季は非常にジンアイの充満する時期で、また晴天の日が少なく、雨天および降雪、強風などのために個体はストレスの状態にあるものが多い。このような時期にジンアイとともにカビが侵入し、アレルギーとして作用するのではなかろうかと推察されるが、いまだ不明な点も少ないので、今後さらに追及してゆきたい。

なお本症は同一牛舎内に飼育していても、1 個体だけに発症し、他のものに異常を認めないので、伝染性のものではなかろう。

また本症の症状は単純な結膜炎のようなものから、角膜結膜、鞏膜結膜などが肥厚、増生し、肉様物となって眼球のほとんど大部分を被覆するようなものなど種々の程度のものが認められる。しかし、MONLUX ら⁸⁾の報じている扁平上皮癌とは異り、一般眼科的処置および外科手術によりほとんどが治癒するので、本症は比較的良性的結膜炎と称することができよう。

Ⅷ む す び

著者らは新潟県山間部に限局して秋季に発生する牛の

結膜炎について各種検索を試みたところ、アレルギー性のものであることが推察された。アレルギーについて種々検討を加えたところ、これはカビ様のものではなかろうかと考えられ、一般眼科的処置および外科手術を行ったところ、大部分のものが治癒した。

終りにのぞみ、1957年以降本症の病理組織学的検査ほか各種検査に協力された家畜衛生試験場北陸支場研究室各位ならびに 1966 年以降の材料の病理組織学的検査に御協力を頂いた麻布獣医科大学病理学教室各位に感謝します。

文 献

- 1) HARRIS, M.C. and SHURE N: *Practical Allergy* (1957).
- 2) FEINBERG, S.M.: *Living with your Allergy* (1958).
- 3) ADLER, F.H.: *Textbook of Ophthalmology* (1962).
- 4) 吾郷 亘, 錦織利光: 家畜診療, No. 60, 32 (1967).
- 5) 永田良胤: 日獣学誌, 19 学会号, 117 (1957).
- 6) *ibid*; 22 学会号 (1960).
- 7) HUNGERFORD, T.G.: *Diseases of Livestock* (1967).
- 8) MONLUX, A.W., ANDERSON, W.A. and DAVIS, L.L.: *Am. J. Vet. Res.*, 18, 5 (1957).

公衆衛生

牛枝肉を汚染する微生物に関する研究 (Ⅱ)

——温度別発育細菌の分離と、これらの菌蛋白分解酵素について——

黒木治男* 江原 茂* 赤司 景**

(昭和 44 年 5 月 10 日受付)

Studies on Microorganisms Contaminating Dressed Carcasses II. Isolation of Bacilli at Different Temperatures and Measurement of Proteolytic Enzyme Produced by These Bacilli

Haruo KUROKI, Shigeru EBARA (Municipal Meat Inspection Station, City of Fukuoka) and Akira AKASHI (Faculty of Agriculture, Kyushu University)

SUMMARY

Putrefaction and degradation of meat are thought, to be caused partially by the proteolytic enzyme of contaminating organisms. In the present study, contaminating organisms were isolated from meat stored at various temperatures, and the rate of producing decomposed material from protein (casein) by the action of protease derived from these contaminating organisms were measured.

1) *Micrococcus*, *Streptococcus*, and *Gaffkya* were isolated at 37°C, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, and *Achromobacter* at 25°C, *Alcaligenes* and *Flavobacterium* at 10°C, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, and *Alcaligenes* at 5°C, and

Pseudomonas, *Achromobacter*, and *Alcaligenes* at 1°C.

2) Comparison was made on the rate of producing decomposed material from protein (casein) by the action of protease derived from the isolated strains. The highest rate was observed in the case of the strains isolated at 37°C. It decreased in value with the decrease in temperature of isolation. The production of proteolytic enzyme from the organisms isolated at low temperature was presumed to have some relations to the putrefaction and degeneration of meat stored at low temperature.

緒 言

* 福岡市食肉衛生検査所 ** 九州大学農学部

と畜場における枝肉が、解体作業ならびに、その後の

処理過程において多くの細菌叢の汚染があることは著者ら⁶⁾がすでに報告したところである。

食肉の冷蔵保管中における腐敗、変敗などは、これらの一般細菌群の汚染の外に、いわゆる好冷細菌による影響が考えられるが、これら好冷細菌に関する研究は、わが国においては、牛乳ならびに乳製品などに関するものが多く、食肉に関する報告は少ないようである。これら好冷細菌による蛋白質、その他の有機物の分解能などは、食肉の腐敗、変敗の一要因とも考えられるので、福岡市食肉市場の冷蔵庫で 4℃ 18 日間冷蔵保管された牛の枝肉を用いて、37℃ で発育する一般細菌を対照とし、各温度別の生菌数、菌種ならびに、これら分離細菌の蛋白分解酵素（プロテアーゼ）について比較検討したので、その成績を報告する。

実験方法

実験A 菌の分離同定

供試材料：4℃ で 18 日間冷蔵保管された牛の枝肉計丸表面から、食品衛生検査指針（Ⅲ）のふき取法に従って採取したものを試料に用いた。

分離培養：培養温度を、37℃、25℃、10℃、5℃、1℃ にわけ、採取した試料を食品衛生検査指針（Ⅲ）に従って、標準寒天培地を用いて平板に混釈し、それぞれの培養温度で、集落を形成するまで培養をつづけた。

分類同定：発育した集落は、生菌数測定後グラム陽性の球菌と桿菌は、Bergey の Manual¹⁾ により、グラム陰性桿菌は坂崎法¹⁰⁾および Bergey の Manual によって菌属の分類を行なった。

実験結果

1) 温度別による分離細菌と生菌数

実験結果は、Table 1 に示すとおり温度別による分離細菌は、37℃ においては *Micrococcus* を主としたグラム陽性球菌のみが分離され、25℃ においてはグラム陽性の球菌と桿菌が混在し分離された。また 10℃ 以下の低温区においてはグラム陰性桿菌のみで、*Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* であった。また生菌数については、中温区、低温区ともに $\times 10^5$ 台であった。

実験B 分離菌株のプロテアーゼ

供試菌株：細菌のプロテアーゼによる蛋白分解物産生度試験は、実験Aにより分離した菌株 *Micrococcus*, *Gaffkya*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* を用いた。

菌株接種培地：Tris-buffer (pH 7.2) に $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 0.02%，Glucose 0.1% および Sodium citrate 0.2% の割合に添加し、更に pH 7.2 に修正後間歇滅菌したものを培地として使用した。

Table 1 温度別による分離細菌と生菌数

培養温度	分離細菌名	生菌数	分離細菌数	分離率(%)
37℃	<i>Micrococcus</i>	23×10^5	140×10^4	60
	<i>Streptococcus</i>		48×10^4	20
	<i>Gaffkya</i>		42×10^4	20
25℃	<i>Micrococcus</i>	17×10^5	72×10^4	40
	<i>Staphylococcus</i>		30×10^4	20
	<i>Bacillus</i>		27×10^4	20
	<i>Achromobacter</i>		36×10^4	20
10℃	<i>Alcaligenes</i>	27×10^5	220×10^4	80
	<i>Flavobacterium</i>		54×10^4	20
5℃	<i>Pseudomonas</i>	21×10^5	100×10^4	40
	<i>Flavobacterium</i>		19×10^4	20
	<i>Achromobacter</i>		50×10^4	20
	<i>Alcaligenes</i>		41×10^4	20
1℃	<i>Pseudomonas</i>	24×10^5	46×10^4	33
	<i>Achromobacter</i>		91×10^4	33
	<i>Alcaligenes</i>		98×10^4	33

プロテアーゼの測定：各菌株から 2 白金耳づつを上記の液体培地 10 ml にそれぞれ接種し、これらを各菌株が分離された温度で、COLEMAN³⁾, BLACKBURN⁵⁾ の報告を参照し、24時間培養した。培養後の菌液は、Table 2 に示すように CHARNEY⁴⁾ ならびに FOLIN⁴⁾ の方法に準拠し分析を行ったのち、分光光度計 $\lambda 650\text{m}\mu$ の吸光度を測定した。

Table 2 プロテアーゼ活性の測定
CHARNEY and TOMARELLI (1947)

実験結果

温度別分離細菌のプロテアーゼによる蛋白(カゼイン)分解物質の産生度：分離細菌により基質カゼインが分解されてできた蛋白分解物質を分光光度計 $\lambda 650\text{m}\mu$ の吸光度 (O.D.) により測定した結果は、Table 3 および Fig.

Table 3 温度別分離細菌のプロテアーゼによる
蛋白分解物質産生度

培養温度	分離細菌名	プロテアーゼによる 蛋白分解物質 (O.D. at 650 mμ)	
		細菌別	平均
37℃	<i>Micrococcus</i>	0.41	0.41
		0.41	
		0.41	
	<i>Streptococcus</i>	0.43	
25℃	<i>Gaffkya</i>	0.39	0.292
	<i>Micrococcus</i>	0.25	
		0.245	
	<i>Staphylococcus</i>	0.251	
	<i>Bacillus</i>	0.295	
10℃	<i>Achromobacter</i>	0.38	0.277
	<i>Alcaligenes</i>	0.25	
		0.25	
		0.26	
5℃	<i>Flavobacterium</i>	0.275	0.259
		0.35	
	<i>Pseudomonas</i>	0.26	
	<i>Flavobacterium</i>	0.27	
		0.28	
1℃	<i>Achromobacter</i>	0.20	0.236
	<i>Alcaligenes</i>	0.24	
	<i>Pseudomonas</i>	0.27	
	<i>Achromobacter</i>	0.235	
	<i>Alcaligenes</i>	0.22	

Fig. 1 温度別による分離細菌のプロテアーゼによる
カゼイン蛋白分解生成物（平均値）とO.D.
価との関係

註：A…1℃ B…5℃ C…10℃ D…25℃ E…37℃

1に示すとおりである。

すなわち、これら分離細菌のプロテアーゼによるカゼイン分解物質の平均 O.D. 価をみると、37℃ 分離細菌群では 0.41、25℃ 分離細菌群では 0.292、10℃ 分離細菌群では 0.277、5℃ 分離細菌群では 0.259、1℃ 分離細菌群では 0.236 であった。

標品アルカリ性細菌プロテアーゼによる O.D. 価の標準曲線：標品として市販されているアルカリ性細菌プロテアーゼを液体培地（Tris-buffer pH 7.2）に 10μg/l～1000μg/l に溶解し、その濃度と λ 650mμ における O.D. 価との関係を標準曲線で描けば Fig. 2 に示すとおりである。すなわち、カゼインを基質とした分解物質の O.D. 価と酵素濃度との関係はほぼ直線関係になることが認められた。

Fig. 2 標品アルカリ性細菌プロテアーゼによる蛋白
(カゼイン) 分解物質を λ 650mμ で O.D.
価を測定した標準曲線

分離細菌のプロテアーゼによるカゼイン分解物質産生度と同じカゼインを基質としたアルカリ性細菌プロテアーゼ濃度との関係：Table 3 に示す分離細菌のプロテアーゼによるカゼイン分解物質の O.D. 価を Fig. 2 に示す標準曲線の酵素量に換算すると Table 4 に示すとおりである。すなわち、37℃ 分離細菌群のプロテアーゼによるカゼイン分解生成物の平均 O.D. 価 0.41 はアルカリ性細菌プロテアーゼ濃度 1400μg/l に相当し、25℃ 分離細菌の場合は 900μg/l、10℃ 分離細菌の場合 810μg/l、5℃ 分離細菌の場合は 750μg/l、1℃ 分離細菌の場合は 650μg/l に相当することが認められた。また、37℃ 分離細菌のプロテアーゼによる蛋白分解質の O.D. 価 0.41 を 100 とした Index number は、25℃ 分離細菌では 72.7、10℃ 分離細菌では 67.5、5℃ 分離細菌では 63.2、1℃ 分離細菌では 57.6 であった。

考 察

1) 温度別の生菌を調査したところ、渡辺ら¹¹⁾は中温区に対し、低温区の汚染度が高いと報告されているが、われわれの成績では、両者間の汚染度には、ほとんど差が認められなかった。また分離された菌種についてみると、中温区においては、小川ら⁷⁻⁹⁾が好冷菌として提称している *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* のグラム陰性桿菌などが、本調査においても分離された。しかし、小川ら⁹⁾は牛乳から *Pseudomonas* をより多く分離していることは、本調査成績と若干異なっている。

Table 4. 分離細菌のプロテアーゼによるカゼイン分解物質 O.D. 価と標品アクリル性細菌によるカゼイン分解物質 O.D. 価より換算した酵素量

培養温度	分離細菌名	平均酵素産生度 (O.D. at 650m μ)	アクリル性細菌 プロテアーゼに よるカゼイン分 解物質の標準曲 線から換算した 酵素量	Index number
37°C	<i>Micrococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Gaffkya</i>	4.41	1,400 μ g/l	100
25°C	<i>Micrococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Bacillus</i> <i>Achromobacter</i>	0.292	900 μ g/l	72.7
10°C	<i>Alcaligenes</i> <i>Flavobacterium</i>	0.277	810 μ g/l	67.5
5°C	<i>Pseudomonas</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Achromobacter</i> <i>Alcaligenes</i>	0.259	750 μ g/l	63.2
1°C	<i>Pseudomonas</i> <i>Achromobacter</i> <i>Alcaligenes</i>	0.236	650 μ g/l	57.6

るようであるが、これは、比較的衛生的に搾乳し、処理される牛乳と、と殺後そのままで処理保管される食肉の汚染細菌叢の差によるものと思われる。

2) 分離細菌のプロテアーゼによる蛋白分解物産生度については、37°C 分離細菌が最も高く、以下低温になるに従って低くなっていることが認められた。特に 1°C における分離細菌の場合は、37°C 分離細菌の 57.6% にすぎなかった。しかし、低温区 of 分離細菌とくに、5°C、1°C の分離細菌にもその蛋白分解酵素作用が認められることは、食肉を、長時間冷蔵保存する場合においては、

低温細菌のもつこれらプロテアーゼが、腐敗、変敗をおこさせることもありうると思考される。

今後更にリパーゼ、アミラーゼなどについても検討を加える予定である。

要 約

食肉の腐敗、変敗の原因の一つとして、汚染細菌の蛋白分解能が関与すると考えられるので、今回は、その温度別による細菌の分離と、これら細菌の蛋白分解酵素について検討を行なった。

1) 中温区と低温区との汚染度の差は、ほとんど認められず、中温区においては、主たる *Micrococcus* の他に、*Bacillus* etc が分離され、低温区においては、*Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* *Achromobacter* のグラム陰性桿菌のみが分離された。

2) 分離細菌のプロテアーゼによる蛋白分解物産生度については、中温区特に、37°C 分離細菌が最も高く、低温になるにしたがい低い (1°C 分離細菌の蛋白分解物質は、37°C 分離細菌の 57.6% であった)。

本研究に種々御便宜を与えられた、九大農学部安藤則秀教授に謝意を表する。

参 考 文 献

- 1) R.S., BREED et al: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 7th edition.
- 2) T.H., BLACKBURN: *J. Gen. Microbiol.*, 53, 27, (1968).
- 3) G. COLEMAN: *J. Gen. Microbiol.* 49, 421 (1967).
- 4) O. FOLIN et al.: *V. J. Biol. Chem.*, 73, 627 (1927).
- 5) J. CHARNEY and R.M. TOMARELLI: *J. Biol. Chem.*, 171, 501 (1947).
- 6) 黒木治男。他：日獣会誌。21, 344 (1968)。
- 7) 小川益男。他：日本獣医学会講演要旨, No. 113, 262 (1967)。
- 8) 小川益男。他：日本公衛誌。15, 483 (1968)。
- 9) 小川益男。他：日獣会誌。21, 197 (1968)。
- 10) 坂崎利一：腸内細菌とその類似菌の簡易なしらべ方。日本栄養化学 (1961)。
- 11) 渡辺 学。他：食肉加工協会シンポジウム講演要旨 (1968)。

× × × ×

家 畜 衛 生 週 間 標 語

まず衛生畜産農家の合言葉