

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3184971号

(P 3 1 8 4 9 7 1)

(45)発行日 平成13年 7 月 9 日(2001.7.9)

(24)登録日 平成13年 5 月 11日(2001.5.11)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C12N 1/20

C12N 1/20

A

C12Q 1/04

C12Q 1/04

//(C12N 1/20

C12R 1:22)

(C12Q 1/04

請求項の数 2 (全11頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平11 - 301224

(22)出願日 平成11年10月22日(1999.10.22)

(65)公開番号 特開2001 - 120256(P 2001 - 120256 A)

(43)公開日 平成13年 5 月 8 日(2001.5.8)

審査請求日 平成11年10月22日(1999.10.22)

(73)特許権者 591131833
農林水産省草地試験場長
栃木県那須郡西那須野町千本松768

(72)発明者 大友 量
栃木県那須郡西那須野町千本松800

(72)発明者 斎藤 雅典
栃木県那須郡西那須野町千本松800

(74)代理人 100063565
弁理士 小橋 信淳

審査官 六笠 紀子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】クレブシエラ (K l e b s i e l l a) 属細菌の選択培地

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】 クレブシエラ (Klebsiella) 属細菌を家畜ふん尿・堆肥・敷料等の畜産環境試料より選択的に検出・定量するための培地であって、単一炭素源としてミオイノシトール、単一窒素源として硝酸ナトリウムを用い、また、夾雑菌の生育阻害剤としてデオキシコール酸ナトリウム、プリリアントグリーンを添加して合成したことを特徴とするクレブシエラ (Klebsiella) 属細菌の選択培地。

【請求項2】 培地1リットルについて、4 gのミオイノシトールと、1 gの硝酸ナトリウムと、17.1 gのリン酸1水素ナトリウム・12水和物と、3 gのリン酸2水素カリウムと、0.5 gの塩化ナトリウムと、0.12 gの硫酸マグネシウムと、1 gのデオキシコール酸ナトリウムと、0.01 gのプリリアントグリーンを

2

有することを特徴とする請求項1記載のクレブシエラ (Klebsiella) 属細菌の寒天培地。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、畜産廃棄物のように様々な細菌が生息している環境から、乳房炎の原因菌の一種であるクレブシエラ (Klebsiella) 属細菌 (Klebsiella pneumoniae) を選択的に検出・定量し、乳房炎発生の予測・予防に役立てる衛生管理技術に関する。

【0002】

【従来の技術】乳房炎は酪農経営上重要な乳牛の疾患であり、様々な原因菌 (大腸菌や黄色ブドウ球菌を含む) によって引き起こされる。Klebsiella pneumoniaeはそうした乳房炎原因菌の一種であり、本菌によって引き起こされる乳房炎は深刻で廃牛となる場合が多い。従っ

10

て、畜産環境から *Klebsiella pneumoniae* を検出・定量する技術はきわめて重要である。

【 0 0 0 3 】従来 *Klebsiella* 属細菌の選択培地として M C I C agar (Bagley, S. T. and R. J. Seidler. Primary *Klebsiella* Identification with MacConkey Inositol Carbenicillin Agar. Appl. Environ. Microb. 36:536-8, 1978) や S C A I agar (Kregten, E. V., N. A. C. Westerdaal, and J. M. N. Willers. New, simple medium for selective recovery of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from human feces. J. Clin. Microbiol. 20:936-941 1984) が報告されているが、いずれも畜産廃棄物のように種々雑多な細菌を含む材料に対しては十分な選択性を持っていない。

【 0 0 0 4 】本プロジェクトの先行研究である「自動切り返しと戻し利用を特徴とする牛ふん尿の堆肥化処理」(伊吹俊彦・島中哲哉・斎藤雅典・関澤香朗, 草地試験場研究報告第 58 号 38-56 1999) において、本発明者らは *Klebsiella pneumoniae* の検出に、D H L 培地に生育した赤色コロニーを分離し簡易同定キットを用いて同定する、という方法を適用した。この方法は、結果が得られるまでに時間がかかるのみならず、非効率である。すなわち、D H L 培地が腸内細菌群一般の選択培地であることから、分離し同定に供した 2 2 株の内、*Klebsiella pneumoniae* はわずか 1 株であった。

【 0 0 0 5 】本発明者らは上記以外にも種々の既存の培地を用いて *Klebsiella* 属細菌を検出・定量することを試みたが、いずれも実用に耐えうるものではなかった。そこで、*Klebsiella* 属細菌の菌学的諸性質に基づき、ミオイノシトールを単一炭素源、硝酸ナトリウムを単一窒素源とし、さらにデオキシコール酸ナトリウムとブリリアントグリーンを選択剤として添加した新規合成培地「B I N D 培地」(表 1) を新たに開発し、*Klebsiella* 属細菌の検出・定量に用いることを提案した。

【 0 0 0 6 】

【発明が解決しようとする課題】本発明は本発明者らが新たに開発した「B I N D 培地」により、従来の方法では困難であった、畜産廃棄物などからの *Klebsiella* 属細菌の検出・定量を簡便・迅速に行うことを可能にする。この発明により、畜産環境中の *Klebsiella* 属細菌の追跡が容易となり、本菌に由来する乳房炎の予測・予防を効果的に行うことができる。

【 0 0 0 7 】

【課題を解決するための手段】本発明は、*Klebsiella* 属細菌の検出・定量のためにミオイノシトールを単一炭素源、硝酸ナトリウムを単一窒素源とし、さらにデオキシコール酸ナトリウムとブリリアントグリーンを選択剤として添加した新規合成培地「B I N D 培地」とその作成方法を提供する。本発明はまた、畜産廃棄物(牛ふん尿、戻し堆肥など)中の *Klebsiella* 属細菌を「B I N

D 培地」を用いて簡便かつ効果的に検出・定量する方法を提供する。

【 0 0 0 8 】

【発明の実施の形態】一般に環境中から特定細菌を分離・同定する最初の行程は、目的とする細菌を効果的に増殖させ、それ以外の細菌の増殖を抑制・阻害する「選択培地」を用いて行われる。選択培地の選択性が低すぎる場合、目的とする以外の細菌が増殖し、目的とする細菌の増殖の判定が困難になったり、その後の同定作業が著しく非効率になったりする。一方、培地の選択性が高すぎる場合、目的とする細菌群の一部しか検出されないことになり、細菌数が過小評価されるため疾病発生の予知・予防には使用できない。

【 0 0 0 9 】培地の選択性は、ある特定の細菌のみが資化できる栄養源の利用、抗生物質や色素など特定細菌の増殖を抑制する薬剤の添加などによって決定される。従来 *Klebsiella* 属細菌の分離には、本菌が特異的に利用できるクエン酸やミオイノシトールを単一炭素源として利用する方法、本菌を含む腸内細菌群が一般に耐性を示すデオキシコール酸の添加、本菌が耐性を示すアンピシリン系抗生物質の利用などが検討されている。しかし、他種の細菌の混入が比較的限定される食品などの試料に対しては一定の効果を示すものの、牛ふん尿スラリーや牛舎敷料など種々雑多な細菌を含む試料に対しては効果的ではなかった。

【 0 0 1 0 】本発明においては、*Klebsiella* 属細菌が特異的に利用できる栄養源として、単一炭素源としてのミオイノシトールに加え、新たに硝酸ナトリウムを単一窒素源として用いることを検討した。また、本菌が耐性を示すとされるアンピシリン系抗生物質については、すべての *Klebsiella* 属細菌が耐性を有するわけではないことから、これを用いなかった。代替として色素化合物の添加による他種細菌の生育抑制効果を検討し、ブリリアントグリーンが本菌の選択に効果的であることを見いだした。また、本発明による培地の応用範囲は、畜産関係に限らず他の分野にも適用できる。

【 0 0 1 1 】

【実施例】以下、本発明を実施例によって説明するが、本発明は実施例に限定されない。本実施例では、草地試験場総合牛舎及び近隣農家より採取したサンプルに含まれる *Klebsiella* 属細菌の検出・定量を以下のように試みた。

【 0 0 1 2 】(方法)

1) 材料：草地試験場総合牛舎及び近隣農家より採取した牛ふん・堆肥・敷料として利用した戻し堆肥・おがくず等。

2) B I N D 培地の調製：寒天末 3 g を 3 0 0 m l 三角フラスコに秤量し、蒸留水 1 9 0 m l を添加してオートクレーブ滅菌した。ここに 1 0 m l の 2 0 × B I N D 濃厚溶液(約 0 . 8 リットルの蒸留水にミオイノシトール

ル 8 0 g、硝酸ナトリウム 2 0 g、リン酸水素 2 ナトリウム 1 2 水和物 1 7 . 1 g、リン酸カリウム 6 0 g、塩化ナトリウム 1 0 g をよく攪拌して溶解し、蒸留水を加えて全量を 1 リットルとした後に濾過滅菌したもの)、0 . 2 ml の 1 M 硫酸マグネシウム水溶液、2 ml の 1 0 % デオキシコール酸ナトリウム水溶液及び 2 ml の 1 mg / ml プリリアントグリーン水溶液を添加する。よく攪拌・混合してから滅菌シャーレに約 1 5 ml ずつ分注し、室温に静置して固化したものをを用いた(表 1)。

【 0 0 1 3 】 3) 既存のクレブシエラ用培地の調製 : 上述の報文に従って調製した(表 2)。

4) *Klebsiella* 属細菌の検出・定量 : 1) で述べた材料 5 g を乾熱滅菌したプレンダーカップに秤量し、オートクレーブ滅菌したリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) を 5 0 ml 加えて、約 1 5 0 r p m で 1 分間処理した。ここから 5 ml を乾熱滅菌した希釈管にはかりとり、P B S で順次希釈したもの 1 0 0 μ l を 2) 及び 3) で述べた寒天培地に塗布した。これを 3 0 $^{\circ}$ C で一晩ないし二晩静置培養し、生育の見られたコロニーを計数し、あるいは単コロニー分離して以後の試験に用いた。

10 【 0 0 1 4 】

【表 1】

「BIND 培地」の組成及び特徴

培地成分	添加量 (g/l)	備 考
<i>myo</i> -inositol	4.0	単一炭素源
NaNO ₃	1.0	単一窒素源
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	17.1	
KH ₂ PO ₄	3.0	
NaCl	0.5	
MgSO ₄	0.12	
sodium deoxycholate	1.0	グラム陽性菌の生育抑制
brilliant green	0.01	夾雑菌の生育抑制
agar	15.0	

本培地は薄青色の外観を呈する完全合成培地である。*Klebsiella* 属細菌は本培地上に白色～淡青色で大きく盛り上がった形状のコロニーを形成するが、ほかの細菌群は本培地上に生育しないか、あるいはごく小さなコロニーを形成するのみである。

【表 2】

既存の *Klebsiella* 属細菌選択培地の組成および特徴

(1) MCIC agar (Bagley and Seidler, 1978)の組成と特徴

培地成分	添加量 (g/l)	備考
カゼインペプトン	17.0	
肉ペプトン	3.0	
<i>myo</i> -inositol	10.0	炭素源
NaCl	5.0	
bile acid mixture	1.5	グラム陰性菌の生育抑制
neutral red	0.03	
crystal violet	0.001	夾雑菌の生育抑制
carbenicillin-Na	0.05	抗生物質
agar	13.5	

本培地は茶褐色の外観を呈する完全培地である。*Klebsiella* 属細菌は本培地上に桃色～赤色で大きく盛り上がった形状のコロニーを形成する。

(2) SCAI agar (Kregtrn *et al.*, 1984)の組成と特徴

培地成分	添加量 (g/l)	備考
<i>myo</i> -inositol	10.0	炭素源
sodium Citrate	2.0	炭素源
(NH ₄)H ₂ PO ₄	1.0	単一窒素源
K ₂ HPO ₄	1.0	
NaCl	5.0	
MgSO ₄	0.2	
bromothymol blue	0.08	
agar	13.0	

本培地は緑色の外観を呈する完全合成培地である。*Klebsiella* 属細菌は本培地上に緑黄色～黄色で(培養期間などにより異なる)大きく盛り上がった形状のコロニーを形成する。またコロニー周辺の培地色も黄変する。

【0015】

【表3】

細菌の簡易同定キット(Api20E)を用いた同定試験の結果

特徴	菌株番号	同定結果
すべての培地でクレブシエラと考えられるコロニーを形成	1, 2, 3, 4, 5, 37, 40	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	15, 16, 17, 22	<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i>
	18	<i>Klebsiella oxytoca</i> or <i>ornithinolytica</i>
SCAI agar上でクレブシエラ様のコロニーを形成	6	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	33	<i>Citrobacter freundii</i> ???
	31, 48	<i>Serratia rubidaea</i> / <i>plymuthica</i> / <i>ficaria</i>
	34	<i>Rahnella</i> or <i>Pantoea</i> or <i>Serratia</i> or <i>Enterobacter</i>
	10	同定不能
MCIC agar上でクレブシエラ様のコロニーを形成	25	<i>Chryseomonas luteola</i>
	29, 49	(<i>Bordetella</i> or <i>Alcaligenes</i> or <i>Moraxella</i>) or <i>Ochrobacterium</i>
すべての培地で良好に生育	39, 41	<i>Pseudomonas</i> or <i>Chryseomonas</i> or <i>Chromo.</i>
	14	同定不能
	35	同定不能
赤色コロニーを形成	11	<i>Serratia marcesens</i> or <i>liquefacines</i>
	47	<i>Serratia rubidaea</i>
系統樹上でクレブシエラに類似	38, 42	<i>Enterobacter</i> or <i>Citrobacter</i>
	9	<i>Aci.baumannii</i> / <i>calco.</i>
	23	<i>Pseudomonas</i> or <i>Chryseomonas</i>

ここで、表1は本発明によって新たに開発された「B I N D培地」の組成を示す。表2は*Klebsiella*属細菌分

離用としてこれまでに報告された選択培地の組成を示す。表3は図4に示した各分離菌株のApi20Eによる同

定結果を示す。

【0016】5) 単コロニー分離した細菌の同定：分離した各菌株を2)及び3)で述べた寒天培地に移植し30で三晩静置培養して形成されたコロニーの外観を観察した。またそれぞれの菌株から全DNAを抽出し、PCR法によって16S rRNA領域を増幅してその塩基配列を解析した。得られた配列情報は塩基配列解析ソフトウェア(GENETIX Mac ver.9.0及びClustal X)を用いて既知のKlebsiella属細菌及び近縁細菌の当該塩基配列と比較し、分子系統樹を作成した。さらに、簡易細菌同定システム(Api20E)を用いた分離株の同定も行った。

【0017】(結果の概要)

1) 上述の各培地によって牛ふんや敷料に含まれるKlebsiella属細菌の検出を試みたところBIND培地によってのみ、一定の外観(白色~淡青色で大きく盛り上がった形状)を有するコロニーの生育が認められた。ほかの培地では様々な外観のコロニーが出現し、Klebsiella属細菌のコロニーを判別することは困難であった(図1~図3参照)。

2) 分離菌株のそれぞれの培地上での生育を比較したところ、BIND培地に生育する菌株はほかの培地上でもKlebsiella属細菌と考えられる外観のコロニーを形成した。

【0018】一方、他の培地ではKlebsiella属細菌と考えられる以外の細菌も生育した(図4参照)。

3) 16S rRNA領域の塩基配列の解析からBIND培地に生育する細菌はすべてKlebsiella属細菌かそれに非常に近縁であることが示された。一方、ほかの培地に生育する細菌の中にはKlebsiella属細菌とは別の系統に分類される細菌も含まれていた(図5参照)。

4) Api20Eによる同定の結果からも、BIND培地に生育した細菌はすべてKlebsiella属細菌であることが示唆された(表3)。

【0019】以上の結果により、本発明によって提供される「BIND培地」は、既知の培地と比較してKlebsiella属細菌の選択性に非常に優れており、畜産廃棄物のような種々雑多な細菌が含まれるような試料に対しても十分適用されることが明らかとなった。

【0020】

10 【発明の効果】本発明は、クレブシエラ(Klebsiella)属細菌を家畜ふん尿・堆肥・敷料等の畜産環境試料より選択的に検出・定量するための培地を、ミオイノシトールを単一炭素源、硝酸ナトリウムを単一窒素源とし、デオキシコール酸ナトリウムとプリリアントグリーンを夾雑菌の生育阻害剤として添加して合成することにより、畜産環境試料中のKlebsiella属細菌の検出・定量をきわめて簡便かつ効果的に行うことができる。これにより、Klebsiella属細菌が原因となる深刻な乳房炎の発生を予知し、予防することが可能となる。

20 【図面の簡単な説明】

【図1】今回試験に用いた4種の培地の外観を示す。

【図2】図1の各培地に畜産環境(草地試験場総合牛舎)から採取したサンプルの抽出液を塗布・培養した様子を示す。

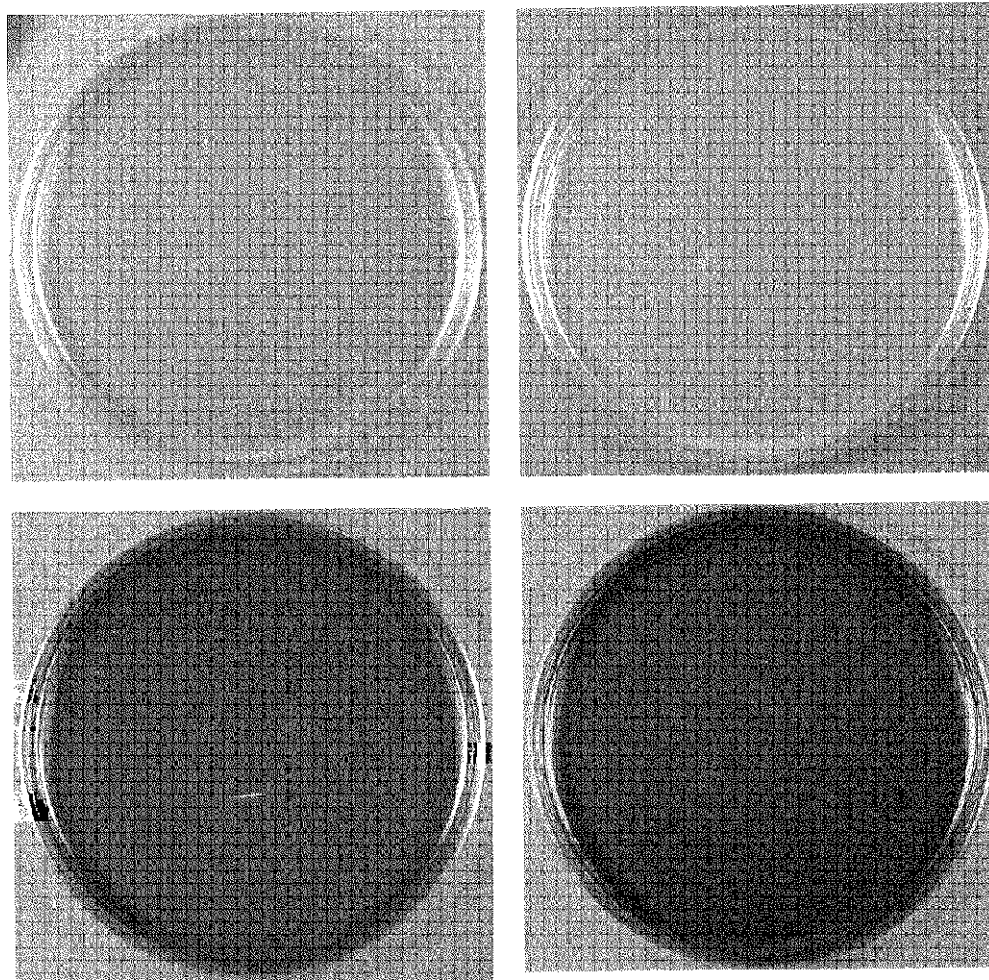
【図3】図1の各培地に畜産環境(近隣農家)から採取したサンプルの抽出液を塗布・培養した様子を示す。

【図4】本実施例で分離された菌株の各培地上での生育の様子を示す。

30 【図5】図4に示した各分離菌株の16S rRNA塩基配列に基づいて作成した系統樹の例を示す。

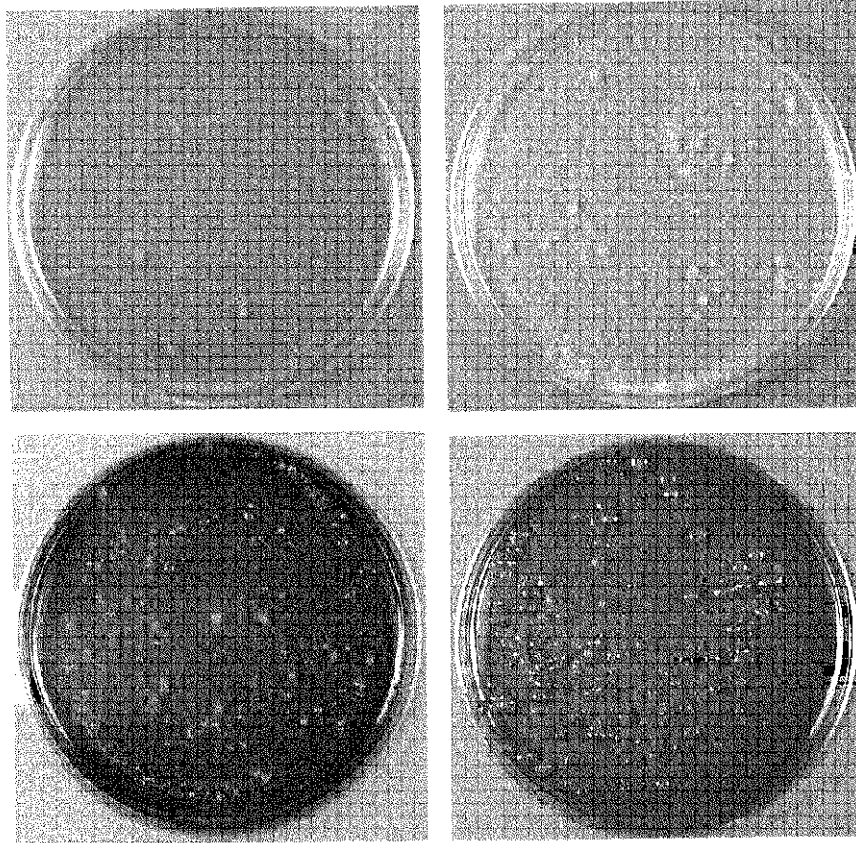
【図 1】

今回試験に用いた4種の培地



今回試験に用いた、寒天培地4種の使用前の外観を示す。
上段左側より、BIND 培地および Brilliant Green を含まない BIND 培地
下段左側より、SCAI agar および MCIC agar

【図 2】

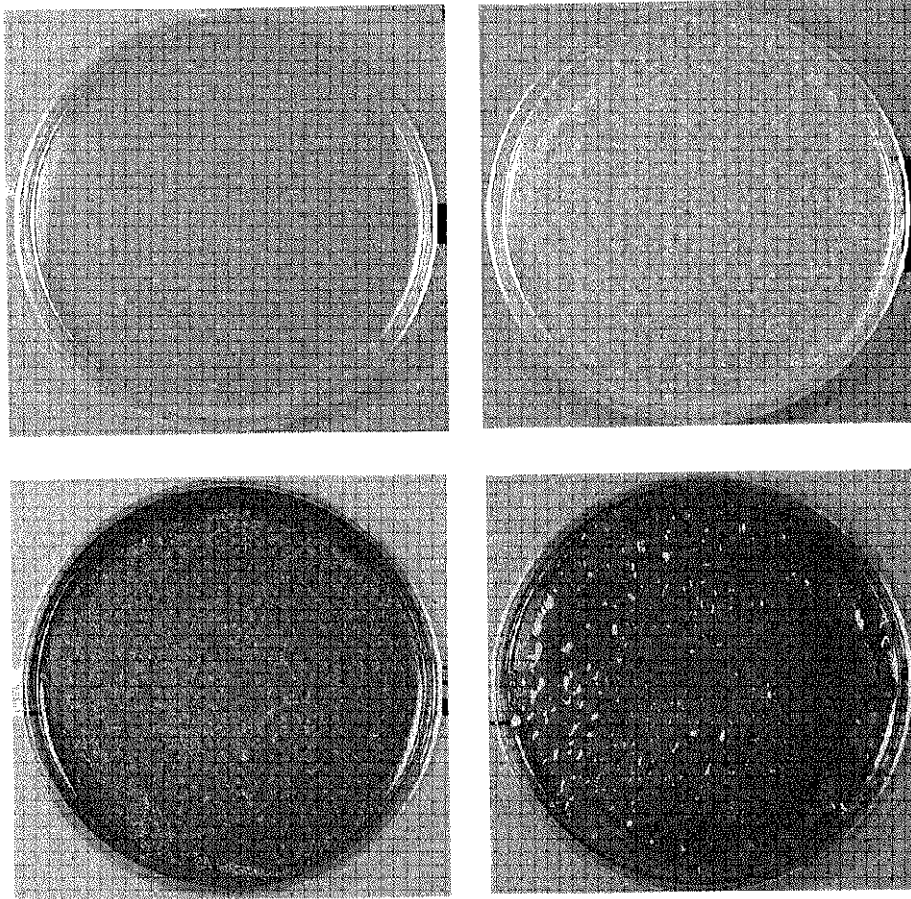
牛ふん中の *Klebsiella* 属細菌の検出例

草地試験場総合牛舎から採取した牛ふんの抽出液(100倍希釈)を塗布し、
30℃で二晩培養したあとの各培地

上段左側より、BIND 培地および Brilliant Green を含まない BIND 培地
下段左側より、SCAI agar および MCIC agar

【図 3】

敷料中の *Klebsiella* 属細菌の検出例



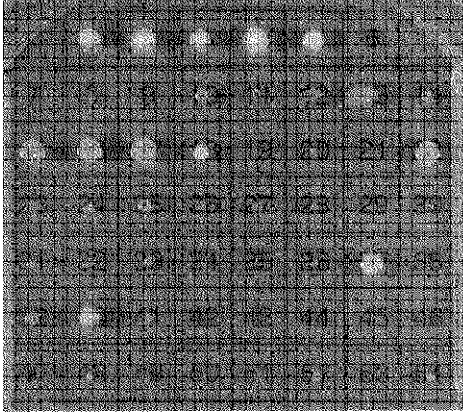
近隣農家から採取した敷料の抽出液(100倍希釈)を塗布し、30℃で二晩培養したあとの各培地

上段左側より、BIND 培地および Brilliant Green を含まない BIND 培地
下段左側より、SCAI agar および MCIC agar

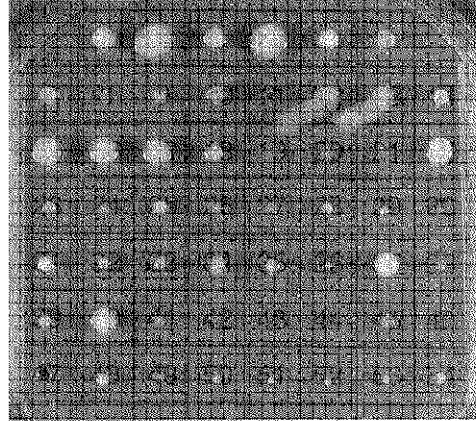
【図 4】

各分離菌株の各培地上での生育

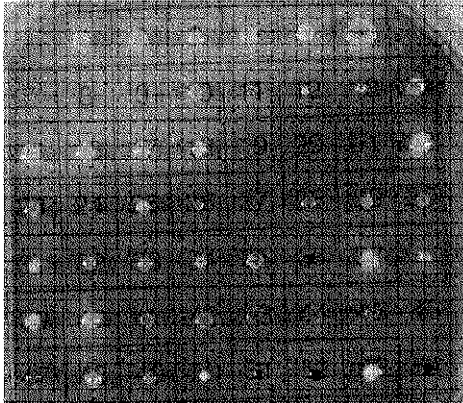
(A)



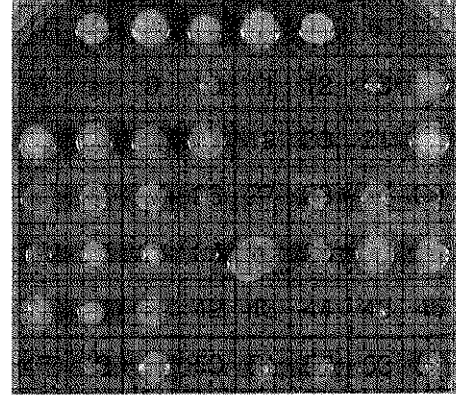
(B)



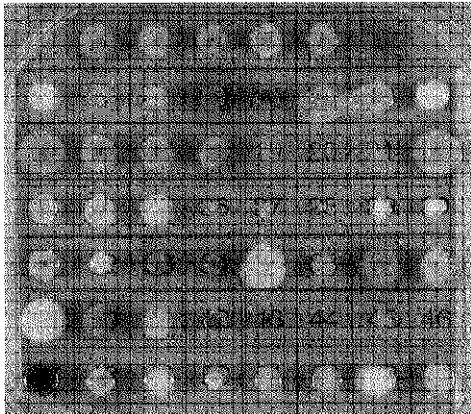
(C)



(D)



(E)



- (A) BIND培地
1~5,15~18,22,37,40が生育
 - (B) BGを含まないBIND培地
 - (C) SCAI Agar
6,10,31,33,48などが類似の
コロニーを形成
 - (D) MCIC Agar
25,29,49などが類似のコロニー
を形成
 - (E) クロモカルト寒天培地 (対照)
(Klebsiellaは桃色に発色する)
- 14,35,39,41など
…外観は似ていないものの、BIND
培地以外では良好に生育した。
- 説明の右側に示したラベルは、図3の系統樹に
付したラベルに対応する。

【 図 5 】

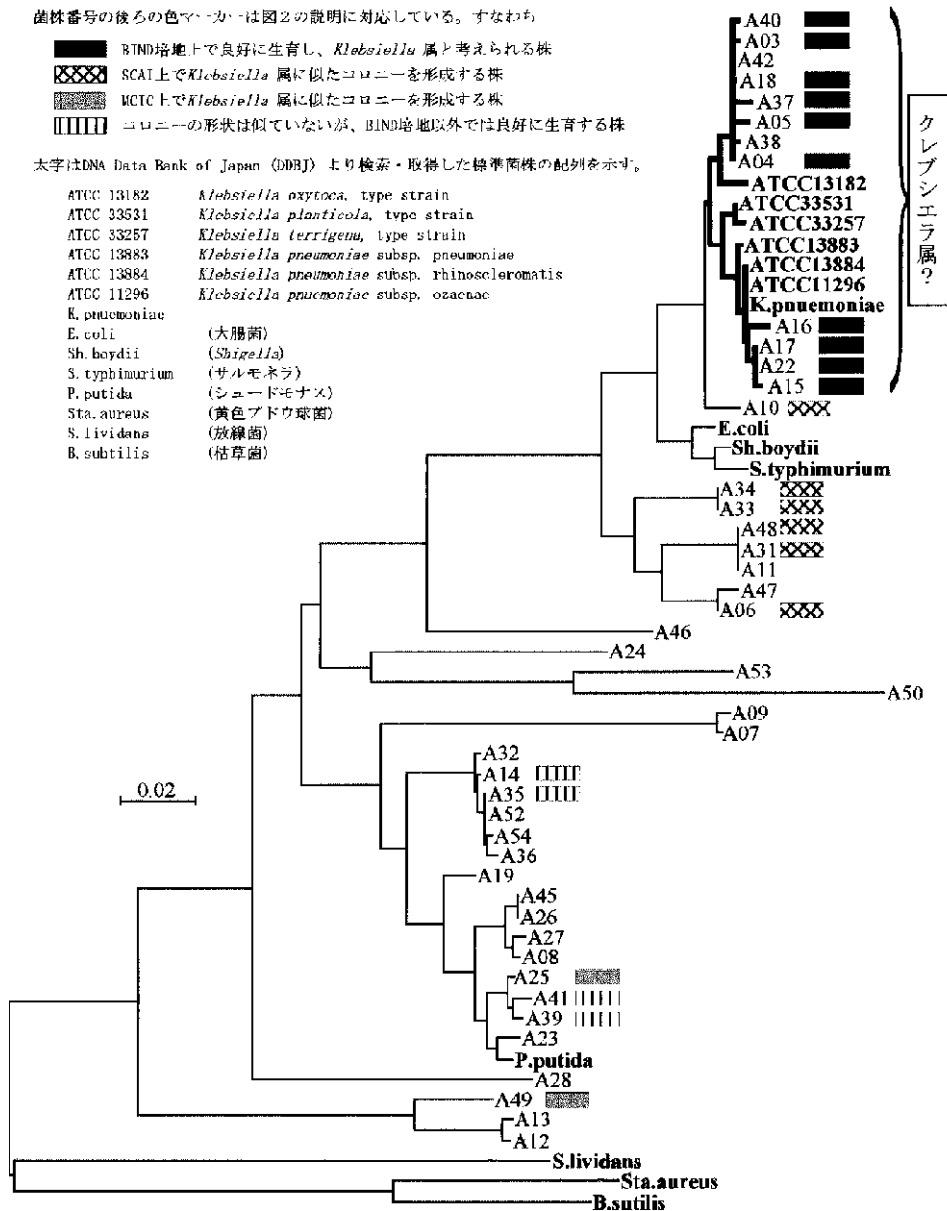
分離菌株の16S rRNA 配列に基づく系統樹の例
DDBJ - Clustal W によるブートストラップで作成した系統樹

菌株番号の後ろの色マーカーは図2の説明に対応している。すなわち

- RTND培地上で良好に生育し、*Klebsiella* 属と考えられる株
- XXXX SCAT上で*Klebsiella* 属に似たコロニーを形成する株
- XXXXX MCTC上で*Klebsiella* 属に似たコロニーを形成する株
- ||||| コロニーの形状は似ていないが、BIND培地以外では良好に生育する株

太字はDNA Data Bank of Japan (DDBJ) より検索・取得した標準菌株の配列を示す。

ATCC 13182	<i>Klebsiella oxytoca</i> , type strain
ATCC 33531	<i>Klebsiella planticola</i> , type strain
ATCC 33257	<i>Klebsiella terrigena</i> , type strain
ATCC 13883	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
ATCC 13884	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>
ATCC 11296	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>
<i>K. pneumoniae</i>	
<i>E. coli</i>	(大腸菌)
<i>Sh. boydii</i>	(<i>Shigella</i>)
<i>S. typhimurium</i>	(サルモネラ)
<i>P. putida</i>	(シュードモナス)
<i>Sta. aureus</i>	(黄色ブドウ球菌)
<i>S. lividans</i>	(放線菌)
<i>B. subtilis</i>	(枯草菌)



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 1 2 R 1:22)

(56)参考文献 特開 昭52 - 134017 (J P , A)
Applied and Environmental Microbiology , 1979 , Vol . 37 , No . 5 ,
p . 909 - 915
J . of General Microbiology , 1980 , Vol . 117 ,
No . 1 , p . 169 - 179

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷ , DB名)
C12N 1/20
C12Q 1/04
BIOSIS (DIALOG)
JICSTファイル (JOIS)
WPI (DIALOG)