

」からビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオの検出を行った。APWで増菌しクロモアガービブリオ培地を用いてMPN3本法による定量法で行った。分離株の血清型別やPFGE解析を行った。また、当該食品を実験的に作製しビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオの生存試験を行った。

(4) 腸炎ビブリオについては魚類での汚染制御の方法

腸炎ビブリオの魚類における部位別定量のために、東京湾において魚類を採取し、滅菌済みの解剖用具を使い部位ごとにクロモアガービブリオ培地にて腸炎ビブリオの分離を行った。また、PCRにて腸炎ビブリオのtoxR遺伝子による計測も行った。

アサリの浄化の検討のために、蓄養を水温約20℃に保った人工海水で行った。菌数の測定はAPWで増菌しクロモアガービブリオ培地を用いたMPN法で測定し、蓄養前後におけるビブリオ属細菌数の変化を観察した。

C. 結果

(1) ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討

これまでに報告されている検出方法について吟味した結果、本研究での検討方法としては、ビブリオ属菌によく使われているAPWを増菌培地として用いることにし、増菌温度を35及び25℃に設定し比較した。また、分離選択培地については腸炎ビブリオで近年多く用いられている酵素基質培地を採用した。自然汚染検体における方法の比較の結果、増菌培養温度において25℃

と35℃を比較すると、分離培養法では65%以上、PCR法では75%以上の検体において、35℃は25℃と同等もしくはより優れていた。さらに、分離培養法とPCR法の検出率の比較をすると、25℃増菌では約90%、35℃増菌では約88%の検体において、PCR法は分離培養法と同等もしくはより優れていた。増菌培養温度において30℃と35℃を比較すると分離培養法での検出結果では、59.1%の検体において35℃が30℃よりも優れており、分離培養法およびPCR法の両方法において84.1%の検体において、35℃は30℃と同等もしくはより優れていた。さらに、分離培養法とPCR法の検出率の比較をすると、30℃増菌では約93.2%、35℃増菌では約91.0%の検体において、PCR法は分離培養法と同等もしくはより優れていた。さらに、一部検体(10検体)において定量PCR法を検討した。その結果、10検体中2検体においては、ほぼMPN培養液をPCR法にて検出した値と合致した。しかし、他は10から1,000倍近く定量PCR法の方が高い値を示した。また、分離培養法では、MPN培養液をPCR法にて検出した値よりもさらに低い値であった。

また、海水検体からのビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオの検出ではビブリオ・バルニフィカスは、7月の検体では培養法で検出されたが、8月以降の検体ではリアルタイムPCR法では検出されたにもかかわらず、培養法ではほとんど検出されなかった。このリアルタイムPCR法で得られたビブリオ・バルニフィカスの菌数はビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオ以

外のその他の菌の菌数の約 1/100 であった。また、腸炎ビブリオは、ビブリオ・バルニフィカスとは異なり、いずれの検体も培養法で測定でき、多くの検体でリアルタイム PCR 法と近い定量値であった。さらに、増菌前の検体でのその他の菌は、7月の検体よりも8月以降の検体で 10~100 倍高い菌数であった。また、APW による増菌は 10~16 時間が最適であることがわかった。

(2) 海水、魚介類、水鳥などにおけるビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオの汚染

魚介類からのビブリオ・バルニフィカス検出率を PCR 法について地域を比較すると、東北では低かったが関東以南では検出限界以下であることは少なく多くの検体から検出された。関東以南では、どの地域でも約半数以上から検出された。特に、東京ほか関東周辺以外の地域では 100 MPN/10g 以上の検体が 25~44%であることが認められた。さらに、熊本では 1,000,000 MPN/10g 以上の検体が 22.2%も認められた。以上の傾向は培養法を用いた検出結果においても同様であった。

九州地域での定点で海水中のビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオの詳細な季節消長のデータを得ることができた。降水量、海水水温、海水塩分、DO、ビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオ菌数と相関が認められた。さらに、静岡県内ではアサリ及びアオヤギ各 1 検体計 2 検体 (2.6%) から TDH 産生腸炎ビブリオが検出され、20 検体 (26.3%) の魚介類からビブリオ・バルニフィカスが検出され、その汚染菌量は 0.36/g から 2,000/g で、

特に二枚貝であるアサリやアオヤギからは高頻度に検出された。海水からの腸炎ビブリオ (非病原株) とビブリオ・バルニフィカスの検出においては、採水定点による差が見られた。また両菌の検出にはほぼ同様の傾向があり、これらの検出と海水温には関連性が認められた。さらに、熊本県での雑食性水鳥 345 検体中ビブリオ・バルニフィカスが検出されたのは 84 検体 (24.3%)、腸炎ビブリオは 240 検体 (69.6%) であった。一方、植物質が主食の水鳥 22 検体ではビブリオ・バルニフィカス 0 検体 (0%)、腸炎ビブリオは 2 検体 (9.1%) であった。ウミネコ及びセグロカモメ群 245 検体中ビブリオ・バルニフィカスが検出されたのは 83 検体 (33.9%)、腸炎ビブリオは 181 検体 (73.9%)、ユリカモメ群 100 検体中ビブリオ・バルニフィカス 1 検体 (1.0%)、腸炎ビブリオ 58 検体 (58.0%) であった。植物質が主食の水鳥群ではマガモ 9 検体中 2 検体から腸炎ビブリオが検出されたのみであった。周辺海水では、ビブリオ・バルニフィカスは 1~3 月と 11~12 月に不検出の時期があったが、腸炎ビブリオは 1 月の一回を除いて調査した全ての月で陽性であった。

(3) ビブリオ・バルニフィカス感染症発生にともなう原因食材からの菌分離と細菌学的検討

感染症原因食材である塩分濃度 17% の「アナジャコ醤油漬け」から高い数値のビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオを検出した。しかし、分離したビブリオ・バルニフィカス株と臨床由来株との PFGE による解析では泳動パターンは一致しなかった。また、

「アナジャコ醤油漬け」に関するビブリオ・バルニフィカス及び腸炎ビブリオの生存試験では4℃条件でそれぞれ48～96時間までの生存を確認した。

(4) 腸炎ビブリオについては魚類での汚染制御の方法

蓄養前後におけるアサリの浄化では、アサリ検体採取日に試験を開始した場合、アサリの活動が自然の状態と近く、TDH 遺伝子が検出された2検体はともに蓄養後 TDH 遺伝子が検出されなくなった。また、腸炎ビブリオの魚類における部位別定量では、全検体の体表において腸炎ビブリオは検出されなかった。検体のそれぞれの部位の腸炎ビブリオ検出率は鰓では6/30 (25%)、消化管では14/30 (47%)であった。定量ができた検体の腸炎ビブリオ定量値は、鰓では2.5～4.1 log cfu/g (2.8～5.7 log cfu/尾)であった。消化管では1.4～4.1 log cfu/g (1.7～4.7 log cfu/尾)であった。

D. 考察

(1) ビブリオ・バルニフィカスの検査法の検討

増菌については、APW を使用し培養温度35℃が妥当であった。しかし、25または30℃の方がビブリオ・バルニフィカスが分離されやすい検体もあった。詳細に APW にて35℃で増菌し分離する方法を検討した結果、腸炎ビブリオには適しているが、ビブリオ・バルニフィカスが培養法で検出されない場合もあり、腸炎ビブリオやその他の菌の菌数が高いことによる増菌培地中での増殖の抑制、また分離平板培地での選択的コロニー形成の不足が考えられた。

これらことから全ての検体に必ず最も適していることではないことを理解した上で増菌条件として使用することが良いと考える。現時点では、リアルタイム PCR 法などの遺伝子検出法を取り入れることによって正確に菌数を把握できると考えられた。しかし、一部検体では PCR の阻害があったことが考えられ、検体の成分などが酵素反応を抑制することが一般に知られているため、PCR 法だけで検出することは間違った結果を生じる可能性もあり、分離培養法の併用が望ましいと思われた。また、遺伝子検出では死菌も検出してしまうため、分離培養法よりも高い値になることが考えられる。

(2) 海水、魚介類、水鳥などにおけるビブリオ・バルニフィカスと腸炎ビブリオの汚染

地域による魚介類の汚染の差異については、 10^6 を超える高い汚染菌数を示す検体は熊本県で認められた。それら検体は7月に採取された二枚貝であったが、同時期に採取された他地域の二枚貝においては高い菌数が認められず、ビブリオ・バルニフィカス生息環境の地域的な特徴があった。これは患者の発生率と魚介類の汚染率に関連が有ることを示している。また一方で、患者の発生が少ない地域においても汚染率は認められるため、患者の発生には食生活等の生活習慣など他の要因が影響していることが考えられた。また、海水温とビブリオ・バルニフィカスの関係は、菌分離で15.5℃を下限とし、PCR で14℃を下限とし、検出されなかった。塩分とビブリオ・バルニフィカスの関係は、菌分離で28‰を上限とし、PCR

で32%を上限とし、検出されなかった。また、海水温、塩分と本菌の関係は、海水温で正の相関、塩分濃度で負の相関が推察され、降雨量も深くかかわっていることが改めて確認された。しかし、ひとつの環境要因だけでなく、様々な要因が重なって菌数が変化していることが推測された。

水鳥の感染については、周辺海水が定性試験でビブリオ陰性であった場合も全て腸炎ビブリオが水鳥糞便から検出されたのに比べ、ビブリオ・バルニフィカスは9~11月に限られていたことから、腸炎ビブリオに比べて水鳥の消化管を通過しにくい傾向が示唆された。干潮時に干潟等で捕食した魚介類（カニやシャコ等甲殻類や魚類）を介してビブリオ・バルニフィカスや腸炎ビブリオを摂取し、排泄していることが推察された。また、植物が主食のマガモ、ユリカモメ、コガモでは、マガモ2検体からのみ腸炎ビブリオが検出された。このことから、海藻や海草に付着する菌量は魚介類に比べて少ないことが推測された。

(3) ビブリオ・バルニフィカス感染症発生にともなう原因食材からの菌分離と細菌学的検討

原因食材である「アナジャコ醤油漬」調味料部の塩分濃度は17%であり、生存が難しいと考えられるにもかかわらず、高い生菌数を示したことは、調理を行った初期の菌数が非常に高かったと考えられる。ビブリオ・バルニフィカスは冷蔵保存には弱く、高い菌数が僅かな時間で分離不能となる。しかし、発症原因食材を検査し始めたのは調理した5日後であり、35日後に再度

検査したが、まだビブリオ・バルニフィカスの分離は可能であった。これは、食材中のなんらかの条件が菌の生存にかかわっていることが考えられ、類似食品には注意を要することが示唆された。

(4) 腸炎ビブリオについては魚類での汚染制御の方法

魚類における部位別の腸炎ビブリオの定量実験を行った結果、腸炎ビブリオの検出率においては、鰓よりも消化管が高い検出率を示した。腸炎ビブリオ数に関しては、消化管において多く定量でき、消化管よりは少ないが鰓からも定量された。この要因の一つとして、供試した魚の食性が原因だと考えられる。本実験で供試した魚の食性は主にプランクトン食性である。腸炎ビブリオをはじめ海洋細菌は、プランクトンの殻に含まれる物質であるキチンに吸着しやすい性質を有するため腸炎ビブリオが付着したプランクトンを食することによって菌が内臓に多く含まれていると考えた。また、鰓に関しては、海中のプランクトンが鰓に蓄積したために、腸炎ビブリオが多く検出されたのではないかと考えられた。このことから魚類を調理する際には、消化管を含む内臓と鰓を完全に取り除くこと、また調理後の器具等を放置しないこと等で本菌の増殖を抑制することができると思われる。アサリの浄化試験では、新鮮な貝類では畜養により細菌数を減少する可能性があるものの、逆に弱った貝類では細菌数が増加する危険性があるものと思われた。今回の試験では、アサリの量に比べ圧倒的に多量の人工海水を使用し、紫外線により

殺菌しながら海水を循環していることから、実際の畜養条件と異なる点もあるものの、一度アサリから排出された細菌による再汚染の可能性は低く、アサリ体内から効果的に除菌する条件を検索するには有効な方法と考える。

E. 結論

ビブリオ・バルニフィカスの効果的な分離方法を確立するために、既存方法の中から優れていると思われる方法を基礎とし、温度や遺伝子検出を組み合わせて検討した。APW を使用し 35℃増菌が妥当であった。また、分離培地には酵素基質培地の使用が良いと思われた。しかし、遺伝子検出の方が分離培養法よりも検出率が高く定量 PCR 法も有用と思われた。今後さらに、増菌培地や分離培地など培地の種類、増菌温度の設定、定量 PCR の応用などについての検討が必要と考えるが、現時点では APW を使用し 35℃増菌液を遺伝子検出法と培養法を併用して検出することが最も確実であると考えられた。また、増菌時間は従来 18 時間培養では長すぎる事が判明し、増菌培養時間の短縮が必要であることがわかった。概ね 10 から 16 時間が妥当と考えられる。これらを総合して「ビブリオ・バルニフィカス感染症の原因食品および原因環境の検査について」別添としてまとめた。

国内の海域についての魚介類からビブリオ・バルニフィカスを検出したが、関東以南では検出率が高く、特に九州地域では環境に高菌数で生息するこ

とが判明した。ビブリオ・バルニフィカスと水温、塩分濃度、降雨量との関係を詳細に把握できたが、菌数は様々な条件が重なって増減していることが推測された。また、冬季でも水鳥が保有していることが明らかになった。また、ビブリオ・バルニフィカス感染症発生にともなう原因食材からの菌分離と細菌学的検討では、「アナジャコ醤油漬け」の汚染再現による菌の挙動が明らかになり、塩分が高いにもかかわらず菌が生残することが判明した。原因食として頻度が高い当該食品を中心に注意喚起が必要と考えられる。さらに、魚介類の調理時に内蔵やえらの取り扱いに注意する必要があることが、科学的に裏付けられた。また新鮮な貝類では畜養によって体内から効果的にビブリオを除菌する有効な方法と考えられる。

以上の研究から、ビブリオ・バルニフィカスや腸炎ビブリオが増殖した夏場の海水との接触やそれらの海水の汚染を受けた魚介類を生食することにより、夏場に感染が多発しているものと思われる。採取された魚介類は迅速に冷蔵保管及び冷蔵流通させる等の管理が必要である。ビブリオ・バルニフィカスについては、基礎疾患を抱える人が充分加熱して食べる等の予防策も有効である。保健所による魚介類販売業及び飲食店営業における生食用魚介類取り扱い施設の監視指導と衛生教育の機会を通してビブリオ・バルニフィカスおよび腸炎ビブリオに関する知識の普及や注意喚起がさらに望まれる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kamio, A., Hara-Kudo, Y., Miyasaka, J., Yahiro, T. and Konuma, H. Efficiency of real-time polymerase chain reaction assay to detect *Vibrio vulnificus* in seawater. 投稿中.

Yoneyama, N., Hara-Kudo, Y. and Kumagai, S. Effects of heat-degraded sugars on survival and growth of *Vibrio parahaemolyticus* and other bacteria. J. Food Prot. 70: 373-377, 2007.

Miyasaka, J., Yahiro, S., Arahira, Y., Tokunaga, H., Katsuki, K., and Hara-Kudo, Y. Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* from wild aquatic bird in Japan. Epidemiol. Infect. 134: 780-785, 2006.

Hara-Kudo, Y., Segawa, Y. and Kimura, K. Sanitation of seawater effluent from seaweed processing plants using a photo-catalytic TiO₂ oxidation. Chemosphere. 62: 149-154, 2006.

Koujitani, E., Horisaka, T., Nomura, Y., Hara-Kudo, Y., Okatani, T. A., Kumagai, S., Iwata, T. and Hayashidani, H. Immuno-magnetic separation and agar layer methods for the Isolation of freeze-injured *Yersinia enterocolitica* 0:8 from water. J. Vet. Med. Sci. 68: 195-199, 2006.

Takahashi, H., Iwade, Y., Konuma, H.,

and Hara-Kudo, Y. Development of a Quantitative Real-Time PCR Method for Estimation of the Total Number of *Vibrio parahaemolyticus* in Contaminated Foods. J. Food Prot. 68: 1083-1088, 2005.

Takahashi, H., Hara-Kudo, H., Miyasaka, J., Kumagai, S. and Konuma, H. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction targeted to the *toxR* for detection of *Vibrio vulnificus*. J. Microbiol. Method, 61: 77-85, 2005.

工藤由起子、三輪憲永、山崎省吾、八柳潤、岩出義人、高橋肇、宮坂次郎. 魚介類からの *Vibrio vulnificus* の定量検出方法の検討. 感染症学会誌. 79: 931-936, 2005.

2. 学会発表

神尾暁、八尋俊輔、宮坂次郎、瀬川優子、工藤由起子、小沼博隆. 環境海水中の *Vibrio vulnificus* の分離における増菌及び分離培養法の問題点について. *V. parahaemolyticus* シンポジウム. 平成 18 年 11 月. 東京. 宮坂次郎、八尋俊輔、中島龍一、工藤由起子. 水鳥糞便中の *Vibrio vulnificus* と *Vibrio parahaemolyticus* の検索. 日本獣医公衆衛生学会 (九州), 平成 18 年 10 月, 熊本.

山崎省吾、中村まき子、右田雄二、原健志、工藤由起子、三澤尚明、岡本嘉六、高瀬公三: 海水における *Vibrio vulnificus* の季節消長と環境因子, 日本獣医公衆衛生学会 (九州), 平成

- 18年10月、熊本。
- 田久保好慶、後藤元樹、工藤由起子、小沼博隆。リアルタイムPCR法を用いた魚介類における腸炎ビブリオの部位別分布とその定量。第141回日本獣医学会学術集会、平成18年3月、つくば。
- 瀬川優子、工藤由起子、木村邦夫。三次元微細セル構造磁器質光触媒フィルターによるノリ加工廃水の浄化。日本防菌防黴学会。平成17年5月、大阪。
- 山崎省吾、宮坂次郎、三輪憲永、岩出義人、八柳潤、高橋肇、工藤由起子。魚介類からの *Vibrio vulnificus* の定量検出方法の検討。日本食品衛生学会第91回学術講演会。平成17年10月、埼玉。
- 工藤由起子。腸管出血性大腸菌 O157 と腸炎ビブリオの食品汚染と制御について。平成17年度食品衛生監視員等研修会。平成17年6月。さいたま市。
- 高橋肇、小沼博隆、工藤由起子。生菌数の定量PCR。第25回日本食品微生物学会。平成17年11月。金沢。
- 小林愛子、近藤和雄、小西良子、工藤由起子。香草や薬味等に用いる植物葉等の抗菌作用について。日本食品衛生学会第89回学術講演会。平成17年5月。東京。
- 工藤由起子、山田加奈子、松寄洋輔、吉川邦衛、林谷秀樹、熊谷進。腸炎ビブリオの挙動解析に有用な指標菌の検索。日本食品衛生学会第87回学術講演会。平成16年5月、東京。
- 高橋肇、岩出義人、小沼博隆、工藤由起子。Real-Time PCR法を用いた *Vibrio parahaemolyticus* の定量法の確立。第24回日本食品微生物学会。平成16年9月、東京。
- 瀬川優子、工藤由起子、木村邦夫。光触媒を用いたノリ加工廃水の浄化・再生に関する研究。日本食品衛生学会第88回学術講演会。平成16年11月、広島。
- 高橋肇、宮坂次郎、工藤由起子、熊谷進、小沼博隆。ToxR 遺伝子を標的とした Real-Time PCR法による *Vibrio vulnificus* の定量法。日本食品衛生学会第88回学術講演会。平成16年11月、広島。
- 工藤由起子。海産物における腸炎ビブリオ汚染と制御。日本食品微生物学会学術セミナー。平成16年11月。静岡。
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)
特になし

別添

「ビブリオ・バルニフィカス感染症の原因食品および原因環境の検査について」

魚介類や海水を対象に検査を行う場合、増菌培養、分離培養および遺伝子検査法を組み合わせて行う（図1）。

1. 検体

食品、環境検体等の固形物においては25gを検体とする。また河川水、海水等の液体においては1リットル以上を濾過したメンブランフィルターまたは遠心した沈査を検体とする。

2. 増菌培養法

検体25gに対しては225ml、また液体検体においては15mlのアルカリ性ペプトン水を加える。ただし、そのまま検体とする場合は2倍濃度の培地を等量加えるものとする。35℃で培養するが、培養時間は18時間では菌が死滅する恐れがあるので10時間から16時間とする。

2. 分離培養法

酵素基質培地（クロモアガービブリオ寒天培地、X-VP寒天培地等）などの鑑別しやすい分離平板培地を使用する。各培地に生育したビブリオ・バルニフィカスの特徴的集落（図2）を分離し生化学性状およびビブリオ・バルニフィカス特異的遺伝子の検出によって同定を迅速に行う。分離培養は画線に加え増菌培養液の希釈液の塗抹も有効である。

3. 遺伝子検査法

増菌培養液をPCR法またはリアルタイムPCR法に供しビブリオ・バルニフィカス特異的遺伝子を検出することによって本菌の検出を迅速に行うことが可能である（表1）。

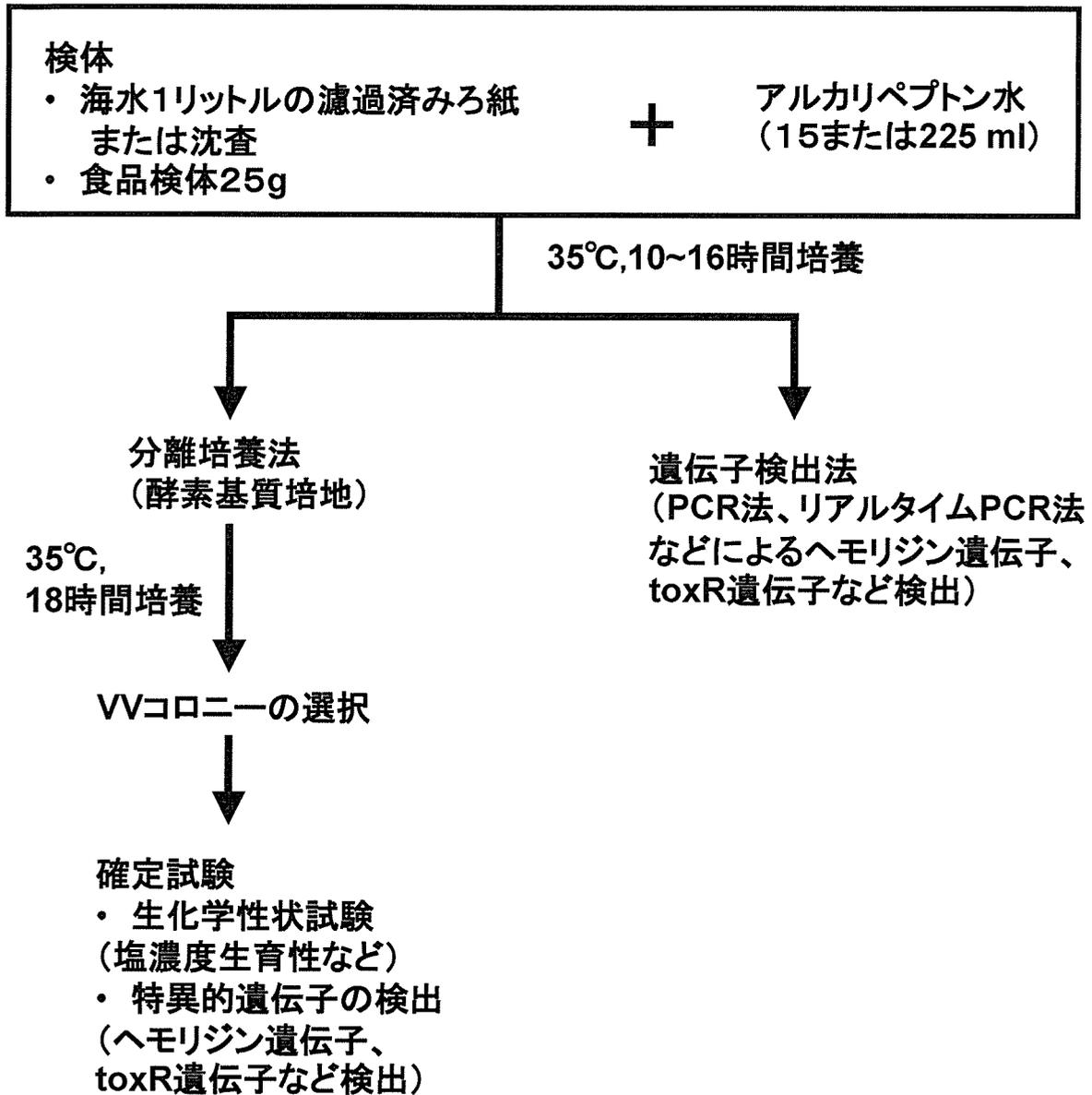
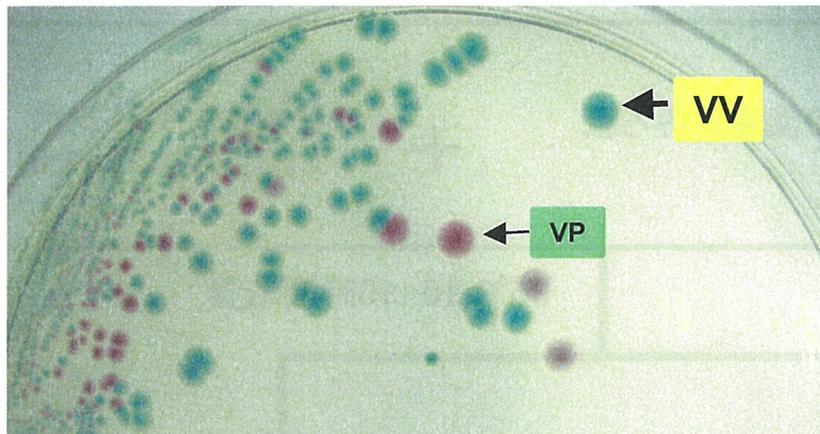


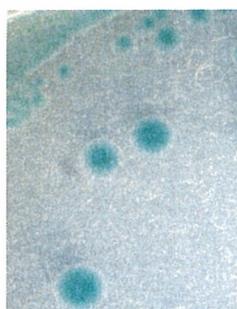
図1 ビブリオ・バルニフィカスの食品および環境検体からの検出方法のフローチャート

(a) クロモアガービブリオ寒天培地

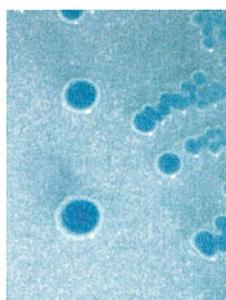


(参考) VP:
腸炎ビブリオ(藤色)

VV: ビブリオ・バルニフィカス(緑青色〜青色)
ただし、まれに白色コロニーを形成する株もある

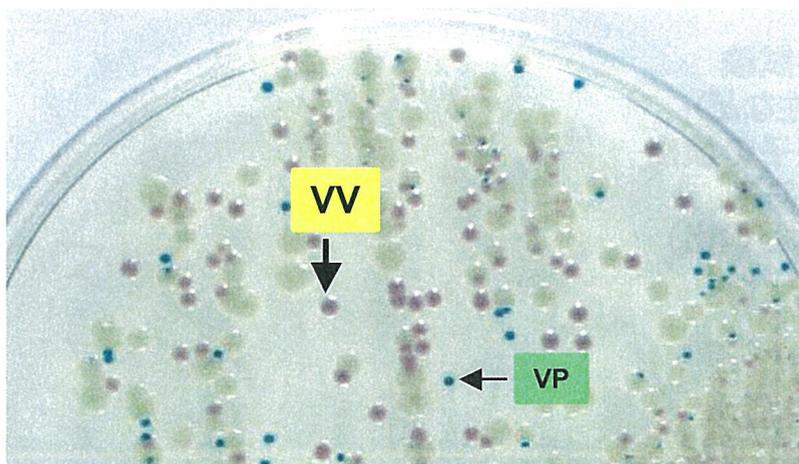


典型的コロニー
の拡大



白糖分解株のコロニー
(青色に白色の輪郭)の拡大

(b) X-VP寒天培地



VV: ビブリオ・バルニフィカス(藤色)
ただし、まれに白色コロニーを形成する株もある

(参考) VP: 腸炎ビブリオ(藤色)

図2 酵素基質培地でのビブリオ・バルニフィカスの生育コロニー
注) (a)と(b)では発色性が異なる

表1 ビブリオ・バルニフィカス特異的遺伝子の検出方法

表1-1 ビブリオ・バルニフィカス ヘモリジン遺伝子を対象としたPCR法

PCR 反応液組成	1 反応あたりの容量
10× ExTaq buffer	5 μl
dNTP mixture	4 μl
Primer vvh-1(10pmol/ul)	2.5 μl
Primer vvh-2(10pmol/ul)	2.5 μl
Ex Taq	0.25 μl
D. W.	30.75 μl
Template DNA	5 μl

(Primer) vvh-1: CCG GCG GTA CAG GTT GGC GC,
vvh-2:CGC CAC CCA CTT TCG GGC C

PCR 反応条件: 95°C 5 分後、95°C 1 分と 69°C 1 分を 35 回繰り返す (コロニーの試験の場合は 30 回でも可能)。

PCR 産物: 電気泳動にて 519bp のバンドを確認。

参考文献: Hill, W. E. et al. 1991. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. Appl. Environ. Microbiol. 57: 707-711.

表1-2 ビブリオ・バルニフィカス toxR 遺伝子を対象としたPCR法

PCR 反応液組成	1 反応あたりの容量
10× ExTaq buffer	5 μl
dNTP mixture	4 μl
Primer VVtoxR-1(10pmol/ul)	5 μl
Primer VVtoxR-2(10pmol/ul)	5 μl
Ex Taq	0.25 μl
D. W.	25.75 μl
Template DNA	5 μl

(Primer) VVtoxR-1: TGT TCG GTT GAG CGC ATT AA,
VVtoxR-2: GCT TCA GAA GCT GCG TCA TTC

PCR 反応条件: 95°C 5 分後、95°C 30 秒、60°C 30 秒、70°C 10 秒を 35 回繰り返す、72°C 4 分。

PCR 産物: 電気泳動にて 70 bp のバンドを確認。

参考文献: Takahashi, H. et al. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction targeted to the *toxR* for detection of *Vibrio vulnificus*. J. Microbiol. Method, 61:77-85, 2005.

表 1-3 ビブリオ・バルニフィカス *toxR* 遺伝子を対象としたリアルタイム PCR 法
(TaqMan PCR 法)

PCR 反応液組成	1 反応あたりの容量	
2×Master Mix	25	ml
Primer Tox-130 (9pmol/μl)	5	ml
Primer Tox-200 (9pmol/μl)	5	ml
Probe Tox-152 (2.5pmol/μl)	5	μl
D. W.	5	μl
Template DNA	5	μl

(Primer) Tox-130: TGT TCG GTT GAG CGC ATT AA,

Tox-200: GCT TCA GAA GCT GCG TCA TTC,

(Probe) Tox-152: CGC TCC TGT CAG ATT CAA CCA ACA ACG (FAM-TAMRA)

PCR 反応条件: 50°C 2 分、95°C10 分後、95°C15 秒と 60°C1 分を 40 回繰り返す。

PCR 産物: 蛍光値で検出 (参考までに大きさは 70 bp)。

参考文献: Takahashi, H. et al. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction targeted to the *toxR* for detection of *Vibrio vulnificus*. J. Microbiol. Method, 61:77-85, 2005.

総合研究（分担）報告書

鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

山本茂貴

細菌性食中毒の予防に関する研究

分担研究課題：鶏肉におけるカンピロバクター食中毒の予防に関する研究

分担研究者	山本 茂貴	国立医薬品食品衛生研究所
協力研究者	山崎 学	国立医薬品食品衛生研究所
	五十君 静信	国立医薬品食品衛生研究所
	宮原美知子	国立医薬品食品衛生研究所
	田口 真澄	大阪府立公衆衛生研究所
	久米田裕子	大阪府立公衆衛生研究所
	松根 涉	大阪府立公衆衛生研究所
	山崎 涉	大阪府立公衆衛生研究所
	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
	塚本 定三	大阪府立公衆衛生研究所
	齋藤志保子	秋田県衛生科学研究所
	小野 一晃	埼玉県衛生研究所
	甲斐 明美	東京都健康安全研究センター
	横山 敬子	東京都健康安全研究センター
	藤田 雅弘	群馬県衛生環境研究所
	平松 礼司	愛知県衛生研究所
	石村 勝之	広島市衛生研究所
	吉野谷 進	広島市衛生研究所
	下村 佳	広島市衛生研究所
	吉田 喜美	広島市衛生研究所
	国井 悦子	広島市衛生研究所
	谷口 正昭	広島市衛生研究所
	萱島 隆之	広島市衛生研究所
	笠間 良雄	広島市衛生研究所
	松本 勝	広島市衛生研究所
	荻野 武雄	広島市衛生研究所
	富田 正章	山口県環境保健研究センター
	八尋 俊輔	熊本県保健環境科学研究所
	中馬 猛久	鹿児島大学

研究要旨

平成16年度から18年度の3年間で以下の検討を行った。

リスクアセスメントモデルに関しては、

1. 16年度に鶏肉によるカンピロバクター食中毒の全体像を把握する目的でリスクプロフィールを作成した。
2. 18年度にカナダの定量的リスクアセスメントモデルを参考に、国内データを用いて、暴露リスクに影響する管理措置について定量的リスクアセスメントにより検討した。その結果、冷却水の塩素濃度を適正に維持することが最も暴露リスクを低減化した。
3. 17, 18年度に農場でのカンピロバクター保菌状況について検討した。カンピロバクターは鶏が主な保菌動物であり、農場段階で高率に保菌していた。
4. 16, 17年度に鶏肉からのカンピロバクター分離法の標準化を検討し、増菌培地としてPreston培地とBolton培地は同等の効力を持つこと、分離培地はCCDA培地よりButzler培地が検出率が良かったことが明らかとなった。気密性袋を使用した好気培養法は、

定性的には大量培養および MPN 法とも微好気培養法と同等の検出率がみられることから、本菌の培養検出に使用できると考えられた。

5. 16, 17 年度にコッコイド化した菌については、好気ストレスによってコッコイド化した本菌について、その菌体構成成分を解析した結果、ストレスによるこれら構成成分の著しい減少・崩壊は認められなかった。この結果はコッコイド化した菌ではストレスによる構成成分の障害・変性は最小限に抑えられていると考えられた。このことから、この形態の菌体が再び増殖能を回復する可能性を持つことが示唆された。

A. 研究目的

近年、細菌性食中毒の予防対策にはリスクアセスメントの手法を用いた科学的な知見が世界的に求められている。そこで、我が国においても、主要な細菌性食中毒の原因菌および食品を対象に、その汚染頻度や高汚染食品を把握するとともに食中毒の発生菌量を調べ、これらの結果をもとに我が国独自の微生物学的リスクアセスメントを試みる必要がある。

本研究では、世界的にも、また我が国においても発生件数が増加したカンピロバクター食中毒について、そのリスクプロファイルを行うとともに、汚染実態調査によりデータ収集し、定量的リスク評価を行うことを目的とする。また、本菌の食品や環境中での挙動について調べる。とくに、本菌の形態がらせん状から球状に変化（コッコイド化）した菌に着目する。この形態の菌体は人工培地での増殖能を欠いているが、再び元のらせん状桿菌に戻り増殖能を回復する可能性をもつことから、本菌の感染経路を考える上で重要な問題となっている。このことから、コッコイド化した菌について詳細に解析し、食中毒につながる汚染拡大や菌の伝播との関連性について知見を得ることを目的とする。本研究によって、カンピロバクター食中毒に関わる食品のリスクを明らかにし、その制御方法に関する科学的根拠を提供することが期待される。

16年度の研究においては、鶏肉によるカンピロバクター食中毒の全体像を把握するためのリスクプロファイルを作成した。また、コッコイド化した本菌の菌体構成成分について、本食中毒の主な原因菌種であるカンピロバクター・ジェジュニを用いて解析・検討することを目的とした。

17年度は気密性バックを用いた微好気培養法について検討した。また、コッコイド化した菌の mRNA の発現について検討した。さらに、農場でのカンピロバクター汚染実態を調査した。

18年度はカナダの定量的リスクアセスメントモデルを参考に日本のデータを用いて暴露リスクの推計を行った。また、農場でのカンピロ

バクター汚染実態について引き続き調査した。

B. 研究方法

1. リスクプロファイルの作成

リスクプロファイルの作成では、農場から消費に至る各段階での鶏のカンピロバクター保菌率及び菌数、鶏肉の汚染状況などの定量データについて、国内外の文献および衛生研究所及び食肉衛生検査所におけるデータを収集し、解析した。

2. 定量的リスクアセスメントモデル

カナダのリスクアセスメントモデルをレビューし、解析した。

日本のデータは発症菌量に関するデータが不足していることから、暴露リスクを中心にリスクアセスメントを行った。

ベースラインを推計し、その後予防対策を行った場合の効果を仮定して最終暴露リスクを推定した。

予防対策としては、冷却水の塩素濃度、農場における感染予防対策、消費者教育の実施（加熱調理の徹底、生食抑制）、すべての食中毒対策の実施として、対ベースラインケース 50%値を求めた。

3. 農場におけるカンピロバクター汚染実態調査

鹿児島県下のブロイラー飼育農場から食鳥処理場に搬入されたブロイラーの盲腸内容物をプレストンブロス、バツラー寒天培地でそれぞれ 42℃ 48 時間増菌選択培養し、常法に従い同定を行い、菌株を収集した。2週ごとに2農場2鶏群ずつ（1995年度：1鶏群5羽、2003年度から2005年度：1鶏群16羽）調査した。ナリジクス酸感受性はディスク法（30 μg）で調べた。

4. 鶏肉からの検出法の検討

鶏肉からの *Campylobacter jejuni* の検出法を検討するため、増菌培地として Preston 培地と Bolton 培地を分離培地として CCDA 培地と Butzler 培地を比較した。

気密性バックを用いて微好気培養の検討を行

った。

5. コッコイド化した菌の解析

コッコイド化した菌の解析では、供試菌株としてカンピロバクター・ジェジュニの患者由来株を用いた。コッコイド化した菌の調製は、これまでの我々の研究によって設定した培養法によって行った。すなわち、微好気条件下にて前培養した菌液を新鮮な培地に接種し、嫌気条件下にて1日処理した後、菌液を大気条件下に移し激しく振とう培養することで、菌に酸素によるストレス（好気ストレス）を与えた。好気ストレス後、経時的に培養液を採取し、寒天培地上での菌の増殖能を調べた。菌体のコッコイド化はDAPI染色またはカルボールフクシン染色後、直接鏡検法により確認した。また、培養液から菌体を回収し、その構成成分であるゲノムDNA、リボソームRNAおよびタンパク質について解析した。DNAはアガロース電気泳動法にて、RNAは抽出・精製後、2100 Bioanalyzer (Agilent)にて解析した。タンパク質はSDS-PAGE後、銀染色した。一方、微好気培養した後に好気ストレスを与えた菌（ストレスによるコッコイド化は起こらない）についても、その菌体構成成分を上記と同様に解析した。これによって得られた両者の結果を比較することで、コッコイド化した菌に特徴的にみとめられる特性について検討した。

C. 研究成果

1. リスクプロファイル

農場段階から消費段階に至る鶏におけるカンピロバクター感染および鶏肉の汚染に関する定量データについてデータの収集を行った。結果は、別添1に要約した。

2. 定量的リスクアセスメントモデル

カナダの定量的リスクアセスメントモデルに従い日本のデータを可能な限り適用して推計を行った。詳細については、別添資料に記載した。

ベースラインデータとして、日本は冷却水に塩素を添加しているが、適正な濃度が保たれていないと仮定した。その結果、冷却水中でのカンピロバクターの菌数変化（対数値）は、カナダのモデル同様に三角分布を適用し、Triang(-2.5, -1.28, -0.25)と推定された（別添2 図4-1）。

次に、農場における感染予防対策を実施した場合の推計は、対策の具体策については言及せず何らかの対策がとられたと仮定して、原稿の汚染率88.3%（農場での調査データによる）が75%、50%、25%、および10%に低下した場合を

想定して検討した。汚染率の分布はベータ分布に従うと考えられた（別添2 表4-1）。

また、消費者教育を実施した場合の暴露リスクの変化について検討するため、不十分な加熱調理を現状の50%程度に減少させた場合と生食の回数を月1回程度から年1回程度に減少した場合を仮定した。

暴露経路が不十分な加熱調理、生食、交差汚染のいずれかで起こる場合に、ベースラインの最大暴露量と最小暴露量の差がそれぞれ33オーダー、16オーダー、15オーダーと分布の幅が広いことから、暴露リスクには大きな不確実性と変動性があるといえる（別添2 表4-2）。

冷却段階における塩素濃度管理の徹底を図った場合、3種類いずれの経路による暴露リスクの50%値（別添2 表4-3）も36%低減していた。

農場における感染予防対策を実施した時の暴露リスクは、農場での汚染率が75%の場合94%に減少した。以下、汚染率が50%、25%、10%に減少した場合、暴露リスクはそれぞれ、78~79%、53~54%、約27%に低減した（別添2 表4-4）。

消費者教育として加熱調理を徹底した場合の不十分な加熱調理による暴露リスクは51%に低減していた（別添2 表4-5）。

また、生食の抑制はベースケースの約47%に低減していた（別添2 表4-6）。

4つの食中毒対策をすべて実施した場合、農場における汚染率が75%に減少した場合、不十分な加熱調理および生食による暴露リスクはベースケースに比べて、16~17%に減少し、交差汚染を通じた暴露リスクは34%に低減する。農場における汚染率が50%に減少した場合、不十分な加熱調理および生食による暴露リスクは13~14%に低減し、交差汚染を通じた暴露リスクは28%に低減する。農場における汚染率が25%に減少した場合、不十分な加熱調理および生食による暴露リスクは9~10%に低減し、交差汚染を通じた暴露リスクは19%に低減する。農場における汚染率が10%に減少した場合、不十分な加熱調理および生食による暴露リスクは5%に低減し、交差汚染を通じた暴露リスクは10%に低減する（別添2 表4-7）。

3. 農場におけるカンピロバクターの汚染実態調査

農場における汚染実態、ブロイラー個体における菌汚染実態を表1に示した。2003年度では45鶏群中26鶏群（57.8%）がカンピロバクター陽性を示したが2005年度では

4 4 鶏群中 9 鶏群 (20.5%) と減少傾向が認められた。分離された菌株のナリジクス酸耐性状況を表 2 に示した。2003 年度は 81 株中 33 株 (41.0%) が耐性を示し、2004 年度もほぼ同様な値を示したが、2005 年度は 36 株中耐性が 6 株 (16.7%) と減少を示した。2005 年度では耐性株はすべてカンピロバクター・ジェジュニでありカンピロバクター・コリはすべて感受性であった。

4. 鶏肉からの検出法の検討

Preston 培地と Bolton 培地ではほぼ同様の結果が得られた。分離培地は Butzler 培地が検出率が高かった。

5. コッコイド化した菌の解析

微好気培養または嫌気処理した後に好気ストレスを与えた結果、菌の CFU はともに検出限界以下にまで減少した (図 1)。このとき、微好気培養後にストレスを与えた菌では、コッコイド化した菌体の増加は確認されなかった。一方、嫌気処理後にストレスを与えた菌では、形状のコッコイド化の促進が認められた (全菌数に対しストレス 24 h 後で $47.0 \pm 6.8\%$ 、48 h 後で $89.7 \pm 3.6\%$)。この結果は、菌の増殖能は好気ストレスによって同様に低下するものの、ストレス前の培養条件をコントロールすることにより異なる形態の菌体 (らせん状とコッコイド) を調製できることを示す。このことから、培地上での増殖能を同様に失わせた状態で、らせん状の菌とコッコイド化した菌を比較することが可能であると考えられた。

まずストレス 24 時間後の菌体の DNA について解析した結果、微好気培養後にストレスを与えた場合、ゲノム DNA 量の著しい減少が確認された (図 2)。一方、嫌気処理後にストレスを与えた場合ではそのような減少は認められなかった。さらに、ストレス 48 時間後について、DNA と結合する色素 DAPI によって菌体内 DNA を染色し蛍光強度を測定した。その結果、微好気培養後にストレスを与えた菌体と比べて、嫌気処理後にストレスを与えコッコイド化させた菌体では蛍光強度は著しく低下しなかった (図 3)。

次に、好気ストレス 48 時間後の菌体から total RNA を抽出・精製した後、リボソーム RNA の検出を行った。その結果、微好気培養した後にストレスを与えた場合、16S および 23S リボソーム RNA は検出限界以下であった (図 4)。一方、嫌気処理後にストレスを与えてコッコイド化を促した菌では、両リボソーム RNA はまだ検出された (図 5)。

さらに、好気ストレス後の菌体のタンパク質

について、経時的に SDS-PAGE により解析した結果、微好気培養した後にストレスを与えた菌では、多くのタンパク質の減少・消失が確認された (図 6)。この減少・消失は菌の増殖能が急激に低下する時期とほぼ一致した (図 1)。一方、嫌気処理した後にストレスを与えた菌では、最終的には増殖能は検出限界以下にまで低下したにもかかわらず、タンパク質のそのような著しい減少・消失は確認されなかった (図 7)。

好気条件下では、カンピロバクター自身の酸化代謝の過程で活性酸素が菌体内に過剰に産生され、これによって菌体の構成成分は酸化障害を受けると考えられる。従って、以上の結果から、嫌気条件下にて生存した後に好気ストレスによってコッコイド化した菌では、微好気条件下にて生存した後にストレスを受けた菌に比べ、ストレスによる菌体構成成分の変性や減少・崩壊は最小限に抑えられていることが示唆される。さらに、このことがストレスによる形状のコッコイド化に強く影響していることが示唆された。

次にコッコイド化した菌の mRNA の発現について検討した。

前年度までの研究結果同様、嫌気処理後にストレスを与えた菌では、ストレス 24 時間後では、培養液中の菌の約 40% の菌体が、ストレス 48 時間後では、約 90% の菌体がコッコイド化し、菌体構成成分の障害・変性が最小限に抑えられていることを確認した。一方、微好気処理した後にストレスを与えた菌では、コッコイド化した菌体の増加は認められなかった。また、両者の寒天培地上でコロニー形成能は検出限界以下であり、増殖能は認められなかった。それぞれの培養液から菌体を回収し、以降の解析に用いた。

まずストレス 24 時間後の菌体の mRNA について解析した結果、微好気培養後にストレスを与えた場合、標的とした遺伝子 *gyrA* および *rrc* の mRNA の発現は検出限界以下であり、認められなかった (図 8)。一方、嫌気処理後にストレスを与えた場合では、発現量の減少は認められたものの、これらの mRNA が検出され、菌体内で両遺伝子の発現がまだ行われていることが確認された。さらに、ストレス 48 時間後の菌体の mRNA についても解析した結果、嫌気処理した後にストレスを与えた菌体では *rrc* の mRNA の発現が認められた (図 9)。以上の結果から、嫌気条件下にて生存した後に好気ストレスを受けた菌の中にはまだ遺伝子の発現を行っている菌体が存在していること示していると考えられた。

D. 考察

1. リスクプロファイルを作製することにより、食鳥肉の加工段階での定量的データが不足していること、食中毒発生時の発症率及び摂食菌数のデータが不足していることが明らかとなった。

2. 定量的リスクアセスメント

ベースケースにおける各暴露経路での暴露リスクを比較すると生食と交差汚染は不十分な加熱調理に比べて圧倒的に大きい。

冷却段階での塩素濃度管理は、すべての暴露経路に対して暴露リスクをベースケースの約36%に低減させるので、最も有効な食中毒対策であると考えられる。

農場における感染予防対策は暴露リスクを確実に低減化するがどのような対策をとればどこまで感染率を下げるかは不明である。冷却段階での塩素濃度管理と同等の効果を上げるためには、感染率を現行の88.3%から20%程度にまで大幅に引き下げなければならない。

消費者教育のうち生食の抑制は食文化の関係から効果が期待しにくい。加熱調理の徹底は時間がかかるが教育方法を検討し、中長期にわたり、継続的に実施する必要がある。

3. 農場におけるカンピロバクターの汚染実態調査

本調査では無作為に農場を選び材料の収集を実施しているが、年度ごとにそれぞれの陽性率ばらつきが生じた。年度ごとに大きな衛生管理方法の転換は実施されておらず、これらの値のばらつきが何らかの因子によるものなのかどうかは言及しがたい。疫学的解析にはさらに多数のサンプル確保が必要かもしれない。2006年度までの4年間では約半数の農場由来の盲腸内容からカンピロバクターが分離され、個別別では約13%の分離率であった。一方、農場に赴き総排泄腔スワブを採取し培養すると19農場中17農場がカンピロバクター陽性という結果になり、個別別でも77%と高率になった。このことから、調査材料の収集方法によっても菌の分離率が大きく影響されるものと考えられる。

4. 鶏肉からの検出法の検討

Bolton 培地は増菌の能力が高いことがあるが、同時に雑菌を増菌する場合があった。CCDA培地はコロニーの携帯になれる必要がある。

5. コッコイド化した菌の解析

微好気条件下にて増殖するカンピロバクターはらせん状桿菌であるが、生育に不利な環境になることでコッコイド化した菌体が現れる。この形態の菌体は人工培地での増殖能を欠いてい

るが、再びらせん状に戻り増殖能を回復する可能性をもつことが指摘されている。本菌は家禽や家畜などから高率に分離されており、この汚染の拡大には環境中に排泄された菌の水平伝播が原因であることが疑われている。それにもかかわらず、それらの飼育環境からの分離は困難である。このことから、培養困難なカンピロバクター、なかでもコッコイド化した菌体の関与が示唆されており、本菌の水平伝播、感染経路や制御方法を考える上で重要な問題となっている。しかしながら、現状ではコッコイド化したカンピロバクターの特性に関する科学的な知見は極めて少なく、この問題の解決には到底至っていない。本年度の研究から、コッコイド化した菌では、好気ストレスによる菌体構成成分の障害・変性は最小限に抑えられていることが示唆された。この結果から、コッコイド化した菌の中でも、比較的インタクトなDNAを保持しリボソームRNAをもつ菌体は、条件が整うことで、再びらせん状に戻り増殖能を回復する高い可能性を持つように思われる。また、このような菌の状態はコッコイド化した本菌の研究を行う上で望ましい状態であると考えられる。

今回用いたコッコイド化した菌の調製法は、カンピロバクターの生活環を反映していると考えられる。すなわち、自然界では、本菌は宿主の嫌気度の高い腸管内から糞便とともに好気的な環境中に排泄され、ここで好気ストレスを受けると考えられる。従って、実際の環境中においても、菌体構成成分を保持したままコッコイド化した菌が生存していると考えられる。このような菌が汚染拡大につながる水平伝播や感染に関与しているかもしれない。

E. 結論

1. リスクプロファイルを作成したが、食鳥肉加工段階、消費段階での菌数及び菌の増減に関する定量データが不足していた。
2. 定量的リスクアセスメントはこうじるべきリスク管理措置を把握する上で非常に有効であることが確認された。
3. プロイラー農場におけるカンピロバクターの流行要因には不明な点が多く、解析には適切な方法と十分なサンプル数が必要であろう。本調査ではカンピロバクター分離率、ナリジクス酸に対する耐性率の両者ともに高い値を維持しており、今後もモニターを続け、菌の流行や耐性獲得に関わる因子を解析していく必要がある。

4. 増菌培地は Preston 培地と Bolton 培地が同等の成績であり、検出培地として Butzler 培地が良かった。
5. 好気ストレス下でコッコイド化した菌体を調製し、その構成成分を解析した結果、コッコイド化した菌ではストレスによる菌体構成成分の著しい減少・崩壊は認められなかった。従って、これらコッコイド化した菌では、ストレスによる障害・変性は最小限にとどまっていると考えられる。このことはこの形態の菌体が再び増殖能を回復する可能性を持つことを示唆する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamasaki M, Igimi S, Katayama Y, Yamamoto S and Amano F. 2004. Identification and Characterization of an Oxidative Stress-Responsive Protein from *Campylobacter jejuni*, Homologous to Rubredoxin Oxidoreductase/Rubryerythrin. FEMS Microbiol. Letters. 235(1):57-63.
2. Yamasaki, M., Igimi, S., Katayama, Y., Yamamoto, S., and Amano, F. Effects of anaerobic preculture on aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni*. *Bioscience Microflora* 2003. 22, 21-25.
3. 国井悦子他：鶏肉のカンピロバクター培養検査法の検討-鶏肉の検査方法別検出感度および検出率の比較, 広島市衛生研究所年報, 24,49-54(2005)

2. 学会発表

1. 山崎学、天野富美夫、片山葉子、山本茂貴、五十君静信. 食中毒起因菌 *Campylobacter jejuni* の coccoid 化における酸素の影響. 第 20 回日本微生物生態学会総会. 2004 年 11 月 21-23 日. 仙台
2. 山崎学、長谷部保彦、北村和之、矢内原千鶴子、山本茂貴、五十君静信. *Campylobacter jejuni* 検出用抗体 : 31

kDa タンパク質に対するモノクローナル抗体の検討. 第 25 回日本食品微生物生態学会総会. 2004 年 9 月 28-29 日. 東京.

3. 山崎学、天野富美夫、山本茂貴、五十君静信. *Campylobacter jejuni* の 27 kDa タンパク質の好気ストレスに対する応答性. 第 77 回日本細菌学会総会. 2004 年 4 年 1-3 日. 大阪.
4. 山崎学、山本茂貴、五十君静信. カンピロバクターの酸素ストレスに対する応答性. 第 26 回日本食品微生物学会学術総会, 2005 年 11 月 10-11 日. 金沢.
5. Yamasaki, M., Amano, F., Kim, T.W., Yamamoto, S., and Igimi, S. Aerobic stress responses of *Campylobacter jejuni* precultured under anaerobic condition. The 13th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms (CHRO 2005). Gold Coast, Australia. September 2005.
6. 山崎学、天野富美夫、山本茂貴、五十君静信. *Campylobacter jejuni* の coccoid 化における酸素の影響. 第 78 回日本細菌学会総会, 2005 年 4 月 4-6 日. 東京.

G. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1) 特許取得 | なし |
| 2) 実用新案登録 | なし |
| 3) その他 | なし |

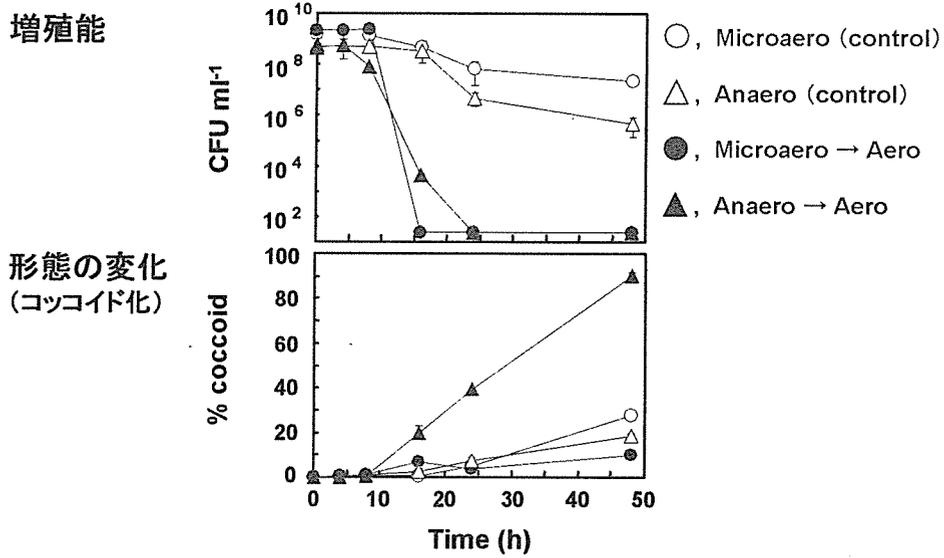


図1. 好気ストレスによるカンピロバクター・ジェジュニの増殖能の低下 (CFU) と形態の変化に及ぼすストレス前の嫌気処理 (▲) または微好気培養 (●) の影響. 白抜きシンボルはストレスを与えなかった各々のコントロールである.

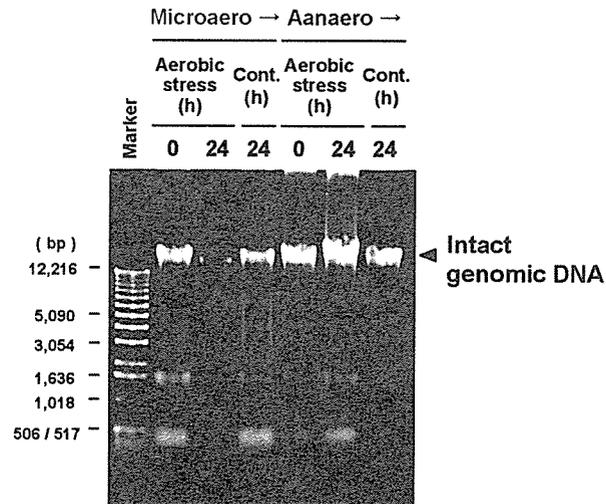


図2. 好気ストレス下のカンピロバクター・ジェジュニのゲノムDNAに及ぼすストレス前の嫌気処理または微好気培養の影響.