原 報

牛乳および粉乳の腸球菌群に関する研究

II. 分離腸球菌群の分類成績と工場別の出現状況

(昭和 39 年 7 月 21 日 受理)

橋本秀夫* 伊藤 烈* 石田貞雄* 川口元紀*

Studies on Enterococcus Group in Market Milk and Milk Powder

II. Identification of Enterococcus Group Isolated from
Market Milk and Milk Powder

Hideo HASHIMOTO, Isao ITOH, Sadao ISHIDA, and Motoharu KAWAGUCHI

(Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University
: Okinokami-cho, Fukuyama, Hiroshima-ken)

The enterococcal strains isolated from milk powder from six dairy factories in five districts in Japan, for a period of 1 year, and from market milk pasteurized by different three methods, were identified and classified.

Of 601 enterococcal strains isolated from 334 milk powder and 22 market milk, 533 were identified as *Str. faecium*, 21 as *Str. faecalis*, 10 as *Str. faecalis* var. *liquefaciens* and 3 as *Str. durans*, but 34 remained unclassified.

Str. faecium occupied 533 or 92.3% of 577 strains from milk powder. On the other hand, the typical strain of *Str. faecium* was not obtained from the market milk examined.

By the use of six fermentation reactions, *Str. faecium* were divided into 9 fermentative types, and the type found most frequently in milk powder was subtype No. 5.

There were few regional differences in fermentative types of *Str. faecium* derived from milk powder.

(Received July 21, 1964)

緒 言

さきに北海道内の5乳製品工場から、8~20日間にわたって連日採取した粉乳の腸球菌群を調べた結果、100%陽性であり、菌種は *Str. faecium* が大部分であった。さらに糖分解の成績に基づいて分離菌を型別し、各工場からの出現状況を検討した結果、工場別に出現菌型に差はあるが、それぞれの工場の粉乳からは同じ菌型のものが、毎日連続して出現していることが判明した¹⁾。

第1報²⁾において、殺菌温度を異にする3種類の牛乳と、本邦各地の6工場から送られてきた粉乳について腸球菌群の分布を調査し、牛乳に比べて粉乳の陽性率がき

わめて高いことを報告したが、今回は、それら陽性例から分離した腸球菌群の分類成績と、とくに北海道も含めて本邦各地の6工場より、しかも1年間にわたって毎月送付を受けた粉乳からの分離菌について、以上と同様の事実があるかどうかを再び検討したので報告する。

材料および方法

供試株は粉乳由来が577株、牛乳由来が24株の合計601株である。これら供試株は既報³⁾のごとく、選択培地から血液寒天培地に分離培養を行ない、集落の形状、溶血態度等を観察して異なるとされる集落から、代表株を約菌分離して得た。

工場別あるいは種類別の検体数と腸球菌群の陽性例

[415]

* 広島大学水畜産学部：広島県福山市沖野上町

数および分離株数との関係を示すと Table 1 のとおりである。

これらの分離株について、所定のごとく各種生物学的性状の検査を行ない同定分類したが、とくに分類については、Bergey's manual⁴⁾には記載されていない菌種である *Str. faecium* 鑑別のため、PT(Potassium tellurite) 試験あるいは TTC(2,3,5-Triphenyl-tetrazolium chloride) 試験等も行なうて判定した。これら両試験はさきに報告⁵⁾した方法に従った。

実験成績

1) 各種生物学的性状

所定のごとくグラム染色、カタラーゼ試験、溶血性、ゼラチン液化能、リトマス牛乳における発育態度、0.1%メチレン青牛乳、40%ウシ胆汁加血液寒天培地、6.5%食塩加ブイヨンおよび pH 9.6 グルコースブイヨンにおける発育試験、10°および45°における発育性、60°、30分の熱抵抗性試験、および各種糖類分解能の各種試験を行なった。Lancefield による D 群沈降反応試験は省略した。

以上の試験の結果、60°、30分の熱抵抗性試験において陰性を示した株も小数例(牛乳由来の11株)みられたが試験株はすべて Bergey's manual の Enterococcus group に属することが確認された。

2) PT 試験および TTC 試験

本試験を行なうことにより、*Str. faecalis* がさらに *Str. faecalis* と *Str. faecium* の2種類に分けられることについては、多くの報告があり、その紹介ならびに試験方法についてはすでに述べた⁵⁾。両試験において *Str. faecalis* とその varieties は陽性を示すが、一方 *Str. faecium* と *Str. durans* は両試験とも陰性である。

供試株の両試験における成績は Table 2 のとおりである。

両試験とも陽性の株は、数は少ないが粉乳、牛乳のいずれを問わず A～I の全工場株にみられた。一方、両試験とも陰性は粉乳由来株にとくに多く、その90%以上を占め、A～F 工場由来のすべてにみられた。

PT 試験のみ陽性で、TTC 試験は陰性の株は、粉乳

Table 1. Incidence of Enterococcus Group in Milk Powder and Market Milk

Dairy plant	No. of samples	Enterococcus group	
		No. of positive samples (%)	No. of strains isolated
Milk powder			
A	85	37 (43.5)	40
B	85	81 (95.3)	102
C	85	78 (91.8)	125
D	66	43 (65.2)	92
E	81	81(100.0)	198
F	70	14 (20.0)	20
Total	472	334 (70.8)	577
Market milk			
G *1	132	2 (1.5)	3
H *2	132	3 (2.3)	3
I *3	132	17 (12.9)	18
Total	396	22 (5.6)	24

Notes *1 : 75° for 15 min pasteurization

*2 : H. T. S. T. pasteurization

*3 : U. H. T. pasteurization

Table 2. Potassium Tellurite Test and TTC Reduction Test of Enterococcus Group

Dairy plant	No. of strains examined	PT*1.....+	+	-	-
		TTC*2....+	-	+	-
Milk powder					
A	40	4	6	•	30
B	102	4	5	•	93
C	125	2	•	•	123
D	92	8	3	•	81
E	198	6	•	•	192
F	20	2	•	•	18
Total	577	26	14	0	537
Market milk					
G	3	3	•	•	•
H	3	1	2	•	•
I	18	1	15	•	2
Total	24	5	17	0	2

Notes*1: Potassium tellurite 1: 2,500

*2: TTC (2,3,5-Triphenyl-tetrazolium chloride) reduction

では A, B, D 工場由来株に、牛乳では H, I 工場由来株にみられたが、とくに後者の牛乳由来株では、この種の菌の出現率が高かった。

3) 分類成績

以上の各検査成績に基づいて分類した結果は、Table

Table 3. Identification of Enterococcus Group Isolated from Milk Powder and Market Milk

Dairy plant	No. of strains	<i>Str. faecalis</i>	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	<i>Str. faecium</i>	<i>Str. durans</i>	Unclassified
Milk powder						
A	40	4	.	27	.	9
B	102	3	1	93	.	5
C	125	2	.	123	.	.
D	92	3	5	80	1	3
E	198	4	2	192	.	.
F	20	2	.	18	.	.
Total	577	18	8	533	1	17
Market milk						
G	3	1	2	.	.	.
H	3	1	.	.	.	2
I	18	1	.	.	2	15
Total	24	3	2	0	2	17

3のとおりである。

粉乳由来株において、*Str. faecalis* および *Str. faecium* は、A～F の6工場すべてから検出された。*Str. faecalis* var. *liquefaciens* はB, D, E 工場から、*Str. durans* はわずか1株がD 工場から検出された。粉乳由来の577株中、*Str. faecalis* はわずか3.1% (18株)、*Str. faecalis* var. *liquefaciens* は1.3% (8株)であったのに対し、*Str. faecium* は92.3% (533株)と圧倒的に多かった。同定分類できなかったものは17株であったが、このうちには、PT 試験で陽性、TTC 試験で陰性の14株が含まれている。

牛乳では、粉乳に比べて腸球菌群の陽性率が低かったため、分離株もわずか24株と少なかったが、粉乳において多数を占めていた *Str. faecium* は1株もみられなかった。牛乳由来株で最も多くを占めたのは、unclassified とされた17株であるが、これらはすべて粉乳のA, B, D工場由来株と同様、PT 試験は陽性であるが、TTC 試験は陰性の株である。

4) 糖類分解能の成績

第1項の各種生物学的性状のうち、とくに糖類分解能の成績を取り上げて示すと Table 4 のごとくである。試験に供した各種糖類のうち、グルコース、マルトース、ラクトースでは全株が分解しているので省略し、表には残りの糖類の成績のみを示す。試験株は糖分解の態度と他の生物学的性状との検査成績から17型に分けられた。

粉乳において *Str. faecalis* と *Str. faecalis* var. *liquefaciens* は、D工場の1株を除いてすべて同じ分解態度を示した。*Str. faecium* は、糖分解態度の組合せから9種の型に分けられたが、6工場のすべてにみられたのは第5型で最も多く、粉乳由来株の70.5% (407/

577) を占めていた。ついで多いのは第6型の50株 (8.6%) で、F工場を除く5工場にみられた。AおよびC工場由来株では、わずか2種類の型のものしかみられず、とくに後者では第5型のものが、C工場分離株の95.2% (119/125) を占めていた。これに反して、D, E工場由来株では、それぞれ5種類および8種類のものが検出されたが、第5型のものは前者で54.3% (50/92)、後者で74.2% (147/198) を占め、やはり本菌型の検出率が高いことを示した。ただし、AおよびF工場では、第5型のものが最大の出現菌型ではなく、それぞれ第6型、第7型のものが最も多い出現菌型であった。アラビノースを分解し、TTC 試験は陰性であるが、PT 試験は陽性のため、一応 *Str. faecium* から除外されたA, BおよびD工場由来の14株は、すべて同じ分解態度を示して第16型に統一された。A工場由来の3株 (第17型) は、PT および TTC の両試験に陰性、アラビノースも非分解の株であり、非定型的な *Str. durans* と考えられる。

牛乳では、*Str. faecalis* が3工場から、すなわち殺菌温度を異にする3種類の牛乳から、1株ずつ検出された。最も多く検出されたのは、HおよびI工場由来の第16型に属する17株であったが、これらはすべてPT 試験は陽性で、TTC 試験は陰性の株であり、粉乳由来の同一性状株と糖分解態度も全く同じものであった。

考 察

さきに各種畜産食品の腸球菌群について、材料別に出現菌種を検討した結果、生乳、生肉等の非加熱食品では *Str. faecalis* およびその varieties が多く、一方、加熱工程を経た乳製品、とくに粉乳では *Str. faecium* が最も多く検出される菌種であることを知った。すなわち、粉乳について北海道の5乳製品工場由来株を分類し

Table 4. Fermentative Types of Enterococcus Group Isolated

Subtype No. Item	Str. faecalis	Str. faecalis var. liquefaciens			Str. faecium									Str. durans		Unclassified		Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Sucrose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	
Sorbitol	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Arabinose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	
Raffinose	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	
Milk powder																		
Plant A	4	.	.	.	2	25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	6	3	40
Plant B	3	1	.	.	82	4	.	5	.	2	.	.	.	.	.	5	.	102
Plant C	2	.	.	.	119	4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	125
Plant D	3	4	.	1	50	2	17	.	8	3	.	.	.	.	1	3	.	92
Plant E	4	2	.	.	147	15	2	15	.	1	5	4	3	.	.	.	.	198
Plant F	2	.	.	.	7	.	9	.	2	.	.	.	.	.	.	.	.	20
Total	18	7	0	1	407	50	28	20	10	6	5	4	3	0	1	14	3	577
Market milk																		
Plant G	1	.	2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	3
Plant H	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	.	3
Plant I	1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	2	.	15	.	18
Total	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	17	0	24

た結果は, *Str. faecium* が分離腸球菌群の71.6% (111/155) を占める成績であった¹¹⁾。

今回は北海道の一地方のみならず, 東北, 中部, 中国および四国地方の6工場から, 1年間にわたって毎月送付を受けた粉乳からの分離株について分類したのであるが, その結果 *Str. faecium* は分離株の92.3% (533/577) を占め, 粉乳に存在する腸球菌群の主要菌種は *Str. faecium* であることを確認した。しかしながら, 8か月間にわたって調査した殺菌温度を異にする3種類の牛乳では陽性率が低く, したがって分離株そのものも少なかったせいもあるが, *Str. faecium* は1株もみられなかった。牛乳と粉乳とは製造方法も異なっておりその差が陽性率の差, ひいては出現菌種の差ともなって現われてきたものとも思われるが, この点についてはさらに検討を要する。

なお, 牛乳から *Str. faecium* を分離した例としては Moutoussis ら⁶⁾ の H.T.S.T. 殺菌乳からの検出報告がみられるのみである。

さて粉乳由来の *Str. faecium* を各種糖類の分解態度によりさらに型別した結果は, Table 4 に示されたように9型に分けられたが, そのうちの6菌型(第5, 6, 8, 11, 12, 13型)は, さきの報告¹¹⁾ のものと同一態度を示す菌型であった。とくに全6工場から検出され, し

かもまた最も多数を占めていた第5菌型は, 上述の報告における全5工場においても最大に検出された菌型である。すなわち, 本菌型の *Str. faecium* は, 本邦産の粉乳において最も普通に検出される腸球菌であるらしい。ただし糖分解の態度は同じであったが, 羊血液寒天培地における溶血態度は, DとE工場由来株は類似していたが, B工場由来株は菲薄で, C工場由来株は溶血環が狭いことなど, それぞれ異なった態度を示していた。BおよびC工場由来株は, 以上のように特徴ある集落態度を示したため, 分布調査あるいは同定試験の後半においては, 血液寒天平板上における集落をみたのみで, 何工場由来の菌株であるか, あるいは菌型の判定が推定可能な状態にあった。

なお, 上記 Moutoussis らの報告によれば, 分離した *Str. faecium* の型は糖分解の態度からみて, 今回の第8および11型に相当するものが多いようである。

既報の各種畜産食品および糞便由来の腸球菌群873株の試験成績では, PT 試験で痕跡程度あるいは微弱な発育を示すものが若干認められたことは述べたが, これら微弱な発育を示すものを陰性と判定した場合, PT および TTC の両試験において, 上記の株はすべて両試験とも陽性か, あるいは両試験とも陰性に区分された。しかし今回の供試株では, PT 試験では明らかに陽性だが,

TTC 試験では陰性の株が、粉乳の3工場、牛乳の2工場の由来株にみられた。とくに I 工場の牛乳由来株では、分離株の83% (15/18) を占める成績であった。このような性状を示した31株は、糖分解の成績においても同じ態度を示した。このように PT および TTC 試験、あるいは糖分解の態度等、各種の性状を同じくする一群の菌があるらしい。しかし糖分解の態度からみるとアビノースを分解しており、その点では第10型の *Str. faecium* と全く同じである。PT 試験を分類の規準として、どの程度にみるかはさらに検討を要する問題であるが、以上の点からみて本グループの菌は、非定型的な *Str. faecium* と考えてよいものかもしれない。もし本グループの菌を非定型的な *Str. faecium* と考えるならば、牛乳由来株においても70%以上が *Str. faecium* であったと考えることができる。なお第10型に属する株の PT 試験成績は明らかに陰性であった。

PT 試験について Papavassiliou⁷⁾ は、*Str. faecalis* であって発育しない場合と、逆に *Str. faecium* であって微弱に発育するものがあることを報告しているが、第16型にみられたような PT 試験で陽性、TTC 試験で陰性のものについては述べていない。今回の成績では *Str. faecalis* であって発育陰性を示す株はみられなかったが、*Str. faecium* であって微弱な発育を示す株は上述のごとく若干みられている。

さて各種の試験成績から粉乳由来株を分類した結果、*Str. faecium* が最も多く検出される菌種であり、糖分解の成績に基づいてさらに型別し、工場ごとに出現菌型を検討した結果、それぞれの工場における出現腸球菌は1年間を通じて同じ菌型のものが出現していた。換言すると、粉乳から腸球菌群が検出される場合その菌型は、工場によってはほぼ一定しているということである。また溶血態度は異なっていたが、糖分解の態度からみて同じ性状のものが、A、F 工場を除く4工場で最も多く出現していた。すなわち、粉乳由来腸球菌群では、菌型の地域的な出現の差がないようである。

北海道の5工場由来菌の型別成績について、特定の型の菌が工場ごとに、しかも毎日連続して出現していた理由として、工場所在地に特定の型の菌が分布していたためか、あるいは粉乳製造工程のどこかで、特定の型の菌による2次汚染を常時受けていたためではなかろうかと推論したが、後者のごとく5工場のすべてに2次汚染があったとは考えられぬことから、前者によるものかもしれないと前報において述べた。今回の成績においても結果は同じで、したがって以上の場合と同様のことが考えられる。しかしながら、今回の粉乳試料は、いずれも H. T. S. T. あるいは U. H. T. 殺菌を行なっている製品であり、同様の殺菌を行なっている各種牛乳について2次汚染を論じた小川ら⁸⁾ の報告や、あるいは粉乳製造工程におけるブドウ球菌の消長を調査し、ブドウ球菌が検

出されるのは2次汚染によるものであるという三野ら⁹⁾ の報告があるように、2次汚染と考えるのが妥当のようである。もちろんこの場合も、工場所在地あるいは工場内に分布する菌が最も有力な2次汚染源となることも考えられる。ともかくこれらの点を明らかにするためにはさらに原料乳から製品に至る一貫した工程について追及することが必要であり、これらの成績については第3報において報告する予定である。

要 約

本邦各地の6工場から1年間にわたって送付を受けた粉乳と、殺菌方法を異にする3種類の牛乳から分離した腸球菌群を分類し、とくに粉乳については工場別に出現菌型を検討した。その結果は以下のとおりであった。

1) 粉乳および牛乳由来の腸球菌群 601 株は、*Str. faecium* 533株、*Str. faecalis* 21株、*Str. faecalis* var. *liquefaciens* 10株、*Str. durans* 3株および Unclassified 34株に分類された。

2) 粉乳では *Str. faecium* が主要菌種で、粉乳由来株の92.3% (533/577) を占めていた。

3) これに反して牛乳由来株では、典型的な *Str. faecium* は1株もみられなかった。

4) 粉乳由来の *Str. faecium* を糖分解の成績に基づいてさらに型別した結果、9型に分けられたが、そのうちの第5型は全6工場から検出され、また出現の最も多い型であった。

5) 粉乳から検出された腸球菌群の主要な菌型は、年間を通じて工場によってほぼ一定していた。

6) 粉乳由来 *Str. faecium* の型別の成績では、地域的な出現菌型の差は認められなかった。

最後に本研究の一部は、森永奉仕会研究奨励金によって記して、ここに謝意を表する。

本報の一部は、第50回日本畜産学会（昭和39年4月、東京）で発表。

文 献

- 1) 橋本秀夫：広大水畜産。3, 503 (1961)。
- 2) 橋本秀夫、伊藤烈、池辺慶三：食衛誌。4, 300 (1963)。
- 3) 橋本秀夫：メディヤサークル No. 41, 111 (1963)。
- 4) R. S. Breed, E. G. D. Murray, N. R. Smith: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 7th Ed. (1957) Williams & Wilkins.
- 5) 橋本秀夫：メディヤサークル No. 54, 163 (1964)。
- 6) C. Moutoussis, J. Papavassiliou, V. Samarakis: Acta Microbiol. Helienica 2, 114 (1957)。
- 7) J. Papavassiliou: Appl. Microbiol. 10, 65 (1962)。
- 8) 小川益男ら：お茶の水医誌。10, 8 (1962)。
- 9) 三野和雄、大塚義一：日獣会誌。14, 479 (1961)。