

平成30年3月31日

徳島県立工業技術センター所長 殿

住 所 徳島県板野郡松茂町中喜来

字福有開拓308-6

氏 名 株式会社アクティス

代表取締役 後藤 仁



研究結果報告書

研究が終了しましたので、徳島県技術シーズ創出調査事業実施要綱第17条の規定により、次のとおり報告します。

1 研究題目名 バイオフィルム検査用スワブの開発

2 結果報告 (別紙1の結果報告のとおり)

結果報告

1 研究の経過

(1) 日程

平成 29 年 6 月 1 日から平成 30 年 3 月 31 日

(2) 実績

目的

食品工場等、衛生管理が必要な製造現場ではスワブを用いた微生物検査が活用されている。しかし、従来のスワブでは固着したバイオフィルムを十分に拭き取ることができず、他の方法でも拭き取りに多くの労力と時間を要しているのが現状である。本研究では、固着したバイオフィルムの拭き取りに適したスワブを開発することで、迅速・簡便な微生物検査の実現を図る。

材料及び方法

1) 使用スワブ

バイオフィルム検査用スワブとして試作した CS-50 を用いて試験を行った。また、対照品として ST-25(楸エルメックス)を用いた。今回使用したスワブの形状を図 1 に示した。

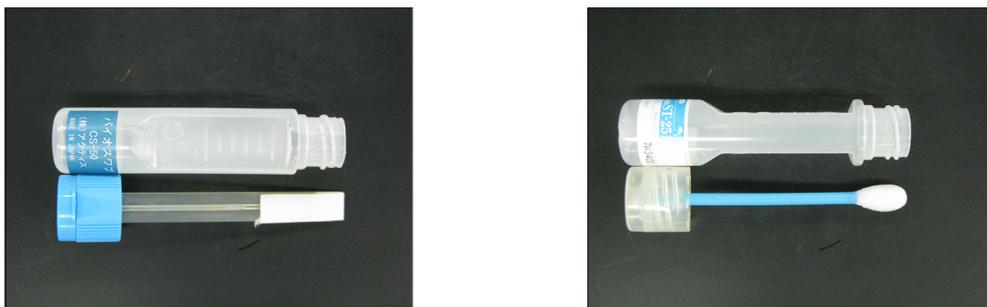


図 1 スワブの形状 (左: CS-50, 右: ST-25)

2) 使用菌株

Escherichia coli NBRC 3972 について、TSB 培地で 28℃、1 日間振盪培養した。*Lactobacillus plantarum* NBRC 3070 については MRS 培地にて 35℃、2 日間静置培養した。

3) *E.coli* を用いたバイオフィルムの形成方法

シャーレに 0.5%うるち米抽出液を 15 mL 滴下し、30 分間静置することでコーティングを行った⁽¹⁾。シャーレを滅菌水 15 mL で 2 回洗浄した後、生理食塩水で 10^3 cfu/mL まで希釈した *E.coli* を 15 mL 加え、30 分間静置した。その後シャーレを生理食塩水 15 mL で 3 回洗浄して、EMB 培地を加えて 35 °C で 1 週間培養した。培養後、培地を静かに除いた。

4) *L.plantarum* を用いたバイオフィルムの形成方法

シャーレに 0.5%うるち米抽出液を 15 mL 滴下し、30 分間静置することでコーティングを行った。シャーレを滅菌水 15 mL で 2 回洗浄した後、生理食塩水で 10^3 cfu/mL まで希釈した *L.plantarum* を 15 mL 加え、30 分間静置した。その後シャーレを生理食塩水 15 mL で 3 回洗浄して、MRS 培地を加えて 35 °C で 1 週間培養した。培養後、培地を静かに除いた。

5) スワブの回収時間検討

スワブのバイアルに滅菌水 10 mL を加えた。*E.coli* のバイオフィルムを形成させたシャーレを用いて、5 cm×5 cm 四方のエリアを 500 g 程度の力で縦に 5 回、横に 5 回拭き取りを行った⁽²⁾。スワブをバイアルに入れて、30 秒、1 分、1 分 30 秒、2 分の条件でボルテックスミキサーを用いて攪拌し、細菌の内容液への回収を行った。バイアルの内容液約 3 mL について、分光光度計 (UV-1200 (株)島津製作所) を用いて測定した。測定波長は、EMB 培地に含まれるエオシンの吸収波長である 515 nm を用いた。

6) 吸光度測定によるバイオフィルム拭き取り試験

E.coli のバイオフィルムを形成させたシャーレを用いて、5 cm×5 cm 四方のエリアを 500 g 程度の力で縦に 5 回、横に 5 回拭き取りを行った。スワブをバイアルに入れて、1 分間攪拌した。バイアルの内容液約 3 mL について、分光光度計を用いて 515 nm の測定波長で吸光度を測定した。

7) 菌数測定によるバイオフィルム拭き取り試験

L.plamtarum のバイオフィルムを形成させたシャーレを用いて、5 cm×5 cm 四方のエリアを 500 g 程度の力で縦に 5 回、横に 5 回拭き取りを行った。スワブをバイアルに入れて、1 分間攪拌した。バイアルの内容液を適宜希釈し、MRS 培地と混釈して 35 °C で 2 日間培養した後、菌数を測定した。

結果

1) バイオフィルムの形成

E.coli 及び *L.plantarum* を用いてバイオフィルムの形成を行った。写真を図 2 に示した。

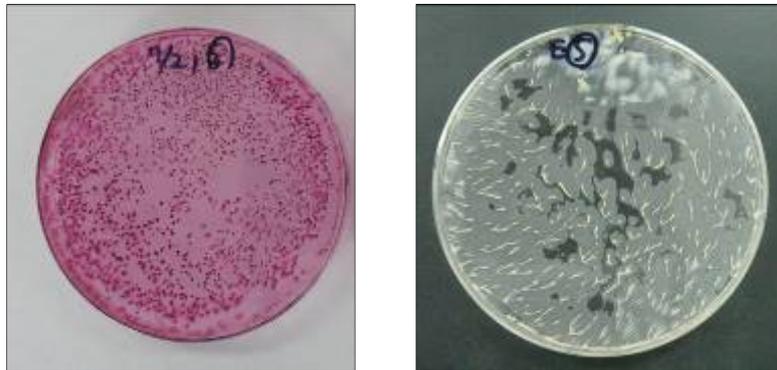


図 2 バイオフィルム（左：*E.coli*、右：*L.plantarum*）

2) 回収時間の検討

E.coli のバイオフィルムをスワブで拭き取りバイアルに入れ、内容液と攪拌する時間（回収に要する時間）の最適化を行った（図 3）。CS-50 について、1 分間の攪拌時間で吸光度は最大値を示した。この結果より、攪拌時間を 1 分間として試験を行うことにした。

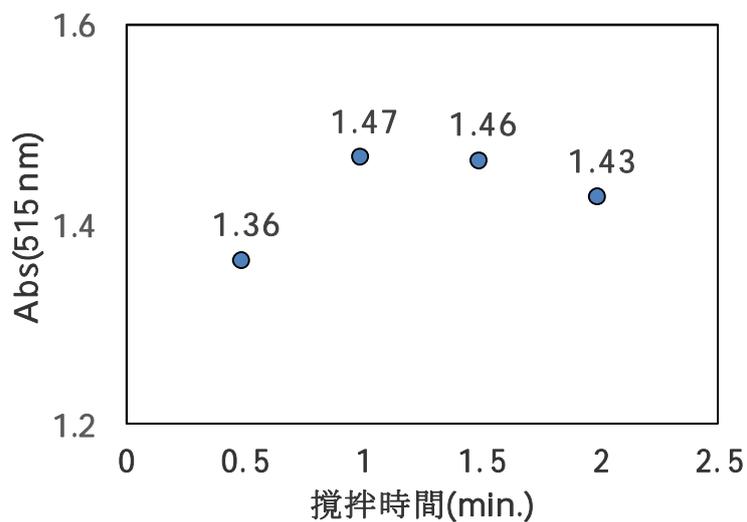


図 3 回収時間の検討

3)吸光度測定によるバイオフィルム拭き取り試験

E.coli のバイオフィルムに対して拭き取りを行い、内容液の吸光度を測定した(図 4)。CS-50 は ST-25 よりも高い吸光度を示し、バイオフィルムを効率的にサンプリングしていることが示唆された。

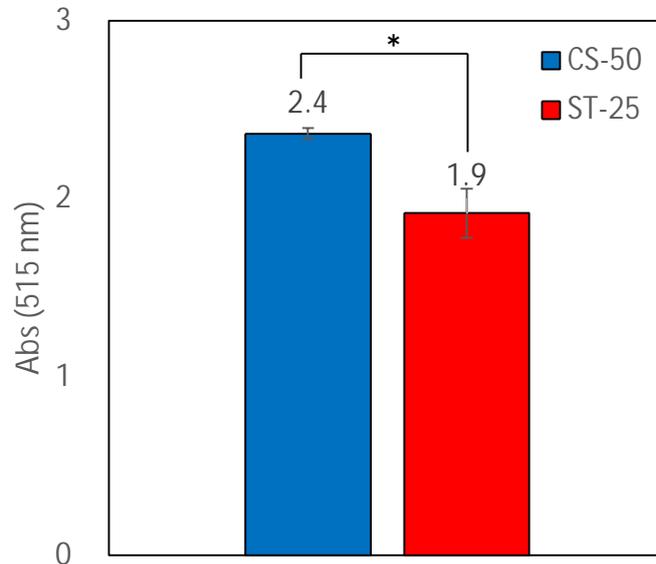


図 4 吸光度測定によるバイオフィルム拭き取り試験(n=3, *:p<0.05)

4)菌数測定によるバイオフィルム拭き取り試験

L.plantarum のバイオフィルムに対して拭き取りを行い、内容液の菌数を培養法により確認した(図 5)。CS-50 は ST-25 よりも約 10 倍の菌数をサンプリングすることができた。また、*E.coli* のバイオフィルムでも同様の試験を行ったが、寒天培地上にコロニーが確認されなかった。

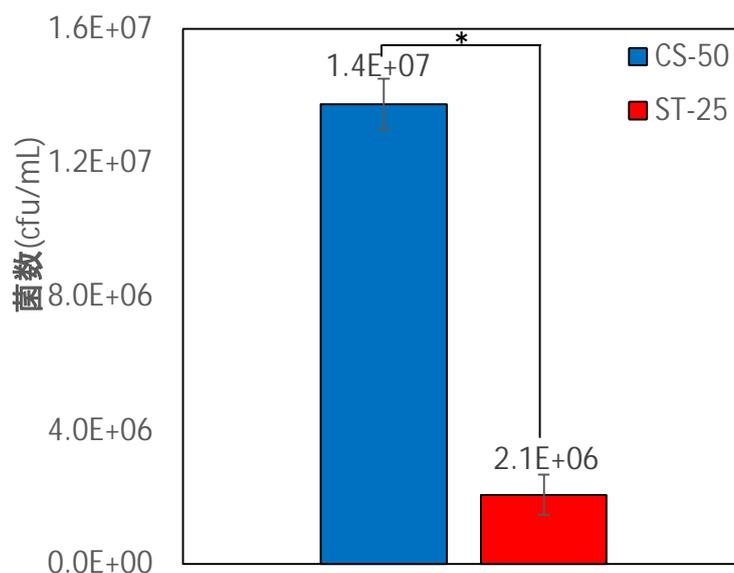


図 5 菌数測定によるバイオフィルム拭き取り試験(n=4, *:p<0.05)

まとめ

スワブを用いたバイオフィルムの拭き取りについて、吸光度と菌数で評価を行ったところ、CS-50はST-25よりも効率的にサンプリングができることが示された。

参考文献

- (1) 酒井 仁美, 酒井 徹, 横井川 久己男 : 調理器具素材への大腸菌の付着に及ぼす穀類の影響, 第37回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集, 111, 2016年9月.
- (2) Yamaguchi, N., H. Hieda, and M. Nasu. Simple and Reliable Swabbing Procedure for Monitoring Microbes in the International Space Station. *Eco-Engineering*. 22(1) 27-30. (2010)

【補足 1】 図 4 の統計処理について

吸光度測定によるバイオフィルム拭き取り試験の結果は表 1 の通りであった。t 検定を行ったところ、p 値は 0.05 以下であったので、有意差とみなすことができた(図 4)。

表 1. 吸光度測定によるバイオフィルム拭き取り試験の結果

スワブ	n=	吸光度	平均	標準誤差
CS-50 (アクティス)	1	2.36	2.36	0.032
	2	2.42		
	3	2.31		
ST-25 (エルメックス)	1	1.65	1.92	0.137
	2	2.01		
	3	2.10		

【補足 2】 図 5 の統計処理について

菌数測定によるバイオフィルムの拭き取り試験は n = 5 で実施した。結果は表 2 の通りであった。この結果に対して棄却検定 (Q 検定) を行ったところ、CS-50 の最小値、ST-25 の最大値は異常値として棄却できることがわかった。また、異常値棄却後のデータで t 検定を行ったところ、p 値は 0.05 以下であったので、有意差とみなすことができた(図 5)。

表 2. 菌数測定によるバイオフィルム拭き取り試験結果（棄却検定前）

スワブ	n=	菌数(cfu/mL)	平均 (棄却検定前)	平均 (棄却検定後)	標準誤差
CS-50 (アクティス)	1	1.2E+07	1.2E+07	1.4E+07	8.5E+05
	2	1.3E+07			
	3	1.6E+07			
	4	3.5E+06			
	5	1.4E+07			
ST-25 (エルメックス)	1	3.2E+06	5.5E+06	2.1E+0.6	6.7E+05
	2	1.9E+07			
	3	1.8E+06			
	4	2.8E+05			
	5	3.0E+06			

※赤字の結果は Q 検定で棄却した。

（3）成果

本研究で得た成果を下記にまとめた。

- ①スワブでバイオフィルムを拭き取った後の回収時間は、1 分間が最適であった。
- ②吸光度測定によるバイオフィルム拭き取り試験では、CS-50 は ST-25 よりも高い吸光度を示し、バイオフィルムを効率的にサンプリングしていることが示唆された。
- ③菌数測定によるバイオフィルム拭き取り試験では、CS-50 は ST-25 よりも約 10 倍の菌数をサンプリングすることができた。
- ④本研究で開発したスワブは「バイオスワブ CS-50」として現在発売中である。更に、クリーンルーム仕様にした「バイオスワブ CS-60C」も現在販売中である。