必須の役

割を演じていることが示された。しかしその役割も部分的で、他の因子と共同的に関与していることも明らかになった。



- 外在性Ca²⁺-DPAによりCwlJは活性化⇒コア内のCa²⁺-DPA放出を促進
- SleB破壊株のみが発芽を制御⇒SleBがコルテックス分解の中心を担う
- 外在性Ca²⁺-DPAで直接活性化し、コア内のCa²⁺-DPA放出や部分的な水和を誘導しても、発芽には至らない⇒CwlJは発芽に必須ではない。

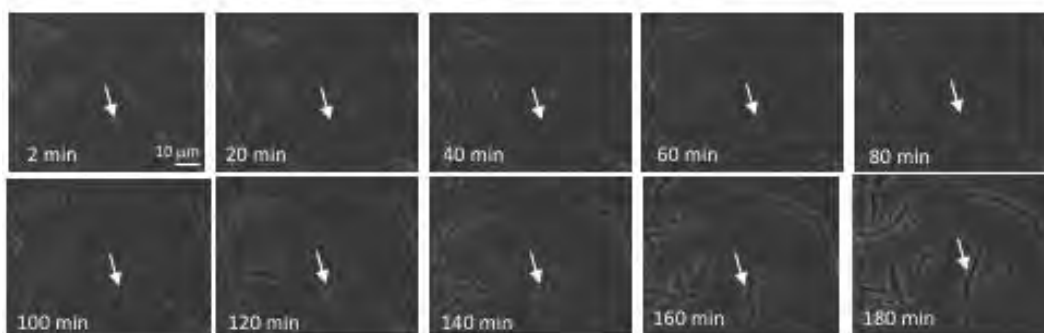
【W菌】

W菌ではまず、菌が生体内でストレスを受けて芽胞を形成する過程に着目した。理由は、本菌は腸管内で芽胞形成をする際に毒素を産生し、これが下痢症発症の直接的原因であることがわかっているからである。まず腸管内でどのような物質をストレス因子としてW菌が感知して芽胞形成を開始するかを調べるため、W菌の芽胞形成を短時間で簡便に検出できるレポーターアッセイを構築した。

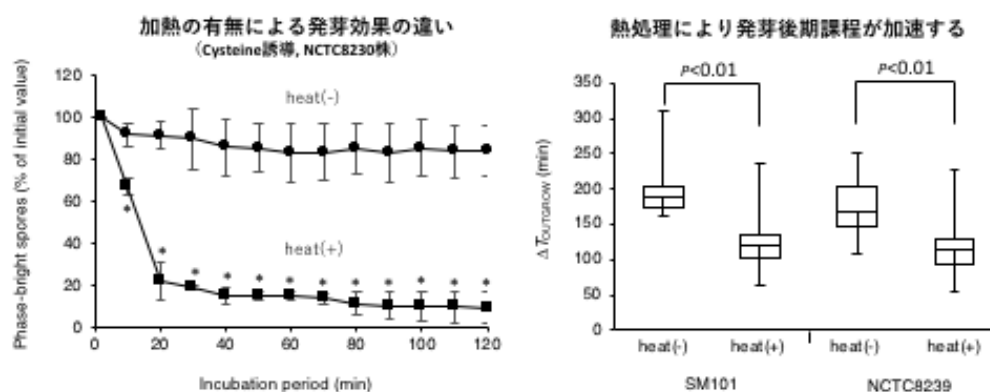
次に腸管内で芽胞形成に影響を与える因子をスクリーニングした結果、硝酸塩が芽胞形成を抑制することを見出した。硝酸塩は食品とともに大量に消化管内に取り込まれる。結果は食品由来の物質が腸管内でW菌に作用して、芽胞形成（ひいては下痢症発症）を正あるいは負に制御する可能性を示唆している。

その後、W菌についても芽胞の発芽メカニズムの解析を行った。W菌食中毒発生時には食品を汚染した芽胞が食品内で発芽することが、食中毒発生に必須なステップであるからである。まず、芽胞の発芽を解析するためにW菌芽胞の精製法を樹立、効率よく芽胞材料を得る手法を確立した。次に芽胞の発芽を解析するための手法を検討し、B菌同様発芽の初期過程を解析するための分光光度計による解析法を確立した。さらに、より詳細な発芽動態を解析するために、発芽過程を経時的に、かつ1細胞レベルで追跡できるライブセルイメージング解析法を開発した。これによってこれまで不可能であった様々な発芽過程の解析が、W菌に対しても可能となった（下図）。

W菌芽胞の発芽過程のタイムラプス画像



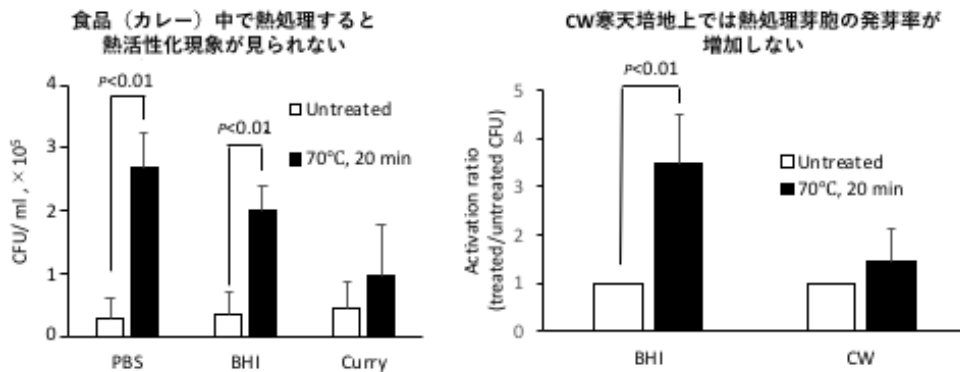
W菌食中毒は加熱食品を原因として発生する。これは加熱により芽胞の発芽が活性化されるためと考えられている。そこで精製芽胞を加熱して、非加熱の芽胞の発芽と比較解析した。その結果、加熱処理が芽胞の発芽率を大幅に増加させ、また発芽に至る過程を加速していることを明らかにした（下左図）。さらに、発芽の後期過程（コルテックス分解により芽胞が水和した後、出芽した栄養型細菌が分裂を開始するまでの過程）の進行が、芽胞の加熱によって加速していることも明らかにした（下右図）。これは、これまで他の芽胞形成細菌では報告されていない現象で、後期過程をライブセルイメージングにて解析して初めて明らかになったと考えている。得られた成果は芽胞の発芽メカニズムを理解する上で新しい知見であると共に、熱ストレスに対する芽胞の発芽応答を考えると極めて重要である。



W菌芽胞が上記熱ストレスを受ける場合は食品内である。しかし食品中で加熱された時のW菌芽胞の挙動についてはほとんど研究されていない。そこで加熱による発芽促進（以下、熱活性化）が起こる際に、芽胞を取り巻く環境がどのように影響を与えるかについて検討した。その結果、緩衝液中で確認される熱活性化現象は、食品中では必ずしも起こらず、食品内での芽胞の挙動は実験室条件で見られるものと異なることがわかった（下左図）。これはおそらく食品成分が芽胞に作用し、熱活性化に至る情報伝達系を攪乱したためと考えられるが、その詳細は未だ不明である。

また、W菌を食品から検出する際は一般にCW寒天培地（カナマイシンと卵黄を含む）を使用する。W菌芽胞に熱ストレスが与えられた時に、使用する分離培地がどのような影響を与えるかについても検討したところ、栄養豊富な増殖培地（BHI培地）では認められた熱

活性化現象が、CW寒天培地では認められないことを発見した（下右図）。この原因を究明したところ、CW寒天培地に含まれる卵黄が何らかのメカニズムで熱活性化を抑制することが明らかになった。この結果は、使用する培地によってはW菌芽胞においてもいわゆる熱損傷という現象が起こることを意味しており、極めて興味深い。また、菌の分離を簡便にする選択培地の使用は、一方で芽胞の検出率を低下させていることも明らかにできた。



3) 成果活用における留意点

B菌ではSleBを標的とした発芽制御という新しい戦略が、本研究により提唱される。しかし下記の今後の課題を整理しなければ、現時点で新しい手法を開発するには至らない。今後もSleB周辺の情報伝達経路の解析を進めることで、新しい戦略の立案が可能になると期待している。

W菌では菌が芽胞を形成したり、逆に芽胞が発芽する際には様々な環境要因の影響を受けていることを明らかにした。得られた成果を利用すれば、例えば発芽過程を標的とした新しい食中毒制御の手法を開発することも可能である。一方で、現時点で得られている情報はまだ断片的なため、今後の課題を追求することも求められる。例えば食品成分を材料とした、発芽抑制効果の検討を進めることが期待される。得られる結果は、どのような成分を含む食品が、W菌食中毒に対して低いリスクを示すかを考える情報を提供しうる。また逆に、食品にある成分（例えばスパイスなど）を加えることで食中毒リスクの少ない食品を開発することも期待される。

4) 今後の課題

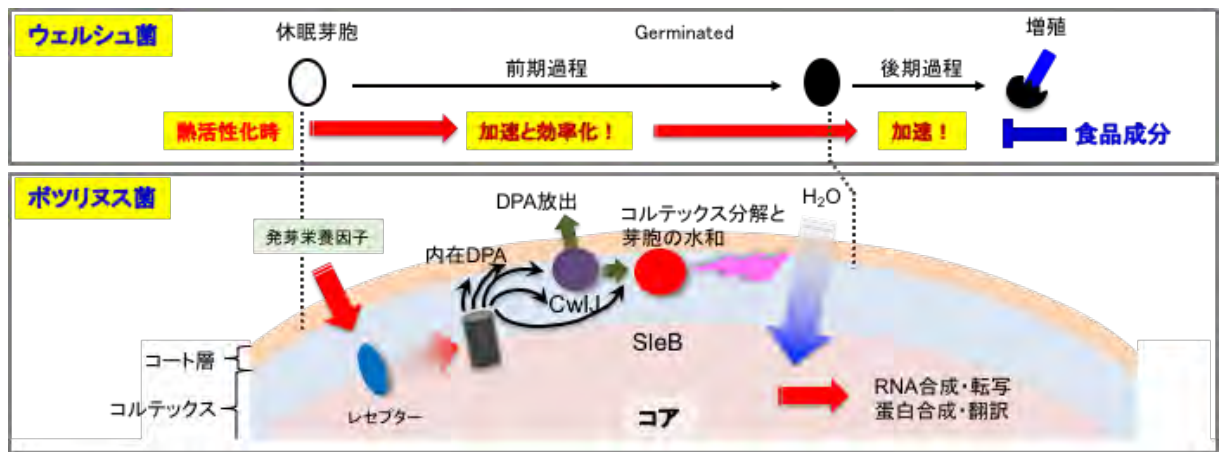
【B菌】

発芽（コルテックス分解）の中心的役割を担うSleBを不活化する、あるいは活性化を阻害することができれば、食品中のB菌発芽を抑制することでボツリヌス症の制御が可能になる。今後はSleB活性化前後の情報伝達経路を特定することで、具体的にSleB活性化を制御する手法を開発していくことが必要である。これによって、SleBを標的とした新しいボツリヌス食中毒の制御法が開発できる。

【W菌】

W菌芽胞の熱活性化や、発芽の促進あるいは抑制に対して、食品のどの成分がどのような影響を与えるかを検討する必要がある。例えばスパイスのような植物由来素材から抽出液を調製し、これらの芽胞に対する影響を調べることが求められる。本研究の成果としてこのような食材中には芽胞の発芽に何らかの影響を与える因子が存在する可能性が示唆さ

れた。これを発展させれば、芽胞の発芽と食品環境との関係を深く理解することができるようになり、本研究の目標であるW菌食中毒の制御を、食品素材を用いて可能にすることができるかと期待している。



中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	5	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	漁獲段階における漁獲物の細菌数制御技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	笠井久会・北海道大学大学院水産科学研究院		

1) 研究目的

漁港で利用する海水の多くは港内から取水されており、その海水をいかに清浄化していくかが衛生管理対策の重要な要素となるが、殺菌処理による損傷菌の出現程度については未検討である。そこで、漁港で普及している海水殺菌処理方法である紫外線殺菌および電気分解による殺菌について、損傷菌が発生する条件を明らかにした上で、それらが死滅する条件を決定し、漁獲段階において微生物制御技術の実証試験を行う。得られた知見をもとに、殺菌装置選択ガイドの改訂版を発行する。

2) 研究成果

①漁港の衛生管理において、漁獲物や器具等の洗浄に紫外線で殺菌した海水が広く用いられている。しかし紫外線により不活化された微生物は可視光により光回復を起こし再び増殖可能になることが知られている。紫外線殺菌海水利用の清浄性を担保するために、*Escherichia coli*と*Vibrio parahaemolyticus*を供試し、光回復を考慮した紫外線殺菌条件の検討を行った。加えて、紫外線が細菌に与える影響はピリミジンダイマー形成以外に存在するかについても検討した。対数増殖期の供試細菌に対し、紫外線C波 (UV-C; 200-280 nm) 200 μ W/cm²の紫外線強度下で所定時間紫外線照射し、殺菌に必要な紫外線照射量 (紫外線強度 (μ W/cm²) × 照射時間 (sec) = μ Ws/cm²あるいは μ J/cm²) を明らかにした。次いで、紫外線照射量を調節することで損傷菌を出現させ、それらを蛍光灯下に所定時間静置し光回復効果を観察した。光回復に要する照射量は、光回復酵素が活性化される紫外線A波 (UV-A; 320～390 nm) の強度と照射時間により算出した。上記の結果をもとに、光回復効果が起こらない紫外線照射量、すなわち紫外線で完全に殺菌しうる照射量を決定した。生菌数を3桁減少させるUV-C照射量は*E. coli*で5 mJ/cm²、*V. parahaemolyticus*で4 mJ/cm²であった。両菌体ともにUV-A照射量に応じて光回復効果がみられ、*E. coli*は照射量250 mJ/cm²、*V. parahaemolyticus*は50 mJ/cm²で効果が最大に達し、2桁程度回復した。両菌株ともに16 mJ/cm²のUV-C照射量で完全に殺菌され、光回復が認められなくなった (図1)。UV-C照射後の供試細菌には、照射量の増加に伴い呼吸活性の低下および膜の損傷が観察された。

②電解殺菌は紫外線殺菌と同様に広く普及している殺菌方法であるが、処理条件に基づ

く損傷菌出現の有無は検討されていない。そこで、海水の電気分解により生成される次亜塩素酸が細菌細胞の生理機能に与える影響を明らかにすることで、損傷菌が出現しない殺菌条件を検討した。生菌数を3桁減少させる有効塩素濃度は *E. coli* で0.1 mg/L, *V. parahaemolyticus* で0.15 mg/Lであり、試薬の次亜塩素酸と同等の殺菌効果が得られた。紫外線照射細胞と比較し、細胞の生理機能に与える影響は大きく、電解により生成した次亜塩素酸に曝露した細菌には強い膜損傷が観察された (図2)。光回復は認められなかったことから、漁港での利用に際しては両菌種が完全に殺菌される条件である有効塩素濃度0.25 mg/Lを担保することが重要であることを示した。

③殺菌装置選択ガイドの改訂版を発行し、損傷菌の生じない装置の運転条件および漁港や産地市場での使用上の注意点をまとめた。漁港内海水を殺菌せずに利用するリスク等、殺菌装置選択ガイドに記載して利用者に注意を促す情報を整備した (図3)。

3) 成果活用における留意点

紫外線ランプの使用時間に応じて紫外線強度が低下することから、強度のモニターあるいは適切な時期でのランプ交換が重要である。

4) 今後の課題

光修復の分子機構について今後明らかにしていく必要がある。加えて、殺菌装置導入後に実際に期待する殺菌効果が得られているかについて適宜確認する必要がある。

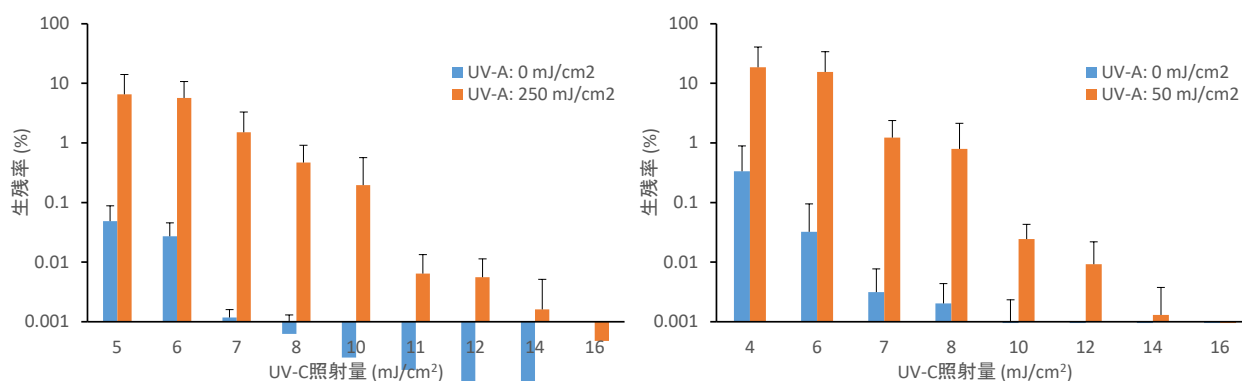


図1. 所定のUV-C照射量で処理した菌体にUV-Aを照射したときの元の生菌数に対する生残率

(左) *E. coli*, 試験3~8回の平均値+標準偏差,

(右) *V. parahaemolyticus*, 試験4~6回の平均値+標準偏差.

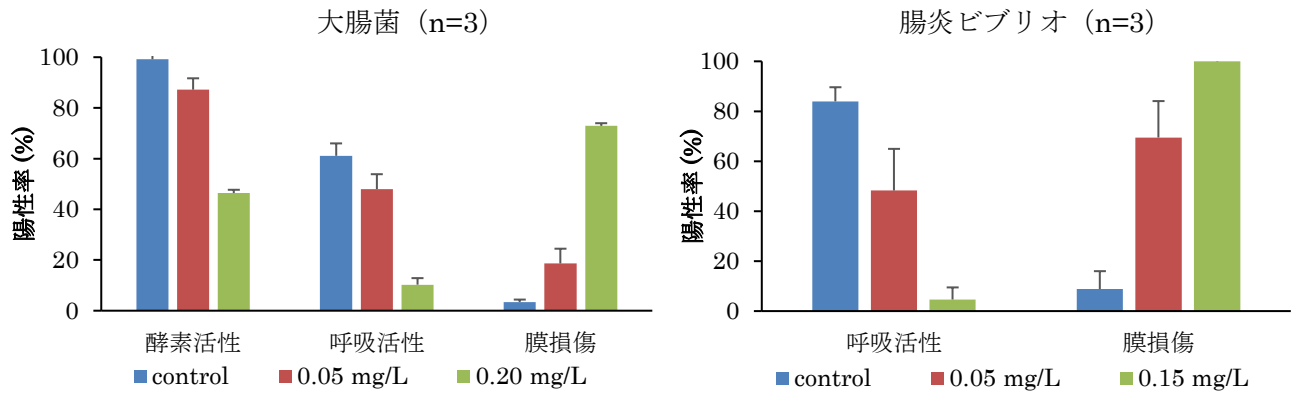


図2. 電解により損傷した細菌の細胞内エステラーゼ活性 (酵素活性), 呼吸活性および膜損傷陽性率.

海水殺菌装置 選択ガイド

平成30年1月
国立研究開発法人 水産研究・教育機構
北海道大学大学院水産科学研究院

損傷菌発生リスク

外的な物理ストレス、化学ストレスに曝された微生物細胞は損傷を受け、生死の区別が難しい場合があります。細菌の種類により、殺菌ストレスに対する耐性や、損傷菌の発生程度および損傷菌の回復能力が異なります。

殺菌ストレス

漁港内海水の細菌数 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL → 殺菌装置によりストレスを与える → 重傷→死滅 / 中-軽傷→**損傷菌**となる

紫外線による殺菌では、紫外線UV-Cの照射を受けた細菌のDNAおよびRNAがダイマー化することで増殖能力を失います。しかし、UV-Cの強度次第では、近紫外線UV-Aの照射により光回復を起し、再び増殖可能となる可能性があります。従って紫外線の照射量の違いにより出現する損傷菌の程度や、損傷菌の程度の違いによる光回復の度合い等を解明する必要があります。

紫外線殺菌(254nm) → 損傷菌 → 光回復(350nm~) → 増殖能を回復

紫外線照射後の光修復

以下の図は、腸炎ビブリオにUV-C照射により供試菌体を不活化後、UV-Aを照射することで光修復を誘導した結果です。UV-C照射後の生菌数は、元の数に対し99.99%以上減少しましたが、UV-A照射により光修復が誘導され、生菌数は元の数に対し99%程度となりました。このことは、光回復により設定した殺菌率に達しないことが起こりうることを示します。

例 腸炎ビブリオ
UV-C照射量 8 mJ/cm²

光回復により増加 (0-30 mJ/cm²) → これ以上増加せず (50-100 mJ/cm²)

腸炎ビブリオの場合は、UV-A照射量が50mJ/cm²に達するとそれ以上の光修復が認められなくなりました。北海道函館市でUV-A照度を測定した結果、2.5mW/cm²に達する日があり、その場合は20秒間で50mJ/cm²に達するという計算になります。紫外線照射後の光修復は、身の回りで容易に起こりうる現象と考えられます。

【計算式】
照射量 (50mJ/cm²) = 照度 (50mW/cm²) × 秒

図3. 海水殺菌装置選択ガイドの抜粋

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	6	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	加工段階における水産物の食中毒ビブリオ損傷菌の汚染動態の解明と制御法の開発		
小課題責任者名・研究機関	澤辺智雄・北海道大学大学院水産科学研究院		

1) 研究目的

水産物を介したビブリオによる食中毒は、依然、注視し続けなければならないリスクである。特に、食品加工過程において、損傷細胞がどのようなダイナミクスで生じるのかは未解明のままである。そこで、本研究では、食品加工過程でビブリオ損傷細胞が生じる機構を、非選択および選択培地での生菌数の差異および遺伝子発現応答などの面から明らかにし、水産物のビブリオ汚染のさらなるリスクの低減に資する新知見を集積する。

2) 研究成果

①加工過程で想定される5つのストレスに対する応答（表1）：加工過程で想定される5つのストレス（加熱、低温、低塩分、銀イオン、酸）応答を、腸炎ビブリオO3:K6株を対象として、ゲノムワイドな遺伝子発現を解析することにより調べた。ストレスの程度は、供試した細胞の半分が損傷（選択培地で増殖できなくなる）する程度の低容量ストレスとした。まず、加熱処理（42℃）に対しては、熱ショックタンパク質、DNA修復、ポリアミン生合成、鉄の取り込み、バイオフィーム形成など一般的な加熱ストレス応答が観察された。加熱からの回復培養では、外膜や細胞壁合成に関する遺伝子の上方発現が観察され、加熱による細胞壁損傷の修復は初期対応の一つであるものと考えられた。低温処理（4℃）では、所定の損傷菌比率に達するまで、1日を要したが、その時の細菌の応答として、プトレシン利用経路にかかわる遺伝子の上方発現やN-アセチルグルコサミンの取り込み遺伝子の上方発現など、細胞構成物質のリサイクルが示唆された。また、回復時にカタラーゼ遺伝子の発現上昇が観察され、損傷回復におけるカタラーゼの有用性が支持された。低塩分および銀イオンは発現している遺伝子が少なく、また酸は下方発現遺伝子の占める割合が高く、今回検討した低容量ストレスの中でも、より致命的なストレスであると考えられた。なかでも、低塩分ストレスでは細胞壁・外膜合成遺伝子の上方発現とともに、カリウムイオン輸送やグリシンバタイン取り込みおよび生合成遺伝子の上方発現を行い、浸透圧調整に対応しているものと示唆された。また、酸ストレス下では、ナトリウム輸送型NADH-キノン酸化還元酵素、ATPシンターゼ、Na⁺/H⁺アンチポーター遺伝子を上方発現させ、海洋細菌独特の呼吸鎖を活用した酸性環境での生存戦略を行っているものと推測された。さらに、低温、低温回復および銀イオン処理時に本菌の病原性遺伝子領域（VP-PAI）で下

方発現する遺伝子の比率が高まった。

②2種類のストレス併用効果（図1）：2種類のストレスを組み合わせ、損傷菌の減少効果を測定したところ、低塩分と酸あるいは銀イオン処理の組み合わせが、損傷菌細胞が生じるリスクをより低減させることが明らかになった。銀イオンと低塩分の低用量ストレスの組み合わせが最も損傷菌生成リスクを低減させた。

③青色光（BL）ストレス応答：BLは調べた可視光の中で最もROSの生成を誘起し、50 μ moles/m²/sの照射量ではその相対生成量は45分で最大となった（図2）。この条件下で、889の遺伝子がそれぞれ発現変動した（図3）。特に、上方発現した遺伝子は、acyl-CoAデヒドロゲナーゼ、転写アクティベーターChrR、およびMerRファミリー転写制御因子などであり、コレラ菌のBL応答と同様に、脂肪酸酸化や呼吸鎖を起因としたROS生成に対する応答が観察された。

3) 成果活用における留意点

全てのストレス応答において、反復実験が1回しかできなかったことから、成果の精度を考慮して活用する必要がある。

4) 今後の課題

ゲノムワイドな遺伝子発現解析は、低容量ストレス条件で生じた損傷菌の効果的な低減手法の考案に活用できる可能性が示された。現在、より安価な携帯型ゲノムシーケンサーが登場していることから、これを活用した経時的かつ、より現場に即した成果の活用を検討する必要がある。

表1. 腸炎ビブリオのストレス応答の概要

ストレス	上方発現	下方発現	回復培養	Vp-PAI
加熱(H)	タンパク質修復 鉄獲得、T6SS 細胞壁生成 バイオフィーム形成 ポリアミン生成		細胞壁生成	上方発現 (H,HR)
低温(C)	ブトレシン利用経路 N-アセチル グルコサミン利用	タンパク質生成 鉄獲得	カタラーゼ	下方発現 (C,CR)
低塩分(O)	鉄獲得 細胞壁生成 カリウムイオン輸送 ペタイン生成		エクトイン生成	上方発現 (O)
銀イオン(Ag)	多剤耐性 酸化ストレス耐性	バイオフィーム形成	多剤耐性 酸化ストレス耐性	下方発現 (Ag)
酸(Ac)	タンパク質修復 ポリアミン生成 Na(+)-NQR ATP生成	バイオフィーム形成	タンパク質生成 細胞壁生成	—

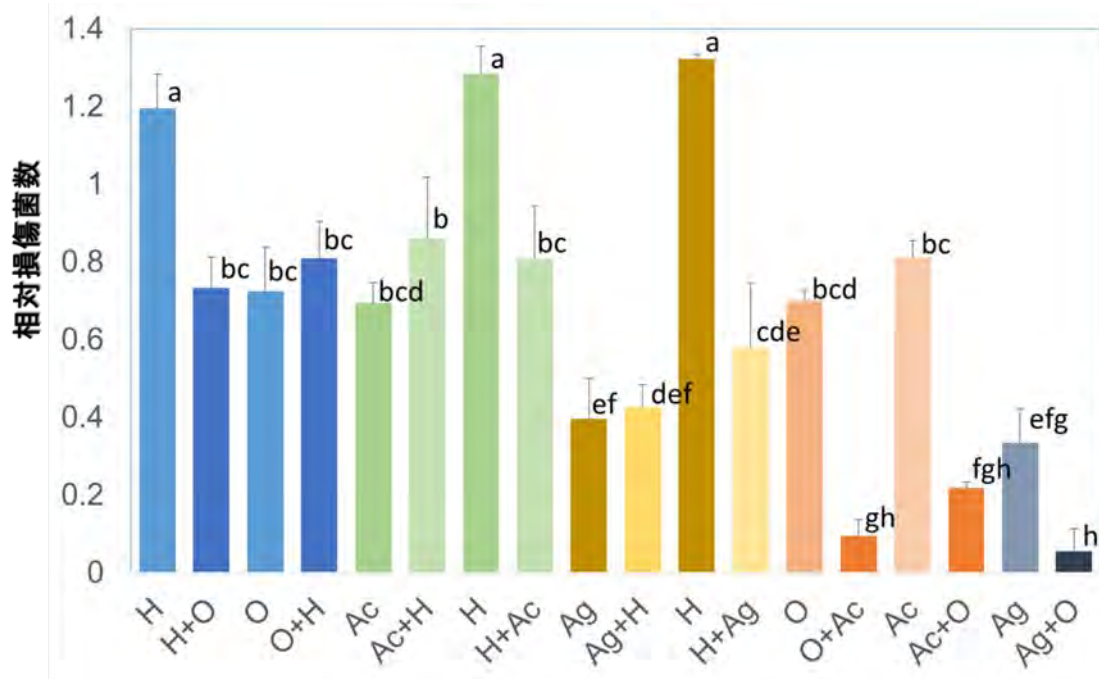


図1. 二種類の低容量ストレスの相乗効果. 棒の右上のアルファベットが同一であれば、差が有意（有意水準5%）ではないことを示す。

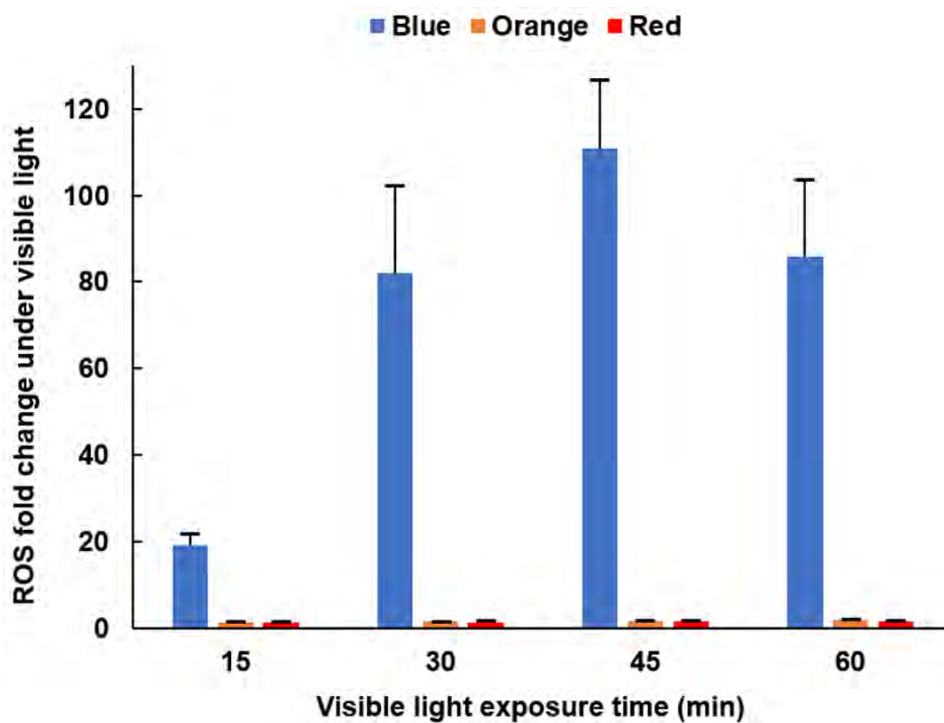


図2. 青色光，橙色光および赤色光照射下における ROS 量経時変化. (n=5, 平均±標準偏差)

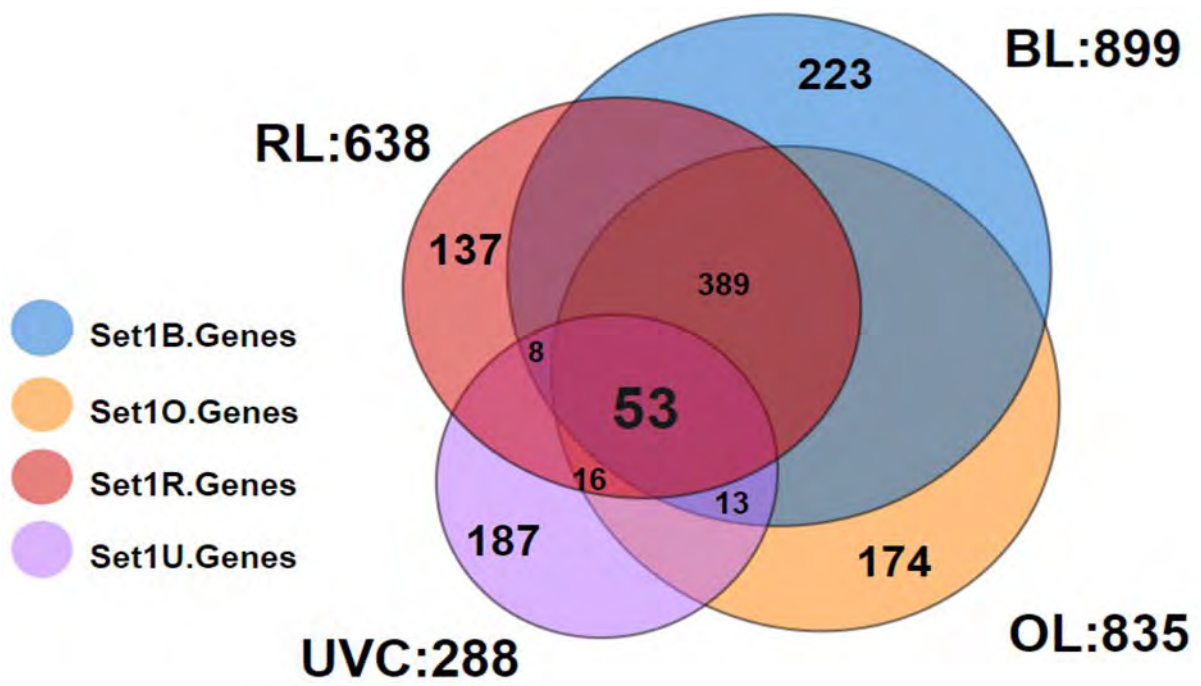


図 3. 青色光，紫外線 C 波およびその他可視光で発現変動する遺伝子の数.

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	7	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	損傷リステリアの発生機構の解明と制御法の開発		
小課題責任者名・研究機関	山崎浩司・北海道大学大学院水産科学研究院		

1) 研究目的

水産食品製造に利用される加工処理によって発生するリステリア (*Listeria monocytogenes*) の損傷程度と損傷リステリアの食品での動態を明らかにし、食中毒リスクの有無を評価する。さらに、各種処理によって生じた損傷菌の物理的および化学的ストレスへの感受性、細胞膜機能の生化学的変化などを調べ、最終的にはこれら各加工処理と損傷機構の知見をハードルテクノロジー理論に基づいた効果的かつ経済的な水産加工および流通機構に適したリステリア制御法を提案し、水産食品におけるリステリア食中毒のリスク低減を目指す。

2) 研究成果

① リステリアのフィラメント形成条件

本研究では、リステリアを食塩で低水分活性とした環境に置くと通常細胞よりも長い細胞へ形態変化することを見出した。この長い細胞を蛍光物質で染色し観察した結果、ほぼ通常サイズの細胞が珠々状に連なったもの（フィラメント）であることを明らかにした。なお、このリステリアのフィラメント形成は緩衝液などの栄養分の少ない環境では起こらないものであった。フィラメント状となったリステリア細胞は、寒天平板上で複数の細胞から構成されているにも関わらず、一つのコロニーを形成することを見出した。そこで、種々の物質によって低水分活性にした培地において、リステリアのフィラメント形成動態について調べた。その結果、リステリアのフィラメント形成はショ糖やグリセリンで水分活性 (A_w) を低下させた時よりも食塩 (NaCl) やKClなどの塩類によって水分活性を低下させた時にフィラメント状となりやすく、また形成されるフィラメントも長くなることを見出した。また、食品加工で汎用される有機酸（酢酸とクエン酸）によってpHを低下させた環境 (pH 5.5) におけるリステリアのフィラメント形成動態についても調べ、低pHにおいてもリステリアがフィラメント状となるが、形成されるフィラメントの長さは食塩類の場合により著しく短いものであることを明らかにした (図1)。

② リステリアのフィラメント形成に及ぼす酸素の影響

食塩で低水分活性とした培地におけるリステリアのフィラメント形成を液体培地で培養方法を変えて調べた結果、好気静置培養より好気振盪培養した時にフィラメント形成率(4

μm より長い細胞の形成割合)は高く、さらにフィラメント長も長かった。一方、嫌気培養時のフィラメント形成率は好気静置培養より低く、しかも形成するフィラメントは短いものばかりであった(図2)。同様の結果は、寒天平板上でも観察された。よって、リステリアのフィラメント形成には酸素の存在が関与していると考えられ、フィラメント形成抑制には酸素の除去、すなわち、食品の真空包装や脱気包装が有効な手法となると考えられた。

② フィラメント状リステリアから個々の通常形態細胞への分断条件

フィラメント状リステリアは、複数の細胞が固まった形態なため、この状態のまま寒天平板を使用する生菌数測定を行うと、正しく生菌数(生細胞数)の測定ができないため、フィラメント状から一つひとつの細胞へ分断する方法について検討した。まず、フィラメント状リステリアに対して超音波処理による強力な物理的処理および超音波処理に界面活性剤を併用した攪拌処理を行ったが、これらの処理ではフィラメントの分断が行えないことを確認した。そこで、フィラメント状リステリアも損傷菌のひとつとして捉え、細胞の分断を施す回復培養条件について、培地成分を変化させて検討した結果、通常のリステリア細胞(新鮮菌体)は増殖分裂できないが、フィラメント状リステリアでは細胞が個々に分断する条件(0.1%ペプトン添加食塩水)を見出した。

③ リステリアの損傷菌発生抑制に有効な抗菌剤の組み合わせ

食品に使用される代表的な抗菌物質(グリシン、酢酸ナトリウム、リゾチーム、ポリリジン、ナイシン)をリステリアに対して最少発育阻止濃度(MIC)で併用(pH 6.0)した時の死滅率と生残菌に占める損傷菌の割合を非選択寒天培地とリステリア用選択培地(ALOAまたはPALCAM寒天培地)で得た生残菌数の差から求めた。その結果(図3)、グリシン-ポリリジン、グリシン-ナイシン、酢酸ナトリウム-ナイシンおよびグリシン-ナイシンでの死滅率は99.9%以上とほぼ同様であったが、生残菌に占める損傷菌の割合は大きく異なった。検討した抗菌剤の組み合わせでは、グリシン-リゾチーム、グリシン-ナイシンおよび酢酸-ナイシンがリステリアの制御に有効であった。

3) 成果活用における留意点

本研究では、水産食品加工工程でのリステリアの損傷について検討している過程で、リステリア制御に使用するストレスの強度によっては形態変化を起こしてしまうことを示した。この形態変化は、確実に発育を抑制できるストレス強度では起こらないことが示唆された。また、各種抗菌物質を組み合わせるリステリアの発育制御を行う場合には、発育阻止効果の高い組み合わせであっても、生残細胞が損傷菌となってしまう組み合わせがあるため、実際に使用に当たっては抗菌物質を組み合わせた時の発育阻止効果だけでなく、生き残った細胞の状態を調べることを推奨する。

4) 今後の課題

微生物制御に利用される方法によって細菌の細胞がフィラメント状に形態変化することが明らかになり、このようなフィラメント状となった細菌の生細胞を正しく測定できる方法の開発が必要と考えられる。

【TSBYE at 37°C for 3days】

低水分活性条件

フィラメント化細胞 = 細胞長 4 μm 以上のものと定義

低 pH 条件

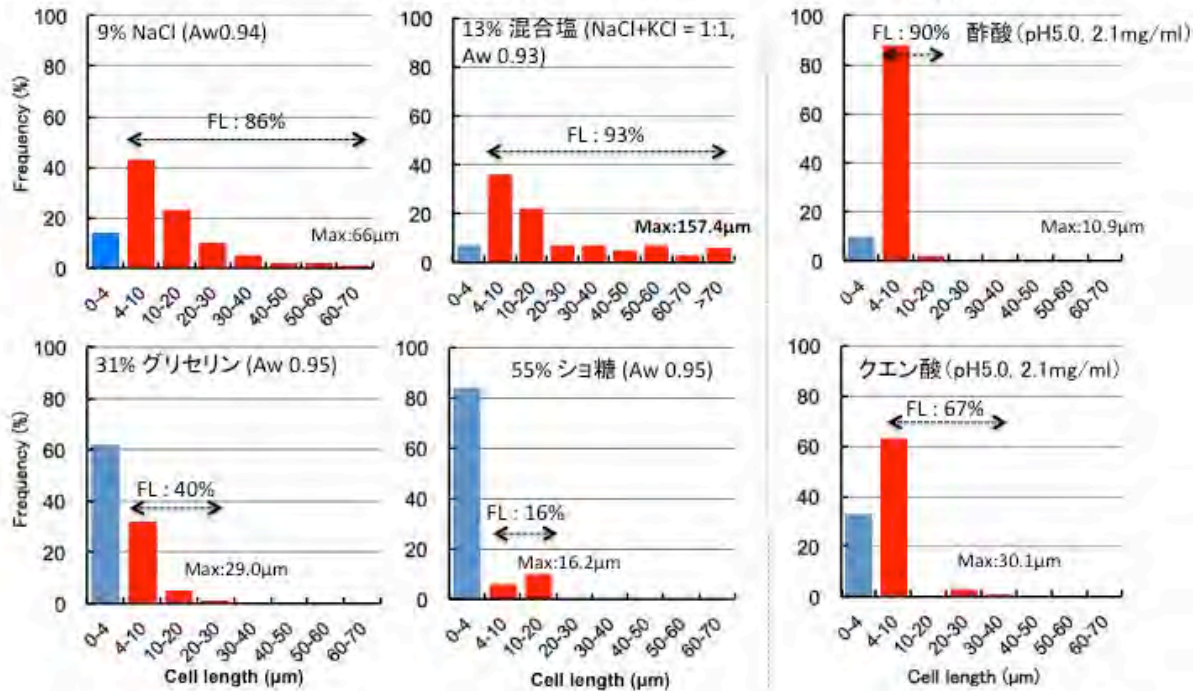


図1. リステリアのフィラメント形成に及ぼす低水分活性と有機酸の影響 (FL: フィラメント化細胞の割合)

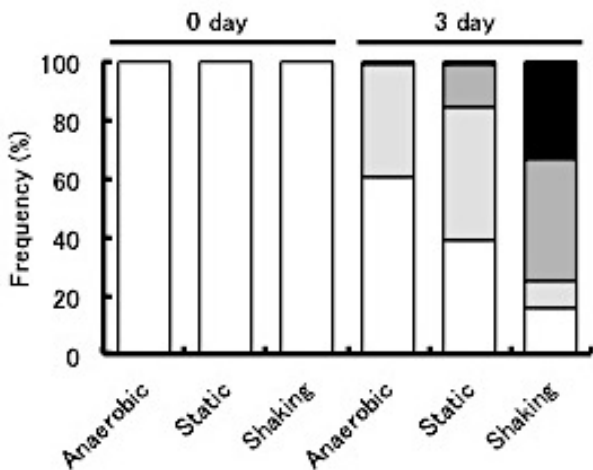


図2. 9%NaCl添加TSBYE培地におけるリステリアのフィラメント形成に及ぼす培養方法 (37°Cで静置、振盪および嫌気培養) の影響. < 4 μm (□), 4-10 μm (■), 10-30 μm (■) and >30 μm (■).

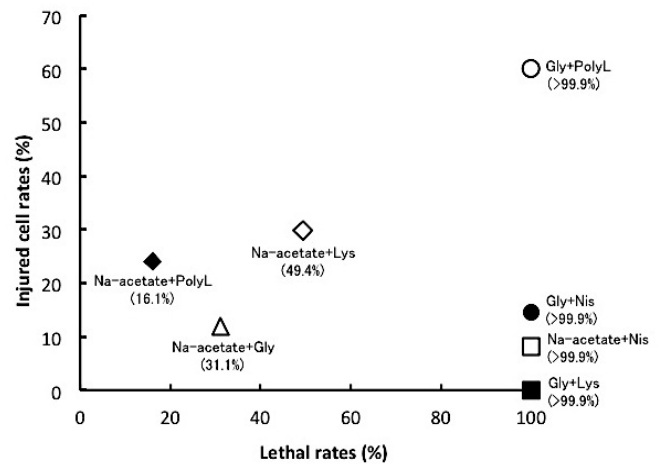


図3. 食品用抗菌剤を最少発育阻止濃度で組み合わせさせて作用 (pH 6.0) させた時のリステリアの致死率と損傷菌発生率. Gly, グリシン; Na-acetate, 酢酸ナトリウム; PolyL, ポリリジン; Lys, リゾチーム; Nis, ナイシン

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	8	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	各種食品加工処理がヒスタミン生成菌のヒスタミン生成能に及ぼす影響の解明		
小課題責任者名・研究機関	里見 正隆・水研機構中央水産研究所		

1) 研究目的

ヒスタミンはアレルギー様食中毒の原因物質で食品中のヒスチジンが細菌により脱炭酸されて生じる。ヒスタミン食中毒防止のためにはヒスタミン生成菌の増殖を抑制することが重要であるが、細菌検査でヒスタミン生成菌が陰性でもヒスタミンが蓄積されることがあり、各種食品加工処理中に生じた損傷菌が「増殖は認められないが、ヒスタミンは生成する」状態となって存在し、ヒスタミンを生成していると考えられる。本研究では、ヒスタミン生成乳酸菌 (*Lactobacillus otakiensis*) が酢酸添加条件下 (pH 4.0前後) で「増殖は認められないが、ヒスタミンは生成する」状態となっているときのヒスタミン生成機構を解明し、このような状態でのヒスタミン生成抑制手法をハードルテクノロジー理論に基づいて提案する。

2) 研究成果

① ヒスタミンを生成する乳酸菌を酢酸添加条件下でpH 3.8に曝露することで「増殖は認められないが、ヒスタミンは生成する」状態となることを明らかにした。一方、水産物で主要なヒスタミン生成菌であるモルガン菌などのグラム陰性菌では、この条件での生残性が低く、酢酸を主成分とするシメサバ調味液では問題とならないと考えられた。また、5℃以下ではヒスタミンを蓄積するまでに7日以上を要することが明らかとなった(図1)。

② ヒスタミン生成乳酸菌はpH 4.0以下において、増殖はほとんどできず、生菌数は減少する傾向にあるが(図2左)、pH 4.0以下においてもヒスタミンを生成することが明らかとなった(図2右)。しかしながら、菌体からのヒスタミン生成酵素の漏洩は少ないため、損傷状態のヒスタミン生成乳酸菌は、増殖はしていないが、代謝活動によりヒスタミンを生成していると考えられた。従って、ヒスタミン生成乳酸菌の場合は、ヒスタミン生成菌数が少なくても、ヒスタミンを蓄積している可能性があることに留意すべきである。

3) 成果活用における留意点

シメサバ調味液においてヒスタミン蓄積を抑制するためには、調味液のpHを4.0以下に保ち、できるだけ低温に保つことが望ましい。

4) 今後の課題

シメサバ以外の加工品についても損傷菌の影響を調べる必要がある。

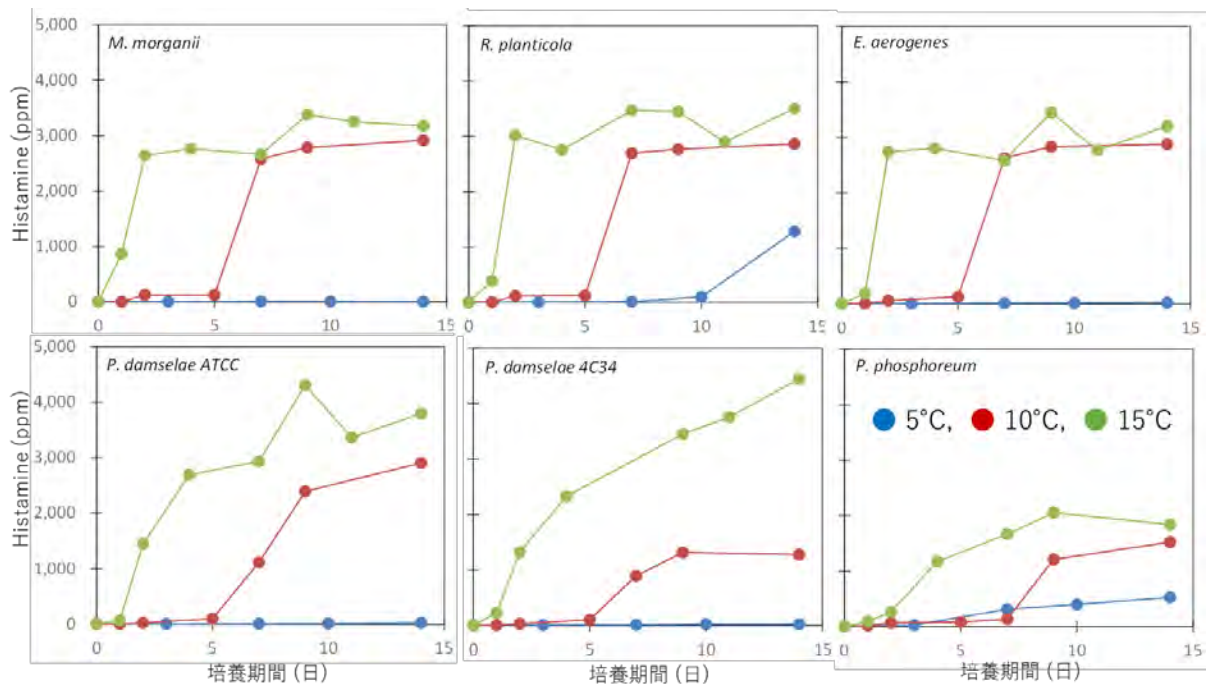


図1 各種グラム陰性菌の各培養温度でのヒスタミン蓄積量の変化. 低温性の *P. phosphoreum* においても5 °Cでヒスタミンを蓄積するのに約7日間が必要。10 °Cではヒスタミン抑制効果は菌種によって限定的。

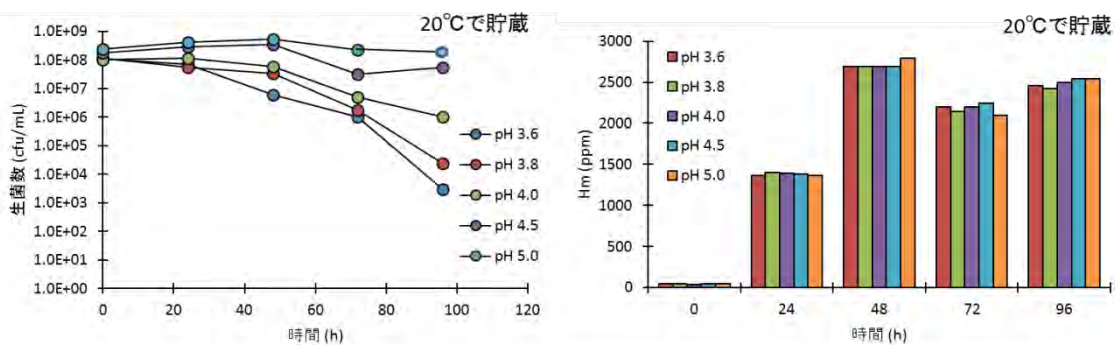


図2. ヒスタミン生成菌 (*Lactobacillus otakiensis*) を各種pHに調整した酢酸緩衝液中に懸濁した時の生菌数とヒスタミン生成量の変化. 生菌数はMRS寒天平板で計数し、ヒスタミン量は緩衝液中のヒスタミン量を市販のヒスタミン測定キット(キッコーマン、チェックカラーヒスタミン)で定量した。細胞外漏洩酵素量は緩衝溶液から細胞を遠心分離にて取り除いた上清について測定した。

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	9	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	野菜の栽培から流通環境における損傷菌の生残性とその制御		
小課題責任者名・研究機関	泉 秀実・近畿大学		

1) 研究目的

栽培および収穫環境中の薬剤損傷菌の生成と野菜への移行状態の把握、ならびに、収穫後の野菜の損傷菌の生残性および貯蔵流通中の損傷菌の消長を明確にする。さらに、野菜の貯蔵流通中の温度とガス環境が損傷菌の生残性に及ぼす影響を調査し、野菜に付着の損傷菌の制御に最適な貯蔵流通条件を確立する。

2) 研究成果

最初に、本研究の目的に即した損傷菌の計測方法を環境菌と食中毒菌の菌液を対象に検討した。酸性電解水により生成される大腸菌群の *Enterobacter cloacae* および大腸菌 O157:H7 の損傷菌数を Thin agar layer (TAL) 法と Flow cytometry (FCM) 法で比較すると、両方法で近似値が得られた。この結果、本研究の損傷菌の計測には、損傷菌の菌種同定 (MicroSeq 法) が可能で、さらに食品産業への利用も考慮し、簡易で安価な二重平板検出法の変法である TAL 法で実施することとした。

野菜栽培時では、農業用水に農薬 (スミレックス、トップジンM、オキシラン) を溶解あるいは塩素殺菌 (有効塩素 2 ppm 含有の酸性電解水) を施すと、数種大腸菌群 (同定の結果から *E. kobei*, *Yersinia mollaretii* など) の 50～87 % が損傷化することが判明した (図 1)。

野菜 (キャベツ) 収穫時の収穫用具 (包丁) に食品用エタノール製剤 (エタノール濃度 47 %、有機酸濃度 0.7 %) を噴霧すると、数種大腸菌群 (同定の結果から *E. amnigenus*, *E. asburie* など) の 60 % が損傷化した (図 2)。

野菜の一次加工工程では、キャベツを切断することでも損傷大腸菌群が生成することが確認され、切断後に酸性電解水で流水処理することで、損傷菌の割合が高まる (36～89 %) ことが判明した。これらのカットキャベツを細菌の増殖抑制に有効な高二酸化炭素 (5、10、15 %) の CA 貯蔵 (5 °C、10 °C) を行うと、貯蔵温度とガス濃度にかかわらず、損傷菌が生残することが明らかとなった (図 3)。このことは、酸性電解水で損傷化 (42～65 %) させた大腸菌 O157:H7 をカットキャベツに接種し、CA 貯蔵した場合も同様に認められた (図 4)。

無処理および酸性電解水処理後のカットキャベツを 1 °C～20 °C で MAP 貯蔵 (10～

20 %二酸化炭素、2~10 %酸素) すると、大腸菌群の増殖は1 °Cで最も抑制されたが、損傷菌は低温ほど生残性が高く、10 °C貯蔵が微生物増殖の抑制と損傷菌の制御に最適と判断した。この結果を受けて、無処理および酸性電解水処理後のカットキャベツを従来の受動的なpassive MAPと15 %二酸化炭素を充填する能動的なactive MAPで10 °C貯蔵すると、いずれの貯蔵でも損傷菌の生残は抑制され(図5)、最適な貯蔵流通条件が得られた。

3) 成果活用における留意点

本研究から、カットキャベツのMAP貯蔵中に、細菌の増殖と損傷菌の生残を抑制する温度条件として10 °Cを推奨した。しかし、カット野菜の微生物数と品質保持に有効な温度は、野菜の種類によって異なるため、各カット野菜に最適な貯蔵流通条件を検討して実用化する必要がある。

4) 今後の課題

栽培から一次加工中の薬剤処理において、野菜の品質に影響せず、損傷菌を生成しない適切な薬剤濃度を野菜と薬剤の種類別に精査し、その使用基準を制定することが必要である。

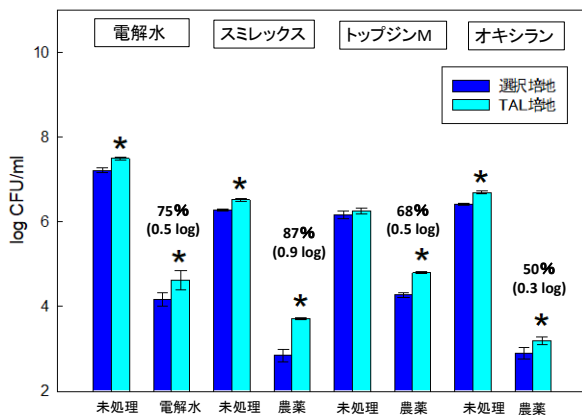


図1. 農業用水の未処理および酸性電解水処理(有効塩素 2 ppm)あるいは農薬溶解後の選択培地とTAL培地における大腸菌群数(*:同一処理区の両培地間で5 %レベルの有意差を示す。%(log値):損傷菌の割合(両培地の菌数差)を示す。)

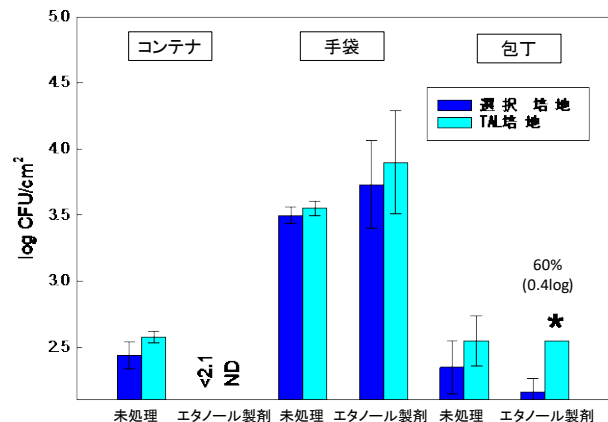


図2. キャベツ圃場における未処理あるいはエタノール製剤(エタノール47 %)処理後の収穫用具の選択培地とTAL培地における大腸菌群数(*:同一処理区の両培地間で5 %レベルの有意差を示す。%(log値):損傷菌の割合(両培地の菌数差)を示す。)

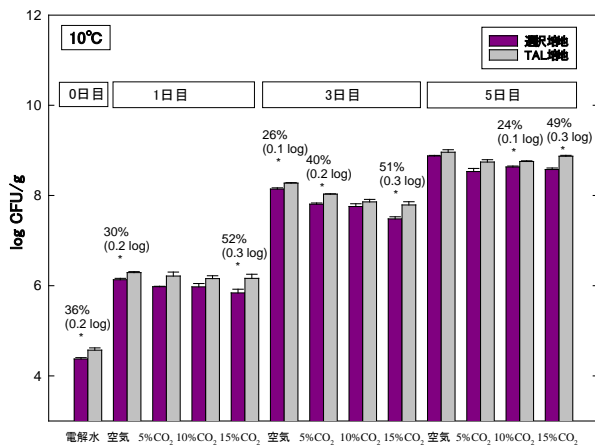


図3. 酸性電解水 (20 ppm) 処理したカットキャベツの高二酸化炭素 (5、10 および 15 %) CA 貯蔵中 (10 °C) の選択培地と TAL 培地における大腸菌群数 (* : 同一処理区の両培地間で 5 %レベルの有意差を示す。% (log 値) : 損傷菌の割合 (両培地の菌数差) を示す。)

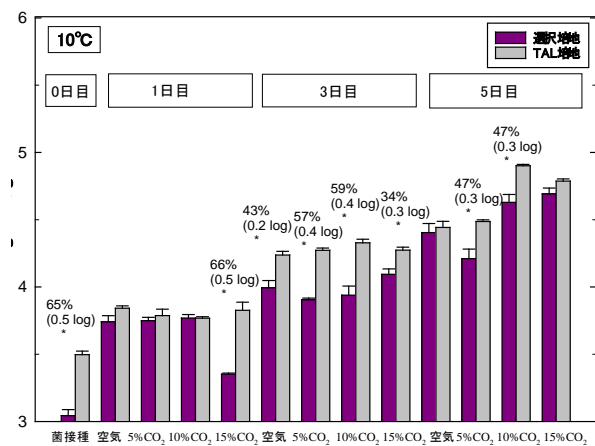


図4. 酸性電解水 (1ppm) で損傷化させた大腸菌 O157:H7 接種後のカットキャベツの高二酸化炭素 (5、10 および 15 %) CA 貯蔵中 (10 °C) の選択培地と TAL 培地における大腸菌 O157:H7 菌数 (* : 同一処理区の両培地間で 5 %レベルの有意差を示す。% (log 値) : 損傷菌の割合 (両培地の菌数差) を示す。)

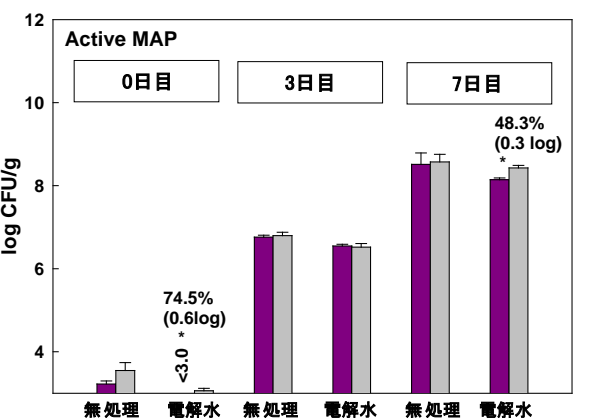
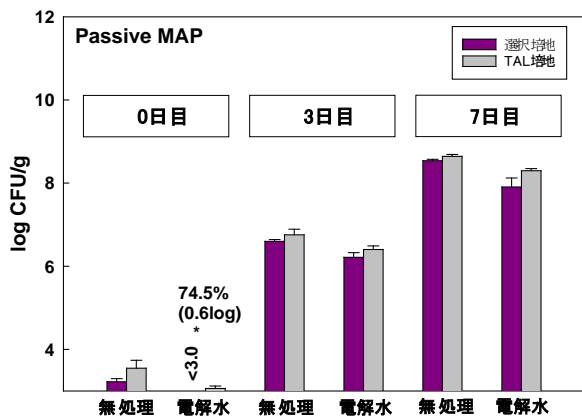


図5. 無処理および酸性電解水処理後のカットキャベツの passive MAP と active MAP (15 %CO₂ 充填) 貯蔵中 (10 °C) の TAL 培地と選択培地における大腸菌群数 (* : 同一処理区の両培地間で 5 %レベルの有意差を示す。% (log 値) : 損傷菌の割合 (両培地の菌数差) を示す。)

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	10	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	堆肥化過程における食中毒菌の生残性に関する環境要因の解明と、これら環境ストレスによる損傷菌化メカニズムの解明		
小課題責任者名・研究機関	湊啓子・道総研畜産試験場		

1) 研究目的

堆肥の衛生管理は、堆肥を利用し、生食用野菜を生産する上で、生産物の衛生管理に繋がる重要なプロセスと考えられる。本課題では堆肥化過程における食中毒菌(サルモネラ、リステリア)の生残性と損傷化それに及ぼす環境要因を解明し、退避中の食中毒菌を低減するための堆肥化条件を提示する。

2) 研究成果

① 堆肥化過程における食中毒菌の動態解析に用いる封入体の開発

容器内の菌を外部に漏らさず、かつ通気性があり容器内でも外部と同様に有機物分解が進む容器として、PTFE製のシートを二重に貼り合わせた容器(封入体, 15 × 16 cm)を作成した。この封入体に、サルモネラまたはリステリア接種堆肥を詰めて堆肥内に埋設し、接種菌が外部に漏洩しないこと、および、堆肥原料を詰めて4週間堆肥内に埋設して封入体の内外で堆肥の性状に差が認められないことを確認し、以下の堆肥化試験に供試した。

② 堆肥化過程におけるサルモネラおよびリステリアの生残性と損傷化

乳牛ふんと副資材の混合物を調製し、約7 m³を幅3.5 m、奥行きを底面では壁から2.1 m、上面では壁から0.5 mとして、高さ1.6 mで屋内の区画に堆積し、3週間隔で3回の切返しを行い4回の堆積を実施して、堆肥化過程でのサルモネラ (*Salmonella enterica* serovar *Infantis*, SI) およびリステリア (*Listeria monocytogenes*, リファンピシン耐性株, Lm) の生残性と損傷菌の発生実態を調べた。各堆積時に、SIまたはLmを接種した堆肥原料または切返し時の混合物50 gを詰めた封入体を堆積物の床面から表層まで5ヶ所に埋設し、切返し毎に封入体を回収してSIおよびLmの生残菌数を選択圧の異なる培地を用いて定量した。SIは非選択培地 (TSA) および選択培地 (ノボピオシン加DHL, nDHL) を用いた二重寒天平板法 (TSA+nDHL) により損傷+健常菌を、nDHLにより健常菌を計数した。Lmはリファンピシンを添加したクロムアガーリステリア培地 (CHROM) への塩化ナトリウム4 %添加の有無で出現する菌数差を損傷菌として計数した。また、開始時の原料混合時に混合物の全体に大腸菌 (非病原株) を接種し、各切返し時に堆積堆肥の混合物およ

び封入体中の試料について平板法（クロモカルトコリフォームアガー）により大腸菌数を計数した。堆肥化試験は副資材種類（オガクズ、モミガラ）、水分(70～78%)、接種菌種（SI, Lm）および実施時期（温暖期、寒冷期）を変えて実施した。

合計8回（各2処理）の堆肥化試験の結果、大腸菌、SIおよびLmは活発な温度上昇が認められた堆積中心部では概ね検出限界未満となった。一方、温度上昇が緩慢な床面や表層では生残し、損傷菌の検出を考慮した培地の方がSIでは平均0.5 log (0.0～1.8)、Lmでは平均0.3 log (0.0～1.9) CFU/g高く、損傷菌の発生が認められた(図1、2)。品温が50℃以上に上昇した部位では損傷菌、健常菌ともに検出されず(図1～3)、発酵温度を高めることにより損傷菌を残さずに低減できることが明らかとなった。堆積物混合物中の大腸菌数は、切返しによる堆積物の混合、および再堆積後の温度上昇の繰返しにより次第に減少し、4回の堆積終了後（12週間後）には概ね2 log CFU/現物g以下となった(図1、2)。SIやLmは各埋設部位で大腸菌と同等以上に低減したことから、堆積物全体に存在した場合でも大腸菌と同様の低減効果が期待できる。また、温度が上がりにくい堆積物表面の乾燥部や自重により圧密化する床面の嫌気部を模した室内実験において、大腸菌はSIやLmよりも高い菌数を推移した。以上より、堆肥の品温を50℃以上に高めることで損傷菌を残さずに食中毒菌を低減できること、床面や表面では損傷化して生残するため、切返しを3回以上行い堆肥全体を高温に曝す必要があること、また、大腸菌は堆肥中での食中毒菌低減のモニタリング指標として利用できる可能性があることが明らかとなった。

③ 食中毒菌低減のための堆肥化条件

(2)の堆肥化試験より、50℃以上に品温を高めることにより食中毒菌の低減が可能であることが明らかになった。しかし、堆肥化の目的には食中毒菌の低減以外に雑草種子の不活化も含まれており、その不活化条件は55℃・2～3日以上（西田ら、1999）とされている。家畜ふんに含まれる雑草種子は堆肥の利用阻害要因の一因ともなっているため、食中毒菌と共に不活化することが望まれる。また、堆積堆肥内の品温は、堆積物表面から50 cm深前後で最高温度を示し、表層または深部に行くほど温度は低下する。このため、堆肥の品温上昇の目標値を雑草種子の不活化条件である55℃とすることにより、堆積物内で50℃以上に曝される堆肥の割合は増加し、微生物リスクの低減効果の増大が期待できる。これらの点を考慮して「切返しを3回実施して4回の堆積で最高温度が55℃・3日以上となることになること」を、食中毒菌の低減に必要な堆肥化条件とした。この条件を達成するための堆肥化開始時原料の調製条件として、水分と比重（=容積重、25 Lバケツですりきり計量）に着目し、堆肥の最高温度との関係と比較したところ、それぞれ有意な相関が認められた（R=0.60, 0.87）。最高温度との相関が高く、バケツにより簡易に測定できる容積重について、各4回の堆積時の最高温度との関係を解析したところ、温暖期では0.50 kg/L以下、寒冷期では0.38 kg/L以下の時に、上記の堆肥化条件が達成された(図4)。以上より、乳牛ふんと副資材の混合物の容積重を25 Lバケツで測定し、温暖期では0.50 kg/L以下、寒冷期では0.38 kg/L以下となるように副資材の混合量を調製することにより、堆積後に堆肥内部の最高温度は55℃以上に上昇し、3回以上切返しを行い、堆積物全体を高温に曝すことで、損傷菌も含めて食中毒菌を低減できることが明らかとなった。

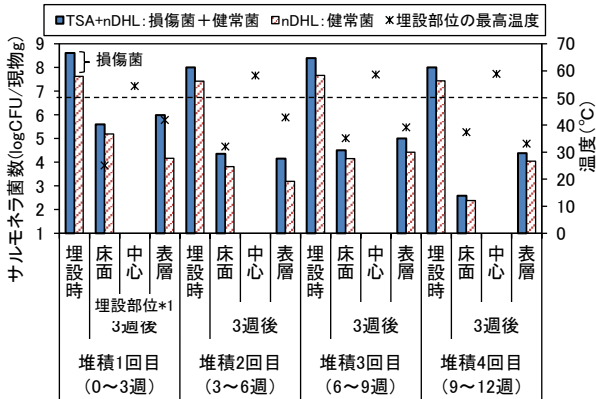
3) 成果活用における留意点

市販のリステリア選択分離培地では堆肥中の雑菌に抑制され接種菌の定量が困難であったため、リファンピシン（Rif）耐性株を用いてRif添加培地により定量した。

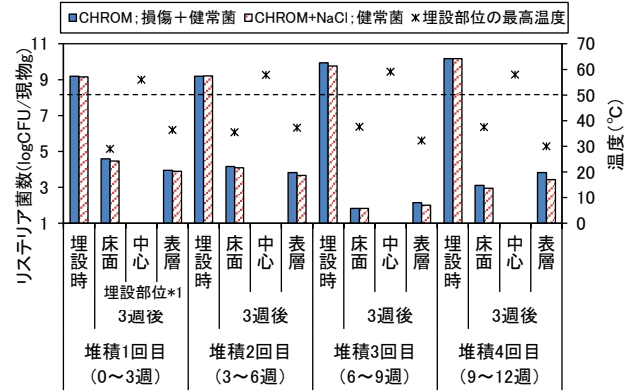
4) 今後の課題

堆肥等、雑菌が多い環境試料からのリステリアの定量法を開発する必要がある。また、堆肥化開始時原料の容積重の目標値は、乳牛以外の家畜ふんを用いた堆肥への適用性が不明であり、今後検討する必要がある。

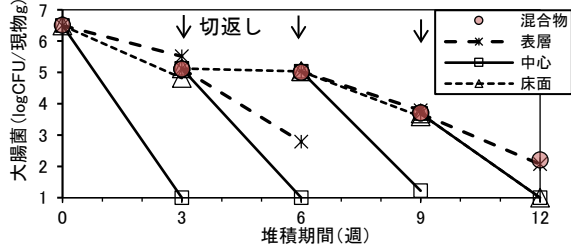
1) サルモネラ菌数の変化



1) リステリア菌数の変化



2) 大腸菌数の変化



2) 大腸菌数の変化

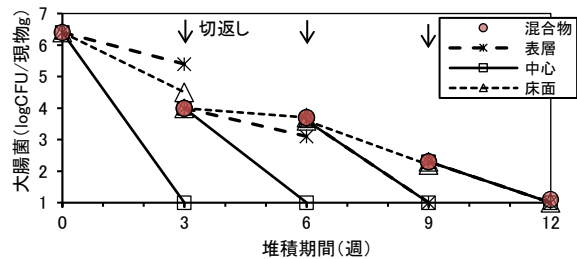


図1 乳牛ふんオガクズ堆肥 (水分71%) に埋設した封入体内堆肥中のサルモネラおよび大腸菌数の変化 *1; 床面 (0 cm), 中心 (床上80 cm), 表層 (2~3 cm 深)。検出限界; サルモネラ 0.7 logCFU/g, 大腸菌 1.21 logCFU/g

図2 乳牛ふんオガクズ堆肥 (水分70%) に埋設した封入体内堆肥中のリステリアおよび大腸菌数の変化 *1; 床面 (0 cm), 中心 (床上80 cm), 表層 (2~3 cm 深)。検出限界; リステリア, 大腸菌ともに 1.2 logCFU/g

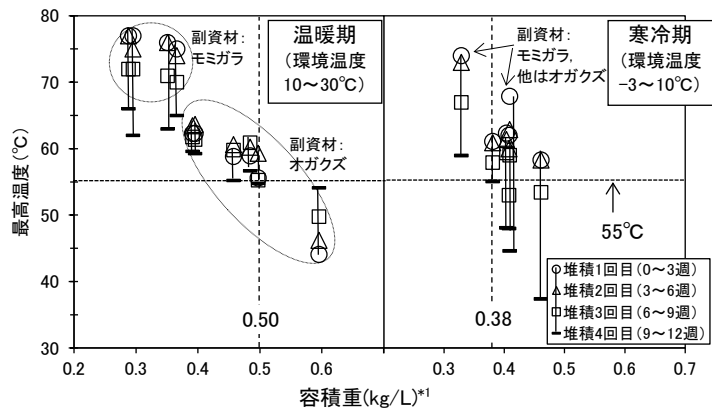
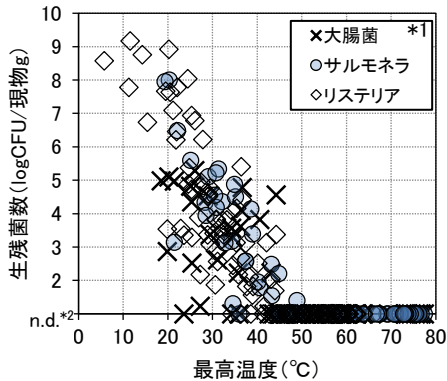


図3 封入体埋設部位の最高温度と堆肥中の大腸菌、サルモネラおよびリステリアの生残菌数の関係

*1: 初期菌数; 大腸菌 6.5 log CFU/g, サルモネラ 8.4 log CFU/g, リステリア 9.5 log CFU/g, 大腸菌はクロモカルトコリフォームアガ, サルモネラは TSA+nDHL の二重寒天平板, リステリアはリファンピシンを添加したクロモアガーリステリア培地により定量 *2: 不検出 (検出限界は図1と2と同じ)

図4 堆肥化開始時原料の容積重と堆肥化過程での4回の堆積での最高温度 (72時間維持)

*1: 25 L バケツに試料を山盛りいれて、超過分をすりきり計量、バケツの空重量を差し引き、別途、水を入れて求めたバケツ容積で除して容積重 (kg/L) 求める。

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	11	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	生食用野菜栽培段階におけるリステリアの損傷菌化機構と可食部汚染機構の解明		
小課題責任者名・研究機関	本城賢一・九州大学		

1) 研究目的

リステリアは、広く環境中に存在し、畜肉、乳製品のみならず、生食用野菜類を介した食中毒を引き起こす。栽培は長期に渡るため、リステリアは様々な生産環境ストレスを受け、検出が困難な損傷菌として存在している可能性が予想される。本課題では、トマト、キュウリ、メロン、リーフレタス、キャベツ、ハツカダイコンを対象に栽培環境中でのリステリアの損傷化および生残性について調べ、その環境で栽培された野菜可食部の汚染の有無ならびに汚染後の損傷化を確認し、その低減技術を確立することを目的とした。

2) 研究成果

① トマト栽培土壌中でのリステリアの損傷菌化ならびに生残性について16週間にわたって調べたところ、栽培開始後すぐに損傷菌化が始まることがわかった。また、生残性については栽培6週間後以降、定量試験では下限以下となった(図1)が、定性試験では16週間後にも生残していることが確認された(表1)。また、2週間毎にリステリアを追加汚染した高濃度汚染土壌においても同様にリステリアの90%程度の損傷菌化は認められた。しかし、いずれの汚染土壌で栽培した場合でも可食部の汚染は認められなかった。また、トマト果皮にリステリア菌液をスポット接種して調べたところ、3 log程度の少ない菌数であっても、大部分は損傷菌化するが、1週間以上生残することが確認された。

② リーフレタス栽培土壌中でのリステリアについて8～10週間にわたって調べたところ、トマト栽培時と同様に90%程度が損傷化し、また、定量下限(2 log CFU/g)程度生残していることが確認された。また、土壌が高濃度で汚染された場合には収穫されたリーフレタス可食部も定量下限程度の汚染も認められた。しかし、リーフレタス内部への移行については確認できなかった。さらに、400 CFU/ml × 4 ml 以上のリステリア汚染水が灌水された場合、7日後でもリーフレタスは定性試験陽性となることがわかった(表2)。また、リステリア菌液を傷のある葉上にスポット接種した場合、傷なしの場合(6～9日)よりも長く(12日以上)生残することが確認された。

・ハツカダイコン栽培土壌中のリステリアについて6週間にわたって調べたところ、灌水量30 mL/植物体/日の場合は、1 log CFU/gの菌数の減少が認められ、灌水量20 mL/植物体/日の場合は、2-3 log CFU/gの菌数の減少であった。各部位におけるリステリアの汚染状況

について定量試験で調べたところ、葉からは2 log CFU/g程度であったが、葉の付け根部分からは5 log CFU/gという高レベルの汚染が確認され、塊根部皮層では3 log CFU/g程度の汚染が確認された(表3)。しかし、塊根部内部への汚染については確認されなかった。また、塊根部の洗浄効果について検討したところ、スポンジ利用によるブラッシングを併用することで1 log CFU/g 程度汚染を低減できることが確認された。

③メロンの主要な栽培方法である地這い栽培と立体栽培において、栽培土壌中でのリステリアについて調べたところ、いずれの栽培方法においても定植2週間後には損傷菌化が認められ、地這いでは定植6週間後、立体栽培条件下では定植4週間後にはリステリア菌数は定量下限未満まで低下した。また、リステリア汚染土壌で栽培したメロンへのリステリアの汚染は6節以下の主茎で確認されたが、果実への内部移行は認められなかった。

果実表層上でのリステリアについて調べたところ、表層上でリステリアは損傷菌化し、収穫時期まで生残することが確認された。立体栽培時に慣行的に用いられる果実への袋かけ処理は、果実表層におけるリステリア菌数を高く維持し、損傷菌の発生率も低下させることが明らかとなった。果実表層から組織内部へのリステリアの汚染は認められなかったが、整枝作業で生じる外傷からは、果実組織内に移行することが明らかとなった(表4)。

④キャベツの栽培土壌中でのリステリアについて調べたところ、定植2週間後には他の品目と同様に損傷菌化が認められた。生残性について、冬作キャベツでは定植直後の菌数は約7 log CFU/gであったが、定植14週間後でも3 log CFU/g程度の菌数が認められた。春作キャベツでは定植6週間後以降の菌数は定量下限であったが、定性試験では12週間後にも生残していることが確認された(図2)。いずれの作型においても汚染土壌中で栽培し、収穫したキャベツの茎部及び外葉の一部からはリステリアが検出された(表5)。

⑤整枝作業で使用するハサミの消毒方法について、リステリアを対象に検討した結果、農機具用の塩素系消毒資材(中性次亜塩素酸カルシウム:有効塩素70%)の1,000倍液に10分間浸漬処理することで、刃面に付着したリステリア(4 log CFU/cm²)は定性試験でも検出されず、本剤がハサミの消毒に有効であることが明らかになった。

3) 成果活用における留意点

本研究の結果、土壌の温度ならびに土壌表面付近の湿度が損傷菌化と生残性に大きく影響を与えることが示唆され、低温ならびに高湿度で長く生残する可能性について留意する必要がある。

4) 今後の課題

本研究によりリステリアの場合は土壌の温度が低いこと、灌水による土壌表面の湿度が高く保たれることで生食用野菜類の汚染確率が上がる可能性が示された。一方で、土性や土壌理化学性の違いがリステリアをはじめとした食中毒原因菌の損傷菌化や生残性にどの程度影響を及ぼすかは明らかになっておらず、それについては整理する必要がある。

また、本研究では土壌や灌水等に用いる水を介した可食部内部への汚染は確認されなかったが、海外の研究機関からは種子がリステリアに汚染された場合、葉物野菜の可食部内部が汚染されるとの報告がある。また、国内においては生食用野菜を介した大腸菌O157:H7による食中毒事件が後を絶たない。種子から収穫に至るまでの栽培期間が短いスプラウトやベビーリーフなどは、発芽効率を維持するために無殺菌で播種されることもある。従って、生食用野菜での食中毒事例が多数報告されている大腸菌O157:H7を中心と

した種々の食中毒細菌の汚染機構の解明ならびに汚染低減法の確立が急務であると考えられる。

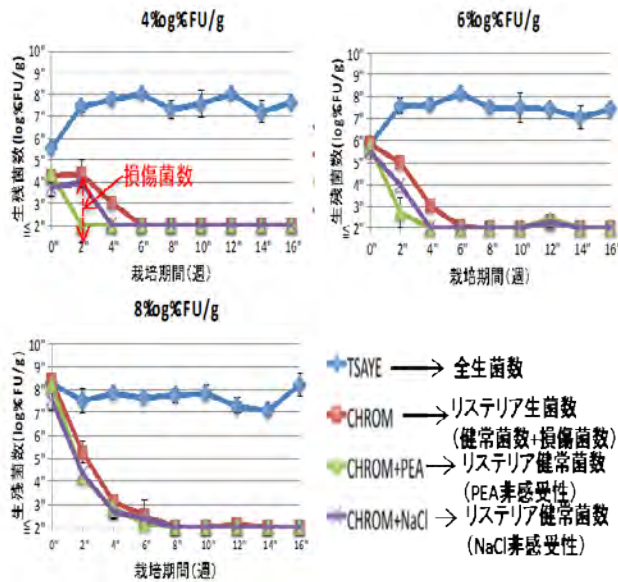


図1 トマト栽培段階における初期汚染土壌中のリステリアの経時的生菌数変化

表1 トマト収穫時における土壌中のリステリアの生残

初期汚染土壌 (CFU/g)	LM 陽性/検体数 (定性試験)	
	一次増菌培養後	二次増菌培養後
10 ⁴	0/3	0/3
10 ⁶	0/3	1/3
10 ⁸	0/3	2/3

表2 頭上灌水で汚染させたリーフレタス葉上でのリステリアの生残性

接種菌数 (CFU/mL)	接種菌数 (log CFU/plant)	LM 陽性/検体数 (定性試験)	
		噴霧直後	7日後
17200	4.84	3/3	3/3
6050	4.38	3/3	1/3
2600	4.02	3/3	3/3
1240	3.70	3/3	3/3
405	3.21	3/3	1/3
200	2.90	3/3	0/3
40	2.20	3/3	0/3
20	1.90	1/3	0/3
4	1.20	0/3	0/3

表3 ハツカダイコン各部位におけるリステリア菌数

部位	LM 菌数 (log CFU/g)
塊根部皮層 (n=11)	2.95 ± 0.61*
茎部 (n=6)	5.14 ± 0.56
葉部 (n=6)	< 2.00

*: 平均値 ± SD, n: サンプル数

表4 地上部外傷からのメロン果実へのリステリアの移行

試験区	調査株数	陽性果実/検体数
LM151R		
10 ⁹ CFU*	10	1/10
10 ⁶ CFU	10	0/10
LM191R		
10 ⁹ CFU*	10	0/10
10 ⁶ CFU	10	0/10
無処理	10	0/10

・ LM151R、LM191R: リファンピシン耐性を自然突然変異で付与したリステリア株

*: 地上部外傷部へのリステリア接種濃度

・ 陽性果実数が0となった試料は、果実部破砕液を増菌培養後CHROMAgar Listeria培地とPCRを併用して接種菌が存在しないことを確認した。

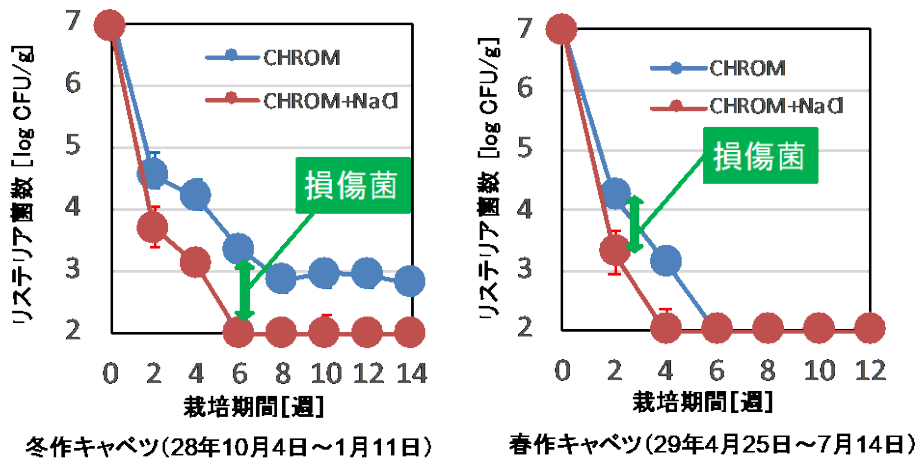


図2 キャベツ栽培土壌中でのリステリアの消長

- ・ 供試菌株：LM151R (リファンピシチン耐性を有するリステリア株)
- ・ CHROM：CHROM agar Listeria
- ・ CHROM agar Listeria培地上では損傷菌と健全菌が生育できるが、CHROM agar ListeriaにNaCl (4%)を加えた培地では健全菌しか生育できないため、両培地上に生育するコロニー数の差が損傷菌数を測定した。

表5 リステリア汚染土壌で栽培したキャベツ可食部からのリステリアの検出

処理区	調査個 体数	LM 陽性個体数/検体数				
		茎部	外葉 1-3	外葉 4-6	結球部位	
LM151R	初期汚染土壌	12	4/12	0/12	0/12	0/12
	高濃度汚染土壌	12	9/12	3/12	0/12	0/12
LM191R	初期汚染土壌	12	8/12	0/12	0/12	0/12
	高濃度汚染土壌	12	11/12	1/12	0/12	0/12
無処理	12	0/12	0/12	0/12	0/12	

- ・ LM151R、LM191R：リファンピシチン耐性を自然突然変異で付与したリステリア株
- ・ 初期汚染土壌：定植時だけリステリアを接種した土壌
- ・ 高濃度汚染土壌：定植時及び2週間ごとにリステリアを接種した土壌
- ・ 外葉：外側からの葉数、結球部位：外葉9枚を除いた可食部
- ・ 陽性果実数が0となった試料は、果実部破碎液を増菌培養後CHROM Agar Listeria培地とPCRを併用して接種菌が存在しないことを確認した陽性個体数は増菌培養法によってLMが検出されたものを示す。

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	12	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	保存料、日持ち向上剤を用いた損傷食中毒菌の制御法とその評価法に関する研究		
小課題責任者名・研究機関	高橋 肇・東京海洋大学		

1) 研究目的

本課題では、加工の際に使用される保存料や日持ち向上剤により、原料に存在していた菌がどの程度死滅若しくは損傷しているのかを多角的に検討することで、より効果的な殺菌、制御法の確立を目指す。これまでの培養法による殺菌・増殖挙動の解析では、死菌と損傷菌、難培養性菌の区別が難しく、薬剤等による殺菌・増殖抑制効果を評価する際に菌数を過小評価し、潜在的なリスクを見逃してきた可能性がある。

近年、EMA、PMAといった核酸結合試薬とリアルタイムPCRを組み合わせる方法が広く用いられるようになり、生菌と死菌を区別することが可能になった。本法は膜の損傷部位より核酸結合試薬を流入させ、リアルタイムPCRの標的から除外させることで生菌のみを標的とすることを原理としており、培養法による測定結果との併用で死菌と損傷菌、難培養状態の菌を区別できる可能性がある。

本研究では、生菌、死菌、損傷菌の判別が可能なリアルタイムPCR法の確立を行い、これを殺菌剤や添加物等による殺菌・増殖抑制法のモニタリング法として利用することで、最終的に効果の高い増殖抑制、殺菌法の開発へ繋げることを目的とする。

2) 研究成果

PCR法により食品中の菌を検出もしくは定量する際の最大の問題点として、死菌由来のDNAを標的とすることによる疑陽性もしくは菌数の過大評価を引き起こすことが指摘されていた。これを解決する手段として、PMAやEMAといった核酸結合試薬とリアルタイムPCR法を組み合わせた方法が提案された。しかしながら、「核酸結合試薬+リアルタイムPCR系」による生菌死菌判別定量法は、加熱殺菌を想定した実験系を評価したものが多く、実際の食品製造現場で用いられるような次亜塩素酸ナトリウムやエタノールなどの薬剤で死滅した菌に対する評価はほとんどない。そのため、本研究課題でははじめに実際の食品製造現場で用いられている薬剤殺菌法に対し、どの程度この方法が応用可能であるか、現状の技術を評価し、その適応範囲を拡大するため条件の検討を行った。

実際の食品加工の現場で多く使用される、エタノールおよび次亜塩素酸などにより処理した死菌液を調整し、これと段階希釈を行った生菌液と混合した。この混合液について、「核酸結合試薬+リアルタイムPCR系」により菌数を測定することで、どの程度の範囲に

本法が応用可能か評価を行った。この結果、どの殺菌法についても、4 log程度の菌数減少であれば、本法が応用可能であるという知見を得た(図1)。

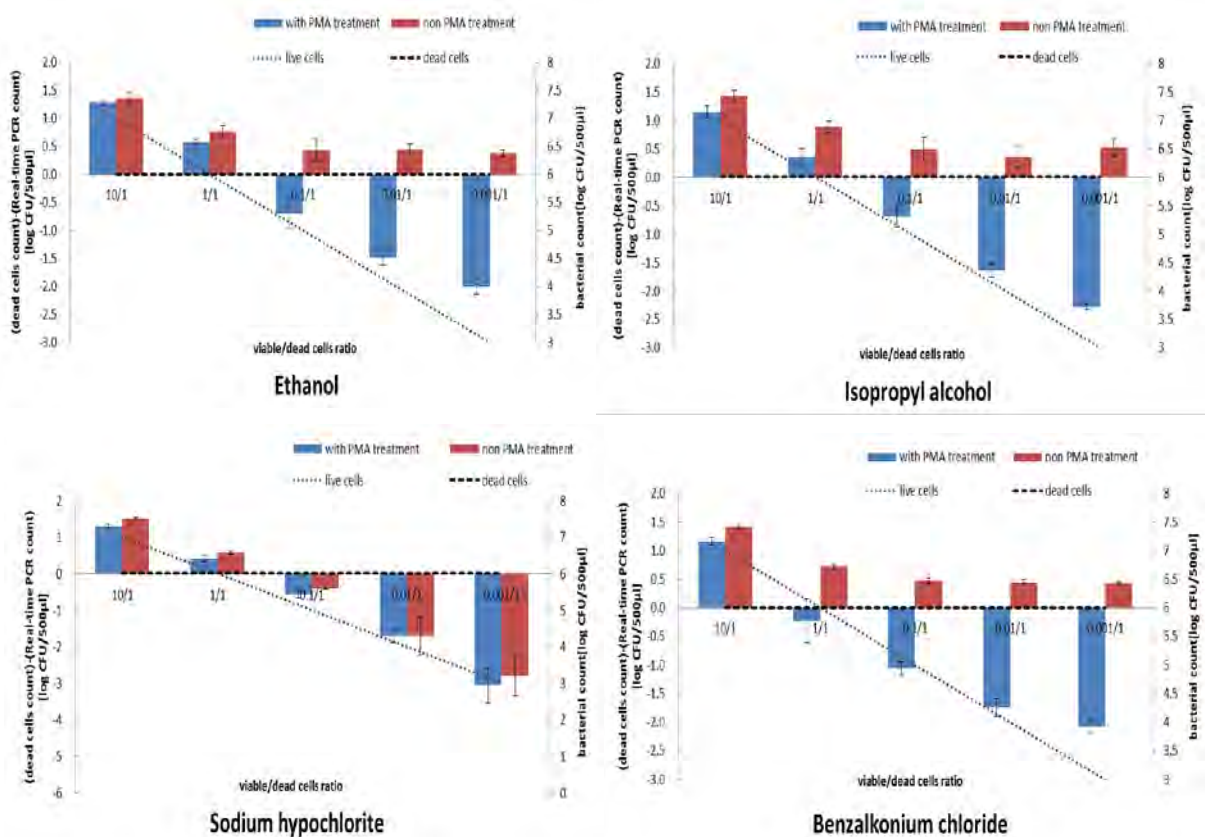


図1： エタノール、イソプロパノール、次亜塩素酸および塩化ベンザルコニウム処理によって死滅した大腸菌に濃度の異なる生菌液を混合し、qPCR、PMA-qPCRで測定した結果。従来のPCR法では死菌の接種菌数を示し続けたが、PMA-qPCRは実際の菌数とほぼ同じになった。

上記知見をもとに、本法を培養法と組み合わせて使用することにより、薬剤処理による菌数減少が、単なる損傷菌の発生によるものなのか、死滅しているのか判断できる方法を確立した。モデル系として、次亜塩素酸により殺菌処理を行った菌液をこの3種の方法で測定したところ(図2)、処理により損傷菌が発生していることが明らかとなり、培養法では当初の予想通り、殺菌処理の過大評価をしてしまっていることが判明した。

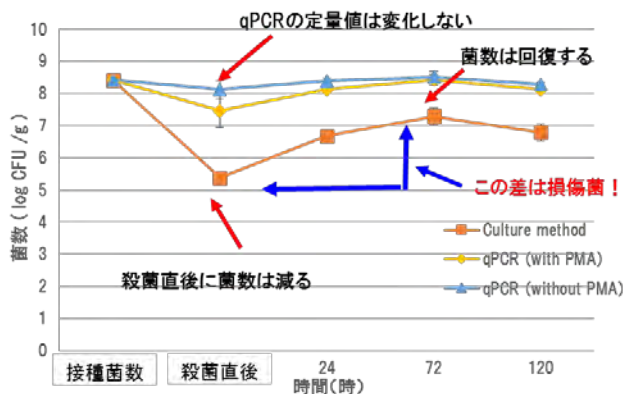


図2 殺菌処理前後の各測定方法による菌数の変動

各測定法の差を見ることにより処理後の菌がどのような状態なのか判別が可能になった。

さらに、食品の加工段階において薬剤処理を行った際の菌数減少を「核酸結合試薬+リアルタイムPCR系」の利用により、正確にモニタリングできることを実際の食品の系にお

いて検証し、殺菌と損傷菌の発生の関係について詳細に検討した。本検討では、モデル食品として根菜を含むサラダを作り、次亜塩素酸、過酢酸で殺菌し、殺菌前後と保存後の菌数を「核酸結合試薬+リアルタイムPCR系」を用いて定量し、殺菌の効果を検証した。その結果、次亜塩素酸ナトリウム600 ppm処理を行ったカットサラダにおいては、殺菌直後および1日後まで通常の培養法では、一般生菌、腸内細菌科菌群ともに平板培地には菌が検出されず、1日後の検体については、ピルビン酸添加培地においてのみ、菌数の測定が可能であった。このデータより、処理によりサラダ中のほとんどの菌が損傷状態になったことが推察された(図3)。PMA-qPCRによる菌数の定量では、処理前後で大きな変動は見られず、3・6 log/gの菌が測定されており、培養法では損傷状態にある菌が測定できていないことが明らかとなった。また、過酢酸製剤(80 ppm)処理でも、腸内細菌科菌群を対象とした測定区において、処理直後に培養法では非検出、PMA-qPCRでは2 log程度の低減という結果となり、損傷菌の発生が起こっていることが明らかとなった(図4)。

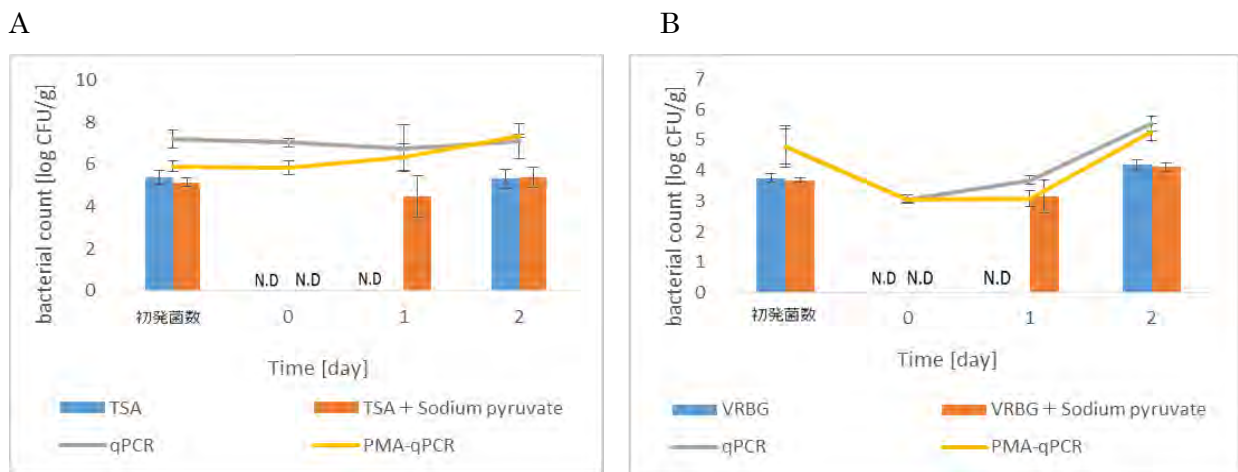


図3 600 ppmの次亜塩素酸にて10分処理した際の、処理前後及び保存後の菌数変化。培養法として通常のTSA培地、損傷回復を目的とするピルビン酸添加培地を使用した。PCR法は通常の処理を行ったものと核酸結合試薬PMAを用いたもの両方を行った。(A)一般生菌数 (B) 腸内細菌科菌群 N.D.検出限界(2 log CFU/g)未満

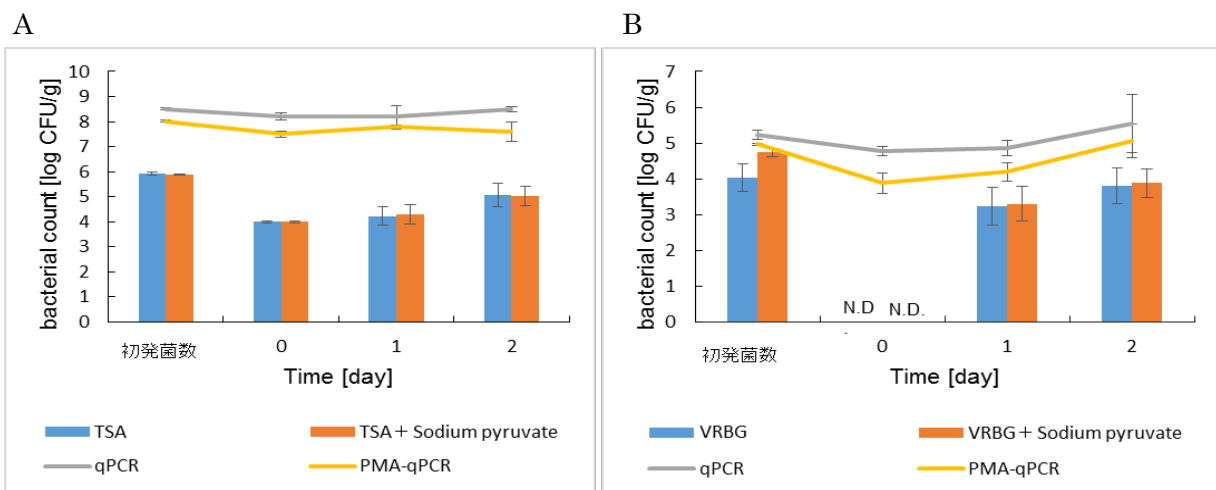


図4 80 ppmの過酢酸にて10分処理した際の、処理前後及び保存後の菌数変化。培養法として通常のTSA培地、損傷回復を目的とするピルビン酸添加培地を使用した。(A)一般生菌数 (B) 腸内細菌科菌群 N.D.検出限界(2 log CFU/g)未満

3) 成果活用における留意点

本研究の(図3, 図4)で示した殺菌剤に対する菌数の挙動は、比較的付着した菌の殺菌が難しいと考えられる食品を例に挙げたデータであり、今回使用した高濃度の次亜塩素酸であっても殺菌効果がないと主張するものではない。これらの薬剤の殺菌効果は、食品によって大きく変化するため、本研究で提示したように、PMA-PCRを培養法とともに評価し、食品毎に多角的に殺菌効果を検証していくべきである。

4) 今後の課題

これまで広く用いられている殺菌法の中には、損傷菌を多く発生させるものも存在する。今後は損傷菌の発生が少なく効果の高い殺菌手法に関し研究が必要である。

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	13	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	食品加工工程における損傷菌の生残性と挙動の解明		
小課題責任者名・研究機関	細谷幸恵、稲津康弘・農研機構食品研究部門		

1) 研究目的

本研究では食品加工工程において発生する損傷菌の生残特性を把握し、従来よりも高度な微生物制御を実現するために活用可能なデータを供給することを目的とする。先行する本プロジェクト研究の成果（高効率損傷菌回復培地やPCR検出技術等）を踏まえつつ、食中毒菌の損傷度の定量的評価手法の開発を目指す。具体的には、例えば乳製品や食肉加工品あるいは浅漬け類等、加熱・塩蔵・pH調整あるいは添加物の使用による微生物制御が行われている生食用食品を対象として、その中に混入した食中毒菌の増殖能を定量PCR等にて特異的に測定する手法を開発する。その結果を基に、増殖の遅延等を指標とした損傷度の評価を行うことを通じて、当該食品に対する必要にして十分な微生物制御の条件を明らかにする。これらの具体的データは食品企業での微生物制御条件の決定に活用でき、より安全で確実な食品加工条件の提示に役立つ。また、加工工程全体でのリスク低減への具体的な措置を検討でき、食品製造から保存までといったフードチェーン全体での活用が期待できる。

2) 研究成果

一般に微生物が損傷を被ると、培地等で回復させた場合に増殖の遅延が観察され、この増殖の遅延時間を菌の損傷度と関連付ける報告がなされている。増殖の遅延時間を計測するには吸光度による測定が一般的であるが、食品が混在した検体で試験する場合、食品残渣の影響や食品中に既に混在している雑菌の増殖等により吸光度測定に影響を与えてしまい、モニタリングの対象とする食中毒菌のみの増殖遅延時間を求めることができない。

そこで、第一に食品検体でも活用可能な食中毒菌の損傷度の定量的評価手法の開発により、食品中における食中毒菌特異的増殖曲線作成手法の構築を目指した。増殖曲線の作製に際し、必要な核酸抽出条件や定量PCR反応条件を検討し、食品マトリクス中に混在する食中毒菌の特異的定量法の開発を行った。さらに、食品マトリクスに食中毒菌を接種した際に、標的菌の増殖挙動が取得可能か試験した。

食品マトリクスとして牛乳および生乳を選定した。サルモネラを検体に接種し、各温度帯について、培養法および定量PCR法で得た結果から増殖曲線を作成した（図1）。同時に、従来の培養法との比較のため、これら検体中に生存するサルモネラ菌数を寒天平板法

により経時的に測定した。両者はいずれも類似した増殖曲線を描き、定量PCRによっても従来法と同等の増殖挙動曲線を取得できることを示した。さらに、雑菌が混在する生乳においても、定量PCR法により標的とするサルモネラのみ増殖曲線の取得が可能であった。以上の結果から、定量PCR法により、食品保存条件下における微生物増殖データの取得を効率的に行える可能性を示した。

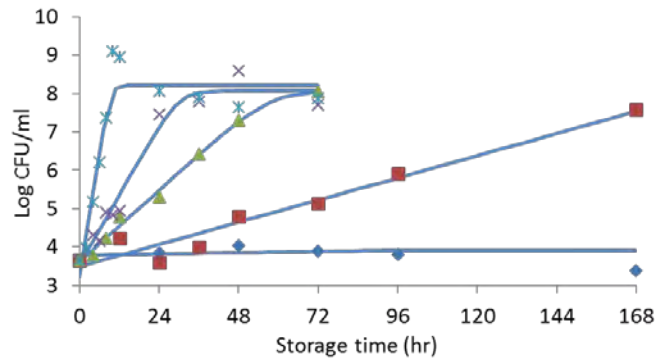


図1. 定量PCR法で作成した牛乳中でのサルモネラの増殖曲線

また、核酸抽出条件およびPCR反応条件のさらなる検討と改良の結果、本法はサルモネラだけでなく、細胞壁がより強固なリステリアについても応用が可能となった。

本法により食中毒菌の増殖曲線のモニタリングが可能となったことから、これを用いてサルモネラに損傷を与えた際に、増殖遅延現象が観察可能か否か検討を試みた。生理食塩水中で加熱処理を与えて菌体を損傷させた場合に、標的菌の回復培地中での増殖過程をモニタリングしたところ、加熱曝露時間が長くなるほど増殖遅延時間の延長が観察され、加熱時間-増殖遅延時間の関係は直線的な1次関数で示された。しかし死滅直前付近では、その関係式よりも増殖遅延時間は急勾配で伸長する現象が観察された。一方、従来の培養法による二重平板培地法では、加熱曝露時間の延長に伴い集落が検出できず評価不可能となったが、この場合においても増殖遅延時間は段階的に延長する現象を確認したことから、本法は損傷菌評価手法として有用である可能性を示した（図2）。

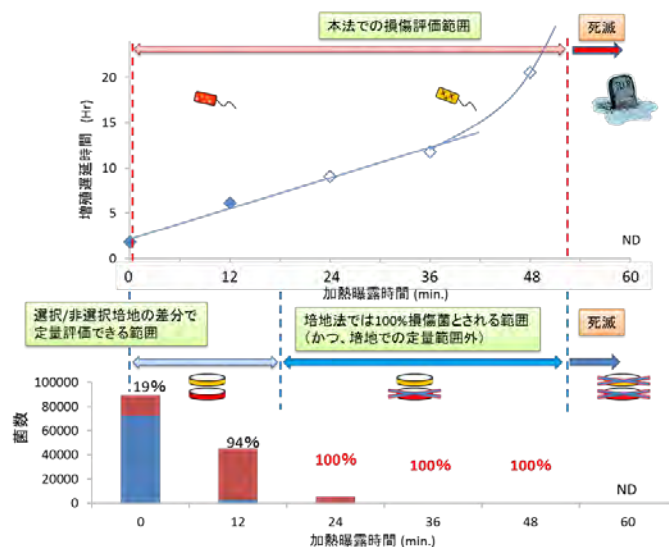


図2 上) PBS中で加熱を与えたサルモネラの増殖遅延時間と加熱時間との関係。黒塗り
は二重平板培地法により評価可能な範囲を示す。下) 二重平板培地法による計測結果。

青は健全菌、赤は損傷菌、数値%は損傷菌の割合を示す。

食品への活用を検討するため、牛挽肉中に混入したサルモネラについて、加熱損傷による損傷度の評価を試みた。牛挽肉にサルモネラを接種し加熱処理を供した後、回復培地で乳剤化し、サルモネラが回復する過程を本法でモニタリングした。フィッティングモデル解析により得られた増殖曲線から、増殖遅延時間を求めた。結果、加熱曝露時間に依存して、サルモネラ増殖遅延時間の伸長が観察されたことから、増殖遅延時間は損傷度の指標となりうると考えられた。一方、PBSと牛挽肉に混入したサルモネラについて、加熱損傷を与えた後にそれぞれの増殖遅延時間の差異を検討した結果、2者間で大きく異なった。すなわち、同等の加熱損傷を与えた場合でも、被る損傷度は混入マトリクスに強く依存することを示した(図3)。

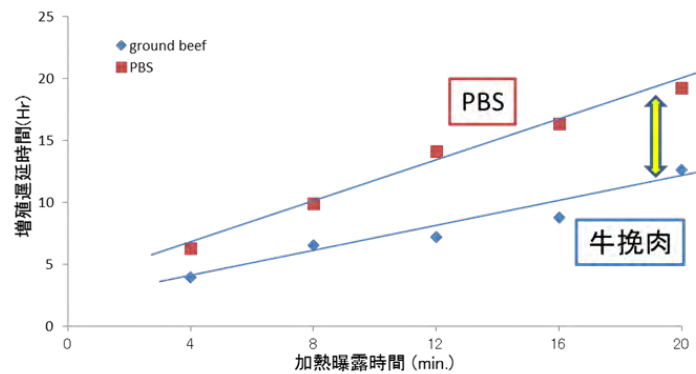


図3. PBSおよび牛挽肉内でサルモネラを加熱損傷させた場合での回復能の差

さらに詳細な解析のため、様々な加熱温度における曝露試験を実施し、曝露条件と増殖遅延時間との関係性を求めたところ、損傷菌が発生する範囲を図4のような3次元モデルで表現できると考えられた。

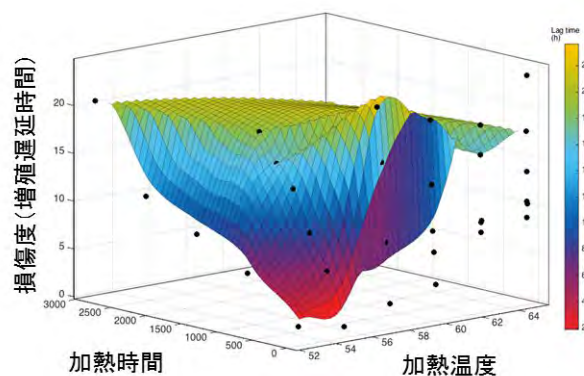


図4. 増殖遅延時間と加熱ストレスとの関係

また、大腸菌O157:H7について高食塩濃度環境への曝露試験も実施したところ、回復必要時間の延長は加熱による曝露試験と比べて異なる動態を示した。以上の結果より、本課題で開発した損傷度計測法は、菌種およびストレス種等、各々による損傷過程の解明にも効果を発揮すると考えられた。

3) 成果活用における留意点

増殖の遅延度を指標とした損傷度の評価法について、挽肉・味噌などに活用できることを明らかとしたが、その他の食品については検討の余地がある。

4) 今後の課題

本研究では、加熱・塩蔵での評価を試みたが、ストレス毎にその変動が異なることも確認された。評価可能な損傷条件について、今後、検討幅を広げる必要がある。

中課題番号	13406381	研究期間	平成25～29年度
小課題番号	14	研究期間	平成25～29年度
中課題名	損傷菌の発生機序の解明と検出・制御技術の開発		
小課題名	高圧処理を活用した有害細菌の損傷菌調製による機構解明及び損傷菌制御技術の開発		
小課題責任者名・研究機関	山本和貴、木村啓太郎、稲岡隆史、中浦嘉子・農研機構食品研究部門		

1) 研究目的

日本国内で高圧食品加工の実用化検討が過去数年間で急速に活発になってきた。高圧損傷菌には未解明な点が多いことに加えて、高圧損傷菌発生リスクが高いと思われる400 MPaでの高圧処理による製品化事例があること等を踏まえ、高圧加工食品製造における高圧損傷菌の発生機構を解明し、損傷菌回復リスクを低減する手法を開発することを目標とする。そのために、高圧処理時の損傷発生・回復の各機構を成分解析、オミックス解析等で明確に捉え、併せて、損傷菌を検出する手法を開発する。

2) 研究成果

高圧損傷菌の損傷回復、発生機構、検出等について、以下が提示された。

- ①連続的または断続的な高圧処理による大腸菌不活性化においては、昇減圧回数よりも、保持時間が重要な因子であった。
- ②一般的な600 MPaでの処理より低い400～500 MPaでの処理は、一部実用的に用いられるが、大腸菌及びリステリア属菌では損傷菌発生リスクが高くなった。
- ③低い処理圧力での殺菌効果を、処理時間の延長、処理回数の増加で補っても、殺菌効率が高くならずに損傷菌リスクが高くなった。
- ④液体培地での高圧処理の結果から、大腸菌及びリステリア属菌の高圧損傷菌は、食品中では、栄養成分を消費して15℃以下でも回復しえた。
- ⑤高圧損傷大腸菌は、蛍光染色後のフローサイトメトリーまたは顕微観察により、平板培養法の10倍程度の菌数が検出されることが明らかとなった(図1)。
- ⑥高圧損傷・回復では、リボゾーム高次構造の破壊及びその後の再形成が観察された。
- ⑦高圧損傷菌のメタボローム解析では、中心代謝経路のアルドラーゼ活性低下が示された。
- ⑧高圧損傷菌は、一般的な培養温度(37℃)では死滅しやすく、25℃培養では培養時間が長くなるが検出率が上がることが明らかとなった(図2)。
- ⑨高圧損傷菌を検出するためには、市販培地では困難であり、ピルビン酸添加LB培地で25℃の培養を行うことが推奨された。

3) 成果活用における留意点

ピルビン酸添加培地で25℃培養することで、損傷菌の検出率は向上するが、培養時間が長くなる点に注意が必要である。また、菌種によってはピルビン酸添加効果が見られない可能性もあるため、自主衛生管理の手法として用いる前に、想定する汚染菌で実験する必要がある。

4) 今後の課題

一般生菌検出では、35～37℃で培養後にコロニーを計数する。しかし、高圧損傷菌には高温のため死滅して検出率が低下する。ピルビン酸添加培地で25℃培養することで、損傷菌の検出率は向上することを示したが、培養に3日程度必要な問題があるため、培養時間を短縮する検出法の技術開発が必要である。また、汎用性を確認するために、更に菌種を増やして検証する必要がある。

リボゾーム高次構造の破壊及び回復が高圧損傷及び回復に伴うことが明らかになったことから、ポリソーム形成を阻害する因子に焦点を当てた研究が今後必要である。

高圧損傷菌では、中心代謝経路のアルドラーゼ活性低下が示されたことから、関連酵素群の活性低下を誘導する因子を解明し、活性低下の促進因子による回復阻害等の研究が必要である。

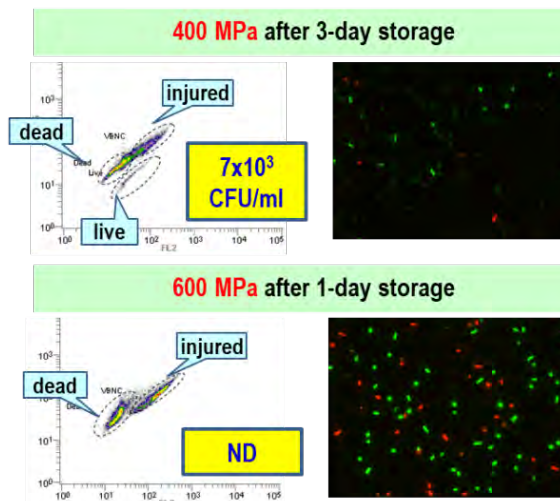


図1 高圧損傷大腸菌の蛍光染色によるフローサイトメトリー解析及び顕微観察
 平板培養では検出されない菌が蛍光検出され、健全、損傷、死滅の各状態で区別された。

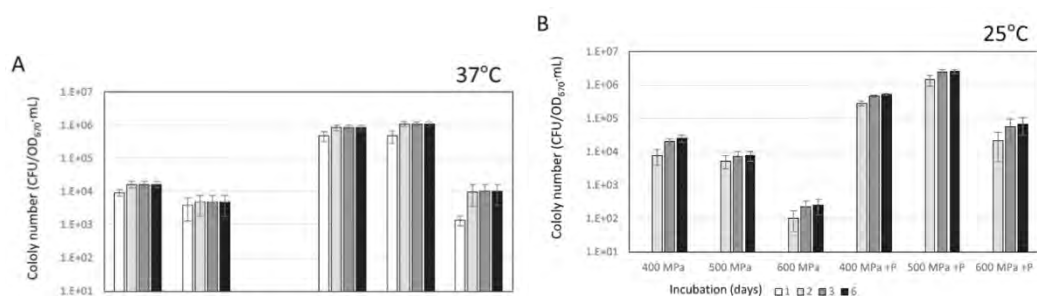


図2 高圧処理（400、500、600 MPa）した大腸菌の検出
 37 °C（図中A）では1日培養で検出が可能な場合もあるが検出率が低い。一方、ピルビン酸を加えて25 °C（図中B）で培養すると検出率は最大となるが、3日以上培養が必要

成果等の集計数

課題番号	学術論文		学会等発表(口頭またはポスター)		出版図書	国内特許権等		国際特許権等		報道件数	普及しうる成果	発表会の主催(シンポジウム・セミナー等)	アウトリーチ活動
	和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得				
13406381	4	18	84	24	19	1	0	0	0	1	2	7	8

(1)学術論文

区分: ①原著論文、②その他論文

整理番号	区分	機関名	タイトル	著者	掲載誌	巻(号)	掲載ページ	発行年	発行月
1	①	農研機構食品研究部門	Real-time PCRを用いた牛乳および生乳中の <i>Salmonella</i> 増殖の特性評価と増殖挙動のモデル化	川崎晋ら	日本食品微生物学雑誌	31	21-35	2014	3
2	①	農研機構食品研究部門	味噌に混入した糞便汚染指標菌の検出方法の検討	細谷幸恵ら	食品総合研究所研究報告	78	25-29	2014	3
3	①	東京海洋大学	<i>Listeria monocytogenes</i> develops no resistance to ferulic acid after exposure to low concentrations.	H. Takahashiら	Food Control	47	560-563	2015	1
4	①	農研機構動衛研	Lipooligosaccharide core truncations affect the ability of <i>Campylobacter jejuni</i> to attach to glass and form biofilms under aerobic conditions	V.T. Nguyenら	JARQ	49 (3)	450-462	2015	8
5	①	東京海洋大学	Growth inhibition effects of ferulic acid and glycine/sodium acetate on <i>Listeria monocytogenes</i> in coleslaw and egg salad.	H. Takahashiら	Food Control	56	105-108	2015	11
6	①	農研機構食品研究部門	Fate of inoculated <i>Escherichia coli</i> O157:H7 on Japanese sweet dumplings during storage	Y. Inatsuら	Biocontrol Science	20	285-290	2015	12
7	①	農研機構食品研究部門	Fate of <i>Escherichia coli</i> O157 cells inoculated into lightly pickled Chinese cabbage during processing, storage and incubation in artificial gastric juice	Y. Inatsuら	Biocontrol Science	21	51-56	2016	3
8	①	農研機構食品研究部門	3M TM molecular detection systemを用いた <i>Listeria monocytogenes</i> の簡易迅速遺伝子検査法の評価	川崎晋ら	食品総合研究所研究報告	80	9-15	2016	3
9	①	九州大学	Possibilities for contamination of tomato fruit by <i>Listeria monocytogenes</i> during cultivation	K. Honjohら	Food Science and Technology Research	22 (3)	349-357	2016	4
10	①	農研機構動衛研	Peptidoglycan acetylation of <i>Campylobacter jejuni</i> is essential for maintaining cell wall integrity and colonization in chicken intestine	T. Iwataら	Applied and Environmental Microbiology	82(10)	6284-6290	2016	10
11	①	大阪府立大学	Nitrate salts suppress sporulation and production of enterotoxin in <i>Clostridium perfringens</i> strain NCTC8239.	M. Yasugiら	Microbiology and Immunology	60	657-668	2016	10
12	①	近畿大学	Enumeration and identification of coliform bacteria injured by chlorine or fungicide mixed with agricultural water	H. Izumiら	Journal of Food Protection	79(10)	1789-1793	2016	10
13	①	東京海洋大学	Discrimination of live and dead cells of <i>Escherichia coli</i> using propidium monoazide after sodium dodecyl sulfate treatment.	H. Takahashiら	Food Control	71	79-82	2017	1
14	①	農研機構食品研究部門	Injury and recovery of <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 cells treated by high hydrostatic pressure at 400-600 MPa	K. Kimuraら	Journal of Bioscience and Bioengineering		online	2017	1

15	①	農研機構 食品研究 部門	Characterization of high hydrostatic pressure-injured <i>Bacillus subtilis</i> cells	T. Inaokaら	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	online	2017	1	
16	①	近畿大学	Enumeration and identification of ethanol-injured coliform bacteria found on harvest equipment and its cross-contamination with cabbage	A. Inoueら	Journal of Food and Nutritional Disorders	6 (1)	1-5	2017	2
17	①	大阪府立 大学	A novel double subculture method and its theory for the enumeration of injured cells in stressed microbial population	T. Tsuchido	Biocontrol Science	22 (2)	131- 135	2017	6
18	②	農研機構	The efficacy of combined (NaClO and organic acids) washing treatments in controlling <i>Escherichia coli</i> O157:H7, <i>Listeria monocytogenes</i> and spoilage bacteria on shredded cabbage and bean sprout	Y. Inatsuら	LWT – Food Science and Technology	85	1-8	2017	6
19	②	近畿大学	[Review] Quality and safety of fresh horticultural commodities: Recent advances and future perspectives	V. Pramodら	Food Packaging and Shelf Life	14	2-11	2017	9
20	①	近畿大学	Viability of sublethally injured coliform bacteria on fresh-cut cabbage stored in high CO2 atmospheres following rinsing with electrolyzed water	H. Izumi・A. Inoue	International Journal of Food Microbiology	266	207- 212	2018	1
21	①	九州大学	Role of phage shock protein in recovery from injury by heating in <i>Salmonella</i>	X. CUIら	Biocontrol Science	23 (1)	17-25	2018	3
22	②	農研機 構、道総 研、九州 大、新潟 農総研	野菜栽培環境における損傷菌の発生と対策	木嶋伸行ら	日本食品科学工 学会誌	65(4)	205- 211	2018	4

(2)学会等発表(口頭またはポスター)

整理番号	タイトル	発表者名	機関名	学会等名	発行年	発行月
1	食品の加熱殺菌処理における原理と操作上の課題	土戸哲明	関西大学(当時)	日本食品工学会(食 品工学フォーラム)	2013	6
2	「サルモネラの加熱損傷回復におけるアミノ酸の機能」	宮本敬久	九州大学	第50回化学関連支 部合同九州大会	2013	7
3	「分岐鎖アミノ酸およびグルタミン酸による細菌の加熱損傷からの回復促進効果」	宮本敬久	九州大学	日本食品科学工学 会第60回記念大会	2013	8
4	枯草菌の抗酸化遺伝子多重欠損株を用いた”定性的ストレス感受性/抵抗性マトリックス解析”とその応用	坂元 仁ら	関西大学(当時)	日本防菌防黴学会 大会	2013	9
5	トマト栽培土壌中におけるリステリアの生残と損傷菌検出に関する研究	林 英ら	九州大学	日本食品科学工学 会西日本支部および 日本栄養・食糧学会 九州・沖縄支部合同 大会	2013	11
6	<i>Escherichia coli</i> acid resistance: Regulation by a tRNA modification	岡本晋	農研機構	2013年度天然資源 の開発利用に関する 日米会議(UJNR)食 品・農業部会	2013	12
7	青果物栽培環境中の大腸菌群を対象とした薬剤損傷菌の生残性	中田有祉ら	近畿大学	日本食品保蔵科学 会学会	2014	6
8	Effect of the liquid to solid cultivation shift on the viability of <i>Escherichia coli</i> OW6 cells	坂元 仁ら	大阪府立大学	IUMS2014 (Int. Union of Microbiol. Societies)	2014	7

9	Survival of microorganisms isolated from fresh produce and production fields and inoculated into pesticide solutions	H. Izumiら	近畿大学	American Society for Horticultural Science (ASHS)	2014	7
10	高圧処理した大腸菌・枯草菌の生死判定	木村啓太郎ら	農研機構食総研, 愛媛大学農学部	平成26年度グラム陽性菌ゲノム機能会議	2014	8
11	Effects of sequential lipooligosaccharide core truncations on the ability of <i>Campylobacter jejuni</i> to attach to and form biofilms on glass under aerobic conditions	V.T. Nguyen	農研機構 動衛研	International Association for Food Protection Annual Meeting	2014	8
12	高圧損傷菌の保存中の回復挙動に及ぼす温度の影響	山本和貴ら	農研機構食総研, 愛媛大学農学部	日本食品工学会第15回(2014年度)年次大会	2014	8
13	平板法による大腸菌の生存性評価への酸化ストレスの関与	西谷巧太ら	大阪府立大学	日本食品微生物学会学術総会	2014	9
14	大腸菌群を対象とした強酸性電解水処理による薬剤損傷菌のThin Agar Layer法およびフローサイトメトリー法による測定比較	中田有社 ら	近畿大学	日本防菌防黴学会第41回年次大会	2014	9
15	「低水分活性状態におけるサルモネラ菌の加熱損傷」	宮本敬久	九州大学	日本防菌防黴学会第41回年次大会	2014	9
16	「グラム陰性ヒスタミン生成菌のヒスタミン生成能に及ぼす各種培養条件の影響について」	舊谷垂由美ら	国立研究開発法人水産研究・教育機構 中央水産研究所	2014年度日本水産学会秋季大会	2014	9
17	Studies on contamination routes of <i>Salmonella</i> Enteritidis and <i>Listeria monocytogenes</i> in vegetables	K. Honjohら	九州大学	天然資源の開発利用に関する日米会議第43回食品・農業部会	2014	10
18	枯草菌栄養細胞の損傷に及ぼす高圧処理の影響	稲岡隆史ら	農研機構食総研, 愛媛大学農学部	第15回極限環境生物学会年会	2014	11
19	リステリア汚染土壌で栽培したトマトの可食部汚染の可能性について	祝迫侑里ら	九州大学	日本食品科学工学会西日本支部大会	2014	12
20	<i>cj0610c</i> 遺伝子は <i>Campylobacter jejuni</i> の鶏腸管定着性に関与する	岩田剛敏	農研機構 動衛研	第7回日本カンピロバクター研究会総会	2014	12
21	「ストレス処理によるリステリアのフィラメント形成とその性質」	山崎浩司	北海道大学大学院 水産科学研究院	日本食品科学工学会北海道支部大会	2015	2
22	「シメサバ調味液から分離されたヒスタミン生成乳酸菌のヒスチジン脱炭酸酵素」	舊谷垂由美ら	国立研究開発法人水産研究・教育機構 中央水産研究所	平成27年度日本水産学会春季大会	2015	3
23	サルモネラ属菌の低温での高圧損傷・回復	森松和也ら	農研機構食品研究部門, 愛媛大学農学部	第75回農業食料工学会年次大会要旨	2016	5
24	キャベツ収穫環境中の大腸菌群を対象とした薬剤損傷菌の生残性	中田有社 ら	近畿大学	日本食品保蔵科学学会学会	2015	6
25	「Changes of morphology and tolerance in <i>Listeria monocytogenes</i> after exposure to environmental stress」	山崎浩司	北海道大学大学院 水産科学研究院	IFT年次大会	2015	7
26	Fate of inoculated <i>Escherichia coli</i> O157 in lightly pickled (fermented) Chinese cabbage during processing, storage and after consumption	稲津康弘ら	農研機構 食品研究部門	3rd Southeast Asia Symposium on Quality Management in Postharvest Systems	2015	8

27	Enumeration of sanitizer-injured coliform bacteria in the production and harvest environment of vegetables	H. Izumiら	近畿大学	American Society for Horticultural Science	2015	8
28	高圧損傷した大腸菌検出の最適培養温度	山本和貴ら	農研機構食総研, 愛媛大学農学部	日本食品工学会第16回(2015年度)年次大会	2015	8
29	微生物栄養細胞の損傷菌数評価のための、平板法と発育遅延解析法を併用した「固液発育活性差分法」とその理論	土戸哲明	大阪府立大学	日本防菌防黴学会大会	2015	9
30	平板法と発育遅延解析法を併用した「固液発育活性差分法」による細菌の損傷菌数評価とその加熱損傷への応用	岩田吏世ら	大阪府立大学	日本防菌防黴学会大会	2015	9
31	生死判定用蛍光染色法による大腸菌細胞の加熱損傷反応の特性解析反応の特性解析	西谷巧太ら	大阪府立大学	日本防菌防黴学会大会	2015	9
32	大腸菌の熱死滅に対する温度履歴の影響評価—線型ピゲロウ予測モデルにおける各関数項の解析	富井恵奈美ら	大阪府立大学	日本防菌防黴学会大会	2015	9
33	大腸菌の抗酸化酵素多重欠損株の構築と活性酸素ストレス耐性解析	坂元 仁ら	大阪府立大学	日本防菌防黴学会大会	2015	9
34	大腸菌の寒天平板培養におけるコロニー形成能の変動要因の解析	坂元 仁ら	大阪府立大学	日本防菌防黴学会大会	2015	9
35	ナス収穫環境中の大腸菌群を対象とした薬剤損傷菌の生残性	中田有祉 ら	近畿大学	日本防菌防黴学会大会	2015	9
36	薬剤処理によるリステリア損傷菌のThin agar layer 法とFlow cytometry法による測定比較	井上あやの ら	近畿大学	日本防菌防黴学会大会	2015	9
37	「海水への紫外線照射により生じる損傷菌の出現およびその制御」	笠井久会	北海道大学大学院 水産科学研究院	平成27年度日本水産学会秋季大会	2015	9
38	ペプチドグリカンのO-アセチル化因子Cj0610cは <i>Campylobacter jejuni</i> の鶏腸管定着に必須である	岩田剛敏	農研機構 動衛研	第158回日本獣医学会学術集会	2015	9
39	Microbial cannibalism and recovery of bacteria injured by high hydrostatic pressure	K. Yamamotoら	農研機構食総研, 愛媛大学農学部	Book of Abstract, Joint AIRAPT-25 & EHPRG-53 International Conference on High Pressure Science and Technology, pp.82.	2015	9
40	微生物制御(殺菌・抗菌・除菌)技術とその作用メカニズム—微生物細胞の抵抗戦略を超えて	土戸哲明	大阪府立大学	日本化学会CSJフェスタ	2015	10
41	「腸炎ビブリオのストレス応答」	澤辺智雄	北海道大学大学院 水産科学研究院	腸炎ビブリオシンポジウム	2015	10
42	大腸菌抗酸化システム多重欠損株を用いた熱ストレス条件下での酸化ストレス損傷の解析	坂元 仁ら	大阪府立大学	第67回日本生物工学会大会	2015	10
43	高圧処理により損傷した大腸菌の回復過程をフローサイトメータで観察	木村啓太郎ら	農研機構食総研, 愛媛大学農学部	第67回日本生物工学会大会	2015	10
44	大腸菌の加熱損傷・死滅に対する加熱温度、pHと食塩の影響度解析	小池佳都子ら	大阪府立大学	日本食品微生物学会学術総会	2015	10

45	「低水分活性状態で生育したサルモネラの耐熱性と加熱損傷回復機構解明」	宮本敬久	九州大学	平成27年度日本食品科学工学会西日本支部大会	2015	10
46	Optimization of methods to detect injured bacteria on agar plates	K. Yamamotoら	農研機構食総研, 愛媛大学農学部	第44回天然資源の利用に関する日米会議(UJNR)食品・農業部会(UJNR), pp.49-50.	2015	11
47	The “viable but nonculturable” and “injured” states in pathogenic bacteria relating to foodborne diseases	岡本晋	農研機構	2015年度天然資源の開発利用に関する日米会議(UJNR)食品・農業部会	2015	11
48	高圧損傷リステリアの回復挙動に及ぼす温度及びマトリックスの影響,	山本和貴ら	農研機構食総研, 愛媛大学農学部	第56回高圧討論会講演要旨集, pp.67.	2015	11
49	The Cj0610c is necessary for peptidoglycan O-acetylation and chicken colonization in <i>Campylobacter jejuni</i> .	Iwata T	農研機構 動衛研	The 18th International workshop on Campylobacter, Helicobacter and related organisms	2015	11
50	「ウェルシュ菌の芽胞形成を評価するレポーター系の開発」	若林友騎ら	大阪府立大学	第68回日本細菌学会関西支部総会	2015	11
51	栽培土壌におけるリステリアの損傷ならびにリーフレタス可食部汚染機構の解明	本城賢一ら	九州大学	第34回 食品微生物学会学術総会	2015	11
52	薬剤および食品添加物により処理された菌に対するPMA-qPCRの有効性	廣川絵梨ら	東京海洋大学	第34回 食品微生物学会学術総会	2015	11
53	Developing Safety Package, for observing ecological aspect of Foodborne pathogens on the process of composting.	N. Kijimaら	農研機構	Quality Management of Organic Horticulture 2015	2015	12
54	「 <i>Listeria monocytogenes</i> 細胞のフィラメント形成とその性質」	山崎浩司	北海道大学大学院 水産科学研究院	日本食品科学工学会北海道支部大会	2016	2
55	大腸菌抗酸化システム多重欠損株を用いたアミノ酸合成系の酸化損傷の解析	坂元 仁ら	大阪府立大学	日本農芸化学会大会	2016	3
56	生きるか死ぬか、それが問題だ！ - 損傷菌の運命と世界	土戸哲明	大阪府立大学	日本生物工学会大会東日本支部コロキウム	2016	3
57	<i>Campylobacter jejuni</i> が保有するセリン合成酵素の機能解析	岩田剛敏	農研機構 動衛研	第89回日本細菌学会総会	2016	3
58	枯草菌における高圧損傷菌の特性解析	稲岡隆史ら	農研機構食総研, 愛媛大学農学部	日本農芸化学会2016年度大会	2016	3
59	野菜の栽培から流通環境における薬剤損傷菌の生残性	泉 秀美	近畿大学	損傷菌研究会	2016	7
60	Microbial Inactivation by Medium High Hydrostatic Pressure in Combination with Freezing	Y. Nakauraら	農研機構食品研究部門, 愛媛大学農学部	9th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology	2016	7

61	Injury and Recovery of <i>Listeria monocytogenes</i> treated with High Hydrostatic Pressure	K. Yamamotoら	農研機構食品研究部門, 愛媛大学農学部	9th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology	2016	7
62	リーフレタス栽培段階におけるリステリアの損傷菌化と可食部汚染機構の解明	本城賢一ら	九州大学	日本食品科学工学会 第63回大会	2016	8
63	「低水分活性条件でのサルモネラの加熱損傷および回復機構の解明」	宮本敬久	九州大学	日本食品科学工学会 第63回大会	2016	8
64	枯草菌栄養細胞における高圧ストレスの影響	稲岡 隆史ら	農研機構食品研究部門	2016年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議 プログラム・要旨集, p56	2016	8
65	Enumeration of chlorine-injured coliform bacteria of shredded cabbage stored in MAP	H. Izumiら	近畿大学	American Society for Horticultural Science	2016	8
66	大腸菌の加熱損傷細胞における蘇生とそのメカニズム	岩田吏世ら	大阪府立大学	日本食品微生物学会学術総会	2016	9
67	「ウェルシュ菌の芽胞形成を評価するレポーター系の構築」	三宅真実	大阪府立大学	第37回日本食品微生物学会学術総会	2016	9
68	強化平板法と発育遅延解析法を併用した「固液培地生存性差分(DiVSal)法」による微生物の新規損傷菌数評価	岩田吏世ら	大阪府立大学	日本生物工学会大会	2016	9
69	大腸菌細胞質内における <i>ssrA</i> タグ認識プロテアーゼ活性評価のためのレシオメトリックセンサーの開発	坂元 仁ら	大阪府立大学	日本生物工学会大会	2016	9
70	「低水分活性条件におけるサルモネラの熱耐性能の向上と加熱損傷及び回復機構の解明」	宮本敬久	九州大学	日本防菌防黴学会 第43回年次大会	2016	9
71	「低水分活性食品におけるサルモネラの損傷および回復機構の解明」	宮本敬久	九州大学	日本防菌防黴学会 第43回年次大会	2016	9
72	「ボツリヌス菌芽胞の発芽機構の解明」	向本雅郁ら	大阪府立大学	日本防菌防黴学会 第43回年次大会	2016	9
73	野菜の栽培から流通環境における薬剤損傷菌の測定法と生残性	井上あやのら	近畿大学	日本食品・機械研究会	2016	10
74	「サルモネラの耐熱性に及ぼす生育培地のNaCl濃度の影響」	宮本敬久	九州大学	第112回日本食品衛生学会学術講演会	2016	10
75	高塩濃度ストレス環境下における <i>Escherichia coli</i> O157:H7 の損傷回復能の経時変化	細谷 幸恵ら	農研機構 食品研究部門, 筑波大学大学院, 北海道大学大学院 農学研究院	第112回日本食品衛生学会学術講演会	2016	10
76	高圧処理による枯草菌芽胞の発芽誘導に対する懸濁液成分の影響	森松和也ら	農研機構食品研究部門, 愛媛大学農学部	第57回高圧討論会	2016	10
77	Microbiology of Injured Bacteria – a case study of <i>Escherichia coli</i> cells inactivated by high hydrostatic pressure –	K. Kimuraら	農研機構食品研究部門, 愛媛大学農学部	45th Annual Meeting, United States – Japan Cooperative Program in Natural Resources, Food and Agriculture Panel	2016	10

78	Survival of <i>Salmonella</i> on manure preparation	N. Kijima	農研機構	45th Annual Meeting, United States – Japan Cooperative Program in Natural Resources, Food and Agriculture Panel	2016	10
79	Injury by high hydrostatic pressure and recovery of <i>Listeria monocytogenes</i> : role of cannibalism as compared with the case of <i>Escherichia coli</i>	K. Yamamotoら	農研機構食品研究部門, 愛媛大学農学部	45th Annual Meeting, United States – Japan Cooperative Program in Natural Resources, Food and Agriculture Panel	2016	10
80	食塩ストレスを被った <i>Escherichia coli</i> O157の Real-time PCR法による損傷回復能モニタリング	細谷幸恵ら	農研機構 食品総合研究所 北海道大学大学院 農学研究 院	第20 回腸管出血性 大腸菌(EHEC)感染 症研究会	2016	11
81	大腸菌の放射線処理における損傷細胞の評価	岩田吏世ら	大阪府立大学	日本農芸化学会 2017年大会	2017	3
82	寒天培地上での大腸菌細胞における酸化ストレスの解析	坂元 仁ら	大阪府立大学	日本農芸化学会 2017年大会	2017	3
83	大腸菌の熱耐性におけるTAシステムの機能の解明	宮本敬久	九州大学	日本農芸化学会 2017年大会	2017	3
84	Nitrate salts suppress sporulation and production of enterotoxin in <i>Clostridium perfringens</i> strain NCTC8239	安木真世ら	大阪府立大学	第90回日本細菌学 会総会	2017	3
85	Study on mechanism for heat resistance of <i>Salmonella</i> in low moisture condition	X. Cuiら	九州大学	ASM Microbe 2017	2017	6
86	食品加工・製造における殺菌技術一とくに微生物学的側面 からみた課題と新技術への期待	土戸哲明	大阪府立大学	日本食品工学会大 会シンポジウム	2017	8
87	NaClによるサルモネラの耐熱性向上機構の解明	宮本敬久	九州大学	日本防菌防黴学会 第44回年次大会	2017	9
88	蛍光タンパク質を用いた新規レシオメトリック酸化センサーの 開発	坂元仁ら	大阪府立大学	日本生物工学会大 会	2017	9
89	細菌と真菌の損傷菌—加熱損傷を中心に	土戸哲明	大阪府立大学	日本防菌防黴学会	2017	9
90	損傷菌とは何か	宮本敬久	九州大学	第2回「損傷菌の発 生メカニズムと検出・ 制御法」講座	2017	11
91	Adherence of <i>Clostridium perfringens</i> spores to human intestinal epithelial cells Caco-2	坂野上英世ら	大阪府立大学	第90回日本細菌学 会総会	2018	3
92	大腸菌の熱耐性と加熱損傷菌発生における発育・回復培地 および抗酸化化合物の影響	和田彰浩ら	大阪府立大学	日本農芸化学会大 会	2018	3
93	低pH環境における損傷ヒスタミン生成乳酸菌のヒスタミン生 成能について	里見正隆	国立研究開発法人水産研 究・教育機構 中央水産研 究所	損傷菌研究会セミ ナー 2017	2017	6
94	牛ふん堆肥化過程における <i>Salmonella</i> および <i>Listeria</i> 生残性 と損傷菌の発生実態	湊啓子ら	道総研、農研機構	損傷菌セミナー2017	2017	6
95	生食用野菜の栽培段階が食中毒菌の損傷化と可食部汚染 に及ぼす影響	前田征之ら	新潟農総研、九州大学、農 研機構	損傷菌セミナー2017	2017	6

96	野菜栽培段階における損傷菌の意味	木嶋伸行	農研機構	損傷菌セミナー2017	2017	6
97	ハツカダイコン栽培段階におけるリステリアの可食部汚染機構の解明	本城賢一ら	九州大学、農研機構、新潟農総研	日本食品科学工学会 第64回大会	2017	8
98	Disinfectant treatments to reduce microbial food safety risks for fresh and fresh-cut produce	Izumi H.	近畿大学	IV ISHS Asia Symposium	2017	9
99	薬剤処理における損傷菌-野菜の栽培から加工において	泉 秀実	近畿大学	日本防菌防黴学会	2017	9
100	Life style of <i>Listeria monocytogenes</i> in Japanese farm	木嶋伸行	農研機構	46th UJNR meeting	2017	11
101	堆肥化過程における食中毒菌の動態解析に用いる封入体の開発	湊啓子等	道総研、農研機構	日本畜産学会	2018	3
102	Predictive modeling for the growth of <i>Salmonella</i> Enteritidis in chicken juice by Real-Time PCR under fluctuate temperature conditions	細谷幸恵ら	農研機構	日本防菌防黴学会	2017	9
103	高食塩濃度食品に生残する <i>Escherichia coli</i> O157:H7 の損傷度測定法の検討	細谷幸恵ら	農研機構	日本防菌防黴学会	2017	9
104	PMA-qPCR法を用いた殺菌効果の新たなモニタリング法	高橋肇ら	東京海洋大学	日本食品衛生学会	2017	11
105	高圧損傷枯草菌の回復過程における遺伝子発現プロファイル	稲岡隆史ら	農研機構	環境微生物系学会合同大会2017	2017	8
106	高圧損傷枯草菌の回復過程における遺伝子発現プロファイル	稲岡隆史ら	農研機構	2017年度 グラム陽性菌ゲノム機能会議	2017	8
107	Properties of <i>Bacillus subtilis</i> vegetative cells injured by high hydrostatic pressure	稲岡隆史ほか	農研機構	46th UJNR meeting	2017	11
108	高圧損傷した枯草菌栄養細胞における遺伝子発現解析	稲岡隆史ほか	農研機構	2017年度 生命科学系学会合同年次大会	2017	12

(3) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

整理番号	区分	著書名(タイトル)	著者名	機関名	出版社	発行年	発行月
1	①	「食品微生物学の基礎」(分担執筆:「食品の保蔵」)	土戸哲明	関西大学(当時)	講談社サイエンスティフィク	2013	9
2	①	「微生物の簡易迅速検査法」(共監修・分担執筆:「損傷菌」)	土戸哲明	関西大学(当時)	テクノシステム	2013	11
3	①	「食品・化粧品・医薬品への保存料・防腐剤の最適な配合法」(分担)	稲津康弘	農研機構 食品研究部門	技術情報協会	2014	9
4	①	「菌・カビを知る・防ぐ60の知恵—プロ直伝! 防菌防カビの新常識」(編集担当・分担執筆:「熱で菌が死ぬのはなぜ?」)	土戸哲明	大阪府立大学	化学同人	2015	6
5	①	「有害微生物の制御と管理—現場対応への実践的な取り組み」(共監修・分担執筆:「制御管理の考え方」と「物理的制御:高温”、低温”」)	土戸哲明	大阪府立大学	テクノシステム	2016	11
6	②	食品とその製造環境の殺菌における損傷菌とその定義・特性・検出をめぐる問題	土戸哲明, 坂元 仁	大阪府立大学	FFIジャーナル、221(4),278-283	2016	11

7	②	「野菜／カット野菜の化学的殺菌技術の現状と今後の動向」	泉 秀実	近畿大学	三栄源FFIジャーナル	2016	11
8	④	食品高圧加工による微生物不活性化の課題と展望	山本和貴	農研機構食品研究部門	FFIジャーナル、221(4),291-296	2016	11
9	②	損傷菌:その定義・原因・特性について	土戸哲明	大阪府立大学	食品加工技術	2017	4
10	②	損傷菌とその食品微生物制御における意義	土戸哲明	大阪府立大学	ILSI JAPAN(イールシー)	2017	4
11	②	損傷菌研究の意義とこれまでとこれから—特集にあたって	土戸哲明	大阪府立大学	日本食品科学工学会誌	2018	2
12	②	損傷菌の特性、発生機構と検出・計数	土戸哲明・坂元 仁	大阪府立大学	日本食品科学工学会誌	2018	2
13	②	サルモネラの加熱損傷・修復の特性とメカニズム	宮本敬久	九州大学	日本食品科学工学会誌	2018	2
14	②	嫌気性細菌の芽胞とその性状	三宅真美ら	大阪府立大学	日本食品科学工学会誌	2018	2
15	②	酸ストレスによる細菌細胞の損傷とその耐性機構	岡本 晋・亀谷宏美	農研機構	日本食品科学工学会誌	2018	2
16	②	細菌の高圧不活性化における損傷・回復	山本和貴	農研機構	日本食品科学工学会誌	2018	3
17	②	食品高圧加工における食品安全性確保	山本和貴	農研機構	食品と容器	2017	9
18	②	微生物制御、澱粉糊化等を非熱的に可能とする食品高圧加工技術	山本和貴	農研機構	応用糖質科学	2017	11
19	④	農畜水産物の鮮度を最大活用するための食品高圧加工技術	山本和貴	農研機構	食糧	2017	3

(4)国内特許権等

整理番号	特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	機関名	特許権 等の種 類	番号	出願年月日	取得年月日
P16064	微生物の損傷度定量方法	川崎晋、細谷幸恵、 小関成樹、稲津康弘	農研機構	農研機構	特願	2016-089343	平成28年4月27日	

(5) 報道等

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映、④その他

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名等	掲載年	掲載月	掲載日	機関名	備考
②	教育紙1面: 農業の最先端技術「品質を守る技」	朝日新聞	2015	4	26	近畿大学	

(6) 普及に移しうる成果

区分:①普及に移されたもの、製品化して普及できるもの、②普及のめどがたったもの、製品化して普及のめどがたったもの、③主要成果として外部評価を受けたもの

区分	成果の名称	機関名	普及(製品化) 年月		主な利用場面	普及状況
③	バケツによる容積重設定と切返しによる牛ふん堆肥化過程における有害微生物リスクの低減	北海道立総合研究機構畜産試験場	2018	1	堆肥生産現場	H29年度北海道農業試験会議において指導参考事項としてHPで成果公表
②	海水殺菌装置選択ガイド	水産総合研究センター、北海道大学	2018	1	漁港	今後、関係者と連携して普及を図る

(7) 発表会の主催の状況

(シンポジウム・セミナー等を記載する。)

整理番号	発表会の名称	年月日			開催場所	参加者数	機関名	備考
		年	月	日				
1	食品自主衛生管理のための細菌検査入門	2014	7	23	農林交流センター	30	農研機構 食品研究部門	公設場所の研究者および食品関連事業者を対象として、細菌検査の実習および関連分野の講義を行った。
2	食品自主衛生管理のための細菌検査入門	2015	7	22	農林交流センター	20	農研機構 食品研究部門	公設場所の研究者および食品関連事業者を対象として、細菌検査の実習および関連分野の講義を行った。
3	食品自主衛生管理のための細菌検査入門	2016	7	20	農林交流センター	10	農研機構 食品研究部門	公設場所の研究者および食品関連事業者を対象として、細菌検査の実習および関連分野の講義を行った。

4	損傷菌セミナー2016	2016	7	22	大阪府立大学学術交流会館	103	大阪府立大学	日本損傷菌研究会設立記念(第1回)
5	食の機能と安全研究会	2016	10	13	近畿大学会館	20	近畿大学	
6	損傷菌セミナー2017	2017	6	13	東京都江東区洲洲文化会館	104	日本損傷菌研究会	第2回セミナー
7	学会大会シンポジウム「損傷菌の問題と対策」	2017	9	26	豊中市千里ライフサイエンスセンター	150	日本防菌防黴学会	

(8)アウトリーチ活動の状況

区分: ①一般市民向けのシンポジウム、講演会及び公開講座、サイエンスカフェ等、②展示会及びフェアへの出展、大学及び研究所等の一般公開への参画、

③その他(子供向け出前授業等)

整理番号	区分	アウトリーチ活動	年月日			開催場所	参加者数	主な参加者	機関名	備考
			年	月	日					
1	②	国際食品工業展アカデミックプラザ	2013	6	11~14	東京ビッグサイト	1,000	一般企業、一般社会人等	大阪府立大学	展示ブース発表
2	②	国際食品工業展アカデミックプラザ	2014	6	10~13	東京ビッグサイト	1,000	一般企業、一般社会人等	大阪府立大学	展示ブース発表
3	①	JSTサイエンスキャンプ	2014	7	30	農研機構 食品研究部門	30	高校生	農研機構 食品研究部門	
4	②	国際食品工業展アカデミックプラザ	2016	6	7~10	東京ビッグサイト	1,000	一般企業、一般社会人等	大阪府立大学	展示ブース発表
5	①	食品安全セミナー	2016	8	29	農研機構 食品研究部門	30	大学生	農研機構 食品研究部門	
6	①	けいはんなサイエンスカフェ	2017	3	10	けいはんなプラザ(京都府)	20	会社員、主婦、行政等	大阪府立大学	口頭講演
7	②	アグリビジネス創出フェア2017	2018	10	4	東京ビッグサイト	500	一般企業、一般社会人等	道総研、農研機構	展示ブース発表
8	①	レギュラトリーサイエンス研究会成果報告会	2018	11	21	農水省	50	一般企業、一般社会人等	農研機構	