芽胞を利用した抗生物質検出のための ディスク法の簡易化

(昭和 49 年 12 月 17 日受理)

矢野 信礼* 石井 徳蔵* 入江良三郎*

Modification of the Disk Assay Method for Detection of Antibiotics by Direct Seeding of Spores of *Bacillus stearothermophilus*

Nobuhiro YANO, Tokuzo ISHII and Ryozauro IRIE

(National Institute of Animal Industry: Aobacho, Chiba)

By means of direct inoculation of spores of the assay organism, *Bacillus stearothermophilus* var. *B. calidolactis* C953, a modification of the IDF standard method for the detection of antibiotics in milk and milk products was investigated. A new sporulation medium, composed of peptone 1%, polypepton 1%, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.004%, and agar 2%, was developed. High yield of spores of the assay organism was obtained on this medium. With crude or purified spore suspensions prepared from the agar plate cultures of the organism, the modified method was examined and it gave the same results to those obtained by the original IDF method, provided the spores were inoculated in the range of 2×10^7 to 5×10^7 in 1 ml of the disk plate agar. Spore suspensions could be prepared readily by usual means in the laboratory, and purification was not necessary. The spore suspensions could be preserved without any deterioration for 12 months at 5°C. It was enable us to shorten the time required for the assay of antibiotics in this modified method, since the time consuming steps of preparation of the seed cultures could be omitted.

(Received December 17, 1974)

牛乳中に含まれている抗生物質, 特にペニシリンの検出法として Galesloot ら¹⁾は高温性芽胞菌 *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 株を検定菌に用いるペーパーディスク法を考案した。その後, 乳・乳製品への抗生物質の移行残留物が国際的に重視されるようになり, 彼らの方法をもとにしたペーパーディスク法が国際酪農連盟によって生乳および飲用乳類中のペニシリンの標準検出法として採用された²⁾。この方法は検定菌のペニシリンに対する感受性が高いので感度の点では優れているが, 保存培養から試験を開始する場合は前培養を2回以上連続して反復する必要があるため, 常時検査を行っている場合以外は敏速性や簡便性の点で問題がある。米国では乳・乳製品中の抗生物質検出のためのペーパーディスク法で *B. subtilis* の芽胞液を平板培地に直接接種する方法が採用されているが³⁾, 国際酪農連

盟の標準法 (以下 IDF 標準法と略記) の場合も, *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 株の芽胞液を予め調製しておき, これを平板培地に直接接種することにより前培養を省略して簡易化をはかることが考えられる。IDF 標準法に記載されている培地では一般に C953 株の芽胞形成は不良であるので, 高濃度の芽胞液を得るためにまず C953 株の芽胞形成に適した培地組成を検討し, その結果に基づいて考案した芽胞用培地を用いて C953 株の芽胞液を調製し, その保存性およびペニシリンに対する感受性について試験し, 芽胞液を用いることにより IDF 標準法の簡易化が可能であるという結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試験菌株 (検定菌)

B. stearothermophilus var. *calidolactis* C953 (NIZO)

* 農林省畜産試験場: 千葉市青葉町 959

Scheme 1. Preparation of spore suspension of *B. stearothersophilus* var. *calidolactis* C953.

* Water means "sterilized distilled water" in this scheme.

** Cf. ref. 6 and 7.

Table 1. Growth and Sporulation of *B. stearothersophilus* C953 on Agar Plates

Media*	Composition of media (%)**	pH of media	Growth and sporulation	Spore count: Cell count***
# 1	Peptone 0.5, yeast extract 0.2, beef extract 0.1, NaCl 0.5, agar 1.5	7.4	+	1 : 100
# 5	Tryptone 0.3, peptone 0.6, yeast extract 0.3, beef extract 0.15, Mn ²⁺ 0.001, agar 2.5	7.0	++	1 : 8
# 11	Polypepton 0.5, beef extract 0.3, Mn ²⁺ 0.001, agar 2.0	7.0	+	1 : 20
# 85	Tryptone 0.5, peptone 0.5, Mn ²⁺ 0.001, agar 2.0	6.8	+++	1 : 2~3 : 2
# 109	Peptone 2.0, Mn ²⁺ 0.001, agar 2.0	6.8	+++	6 : 1
# 125	Peptone 1.0, polypepton 1.0, Mn ²⁺ 0.001, agar 2.0	7.0	+++	10 : 1~4 : 1

* #1: Slant agar of IDF Standard 57, #5: BS medium of Franklin, *et al.*⁹⁾

** Products of "Difco Laboratories" were used except salts and polypepton (Daigo Eiyokagaku Co.). Mn²⁺ was added as MnSO₄.

*** Microscopic count after 72~96 hr incubation.

Table 2. Cell and Spore Yields of *B. stearothersophilus* C953 Incubated on Agar Plates for 72 hr at 55°C

Medium		#125		#1	
Count/plate*		Viable	Spore	Viable	Spore
Trial	1	20×10 ⁹	22×10 ⁹	11×10 ⁸	85×10 ⁸
Trial	2	89×10 ⁸	12×10 ⁹	47×10 ⁸	18×10 ⁸

* Large Petri dishes (diameter 14 cm) with 100 ml of the medium per plate were used.

2. 芽胞用培地

IDF 標準法の斜面寒天培地を対照として、芽胞形成に適した培地として従来の文献に記載されている組成の培地^{4),5)}、およびそれらを参考として組成を適宜に改変した培地を調製した。培地はすべて固体培地を用いた。

3. 芽胞形成試験

前記の各種培地の平板を作り、IDF 標準法の斜面寒天上の C953 株の新鮮培養に滅菌生理食塩水を加えて作った菌液を、数滴ずつ平板表面に載せてむらなく拡げ、55°で培養する。24時間ごとに肉眼的に菌の生育状態を観察するとともに、その一部をとって鏡検し、栄養細胞と芽胞の割合を調べた。

4. 芽胞の収量の測定

芽胞形成試験で優れた結果の得られた #125 培地について、C953 株の芽胞の収量を IDF 標準法の菌株保存培地と比較した。培養には直径 14 cm の大型ペトリザラを用い、平板の厚さが 4~5 mm 程度となるように培地を注加し、芽胞形成試験と同様の手法で菌を接種培養する。72時間培養後、平板1枚について滅菌蒸留水 10 ml を加えて菌液を調製し、常法によってこれらの菌液の生菌数を測定する。また菌液を100°で10分間加熱処理したものの生菌液をもって芽胞数とした。これらの生菌数の測定には IDF 標準法のディスク用平板培地、すなわちプレートカウント寒天培地を用い、55°で24時間培養のコロニー数から求めた。

5. 芽胞液の調製

前記と同様の方法で #125 培地に C953 株を培養し、芽胞液を調製した。栄養細胞の混入を少なくするために培養期間は 3~4 日とした。濃厚な菌液を得るために同一の滅菌水で数枚の平板を処理して調製するようにした。集めた菌液は滅菌ガーゼでろ過し、混入した培地の細片などを除去する。このろ液を通常の遠心分離、洗浄の操作を反復することにより粗製の芽胞液が得られる。この粗製芽胞液には栄養細胞やその破片がある程度残っているため、これらの存在によって芽胞液の保存中に芽胞の発芽が起こって菌数に変化したり、あるいはディスク法の試験結果に影響を与える可能性も考えられるので、ウログラフィンを用いる濃度こう配法^{6),7)}により芽胞だけを分離した精製芽胞液も調製して実験を行った。芽胞液の調製法は次のとおりで、その概略を Scheme 1 に示した。

粗製芽胞液：常温で菌液を 3,000 rpm 10 分間遠心分離し、上澄を捨て滅菌水を加えて菌とよく混和し、再び同じ条件で遠心分離する。この操作を 3~4 回繰り返す。最後に 10⁸/ml 程度の芽胞濃度の液として、滅菌したねじりびんまたは試験管に入れる。

精製芽胞液：菌液を冷却遠心で 5°、5,000 rpm、10~15 分の条件で 3 回洗浄して得られた粗製芽胞液を氷冷しながら 3 分間ホモジナイザーにかける。遠心管にウログ

ラフィン60% (Schering AG) 3 部、蒸留水 1 部の混液を 5 ml ずつ入れ、その上にウログラフィン60% 2 部、ホモジナイザーにかけた芽胞液 1 部の混合液 3 ml を静かにのせ、15,000 rpm、60分間5°で遠心分離する。分離した芽胞は最初と同じ条件でさらに 3 回冷却遠心で洗浄後、芽胞浮遊液とする。

6. 芽胞液の保存性

芽胞液は 5 および 30°に保存し、経時的に生菌数を測定して、調製法および保存条件の影響を調べた。液の状態の標品のほか、一部の試料は凍結乾燥して室温保存し、また -20°で凍結保存し、同様の試験をした。なお芽胞の凍結乾燥では乾燥時の芽胞の飛散を防ぐため、分散媒として 1%乳糖水溶液を使用し、試料はバイアルビンに入れた。また凍結保存もバイアルビンに入れて行った。

7. 芽胞液によるディスク法

菌数を測定した芽胞試料について引き続いてディスク法により、ペニシリンに対する感受性および検出所要時間の変動の有無を試験した。芽胞濃度が 2~5×10⁷/ml

Fig. 1. Survival of spores of *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C953 during storage

○—○, suspension, 5°C; ●---●, suspension, 30°C; □----□, frozen, -20°C; ×---×, freeze-dried, room temp.

Table 3. Ratios of Diameter of Inhibition Zone Obtained by the Direct Spore Seeding Method to That of the IDF Standard Disk Assay Method

Storage temp. (°C)	Spore suspension						Freeze-dried	
	5°C		30°C		-20°C(frozen)		Room temp.	
Penicillin of disk (IU/ml)*	0.006	0.01	0.006	0.01	0.006	0.01	0.006	0.01
Storage period (mo.)	Crude preparations							
3	1.00	0.80~1.07	1.09	1.14				
4					1.11	0.92	1.00~1.08	1.07~1.13
6	0.77~1.10	0.80~1.07	1.10~1.18	0.93~1.07	1.00~1.10	1.00~1.07	1.00~1.18	1.00~1.07
9	0.83~1.00	0.86~0.93						
10			0	1.00				
12	0.92	1.00						
	Purified preparations							
3	1.00~1.09	0.93~1.07	1.10	1.23			0.92	0.94
5							1.00	1.00
6	0.92~1.23	1.00~1.23						
7			1.09	1.07			1.00	1.00
9	0.83~1.18	0.93~1.14						
10			0	1.07				
12	1.00~1.18	1.00~1.13						

* Diameter of the disk=8 mm

となるように芽胞液を IDF 標準法の平板培地に接種して平板を作り、0.006 および 0.01 IU/ml のペニシリン G 溶液を浸ませた直径 8 mm のペーパーディスク⁹⁾を用いて、IDF 標準法に準じて 55° で培養して阻止円を調べる。対照として同時に IDF 標準法による試験を行った。

実験結果および考察

1. 各種培地における C953 株の芽胞形成

試験した培地のうち主要なものについて、組成および C953 株の生育と芽胞形成を観察した結果を Table 1 に示した。最も良好な結果が得られたのは、ペプトン (Difco) およびポリペプトン (大五栄養化学) 各 1%，硫酸マンガン ($\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.004% (Mn^{2+} として 10 ppm)，寒天 2% の組成をもつ #125 培地であった。

IDF 標準法の保存培地では C953 株の生育、芽胞形成ともに良好でなく、*Bacillus* 属の芽胞形成に必要とされている Mn^{2+} を加えた Nutrient agar や Franklin ら⁹⁾ が *B. stearothermophilus* の芽胞形成に用いた BS 培地もありよい結果は得られなかった。またこの菌株は肉エキスや酵母エキスを含む培地では一般に芽胞形成が不良となる傾向がみられた。なお #125 培地のペプトンをいずれか一方のみ 2% の濃度で作製した培地では試験結果に変動が多く、時として芽胞形成がよくない場合があった。二種類のペプトンを混合した #125 培地では

このような芽胞形成の変動は認められなかった。

2. 芽胞の収量

大型ペトリザラを用いた IDF 標準法の保存培地および前記の #125 培地の平板培養における菌および芽胞の収量を測定した結果を Table 2 に示した。すでに述べたように IDF 標準法の培地では C953 株の生育は不良で、#125 培地の芽胞収量はその 10 倍以上になっている。また生菌数と芽胞数を比較すると、#125 培地では両者がほぼ同じレベルにあり、ほとんど全部の細胞で芽胞が形成されたとみなすことができるが、IDF 標準法の培地では生菌数に比較して芽胞数がかなり少なく、この培地は C953 株の芽胞形成には適していないと考えられる。

3. 芽胞液の保存中の菌数の推移

粗製芽胞液、精製芽胞液、およびこれらを凍結乾燥したものを種々の条件で保存し、保存中の菌数の推移を調べた結果を Fig. 1 に示した。試料の都合で一部は 1 ロットだけの値であるが、他は 2~4 ロットの平均値で、生残率として得られた値の範囲を併記した。なお凍結保存は粗製芽胞液について 6 か月だけ実験した。

芽胞液を 5° に冷蔵した場合は、粗製標品、精製標品いずれも菌数にある程度の変動はあるが、12 か月にわたって減少傾向は認められなかった。30° 保存では試料がなかったため、菌数が減少し始める時点を明確にする

ことはできなかったが、いずれも3か月程度は最初の菌数レベルが維持されており、それ以降に菌数が減少し始める。凍結乾燥品では6か月以降菌数がかかなり減少しているが、この実験ではバイアルびん中の凍結乾燥品を常圧の空気の下でゴム栓をしてデシケーター中に保存したので、保存条件が適当でなかったため比較的短期間で菌が減少し始めたと推定される。6か月凍結保存では菌数の変化はみられなかった。凍結は適当な条件であれば栄養細胞の場合にも効果的な保存法として実用化されている。したがって芽胞の場合好結果が得られるのは当然予測されることで、Forschner¹⁰⁾も *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* の芽胞液を -20° で6か月間変化なく保存できると報告している。

同一保存条件について粗製標品と精製標品の菌数の推移を比較すると、一般に両者間に差は認められず、したがって細胞残留物や少量の栄養細胞の混在は芽胞の保存性には影響を与えないとみることができる。

この実験で対象としている芽胞標品は抗生物質検出用のものであるから、所要の保存期間は6か月から多くて1年程度と考えて差し支えなからう。したがって菌数保持という観点からすれば、通常の実験室で簡単に調製できる粗製芽胞液を冷蔵しておけばよいことになる。

4. 保存芽胞のペニシリン感受性

芽胞の調製法や保存条件にかかわらず、十分な菌数が維持されている標品を直接ディスク用平板に接種した場合は、ペニシリンGに対して検出に要する培養時間も、阻止円の直径も同時に対照として行ったIDF標準法の値と差がなかった。Table 3に保存芽胞とIDF標準法によるディスク法の阻止円の直径の比率を示した。ディスクの直径は8mmで、ペニシリン0.006 IU/mlの場合の対照の阻止円の径は9~15mm、芽胞では9~15mm、0.01 IU/mlの場合はそれぞれ12~18および10~18mmであった。30°で10か月保存した芽胞液の場合はペニシリン0.006 IU/mlでは明白な阻止円が認められなかった。菌の生育には遅延は認められず、30°での長期保存に伴うペニシリン感受性の低下が何に起因するのかは不明である。

芽胞を用いる場合、IDF標準法と同程度の明りょうさの阻止円を得るためには、 $2 \sim 5 \times 10^7$ /mlの菌濃度となるように接種する必要がある、これはIDF標準法の菌濃度の約2倍である。したがって芽胞標品ではその約半数の芽胞がこの条件では発育が遅延し、十分な生育をみないものと推定される。しかし保存期間が長くなっても検出所要期間に変化はみられず、保存による発芽もし

くは生育の遅延現象は見掛け上は認められなかった。

以上の結果から芽胞を用いるIDF標準法の簡易化は実用可能であるが、今後は芽胞の活性化、発芽条件に関する知見を得ることにより、方法の信頼性を高めていく必要がある。

要 約

1. *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* C953の芽胞形成に適した#125培地—ペプトン(Difco)、ポリペプトン(大五栄養化学)各1%、硫酸マンガン0.004%、寒天2%—を考案した。

2. この培地を用いてC953株を55°で3~4日培養し、通常の実験室の手法で調製した芽胞液を直接ディスク用平板に $2 \sim 5 \times 10^7$ /mlの濃度に接種することにより、IDF標準法の簡易化が可能である。

3. 芽胞液は5°で1年以上、30°で3か月程度は菌数およびペニシリンに対する感受性に变化をきたすことなく保存できる。凍結あるいは凍結乾燥による保存も可能である。

終わりに菌株を分与された国立衛生試験所慶田雅洋博士、日本国際酪農連盟林俊雄事務局長の両氏に感謝します。

文 献

- 1) Galesloot, Th. E., Hassing, F.: *Neth. Milk Dairy J.*, **16**, 89 (1962).
- 2) Intern. Dairy Federation: IDF Standard 57 (1970).
- 3) "Standard methods for the examination of dairy products," 12th ed., p. 72 (1967) A. P. H. A., Inc., New York.
- 4) Ordal, Z. J.: "Spores", Vol. I, ed. by Halvorson, H. D., p. 18 (1957), A. I. B. S., Washington, D. C.
- 5) Fields, M. L.: *Adv. Food Res.*, **18**, 163 (1970).
- 6) Tamir, H., Gilberg, C.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 1085 (1966).
- 7) Irie, R., Morichi, T.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **19**, 421 (1973).
- 8) 慶田雅洋, 津郷友吉: *食衛誌*, **11**, 389 (1970).
- 9) Franklin, J. G., Williams, D. J., Burton, H., Chapman, H. R., Clegg, L. F. L.: *Intern. Dairy Congr.* 1959, **1**, 40 (1959).
- 10) Forschner, E.: *Archiv f. Lebensmittelhyg.*, **23**, 101 (1972).