ノ ー ト

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 58, No. 11, pp. 1127~1129, 1984]

ラクリス・ラクボン菌(*Bacillus coagulans*) の血清学的特性

小玉健太郎, 内藤 敦
(三共株式会社醸酵研究所)

昭和 59 年 5 月 28 日 受理

Serological Specificity of the Strain Lacris-Lacbon (*Bacillus coagulans*)

Kentaro KODAMA and Atsushi NAITO
Fermentation Research Laboratories, Sankyo Co.,
Hiromachi 1-2-58, Shinagawa-ku, Tokyo 140

A simple and rapid procedure is reported for detection of Lacris-Lacbon (*Bacillus coagulans*) in animal feces by use of immunological specificity. The antiserum against Lacris-Lacbon reacted only with this strain and not with the other 19 strains of *Bacillus coagulans*. Moreover, the antiserum did not react with any of the 153 strains of acid-forming thermophilic bacteria which were isolated from animal feces with modified GYP medium at 55°C. This finding enables us to detect with ease the strain Lacris-Lacbon.

(Received May 28, 1984)

中山ら^(1,2)により緑麦芽から分離された *Bacillus coagulans* SANK 70258 はラクリス・ラクボン菌と称し、本菌の持つ生理的特性と製剤としての安定性により、整腸を主目的とした生菌製剤として市販されている。他方、ブタ、ウシ、ニワトリなど動物の下痢の予防や治療のほか、発育促進効果のあることもわかり、より安全性の高い動物薬として広く利用されている^(3,4)。

従来、ラクリス・ラクボン菌を投与した動物の腸管内、または糞からの本菌の検出法としては、好温性と生酸性を利用した BCP 添加寒天培地上の 55°C での培養、さらに出現したコロニーの形状と検鏡による細胞の形態観察とを組み合わせた一般的な手法が用いられてきた。この手法は非常に煩雑であり、正確さにおいてもやや欠ける点がある。したがって、ラクリス・ラクボン菌

を投与した動物の腸管内や糞中から分離される本菌と、その他の好温性生酸菌を簡便かつ正確に判別する方法の開発が望まれていた。

そこで、ラクリス・ラクボン菌とその他の好温性生酸菌との判別法を確立することを目的として、本菌の血清学的性状について検討した。その結果、ラクリス・ラクボン菌が血清学的特性を有することが明らかになったので報告する。

供試菌株とその培養法：供試菌株は Table I に示した *Bacillus coagulans* の 21 株である。ラクリス・ラクボン菌は中山ら^(1,2)により緑麦芽から分離され、*Bacillus coagulans* と同定され、当研究所保存番号 SANK 70258 とした菌株であり、SANK 70358 株はラクリス・ラクボン菌 (SANK 70258 株) が保存中に孢子形成能を失った変異株である。SANK 70158 株は Gibson と Gordon⁽⁵⁾ により *Bacillus coagulans* の標準株に指定されている。これらの菌株は、グルコース 10 g、ペプトン 5 g、酵母エキス 5 g、炭酸カルシウム 10 g、V.8 ジュース 100 ml、水 900 ml、寒天 15 g の組成を持つ培地 (以後、改変 GYP 培地と略称) を用いて 55°C で 36 時間培養した。

抗血清の調製：ラクリス・ラクボン菌を上記のようにして培養した後、集菌し、生理食塩水で 3 回洗浄、10 mg/ml 濃度の菌液として 75°C で 30 分間加熱殺菌した後、5°C に冷却保存したものを免疫原とした。

免疫は 3.5 kg のオス家兎に初回 0.5 ml 静脈内注射を行い、以後 2 日おきに各回 0.6 ml、0.8、1.2、1.8、2.0 ml と累計 6 回静注を行った。随時試験採血を行い、反応抗原濃度を 0.5 mg/ml とし、常法により抗体価を測定した。

凝集反応：改変 GYP 培地で 36 時間培養後、洗浄した供試菌 21 株と 0.25% 食塩水で 40 倍に希釈した抗血清とのスライド凝集反応を検べた。

動物の糞から分離される好温性生酸菌とラクリス・ラクボン菌の抗血清との反応：好温性生酸菌の分離に用いた動物の糞は、本菌無投与のブタ 16 頭、ウシ 2 頭、ヤギ 2 頭、ヒツジ 2 頭、ニワトリ 3 羽から採取した 25 点である。好温性生酸菌の分離は、自然排便 1.0 g を滅菌生理食塩水 9 ml に懸濁した後、10 倍段階希釈法で希釈し、改変 GYP 培地を用いて 55°C で行った。ラクリス・ラクボン菌の抗血清との反応は、寒天平板上に発現したコロニーのなかから生酸性を有するものを白金耳で鉤菌し、あらかじめスライドグラスに滴下しておいた血

Table I. Test Strains (*Bacillus coagulans*)

Strain	Strain
Strain Lacris-Lacbon (SANK 70258)	SANK 76058
SANK 70358 (Spore-less mutant of strain Lacris-Lacbon)	SANK 77958
SANK 70158 (ATCC Type strain of <i>B. coagulans</i>)	SANK 79058
SANK 70558	SANK 70159
SANK 71058	SANK 71159
SANK 71258	SANK 71959
SANK 71558	SANK 73159
SANK 72858	SANK 74159
SANK 73058	SANK 75159
SANK 74258	SANK 76159
SANK 75058	

Table II. Serological Reaction between Some of *B. coagulans* and Serum against Strain Lacris-Lacbon

Serological reaction			
Positive strain	Negative strain		
Strain Lacris-Lacbon	SANK 70158	SANK 70558	SANK 71058
SANK 70358	SANK 71258	SANK 71558	SANK 72858
	SANK 73058	SANK 74258	SANK 75058
	SANK 76058	SANK 77958	SANK 79058
	SANK 70159	SANK 71159	SANK 71959
	SANK 73159	SANK 74159	SANK 75159
	SANK 76159		

Table III. Samples for Isolating and Counts of Thermophilic Acid Forming Bacteria in Animal Feces (cells/g)

Kind of animal	Remarks	Counts	Kind of animal	Remarks	Counts
Piglet A	7 days-old	4.4×10^5	Piglet N	60 days-old	1.2×10^8
Piglet B	7 days-old	1.1×10^6	Pig O	90 days-old	0.3×10^3
Piglet C	7 days-old	0	Pig P	180 days-old	1.0×10^2
Piglet D	7 days-old	7.9×10^5	Calf		0
Piglet E	7 days-old	4.2×10^5	Cow		0
Piglet F	7 days-old	4.5×10^5	Hen A	Adult	1.0×10^2
Piglet G	9 days-old	0	Hen B	Adult	0
Piglet H	16 days-old	0	Hen C	Adult	0
Piglet I	20 days-old	2.0×10^5	Goat A	Young	0
Piglet J	20 days-old	0	Goat B	Adult	0
Piglet K	20 days-old	1.0×10^5	Lamb A		0
Piglet L	50 days-old	0.3×10^2	Lamb B		0
Piglet M	50 days-old	2.1×10^8			

清に直接懸濁する方法で凝集反応を試験した。

結果と考察：得られた抗血清の力価は 1:2048 であった。この抗血清を 40 倍に希釈した後、供試した *Bacillus coagulans* 21 株との間でスライド凝集反応を行った。その結果を Table II に示した。ラクリス・ラクボン菌の抗血清と凝集反応の陽性な菌株はラクリス・ラク

ボン菌とその孢子形成能欠損株 SANK 70358 の 2 株だけであり、*Bacillus coagulans* の標準株 SANK 70158 を含む他の 19 株では全く反応が見られなかった。したがって、ラクリス・ラクボン菌は血清学的特性を有し、しかもその特性は安定なものと考えられる。

好温性生酸菌の分離に供した本菌無投与の糞の種類と

Table IV. Serological Reaction between Thermophilic Acid Forming Bacteria and Serum against Strain Lacris-Lacbon

Sample	Assayed numbers	Serological reaction	
		Positive	Negative
Piglet A	18	0	18
Piglet B	15	0	15
Piglet D	23	0	23
Piglet E	12	0	12
Piglet F	10	0	10
Piglet I	11	0	11
Piglet K	12	0	12
Piglet L	1	0	1
Piglet M	32	0	32
Piglet N	12	0	12
Pig O	1	0	1
Pig P	3	0	3
Hen A	3	0	3
Total	153	0	153

1g 当りの好温性生酸菌数とを Table III に示した。最も多い仔ブタで好温性生酸菌は 1.1×10^6 個/g であり、約半数の試料からは全く分離されなかった。次いで寒天

平板上に出現した生酸性を有するコロニーから釣菌、ラクリス・ラクボン菌の抗血清とのスライド凝集反応を試みた。その結果を Table IV に示した。13 点の試料から分離、釣菌した生酸菌 153 株は、いずれも本菌の抗血清とは反応を示さなかった。したがって、分離、釣菌した生酸菌 153 株は、ラクリス・ラクボン菌と異なる好温性生酸菌であると判定できる。

これらのことから、これまで非常に煩雑であったラクリス・ラクボン菌を投与した動物の腸管内や糞中からの本菌の検出や菌数測定が、血清学的手法により、容易にかつ正確、迅速に行えるものと考えられる。

- (1) 中山大樹, 坂口謹一郎: 農化, **23**, 513(1950).
- (2) 中山大樹, 上野 学, 農化, **26**, 117 (1952).
- (3) T. Matsuzawa and Y. Suzuki: *Ann. Sankyo Res. Lab.*, **22**, 209 (1970).
- (4) 松沢利明, 岩藤誠吾, 北野訓敏, 鈴木善雄: 日家禽誌, **9**, 153 (1972).
- (5) T. Gibson and R. E. Gordon: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology," 8th ed., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1974, p. 540.