

2 残留抗生物質検査に用いる感受性測定用ブイオンの代替培地の改良について

○山口 麻綾, 佐々木 秀樹, 額田 優花, 関 浩

1. 目的

当所では厚生労働省通知「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法」[1]に示された検査法(以下「検査法」)に従い、食肉中の残留抗生物質検査を実施している。この「検査法」では *Micrococcus luteus* ATCC9341(現菌名 *Kocuria rhizophila*) (以下 ML) の増殖用液体培地として「感受性測定用ブイオン(以下 STB)(日水製薬)またはこれと同等の培地」を用いることが規定されている。しかしながら、平成 24 年 9 月に STB は終売となり、各自治体で「STB と同等の培地」(以下、代替培地)の選定について検討されてきた。STB はミューラーヒントンブロス(以下 MHB)を改良したものであり、代替培地として MHB が有用であるとの報告[2]があったことから、当所においても MHB の採用を検討したが、培養によって菌塊が形成され、結果判定に影響が生じていた。今回、MHB に界面活性剤を添加したところ良好な結果が得られたため、その概要を報告する。

2. 材料及び方法

(1)材料

STB と MHB への界面活性剤の添加の有無或いは、界面活性剤の種類(Tween80 又は Tween20)及びその添加濃度により 6 種類の液体培地(表 1)を試験に供した。なお、表 1 の添加物のカッコ内は培地における最終濃度を示している。

表 1 比較検討培地

	基礎培地	添加物(最終濃度)
①	感受性測定用ブイオン(STB)	無
②	ミューラーヒントンブロス (MHB)	無
③		Tween80 (0.1%)
④		Tween80 (0.2%)
⑤		Tween20 (0.1%)
⑥		Tween20 (0.2%)

(2)方法

1. 各液体培地における菌数の推移

常法に従い、各種類の液体培地に ML を接種し、それぞれ 3 回継代を行い、各培養段階(f1, f2, f3)における菌数の推移を OD620nm における吸光度を計測することにより観察した。また、f3 の培養液を 10^{-1} から 10^{-7} まで 10 倍階段希釈を行い、各希釈液を用いてミスラ法[3]により生菌数を測定した。なお、同操作を 5 回を行い、各液体培地における吸光度及び f3 の生菌数の平均値と変動係数を算出した。

2. 混積平板培地における阻止円の直径

1.において結果が良好であった液体培地の f3 の培養液を用いて平板培地(Antibiotic Medium5 (BD)使用)を作成した。作成直後の平板培地と作成から2週間経過後の平板培地にアンピシリン(0.025 $\mu\text{g/ml}$ に調整)含有のペーパーディスクを置き、30°C18 時間培養後、阻止円の直径を測定し

た。同操作を5回行い、平均値と変動係数を算出した。

3. 結果

(1) 各液体培地における菌数の推移

f3まで継代した結果、②でのみ菌塊が生じた。f1からf3の吸光度の推移を図1に示した(n=5)。f1において、②が最も吸光度が低く菌数が少なかった。また、①及び③から⑥はf1からf2にかけて菌数が大きく減少しているのに対し、②のみf1とf2で菌数の大きな差はみられなかった。③から⑥についてはf1からf3にかけて同じような吸光度の減少であるのに対し、①はそれらよりもやや菌数が少ない結果となった。表2にf3における吸光度の変動係数を示した。①が最も小さく2.1%、②が最も大きく10.5%となった。f3における生菌数を算出した結果を表3に示した(n=5)。最も生菌数が多かったのは④で 3.8×10^7 CFU/ml、最も少なかったのが①で 1.3×10^7 CFU/mlであった。また、変動係数が最も小さかったのは⑥で6.7%、最も大きかったのは②で28.0%であった。

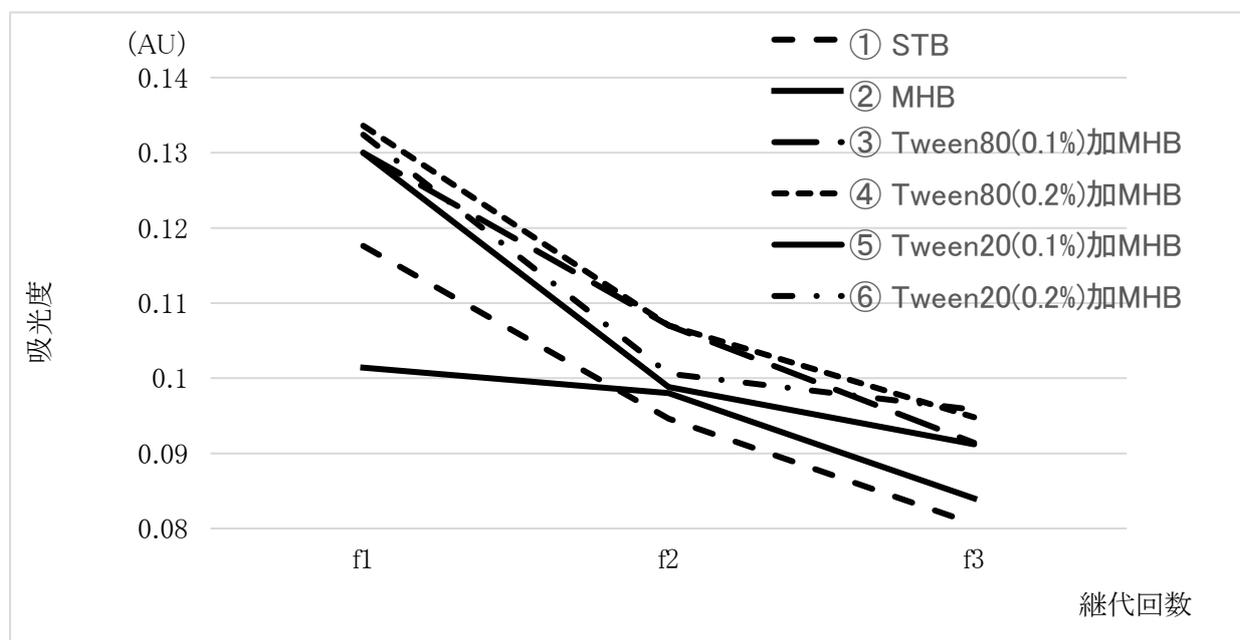


図1 f1からf3における吸光度の推移

表2 吸光度測定時の
f3における変動係数

培地	変動係数(%)
①	2.1
②	10.5
③	3.7
④	6.7
⑤	3.4
⑥	8.6

表3 f3における生菌数

培地	生菌数(CFU/ml)	変動係数(%)
①	1.3×10^7	11.4
②	2.3×10^7	28.0
③	3.5×10^7	9.4
④	3.8×10^7	9.5
⑤	2.1×10^7	27.5
⑥	2.9×10^7	6.7

(2) 混積平板培地における阻止円の直径

(1)の結果より、変動係数が比較的小さかった Tween80(0.1%)加 MHB の培地を用いて平板培地を作成し、作成直後と作成から2週間後の阻止円の直径を比較した(図2, n=5)。エラーバーは標準誤差を表す。作成直後の阻止円の直径は平均 12.68mmであり、作成から2週間経過後では平均 14.81mmと約2mm 阻止円が大きい結果となった。変動係数は作成直後で 5.3%, 作成から2週間後で 2.1%となった。

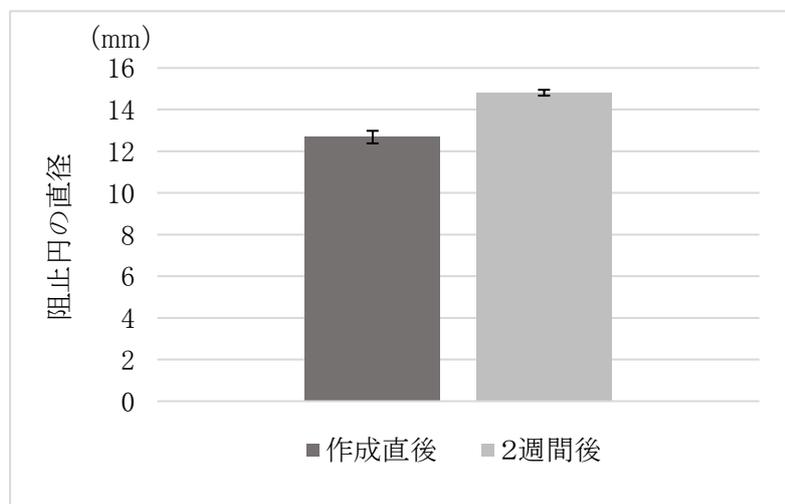


図2 阻止円の直径の比較

4. 考察

常法では3回の継代により混積する菌数をある程度揃えるため[4]、混積平板培地を作成する際に3回継代を行った培養液を平板培地に加える操作となっている。そこで、増殖用液体培地を3回継代したときの菌数の安定性を評価することとした。

代替培地として有用であると報告のあった MHB のみの培地は、f3 で菌塊が生じ、f1 における菌数が他の培地と比較して少なく、吸光度と生菌数のどちらにおいても変動係数が最も高かったことから、菌の増殖にばらつきが大きく、当所でSTBの代替培地として用いるには適していないと考えられた。

一方、Tween80(0.1%)加 MHB は f3 で菌塊を生じることなく、f1 から f3 における菌数の推移が STB と同様であり、且つ吸光度と生菌数のどちらにおいても変動係数が比較的小さかったことから、同培地内で菌の増殖にばらつきが小さいことが分かった。「検査法」では、平板培地作成直後にアンピシリン(0.025 μg/ml)含有のペーパーディスクを置き、30°C18 時間培養後の阻止円の直径は 14±1mm を示さなければならないとされている。本検討では培地作成直後の阻止円の直径が平均 12.68mm とその範囲から逸脱した結果となったが、おおむね近い結果となった。さらに、平板培地作成から2週間後の阻止円の直径は平均 14.81mm と検査法に示された範囲内であり、且つ変動係数が小さかったことから、平板培地は作成2週間後も使用可能であると考えられた。また、阻止円の直径が 14±1mm の範囲に収まるには f3 の培養段階で 10^{6.8}~10⁸ の菌数が必要であり、且つ培養時間が 18~24 時間必要との報告[2]がある。同培地の菌数は 3.5×10⁷CFU/mlとその範囲内ではあるものの培養時間は 18~24 時間の間で毎回ばらつきがあった。今後、Tween80(0.1%)加 MHB が STB の代替培地として利用可能であるか、培養時間の検討などさらに詳細な検討を行う必要があると考える。

5. 引用文献

- [1]厚労省通知平成6年7月1日付け衛乳第107号(別添2)「畜水産食品中の残留抗生物質簡易検査法(改訂)」
- [2]中野由佳子ら:残留抗生物質検査法における増殖用液体培地の検討,北海道獣医師会雑誌,第58巻第8号,385(2014)
- [3]坂崎利一,吉崎悦郎,三木寛二:新 最近培地学講座一上一 <第二版>,183-192(1986)
- [4]全国食肉衛生検査所協議会 微生物部会:第14回 微生物部会総会研修会資料,34(1994)