海水性 *Pseudomonas* 属の研究

Studies on Marine Species of *Pseudomonas*

千葉大学腐敗研究所 (主任 相磯和嘉教授)

富 平 輝 夫

Teruo Tomihira

The Institute of Food Microbiology, Chiba University

(Director: Prof. Dr. K. Aiso)

緒 言

海洋に棲息している bacteria は海水という環境条件に支配されているので固有の flora を形成している。

それぞれの海洋国家では、それぞれの海洋環境下における marine bacteria の研究者の一群をもっている。米国における Zobell¹⁾, ソ連における Kriss²⁾, オーストラリアにおける Wood³⁾, 印度における Velankar⁴⁾ など代表的の marine bacteria の研究者である。

また、最近 marine bacteria に関する綜説的の論文^{5), 6)} がしばしば専門誌に掲載されているのも marine bacteria の重要性を示唆しているものである。

わが国においては水産学とも関聯して、当然 marine bacteria の研究が過去において盛んであつた筈だと思われるが、不思議とこの方面の文献が少ない。わずかに基礎細菌学の領域で好塩性のメカニズムに関する一連の研究と、木俣正夫⁷⁾, 谷川英一氏⁸⁾ らの水産腐敗学としての微生物学的記載が見られるのみである。

当研究所においては食品腐敗細菌の系統的研究の帰結として海水細菌叢の検索の必要にせまれ、ここ数年来相磯研究室^{9), 10)}, 柳沢研究室^{11), 12)} において本問題がとりあげられて来た。

又時を同じくして滝川巖氏^{13), 14)} が腸炎型の食中毒の原因菌として好塩性の *Pseudomonas* を分離し、その病原性を主張するに及び、水産食品に因る食中毒と海水菌の関係が研究の対像としてとりあげられ、漸く衛生細菌学者の間に marine bacteria に関する関心が高まるに至つた。

滝川菌はグラム陰性の桿菌で、極毛性の鞭毛を有する所から *Pseudomonas* の sea water form のものに近似している。

相磯¹⁵⁾ らの研究によれば、本菌は全く marine pseud-

omonas と一致するもので、病原性という点を別にすれば決して珍らしい細菌ではない。著者は同僚齊藤¹⁶⁾ と共に食品細菌としての海水菌の立場と、病原性としての滝川菌の存在を理解する為に、海水環境から相磯、飯田らによつて分離された marine bacteria のうちグラム陰性桿菌で、端在性の鞭毛の着生を示す菌株を選んで本研究を実施した。

菌株の分離蒐集

3%食塩濃度を至適とする marine form bacteria は海水あるいは海産魚介類の新鮮なもので容易に分離出来る。当教室では1956年と1957年の夏2回にわたつて駿河湾沼津近海において海水及び釣り上げた直後の魚から菌の分離を行つた。本研究に用いた菌の大部分はこの時に分離されたものである。この時の分離源及び分離方法はすでに飯田⁹⁾, 海瀬らにより報告されている。すなわち海水は河口、海岸、岸から5km沖の表面または深さ30cm程度の海水を滅菌ビペットまたは採水瓶で採取して分離源とした。魚はメバル、カサゴ、キンメダイなどの底魚が主で、釣り上げた直後のものの皮膚粘液物をかき取り、またはえらを取り出して増菌培地に加えた。増菌培地には食塩3%加ブイオンを使用し、室温(25°C前後)18時間培養した後、食塩3%加普通寒天培地、食塩3%加SS寒天培地、食塩7.5%加普通寒天培地等で平板分離をおこなつた。一部の海水は増菌せずに滅菌瓶に入れて実験室に持ち帰つたものを直接7.5%食塩加寒天で混釈培養法(9cmシヤーレ中に海水0.1~0.2ccを加えて)により、また membran filter で海水10~50ccから集菌して3%食塩加SS寒天で分離した。分離菌は直に食塩無添加の培地に移植して発育しないもの、または食塩3%の培地と比べて発育のきわめて弱い好塩性の菌株のみを海水菌とした。海水菌は3%に食塩を添加した培地で増菌したものの方が、直接あるいは集菌して

分離したものより遙かに高率に分離された。分離培地のうちでは 3%食塩加普通寒天をもちいた場合は海水菌の中に swarming を起こすものが多く分離ははなはだ困難であつた。この場合は分離不十分のまま持ち帰り SS 寒天または streptomycin を 5~10 γ/cc に加えた培地で再分離をおこなつて純培養とした。

以上の方法で 沼津近海で分離した海水菌は 2 年間で 300 株以上をかぞえたが、継代中に死滅したものも多くまた性状を調べたのち整理したものもあり、著者が実験に用いたものはこのうちのグラム陰性桿菌で端在性の鞭毛を有する marine form の *Pseudomonas* と思われるものの 41 株である。沼津近海で分離したものその他 1956 年秋、浜名湖産のボラによる食中毒が起つた際、ボラ及浜名湖水より分離したもの 3 株を加えた。

以上当教室で分離したもの計 44 株の他に食中毒原因菌として報告されている好塩菌を 2 株加えた。これらは著者の収集したものと、その性状においてほとんど差異が認められない。その 1 株は最初に滝川氏によつて分離されたもので同氏より分与を受けて使用した。他の 1 株は長崎県で起つた食中毒原因菌と思われるもので、すでに当教室の松野¹⁷⁾らにより報告されている菌である。

著者の収集し実験に供した菌株は以上のごとき由来の

第 1 表 Source, isolation method and grouping

sources	isolation method	mono. & lophotrichous	peritrichous	vibrio like
sea water	I	7	3	2
	II	8	2	
	III	7	1	2
	IV	8		
marine fish	I	5		
	II	3		
	III	6	2	
human feces*		2		
		46	8	4

I : NaCl bouillon, 24 hrs incubation, 3.0 % NaCl agar plating

II : NaCl bouillon, 24 hrs incubation, 7.5 % NaCl agar plating

III : NaCl bouillon, 24 hrs incubation, 3.0 % NaCl SS plating

IV : 7.5 % NaCl agar plate, direct isolation

* : isolated from the patients of some enteric food poisoning cases

ものの計 46 株であり、その分離源及び分離方法と株数の関係を第 1 表に示した。表には明らかに peritrichous の 8 株と *Vibrio* like の菌形を示した株 4 株を記載してあるが、これらは対象の意味で *Pseudomonas* と共に実験はおこなつたのであるが本報告では詳細は割愛した。

菌の形態

分離株はグラム陰性の桿菌で、配列は singly または in pair で、大きさは $0.6 \sim 0.8 \times 1.0 \sim 1.2 \mu$ のものから $0.8 \sim 1.0 \times 2.0 \sim 4.0 \mu$ のもの迄あり、一般に no swarming のものは短桿菌又はは球桿菌のものが多く、まっ直ぐのもの、軽く彎曲しているもの種々であり、明に彎曲の認められたものは *Vibrio* として除外した。更に先端が割合鈍なものもあつた。

運動性は位相差顕微鏡下で容易に観察されたが、運動性のある菌株については Bailey の方法で鞭毛染色を試みたが極毛は容易に染色されるにしても、周毛性のそれは腸内細菌などのものと比較して染まりにくく、菌属の診断には不十分であつた。従つて鞭毛の診断は総て電子顕微鏡によつた。培養 16~20 時間の新鮮な資料を用いた。

鞭毛は 1 極より 1 本または束状のもの、両極より 1 本づつのも、更に極毛の他に細い鞭毛様索状物を胴体部に数本有しているものもあつた。集落が no swarming の菌群は大半が明確に polar の flagella のみであつたが、swarming のある菌株は太い 1 本の極毛の他にあたかも周毛性であるかのごとき数本の細い索状物を認めたものが多いようであつた。著者はこれらの菌が極毛であるか周毛であるかについて判断に迷つたのであるが、他の培養性状から *Achromobacter* とは考えられないので極毛を認めない周毛性の菌株だけを除外して、多くの菌株は一応 polar の鞭毛着生を承認して、*Pseudomonas* に組入れた。これらの鞭毛については写真を参照されたい。

集落の形状：3%に食塩を添加した nutrient agar plate で集落を形成させると、普通の集落を作る菌群と早期に swarming して一定の集落形成の見られない菌群とに分れる。not swarmed の菌株の場合は circular entire で光沢があり、ほとんどが湿潤性である。直径は $0.5 \sim 1.0 \text{ mm}$ でそれぞれ同じ大きさを作るが、各菌株の集落の大きさは不同であつた。色は白色、灰白色、乳白色で半透明または不透明であつて、本菌を特徴づけるような外観は全くない平凡な集落である。Swarming の菌株では streptomycin を添加したり、SS 培地や Mc Conky 培地とうで孤立した集落を作らせることが出来た。

培養性状

A) 斜面寒天及びブイヨン培養所見

1. swarming のない菌株：46株中20株は 3%食塩斜面寒天ではいわゆる filiform に綺麗な発育が見られ、白色半透明または灰白色不透明のものがあつた。3%食塩ブイヨンでの発育も良好で、一般に平等な中等度の濁濁を示すが、sediment はない。液面には大部分のものは薄い菌膜を作る。

2. Swarming する菌株：26株がこの group で全株共前者に比べて発育は旺盛である。3%食塩斜面寒天では abundant, smooth で、白色半透明のものは白金耳の跡から拡がる感じが強く、灰白色不透明のものは一様に膜状の発育を示す。3%食塩ブイヨンでは平等な強い濁濁を示し、時に sediment を生ずる。全株とも液面に相当厚い菌膜を作る。

B) 含窒素化合物に対する作用

1. Gelatin 液化作用：Bergey's manual によると *Pseudomonas* 属の sea water and brine forms 中色素非産生菌で運動性を有する菌種として8株を挙げ、その中 gelatin liquefied のもの7菌種を記載している。著者の分離株では液化能を有するもの44株、非液化菌は2株であつた。陽性株中 swarming する菌株の液化作用は強くかつ速かつた。

2. Casein 水解：判定は casein plate に菌浮游液を移植し casein 水解による透明化を目標とした。46株中42株が陽性であり、swarming, no swarming の差は見られなかつた。

3. 尿素分解作用：Christensen の urea agar を用いて判定したが、分離株中42株が陰性で、陽性のものは第1群の4株であつた。なお滝川株は陰性であつた。

4. Indole 反応：第1群の40株及び第Ⅲ群の AITS-57が陽性であつた。Fresh water form の *Pseudomonas* の多くのものが Indole を産生しないのに、sea water form の *Pseudomonas* は Indole 産生が普通であり、この点本菌の同定上の Key の1つとなつている。

5. 硝酸塩還元作用：分離同定に用いた全株が陽性であつたが、陽性度には強弱が認められた。本反応も本菌の同定上重要な生化学的性状ということが出来る。

6. 硫化水素：全株中2株のみが陰性を示したが、これはいずれも no swarming の菌株であつた。ただし S IM 培地で著明に H₂S を産生する群と弱い陽性を示す群とあつて、弱い陽性群の判定はしばしば困難を感じた。

7. ヒスタミンの利用：ヒスタミンを唯一の C, N 源として利用し得る菌は46株中10株だけであつたが、その利用度はきわめて弱かつた。なお swarming, no swarming の差は認められなかつた。

以上蛋白質並びに窒素化合物に対する活性は全般に強力なことが認められた。

C) リトマスミルクの所見

3%食塩加リトマスミルクを27°Cで1週間放置無菌試験をおこなつた後使用した。観察は3週間にわたつておこなつた。第Ⅲ群 AITS-57を除く45株に、速いのは2日目、遅くとも4日目から凝固について消化が認められ、7日後には pH 7.4~ 8.8 程度のアルカリ化を認めた。ただしミルクに 3%に NaCl を添加すると若干凝固を促進するように思われた。

これらの培養性状並びに生化学的性状のうち分類の Key となるものは、Gelatin liquefaction, Indole production, nitrite from nitrate, H₂S production などであり、

第 2 表 Grouping by the key of Berge's manual (1957)

	Gelatin	Indole	KNO ₃	H ₂ S	swarming form	no swarming form	Total
Group I							
Glatin liquefied*	+	+	+	+	26	13	39
Indol produced	+	+	+	—		1	1 (AITS-50)
Group II							
Gelatin liquefied	+	—	+	+		3	3
Indole not produced	+	—	+	—		1	1 (AITS-53)
Group III							
Gelatin not liquefied	—	+	+	+		1	1
	—	—	+	+		1	1
					26	20	46

* *Pseudomonas ichthyodermis* or its closely related species.

第 3 表 Cultural characteristics of the strains belonging Group I

media strains	urease	sodium citrate	milk akl. & digest.	Voges- proskauer	methylred	hydrolysis casein	utilization [▲] histamine	growth in SS med.
Gr. I swarming (26 strains)	2*	25	26	21	22	25	4	17
no swarming (14 strains)	2	10	14	2	14	12	3	9

* positive numbers amongst tested strains

▲ histamine hydrochloride is a only source of C. and N.

第 4 表 Cultural characteristics of the strains belonging Group II and III.

media strains	urease	sodium citrate	milk alk. & digest.	Voges proskauer	methylred	hydrolysis of casein	utilization histamine	growth in SS medium
Gr. II								
AITS-22	—	—	alkaline digestion	—	+	+	+	+
AITS-53	—	+	alkaline digest	—	+	+	+	—
AITS-55	—	+	alkaline digest	—	+	+	+	+
AITS-67	—	—	alkaline digest	—	—	+	—	+
Gr. III								
AITS-57	—	+	acid	—	+	+	—	+
AITS-61	—	+	alkaline digestion	—	+	—	—	+

これに slant での swarming, no swarming の区別を加えて46菌株を漸次的に群別すると、第2表および第3表第4表のごとくになり、後述のごとくほぼ本菌の同定の目安が出来る。

D) 糖類の利用

Bergey's manual によると sea water and brine form の *Pseudomonas* は、一般に lactose を除く種類の糖類を分解し酸を形成するが、ガスは発生しないとされている。著者の分離株でも、ガスの発生は全く見られなかったが、多くの糖から酸を産生している。本検査には3%に NaCl を添加した、Barsiekow 培地を用い3週間にわたって観察した。

まず第I群の菌株では glucose, mannose, fructose, maltose, dextrin, glycogen, starch は全株が陽性に出ている。これに反して xylose, arabinose, lactose, sorbitol, adonitol, dulcitol, salicin, cellulose は全株が陰性であった。この他 swarming のある菌群は sucrose, mannitol を全株が分解しておるのに、no swarming の菌株では sucrose が14株中10株、mannitol が14株中11株が陽性であった。

糖の分解が菌株によって差異の出てくるものに他に galactose があつた。これらは第5表に掲げた。

第II群に属するものはやはり、galactose, sucrose,

第 5 表 Fermentation test of Group I

sugar	swarming (26 strains)	no swarming (14 strains)
glucose	26*	14
mannose	26	14
galactose	9	10
xylose	0	0
arabinose	2	2
fructose	26	14
lactose	0	0
sucrose	26	10
maltose	26	14
mannitol	26	11
sorbitol	0	0
adonitol	0	0
dulcitol	0	0
dextrin	26	14
glycogen	26	14
starch	26	14
salicin	0	0
cellulose	0	0

* numbers of strain produced acid but no gas.

mannitol などが菌株により相違が見られた。AITS-57 は lactose を分解する点が著るしく相違していた。その成績は第6表に掲げた通りである。

第 6 表 Fermentation test of
Group II & III

strain	AITS-22	-53	-55	-67	-57	-61
sugar						
glucose	+	+	+	-	+	+
galactose	+	-	+	-	+	-
xylose	-	-	-	-	-	-
arabinose	-	-	-	-	-	-
lactose	-	-	-	-	+	-
sucrose	-	+	-	-	+	+
maltose	-	+	+	-	+	+
mannitol	+	-	+	-	+	-
dextrin	+	+	+	-	+	+
glycogen	+	-	+	-	-	+
starch	+	+	+	-	+	+

Voges-Proskauer 反応および Methyl red 試験：第 I 群の swarming する 26 菌株は、ほとんど VP, MR 反応共に陽性である。之に反し、第 I 群の no swarming のもの 14 株および第 II, III 群の株（これも no swarming のものである）は、MR 試験は陽性だが、VP 反応では AITS-32, -45 以外は陰性で、特徴的であつた。なお中毒株である滝川株は、著者の成績では VP, MR 反応共に陽性であつた。（分離当時は MR (+), VP (-) である）

増殖条件

1) 塩類要求及び好塩性

塩類要求：NaCl が他の塩類によつて置換され得るかどうかについては今日迄多くの研究がなされており¹⁸⁻²⁰⁾ その成績はいずれも可能とされている。しかし obligate halophiles は特異的に NaCl を要するとされている。Flannery²¹⁾ らは Na イオン, Cl イオン共に置換され得るが、菌の増殖代謝には Na イオンの方がより重要であると述べている。

著者は基剤として peptone 1%, 寒天 2% を用い、これに NaNO₃ 4.4%, MgSO₄ 6.7%, MgCl₂ 4.5% をそ

第 7 表 Requirement of salt to growth*

		sodium nitrate ¹⁾	magnesium sulfate ²⁾	magnesium chloride ³⁾
Group I	growth	40 ^Δ	38	37
	no growth	0	2	3
Group II	growth	4	2	3
	no growth	0	2	1
Group III	growth	2	2	2

^Δ numbers of strain

* base medium: pepton 1.0%, agar 2.0%

1) 4.4%, 2) 6.7%, 3) 4.5%

れぞれ NaCl の代りに加えた 3 種の培地で発育有無を検べたが、その成績は第 7 表のごとくである。すなわち NaNO₃ を加えた培地では全株が発育し、MgSO₄ を加えた培地では第 I 群の AITS-43, -50, 第 II 群の AITS-22, -53 が陰性。MgCl₂ を加えた培地では第 I 群の AITS-35, -43, -50, 第 II 群の AITS-53 が陰性であつた。これらはいずれも no swarming のものであり、また AITS-43, -50, -53 は両者に陰性である事は興味がある。

好塩性：24 時間培養の菌 1 白金耳を 3% 食塩水 5.0cc に浮遊させ、これを 1% peptone 加寒天に各濃度の食塩を加えて平板とした培地に塗つて発育の有無を検べた成績が第 8 表である。0% は溜水である。0.1% で発育し

第 8 表 Requirement of NaCl to growth^Δ

organism	0%	0.1*	0.2	1.0	3.0	5.0	10.0	15.0
Group I	0	9	31	40	40	40	30	0
Group II	0	1	1	4	4	4	2	0
Group III	0	0	0	2	2	2	1	0

* NaCl content (%), ^Δ incubation: 27 C, 24 hrs
optimale concentration: 1.0~3.0%

た 10 株を 3% および 0.1% 食塩 slant で発育を比較すると、0.1% 食塩 slant では発育が極めて弱い。表で明かなように至適食塩濃度範囲は 1~3% であるが、Stather²¹⁾ あるいは竹内²²⁾ らによると好塩性はある程度変え得られるとしている。尚 swarming および no swarming の差は見られなかつた。

2) 蔗糖耐性：第 9 表は食塩の代りに、1% peptone

第 9 表 Sugar tolerance

organism	5%	10	20	40
Group I	29*	35	36	18
Group II	1	1	1	1
Group III	0	2	0	0

* numbers of positive strain

加寒天に蔗糖をそれぞれ 5, 10, 20, 40% 加えた培地での発育を検べた成績である。10% および 20% では約 1/3, 5% では過半数の菌株が発育を示した。NaCl は栄養補給源、イオン作用だけでなく、その浸透圧の作用も重要である事は多くの研究者²³⁾ によつて指摘されているが、本実験での発育も浸透圧の影響であると考えられる。

3) 発育温度：24 時間培養菌を 3% 食塩水に浮遊させ 3% 食塩 slant に移植してそれぞれの温度における発育を検べた。（第 10 表）5℃での発育は 7 日後に判定した

第 10 表 発 育 温 度

温度	5°C	10°C	20°C	27°C	37°C
I 群	5*	32	40	40	31
II 群	0	2	4	4	3
III 群	0	1	2	2	1

* numbers of positive strain

がきわめて弱かった。表に示すごとく至適温度は 20°~27°C である。なお 37°C で発育した株は、滝川株以外に 34 株あった。

4) 発育 pH: 実験直前にそれぞれの pH に修正した 3% 食塩寒天を平板にし、これに菌浮游液を塗って調べた成績が第 11 表である。pH 6.0 から 9.6 迄は全株の増

第 11 表 発 育 pH 域

pH	5.2	5.6	6.0	8.8	9.2	9.6
I 群	28*	38	40	40	40	40
II 群	0	3	4	4	4	4
III 群	1	2	2	2	2	2

* numbers of positive strain

殖を認めたが、5.2 および 5.6 では陰性株があり、殊に no swarming のものに多かった。

5) 合成培地: halophiles の營養要求については多数の研究がなされ種々の合成培地が報告されている。一般にアンモニウム塩は窒素源として利用されるが、硝酸塩については之を否定する学者もいる。著者は基剤に KH_2PO_4 1.5 gr, MgSO_4 1.5 gr, glucose 3.0 gr, 3% 食塩水 1.000 cc とし、これに $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 2.5 g, KNO_3 2.5 gr をそれぞれ加えた培地での発育を検べたが、その成績は第 12 表のごとくである。なお pH は 7.0 とした。KN-

第 12 表 Growth in synthetic media*

		ammonium phosphate ¹⁾	potassium nitrate ²⁾
Group I	growth	33	22
	no growth	7	18
Group II	growth	2	0
	no growth	2	4
Group III	growth	0	0
	no growth	2	2

* base medium: glucose 3.0 gr, magnesium sulfate 1.5 gr, K_2HPO_4 1.5 gr, NaCl 30.0 gr, aq. 1,000cc

1) 2.5%, 2) 2.5%

O_2 を加えた培地での発育はやはり不良であった。両者の陰性株はいずれも no swarming のものが大多数で、特に第 I 群の AITS—43, —50, 第 II 群の AITS—22, —55, 第 III 群 AITS—57. —61 などは両者に共通して陰性であった。

Sodium citrate での発育も良好であるが、これも no swarming の株の陰性率が高かった。(第 3, 4 表)

6) 3% 食塩加 S S 培地: 第 3, 4 表のごとく、第 I 群で 26 株、第 II 群で 3 株、第 III 群は全株発育を認めたが、特に swarming, no swarming の差は認められなかった。

同定と分布

Bergey's manual (1958) によると、Pseudomonas 属の sea water and brine forms 中、色素非産生菌として 10 菌種を区別し、更に之を gelatin liquefied のもの 8 菌種, gelatin not liquefied のもの 2 菌種に分け記載している。この中には運動性を有しない菌種が 2 つある。次いで gelatin liquefied で polar flagellate (運動性あり), Indole (+) KNO_3 (+), H_2S (—) のものを Ps. ichthyodermiss とし、Indole (—), KNO_3 (—), H_2S (+) のものを Ps. marinoglutinosa Indole (—), KNO_3 (—), H_2S (—) を Ps. membranoformis としている。

更に 1955 年食中毒患者の糞便から分離された滝川株は、gelatin (—), KNO_3 (+), H_2S (+), MR (+), VP (—), Urea (—), lactose (—), glucose (+) となっている。

著者は分離株を gelatin, Indole, KNO_3 を基準として 3 群に分けたが第 2 表のごとくであった。

第 I 群: Bergey's Key によると Ps. ichthyodermiss²³⁾ に類似する。 H_2S は異なるが glucose, sucrose, mannitol, を分解して酸性化, lactose は非分解, starch を hydrolyze する点は一致する。滝川株は第 I 群に入っているが、著者の実験では gelatin (+) となつたためである。なお VP 反応も陽性であった。

第 II 群: AITS—22, —55, —67 は gelatin (+), Indole (—), KNO_3 (+), H_2S (+) で、 KNO_3 の成績を除けば Ps. marinoglutinosa に類似する。この株は glucose, lactose を分解しないが分離株の AITS—22, —55 は glucose を分解酸性にする。AITS—53 は KNO_3 (+) であるが、他の成績では Ps. membranoformis に類似する。

第 III 群: Gelatin 非溶解株であり、Bergey's Key によると Ps. beijerinckii および Ps. iridescens の 2 菌種がある。しかし前者の特殊の培地である種の色素を産生し、後者は運動性がない。従つてこの群の 2 株は同定不

能であつた。

分布 : Bergey's manual では, *Ps. ichthyodermis* は海産魚の病的皮膚より, *Ps. marinoglutinosa* および *Ps. membraniformis* は sea water より分離されるとしている。著者の分離の source としては第 1 表に示す通りであるが, 群別および swarming との関連性は特に見られなかつた。病原性を有する滝川株が著者の実験成績では第 I 群に属し, しかも分離株 44 株中 88 株をもつこの第 I 群が *Ps. ichthyodermis* 類似株である事は, 興味ある事実であつた。

薬剤抵抗

抗生物質 : 3% 食塩寒天で streak method 法により検べた成績が第 13 表である。S M では 1 cc 当り 10 γ の

第 13 表 Susceptibility to antibiotics

antibiotic concentration organism	streptomycin					chlortetracycline				
	0	1	10	50	100*	0	1	10	50	
Group I	40	40	40	3	0	40	40	10	0	
Group II	4	4	4	0	0	4	3	1	0	
Group III	2	2	2	0	0	2	2	0	0	

* concentration of the drug (mcg/ml)

numbers of strain which were observed their growth

濃度では全株発育したが, 50 γ では swarming する 3 株のみが発育し, 他は阻止された。C T C では 10 γ で swarming する 10 株および第 II 群の AITS-67 の発育を認めたが, 50 γ では全株発育が阻止された。一般に swarming する株は, 抗生物質に対して中等度の抵抗性があるように思われた。

防腐剤 : 同じ方法で実験をおこない, その成績は第 14 表の通りである。D H A 500 $\times$ では全株が発育を阻止され, 1,000 $\times$ では 41 株が発育した。阻止された株はいずれも no swarming の株で, 第 I 群の AITS-19, 第 II 群の AITS-22, -55, 第 III 群の AITS-57, -61 であつた。Sorbic acid では 1,000 $\times$ 迄は全株発育が阻止され,

2,000 $\times$ では全株の発育を認めた。Z-furan では全株が 50,000 $\times$ で発育を阻止され, 10,000 $\times$ では発育を認めた。

考 按

著者の取扱つた海水細菌の菌株は, 同定の結果 marine form *Pseudomonas* のうち *Pseudomonas ichthyodermis* 類似菌が圧倒的に多かつたのであるが, これは分類源となつた駿河湾沿岸近海における海水菌の真の分布を示すものではない。海水菌には最初分離に成功しても継代の出来にくい菌種や, 継代中に死滅する菌株が非常に多いのであつて, 著者の菌株は継代に堪えてきた菌株の中からある程度撰別したものが多くからである。

著者の行つた菌株の同定には種の問題が残されている。

第一に鞭毛の問題である。著者の分類の第 I 群のうち no swarming の菌株と, 第 II, III 群の菌株は polar の monotrichous あるいは lophotrichous で疑問は少いのであつたが, 第 I 群の swarming のある菌株は前述したように電顕像で周毛性の菌との区別が明確に出来ない。確かに一本の太い鞭毛が一極にあつて, 細い多数の鞭毛様のものが周毛性にみられる場合があるのであるが, このような菌株でも別の電顕像では一本の極毛だけのこともある。周毛性の菌種とすれば *Achromobacteriaceae* の *Achromobacter* 中 sea water form と新に設けられた *Beneckea* 属の菌種であるが, *Achromobacter* としては糖類の分解能が強すぎるし, *Beneckea* については Chitin 分解能が強くないので, そのいずれともなし得ない。

結局本菌群については暫定的に *Pseudomonas* に入れておいて, 今後の研究によつて決定することにした。

次に第 I 群の菌が Zo Bell の *Pseudomonas ichthyodermis* と同一菌種か否かの問題であるが, 分類の Key となる gelatin liquefaction, Indole production, KNO₃ reduction はもち論, 形態学的, 生化学的性状がきわめて類似している。問題点となるのは, 鞭毛が *Ps. ichth-*

第 14 表 Susceptibility to food preservatives

drug concent organism	dehydroacetic acid			sorbic acid Z-furan				
	500	1,000	2,000*	1,000	2,000	10 $\times$ 10 ³	50 $\times$ 10 ³	100 $\times$ 10 ³
Group I	0	39	40	0	40	0	0	40
Group II	0	2	4	0	4	0	0	4
Group III	0	0	2	0	2	0	0	2

* dilution series of the drug

ychthyodermis は極毛性の tuft を作ることに、感染した魚の皮膚あるいは筋肉に寄生しているという点と、硫化水素産生が陰性とされている事項である。

鞭毛については著者の株も時に tuft となることもあるし、habitat については必ずしも狭く考える必要はないであろう。また H₂S 産生は著者も実験の都度陽性か陰性かに迷った菌株も少なくなつたのであつて、本菌群は、Ps ichthyodermis と同一でないにしても著るしく関連した菌種であると考えて差支えないであろう。なおこの群に入る菌株が圧倒的に多かつた点は注目に値する。

第Ⅱ群、第Ⅲ群については菌株が少数であつて、第Ⅰ群の菌とは種々の点で相違しているが、Bergey の記載の中にびつたりはまるものは見出されなかつた。Ps. calcis, Ps. calciprecipitans の両菌種については柳沢教授²⁴⁾によつてその存在が疑問視されるにいたっているし、著者も氏の見解に賛意を表したいのでこの 2 菌種は同定の対象にしなかつた。

さてわが国で問題になつてゐる滝川菌と著者の取扱つた菌株との関係であるが、著者は滝川菌を第Ⅰ群の no swarming の菌株に入れて性状検査をおこなつた結果、無理なくこの group に入つてきたし、本菌がなんらかの点で特別の菌株であると言う感じをうけなかつた。すなわち滝川菌は滝川氏も述べているように海水に由来する Pseudomonas の一種であつて、著者の第Ⅰ群の no swarming の菌株に属し Ps. ichthyodermis に関連深い細菌であると推定される。病原性の問題については著者はこゝでは触れない。

また相磯らが報告した他の食中毒菌と推定されているいわゆる長崎株は、著者の分類では第Ⅰ群の swarming の菌株に入り、滝川菌とはわずかに異なるがやはり Ps. ichthyodermis に入るものであつた。

次に本菌の増殖条件であるが、好塩性の問題については諸家の成績と一致したもので特に考察する点はない。

発育温度については 37°C で発育する菌と発育しない菌とがあり、この点が人の腸管への寄生の問題と関係があるか否かは不明である。Synthetic medium における発育は Ammonium phosphate medium に大部分のものが発育しており、特に營養要求のむづかしい菌ではないと推定された。

総 括

著者は海水、海産魚介類から分離された sea water form Pseudomonas 46 株について、その形態、培養性状、生化学的特性、系統分類、増殖条件ならびに薬剤に対す

る感受性などを研究し大よそ次のごとき成果を得た。

1. 実験に供した 46 菌株の内訳は 1956, 1957 年の夏、駿河湾沼津近海の海水ならびに魚介類から分離した 44 株と、滝川氏から分与をうけたいわゆる滝川菌ならびに長崎県衛生研究所から分与をうけた長崎株の 2 株の病原性菌と推定された菌株を含んでいる。

2. 全菌株共グラム陰性桿菌で運動性を有し、mono-あるいは lopho-trichous の鞭毛を着生し、培地に 2~3% に NaCl を添加した時増殖は最高となり、普通の培地では全くあるいはきわめて弱くしか発育しない marine form の halophiles である。

3. 3% に NaCl を添加した諸培地で形態ならびに培養性状を調べると、gelatin を溶解し、Indole を産生し、硝酸塩を還元し、ミルクを凝固後消化し、Citrate を利用し、V.P 反応陽性、MR テスト陽性、casein を水解し、glucose, mannose, sucrose, glycogen, starch, mannitol, などを分解して酸を産生するという共通の性状を有するものが圧倒的に多く、Bergey's manual に従つて分類すると Pseudomonas ichthyodermis にほとんど一致する菌種であつた。ただしこの菌株は slant や plate で孤立した集落を形態する菌群と swarming する菌群に分れ、swarming のある菌は形態的に 1 本の太い極毛の他に周囲性に細い鞭毛線物質の存在を認めるものが多かつた。

著者は上記の菌を第Ⅰ群とし、Indole を産生しない菌を第Ⅱ群、gelatin を溶解しない菌を第Ⅲ群とした。

4. 滝川菌は第Ⅰ群の no swarming の菌群に属し swarming の菌群とは若干異り、no swarming の菌のうち sucrose を分解しない菌株群に分類されたが、全般的の性状からいって Pseudomonas ichthyodermis にきわめて近い菌であると判定された。

5. 長崎株は第Ⅰ群の swarming のある菌株に属し滝川菌とはわずかに相違していた。

6. 供試菌の好塩性については諸家の成績と一致し NaCl 2~3% を至適とし、0.2~8.0% まで発育が認められた。また NaNO₃, KCl などて NaCl を置換しても発育が見られた。

合成培地によく発育する菌株が多く、營養要求には特に exact なものはないようであつた。

7. 20~27°C でよく発育するが、37°C でもよく発育する株が相当に認められた。発育 pH 域はかなり広く pH 5.2~9.6 で発育が認められたが optimum は稍アルカリ側にある。

8. 本菌は抗生物質に対し可成高い感受性を有し、し

かも菌株の全部が一樣の感受性を有し fresh water form の *Pseudomonas*²⁵⁾ に比し強い抵抗株が存在していない。

稿を終るに当り、終始御懇篤な御指導と厳正な御校閲を賜った恩師相磯和嘉教授に心から感謝致すと共に、絶えず御援助を仰いだ腐敗部飯田講師及研究室諸氏諸嬢に感謝します。なお種々の御便宜御協力を頂いた都立豊島病院内科医長名尾良憲博士、長汐病院院長長汐達也博士、当内科齊藤英夫、小島竜男両氏に感謝の意を表する。

文 献

- 1) ZoBell, C. E. : Marine microbiology Chronica Botanica co., Waltham, Mass. (1946)
- 2) Kriss, A. E. : Marine microbiology Academy of sciences, Moskow U. S. S. R. (1959)
- 3) Wood, E. J. F. : The significance of marine microbiology Bacteriol. Rev., **22**, 1 (1958)
- 4) Velankar, N. K. : Bacteriological survey of sea water from coast of Madras City (Bay of Bengal). Proc. Indian Acad. Sci., **32**, 80 (1950)
- 5) Flannery, W. L. : Current status of Knowledge of halophilic bacteria, Bacteriol. Rev., **20**, 49 (1956)
- 6) 木俣正夫 : 食品腐敗学, 河出書房 (1943)
- 7) 谷川英一 : 水産細菌学, 生活社 (1942)
- 8) 飯田宏美, 海瀬好和, 相磯和嘉 : ヒスタミンを産生する好塩性細菌について, 日衛誌, **13**, 354 (1958)
- 9) 加藤博, 宇多謙一, 相磯和嘉 : 好塩性 *Pseudomonas* の産生する蛍光色素について, 腐研報, **11**, 12 (1958)
- 10) 柳沢文徳, 竹内端彌 : 細菌性食中毒について一特殊な食中毒を中心として一, 腐研報, **9**, 62 (1956)
- 11) 柳沢文徳他 9 名 : 好塩細菌に関する研究, 日衛誌, **12**, 226 (1957)
- 12) 山脇正樹 : 好塩球菌に関する分類学並びに食品腐敗に関する基礎的研究, お茶の水医学会誌, **7**, 113 (1959)
- 13) Takikawa, I. : Studies on pathogenic halophilic bacteria, Yokohama Med. Bulletin, **9**, 313 (1958)
- 14) 野坂, 加藤, 滝川等 : 日医報, **1666**, 23 (1956)
- 15) 相磯和嘉 : 好塩菌について, 臨床検査, **3**, 551 (1959)
- 16) 斎藤英夫 : 日衛誌投稿中 (1960)
- 17) 松野仁 : 日衛誌, **13**, 50 (1958) 抄
- 18) Baxter, R. M. and Gibbons, N. E. : Effects of sodium and potassium chloride on certain enzymes of micrococcus halodenitrificans and pseudomonas salinarum Canadian Journal of Microbiology **2**, 599 (1956)
- 19) Brown, H. J. and Gibbons, N. E. : The effect of magnesium, potassium, and iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria, Canadian Journal of microbiology **1**, 486 (1955)
- 20) 山地幸雄, 八田貞義外 : 日細菌誌, **13**, 63 (1958)
- 21) Flannery, W. L. : Salt desideratum of *Vibrio costicola* an obligate halophilic bacterium. I. Ionic replacement of sodium chloride requirement. J. Bacteriol., **64**, 713 (1952)
- 22) Stather, F. : "Rote Verfärbung" und "Rote Erhitzung" auf gesalzenen Häuten Collegium, **720**, 151 (1930)
- 23) Johnson, F. H. and Haruey, E. N. : The osmotic and surface properties of marine luminous bacteria. J. Cellular Comp. physiol., **9**, 363 (1937)
- 24) 長谷川俊吉 : 結晶形成好塩細菌に関する研究, 日衛誌, **14**, 864 (1959)
- 25) 長谷川広吉 : 食品腐敗細菌としての *Pseudomonas* 属の研究, 千葉医学会誌, **33**, 851 (1957)

Marine *Pseudomonas* の鞭毛 (電子顕微鏡像)

菌株番号 AITS-51, 最も典型的な
鞭毛の着生を示す

菌株番号 AITS-43, 束状の極毛
Ps. ichthyodermis 類似株

菌株番号 AITS-23, *Ps. ichthyodermis*
類似株

菌株番号 AITS-49, 一本の極毛の外に
細い数本の鞭毛が周毛性にある集落が
swarming ある菌群に多い