

# ビフィズス菌利用食品における菌数測定方法の現状と課題

武藤正達\*, 宮内浩文, 越智 浩, 阿部文明

(森永乳業株式会社 研究本部 素材応用研究所 〒252-8583 神奈川県座間市東原 5-1-83)

## Current status and issues of methods for measuring the viable counts in bifidobacteria-containing foods

Masamichi Muto\*, Hirofumi Miyauchi, Hiroshi Ochi, Fumiaki Abe

(Food Ingredients & Technology Institute, R&D Division, Morinaga Milk Industry Co., Ltd, 5-1-83, Higashihara, Zama, Kanagawa 252-8583, Japan)

### 要旨

ビフィズス菌は乳酸菌と共にプロバイオティクスとして認識され、様々な製品に添加されている。ビフィズス菌の生菌数値は生理効果の指標として使用され、ラベルに記載されるため、製造会社は賞味期限時までビフィズス菌の生菌数を維持する必要がある、安定して菌数値を計測することができる菌数測定技術が求められている。本稿では、まずビフィズス菌の菌数測定技術に関して、重要な因子である寒天培地と希釈液の選択を中心に説明する。次に、近年分析法は国際的な標準法が次々に制定されるようになり、ビフィズス菌の生菌数測定法に関しても2010年に国際標準法が発行されているため、ここではビフィズス菌数測定に関する国際標準法ならびに日本におけるガイドライン制定の動きについて紹介する。最後の項では、近年ビフィズス菌数測定法に求められている技術として、高精度な菌数測定を行うために注意すべき点、菌種もしくは菌株特異的な菌数測定方法、培養法に依存しない新規の計測技術についても触れる。

### 1. はじめに

ビフィズス菌は1899年にパスツール研究所の Tissier 博士により、乳児の糞便から発見された菌で、分類学上は *Bifidobacterium* 属に分類されるグラム陽性桿菌である。発見当初、ビフィズス菌は *Lactobacillus* 属に分類されたこともあり、乳酸菌の一種として認識されている場合もあるが、乳酸菌 (Lactic acid bacteria) は分類学上の名称ではなく、定義の1つに50%以上の乳酸を産生することが挙げられており<sup>1)</sup>、ビフィズス菌は50%以上の乳酸を

産生しないため、乳酸菌の定義から外れる。またビフィズス菌である *Bifidobacterium* 属と乳酸菌の代表格である *Lactobacillus* 属を比較すると、*Bifidobacterium* 属は *Actinobacteria* 門、*Lactobacillus* 属は *Firmicutes* 門に分類され、門の階層から分類学上は異なること、*Bifidobacterium* 属は偏性嫌気性菌に分類され酸素存在下では生育しないが、*Lactobacillus* 属の多くが通性嫌気性菌に分類され酸素存在下においても生育すること、糖代謝による生産物として *Bifidobacterium* 属はビフィズス経路を介して乳酸と酢酸を生産するが、*Lactobacillus* 属は乳酸を生産するホモ乳酸発酵、乳酸に加えて酢酸やエタノールを生産するヘテロ乳酸発酵もしくはその両方の発酵を

\* E-mail: ma-mutou@morinagamilk.co.jp

行うなど、*Bifidobacterium* 属と *Lactobacillus* 属は分類・性質上大きく異なることが分かる<sup>1)</sup>。以上のように、性質が異なることに起因して培養上の差異が生じることから、菌数測定を考える上でビフィズス菌と乳酸菌は区別して考えるべきであり、そのため本稿では両者を区別して扱う。ビフィズス菌を配合した製品は、日本においては1970年代前半からヒトへの健康増進を目的に発売され、現在では発酵乳、乳酸菌飲料、健康食品、海外では育児用粉乳など、様々な製品に添加されるようになっている<sup>2)</sup>。

プロバイオティクスの定義は、2001年にFAO/WHOの合同ワーキンググループにより提唱され<sup>3)</sup>、その後Hillらによって修正された<sup>4)</sup>「適正量を摂取した際に宿主に有用な作用を示す生菌体」という表現が広く用いられ、生理作用を期待するには一定量の生きた菌数を摂取することが好ましいと一般的に考えられている。そのため、配合されたビフィズス菌の品質を評価する指標の一つとして、生菌数値が利用されている。生菌数は、希釈した検体を寒天培地に接種し、培養することにより得られるコロニーをカウントすることにより Colony forming units (CFUs) もしくは個の単位として記載される。培養法によるCFUsは製品のラベルに表示されるため、製造会社は賞味期限時までCFUsを維持することが求められ、ビフィズス菌数を安定的に測定することができる菌数測定法が求められている。

本稿では、製品中に含有するビフィズス菌数測定法について、培養法における寒天培地・希釈液の選択を中心に紹介した後、近年の動向として国際標準法や菌数測定法に関する課題にふれ、最後に培養法以外の新規の生菌数測定方法についても紹介する。

## 2. ビフィズス菌の生菌数測定法の現状

### 2-1 ビフィズス菌数測定法の概略

培養法によるビフィズス菌の生菌数測定法の各工程を図1に示す。まずは、検査に使用する検体がサンプル全体の代表することを目的にサンプルの均質化を行う。次に希釈液を用いて第一段階希釈を実施する。ビフィズス菌は発酵乳や乳酸菌飲料のよう

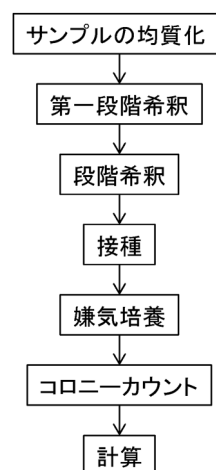


図1 培養法によるビフィズス菌の生菌数測定法の概略図

に液体状態で配合された場合と、カプセルや錠剤などの健康食品や、海外における育児用調製粉乳のように乾燥した粉末状態で配合された場合の二通りの配合形態がある。特に、粉末状態で配合されたビフィズス菌を測定する場合は、第一段階希釈の時に乾燥状態のビフィズス菌の菌体内が再び水分で満たされ、代謝活性を再び取り戻す復水と呼ばれる現象が起きるため、第一段階希釈の条件に注意する必要がある。得られた検液は、希釈液を用いて目的濃度に到達するまで段階希釈を行う。その後、混釈法もしくは塗抹法を用いて菌を接種した後に、ビフィズス菌は偏性嫌気性菌であるため嫌気培養を行い、72時間経過後のコロニー数を計測して生菌数値を計算する。ビフィズス菌数を測定する際に重要となる、測定精度を決定する因子としては、寒天培地と希釈液の選択が挙げられる。

### 2-2 寒天培地

ビフィズス菌の菌数測定に使用する培地は、ビフィズス菌のみを含む製品であるか、発酵乳や乳酸菌飲料のようにビフィズス菌以外に *Lactobacillus* 属などの乳酸菌を含む製品であるかにより種類を変える必要がある。前者の場合には非選択培地、後者の場合には選択培地を使用する。表1にビフィズス菌の菌数測定によく使用される培地一覧を示す。非選択培地としては reinforced clostridial 寒天培地

表1 製品中のビフィズス菌の菌数測定において使用される寒天培地

名称	非選択/選択培地	引用文献
RCM 寒天培地 (RCA)	非選択培地	(5)
BL 寒天培地	非選択培地	(9)
GAM 寒天培地	非選択培地	(8)
mMRS 寒天培地	非選択培地	(11)
TOS 寒天培地	選択培地	(12)
TOS-Mup 寒天培地	選択培地	(15)
WSP-Mup 寒天培地	選択培地	(16)

(RCM 寒天培地もしくは RCA と呼ばれることもある), glucose blood liver 寒天培地 (BL 寒天培地), modified MRS 寒天培地 (mMRS 寒天培地), Gifu anaerobic 寒天培地 (GAM 寒天培地) などを使用する人が多い。それぞれの培地の特徴を挙げると, RCM 寒天培地はクロストリジア属の菌数測定に開発された培地であり<sup>5)</sup>, いくつかの論文においてはビフィズス菌数測定用のコントロール培地として使用されていること, またはビフィズス菌の菌数測定に適しているとの報告があることから<sup>6,7,8)</sup>, 比較的広範囲のビフィズス菌数測定に適していると考えられる。BL 寒天培地は従来の目的としてはウマの脱繊維血液を5%添加した血液入り寒天培地として, 特に日本においてよく使用されてきたが<sup>9,10)</sup>, ビフィズス菌 (*Bifidobacterium* 属のみ) の菌数測定を行う際には脱繊維血液を添加せずに使用される場合もある<sup>8)</sup>。Modified MRS 寒天培地 (mMRS 寒天培地) は *Lactobacillus* などの乳酸菌の培養に開発された MRS 寒天培地に, ビフィズス菌にとって必須アミノ酸である L-システイン塩酸塩を添加した培地である<sup>11)</sup>。ビフィズス菌の液体培養液を用いた継代培養には mMRS 液体培地が頻繁に使用されるが, ビフィズス菌の菌数測定に使用する場合には, ビフィズス菌株によっては mMRS 寒天培地が他の培地と比較して菌数値が低かったとの報告がある<sup>8)</sup>。

一方, 選択培地としては, TOS プロピオン酸寒天培地 (TOS 寒天培地) が挙げられる。TOS 寒天培地は糖源として転移オリゴ糖 (TOS) を含むことが特徴で, ビフィズス菌の資化性が強い一方, 乳酸菌の増殖速度が緩やかなため, コロニーの大きさ

からビフィズス菌と乳酸菌を判別することができる<sup>12)</sup>。また, 抗生物質のムピロシムが *Lactobacillus* 属, *Lactococcus* 属などの乳酸菌の生育を広く抑制する一方, ビフィズス菌のムピロシム耐性が高いことが報告されている<sup>13)</sup>。Serafini らは, ビフィズス菌の Isoleucyl-tRNA 合成酵素 (IleS) に変異が起き, その変異は *Bifidobacterium* 属内で広く保存されているため, ムピロシムが IleS に結合できずに Isoleucyl-tRNA の合成が阻害されないことが, ビフィズス菌の高いムピロシム耐性に寄与している可能性を指摘している<sup>14)</sup>。TOS だけでもビフィズス菌の選択性はあるものの, 乳酸菌によってはある程度の大きさのコロニーが生育することもあるため, TOS 寒天培地にムピロシムを組み合わせた TOS-Mup 寒天培地として使用される場合も多い<sup>15)</sup>。近年, Bunesova らは Wilkins-Chalgren 寒天培地に大豆ペプトン, L-システイン塩酸塩, ポリソルベート80を添加した WSP 寒天培地を開発し, ムピロシムを添加した WSP-Mup 寒天培地を使用することで, 特に従来の選択培地では生育しにくい *B. bifidum* 種の菌数測定において, TOS-Mup 寒天培地よりも高い生菌数値が得られることを報告している<sup>16)</sup>。

### 2-3 希釈液

表2にビフィズス菌の菌数測定によく用いられる希釈液を示す。一般的に広く微生物の希釈操作に使用される塩化ナトリウムを0.85%含有する生理食塩水, ペプトンが添加された加ペプトン生理食塩水, 塩化ナトリウムとリン酸塩が添加された緩衝ペプトン水, 1/4強度リングル溶液などがよく使用されている<sup>15,17)</sup>。日本では光岡らが開発した光岡バッファー, 寒天が省略された改光岡バッファーが使用されてきた<sup>8,9)</sup>。

Roy らはビフィズス菌の菌数測定に使用される様々な希釈液について紹介し, 結論として加ペプトン生理食塩水の使用を推奨している<sup>6)</sup>。Straka らはペプトンの添加濃度を変えた生理食塩水を用いて菌を1時間保持した前後の菌数を比較し, 0.1%以上

表2 製品中のビフィズス菌の菌数測定において使用される希釈液

名称 (引用文献)	各成分 (g/L)
生理食塩水	塩化ナトリウム 8.5
加ペプトン生理食塩水 (17)	塩化ナトリウム 8.5, カゼイン酵素分解物 1.0
光岡バッファー (9)	リン酸二水素カリウム 4.5, リン酸水素二ナトリウム 6.0, L-システイン塩酸塩一水和物 0.5, ポリソルベート80 0.5, 寒天 1.0
改光岡バッファー (8)	リン酸二水素カリウム 4.5, リン酸水素二ナトリウム 6.0, L-システイン塩酸塩一水和物 0.5, ポリソルベート80 0.5
緩衝ペプトン水 (17)	動物組織酵素分解物 10.0, 塩化ナトリウム 5.0, リン酸水素二ナトリウム12水和物 9.0, リン酸二水素カリウム 1.5
1/4強度リングル溶液 (15, 17)	塩化ナトリウム 2.25, 塩化カリウム 0.105, 塩化カルシウム (無水) 0.06, 炭酸水素ナトリウム 0.05

のペプトンが含まれる場合に、1時間保持後の菌の生残率が上昇したことを報告している<sup>18)</sup>。阿部らの検討では、ビフィズス菌8菌種/亜種のそれぞれの基準株に対して、生理食塩水、1/4強度リングル溶液、光岡バッファー、滅菌水を含む9種類の希釈液を用いて菌数測定したところ、光岡バッファーを使用した場合に、安定的に高い菌数値が得られたことを報告している。また、ビフィズス菌を含む市販品9製品に同様の希釈液を用いて、ビフィズス菌の生菌数測定を行ったところ、コロニー数の総平均値は光岡バッファー、加ペプトン生理食塩水、生理食塩水などを使用した時に最も高い値を示し、逆に1/4強度リングル溶液を使用した時は滅菌水に次いでコロニー数値が低くなることが報告されている(図2)。

前述のとおり、粉末状のビフィズス菌を最初に希釈液と混ぜる第一段階希釈では、乾燥状態で休眠している菌に水分が満たされ、菌の代謝が再び活性化される復水と呼ばれる現象が起きる。Mullerらは、ビフィズス菌の第一段階希釈時の希釈液に関し

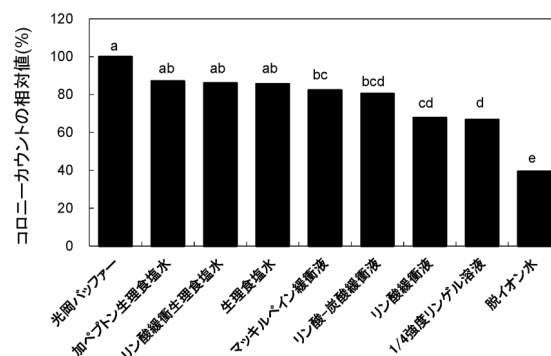


図2 9つのビフィズス菌配合製品をそれぞれの希釈液を用いて菌数測定を実施した時のコロニー数の相対値。図中の英字は有意差を示し、英字が異なると有意差があることを示す( $p < 0.05$ )<sup>8)</sup>。

て、希釈液のpH、希釈液とサンプルを混ぜてからの保持時間、サンプルと希釈液の割合について比較試験を実施し、それぞれ希釈液のpHが低い時、保持時間が長い時、サンプルの割合が高い時に菌数値が低下することを報告している<sup>19)</sup>。筆者らの検討においても、粉末状のビフィズス菌数値は第一段階に使用する希釈液の影響を強く受けることが示されている<sup>20)</sup>。

### 3. ビフィズス菌の菌数測定法に関する標準法の推移

#### 3-1 国際標準化機構 (ISO) と国際酪農連盟 (IDF)

国際標準化機構は1947年に設立された非政府組織であり、主要な活動としては、国際標準法を制定し、製品の品質・安全性・効率に関する国際規格を提供することにより、国際貿易を促進することが挙げられる。ISOは専門委員会(Technical committee, TC)および分科委員会(Subcommittee, SC)まで細分化され、それぞれの分科委員会でISO規格が制定される。乳製品に関する規格はISO TC 34(食品に関する専門委員会)のSC 5(乳および乳製品に関する分科委員会)において審議される。

一方、IDFは酪農乳業分野を代表する非営利的かつ非政治的な国際団体で、良質な生乳の生産と乳製品の開発・普及を行い、科学的、技術的および経

済的發展を推進することを目的とする団体である。現在のところ、乳製品に関する国際標準は ISO TC34 SC5 および IDF の合同規格として制定されている。

乳および乳製品中のビフィズス菌数の国際標準法は、2010年に ISO29981/IDF220 として発行された。本方法では、寒天培地として TOS-Mup 寒天培地が指定されている。希釈液としては 1/4 強度リンゲル溶液もしくは ISO6887-5 に記載の希釈液の中で 1/4 強度リンゲル溶液と同等性が示された溶液と指定されているため、実質的に 1/4 強度リンゲル溶液が使用されている。また、粉末状のビフィズス菌の第一段階希釈においては、45℃に保温した希釈液をサンプルと混濁させた後、45℃で 5 分間保持する方法が指定されている。ISO 29981/IDF 220 法では、前述のとおり 1/4 強度リンゲル溶液を使用することで菌数値が低下すること、また筆者らの検討において第一段階希釈時の 45℃ 5 分間の保持時間においても菌数値が低下することから、現在、筆者がアクションチームリーダーとなって、使用することができる希釈液のリストを増やすこと、また第一段階希釈時の温度を下げることを目的として、改訂に向けたプロジェクトを進めている。

食品中に含有する微生物に関する ISO 法の特徴としては、① 1 つの ISO 法の中に他の関連する ISO 法が参照・利用され、個々の分析法の制度設計が高められている点、② 具体的な分析法を制定する ISO 法が発行される際には複数の国とその試験機関において、基準以上の精度があるかどうかを検証する必要がある点、③ 培地においてもある一定以上の品質があることを確認するための、培地の性能評価に関する方法が記載されている点などが挙げられる。これら特徴は、ISO 法を用いることによって世界のどこの分析機関においても同等の菌数値が得られるような分析法を提供することを理念として作成されることに起因している。

### 3-2 日本におけるガイドライン制定の動き

日本で販売される乳・乳製品については乳等省令

により定義と成分規格が決められており、発酵乳・乳酸菌飲料は一定量以上の乳酸菌を含む必要があることから、乳酸菌の菌数測定方法も同様に定められている。

乳等省令で規定された乳酸菌の菌数測定法は、特定の寒天培地を好気中で培養することが指定されているため、ビフィズス菌はコロニーを形成することができず、日本の乳等省令上は乳酸菌として扱われることはなく、ビフィズス菌の菌数測定法は規定されていない状況であった。一方、ビフィズス菌の研究が進み、健康上の意義も浸透するにつれて、市場では発酵乳・乳酸菌飲料への利用が進むようになり、乳製品中のビフィズス菌を乳酸菌から選択的に測定することができる菌数測定方法が求められていた。このような背景から全国はっ酵乳乳酸菌飲料協会のもと、13機関、16名もの専門家から構成されるビフィズス菌検査法検討委員会が構成され、発酵乳・乳酸菌飲料中のビフィズス菌の菌数測定法に関するガイドラインが2000年に発行された<sup>21)</sup>。培地としては、TOS 寒天培地を含む 3 種類が有用であると結論づけられ、希釈液としては、光岡バッファーを窒素置換した溶液、光岡バッファー、生理食塩水、加ペプトン生理食塩水、0.1%酵母エキス溶液の使用が認められた。その後、前述の ISO29981/IDF220 としてビフィズス菌数測定法の国際標準法が発行され、2014年に ISO/IDF 法に沿う形でガイドラインが改定され、培地としては TOS-Mup 寒天培地、希釈液として 1/4 強度リンゲル溶液、もしくはペプトン水、加ペプトン生理食塩水、緩衝ペプトン水などの同等性が確認できる溶液の使用が認められている<sup>22)</sup>。

## 4. ビフィズス菌の菌数測定法に関する課題

### 4-1 高精度の菌数測定法を目指して

前述のとおり、ビフィズス菌の菌数値 CFUs は製品のラベル表示に使用されること、また2015年から開始された日本国内の機能性表示食品制度では、ビフィズス菌のような機能性関与成分の分析値については第三者機関による分析が必要と規定され

ていることから<sup>23)</sup>、製造会社だけではなく第三者機関においても高精度にビフィズス菌の生菌数を測定することができる方法が求められている。特に、粉末状態のビフィズス菌の場合は、粉末状態に加工された菌を目的の菌数まで賦形剤を用いて倍散することもあることから、菌数測定の分析精度が悪いと過剰に菌を添加しなければならず、生産性を考慮する上で高精度な菌数測定法は重要な分析技術であるとも言えよう。

しかしながら、菌数測定に用いられる培養法は、分析の原理上どうしても理化学的な分析値と比較して誤差が大きくなってしまいます。その理由として、理化学的測定では、莫大な数の分子数を測定するのに対し、培養法ではせいぜい300個以下のコロニーカウントしか行わないためである。ただし、カウントするコロニー数についても、300を超えると隣接するコロニーを1つとしてカウントしてしまうエラーが頻発し、コロニー数が少なすぎると変動が大きくなる。表3に筆者らが試験した、シャーレに生育したビフィズス菌の、コロニー数による変動係数の違いを示すが、コロニーの数が少ないと変動係数が大きくなることが分かる。一方で、一回の分析に使用するシャーレの枚数は通常固定されている場合が多い。よって、必要な分析感度を上げるためには、1枚あたりのコロニー数を一定数以上にする、もしくはシャーレの枚数を増やす必要があると考えられる。

また、筆者らのグループでは、国内外を含めて多くの試験機関を訪問し、ビフィズス菌数測定法に関する技術交流を度々行ってきたが、その際にしばしば話題になるのが、均一性を上げるために偏性嫌気性菌であるビフィズス菌をよく攪拌すると、ビフィズス菌に悪影響を及ぼし、菌数値を下げる原因になってしまうのではないかということである。一方で攪拌を弱めると正確な菌数値を得られにくくなる。筆者らは、例外はあるにしろ、正確な菌数測定を行う上ではある程度の攪拌は必要ではないかと考えている。この点について、製品中のビフィズス菌は糞便中のビフィズス菌とは酸素曝露の影響が異なる可

表3 ビフィズス菌数測定を行う際に、シャーレに生育した各コロニー数と変動係数の関係について

試験群	①	②	③	④
添加菌濃度	3.00	2.00	1.00とする	0.33
予想菌数値 (CFUs/シャーレ)	300 CFUs	200 CFUs	100 CFUs	30 CFUs
No. 1	301	199	115	21
No. 2	348	192	98	37
No. 3	319	199	108	23
No. 4	327	204	115	28
No. 5	328	191	111	31
No. 6	328	209	88	29
No. 7	318	186	102	38
No. 8	271	199	115	29
No. 9	282	195	96	26
No. 10	315	198	100	36
No. 11	286	200	99	28
No. 12	353	204	121	26
No. 13	282	221	107	34
No. 14	307	183	94	33
No. 15	337	219	107	28
標本平均	313.5	199.9	105.1	29.8
標本分散	580.2	105.1	81.3	23.4
標準偏差	24.1	10.3	9.0	4.8
変動係数	7.7%	5.1%	8.6%	16.2%

*B. breve* 種含有の粉末製品について、希釈液として生理食塩水、寒天培地として RCA を用いて菌数測定を行った。各試験群は段階希釈時に菌濃度を0.33から3.00まで変化させ、各群、15枚のシャーレを用いて培養して得られた各コロニー数を示した。シャーレに添加する溶液は1.00 ml に固定した。

能性がある。即ち、生育や生残性に関わる製造条件(培地・培養条件・その後の加工条件など)が最適化されている場合が多く、菌数測定における希釈時にある程度の酸素に曝されても、培養時に嫌気状態にすることで、コロニーが均一に生育する場合が多いと考えられるからである。

第一段階希釈と段階希釈時の容量と精度管理を正確に行うことも重要である。例として、第一段階希釈時、サンプルと希釈液を混合攪拌する際にストマッカーなどを用いる場合、下部にサンプルが沈み、十分に攪拌されないことがよくあるため、均一に攪拌されていることをよく確認する必要がある。また、段階希釈用の希釈液9.0 ml を秤量する場合、9.0 ml の精度管理がうまく行われていない、もしくは

は希釈液を入れた後に密栓せずにオートクレーブ処理して容量が変化している可能性もある。その場合、段階希釈時に1段階ごとに5.0%の誤差を含む操作を行うことを仮定すると、その操作を6回繰り返すだけで25%程度の誤差が発生する計算になる。希釈液の攪拌操作もピペティングではなく、ボルテックスによる攪拌を用いた方がより均質化されられると思われる。

#### 4-2 菌種特異的もしくは菌株特異的な菌数測定方法

プロバイオティクスの生理効果は一般的に菌株に依存すると考えられるため、近年、培養法によるビフィズス菌の菌数測定に関して、コロニーに生育したビフィズス菌数をCFUs値として計測するだけでなく、生育した菌の種や株を同時に分析することが必要とされている。ビフィズス菌用の選択培地に生育したコロニーであっても、それはビフィズス菌であることを示唆するだけであり、目的とするビフィズス菌種・株であることを示しているわけではないからである。そのような理由から、生育したコロニーが目的の株であることを確認する必要がある。一例としては、生育したコロニーについてRAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) などの遺伝学的手法を用いて、目的の菌株と一致するかを確認する方法が挙げられる<sup>24,25)</sup>。

また、一つの製品中に二つ以上のビフィズス菌株が配合される製品もあり、菌株ごとの生菌数が求められる場合もある。従来方法として、ビフィズス菌を5%のウマ脱繊維血液を添加したBL寒天培地上に生育させると、菌株に依存した特徴的なコロニーを形成させることができ<sup>26)</sup>、それを判別するといったBL血液寒天培地を利用した菌数測定が知られている。また、筆者らは製品中に含まれる*B. breve*と*B. longum* subsp. *longum*の菌種ごとの生菌数測定法として、糖の資化性を利用した培地を開発し、既存の寒天培地と同等の生菌数値を示すことを報告した<sup>27)</sup>。今後も、複数のビフィズス菌株が配合された製品における菌株ごとの菌数測定に対する

需要が高まるものと予想される。

#### 4-3 培養法に代わる新しい菌数測定方法

近年、培養法に代わる新規の生菌数測定法が開発されている。例えば、propidium monoazide (PMA)を使用したPCR法の原理は次のとおりである。PMAは死菌もしくは細胞膜の強度が低下した菌の細胞内を通過する。その後、光照射を行うことでPMAがDNAに結合し、PCR反応を阻害するため、生菌と損傷菌・死菌を区別することができる<sup>28)</sup>。通常のPCR法では、1サイクルごとに指数的に上昇するPCRのサイクル数から菌数値が計算されるが、この方法による測定では一般的に測定誤差が大きいことが知られている。デジタルPCRでは、チップ内に細分化されたウェルの1つ1つにおいてDNAを検出することができるため、DNA量をより正確に測定することができる。Hansenらは乳酸菌とビフィズス菌の菌数測定に関して、PMA処理後にそれぞれの株特異的なプライマーを用いてデジタルPCRを行うことで、従来のPCR法よりも高精度に菌数測定することが可能であることを示している<sup>29)</sup>。

フローサイトメトリーを使用した菌数測定に関しても技術開発が進められている。フローサイトメトリーは対象物を高速で1つ1つ流路を通過させ、レーザーを当てて粒子の大きさ、内部の複雑さ、標識された蛍光色素を検出する測定方法であるが、例えば、全ての菌の核様体を染色するSYTO24<sup>®</sup>と、死菌・損傷菌の膜を通過して染色するpropidium iodide (PI)を組み合わせることで、菌が生菌・死菌・損傷菌のどれに分類されるかを計測することができる。乳製品中のフローサイトメトリーを使用した方法は、ISO/IDFとして国際標準法が発行されている<sup>30)</sup>。従来方法では、フローサイトメトリーを用いた菌株特異的な菌数測定法は不可能であったが、Chironらは加熱による殺菌処理をした菌体もしくは菌の表面タンパク質に特異的なポリクローナル抗体を用いて、フローサイトメトリーによる菌株特異的な菌数測定が可能であることを示して

いる<sup>31)</sup>。

ただし、PMA-デジタル PCR 法およびフローサイトメトリー法は生菌であるかどうかは、PMA もしくは PI が細胞膜を透過するかどうか依存しているため、細胞膜のバリア性は維持しているが培養してもコロニーを形成することができない菌は VBNC (Viable but not culturable) は生菌としてカウントしてしまう。プロバイオティクスとして使用するためには、ヒトにおける生理効果を有することが前提となるため、今後、これらの測定法が一般的に普及していくためには、VBNC の状態の菌が生理効果を有するかどうかの検証が必要と思われる。

## 5. おわりに

ビフィズス菌の培養法を中心に、寒天培地・希釈液の重要性ならびに国際標準法への取り組み、培養法の課題などを紹介してきた。ビフィズス菌は偏性嫌気性菌であるため菌数測定が難しいとの印象を受けやすいが、ポイントを抑えれば安定的に菌数測定を行うことが可能である。一方、新規分析方法の進展は目覚ましく、今後 PMA-デジタル PCR 法およびフローサイトメトリー法がスタンダードとして定着する可能性も考えられる。しかし、どんな測定法にも長所・短所はあるため、それらを見極めながら、今後の動向に注目していきたい。

## 引用文献

- 1) 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 京都大学学術出版会, 8-10, 24-29, 35-51, 80-81, 129-134 (2010)
- 2) 上野川修一, 山本憲二, 世紀を超えるビフィズス菌の研究—その基礎と臨床応用から製品開発へ—, 財団法人 日本ビフィズス菌センター, 271-279 (2011)
- 3) Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid bacteria, 1-4 (2001)
- 4) Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C. and Sanders, M. E.: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 11, 506-514 (2014)
- 5) Hirsch, A. and Grinstead, E.: Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese, with observations on the effect of nisin, *J. Dairy Res.*, 21, 101-110 (1954)
- 6) Roy, D.: Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products, *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 167-182 (2001)
- 7) Payne, J. F., Morris, A. E. and Beers, P.: Note: evaluation of selective media for the enumeration of *Bifidobacterium* sp. in milk, *J. Appl. Microbiol.*, 86, 353-358 (1999)
- 8) Abe, F., Muto, M., Yaeshima, T. and Iwatsuki, K.: Effects of suspension-dilution buffers and plating media on enumeration of *Bifidobacterium*, *Milchwissenschaft*, 64, 139-142 (2009)
- 9) Mitsuoka, T., Segal, T. and Yamamoto, S.: Eine verbesserte methodik der qualitativen und quantitativen analyse der darmflora von menschen und tieren. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I Orig.*, 195, 455-469 (1965)
- 10) 食品衛生検査指針 微生物編 2004, 社団法人 日本食品衛生協会, 349-360 (2004)
- 11) Arroyo, L., Cotton, L. N. and Martin, J. H.: Evaluation of media for enumeration of *Bifidobacterium adolescentis*, *B. infantis* and *B. longum* from pure culture, *Cult. Dairy Prod. J.*, 29, 20-21 23-34 (1994)
- 12) 園池耕一郎, 馬田三夫, 務台方彦: 発酵乳製



- 品中の *Bifidobacterium* 生菌数測定法選択培地の検討, 食品衛生学雑誌, 27, 238-244 (1986)
- 13) Rada, V. and Koc, J.: The use of mupirocin for selective enumeration of bifidobacteria in fermented milk products, *Milchwissenschaft*, 55, 65-67 (2000)
- 14) Serafini, F., Bottacini, F., Viappiani, A., Baruffini, E., Turrone, F., Foroni, E., Lodi, T., van Sinderen, D. and Ventura, M.: Insights into Physiological and Genetic Mupirocin Susceptibility in Bifidobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 3141-3146 (2011)
- 15) Milk products – Enumeration of presumptive bifidobacteria – Colony count technique at 37 °C, ISO 29981/IDF 220, ISO and IDF (2010)
- 16) Bunesova, V., Musilova, S., Geigerova, M., Pechar, R. and Rada, V.: Comparison of mupirocin-based media for selective enumeration of bifidobacteria in probiotic supplements, *J. Microbiol. Methods.*, 109, 106-109 (2015)
- 17) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products, ISO 6887-5, ISO (2010)
- 18) Straka, R. P. and Stokes, J. L.: Rapid Destruction of growth of Bacteria in commonly used diluents and its elimination, *Appl. Microbiol.*, 5, 21-25 (1957)
- 19) Muller, J. A., Stanton, C., Sybesma, W., Fitzgerald, G. F. and Ross, R. P.: Reconstitution conditions for dried probiotic powders represent a critical step in determining cell viability, *J. Appl. Microbiol.*, 108, 1369-1379 (2010)
- 20) Muto, M., Abe, F., Yaeshima, T. and Iwatsuki, K.: Effect of Enumeration Method on *Bifidobacterium* Cell Counts in Commercial Powder Products, *Bioscience Microflora*, 29, 143-148 (2010)
- 21) はっ酵乳・乳酸菌飲料中のビフィズス菌の菌数測定法, 社団法人 全国はっ酵乳乳酸菌飲料教会 (2000)
- 22) ビフィズス菌使用発酵乳, 乳酸菌飲料のガイドライン, 一般社団法人 全国発酵乳乳酸菌飲料教会 (2014)
- 23) 機能性表示食品の届出等に関するガイドライン 消食表第156号, 消費者庁 (2018)
- 24) Sakata, S., Kitahara, M., Sakamoto, M., Hayashi, H., Fukuyama, M. and Benno, Y.: Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1945-1951 (2002)
- 25) Xiao, J. Z., Takahashi, S., Odamaki, T., Yaeshima, T. and Iwatsuki, K.: Antibiotic susceptibility of bifidobacterial strains distributed in the Japanese market, *Biosci Biotechnol. Biochem.*, 74, 336-342 (2010)
- 26) 光岡知足, 腸内菌の世界一嫌気性菌の分離と同定一, 叢文社, 146-154 (1980)
- 27) Muto, M., Miyauchi, H., Xiao, J. Z. and Abe, F.: Enumeration of *Bifidobacterium* in powdered milk products: effect of suspension buffer and development of selective enumeration media, *Milk Science*, 64, 15-23 (2015)
- 28) Nocker, A., Cheung, C. Y. and Camper, A. K.: Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells, *J. Microbiol. Methods*, 67, 310-320 (2006)
- 29) Hansen, S. J. Z., Morovic, W., DeMeules, M., Stahl, B. and Sindelar, C. W.: Absolute Enumeration of Probiotic Strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium*

- animalis subsp. lactis BI-04® via Chip-Based Digital PCR, *Front Microbiol.*, 9, 704 (2018)
- 30) Milk and milk products –Starter cultures, probiotics and fermented products –Quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry, ISO 19344/IDF 232, ISO and IDF (2015)
- 31) Chiron, C., Tompkins, T. A. and Burguiere, P.: Flow cytometry: a versatile technology for specific quantification and viability assessment of micro-organisms in multistrain probiotic products, *J. Appl. Microbiol.*, 124, 572–584 (2018)