L1903-14

バイオフィルム検査用スワブの評価

アース環境サービス㈱　矢野　圭介／㈱エルメックス　佐藤　拓耶／㈱アクティス　後藤　仁
エヌ・ティ・ティ・エイ・ティ・クリエイティブ㈱　脇田　美幸／大阪大学　那須正夫
徳島県立工業技術センター　岡久　修己・西岡　浩貴／徳島大学　横井川　久己男

はじめに

近年、食品などの製造工場においても、「バイオフィルム」という言葉がよく聞かれるようになった。バイオフィルムとは、細菌などの微生物が、その微生物がつくる細胞外多糖（EPS：extracellular polysaccharide）やその他の有機物でできた粘性のある物質と複合体を形成し、固体表面に固着した生物膜である。流し台や浴室内のヌメリなど、一般家庭でも水回りでしばしばお目にかかるものであるが、食品などの製造工場においても、配管内やホース類をはじめ、床、壁、排水溝、コンベアなど、工場内のあらゆる箇所で形成される。これが食品工場で問題視される理由は、バイオフィルムの中の微生物が熱や除菌剤、殺菌剤に対して、通常よりも強い抵抗性を有することにある。そのため、除菌剤や殺菌剤を通常の適用条件で使用しても、これらの微生物を排除できない可能性があり、製品の微生物汚染の原因となる事例が見受けられる。したがって、食品製造工場にとってバイオフィルム形成の有無、およびそこに存在する微生物を把握することは、適切な洗浄殺菌方法の選定、ひいては製品自体の安全性を確保するために極めて重要である。

開発の経緯

製造環境の微生物汚染をできるだけ正確に把握するためには、適切な方法で環境付着菌をサンプリングすることが求められる。食品工場における環境付着菌調査の主なサンプリング手法としては、スタンプ式培地を用いたコンタクトプレート法と、拭き取り法の二つがあげられる。このうち拭き取り法は凹凸のある面や曲面にも対応可能で、広い面積が採取できること、さらに比較的回収率が高いことから、より正確な菌数測定が可能な方法である。拭き取り材としては滅菌した綿棒が汎用されており、滅菌希釈水と一体となった簡便な拭き取り用キットなども市販されている（写真１：㈱エルメックス製ST-25PBS）。ただし綿棒では強く擦ると折れてしまうことがあり、バイオフィルムが固着している箇所のサンプリングでは、バイオフィルム上面を擦るだけになりその中の微生物まで採取ができず、菌数が過少評価されてしまうことが懸念される。そのような場合には、滅菌ガーゼなどを拭き取り材として、滅菌ピンセットなどを使って強く擦り取ることで、回収率を高めることは可能である。ただしこの方法は、作業が非常に煩雑になりサンプリングに時間を要するというデメリットがある。そこで、拭き取りキットと同様な簡便な取り扱いが可能で、かつ回収率を高めた新たな採取用器具「バイオスワブ」について、その有効性を評価した。

バイオスワブの特徴

バイオスワブ（製造元：㈱アクティス、販売元：㈱エルメックス）は、前述のST-25PBSと同様に滅菌希釈水と拭き取り器材が一体になった拭き取りキットである（写真２）。大きな特徴は、綿棒の軸に当たる部分が板状になっていることで、これがしなることにより、綿棒のように強い荷重をかけても折れることなくサンプリングが可能になる

写真１

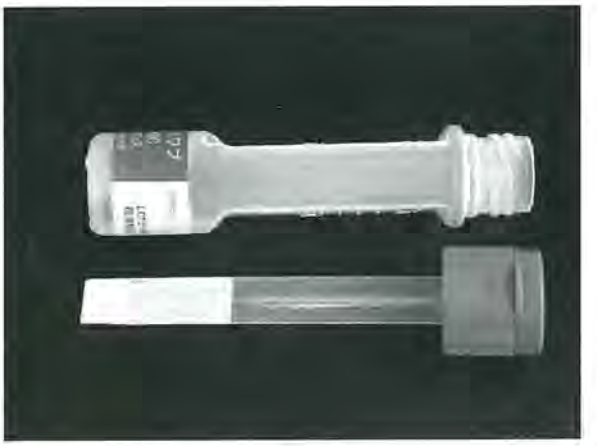

写真２

(写真３)。もう一つの特徴は、綿球に当たる部分が扁平なヘラ状になっていること（写真４)、繊維径約2 μmのマイクロファイバ（写真５）を使用していることである。これにより、バイオフィルムを「掻き取る」ことができ、綿棒と比較して高い回収率が得られることが期待される。このバイオスワブが、実際にバイオフィルムが形成されている場合の生菌数測定に有効かどうかを評価するため、以下の評価試験を行った。

写真３

写真４

写真５

評価試験手順

(1) バイオフィルムの回収率試験手順

腰高シャーレに5 cm×5 cmの試験片１枚を入れ、1/2濃度のSCD液体培地（日水製薬㈱製、製品コード05630）30 mLを加えた。そこに同じ培地で前培養した供試細菌１種を、およそ10^3 cfu/mLの濃度になるよう接種して、30～35 ℃で７日間静置培養を行い、試験片の表面にバイオフィルムを形成させた。試験片はステンレス、ポリプロピレンの２種類を用いた。また供試細菌としては、*Staphylococcus epidermidis* ATCC35984株、*Brevundimonas diminuta* NBRC14213株および*Pseudomonas aeruginosa* NBRC13275株の３種類を用いた。培養後、試験片を取り出して水洗、乾燥後、0.1％クリスタルバイオレット溶液に30分間浸漬して、試験片表面に形成されたバイオフィルムを染色した。クリスタルバイオレッド溶液から試験片を取り出して水洗・乾燥後した。この試験片の表面（片面のみ）を、バイオスワブおよび比較対照の綿棒（拭き取りキットST-25PBS）で、試験片表面を可能な限り強い荷重をかけて、縦20回、横20回拭き取った。これをエタノール（99.5％）で洗い出し、分光光度計（㈱島津製作所製UV-1850）にて585 nmにおける吸光度を測定して、回収されたバイオフィルム量の相対値として評価した。各試験区（試験片と細菌の組み合わせ）の繰り返し試験回数は８回とした。

(2) 生菌の回収率試験手順

ポリスチレン製のシャーレ（直径90 mm）に、0.5％うるち米袖出液を15 mL滴下して、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*Lactobacillus plantarum* NBRC3070株の菌液15 mLを加え、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液体培地を加えて35 ℃で１週間培養した。培養後、培地を静かに除いた。このシャーレの5 cm×5 cm四方のエリアを、バイオスワブおよびST-25PBSを用い、可能な限り強い荷重をかけて、縦20回、横20回拭き取った。スワブを滅菌希釈水の入ったバイアルに戻し、ボルテックスミキサーで１分間撹拌した。バイアルの内容液を10倍段階希釈し、MRS培地と混釈して35 ℃で２日間培養し、菌数を測定した。繰り返し試験回数は５回とした。

結果

(1) バイオフィルムの回収率試験結果

前述のとおり、バイオスワブは綿棒（ST-25PBS）と異なり軸の部分が板状になっており、その「しなり」を利用し、約500 gの荷重をかけることが可能であった。一方、ST-25PBSでかけられた荷重は約300 gであった。染色したバイオフィルムに対して拭き取りを行い、エタノールで洗い出した後、吸光度（585 nm）を測定した。試験片にステンレスを用いた場合の結果を表１および図１に、ポリプロピレンを用いた場合の結果を表２および図２に示した。すべての試験区（試験片と細菌の組み合わせ）で、バイオスワブで拭き取った場合の吸光度の値が、対照（ST-25PBSで拭き取り）の値を上回った。t検定を行った結果、すべての試験区でp値が0.05を下回り、有意差があると考えられた。

(2) 生菌の回収率試験手順

*L. plantarum*のバイオフィルムに対して拭き取りを行い、ボルテックスミキサーで撹拌した後の希釈水中の生菌数

表1

		吸光度平均（585 nm）		標準誤差	
材質	菌株	バイオスワブ	ST-25PBS	バイオスワブ	ST-25PBS
ステンレス	*B. diminuta*	2.9438	1.9663	0.1451	0.2283
	P. aeruginosa	2.8094	2.0756	0.2459	0.2201
	S. epidermidis	2.5484	1.1528	0.2506	0.0892

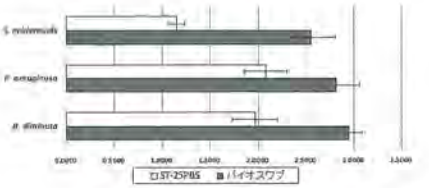

図1

表2

		吸光度平均（585 nm）		標準誤差	
材質	菌株	バイオスワブ	ST-25PBS	バイオスワブ	ST-25PBS
ポリプロピレン	*B. diminuta*	2.8960	2.0686	0.2138	0.2604
	P. aeruginosa	2.6919	1.7085	0.3269	0.2759
	S. epidermidis	3.1161	2.4229	0.1077	0.2982

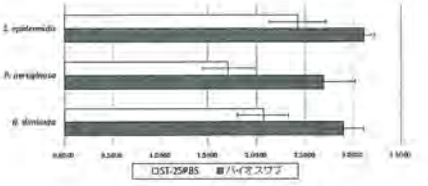

図2

表3

		菌数平均		標準誤差	
材質	菌株	バイオスワブ	ST-25PBS	バイオスワブ	ST-25PBS
ポリスチレン	*L. plantarum*	1.4E+07	2.1E+06	7.6E+05	6.0E+05

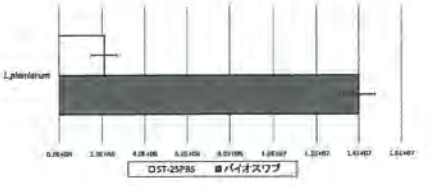

図3

を培養法により確認した。その結果を表3および図3に示した。バイオスワブでは、対照の綿棒（ST-25PBS）と比較して、約10倍の生菌数が得られた。t検定を行った結果、p値が0.05を下回り、有意差があると考えられた。

おわりに

本試験で、特に生菌数の試験において綿棒と比較して有意に差が認められたことは、回収率の違いももちろんであるが、拭き取り材がマイクロファイバーで編まれたニットであることから、綿棒の綿球と比較して、捕集した微生物を希釈水中にリリースしやすい特徴があると推察された。本試験の結果からバイオスワブは、製造ラインなどに固着したバイオフィルムを形成する微生物の採取、ひいては製造環境における微生物汚染状況をより適格に評価するために有用な採取キットであると判断された。

筆者紹介

矢野圭介
アース環境サービス㈱
彩都総合研究所分析センター
副センター長

佐藤拓耶
㈱エルメックス

後藤　仁
㈱アクティス
代表取締役

脇田美幸
エヌ・ティ・ティ・エイ・ティ・クリエイティブ㈱

岡久修己
徳島県立工業技術センター
食品・応用生物担当　主任

西岡浩貴
徳島県立工業技術センター
食品・応用生物担当　主任研究員

那須正夫
大阪大学　大学院薬学研究科
名誉教授
大阪大谷大学　薬学部薬学科
客員教授

横井川久己男
徳島大学　大学院生物資源産業学域
食品微生物学研究室　教授