(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第3985070号

(P3985070)

(45)発行日　平成19年10月3日(2007.10.3)　(24)登録日　平成19年7月20日(2007.7.20)

(51)Int.Cl.			F I		
C12Q	1/04	(2006.01)	C12Q	1/04	
C12M	1/34	(2006.01)	C12M	1/34	B
C12Q	1/34	(2006.01)	C12Q	1/34	

請求項の数 9　(全 12 頁)

(21)出願番号	特願平7-520099
(86)(22)出願日	平成7年1月20日(1995.1.20)
(65)公表番号	特表平9-508279
(43)公表日	平成9年8月26日(1997.8.26)
(86)国際出願番号	PCT/US1995/000778
(87)国際公開番号	WO1995/020674
(87)国際公開日	平成7年8月3日(1995.8.3)
審査請求日	平成14年1月21日(2002.1.21)
(31)優先権主張番号	08/189,182
(32)優先日	平成6年1月31日(1994.1.31)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者
スリーエム　カンパニー
アメリカ合衆国，　ミネソタ　５５１４４－１０００，　セント　ポール，　スリーエム　センター
(74)代理人
弁理士　石田　敬
(74)代理人
弁理士　吉田　維夫
(74)代理人
弁理士　西山　雅也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ブドウ球菌を検出するための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

１種以上のバクテリアを含むサンプル内のブドウ球菌を同定及び測定するための方法であって、

ｉ）選択培地にサンプルの分割量を接種するステップであって、前記培地が、ブドウ球菌以外の微生物の増殖を妨げるためのインヒビター、β－グルコシダーゼの存在下で視覚的な第１の色の変化を供するインドリルグルコピラノシドたる第１の基質、及びブドウ球菌の存在下において第２の色を形成することができる第２のホスファターゼ基質を含むことを特徴とするステップと、

ii）前記接種された培地をインキュベートして、該培地中の前記第１及び第２の基質の存在下においてバクテリアコロニーを見ることができる十分な大きさの前記バクテリアコロニーを形成するステップと、

iii）前記第２の基質の前記第２の色の存在により同定された前記コロニーを測定して、前記サンプル内のブドウ球菌の数を供するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

【請求項２】

前記インヒビターがコリスチンメタンスルホネート、ナリジクス酸及び塩化リチウムからなる群から選択される、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記第１の基質が５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド

であることを特徴とする、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記第２の基質が６－クロロ－３－インドリルホスフェート及び５－ブロモ－６－クロロ－３－インドリルホスフェートからなる群から選択されることを特徴とする、請求項１～３のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
混ざったバクテリア集団を含むサンプル内のブドウ球菌を同定及び測定するための薄膜培養プレート装置であって、栄養素、ブドウ球菌以外の微生物の増殖を妨げるためのインヒビター、及び少なくとも１つのゲル化剤を含む冷水可溶性選択培地パウダーが接着された自己支持性防水性基材と、β－グルコシダーゼの存在下で視覚的な第１の色の変化を供するインドリルグルコピラノシドたる第１の基質及びブドウ球菌の存在下において第２の色を形成することができる第２のホスファターゼ基質を含む接着剤の層並びに少なくとも１つのゲル化剤を有する透明カバーシートと、を含むことを特徴とする装置。
【請求項６】
前記インヒビターがコリスチンメタンスルホネート、ナリジクス酸、及び塩化リチウムから選択され、前記ゲル化剤が寒天、メトキシルペクチン、キサンタンゴム、ロカストビーンゴム（locust bean gum）、ラムサンゴム（rhamsan gum）及びグアーゴム並びにそれらの混合物からなる群から選択されることを特徴とする、請求項５に記載の装置。
【請求項７】
前記第１の基質が５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシドであることを特徴とする、請求項５又は６に記載の装置。
【請求項８】
前記第２の基質が６－クロロ－３－インドリルホスフェート及び５－ブロモ－６－クロロ－３－インドリルホスフェートからなる群から選択されることを特徴とする、請求項５－７のいずれかに記載の装置。
【請求項９】
請求項１～４のいずれかに記載の方法において利用するための、ブドウ球菌以外の微生物の増殖を阻害するためのインヒビター、β－グルコシダーゼの存在下で視覚的な第１の色の変化を供するインドリルグルコピラノシドたる第１の基質、及びブドウ球菌の存在下において第２の色を形成することができる第２のホスファターゼ基質を含むことを特徴とする選択培地。
【発明の詳細な説明】
本発明は、サンプル内のバクテリアを検出及び／又は測定（enumerating）する方法に関し、更に詳しくは、新規な指標システムを用いて、混合されたバクテリア集団中のブドウ球菌を同定及び／又は測定する方法に関する。
技術的背景
異なる型のサンプル中のバクテリアを決定、同定、及び測定するために、種々の方法及び過程が現在利用できる。例えば、水、食物、又は酪農産物のサンプルにおいて、これらのサンプルの質又は潜在的な汚染レベルを評価するため、大腸菌群（coliform bacteria, coliforms）を同定及び測定する方法が利用できる。
大腸菌群の混合集団からグラム陰性桿菌として一般に分類される大腸菌群の特定の型である大腸菌（E. coli）を区別する一つのアプローチは、米国特許第5,210,022号に報告される。この特許において、２つの特定の酵素、β－ガラクトシダーゼ及びβ－グルクロニダーゼの存在下で対比性不溶性沈殿物を形成する２つの基質がテスト培地中に組み込まれる。これらの基質を用いることにより、大腸菌群が大腸菌から区別され、これは全ての大腸菌群がβ－ガラクトシダーゼを産生するのに対して、唯一大腸菌はβ－グルクロニダーゼを産生するからである。バクテリアの異なるコロニーが、基質含有培地中でインキュベートされた時に増殖するので、対比色をした沈殿は、増殖する大腸菌又は大腸菌群のコロニーのいずれかの周囲に形成される。混合集団における他の大腸菌群のコロニーからの大腸菌のコロニーの同定は、沈殿した基質の対比色（contrasting color）により容易になさ

れる。
このような選択的区別の必要性は、サルモネラ、ブドウ球菌、又はストレプトコッカスのような病原性を有する、又はヒトに有害な効果を与える他の種類のバクテリアにおいてもある。チキン、他の処理された食用獣肉、及び酪農産物のブドウ球菌汚染に関係したブドウ球菌エンテロトキシンが食中毒の最も一般的な場合の原因物であるので、グラム陽性球菌として一般に分類されるブドウ球菌を、食物サンプルにおいて同定及び測定する有効な方法が特に必要とされる。
これらのバクテリアを同定及び／又は測定することができる方法及び製品は、これらに限定されないが、食物製品の製造者、化粧品、及び診断アッセイを含む種々の産業に重大な利益を与えるであろう。

発明の概略

本発明は、バクテリアに汚染された恐れのあるサンプル又はブドウ球菌を潜在的に含むサンプルにおいてブドウ球菌を同定及び／又は測定する方法を提供する。この方法は、ｉ）選択培地にサンプルの分割量を接種するステップであって、前記培地が、ブドウ球菌の増殖を促進するためのインヒビター、β－グルコシダーゼの存在下で観測可能な第１の色を形成することができる第１の基質、及びホスファターゼの存在下で第２の色を形成することができる第２の基質を含むことを特徴とするステップと、ii）前記接種された培地をインキュベートして、前記培地内の前記第１及び第２の基質の存在下でバクテリアコロニーを見ることができる十分な大きさの前記バクテリアコロニーを形成させるステップと、iii）前記第２の基質の第２の色の存在により同定される前記コロニーを測定して、前記サンプル中のブドウ球菌の数を供するステップと、を含む。
本発明は、たとえブドウ球菌が酵素であるβ－グルコシダーゼを産生するとしても、この属のバクテリアは、他のバクテリアにより産生されるβ－グリコシダーゼの存在を検出するのに一般に用いられる基質である５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシドと酵素的に反応するであろう代謝物質を産生することができないという本明細書で最初に報告される実験的観察結果を利用する。この予期せぬ観察結果において、本発明の一つの実施形態は、ブドウ球菌の増殖を促進するためのインヒビター、並びに５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシドのような第１のグルコピラノシド基質、及び６－クロロ－３－インドリルホスフェートもしくは５－ブロモ－６－クロロ－３－インドリルホスフェートのような第２のホスファターゼ基質を含む選択固体培地を含む。この実施形態において、サンプル中のブドウ球菌は、培地内でホスファターゼ基質と反応するであろう代謝物質を産生して赤ないし赤紫色を有するコロニーを形成し、一方前記サンプル中の他のバクテリアは、前記培地内でグルコピラノシダーゼ基質と反応するであろうβ－グルコシダーゼを産生し、青色を有するコロニーを形成するであろう。
本発明の特に好ましい実施形態において、栄養素、選択インヒビター、第１のグルコピラノシド基質、及び第２のホスファターゼ基質を含む選択乾燥培養培地を用いてPETRIFILM薄膜培養プレートのような薄膜培養プレート装置を調製する。薄膜培養プレート装置にサンプルを接種した後十分な期間インキュベートする時、前記サンプル中のブドウ球菌は薄膜装置の培地において赤色を有するコロニーを形成し、前記サンプル中の他のバクテリアは青色を有するコロニーを形成するであろう。
本発明は、種々の固体培地において、サンプル中のブドウ球菌を同定及び測定する効果的かつ視覚的な比色法を提供する。

【図面の簡単な説明】

図１は、微生物を増殖させるのに用いられる薄膜培養装置の、部分的な上からの透視図である。

詳細な記載

本発明は、たとえブドウ球菌が酵素であるβ－グルコシダーゼを産生するとしても、この属のバクテリアは、他のバクテリアにより産生されるβ－グリコシダーゼの存在を検出するのに一般に用いられる基質である５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－

グルコピラノシドと酵素的に反応するであろう代謝物質を産生することができないという本明細書で最初に報告される実験的観察結果を利用する。この予期せぬ観察結果において、本発明の一つの実施形態は、ブドウ球菌の増殖を促進するためのインヒビター、並びに５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシドのような第１のグルコピラノシド基質、及び６－クロロ－３－インドリルホスフェートもしくは５－ブロモ－６－クロロ－３－インドリルホスフェートのような第２のホスファターゼ基質を含む選択培地を含む。この実施形態において、サンプル中のブドウ球菌は、培地内でホスファターゼ基質と反応するであろう代謝物質を産生して赤ないし赤紫色を有するコロニーを形成し、一方前記サンプル中の他のバクテリアは、前記培地内でグルコピラノシダーゼ基質と反応するであろうβ－グルコシダーゼを産生し、青色を有するコロニーを形成するであろう。

好ましい選択培地は、ブドウ球菌が検出可能なコロニーを形成するのに必要な、適した栄養素、塩及びイオン並びに他の不必要な微生物の増殖を防止するためのインヒビターを含む。適した栄養素、塩及びイオンは、カゼインペプトン、イースト抽出液、牛肉抽出液、グルコース、ピルビン酸ナトリウム、リン酸二ナトリウム、リン酸一カリウム塩、クエン酸鉄アンモニウム、及びカルボン酸ナトリウムを含む。使用する前に、上記列挙された構成物は、混合又は混和された後、滅菌される。例えばエチレンオキシドへの曝露はこれらの構成物を滅菌するのに十分である。これらに限定されないが、大腸菌のようなグラム陰性バクテリア及びほとんどのグラム陽性バクテリアを含む要求されない微生物の増殖を防止するために、選択インヒビターも前記培地に含まれる。これらの要求されないバクテリアの阻害により、ブドウ球菌の増殖が選択的に促進される。適したインヒビターは、種々の公知の抗菌物資又は抗生物質の化合物を含む。例えば、ナリジクス酸のようなキノリンベースの抗菌性化合物、コリスチンメタンスルホネートのようなポリミキシン誘導化合物、及び塩化リチウムが周知の好ましいインヒビターである。

本発明の選択培地は、異なる型の成長するコロニーの視覚的検出を可能にする２つの異なる基質も含む。１つの基質は、ブドウ球菌属のバクテリアを除いたバクテリアにより産生されるβ－グルコシダーゼ代謝物質と反応して検出可能な基質を形成するであろうグルコピラノシド基質である。好ましくは、検出可能な基質は、色のある、視覚的に検出可能な基質である。種々の周知のβ－グルコシダーゼ指示化合物が市販されている。前記選択培地において用いられ得るこれらの基質の典型的な量は、約25～500mg／mlの範囲であり、好ましくは約25～50mg／mlの範囲である。適したβ－グルコシダーゼ指示体は、β－グルコシダーゼの存在下で青色の沈殿物を供する５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド、及びβ－グルコシダーゼの存在下で検出可能な蛍光基質を供する４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシドを含む。

第２の基質は、ブドウ球菌により産生されるホスファターゼ代謝物質と反応して検出可能な、好ましくは沈殿した基質を形成するであろうインドリルホスファターゼ基質である。市販のホスファターゼ指示体は、ブドウ球菌ホスファターゼと反応して赤ないし赤紫色の沈殿した基質を供するであろう６－クロロ－３－インドリルホスフェートは５－ブロモ－６－クロロ－３－インドリルホスフェートを含む。前記選択培地で用いられ得るホスファターゼ基質の典型的な量は、約100～500mg／mlの範囲であり、好ましくは約200～300mg／mlの範囲である。

本発明の選択培地は、ゲル形成性材料と一般的に混合されて固体培地となる。固体培地は、サンプル中に存在し得るバクテリアコロニーの増殖に規定された領域を供する。適したゲル形成性材料は、市販の寒天及び米国特許第5,210,022号に開示されるメチルペクチンを含む。薄膜培養プレート装置において用いられるのに好ましいゲル化材料は、キサンタンゴム、ロカストビーン（イナゴマメのさや）ゴム、ラムサン（rhamsan）ゴム、及びグアーゴムのようなゲル形成性ゴム又はそれらの混合物を含む。

本選択培地が用いられる時、サンプルは希釈剤で典型的に希釈され、その後前記固体培地に接種するのに用いられる。その後、接種された培地は約40～56時間インキュベートされ、その後視覚的に検査される。サンプル中に存在するブドウ球菌は、前記培地内でホスフ

ァターゼ基質と反応するコロニーを形成して赤ないし赤紫色のゾーンを供し、一方前記サンプル中の他のバクテリアは、前記培地内でグルコピラノシダーゼ基質と反応するであろうβ－グルコシダーゼを産生するコロニーを形成して青色のゾーンを供するであろう。

本発明の特に好ましい実施形態において、エアロビックカウント（Aerobic Count）PETRIFILM培養プレート装置（3M, St. Paul, MN、から市販される、カタログ番号6400）と本質的に類似した薄膜培養プレート装置は、選択インヒビター、第１のグルコピラノシド基質、及び第２のホスフェート基質を含む乾燥培地を用いて調製される。薄膜培養プレート装置にサンプルを接種した後十分な時間インキュベートした時、サンプル中のブドウ球菌は薄膜装置上に赤色を有するコロニーを形成し、サンプル中の他のバクテリアは前記装置上に青色を有するコロニーを形成するであろう。

図１は、本発明に用いるのに適した薄膜培養プレート装置を示す。このような薄膜培養装置は、米国特許第4,565,783号、第5,089,413号、及び第5,232,838号に開示される。

簡単にいうと、乾燥培養装置10は、自己支持性の水不透過性基材12を有する基体部を含む。基材12は、好ましくは、ポリエステル、ポリプロピレン、又はポリスチレンのような吸着しない防水性ポリマーから作られる比較的堅い材料である。他の適した防水性材料は、防水性ポリエチレンコーティングを含む紙のような基材を含む。

基材12の上部表面は、96／４の重量比のアクリル酸イソオクチル／アクリルアミドもしくは米国特許第5,232,838号に開示される98：２の重量比のアクリル酸イソオクチル及びＮ－ビニルピロリドンのコポリマーの水性乳濁液並びにIGEPAL CA897非イオン性界面活性剤及びラウロイルペルオキシドのような接着層14で被覆され、該接着層は、前記基材上の均一層中に接着された乾燥ゲル化剤及び微生物成長栄養素の混合物である冷水可溶性乾燥パウダー16を保持している。この接着剤は、前記微生物の増殖を防げてはならない。加えて、前記接着剤は、基材の表面上で成長するバクテリアコロニーを被覆された基材を通して見ることができるように、水和した時十分に透明であるべきである。接着剤14は、基材が前記接着剤中の粉末状ゲル化剤及び栄養素のような粒子を完全に埋め込まずに前記粉末状ゲル化剤及び栄養素で均一に被覆されることを許容する厚さで基材上に被覆されるべきである。

冷水可溶性乾燥パウダー16の層は、接着層14に均一に接着される。好ましくは、この可溶性パウダーは、ゲル化剤及び微生物成長栄養素を含む。適したゲル化剤は、室温で水と溶液を形成する天然及び合成剤の両方を含む。これらゲル化剤は、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロースポリアクリルアミド、又はアルギンを含む。ゲル化剤又はゴムの好ましい混合物は、キサンタンゴム、ロカストビーンゴム、ラムサンゴム及びグアーゴムを含む。本発明に用いるのに適した栄養素は、室温で水に可溶性である栄養素も含む。基材12上で増殖するであろう微生物の増殖を促進するために、特定の型の栄養素が選択される。炭水化物、蛋白質、及び無機質のような構成物を含む種々の栄養素が用いられ得る。好ましい栄養素パウダーは、アクリル酸イソオクチル及びＮ－ビニルピロリドンの水ベースのコポリマーの接着剤と混合された、カゼインペプトン、イースト抽出液、グルコース、クエン酸鉄アンモニウム、ピルビン酸ナトリウム、カルボン酸ナトリウム、及びグアーゴムを含む。付加的な構成物は、ピルビン酸ナトリウム、一塩基リン酸カリウム、二塩基リン酸カリウムのような塩及び無機質、並びにコリスチンメタンスルホネート、塩化リチウム及びナリジクス酸を含む。

図１に示される装置において、カバーシート20は基材12の上部表面の一端に付着される。カバーシート20は、好ましくは、基材上に存在するバクテリアコロニーを計数するのを容易にするために、透明なフィルム又はシート材料から作られる。加えて、カバーシート20は、好ましくは、前記構成物のコンタミネーション及び劣化の危険を避けるためバクテリア及び水蒸気に不透過性である。カバーシート20として用いるのに好ましい材料は、二軸延伸ポリプロピレンである。

指示体染料を含む水不溶性接着剤の層は、基材12に隣接しているカバーシート20の表面上に適用される。カバーシート20に適用される適した接着剤22は、米国特許第4,565,783号及び米国特許Re24,906号に開示される接着剤のようなアクリレートベースの接着剤並びに

98：２の重量比のアクリル酸イソオクチル及びアクリル酸の接着性コポリマーを含む。好ましい接着剤は、一般的に、バクテリアのような微生物の増殖を有害に妨げないであろう水不溶性アクリル酸イソオクチルベースの接着剤である。カバーシートは、５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシドのようなβ－グルコシダーゼ基質及び５－ブロモ－６－クロロ－３－インドリルホスフェートのようなホスファターゼ基質も含む。必要であれば、付加的なゲル化剤又は栄養素もカバーシート20の表面に適用される接着剤に接着され得る。

使用において、予定された量の接種物、典型的には約１ミリリットルの接種物が、カバーシート20を引き離して水性テストサンプル又は水を基材12の中央に添加することにより、図１に示される装置に添加される。その後カバーシート20を基材12に再びかぶせて、基材12の特定の領域に接種物を閉じ込めるのに用いられる重量円形テンプレート（weighted circular template）を用いて基材上に平らに広げられる。接種物が接触して基材12上に広げられると、基材12に接着したゲル化剤及び栄養素は水和して成長支持栄養素ゲルを形成する。その後接種された装置は予定された時間インキュベートされ、その後基材上で成長するバクテリアコロニーの数が透明なカバーシート20を通して計数され得る。

次の実施例は、本発明の種々の実施形態の実施を更に示すために提供される。前記実施例は、実例的目的のみのために提供されるのであって、添付の請求の範囲における発明の範囲を限定するために解釈されるべきでない。

実施例

実施例１

0.13mm厚のポリエチレンコートされた紙（Schoeller Paper Inc., of Pulaski, N. Y.）を0.93mg／cm^2のレベル（乾燥時に測定）で98：２の重量比（IOA：ACM）のアクリル酸イソオクチル（IOA）及びアクリルアミドの非抑制性接着コポリマーで被覆して、乾燥させた。

その後、前記接着剤に、２重量部のグアーゴム（Meyhall Chemical AG, Kreuzlingen, Switzerland）、並びにカゼインペプトン５重量部、イースト抽出液2.5重量部、グルコース１重量部、ピルビン酸ナトリウム10重量部、牛肉抽出液１重量部、リン酸二ナトリウム２重量部、及びリン酸一カリウム0.7重量部を含む１重量部の栄養素混合物の混合物を均一に振りかけた。このパウダーコートされた紙をエチレンオキシドに曝露することにより殺菌消毒した。

0.93mg／cm^2のレベル（乾燥時に測定）で、98：２の重量比（IOA：AA）のアクリル酸イソオクチル（IOA）及びアクリル酸（AA）の非抑制性コポリマーで被覆された0.04mm厚の透明二軸延伸コロナ処理ポリプロピレンフィルムのシートからカバーシートを作った。その後、キサンタンゴム（Kelco Inc., San Diego, CAから得られるKELTROL gum）２重量部、ロカストビーンゴム（Hercules, Inc., Wilmington, DEから得られるGENU gum）２重量部、ラムサンゴム（Kelco Inc.から得られるK1A112）１重量部、及びM150グアーゴム（MEYPROGAT gum, Meyhall Chemical AG）の混合物を前記接着剤に振りかけた。過剰なパウダーは振って落とした。このパウダーはエチレンオキシド又はガンマ照射への曝露により前に殺菌消毒されている。

接着剤コートされ、パウダーコートされた底部分及びカバーシートを7.6cm×10.2cm断片に切り取り、パウダーがまかれた側面が互いに向き合うように共に置き、一つの端に沿って加熱密閉した。

使用において、この装置を水平面上におき、上のカバーシートを折りもどして、装置の底部分のパウダーコートされた表面を露出させた。基質及びバクテリアの混合物の（後述のように調製された）溶液を含む１ml水性テストサンプルを、装置の底部分の中央に注意深く置き、カバーシートをパウダーコートされた側面に下ろした。水性テストサンプルを培養培地装置のパウダーコートされた表面の上に平らに広げるため重量スプレッダー（weighted spreader）を用いた。接腫された装置をインキュベーター内におき、35℃で普通にインキュベートした。インキュベーションの後、ちょうど標準的なポアープレート（pour-plate）を用いて行うように装置を読んだ。

基質及びバクテリアの溶液を次のように調製した：10.1mgの６－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシドパラトルイジン塩を１００μｌのＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミドに溶解した。400μｌのエタノールを添加した時、沈殿が形成されたので付加的なＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミドを200μｌ添加した。各々400及び200μｌのエタノールを、両者ともＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド300μｌに溶解した10.2mgの６－クロロ－３－インドリルホスフェートパラトルイジン塩及び６－クロロ－５－ブロモ－３－インドリルホスフェートパラトルイジン塩に各々添加した。（Biosynth International Inc., Skokie, ILから得られる）５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシドパラトルイジン塩9.9mgを200μｌのＮ，Ｎ－ジメチルホルムアルデヒド及び300μｌのエタノール中に溶解した。

ヒツジ血液寒天プレート上で増殖し、各々に培養ATCC29213及びATCC29212由来のスタフィロコッカス・アウレウス（Staphylococcus aureus）及びストレプトコッカス・ファエカリス（Streptococcus faecalis）の各々の３つのコロニーをPROMPT接種システム（Baxter Scientific Productsから得られる、Catalog No.B1026-10D）で拾って、バクテリア懸濁液とし、その後これをバターフィールドの緩衝液（Butter field's buffer）で１／10,000に希釈した。

緩衝液中の各々のバクテリア懸濁液の４つの10ml部分を４つの滅菌チューブの各々に移して全部で８つのチューブとした。各々のバクテリアのチューブを分離するために、上記のように調製された下に示される基質溶液の分割量を添加した。

140μｌ６－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド塩
（基質Ａ）
100μｌ５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド塩
（基質Ｂ）
140μｌ６－クロロ－３－インドリルホスフェート塩（基質Ｃ）及び
100μｌ６－クロロ－５－ブロモ－３－インドリルホスフェート塩（基質Ｄ）

１mlのＳ．アウレウス（S. aureus）及び６－クロロ－３－インドリルホスフェート混合物と１mlのＳ．ファエカリス（S. Faecalis）及び５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド混合物；１mlのＳ．アウレウス及び６－クロロ－５－ブロモ－３－インドリルホスフェート混合物と１mlのＳ．ファエカリス及び５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド混合物；１mlのＳ．ファエカリス及び６－クロロ－３－インドリルホスフェート混合物と１mlのＳ．アウレウスと５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド混合物；並びに１mlのＳ．ファエカリス及び６－クロロ－５－ブロモ－３－インドリルホスフェート混合物と１mlのＳ．アウレウス及び５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド混合物を組み合わせることにより４つの混合物を調製した。全ての混合物がいくらか曇りを示したことが観察され、これは沈殿を示す。１ミリリットルの各々の20の基質－バクテリア懸濁液を、上述のように調製された20の培養培地装置に接種するのに用いた。この装置を35℃でインキュベートした。24時間のインキュベーションの後、結果を観察した。

表１

バクテリア	基　質	結　果
S.aureus	A	コロニーは観察されなかった。
S.aureus	D	暗い緻密な紫色のコロニー
S.aureus	C	明るいより広がった紫色のコロニー
S.aureus	B	コロニーは観察されなかった。
S.faecalis	C	薄い広がった紫色のコロニー
S.faecalis	D	少し暗いより緻密な紫色のコロニー
S.faecalis	A	コロニーは観察されなかった。
S.faecalis	B	激しいいくらか広がった青緑色のコロニー
S.aureus/S.faecalis	C，B	青緑と紫の混ざったコロニー
S.aureus/S.faecalis	D，B	〃
S.aureus/S.faecalis	B，C	〃
S.aureus/S.faecalis	B，D	〃

驚くことに、基質がグルコピラノシド単独の時、色のついたコロニーの欠如により示されるように、Ｓ．アウレウスは指示体を代謝しなかった。Ｓ．ファエカリスが５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド基質上に色のついたコロニーを形成したことは、これらのバクテリアがこの基質を使用する能力の明らかな違いを示す。

実施例２．ブドウ球菌変異体によるβ－グルコシダーゼ活性の欠如の証明

スタフィロコッカスアウレウス変異体をCenters For Disease Control, Atlanta, GAから得て、ミネソタマイニングアンドマニュファクチュアリングカンパニー（3M, St. Paul, MN）におけるプライベートコレクションの一部として維持し、３つのシステム、即ち寒天、ブイヨン、及び（実施例１に記載される）PETRIFILM薄膜培養培地装置を用いて、β－Ｄ－グルコシダーゼ活性についてテストした。前記寒天には基質として５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（Ｘ－グルコシド）を含ませた。（Difco, Detroit, MIから得られる）慣用の緩衝ペプトンブイヨンは、炭水化物がなく、これを基質として５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド又は４－メチルウンベリフェリル－β－Ｄ－グルコピラノシド（４－MUG）（実施例１に記載されるように調製された溶液）を用いてテストした。実施例１に記載されるようにPETRIFILM培養プレート装置を調製し、これを、Ｘ－グルコシド及び６－クロロ－５－ブロモ－３－インドリルホスフェートパラトルイジン塩（リン酸）（実施例に記載されるように調製された溶液）のいずれかを用いて、培養プレート装置上に実施例１に記載のようにプレートすることによりテストした。表２に示されるように、寒天プレート上で増殖したＳ．アウレウス変異体は、全てが４－MUG基質を使用したが、Ｘ－グルコシド基質を使用することができず、そのコロニーはブドウ球菌で見られる激しい青色へ向かうよりむしろ灰色がかった白ないし金色を有していた。ブイヨン中の全ての32のＳ．アウレウス変異体は、４－MUG基質を産生するがＸ－グルコシド基質を代謝できなかった。全ての32のＳ．アウレウス変異体は、６－クロロ－５－ブロモ－３－インドリルホスフェート基質を用いた

PETRIFILM培養プレート装置上で紫色のコロニーとして増殖したが、Ｘ－グルコシド基質を代謝できなかった。

PETRIFILM培養プレート装置上に存在する紫色及び青色のコロニーの同定は、ヒツジ血液寒天プレートに各々のバクテリアのコロニーをストリークして慣用の方法によりバクテリアの純粋な培養物を再同定することにより行った。

表2

微生物	4－MUG 基質 含有ブイヨン	Ｘ－グルコシド 基質 含有ブイヨン	4－MUG 基質 含有寒天	Ｘ－グルコシド 基質 含有寒天	4－MUG 基質 含有 ペトリフィルム	Ｘ－グルコシド基質 含有ペトリフィルム
S. faecalis対照(88)	＋	＋	NA	NA	＋	＋
コアグラーゼ陰性ブドウ球菌対照	－	－	－／＋*		－	－
S. aureus-76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 1043, 1052, 1054, 1060, 1068, 1070, 1072, 1078, 1081, 1112, 1117, 1119, 1120, 1154, 1155, 1156, 1166, 1167, 1168, 2013	＋	－	＋（弱い）	－	＋	－
腸球菌対照（10株）	NA	NA	all＋	all ＋	NA	NA

＊ 10株を用いた。８つは陰性、２つは陽性である。

実施例３

実施例１に記載されるように調製された薄膜培養培地装置を用いて、食物中のブドウ球菌の存在を後述のバードパーカー（Baird-Parker）寒天と比較して評価した。
（BBL Microbiological Systems, Cockeyesville, MD.から得られる）トリプチカーゼソーイブイヨン（trypticase soy broth）中で一晩スタフィロコッカスアウレウス株1060を増殖させることにより、実際の“実寿命（real life）”状況をシミュレーションするためにストレスのかけられたブドウ球菌を調製した。このブイヨン培養物の0.01mlサンプルを52℃に予め温められた10mlの0.1M，pH7.2のリン酸緩衝液内にピペットでとった。この混合物を52℃で20分間インキュベートし、その後プレーティングのためにバターフィールド緩衝液（Butter field's buffer）で希釈した。用いられた希釈率は１：100（混合物：緩衝液）である。この緩衝液を４℃で保存し、その後室温まで温めて後に用いた。
カゼインペプトン132部、イースト抽出液66部、グルコース26部、クエン酸鉄アンモニウム5.8部、ピルビン酸ナトリウム264部及びカルボン酸ナトリウム5.8部からなる500ｇの栄養素パウダー並びに75ｇのＭ150グアーゴムを５kgの接着剤中に溶解することにより、実施例１に記載されるようなポリエチレン紙に被覆されるべき水ベースの接着剤組成物を形成した。実施例１に記載されるものと同様の接着剤は、コリスチンメタンスルホネート0.2503部と、塩化リチウム175部と、小量の10Ｎ水酸化ナトリウム及びメチル－β－Ｄ－グルコシド0.075部の添加により水50部中に溶解されたナリジクス酸0.4001部の溶液が添加された蒸留水2450部と、の撹拌された水性溶液が添加されたIGEPAL CA 897非イオン性界面活性剤及びラウロイルペルオキシドとの98：２の重量比（IOA：NVP）のアクリル酸イソオクチル（IOA）及びＮ－ビニルピロリドン（NVP）のコポリマーの水性乳濁液である。被覆された基材を約90℃のエアーオーブン中で乾燥させ、3.55～4.2mg／cm^2の乾燥重量で基材の表面上に粘着層を形成した。
栄養素パウダー１部と、キサンタンゴム２重量部（KELTROL gum、ロカストビーンゴム２部）（MYPRODYNE gum)，K1A112の１重量部、及びＭ150グアーゴム１重量部の割合で形成された混合ゴムパウダー２部と、を含む冷水可溶性パウダーの混合物を水ベースの接着剤層の表面上に振りかけた。全ての過剰なパウダーも振りおとした。この接着剤コートされパウダーコートされた紙を、培養培地装置の底部を形成するのに用いた。
0.969～1.29mg／cm^2のレベル（乾燥時に測定）で98：２の重量比（IOA：AA）のアクリル酸イソオクチル（IOA）及びアクリル酸（AA）の接着性コポリマーで被覆され、接着性ポリマー３kg当り1.2リットルメタノール及び1.2リットルアセトン中に0.66ｇの５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル－β－Ｄ－グルコピラノシド及び5.43ｇの５－ブロモ－６－クロロ－３－インドリルホスフェートを含む0.04mm厚の透明な二軸延伸コロナ処理ポリプロピレンフィルムのシートからカバーシートを作り、接着性組成物を乾燥させた。カバーシートに混合ゴムパウダーを振りまいた。
９mlのバターフィールド緩衝液（Butter field's buffer）中のＳ．アウレウス及び１mlの食物サンプルの混合物を、培養プレート装置に接種するのに用いるために調製した。用いられた食物は、１～10倍の水で希釈したチキン（chicken）及びチェダー（cheddar）、モンテレイジャック（Monterey jack）、スイス（Swiss）並びにモッツアレラ（mozzarella）チーズである。１ml部分の培養プレート装置への添加を２回行い、0.5m部分の新しく調製されたバードパーカー（Baird-Parker）寒天への添加を４回行った。陽性対照培養プレートに接種するのに未希釈の純粋なＳ．アウレウス及び１：10に希釈したＳ．アウレウスを用いた。全てのサンプルを35℃でインキュベートし、40時間において培地計数を行った。この結果を表３に要約する。

表３

平均カウント （cfu／ml）			
	Baird-Parker	マゼンタ PO_4 *	生産率 マゼンタ
純粋なブドウ球菌－10	144.5	163.5	113%
純粋なブドウ球菌－10^{-1}	15.5	13	84%
Cheddar	173.5	212	122%
Swiss	160	173.5	108%
Mozzarella	193	195	101%
Monterey Jack	196.5	191	97%
Chicken	226	195.5	87%

生産率は、バードパーカー（Balrd-Parker）寒天、即ち周知の標準に対する本発明の方法及び装置の比較である。Ｓ．アウレウスコロニーは本発明の装置において明るいマゼンタ色である。この結果は、コロニー形成単位の数は両方の方法を用いてほぼ同じであることを示す。

* ５－ブロモ－６－クロロ－３－インドリルホスフェートは明るいマゼンタ色を与え、好ましいホスフェート基質である。

【図１】

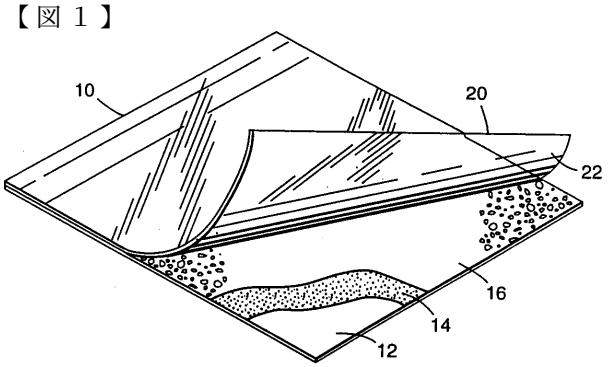

FIG.1

フロントページの続き

(72)発明者　ランド，マーリーズ　イー.
アメリカ合衆国，ミネソタ　５５１３３－３４２７，セント　ポール，ポスト　オフィス　ボックス　３３４２７　（番地なし）

審査官　冨永　みどり

(56)参考文献　国際公開第９３／０１２２１８（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12Q 1/00 - 3/00
BIOSIS/WPI(DIALOG)