

バクテリオファージテストにおけるメンブラン フィルターのろ過効果について

胡木 浩伸・大石 修三*・合田 俊彦*

神戸植物防疫所坂出支所松山出張所

久保 秀幸**・崎山 健二***

神戸植物防疫所大阪支所和歌山出張所

Effectiveness of membrane-filtration for phage technique for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Hironobu EBISUGI, Shuzo OOISHI, Toshihiko GODA, Hideyuki KUBO, Kenji SAKIYAMA (Kobe Plant Protection Station). *Res. Bull. Pl. Prot. Japan* 34: 113-115 (1998).

Abstract: The plaque count method test for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *citri* was reexamined. The membrane-filter (pore size 0.22 μ m) was used after centrifugation process of test solution in the phage count method in order to exclude the contaminated bacteria in phage suspension. The use of membrane filter was effective in plaque-counting.

Key words: membrane-filtration, bacteriophage, detection, *Xanthomonas campestris* pv. *citri*

対米輸出温州みかん検疫においては、バクテリオファージによるカンキツかいよう病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *citri* (HASSE 1915, DYE 1978) 汚染の有無を検定 (以下、ファージ検定という。) することが輸出条件の一つとなっている。

この検定では、温州みかん果実の洗浄液でバクテリオファージが増殖するかどうかをチェックすることにより当該細菌の有無を確認するものである (OBATA, T. *et al.*, 1969)。実際の検定では、果実洗浄液 (検定液) にバクテリオファージを加えて振とう培養し、そこで増殖したバクテリオファージを溶菌斑計数法で定量するものであるが、果実洗浄液中には種々雑多な細菌類が混在することから、それらを遠沈処理で除去して溶菌斑計数法に供している。

しかしながら、この遠沈処理ではこれらの雑菌等の除去が十分でない場合もあり、溶菌斑計数に支障を生じることがある。

このため、メンブランフィルター (以下、フィルターという) を用い、果実洗浄液のろ過の有効性を検討したので、その結果を報告する。

材料及び方法

1. 検定用バクテリオファージおよびその指示菌

ファージ検定用として、横浜植物防疫所調査研究部から分譲された CP₁、CP₂ ファージおよびそれぞれの指示菌である *X. campestris* pv. *citri* N6101 菌株および N6119 菌株を供試した。真空凍結乾燥保存された CP₁、CP₂ ファージをジャガイモ半合成液体培地 (Potato Semi-synthesis medium, PS 培地) に懸濁させ、ファージ濃度約 1.5~1.6 $\times 10^5$ /ml のファージ調整液を作製して以下の試験に供試した。指示菌は、PSA 培地 (PS 培地に寒天を加えたもの) で 1~2 日間斜面培養し、滅菌水に懸濁させ指示菌懸濁液 (10⁸ CFU/ml) として供試した。

2. ファージ濃度の定量法

ファージ濃度の定量は、現行のファージ検定の方法 (農政局長通達, 43 農政 B 第 1901 号) に準じて溶菌斑計数法で行った。

3. フィルターによるファージ液のろ過方法

滅菌注射筒を用いて検定液を採取し、その注射筒の先端にポアサイズ 0.22 μ m のろ過器 (ミリポア社製)

* 現在、神戸植物防疫所坂出支所

** 現在、神戸植物防疫所関西空港支所

*** 現在、神戸植物防疫所業務部

を取り付けてファージ液のろ過を行った。

4. フィルターろ過の有効性の検討

PS培地5mlに前述のファージ調整液0.1mlを添加して作製したファージ液(約 $1.5\sim 1.6\times 10^4$ 粒子/ml)をフィルターろ過し、このろ過液0.1mlを溶菌斑

計数法によりファージ濃度を定量し、フィルターろ過による影響を調査した。また、実際に行われるファージ検定液中に含まれる各種の夾雑物の影響を調べるために、おりを多く含むPS培地を用いて上記と同様に作製したファージ液を3回(毎回フィルターを交換)ろ過し、各ろ過毎にファージ濃度を溶菌斑計数法で定量

第1表 フィルターろ過のファージ液への影響

反復	CP ₁			CP ₂		
	対照区	ろ過区	増減率(%)	対照区	ろ過区	増減率(%) ²⁾
1	235.4 ¹⁾	255.4	8.5	387.6	341.4	-11.9
2	310.8	336.2	8.2	244.2	226.4	-7.3
3	205.6	239.7	16.6	381.8	360.6	-5.6
4	382.6	358.8	-6.2	359.4	333.8	-7.1
5	394.2	375.4	-4.8	372.2	365.4	-1.8
平均増減率			4.5	-6.7		

¹⁾: シャーレ5枚の平均溶菌斑数

²⁾: 増減率=(ろ過区-対照区)/対照区×100

第2表 夾雑物によるフィルターろ過への影響

ファージ	ろ過回数	対照区溶菌斑数 ¹⁾	夾雑物混入区溶菌斑数
CP ₁	0	290.0 (100)	303.0 (100)
	1	265.3 (91.5)	173.7 (57.3)
	2	280.3 (96.7)	171.4 (56.6)
	3	260.7 (90.0)	166.7 (55.0)
CP ₂	0	316.7 (100)	330.3 (100)
	1	292.0 (92.2)	146.9 (44.5)
	2	288.0 (90.1)	131.7 (39.8)
	3	262.7 (82.9)	136.4 (41.3)

¹⁾: 溶菌斑数は3シャーレの平均値

第3表 ファージ検定におけるフィルターろ過の影響

ファージ	ろ過の有無	対照区		検定区	
		Check	Test	Check	Test
CP ₁	無	418.9 ¹⁾	332.7	416.9	335.2
	有	412.6	311.9	427.9	347.5
増減率 ²⁾		-1.5	-6.4	2.6	3.7
CP ₂	無	379.0	367.9	369.1	359.0
	有	360.6	350.8	351.7	374.1
増減率		-4.8	-4.6	-4.7	4.2

¹⁾: 溶菌斑数は3シャーレの平均値

²⁾: 増減率=(ろ過区-無ろ過区)/無ろ過区×100

した。この試験の対照区は、フィルターろ過により清澄化したPS培地を用いて調整したファージ液とした。

さらに、現行のファージ検定にフィルターろ過を組み入れる場合の問題を検討するため、ファージ検定で実際に行われる方法と同様の方法で作製した果実洗浄水を用い、検定を行うことによりフィルターろ過処理の影響を検討した。

結果及び考察

ファージ液をフィルターでろ過後溶菌斑計数法で定量した結果、ろ過しない対照区と比較してCP₁では平均4.5%の増加、CP₂では平均6.7%の減少となった(第1表)が、この程度の増減は操作上の誤差の範囲と考えられた。

一方、実際のファージ検定では果実洗浄液を濃縮し、これにファージを添加して検定液とするため細菌など種々の微生物、夾雑物等が含まれている。これらのフィルターろ過への影響を調べるため、おりを多くを含むPS培地を用いて調整したファージ液をろ過し、ファージ濃度を調べた結果を第2表に示した。

おりを多く含むファージ液をろ過した場合、1回目のろ過でCP₁、CP₂の溶菌斑はろ過しなかったものと比較してそれぞれ無ろ過の57.3%、44.5%へと大幅に減少した。2回目、3回目のろ過では両者とも大幅な変動はなかった。おりを除去した対照区は、ろ過しなかったものに比較して顕著な変動はなかった。このことは、ファージ液中に多量の夾雑物があった場合フィルター

に目詰まりなどが起こったためと考えられた。

以上の予備試験の結果から、フィルターはファージの透過性に影響はないが、検定液に夾雑物を多く含む場合目詰まりを起こすことが明らかとなった。

現行のファージ検定の手順では、溶菌斑計数を行う場合には遠沈処理(7,000 G・10分間)により夾雑物を落として検定に用いることとしているが、この操作が不十分であると培養シャーレに細菌類が生育し、溶菌斑計数が困難な事態が生じることがある。これは不慣れなピペット操作などにより、検定液に沈殿した雑菌が混入することが原因と考えられるが、そのような場合などはフィルターろ過が有効であると考えられる。

このため、現行の検定の操作の中で検定液の遠沈後にフィルターろ過を加えてファージ検定を行った。その結果を第3表に示した。フィルターろ過の操作を加えることによる溶菌斑数に差はほとんど認められなかったが、フィルターろ過区では培養したシャーレに雑菌の発生がなく、溶菌斑計数が極めて容易であった。

ファージ検定は、熟練した技術を要する溶菌斑計数法が根幹となっており、これを確実に行うことが検出精度、すなわち検定の信頼度を保証するものである。フィルターろ過の導入により、より確実に溶菌斑計数が行えるものとする。

引用文献

- 小畑琢志, 坪井福俊, 脇本 哲 (1969) 対米ウンシュウミカン検定法ならびに表面殺菌法の検討 (英文) 植防研報 7: 26-37