

BGLB発酵法とバイオルミネッセンス法 （ルシフェリン^{CT150}）を組み合わせた 大腸菌群の迅速検査法

金井美恵子

The Rapid Inspection Method of Coliforms which Combined BGLB Method with
Bioluminometric Assay

MIEKO Kanai

Abstract : The presence of coliforms in milk, frozen foods and other food stuffs show the some possibility of the contamination of microbial pathogen such as *Salmonella* and *Shigella*.

The experiments were conducted to establish the rapid inspection to detect coliforms by combining the use of BGLB medium and CT kit.

The standard BGLB method required a culture time of 24~48 hrs at least.

The new aforementioned combined method required an incubation period of 10~12 hrs.

And 48 hours after being based on a BGLB culture medium, MPN of coliforms was countable as usual.

It was found that the bile ingredient of the BGLB medium inhibited the luciferase activity. The addition of 5 μ l of the medium into 20 μ l of reaction liquid had no significant effect.

Key words : Coliforms（大腸菌群） Bioluminometric assay（バイオルミネッセンス法）
Standard method（公定法） Luciferin CT 150 kit（ルシフェリンCT150キット）
Rapid detection（迅速検出）

日本では大腸菌群を大便汚染指標菌として意義づけ、消化器感染症に対する予防対策をはかってきた。すなわち牛乳、アイスクリーム、冷凍食品、あるいは清涼飲料などの加工食品に対しては食品衛生法施行規則、および乳・乳製品に関する省令、飲料水においては水道法、水質基準に関する省令により大腸菌群陰性であることが義務づけられている。一方、多くの食品企業においては工場生産過程における衛生管理や食品流通の広域化に伴うトレーサビリティとともに、微生物検査の簡易・迅速化が求められている。しかし、如何に検査の簡易・迅速化がはかられても、最終製品の出荷に際して公定法があ

る限り、そこから逸脱することはできない。

大腸菌群を対象にした簡易検査法、さらに公定検査法との相関性を検討した報告^{1, 2, 3, 4, 5)}もあるが、今回、著者は公定検査法の中に大腸菌群検査キットであるキッコーマン社製ルシフェールCT150を組み込み、検査の迅速化と公定法に基づく検査が同時に行えるよう基礎的な実験を含めて検討し、その中で興味ある知見を得たので報告する。

実験に用いた試薬、菌株

供試試薬；ルシフェールCT150簡易検査キット
（キッコーマン社製）

BGLB培地（日水製薬（株））、
プリリアントグリーン（和光純薬工業（株））、
乳糖（和光純薬工業（株））、
ポリペプトン（日本製薬（株））、
胆汁末（和光純薬工業（株））

供試菌株：*Escherichia coli* IFO3301

Klebsiella pneumoniae IFO 3318

Enterobacter aerogenes IFO 13534

Salmonella Enteritidis IID 604

Pseudomonas aeruginosa ATCC 19432

Staphylococcus aureus Ent.A isolated

Staphylococcus epidermidis IFO 13889

Bacillus subtilis IFO 3134

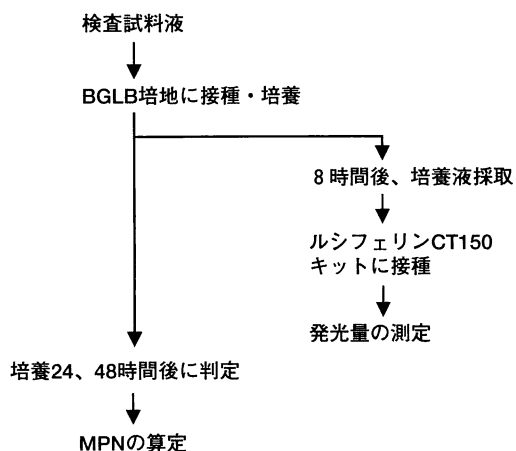


図1 大腸菌群検出のための実験手順

I. 実験方法

1. ルシフェールCT150キットによる大腸菌群検出の基本操作およびBGLB培地との併用実験

大腸菌群検出試薬ルシフェールCT150（キッコーマン社製）の10mlに等量のCT150溶解液を加え、緩やかに攪拌した後、その200 μ lずつを専用のプラスチック製試験管、ルミチューブに分注し、約30分間室温に放置して検出試液とする。

ルシフェールCT150の大腸菌群検出限界は約 $10^3 \sim 10^4$ / mlとされるので、検査検体はあらかじめ増菌培地Pro-media XMプロスで培養する。増菌後の培養液40 μ lを調製検出試液の入ったルミチューブに加え、軽く振り混ぜ、35 $^{\circ}$ C、20分間放置して発光させ、ルミテスターで測定した。併用実験では後述の実験結果からBGLB培養液の接種量を5 μ lとした。なお、Blankは、培養前の同一の試料を加えたルミチューブを冷蔵庫に保管して置き、同様に測定した。

結果の判定はBlank値と比較して2倍以上の発光量を示したとき、大腸菌群陽性と判断する。1.5 \sim 2倍未満の場合は疑陽性、1.5倍未満は陰性とする。

BGLB培地とルシフェールCT150キットの併用実験では図1に示すように、BGLB培地による培養過程でその一部を発光試薬を分注したルミチューブにとり、常法に従い発光量を測定した。これにより検査検体中に β -ガラクトシダーゼ保有菌の存在を確認することができる。なお、発酵のための溶菌が十分でない場合も考え、35 $^{\circ}$ C、20分の放置時間を2時間まで延長して観察するようにした。さらに

BGLB培地はそのまま培養を継続し、24時間、48時間後にMPNを測定する。

なお、ルシフェールCT150の発光量に及ぼすBGLB培地組成成分の影響についても同様に検討した。

II. 実験結果

1. ルシフェールCT150測定値に及ぼすBGLB培地およびその組成成分の影響

検出試液200 μ lにBGLB培地、培地組成濃度のプリリアントグリーン、乳糖、ペプトン、胆汁を各水溶液ごとに5、10、20、40 μ lを添加し、常法に従って発光量（RLU）を測定した。その結果を表1に示す。

ルシフェールCT150自体の発光量は150前後であったが、これにBGLB培地が加わると発光量は培地添加量によって著しく影響を受けた。同時に行った試薬チェックのための陽性対照液ではRLU（S）は平均約13,000であったが、BGLB培地を添加後の測定値（N）は著しく影響を受けた。ちなみに、培養液40 μ lを加えたときは29RLU、20 μ lで102RLU、陽性対照との比（S/N）はそれぞれ2.1および2.7に低下した。培地組成であるプリリアントグリーンのS/Nは平均約80で、陽性対照と極端な差はみられない。胆汁のS/Nは2.0を遥かに上回るが、Blank値（N）、陽性対照値共に著しく低下させていた。乳糖はBlank値、陽性対照値を下げているが、ペプトンは逆に上昇させる傾向があった。これらの

結果を総合的に捉えると、BGLB培地による発光阻害の大きな要因は胆汁にあることがわかった。しかし、BGLB培地の添加量が5 μ lでは影響は少なく、判定上に支障をきたさないと判断された。

表1. ルシフェールCT150測定値に及ぼすBGLB培地および培地組成の影響

25	添加培地量	Blank RLU(N)	陽性対照 RLU(S)	S/N
BGLB*	40 μ l	14	29	2.1
	20	456	122	0.7
	10	218	6,353	29.1
	5	186	11,318	60.8
Brilliant green	40	177	12,773	72.2
	20	176	15,139	86.0
	10	184	16,850	91.6
	5	195	15,681	80.4
Lactose	40	95	2,889	30.4
	20	108	5,228	48.4
	10	121	7,262	60.0
	5	139	10,149	73.0
Peptone	40	675	12,565	18.6
	20	310	13,996	45.1
	10	219	14,333	65.4
	5	183	16,391	89.6
Bile	40	4	58	14.5
	20	57	6,484	11.3
	10	152	13,577	89.3
	5	148	15,257	103.1
ルシフェールCT150のみ	—	156	14,634	93.8
	—	145	12,825	88.4

注) *日水製薬製BGLBを使用

2. BGLB培地中の大腸菌群などルシフェールCT150発光量

標準寒天培地をもって前もって培養した供試菌をBGLB培地の1mlに対し $10^7 \sim 10^8$ に懸濁させ、その5 μ lを発光試薬200 μ lに加え、常法に従って発光量(RLU)を測定した。5 μ lのBGLB菌懸濁液は培地が測定上に支障をきたさないと判断されたものである。発光量の最も多かったのは*E.coli*でS/Nは3,000を超え、ルシフェール反応はあきらかに陽性を示していた。

K.pneumoniae, *E.aerogenes*は*E.coli*に比較すると遥かに低い値を示すが、いずれも陽性と判断された。大腸菌群以外の菌では*S.Enteritidis*, *P.aeruginosa*

および*S.aureus*, *S.epidermidis*のS/Nは1.0~1.3であり、いずれも陰性と判断された。しかし、*B.subtilis*は7.7と陽性判断基準値を上回っていた(表2)。

3. BGLB培地とルシフェールCT150の組み合わせによる判定

微温湯で溶解したW社製育児用調製粉乳に、あらかじめ表3に示す3菌種を 10^3 /ml位に懸濁させ、その1mlを初発時菌濃度が 10^2 /mlになるようにBGLB培地10mlに接種した。次いで35 $^{\circ}$ C培養、4、8、24時間後にそれぞれの発光量をルミテスターで読み取った。

表2. BGLB培地に懸濁した菌のCT150発光量(RLU)

供試菌種	RLU(S)	S/N
グラム陰性菌		
<i>E. coli</i> IFO3301	337,868	3312.4
<i>K. pneumoniae</i> IFO3318	30,511	229.1
<i>E. aerogenes</i> IFO13534	1,328	13.0
<i>S. Enteritidis</i> IID604	133	1.3
<i>P. aeruginosa</i> ATCC19432	172	1.7
グラム陽性菌		
<i>S. aureus</i> Ent.A	100	1.0
<i>S. epidermidis</i> IFO13889	109	1.1
<i>B. subtilis</i> IFO3134	785	7.7
<i>B. cereus</i> IFO13690	129	1.3
CT150陽性対照	13,175	129.2
BGLB培地 Blank(N)	102	

注) 培地への接種菌量： $10^7 \sim 10^8$ /ml
 ルシフェールCT150測定に用いた菌液： 5μ l
 CT150反応保持時間：35℃、20分

培養開始後4時間値では*E.coli*のみがルシフェールCT150の判定は疑陽性であり、他の2菌種は陰性であった。培養8時間値では*E.coli*、*K.pneumoniae*のBGLB培養試験管を振ると、管壁に細かい気泡が生じ、発酵の兆しがみえ、発酵管にケシ粒大のガスが見られるものの、明らかに発酵したと判断しうるものではなかった。その際の菌数は確認しなかった。これに対し、ルシフェールCT150試験では両菌株とも大腸菌群陽性と判断しうるものであり、特に*E.coli*のS/Nは53と明らかに陽性を示した。その後、*E.coli*、*K.pneumoniae*は24時間後の判定でBGLB発酵法、ルシフェラーゼ反応ともに強陽性を示した。

*B.subtilis*ではBGLB培地により増殖が阻害されるため、菌自体はβ-ガラクトシダーゼを持つものの、ガス貯留による発酵の形跡はなく、ルシフェールCT150による発光も見られなかった。CT150の判定を2時間延長して測定したが、発光量は増加しなかった。

表3. 大腸菌等を接種した粉ミルク液のBGLB培地判定結果とルシフェールCT150判定の相関

接種供試菌種	BGLB培地		ルシフェールCT150		
	培養時間	ガス発生	RLU(S)	S/N	判定
<i>E. coli</i> IFO3301	4 h r	—	632	1.7	±
	8	±	19,241	53.2	+++
	24	+++	631,925	1,745.6	+++
<i>K. pneumoniae</i> IFO3318	4 h r	—	492	1.3	—
	8	±	1,096	3.0	+
	24	+++	5,281	14.5	+++
<i>B. subtilis</i> IFO3134	4 h r	—	408	1.1	—
	8	—	401	1.1	—
	24	—	446	1.2	—
Blank(N)			362		
陽性対照			129,980	126.0	+++

注) Blank：反応液200μlにBGLB培地・ミルク混合液を5μl混和
 CT150反応：培養液5μl混和、35℃、20分保持
 培地1ml中の接種菌量：約 10^2 /ml
 —～+++：—は陰性、±は疑陽性、+～+++は陽性

Ⅲ. 考 察

加工食品には微生物学的規格基準とそのための公定検査法が定められているものが多い。一方、食品企業では安全性確保を目的に、HACCP, ISOによる認承を受け、食品原材料をも含め、日に日に広域化する食品流通に対しトレーサビリティの対応もはかっている。そうした中で強く求められるのが検査の簡易・迅速化である。製品の出荷を行うにも、微生物検査結果を得るまでに必要とする日時が非常に長いのが一つの大きな隘路になっているのが現状で、その為の簡易試験法も検討されてきた。しかし、日常の出荷検査において公定法を無視することは出来ない。

著者は大腸菌群の検査において公定法を踏まえながら、キッコーマン株式会で開発したルシフェールCT150を公定法の手法の中に組み入れ、検査の迅速化・簡便化を計った。

公定法である食品の大腸菌群検査においては乳製品を対象にしたBGLB発酵法、冷凍食品を対象としたデオキシコレート法がある。上門ら⁵⁾はBGLB培地およびバイオルミネッセンス法の大腸菌群検出一致率は80~90%であったと報告している。また、辰巳ら⁶⁾はデオキシコレート法とルシフェラーゼ法を組み合わせた実験を行い、培養から判定にいたる時間の短縮を図っている。

今回、著者はBGLB発酵法とルシフェラーゼによる法の組み合わせを検討し、両者の実験目的を十分はたすと同時に、検査の迅速化・簡便化さらに、検査結果の確実性を高めることが出来た。また、BGLB培地の培地組成としての胆汁はルシフェラーゼ活性に強い阻害作用のあることを明らかにした。

まず、培地組成成分の影響についてみると、グラム陽性菌に強い増殖阻害作用のあるブリリアントグリーンは全く発光作用に影響をおよぼさなかった。上門ら⁵⁾は乳製品へのルシフェラーゼ応用に際し、乳糖が影響することを報告している。著者の成績においてもBGLB培地中の乳糖がその傾向を示していたが、極端なものではなかった。ペプトンも僅かではあるが反応の阻害があった。しかし、結論としてBGLB培地による培養液の最大量5μlまでの添加はルシフェールCT150による測定上に殆んど影響しない

と判断した。

次いで各種のグラム陰性菌、グラム陽性菌をBGLB培地に $10^7 \sim 10^8$ 位/mlになるように懸濁し、BGLB培養液の無影響量と判断された5μlをルシフェリンCT150液に加え、ルシフェラーゼ反応を観察した。

グラム陰性の大腸菌群はβ-ガラクトシダーゼの作用により乳糖をブドウ糖とガラクトースに分解し、さらにブドウ糖は腸内細菌が共通に持つブドウ糖分解作用により発酵的に分解し、ガスと酸を産生する。ルシフェリンCT150はその第1段階とも言うべきβ-ガラクトシダーゼ活性を測定するものであるが、供試した大腸菌群のうち*E.coli*は最も活性が強く、次いで、*K.pneumoniae*, *E.aerogenes*の順であった。

なお、グラム陽性である*B.subtilis*のルシフェラーゼ反応は陽性を示し、生化学的性質としてβ-ガラクトシダーゼを持つ菌として確認された。

次に食品に大腸菌群の汚染が合った場合を想定し、*E.coli*, *K.pneumoniae* およびルシフェラーゼ反応陽性を示した*B.subtilis*を粉ミルク液に 10^2 /mlに接種し、実験した。その結果、BGLB培地による大腸菌群の8時間培養後のダーラム管には十分なガスの貯留はなかったが、ルシフェラーゼ反応では明らかに陽性を示し、検査開始後、ほぼ8時間後に大腸菌群の存在が確認された。

培養24時間後はBGLB発酵法およびルシフェリンCT150を用いた両者の方法において大腸菌群強陽性と判断された。

*B.subtilis*を接種したミルクでは24時間後も結果は陰性であった。*B.subtilis*はβ-ガラクトシダーゼはもっているが、BGLB培地中ではグラム陽性菌のため増殖阻害によってルシフェリンCT150の反応も陰性になったと考える。

なお、著者は食品の検査においてBGLB培地を発酵し、ガス産生したにも関わらず、EMB培地により菌を分離しえない場合が多々あることを経験している。恐らくBGLB培地によるグラム陽性菌の阻止作用が何らかの理由で失活し、大腸菌群以外のβ-ガラクトシダーゼを持つ菌が増殖した可能性を考えているが、今後、その原因を明らかにしてゆきたい。

IV. 結 論

大腸菌群検査においてBGLB発酵法とルシフェリンCT150を用いる法を組み合わせる実験し、良好な結果を得た。次に実験の目的を踏まえた概要を述べる。

- ① 大腸菌群検査の迅速化をはかることができた。
- ② 大腸菌群検査結果の信頼性を高めることができた。
- ③ BGLB培地の組成成分である胆汁はルシフェラーゼ反応を阻害した。

本論分の一部は第86回日本食品衛生学会（平成15年10月）にて発表した。

参考文献

- 1) 伊藤 武監修：食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった！サイエンスフォーラム、31～35, 145～149, 266～271 (2002)
- 2) Apte,S.C. and Bately,G.E.： Rapid detection of sewage contamination in marine water using a furuorimetric assey of beta-galactosidase activity. Science of Total Envioment. 141, 175-180(1994)
- 3) Fiksdal.L., Pommepuy.M., Caprass,M.P. and Middtum I.： Monitoring of Fecal pollution in coastal water by use of rapid enzymatic techniques. Applied Enviromental Microbiology 60,1581-1584(1994)
- 4) Msuda-Nisimura I Fukuda S., Sano A., Kasai K. and Tatumi H.： Developument of a rapid positive absent test for coliforms using sensitive bioluminescence assay, The Society for Applied Microbiology, 30, 130-135(2000)
- 5) 上門英明、大島 晶、青木史樹、杉本康子、大西 薫、遠藤光春、宮本敬久、飯尾雅嘉；バイオルミネッセンス法による大腸菌群の迅速検出に及ぼす飲用乳成分の影響と公定法との相関、防菌防黴、31, 4, 183-190 (2003)
- 6) 辰巳宏樹、福田 賢；大腸菌群検査キット「ルシフェールTMCT150」の簡易化と応用例、第