我が国の乳製品及び生菌製剤から検出される *Bifidobacterium* 生菌数の簡易測定法

(昭和 56 年 6 月 26 日受理)

寺 口 進* 川 島 拓 司* 久保山盛雄*

Test Tube Method for Counting Bifidobacteria in Commercial Dairy and Pharmaceutical Bacteria Products

Susumu TERAGUCHI, Takuji KAWASHIMA and Morio KUBOYAMA

(Central Research Laboratory, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.: 4-4-22, Meguro, Meguro-ku, Tokyo)

A culture method was developed suitable for selective cell counting of bifidobacteria in Japanese commercial dairy and pharmaceutical bacteria products.

1) A dissolved agar medium was added at 45°C to the bacterial suspension in the bottom of a test tube to achieve a deep culture medium, then the culture was incubated. The present culture method in the agar column, tentatively called the test tube method by the authors, was suitable for carrying out anaerobic incubation for viable cell counting of bifidobacteria.

2) Modified Garche's agar with lithium chloride (MGL agar) or with lithium chloride and penicillin G potassium (MGLP agar) was demonstrated to be a suitable medium for the selective cell counting of bifidobacteria by the test tube method described, above since it discriminated the growth of lactobacilli and streptococci.

3) Bifidobacteria in commercial dairy and pharmaceutical bacteria products were determined satisfactorily by the present test tube method with MGL agar or with MGLP agar, except for products which contained enterococci.

(Received June 26, 1981)

Key words: 選択的測定法 selective enumeration; ビフィズス菌 *bifidobacterium*; 乳製品 dairy product; 生菌製剤 pharmaceutical bacteria product

緒 言

Bifidobacterium は、乳児をはじめヒトの健康にかかわる最優勢の腸内有用菌として注目されており、近年、我が国では *Bifidobacterium* の生菌を積極的に応用した乳製品や生菌製剤が広く商品化されている。一方、この種の製品に含まれる *Bifidobacterium* の生菌数測定法については、いくつかの報告^{1), 2)}があるものの、いまだ統一された方法がない。そこで、著者らは *Bifidobacterium* 生菌数の簡易測定法について検討し、市販の *Bifidobacterium* 含有製品への適用を試みたので、その結果を報告する。

実験方法

1. 供試材料

現在、我が国で市販されている *Bifidobacterium* 含有製品のうち、発酵乳 2 種類（ドリンクタイプ、ヨーグルトタイプ）とミルクタイプの乳製品乳酸菌飲料 2 種類（ビフィズスミルク）の乳製品 4 種類、キャンディタイプの錠剤 1 種類（タブレット）及び粉末状の生菌製剤 6 種類を市場から購入し供試材料とした。

2. 分離菌株の同定

供試材料から *Bifidobacterium* 15 株、*Lactobacillus* 5 株及び *Streptococcus* 3 株を分離した。分離菌株は光岡の分類方法³⁾及び Bergey's Manual 第 8 版の分類方法⁴⁾に従って同定した。

* 森永乳業（株）中央研究所：東京都目黒区目黒 4-4-22

3. 被検菌液の調製

分離した *Bifidobacterium* 及び *Lactobacillus* は Briggs liver broth³⁾, *Streptococcus* は 0.25% 酵母エキスを加 10% スキムミルク培地を使用し, 1 コロニーから増菌した前培養液を同培地に 5% 接種して 37°, 24 時間培養した培養液を被検菌液とした。

4. 培地及び培養方法

菌株分離用の培地及び生菌数測定のための非選択培地には, Table 1 に示した BL 寒天培地⁵⁾ を使用し, 培養方法は平板塗抹の炭酸ガス加スチールウール嫌気ジャー

Table 1. Composition of Glucose Blood Liver Agar

Lab-lemco powder (Oxoid)	3	g
Proteose peptone No. 3 (Difco)	10	g
Trypticase (BBL)	5	g
Phytone (BBL)	3	g
Yeast extract (Difco)	5	g
Liver extract solution ^{a)}	150	ml
Glucose	10	g
Soluble starch	0.5	g
Solution A ^{b)}	10	ml
Solution B ^{c)}	5	ml
Tween 80	1	g
L-Cysteine HCl-H ₂ O	0.5	g
Agar (Difco)	15	g
Horse blood	50	ml
Distilled water	775	ml

pH 7.2

^{a)} 10 g of liver powder (Kyokuto Co., Ltd.) is extracted with 170 ml of distilled water for 1 hr at 50~60°C and boiled for 10 min and filtrated.

^{b)} 25 g of K₂HPO₄ and 25 g of KH₂PO₄ in 250 ml of distilled water.

^{c)} 10 g of MgSO₄·7H₂O, 0.5 g of FeSO₄·7H₂O, 0.5 g of NaCl and 0.337 g of MgSO₄ in 250 ml of distilled water.

Table 2. Composition of Modified Garche's Agar

Bacto-Casitone	20	g
Yeast extract	5	g
L-Cysteine HCl-H ₂ O	0.4	g
Lactose	10	g
CH ₃ COONa	6	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.12	g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2.5	g
KH ₂ PO ₄	2	g
Agar	5	g
Distilled water	1000	ml

pH 6.5

Fig. 1. Colonies of *B. longum* BLO-1 obtained by the test tube method
Cultural conditions; 37°C, 48 hr, MGLP agar

培養法 (以下嫌気ジャー法と略す) を用いた。 *Lactobacillus* 及び *Streptococcus* の生菌数測定には, BCP 加プレートカウント寒天培地 (栄研化学 (株) 製) の混釈平板培養法を用いた。

Bifidobacterium 選択培地は, Table 2 に示した MG 寒天培地 (Modified Garche's agar) を基礎培地として塩化リチウム 3 mg/ml を添加した MGL 寒天培地, あるいは塩化リチウム 3 mg/ml とペニシリン G カリウム (明治製菓 (株)) 0.02 unit/ml を添加した MGLP 寒天培地を使用し, 試験管を用いた高層寒天培養法²⁾ (以下試験管法と略す) で培養した。試験管法では, Fig. 1 に示したようにアルミキャップ付滅菌試験管 (13 mm × 150 mm) に希釈検液を 1 ml 入れ, 次いであらかじめ加温溶解した約 45° の寒天培地 10~15 ml を加え, 冷却固化させた後, 更に同じ培地を 15~20 mm の厚さになるように重層した。この場合, 試料の混和に特別な方法は必要なくコロニーは均一に出現する。なお, MG 寒天培地は非選択培地としても使用できるか否かを嫌気ジャー法及び試験管法で調べた。その際に, MG 寒天培地中の寒天濃度は, 嫌気ジャー法では 1.5%, 試験法では 0.5% とした。これらの方法の培養条件は, すべて 37°, 48~72 時間で行った。

5. 生菌数の測定方法

生菌数の測定のため、供試材料及び被検菌液は、まず希釈液 A³⁾ (組成: リン酸一カリウム 4.5 g, リン酸二ナトリウム 6.0 g, L-Cysteine 塩酸塩 0.5 g, Tween 80 0.5 g, 精製水 1000 ml) に懸濁し、pH 6.5 に調整した後、10 倍段階希釈法により希釈した。pH 6.5 の調整は pH の低い試料を希釈する場合に必要であり、特にタブレットでは pH 未調整の場合、回収率は大幅に低下した。培地及び培養方法は実験方法 4 に記したとおりに行った。2 菌種以上の細菌を含む供試材料中の生菌数の測定は、嫌気ジャー法によって得られた BL 寒天平板上のコロニー性状及び菌形態の違いから菌種を判別し、それぞれ計数した。

実験結果及び考察

1. 市販製品中の細菌

実験に供試した市販製品中の細菌は、製品説明書あるいは容器などの表示内容によれば、Table 3 に示したとおりであった。又、Table 3 には著者らが各製品から実際に分離、同定した細菌の菌種名及び製品中の構成比率を示した。その結果、発酵乳及び乳製品乳酸菌飲料から検出された菌種は表示内容と一致したが、錠剤及び生菌製剤については必ずしも一致しなかった。すなわち、錠

剤及び生菌製剤の *Bifidobacterium* に関する表示内容には、BP-3 以外はビフィズス菌あるいは *Lactobacillus bifidus* としか記されておらず、菌種名は明確ではなかった。又、BP-3 からは表示の *B. bifidum* は検出されず *B. longum* が検出され、TA-1、BP-4 及び BP 6 からは 2 種類の *Bifidobacterium* が検出された。乳酸菌についても BP-5 からは表示の *L. acidophilus* は検出されず *L. casei* が検出された。BP-5 及び BP-6 の *S. faecalis* は *S. faecium* との区別が明確にできなかったため *Enterococcus* とした。以上、市販製品から検出された細菌は Table 3 のごとく、*Bifidobacterium* 15 株、*Lactobacillus* 5 株及び *Streptococcus* (*Enterococcus* を含む) 3 株の計 23 株であった。各市販製品中の *Bifidobacterium* 生菌数の総生菌数に占める割合は、製品によって異なり 4~100% の範囲であった。

2. *Bifidobacterium* 選択培地の検討

Bifidobacterium をはじめ嫌気性細菌の簡易測定法としては、ガスバック法やパウチ法が報告¹⁾ されているが、より簡便な方法として本報では試験管法を使用した。*Bifidobacterium* の試験管法での測定例は、先に著者らが血液を含まない BL 寒天培地について報告している²⁾。本報では、比較的培地組成の単純な Raynaud

Table 3. Bacterial Species and Composition in Commercial Products Containing Bifidobacteria

Commercial products	Sample No.	Bacterial species		Strain No.	Bacterial composition (%)
		Declared in explanatory statement	Isolated and identified		
Fermented milk					
Drink type	FM-1	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>B. breve</i>	BBR-1	5.5
		<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	BBI-1	92.7
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	LAC-1	1.8
Yogurt type	YO-1	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	BLO-1	14.7
		<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	LBU-1	7.3
		<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>S. thermophilus</i>	STH-1	78.0
Bifidus milk	LAB-1	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	BLO-2	42.5
		<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	LAC-2	57.5
	LAB-2	<i>B. longum</i>	<i>B. longum</i>	BLO-3	30.6
		<i>L. acidophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>	LAC-3	69.4
Tablet	TA-1	<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. longum</i>	BLO-4	4.1
			<i>B. infantis</i>	BIN-1	95.9
Pharmaceuticals	BP-1	<i>L. bifidus</i>	<i>B. longum</i>	BLO-5	100
	BP-2	<i>L. bifidus</i>	<i>B. longum</i>	BLO-6	100
	BP-3	<i>B. bifidum</i>	<i>B. longum</i>	BLO-7	100
	BP-4	<i>L. bifidus</i>	<i>B. longum</i>	BLO-8	17.5
			<i>B. infantis</i>	BIN-2	82.5
			<i>B. infantis</i>	BIN-3	38.5
	BP-5	<i>L. bifidus</i>	<i>L. casei</i>	LCA-1	19.2
		<i>S. faecalis</i>	<i>Enterococcus</i>	ENT-1	42.3
		BP-6	<i>L. bifidus</i>	<i>B. longum</i>	BLO-9
			<i>B. infantis</i>	BIN-4	14.5
			<i>S. faecalis</i>	<i>Enterococcus</i>	ENT-2

の Garche 培地を改変した MG 寒天培地を基礎培地として使用した。

Garche 培地は Raynaud の bifidus factor に関する研究に報告されており⁶⁾, Table 4 に示した最少組成の培地である。Garche 培地について予備的に調べたところ, 1) 大部分の *Bifidobacterium* の培養に適するが, 2) 一部の *Lactobacillus* 特に *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* 及び *L. helveticus* の発育には不適であるという利点があり, 一方, 1) 複雑な滅菌操作が要求され, 2) 121° 15 分間の滅菌条件では沈殿物が生成されるなどの難点があった。そこで, ビタミン類とアスパラギンを除き酵母エキスを代替栄養源として添加し, バクトカジソン (Difco 社製) をビタミンフリーでないものに変更し, さらに塩類濃度を調整することによって 121° 15 分間の

Table 4. Composition of Garche's Medium

Asparagine	10	g
Bacto-Casitone (Vitamin free)	20	g
Cystine	0.4	g
Lactose	20	g
CH ₃ COONa 6H ₂ O	10	g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1	g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	4.66	g
KH ₂ PO ₄	1.8	g
p-Aminobenzoic acid	2	mg
Calcium pantothenate	2	mg
Biotin	20	μg
Distilled water	1000	ml
pH 6.4		

滅菌条件に耐え, しかも *Bifidobacterium* の発育に良好な MG 寒天培地を考案した。ただし, MG 寒天培地は *Lactobacillus* の発育がみられるようになったので, 後述する選択剤を添加することによって *Bifidobacterium* の選択性を高めた。MG 寒天培地の基礎培地としての適否を検討するため, まず分離した *Bifidobacterium* 15株の純粋培養液を被検菌液とし, それらの生菌数を BL 寒天培地と MG 寒天培地で測定し比較した。BL 寒天培地は嫌気ジャー法で培養し, MG 寒天培地は嫌気ジャー法及び試験管法で培養した。

結果は Table 5 に示したごとく, すべての分離株について BL 寒天培地と MG 寒天培地で得られた生菌数に有意差はなかった。しかし, コロニー性状には若干の相違が観察された。嫌気ジャー法の BL 寒天平板上のコロニーは各菌株によって特徴のある性状を呈する⁷⁾のに対し, MG 寒天平板上のコロニー形態は前者と類似しているが色調が全菌株とも白色～乳白色で明確な判別は困難であった。又, 試験管法の MG 寒天培地中のコロニーは乳白色のレンズ状, 三叉状あるいは中間形などの多様な形態を示し, コロニー性状による菌株の明確な判別は困難であった。

次に, *Bifidobacterium* を選択的に発育させる培地として MGL 寒天培地及び MGLP 寒天培地の可能性を検討した。両培地での生菌数の測定には試験管法を用いた。分離した全23株の純粋培養液を被検菌液とし, それらの生菌数を各培地で測定し比較した。すなわち, BL 寒天培地の嫌気ジャー法で測定した生菌数を対照とし, BCP 加プレートカウント寒天培地の混釈平板培養法,

Table 5. Relative Cell Counts of *bifidobacteria* with BL Agar and MG Agar

	BL agar plate incubated in anaerobic jar	*MG agar plate incubated in anaerobic jar (%)	*MG agar tube overlaid with agar (%)
<i>Bifidobacterium</i>			
B B R-1	32×10 ⁸ /ml	103	106
B B I-1	17×10 ⁸	88	100
B L O-1	20×10 ⁸	95	95
2	42×10 ⁸	95	93
3	20×10 ⁸	100	90
4	21×10 ⁸	90	110
5	22×10 ⁸	91	109
6	30×10 ⁸	97	90
7	24×10 ⁸	92	104
8	32×10 ⁸	105	100
9	13×10 ⁸	100	92
B I N-1	28×10 ⁸	107	93
2	34×10 ⁸	94	97
3	46×10 ⁸	91	89
4	35×10 ⁸	91	100

* Viable cell counts as determined on BL agar plate were taken as 100 and those in MG agar medium were rated

Table 6. Relative Cell Counts of Bifidobacteria, Lactobacilli and Streptococci with Various Agar Media

Strains	BL agar plate incubated in anaerobic jar	*BCP agar pour- plate incubated aerobically (%)	*MGL agar tube overlaid with agar (%)	*MGLP agar tube overlaid with agar (%)
<i>Bifidobacterium</i>				
B B R-1	$32 \times 10^8/\text{ml}$	N.D.	100	115
B B I-1	17×10^8	N.D.	94	85
B L O-1	20×10^8	N.D.	95	110
2	42×10^8	N.D.	83	96
3	20×10^8	N.D.	95	110
4	21×10^8	N.D.	100	125
5	22×10^8	N.D.	118	125
6	30×10^8	N.D.	93	100
7	24×10^8	N.D.	83	82
8	32×10^8	N.D.	94	91
9	13×10^8	N.D.	85	92
B I N-1	28×10^8	N.D.	125	130
2	34×10^8	N.D.	88	103
3	46×10^8	N.D.	70	74
4	35×10^8	N.D.	94	91
<i>Lactobacillus</i>				
L A C-1	31×10^8	97	N.D.	N.D.
2	29×10^7	126	N.D.	N.D.
3	31×10^8	97	N.D.	N.D.
L B U-1	47×10^7	157	N.D.	N.D.
L A C-1	18×10^7	117	N.D.	N.D.
<i>Streptococcus</i>				
S T H-1	17×10^7	106	131	N.D.
E N T-1	12×10^8	89	92	125
E N T-2	15×10^8	100	73	87

N.D.: no colonies were detected at 10^{-5} dilution.

* Viable cell counts as determined on BL agar plate were taken as 100 and those in other agar media were rated.

MGL 寒天培地及び MGLP 寒天培地の試験管法で測定した生菌数と比較した。

結果を対照区の生菌数を 100 とした相対値として、Table 6 に示した。BCP 加プレートカウント寒天培地では *Bifidobacterium* の発育はすべて抑制され、*Lactobacillus* 及び *Streptococcus* の生菌数は対照と差がなかった。MGL 寒天培地及び MGLP 寒天培地では *B. infantis* BIN-3 の発育だけが若干抑制されたが、他の *Bifidobacterium* の生菌数は対照と差なく回収された。一方、*Lactobacillus* の発育はすべて抑制された。これは塩化リチウムによる発育阻害と考えられる。又、*S. thermophilus* の発育は MGL 寒天培地では抑制されず、*Bifidobacterium* よりやや小さい乳白色、三叉状のコロニーを形成するが、ペニシリン G カリウムを加えた MGLP 寒天培地では完全に抑制された。しかし、生菌製剤から分離された *Enterococcus* 2 株の発育は、いずれの培地でも抑制されず *Bifidobacterium* と類似し

たコロニーを形成した。

3. *Bifidobacterium* 選択培地の市販製品への適用

種々の割合で *Bifidobacterium* を含有する市販製品について、MGL 寒天培地及び MGLP 寒天培地を用いた試験管法の適用を試みた。

対照は BL 寒天培地の嫌気ジャー法とした。

分析は各製品につき 2 検体ずつ行った。

結果を Table 7 に示した。BL 寒天平板上のコロニー性状と菌形態の違いから判別した *Bifidobacterium* の生菌数を 100 とし、MGL 寒天培地及び MGLP 寒天培地で得られたコロニー数を比較するとドリンクタイプの発酵乳、乳製品乳酸菌飲料、キャンディタイプの錠剤及び生菌製剤 4 種類の場合は、ほぼ一致し、*Bifidobacterium* の選択的な測定は両選択培地で可能であった。*S. thermophilus* を含むヨーグルトタイプの発酵乳 (Yo-1-a, b) では MGL 寒天培地中のコロニー数が対照値に比べて非常に高くなっているが、相対的に高い割合で含ま

Table 7. Relative Bacterial Cell Counts in the Commercial Products as Determined in the Two Selective Agar Media

Commercial products	Relative cell counts as determined in	
	MGL agar tube overlaid with agar (%)	MGLP agar tube overlaid with agar (%)
FM-1 a	102	98
b	100	92
YO-1 a	707	108
b	12800	119
LAB-1 a	100	82
b	85	98
2 a	100	120
b	90	110
TA-1 a	87	113
b	95	109
BP-1 a	96	93
b	94	156
2 a	105	93
b	66	85
3 a	84	84
b	78	83
4 a	113	103
b	100	69
5 a	210	140
b	380	380
6 a	369	344
b	219	213

Values are expressed by percentage to the cell counts of *bifidobacteria* as determined on BL agar plate incubated in anaerobic jar.

れる *S. thermophilus* が発育したためと考えられる。従って、*S. thermophilus* の発育を抑制する MGLP 寒天培地でのみ *Bifidobacterium* の選択的な測定が可能であった。一方、*Enterococcus* を含む 2 種類の生菌製剤 (BP-5, 6) の場合は、MGL 寒天培地、MGLP 寒天培地ともに *Enterococcus* の発育を抑制できず、コロニー数も対照値の 2~4 倍となり *Bifidobacterium* を選択的に測定することができなかった。なお、MGLP 寒天培地よりも選択性の高い Mitsuoka らの BS 寒天平板⁵⁾や

著者らの NPNL 寒天平板²⁾ を使用しても *Enterococcus* の発育を抑制することは困難であった。従って両菌株を判別するには BL 寒天平板のような非選択培地を用いてコロニー性状の違いから判別する以外には適当な方法がないと思われる。しかし、この場合にも両菌株の菌比に大きな差がないという制約が残される。以上、MG 寒天培地を基礎培地とする *Bifidobacterium* 選択培地の試験管法について述べた。MG 寒天培地は比較的組成の単純な培地であり、基礎培地として特に優れた回収率を示すとはいえないが、供試した *Bifidobacterium* については BL 寒天培地とほぼ同程度の回収率を示した。一方、実用的な意味から試験的に粉末化した MG 寒天培地の使用を試みているが、透明度も高く、得られた結果は前述の結果と何ら変わらなかった。選択培地の MGL 寒天培地及び MGLP 寒天培地については、*Enterococcus* や供試菌株以外の薬剤耐性菌に対する問題が残るものの、あらかじめ菌種が明らかな場合には本法は簡易測定法として十分、実用に供しうるものとする。

要 約

Bifidobacterium を含有する市販の乳製品、錠剤及び生菌製剤から *Bifidobacterium* だけを選択的に測定する簡易測定法について検討した。その結果、*Enterococcus* を含む生菌製剤以外の製品中の *Bifidobacterium* 総生菌数は、MGL 寒天培地あるいは MGLP 寒天培地の試験管法で製品中の細菌数の構成比率にかかわらず選択的に計数できることを確認した。

文 献

- 1) 島田清弘, 馬田三夫, 務台方彦, 鈴木 昭, 小沼博隆: 食衛誌. **18**, 537~546 (1977).
- 2) 寺口進, 植原真理子, 小笠勝啓, 光岡知足: 日細菌誌. **33**, 753~761 (1978).
- 3) 光岡知足: 臨床検査. **18**, 1163~1172 (1974).
- 4) Buchanan, R. E., Gibbons, N. E.: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8 th Ed." (1974). The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- 5) Mitsuoka, T., Segi, T., Yamamoto, S.: Zbl. Bakteriologie. I. Abt. Orig., **195**, 455~469 (1965).
- 6) Raynaud, M.: La Semaine des hôpitaux. (Ann. De Pédiatrie.) **35**, 240~255 (1959).
- 7) 光岡知足編: "腸内菌の世界" (1980) 養文社.