

## 発酵乳製品製造場における乳酸菌ファージの実態把握

濱岡直裕

### Distribution Analysis of Lactic Acid Bacteria Bacteriophages in Fermented Dairy Product Factories

Naohiro Hamaoka

Lactic acid bacteria (LAB) play an important role in the manufacturing of fermented food, like cheeses and cultured milk. A bacteriophage infection would be a disastrous incident, when using one specific LAB stock in a dairy products factory. The number of domestic, small-scale cheese manufacturers has been increasing in recent years in Japan. However, there are few reports that have examined the bacteriophage distribution situation in the factories. In this study, the current state of the bacteriophage distribution in 11 dairy product manufacturing companies in Hokkaido was investigated. A general bacteriophage detection method was modified, in order to perform an LAB bacteriophage test. Two bacteriophages that infect *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* were detected from concentrated cheese whey samples from one of the cheese-making plants in a 6-month time span. These detected bacteriophages belong to a typical morphological class (Siphoviridae, B1 morphotype) of bacteriophage, based on electron microscopy. The LAB infected with these bacteriophages were from a bacterial stock that had been used for cheese production in the past. The commercially available LAB strains used in this research were not infected with these bacteriophages. These results demonstrated that bacteriophage infection in manufacturing is not an urgent risk at present in many of the factories in Hokkaido. However, the detection of 2 bacteriophages from the same factory within 6 months indicated that there are some risk factors in the manufacturing conditions at this factory.

**KEY-WORDS** : lactic acid bacteria, phage, infection incident, distribution

**キーワード** : 乳酸菌, ファージ, 感染事故, 分布

乳酸菌はチーズや発酵乳をはじめ発酵食品製造において重要な役割を果し、道内企業から乳酸菌の活用に関するニーズが多く寄せられている。しかし、特定の菌株を使用し続けると、バクテリオファージ（以下、ファージ）による感染事故が起こることが知られている<sup>1)</sup>。ファージ感染した乳酸菌は、溶菌され死滅するなど、その使用の目的を果たせないため、乳酸菌を用いる食品製造では、

ファージ感染対策が必要である。ファージ感染対策として、一つの菌株を続けて使用せずに菌株数種類を入れ換えながら使用する方法が知られている<sup>2)</sup>が、決定的なファージ感染対策は見出されていない。しかし、中小規模のチーズ工房も増えた中で、製造場における現在のファージ分布状況が公表された例は少なく、当所では、食品工場のファージ感染状況および感染対策についての試験研究が

事業名：経常研究

課題名：抵抗性の付与によるファージ感染対策技術の検討

これまでに実施されていない。

そこで本研究では、当所にファージ試験を行う環境を整え、乳製品製造企業での乳酸菌ファージの現状を把握することを中心に検討し、ファージと製造環境について考察した。

## 実験方法

### 1. 試料および試薬

ファージの有無を探索する試料には、道内乳製品製造企業の11社のチーズホエイの16試料、各2Lを用いた。

試料の濃縮は、酪農学園大学獣医学類および東京工業大学大学院生命理工学院で行われている方法<sup>3), 4)</sup>を参照して実施した。すなわち、試料液は、遠心分離10,000×g、15分間で夾雑物を沈殿させ、上清を回収し、PEG6000を約10% (w/v)、NaClを約4% (w/v) となるように添加し、一夜4℃で静置した。その後、遠心分離10,000×g、60分間で沈殿させたファージPEG6000の凝集体を、少量(2mL程度)のSM buffer (1000mL中に、NaCl 5.8 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.0 g, 1M Tris-HCl (pH 7.5) 50mL, 2% (w/v) gelatine 5 mLを含む)で懸濁し、等量のクロロホルムを加えて攪拌後、水中で5時間程度静置した。これを遠心分離15,000×g、15分間でPEG6000を分離させ、上層を回収し、これを濃縮試料とした。

試薬は、培地には0.5% (w/v) ラクトースを添加したM17 broth (Oxoid) またはM 17 broth acc. to TERZAGHI (Merck) (以下M17培地)を用い、そのほかの一般試薬は、和光純薬工業製または関東化学製を用いた。

### 2. 試験に供した乳酸菌

ファージを感染させる乳酸菌宿主菌株には、*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (以下*Lc.cremoris*) 当所保有菌株#04103株、#04104株、#04105株、IFO3427株、およびH-61株 ((公財)日本乳業技術協会)、*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (以下*Lc.lactis*) JCM5805株、527株 ((公財)日本乳業技術協会)、NM1016-51株、およびC-2株 (北海道大学)、*Lc.cremoris* と*Lc.lactis*を主体に構成される市販スターターCHN19 (クリスチャンハンセン) から単離した菌株7株 (CHN19-6, 7, 27, 23, 2, 3, 38, 9)、および*Lc.cremoris*で構成される1980年代に市販されたスターター菌株から単離した#5627株、#5633B2株 (よつ葉乳業から分譲)を用いた。CHN19からの菌株単離した各株は、長島らの方法<sup>5)</sup>で16S rRNA遺伝子の塩基配列をNCBIデータベースで相同性検索することにより、菌種名を推定した。

乳酸菌の増幅培養にはM17培地 (液体培地)を用いた。寒天培地は、寒天粉末を1.5% (w/v) 含むM17培地の

平板を用いた。また、重層する軟寒天培地は、M17培地にアガロースMEを0.5% (w/v) 添加したのものを用いた。

### 3. ファージ感染試験

試料中のファージ有無の確認には、ブランクアッセイ法を用いた。これには、酪農学園大学獣医学類および東京工業大学大学院生命理工学院で行われている緑膿菌および大腸菌に感染するファージをターゲットとする方法を準用した。乳酸菌ファージでは増殖にカルシウムイオンを要求することから<sup>6), 7)</sup>、本研究では、補助成分として重層する軟寒天培地に塩化カルシウムを添加することとし、平板培地に重層する軟寒天培地に対し、10mM前後となることを目安にCaCl<sub>2</sub>を加えた。

感染ホストとなる乳酸菌は、M17培地の液体培地に1白金耳接種し、30℃で一夜培養した。遠心分離1,200×g、3分間で集菌し、同種類の液体培地に再懸濁して濃縮するか、そのままの菌液を宿主菌液とした。ファージの有無を試験する試料90μLと宿主菌液90μLに1.0M CaCl<sub>2</sub> 40μLを混合し数分静置した後、47-48℃に保温した0.375% (w/v) 軟寒天培地4mLと混合させ、平板培地に重層した。軟寒天が固化した後、宿主菌株の生育至適温度 (30℃) で嫌気ジャーを用いて一夜培養し (生育が明確に確認できない場合はさらに一夜培養し)、平板上に現れる宿主菌株が生育しなかった部分 (ブランク)を確認することで、ファージの有無を判定した。

### 4. ファージ同定

ブランクを確認した平板培地は、軟寒天ごとファージを回収し、簡易精製した。ブランクを形成した平板上に少量のSM bufferを添加し、室温で静置した後に、滅菌コンラージ棒を用いて軟寒天を掻き取った。これをホモジナイズした後に、等量のクロロホルムを加えて混和し、遠心分離1,700×g、15分間行い、上清を回収した。

次いで、ファージを大量回収することを目的に増幅させた。回収ファージ液100μLと一夜培養した宿主菌液100μLに1.0M CaCl<sub>2</sub> 40μLを混合し、液体培地10mLに添加し、震盪させながら30℃で一夜培養した。培養液は遠心分離1,700×g、15分間行い、上清に等量のクロロホルムを加えて混和後、再度遠心分離1,700×g、15分間行い、上清を回収した。

増幅したファージ液は、平板培地上でスポットテストを行い、回収を確認した。一夜培養した宿主菌液100μLと1.0M CaCl<sub>2</sub> 40μLを混合し、軟寒天培地4mLと混合させ、M17平板培地に重層した。軟寒天が固化した後、ファージ液6μLをスポット状に載せ、浸透させた後に、宿主菌株の生育至適温度 (30℃) で一夜嫌気培養し、

平板上に現れるプラークを確認した。

得られたファージは、透過型電子顕微鏡 (HT7700, 日立ハイテクノロジーズ) で形態を観察した。親水化処理後のグリッドにファージ液を10 μL載せて、3分間静置した。PBS(-)で洗浄した後、2%酢酸ウランを一滴載せて10秒程静置した後に、グリッドを乾燥させて観察した。条件は、加速電圧75~80kVとした。

実験結果および考察

1. チーズホエイ中のファージ探索

ファージを検索するチーズホエイ試料Aから試料Rまでの合計16サンプルは、ファージをPEG6000に吸着させることで、約140~200倍に濃縮した。

ファージを感染させる宿主とする乳酸菌として、*Lc.cremoris*を主体とするチーズ用市販スターター CHN19

を市販株の代表株とするため、M17寒天培地で展開することで単菌40株を釣菌した。釣菌した40株は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列から、7割以上(29株)が*Lc.cremoris*であると推定され、そのうち8割(23株)が同じ菌株UC509.9で構成され、*Lc.cremoris*は少なくとも5種類が混合されていると推定された(表1)。この中から、*Lc.cremoris* 7株(CHN19-6, 7, 27, 23, 2, 3, 38)および*Lc.lactis* 1株(CHN19-9)を選択した。

CHN19から高頻度に分離された*Lc.cremoris*菌株(UC509.9)のうち、CHN19-6を宿主菌株に試料濃縮液に含まれるファージを探索したところ、小さいプラークと見受けられるスポットを約50個検出した。しかし、これらスポットの回収液は、元の菌株を溶菌せず、この菌株に対するファージは、いずれの濃縮液からも検出されなかった(表2)。

CHN19から低頻度に分離された*Lc.cremoris*菌株(Mast\_29)

表1 市販スターターCHN19から単離した乳酸菌40株の菌種・株名

16S rRNA遺伝子塩基配列から推定された菌種・株名	株数	実験上の整理番号
<i>Lc.cremoris</i> UC509.9	23	CHN19-6, -11, -12, ほか
<i>Lc.cremoris</i> Mast_29	3	CHN19-7, -27, -38
<i>Lc.cremoris</i> KW2	1	CNH19-23
<i>Lc.cremoris</i> mast_36	1	CHN19-2
<i>Lc.cremoris</i> TUB/2013/1-1	1	CHN19-3
<i>Lc.lactis</i> A12	9	CHN19-8, -9, ほか
undefined	2	

表2 各乳酸菌株に対するチーズホエイのプラークアッセイ結果

	菌 株									JC M58 08	NM 105 6-1	C-2	041 03	041 04	041 05	IFO 34 27	H- 61	56 27	56 33 B2
	CHN19																		
	19-6	19-7	19-27	19-23	19-2	19-3	19-38	19-9											
試料 A	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
B	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
D	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
E	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
F	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
G	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
H	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
J	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
K	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
L	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
M	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
N	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	1
P	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Q	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

表中の菌株 *Lc.cremoris* : CHN19-6, 19-7, 19-27, 19-23, 19-2, 19-3, 19-38, 04103, 04104, 04105, IFO3427, H-61, 5627, 5633B2, *Lc.lactis* : CHN19-9, JCM5808, 527, NM1056-1, C-2. (-)は検出されなかったことを、「1」は検出されたことを示す。

の3菌株CHN19-7, CHN19-27およびCHN19-38を宿主菌株にして、ホエイから回収したサンプル濃縮液に含まれるファージを検出したところ、20個程度の小さいプラークとみられるスポットを検出した。スポットからファージを回収し、再度、元の菌株と混合培養した結果、元の菌株を溶菌せず、この菌株に対するファージは、いずれの濃縮液からも検出されなかった(表2)。なお、5つのスポット回収液は、不定形に菌株の生育抜けを生じさせたため、当初、ファージ感染によるものと推定したが、繰り返し試験の結果、ファージ感染による明確なプラークではなかったことから、試料中にわずかに残存したPEG等の成分が影響したものと推察した。

同様にCHN19から低頻度に分離された*Lc.cremoris*のCHN19-23 (KW2), CHN19-2 (mast\_36), CHN19-3 (TUB/2013/1-1) および*Lc.lactis*のCHN19-9 (A12)を宿主菌株にして試験を実施したが、小さいプラークとみられるスポットは確認されたものの、ファージ感染による明確なプラークではなく、これらの菌株に対するファージは、いずれの濃縮液からも検出されなかった(表2)。

このほか、当所が保有している*Lc.cremoris* #04103株, #04104株, #04105株, IFO3427株, およびH-61株に対しても、いずれのチーズホエイ濃縮サンプルは、全くプラークを形成せず、これら保有株に感染するファージは検出されなかった(表2)。

しかし、よつ葉乳業(株)から分譲された*Lc.cremoris* #5627株, および#5633B2株を宿主菌株とした場合では、#5627株に対してはいずれの試料からもファージを確認できなかったが、#5633B2株に対しては試料Hと試料

Pが明瞭なプラークを形成し(図1), ファージ感染が濃厚と考えられた。

一方,*Lc.cremoris*近縁種の*Lc.lactis* JCM5805株, 527株, NM1016-51株, およびC-2株に対して、チーズホエイから得た試料濃縮液16サンプルのプラークアッセイを行った結果、プラークは確認できず、いずれの試料にも保有株に感染するファージが存在しないと結論した(表2)。

プラークを確認した平板培地から回収したファージ試料を、新たに宿主菌株と混合培養してファージを増幅させ、スポットテストを行ったところ、増幅前ファージ液に比べて強いプラークを形成したため(図2), 試料Hと試料Pにはファージが存在していると結論した(表2)。

プラークアッセイの結果,*Lc.cremoris* #5633B2株に対してプラーク形成した試料Hと試料Pについては、プラークを回収後、増幅させた前述のファージ液を、透過型電子顕微鏡で観察した。被験試料としたファージ液は、精製や濃縮を行えなかったため、夾雑物が多く含まれ、確認できた試料中のファージの数も多くはなかったが、幾つかのファージについての形態が明瞭に観察できた。また、試料Hと試料Pから得られたファージはほぼ同一の大きさおよび形態であることが明らかになった(図3)。

## 2. 検出されたファージについて

特定の乳酸菌を食品製造で利用する上では、何らかのファージ感染対策が必要である。ファージは、乳酸菌などの細菌にのみ感染し増殖するウイルスである。これまで当所では、細菌に関する試験研究は実施されているが、ファージについて取扱われていなかった。

本研究は、食品製造のスターターとする乳酸菌の

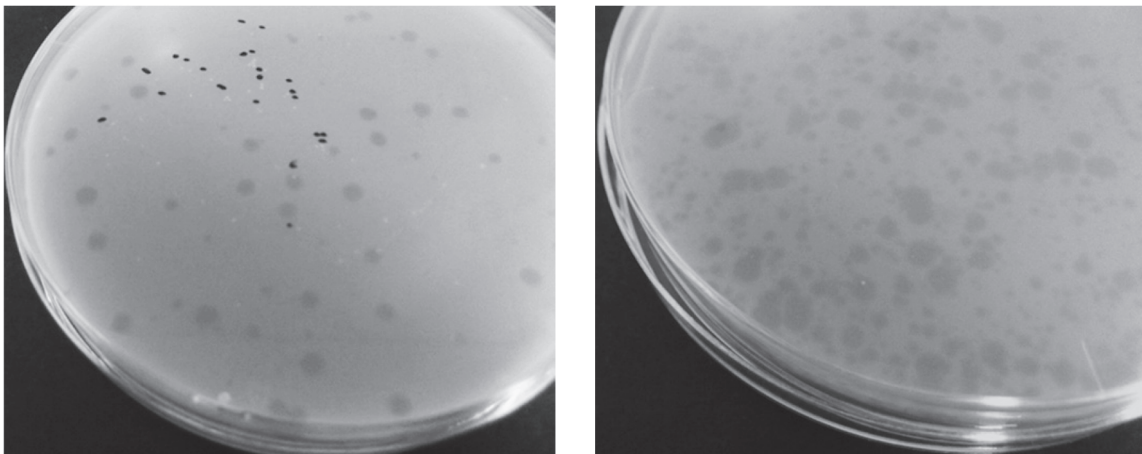


図1 プラーク形成した培地 (a) 試料 H, (b) 試料 P (宿主菌株: *Lc.cremoris* #5633B2 株)



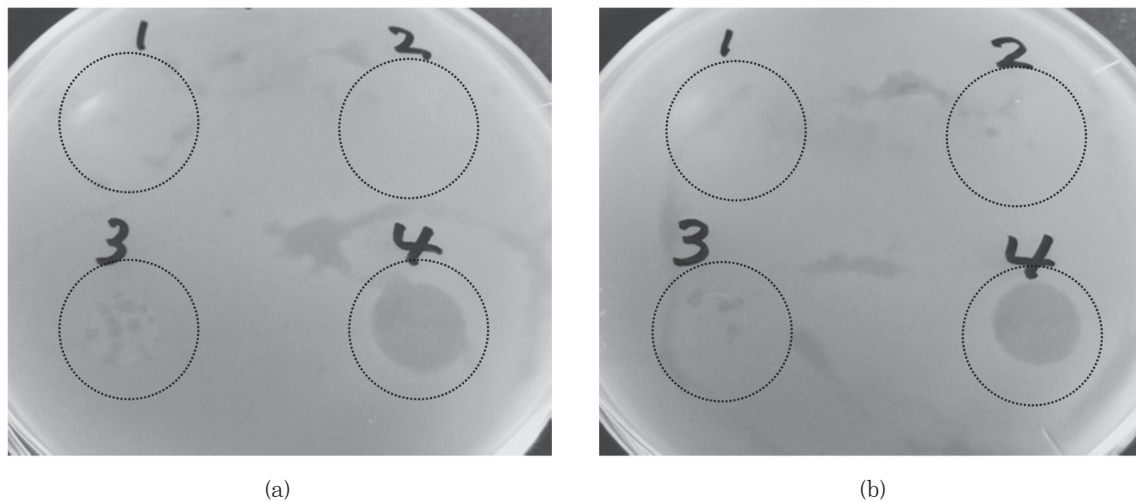


図2 ファージ液のスポットテスト (滴下部分を○で示した)

(a) 試料H, (b) 試料P (宿主菌株は*Lc.cremoris*株#5633B2株)

1 : SM buffer (対照)

2 : プラーク形成平板から回収したファージ液

3 : 2のファージ液を平板上で再感染させたプラークを回収したファージ液

4 : 2のファージ液を宿主菌株懸濁液で増幅培養し回収したファージ液

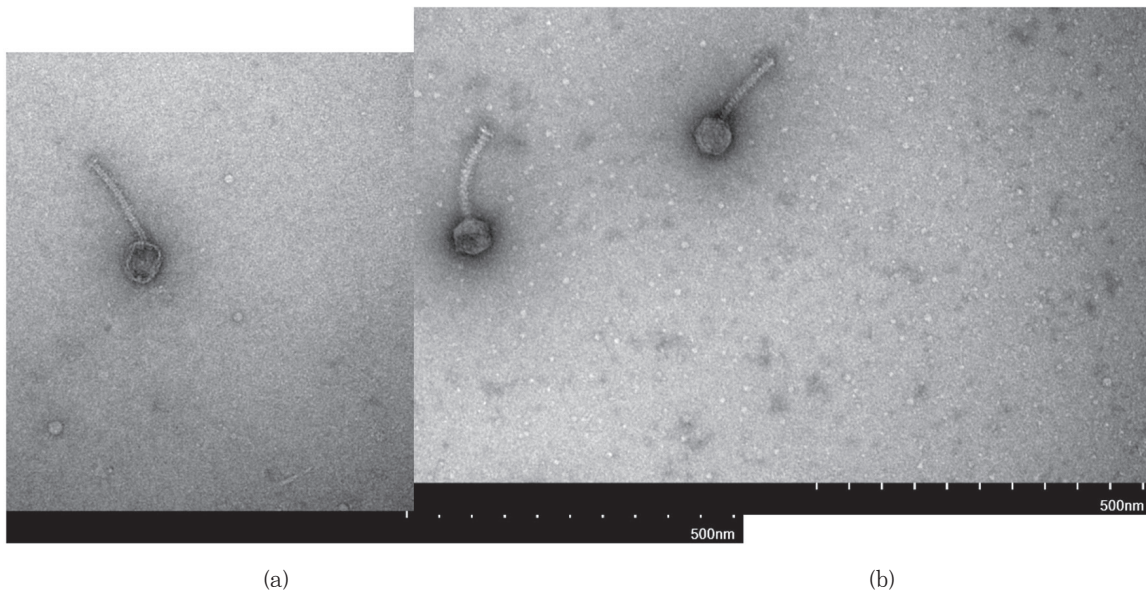


図3 電子顕微鏡による回収ファージ写真 (宿主株*Lc.cremoris* #5633B2株, (a)試料H, (b)試料P)

ファージ感染対策に活用することを将来展望に想定したものであるが、はじめに所内でこれまで整備されていなかったファージ取扱いの試験環境を整え、所外からファージ検出技術を導入し、その上で、道内の乳酸菌ファージ感染状況を把握することとした。

酪農学園大学岩野研究室と東京工業大学大学院丹治研究室の方法を参照し、乳酸菌を用いたファージ試験が可能になるように改良して試験法を決定した。この手法を用いて、道内中小チーズ工房で製造時に排出されるホエイから、

*Lc.cremoris* #5633B2株に感染するファージを検出した(表2)。検出できたことは、改良した試験法の実用性が確認できたものと考えられた。

ファージ検出時に感染宿主となった乳酸菌*Lc.cremoris* #5633B2株は、1980年代に市販された海外産スターターから単離した菌株である<sup>7)</sup>。しかし、今回検出した#5633B2株に感染するファージは、近年販売されている(2016年のカタログ掲載)海外産スターターCHN19から得た*Lc.cremoris*には感染しなかった。なお、#5633B2株に感染するファ-

ジが含まれた試料Hと試料Pは、同一工場から採取したチーズホエイであるが、採取時期が半年近く異なるサンプルであった。

試料としたほとんどのチーズホエイからファージは検出できず、ファージ検出例でも過去に販売されていたスターター菌株のみに感染し、現行製品の市販スターター菌株には感染しなかったことは、現時点におけるファージ汚染事故リスクは今回の調査の範囲内では小さいことを示すと考えられる。しかし、同一工場で採取時期の異なる2つの試料からファージが確認できたことは、使用スターターにファージが共存している可能性や、ファージが半年以上も生産現場に常在している可能性もあり、ファージの存在には製造環境中に複数の要因があるものと考えられた。本研究では明らかな問題点の指摘に及ばなかったが、ファージ検出技術の有用性はあるものと考えられた。

検出されたファージは、電子顕微鏡観察の結果（図3）、頭部は長細くない20面体で、尾部は細長い形態と推定できた。この形態観察の結果からSiphoviridaeに属するファージであると推定した<sup>8)</sup>。生産現場から分離される*Lactococcus*属乳酸菌に感染するファージはSiphoviridae B1タイプがほとんどであるとされており<sup>8)</sup>、今回検出されたファージも形態からこのB1タイプの可能性が考えられた。ファージの詳細な分類、および2つのファージの差異の検討は出来なかったものの、形態上の特徴から同じファージが、採取時期の異なる同一工場試料から検出されたと推定した。同工場から製造に問題が生じている報告はないものの、発酵不良事故を未然に防ぐためには、特定のファージ残存を避けるために使用スターターを定期的に変更することや、自社で管理する継代菌株の管理や設備の衛生管理を強化することなどによって、製造環境中に特定の菌株を長期に残存させない対策も必要と考えられた。

ファージ感染および抵抗性菌株の出現は、醤油製造や納豆製造においても問題であり、有用な菌株に対しては生産現場由来のファージを用いた耐性株の取得などが行われている<sup>9), 10)</sup>。また、抵抗性菌株がファージと宿主菌株の混合培養でわずかに生じることが近年のファージ研究会などで報告されている<sup>11), 12)</sup>。本研究では、試験に供した乳酸菌株と検出したファージが、元来感染しない菌株とファージの組み合わせであったことも考えられるが、これらファージに対する抵抗性菌株である可能性もある。これらのことについては、試料Hや試料Pから分離したファージと混合培養を繰り返し継代することで、抵抗

性菌株に関する新たな知見が得られるものと考えられた。

総括すると本研究では、1) 乳酸菌ファージを検出する手法を導入し決定できたこと、2) 道内チーズ製造事業者のチーズホエイをサンプルにファージを実態調査した結果からは、ファージ汚染事故リスクが小さいと見積もられるが、更なる調査も必要であること、3) 分離したファージは*Lactococcus*属乳酸菌に感染するSiphoviridae属ファージと推定されることを明らかにした。一部の事業者で連続してファージが検出されたことから、今後の発酵不良事故の際などに、決定した試験方法がファージ汚染を検証する手法となり得るものと考えている。

## 要 約

- 1) ファージを検出する手法を所外から導入し、生育が遅い乳酸菌を用いたファージ試験が可能になるように改良した。乳酸菌ファージが要求するカルシウムイオンを添加し、軟寒天の重層方法について検討を加え、改良した試験法を決定して、所内で実施可能とした。
- 2) 道内乳製品製造企業で排出されるチーズホエイの各種試料から、市販スターター乳酸菌に対するファージを検索した結果、チーズホエイ2試料から*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*に感染するファージを検出した（表2）。検出できたことから、改良した試験法の実用性が検証できたものと判断した。
- 3) 検出したファージは、電子顕微鏡観察の結果から2試料中のファージともにSiphoviridaeに属するファージであるとみられ、*Lactococcus*属乳酸菌に感染する典型的なファージSiphoviridae B1タイプと推定された（図3）。
- 4) 検出したファージに感染する乳酸菌は過去にチーズ製造に利用されていた菌株であり、現在流通されるスターター菌株や保有している乳酸菌株に感染しなかったことから、今回の調査の範囲内では現状の製造現場においてファージ感染が喫緊の危害リスクとなっている証拠は得られなかった（表2）。
- 5) 試料Hと試料Pは、同一工場から採取したチーズホエイであり、一つの事業者から連続してファージが検出されたことから、ファージ感染の危害発生には個々の製造現場特有の状況が影響する可能性が示唆された。
- 6) 本知見は今後、乳製品製造現場でチーズやヨーグルトの発酵不良事故が起きた際のファージ汚染を検証する原因究明に役立つことが期待される。

本研究を行うにあたり、酪農学園大学獣医学類 岩野英知教授、酪農学園大学食と健康学類 岩崎智仁准教授、

東京工業大学大学院生命理工学院 丹治保典教授、および、よつ葉乳業株式会社 元島英雅技術顧問より多くの御協力を賜った。ここに深甚なる感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) 肖金忠ら (2000). ヨーグルト製造工場における乳酸菌ファージの発生およびその制御. 日本乳酸菌学会誌, **11**, 16.
- 2) 緒方靖哉ら (2000). 発酵生産プロセスにおけるバクテリオファージ汚染の防御. ウイルス, **50**, 17-26.
- 3) Yasunori Tanji, et. al.,(2008). Spontaneous deletion of 209-kilobase-pair gene fragment from the *Escherichia coli* genome occurs with acquisition of resistance to an assortment of infectious phages, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4256-4263.
- 4) Aidan J. Synnott, et. al., Isolation from Sewage Influent and Characterization of Novel *Staphylococcus aureus* Bacteriophages with Wide Host Ranges and Potent Lytic Capabilities, *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4483-4490.
- 5) 長島浩二ら (1998). 塩基配列に基づく細菌同定法の食品マイクロフローラ解析への応用. 日本食品科学工学会誌, **45**, 58-65.
- 6) B.del Rio, et al.(2007). Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophage in milk. *Food Microbiol.*, **24**, 75-81.
- 7) 元島英雅 (よつ葉乳業中央研究所). 私信 (2016).
- 8) 日本乳酸菌学会編 (2010). 「乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス」, 京都大学学術出版会. p.431-446.
- 9) 樋口猛ら (2001). 乳酸菌のアスパラギン酸脱炭酸. *Jap. J. Lactic Acid Bacteria* (日本乳酸菌学会誌), **12**. 14-20.
- 10) 永井利郎 (2011). 納豆菌バクテリオファージのタイピングと特性調査. 微生物遺伝資源探索収集調査報告書 (微探収報, 農研機構), **24**. 99-104.
- 11) 丹治保典 (2016). ファージセラピーの可能性と問題点. 第6回ファージ研究会. o-8.
- 12) A.J.Synnott, et al.(2009). Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage with wide host ranges and potent lytic capabilities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 4483-4490.