資 料

放射線滅菌における微生物試験法 (Ⅲ) —— BBL クリスタル GP 同定キットによる芽胞形成菌の 同定ソフトの開発——†

廣庭隆行, 山本陽子, 越川富比古

社団法人日本アイソトープ協会甲賀研究所
520-3403 滋賀県甲賀郡甲賀町鳥居野 121-19

Key Words : radiation sterilization, identification of spore-forming bacteria, identification software, bioburden, BBL CRYSTAL GP identification kit

1. はじめに

放射線抵抗性の強い菌は芽胞形成菌である。医療用具のバイオバーデンを構成する菌種として、芽胞形成菌が検出される頻度は高い。菌種が判明すれば、芽胞の放射線抵抗性の強弱が推定でき、更に滅菌線量設定時の検定試験の可否を推定することにも利用できる。

近年、従来よりも迅速に菌種を同定できる簡易同定キットとコンピュータ検索ソフトが開発され、同定が手軽に行える時代になった。しかし、環境由来菌に適用する場合、コンピュータ検索ソフトに問題点（病原菌を対象としたデータベースであり、環境菌に由来してない）がある。また、芽胞形成菌の菌種が少ない点も問題である。

ここでは、今までに得られた医療用具由来のバイオバーデン菌（芽胞形成菌）について、市

販されている同定キット（BBL クリスタル GP 同定システム：ベクトン・ディッキンソン（株）製）を用い、甲賀研究所で開発した芽胞形成菌（バシラス属）の検索ソフトを紹介する。

2. 芽胞形成菌の各基質に対する反応性の陽性確率を BBL クリスタル GP 同定検査キットにより求める手順の概略

BBL クリスタル GP 同定検査キット（以下 GP キットと略記）を用いた芽胞形成菌の各基質¹⁾に対する反応性の陽性確率を求める手順の概略を図 1 に示す。

最初に菌が分離（単離）されていることを位相差顕微鏡で観察し、芽胞形成菌であることを

図 1 BBL クリスタル GP 同定キットでの芽胞形成菌の各基質の陽性率及び陽性確率を求める手順の概略

† Microbiological Method for Radiation Sterilization (III)——Development of Identification Software of Spore-forming Bacteria by Using BBL CRYSTAL GP Identification Kit——. Takayuki HIRONIWA, Yoko YAMAMOTO and Tomihiko KOSHIKAWA : Koka Laboratory, Japan Radioisotope Association, 121-19, Toriino, Koka-cho, Koka-gun, Shiga Pref. 520-3403, Japan.

表1 BBL クリスタル GP 同定検査試薬の基質と原理¹⁾

パ ー 社 の 位 置	略 語	基 質	原 理
4-A	FCT	ネガティブコントロール	蛍光基質のコントロール
2-A	FGC	β -D-グルコシド	アミドあるいはグリコシド結合の酵素加水分解により、蛍光性クマリン誘導体が放出される。
1-A	FVA	バリン	
4-B	FPH	フェニルアラニン	
2-B	FGS	α -D-グルコシド	
1-B	FPY	ピログルタミン酸	
4-C	FTR	トリプトファン	
2-C	FAR	アルギニン-AMC	
1-C	FGA	N-アセチル- β -D-グルコサミニド	
4-D	FHO	リン酸	
2-D	FGN	β -D-グルクロニド	
1-D	FIS	イソロイシン	炭水化物の利用により、pHが下がり、指示薬（フェノールレッド）が変化する。
4-E	TRE	トレハロース	
2-E	LAC	ラクトース	
1-E	MAB	メチルグルコシド	
4-F	SUC	白糖	
2-F	MNT	マンニトール	
1-F	MTT	マルトトリオース	
4-G	ARA	アラビノース	
2-G	GLR	グリセロール	
1-G	FRU	フルクトース	
4-H	BGL	p-ニトロフェニル- β -D-グルコシド	無色のアリール置換グリコシドの酵素の加水分解により黄色のp-ニトロフェノールが放出される。
2-H	PCE	p-ニトロフェニル- β -D-セロビオシド	無色のアミド基質の酵素の加水分解により黄色のp-ニトロアニリドが放出される。
1-H	PLN	プロリン、ロイシン-p-ニトロアニリド	
4-I	PHO	p-ニトロフェニル-リン酸	無色のアリール置換グリコシドの酵素の加水分解により黄色のp-ニトロフェノールが放出される。
2-I	PAM	p-ニトロフェニル- α -D-マルトシド	
1-I	PGO	p-ニトロフェニル- β -D-ガラクトシド、p-ニトロフェニル- α -D-ガラクトシド	
4-J	URE	尿素	尿素的加水分解によりアンモニアがpH指示薬の色（プロモチモールブルー）を変化させる。
2-J	ESC	エスクリン	第二鉄イオンの存在下エスクリンの加水分解により、黒い沈殿物ができる。
1-J	ARG	アルギニン	アルギニンの使用によりpHが上がり、指示薬（プロモクレゾールパープル）の色が変化する。

確認する。一晚培養した菌をGPキットに接種し、菌濃度マックファーランド0.5に調整する。菌懸濁液を容器（ベース）に注ぎ、基質を付着させた蓋（リッド）をかぶせて、35～37℃で18～24時間培養する。培養後、オートリーダーでプロファイル番号を読み、30種類の基質¹⁾（表1）に対する反応性を調べた。

3. 30種類の基質に対する反応性での陽性確率及び検索ソフトの作成

環境菌由来の芽胞形成菌を筆者らが確立した7項目の生化学試験による簡易同定法²⁾（クエン酸試験，硝酸塩還元試験，デンプン水解試験，Voges-Proskauer（VP）試験，ゼラチン水解試

験, マンニット試験及びキシロース試験の結果パターンに基づく同定法)で同定した。この方法で同定された20菌種の菌株に対してGPキットでの30種類の基質に対する反応性を調べ、その陽性確率のデータベースを作成した。この結果を表2に示した。このデータベースを基に菌種の検索ソフトを作成した。検索ソフトの原理はCowan and Steel³⁾のコンピュータによる細菌の同定を参考にしたが、BBLが採用しているものとほぼ同等である。この計算手順を表3に示した。手順1は最初に未知菌での陽陰性結果に対してデータベースの各菌のそれぞれの基質の陽性確率に基づいて以下のように変換する。

- ① 未知菌が陽性であればそのまま陽性確率の値を用いる
- ② 陰性であれば(1-陽性確率)の値へと変換する

手順2では、算出した全ての陽性・陰性確率の値を各菌種ごとに掛け合わせ、データベース上の20菌種と未知菌との類似性(同定確率)の値を得る。この値は未知菌が類似している菌種に近いほど大きな値を示す。検索ソフトではこの値を大きい順に並べ替えて上位5位の菌種を表示させる。更に、同定された菌種と未知菌の各基質での陽陰性結果の相違を比較し、その相違数をエラー数として表し、信頼性の指標とした。このソフトはMicrosoft EXCELで作っており、(社)日本アイソトープ協会のホームページで公開する予定である。

4. 同定できる芽胞形成菌の菌種

同定できる菌種は以下の20菌種である。

- (1) *Bacillus subtilis*
- (2) *Bacillus pumilus*
- (3) *Bacillus licheniformis*
- (4) *Bacillus megaterium*
- (5) *Bacillus cereus*
- (6) *Bacillus badius*
- (7) *Bacillus firmus*

- (8) *Bacillus lentus*
- (9) *Bacillus coagulans*
- (10) *Bacillus freundenreichii*
- (11) *Bacillus circulans*
- (12) *Bacillus aneurinolyticus*
- (13) *Bacillus sphaericus*
- (14) *Paenibacillus alvei*
- (15) *Paenibacillus macerans*
- (16) *Paenibacillus polymyxa*
- (17) *Paenibacillus thiaminolyticus*
- (18) *Brevibacillus brevis*
- (19) *Brevibacillus laterosporus*
- (20) *Virgibacillus pantothenicus*

5. 同定手順の詳細

最初に菌が単一分離され、芽胞形成菌であることが判明しているものとする。

5.1 菌の培養

菌をソイビーンカゼインダイジェスト寒天平板培地(SCDA)に画線し、35～37℃で一晩(14～17時間)培養する。

[注意点]

- ① 菌の増殖が遅いものは培養時間を長くする
- ② 芽胞形成菌の場合、顕微鏡観察して菌の状態が栄養型細胞であることを確認する。芽胞形成期細胞、あるいは芽胞の状態の場合は、再度新しい培地に菌を接種して培養し、栄養型細胞を使用する

5.2 菌懸濁液の調製

- (1) 懸濁しやすい菌の場合

- ① 培養したコロニー(画線した最後の部分のコロニー)を白金線の先端で少量釣菌する
- ② BBLクリスタル ANR, GP, RGP, N/H 同定プロスの試験管の壁に菌を擦り、懸濁する
- ③ 次に試験管ミキサーで10秒間、3回攪拌する
- ④ 次にクリスタルスペック比濁計で濁度を測定する

表2 芽胞形成菌のBBLクリスタルGPでの各反応の陽性確率

菌 種	FCT	FGC	FVA	FPH	FGS	FPY	FTR	FAR	FGA
<i>B.megaterium</i>	0.0010	0.8800	0.0300	0.9000	0.9000	0.0010	0.9990	0.8700	0.6500
<i>B.cereus</i>	0.0010	0.9306	0.8542	0.9653	0.7847	0.9028	0.9097	0.7361	0.8958
<i>B.pumilus</i>	0.0010	0.9990	0.0010	0.9990	0.0556	0.0010	0.7222	0.2407	0.9990
<i>B.licheniformis</i>	0.0010	0.9800	0.0200	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.7700	0.9400
<i>B.subtilis</i>	0.0010	0.9903	0.0194	0.9709	0.9515	0.9990	0.5922	0.8738	0.9903
<i>B.brevis</i>	0.0010	0.9500	0.7600	0.9990	0.3800	0.9990	0.9990	0.8200	0.9990
<i>B.sphaericus</i>	0.0010	0.0010	0.4100	0.7000	0.0010	0.8500	0.6200	0.3500	0.0300
<i>B.circurans</i>	0.0010	0.9931	0.0010	0.9141	0.9622	0.5395	0.8935	0.7320	0.5361
<i>B.badius</i>	0.0010	0.0010	0.0010	0.9990	0.4200	0.0010	0.9990	0.5800	0.0010
<i>P.thiaminolyticus</i>	0.0010	0.9990	0.0010	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990
<i>V.pantothenticus</i>	0.0010	0.9990	0.0010	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990
<i>P.polymyxa</i>	0.0010	0.9990	0.0010	0.9000	0.5000	0.0010	0.5000	0.4200	0.9990
<i>B.laterosporus</i>	0.0010	0.9990	0.0010	0.0010	0.0010	0.9990	0.0010	0.0010	0.9990
<i>B.aneurinolyticus</i>	0.0010	0.0010	0.9990	0.9990	0.0010	0.7200	0.9990	0.8900	0.0010
<i>P.macerans</i>	0.0010	0.9990	0.0010	0.9990	0.9990	0.0010	0.9990	0.8000	0.9000
<i>B.firmus1</i>	0.0010	0.6400	0.0010	0.9990	0.9990	0.9990	0.9700	0.5600	0.9200
<i>B.lentus</i>	0.0010	0.9990	0.0010	0.9990	0.9990	0.6667	0.9990	0.9990	0.7778
<i>Palvei</i>	0.0010	0.9990	0.0010	0.9990	0.9990	0.4242	0.9990	0.7273	0.9697
<i>B.coagulans</i>	0.0010	0.5000	0.0010	0.9990	0.9400	0.9400	0.9400	0.7800	0.5000
<i>B.firmus 2</i>	0.0010	0.0010	0.2400	0.9990	0.0300	0.9990	0.9990	0.6800	0.0010
<i>B.firmus 3</i>	0.0010	0.6500	0.0010	0.9990	0.9990	0.0010	0.9600	0.9600	0.7400
<i>B.freundenreichii</i>	0.0010	0.0010	0.9990	0.9990	0.0010	0.0010	0.9990	0.9990	0.0010

FHO	FGN	FIS	TRE	LAC	MAB	SUC	MNT	MTT	ARA	GLR
0.6000	0.0010	0.0010	0.6600	0.0100	0.0500	0.9800	0.4800	0.4700	0.0800	0.5100
0.8958	0.0010	0.9236	0.8611	0.0010	0.0208	0.5069	0.0010	0.6319	0.0010	0.0278
0.9074	0.0010	0.0185	0.2593	0.0010	0.2222	0.5000	0.4630	0.0185	0.0010	0.8704
0.6000	0.0010	0.1000	0.6900	0.0400	0.3800	0.8800	0.5800	0.4200	0.1500	0.7100
0.8641	0.0010	0.0010	0.2039	0.0010	0.0097	0.4660	0.3107	0.1068	0.1456	0.5825
0.3800	0.0010	0.6000	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010
0.0300	0.0600	0.4000	0.0300	0.0300	0.0300	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010
0.1340	0.3814	0.0103	0.6873	0.5223	0.5430	0.7560	0.7320	0.6701	0.3849	0.6701
0.3700	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010
0.2000	0.0010	0.0010	0.9990	0.0010	0.9990	0.9990	0.0010	0.9990	0.0010	0.9990
0.9990	0.0010	0.0010	0.9990	0.0010	0.9990	0.9990	0.0010	0.9990	0.0010	0.0010
0.0010	0.0010	0.0010	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990
0.0010	0.0010	0.0010	0.9990	0.0010	0.0010	0.0010	0.3300	0.3300	0.0010	0.0010
0.4400	0.0010	0.7000	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010
0.0010	0.8000	0.0010	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990
0.2600	0.0010	0.0010	0.2600	0.0010	0.0010	0.2600	0.1600	0.2100	0.0010	0.0500
0.0010	0.8889	0.0010	0.1111	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010
0.4545	0.0010	0.0010	0.3030	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.7273	0.0010	0.4848
0.1100	0.0010	0.0010	0.7200	0.0010	0.3300	0.1100	0.5600	0.7200	0.8300	0.3900
0.3200	0.0010	0.6000	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010
0.5700	0.0010	0.0010	0.4300	0.0010	0.0010	0.1700	0.1300	0.1300	0.0010	0.3000
0.5600	0.0010	0.9990	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010

FRU	BGL	PCE	PLN	PHO	PAM	PGO	URE	ESC	ARG
0.6500	0.9500	0.4600	0.1200	0.9900	0.9990	0.9900	0.0010	0.8300	0.9300
0.6111	0.5208	0.1736	0.8264	0.9583	0.2708	0.0764	0.1181	0.9444	0.9931
0.5556	0.9990	0.9990	0.4074	0.9815	0.0010	0.9259	0.0185	0.9990	0.9444
0.6700	0.9400	0.8800	0.8500	0.9600	0.9600	0.6300	0.3100	0.9400	0.9990
0.2913	0.9223	0.7184	0.7087	0.9903	0.6117	0.8835	0.0291	0.6408	0.9990
0.0010	0.2200	0.0010	0.8400	0.6600	0.0800	0.0010	0.6400	0.8700	0.9990
0.0010	0.0010	0.0010	0.0900	0.5000	0.0010	0.0010	0.5300	0.0300	0.9990
0.6976	0.9828	0.9966	0.0447	0.6117	0.9450	0.9485	0.0206	0.9863	0.1753
0.0010	0.0010	0.0010	0.2100	0.2600	0.0010	0.0010	0.1600	0.0500	0.9990
0.9990	0.9990	0.9990	0.0010	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990	0.9990
0.0010	0.9990	0.9990	0.0010	0.9990	0.9990	0.0010	0.0010	0.9990	0.9990
0.9990	0.9990	0.9990	0.0010	0.9990	0.5000	0.9990	0.0010	0.9990	0.1700
0.9990	0.9990	0.9990	0.0010	0.6700	0.0010	0.0010	0.0010	0.9990	0.9990
0.0010	0.0010	0.0010	0.0600	0.3900	0.0010	0.0010	0.1100	0.0600	0.9990
0.9990	0.9990	0.9990	0.0010	0.1000	0.9990	0.9990	0.0010	0.9990	0.0010
0.1600	0.0500	0.0010	0.0700	0.9990	0.9800	0.0010	0.0010	0.0010	0.9990
0.0010	0.9990	0.9990	0.0010	0.6667	0.9990	0.8889	0.4444	0.9990	0.7778
0.0010	0.9990	0.9091	0.0010	0.9697	0.9990	0.6667	0.1515	0.9697	0.9697
0.9990	0.3300	0.0010	0.4400	0.7800	0.7800	0.6100	0.0010	0.5000	0.3300
0.0010	0.0010	0.0010	0.5000	0.4700	0.0010	0.0010	0.7400	0.0010	0.9990
0.4300	0.5700	0.0400	0.0900	0.9990	0.9990	0.0010	0.0010	0.2600	0.9990
0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.3300	0.0010	0.0010	0.8900	0.1100	0.9990

統計学的処理を行うため、陽性率が100%を0.9990、0%を0.0010とし、陽性率が例えば、63.33%の場合は0.6333と表示した。

表3 菌種検索ソフトでの計算手順

BBL クリスタル GP 同定検査キットで得られた芽胞形成菌の陽性確率データベース (表2の抜粋)

菌 種	基 質				
	FCT	FGC	FVA	FPH	
<i>B.megaterium</i>	0.0010	0.8800	0.0300	0.9000	
<i>B.cereus</i>	0.0010	0.9306	0.8542	0.9653	
<i>B.pumilus</i>	0.0010	0.9990	0.0010	0.9990	
.	.	.	.	.	
.	.	.	.	.	
.	.	.	.	.	

FCT は蛍光基質のコントロール値で 20 菌種すべて 0.0010 である

手順1 未知菌での基質の反応性

基 質	基質の反応性				
	FCT	FGC	FVA	FPH	
未知菌	-	+	-	+	

+: 陽性, -: 陰性

手順2 未知菌との類似性の算出

菌 種	基 質					類似性の算出	類似性
	FCT	FGC	FVA	FPH			
<i>B.megaterium</i>	1-0.0010 =0.9990	0.8800	1-0.0300 =0.9700	0.9000		$0.9990 \times 0.8800 \times 0.9700 \times 0.9000 \times \dots = 2.79806 \times 10^{-9}$	2.798×10^{-9}
<i>B.cereus</i>	1-0.0010 =0.9990	0.9306	1-0.8542 =0.1458	0.9653		$0.9990 \times 0.9306 \times 0.1458 \times 0.9653 \times \dots = 1.58278 \times 10^{-15}$	1.583×10^{-15}
<i>B.pumilus</i>	1-0.0010 =0.9990	0.9990	1-0.0010 =0.9990	0.9990		$0.9990 \times 0.9990 \times 0.9990 \times 0.9990 \times \dots = 1.43846 \times 10^{-3}$	0.0014×10^{-3}
.	.	.	.	.			
.	.	.	.	.			
.	.	.	.	.			

陽性の場合には陽性確率をそのまま用いる、陰性の場合には(1 - 陽性確率)の値を用いる

全てのデータベース上の菌種について同様に算出し、高い値を示した菌種ほど類似性がある

- ⑤ 菌の濁度がマックファーランド 0.5 近辺 (0.4 ~ 0.6) になるよう調整する。マックファーランド 0.4 以下の場合には、再度、同様の操作を行い、0.5 近辺になるよう調整する。菌の濁度が 0.6 以上の場合は、再度、菌懸濁液を調製するか、新しい懸濁液を加えて希釈して 0.5 近辺になるよう調整する

(2) 懸濁しにくい菌の場合^{①)}

懸濁しにくい菌の懸濁液を調製するには、乾

熱滅菌したガラスビーズ (直径: 2 mm) とパスツールピペット及び超音波発生装置が必要である。

- ① ガラスビーズ約 1 g を小試験管 (φ 12 mm × 75 mm) の中に入れ、アルミキャップを装着した後、乾熱滅菌する
- ② 培養したコロニー (画線した最後の部分のコロニー) を白金耳で多量にかきとる
- ③ BBL クリスタル ANR, GP, RGP, N/H 同定ブロスの試験管の中に移す

- ④ 次に乾熱滅菌したガラスビーズを試験管の中に加える
- ⑤ 試験管ミキサーで試験管を10秒間、3回攪拌する
- ⑥ 次に試験管を5分間超音波処理（28～50 kHz）し、5分間放置する
- ⑦ 試験管の上澄みを滅菌したパスツールピペットで吸い取り、新しいクリスタル ANR, GP, RGP, N/H 同定プロスの試験管の中に少量滴下し、クリスタルスベック比濁計で測定しながら、マックファーランド0.5 近辺（0.4～0.6）になるよう調整する

5.3 ベースへの菌懸濁液の注入

菌懸濁液をベースの注入口に注入する。ベースを傾けながら全ウェル（穴）の中に菌液を充填し、残液は注入口に戻す。

5.4 リッドの装着

リッドを袋から取り出す。リッドをベースの上に装着し、1分間静置する。次にリッドの表面を下に押す。リッドのラベルに菌株番号を記入し、パネル（測定試料）を反転させる。

5.5 培養

パネル（測定試料）を培養トレイに移す。リッドが包装されていた袋の中にプラスチックの容器があるので、脱脂綿を置き、水道水を注ぎ吸水させる。湿潤した脱脂綿の入ったプラスチックの容器1個を培養トレイの中に置き、測定試料を培養トレイに移す。培養トレイをチャック付きポリエチレン袋の中に入れ、チャックを閉じる。

測定試料を35～37℃の培養器で23時間（18～24時間）培養する。

5.6 BBL クリスタルオートリーダーでの結果の判定と菌名の検索

以下の手順で行う。

- ① クリスタルオートリーダーのスイッチを入

れ、10分間ウォーミングアップする。データベースを選ぶ（グラム陽性菌）

- ② クリスタルオートリーダーに測定試料（パネル）を設置する
- ③ コンピュータに入力する菌の形態は桿菌（棒状の形）を選ぶ
- ④ リーダー読み取りボタンを押す。リーダーが自動的に作動して結果を判定し、表示されたプロファイル番号を記録する。リーダーで読み取る場合、読み取り操作を数回行い、プロファイル番号を確認する

筆者らが作成した検索ソフトにプロファイル番号を入力することにより同定できる。図2に同定結果の例を示す。プロファイル番号が2454563653の場合、同定確率の高い順に菌名が表示され、確率100%、エラー数0で *Bacillus pumilus* と同定された。

しかしながら、コンピュータ同定結果はデータベース上にない菌に対してもその結果を判定し、データベース上にある20菌種の中で同定確率が一番近い菌名を検索するので注意が必要である。

6. 誤同定の場合の対応例

正しく同定されていない疑いがある場合、あるいは同定結果がはっきりとした結論を与えない場合には、以下の対応策を試す。

6.1 菌の再分離

正しく同定されない例としては、菌が単離されず、少量の他の菌が混在したコロニーを用いて試料を作成した場合が多い。このような場合には再度、菌を分離して試料を作り、再測定する。

6.2 培養時間の延長

増殖速度が遅い菌の場合、培養時間を延長する。例えば、菌濃度はマックファーランド0.5 近辺（0.4～0.6）とし、培養時間を35～37℃で23、30、48及び55時間と延長してプロファ

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	BBLキットを用いた同定ソフト	-4.0i-				2003/12/2	日本アイトープ協会	甲賀研究所			
2		-濁度マックファランド	0.5	にて-			研究開発・試験課	越川			
3								2002.11.1			
4	未知検体	1234567890									
5	プロファイル	2454563653									
6											
12	同定結果										
13		菌株	確率	エラー数	特徴						
14	1位	<i>B. pumilus</i>	100.00%	0	芽胞形成期細胞が膨化せず、芽胞が小さく楕円形						
15	2位	<i>B. circulans</i>	0.00%	0	芽胞形成期細胞の膨化は±、運動性があり、芽胞は楕円形またはリンダー型						
16	3位	<i>B. megaterium</i>	0.00%	1	栄養型細胞が大きく、芽胞形成期細胞が膨化せず、芽胞が楕円形あるいは球形に近い						
17	4位	<i>B. licheniformis</i>	0.00%	2	芽胞形成期細胞が膨化せず、芽胞が楕円形						
18	5位	<i>B. subtilis</i>	0.00%	1	コロニーが膜を張り、芽胞形成期細胞が膨化せず、芽胞が楕円形						
19		ここで表示された菌株名と確率はあくまで「データ」シートに入力された菌があるとして計算した確率です									

図2 芽胞形成菌での同定結果の例

イル番号を比較する。培養時間の延長によりプロファイル番号が異なってくることがある。得られた結果を基に菌名を判断する。

また、芽胞形成菌 (*Bacillus* 属) の一部の菌では、糖から酸の産生を指標とする反応の場合培養時間が長くなるにつれて、糖から酸を産生していた菌 (陽性) が、産生した酸を更に利用して陰性を示す場合もあるので注意する。

6.3 接種菌濃度の増加

接種菌濃度を増加させる。例えば、マックファランド 0.5 以外に 1 及び 2 の菌濃度の試料を作成して測定し (培養: 35 ~ 37 °C で 18 ~ 24 時間), プロファイル番号を比較する。菌濃度によりプロファイル番号が異なることがある。得られた結果を基に菌名を判断する。菌濃度が異なっても菌名が同じであるときは、信頼性が非常に高い。

6.4 コンピュータ検索結果の順位^{5)~6)}

コンピュータ検索結果では、通常、同定確率が高い順に菌名が表示される。1 番目に表示される菌名が同定結果となる可能性が非常に高いが、2 番目や 3 番目の菌名が同定結果となるこ

ともある。環境由来菌のコンピュータ検索結果で得られた各順番での同定率 (正答率) を表 4 に示した。

例えば, *B. sphaericus* (又は *B. firmus* 2) の場合, *B. sphaericus* と *B. firmus* 2 のプロファイル番号は類似しているため, 1 番目での同定率 (正答率) は他の菌種に比べ, 低く 73.5% であった。この 2 菌種では 2 番目の菌名が同定結果となる可能性が他の菌種よりも高かった。他の菌種でも 1 番目の菌名が同定結果となることが多いが, 2 番目の菌名が同定結果となる可能性のある菌種は *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. circulans* と *B. aneurinolyticus* で, その同定率 (正答率) は約 10% であった。更にわずかではあるが 3 番目の菌名が同定結果となる可能性のある菌種は *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. licheniformis* と *B. sphaericus* で, その同定率 (正答率) は約 2 ~ 6% であった。

菌名を決定するときはエラー数, コロニーの形態と顕微鏡観察の結果を考慮して判断する。

現在, 芽胞形成菌の図鑑を作成中である。この図鑑は菌名を決定する際, 同定ソフトによる結果を確認するための重要な手段になると思われる。

表4 芽胞形成菌のコンピュータ検索結果で得られた各順位での同定率（正答率）⁶⁾

菌 種	1 番目での同定率 (%)	2 番目での同定率 (%)	3 番目での同定率 (%)
<i>B.megaterium</i>	9 8.1	1.9	—
<i>B.cereus</i>	9 5.1	4.2	—
<i>B.pumilus</i>	1 0 0	—	—
<i>B.licheniformis</i>	8 3.3	8.4	6.2
<i>B.subtilis</i>	8 5.4	1 1.7	1.9
<i>B.brevis</i>	1 0 0	—	—
<i>B.sphaericus</i>	7 3.5	2 3.6	2.9
<i>B.circulans</i>	8 1.8	1 0.6	6.6
<i>B.badius</i>	1 0 0	—	—
<i>P.thiaminolyticus</i>	1 0 0	—	—
<i>V.pantothenicus</i>	1 0 0	—	—
<i>P.polymyxa</i>	1 0 0	—	—
<i>B.laterosporus</i>	1 0 0	—	—
<i>B.aneurinolyticus</i>	8 8.9	1 1.1	—
<i>P.macerans</i>	1 0 0	—	—
<i>B.firmus 1</i>	9 6.7	3.3	—
<i>B.firmus 2</i>	7 3.5	2 6.5	—
<i>B.firmus 3</i>	9 5.7	4.3	—
<i>B.lentus</i>	8 8.9	1 1.1	—
<i>P.alvei</i>	1 0 0	—	—
<i>B.coagulans</i>	1 0 0	—	—
<i>B.freundenreichii</i>	1 0 0	—	—

6・5 他の同定方法の適用

同定結果が間違っていると考えられる場合、又は同定結果を再確認する場合には、他の同定方法²⁾を用いて検討する。

菌を同定するに必要な一般的知識と操作技術を3回に分けて掲載した^{7), 8)}。従来は非常に煩雑な方法で同定していたが、簡易同定キットと検索ソフトにより、手軽に行うことができるようになった。本稿ではこれらの方法の詳細について紹介した。放射線滅菌では菌の同定により、放射線抵抗性の評価及び滅菌線量設定時の検定試験可否の推定に利用できる。

参 考 文 献

- 1) BD BBLCRYSTAL GP 同定検査試薬製品説明書、日本ベクトン・ディッキンソン(株)
- 2) 越川富比古, *RADIOISOTOPES*, **47**, 172-190(1998)
- 3) 坂崎利一 監訳, Cowan and Steel's 医学細菌同定の手引き(第3版), 202-206(1993)
- 4) 廣庭隆行, 山本陽子, 越川富比古, 日本防菌防黴学会第28回年次大会要旨集, **156**(2001)
- 5) 廣庭隆行, 山本陽子, 松島昌子, 越川富比古, 関口正之, 細瀬和成, 日本防菌防黴学会第29回年次大会要旨集, **116**(2002)
- 6) 廣庭隆行, 山本陽子, 松島昌子, 越川富比古, 関口正之, 細瀬和成, 日本防菌防黴学会第30回年次大会要旨集, **171**(2003)
- 7) 越川富比古, *RADIOISOTOPES*, **53**, 223-243(2004)
- 8) 越川富比古, *RADIOISOTOPES*, **53**, 317-329(2004)