腸球菌に関する研究

I. 冷血動物由来腸球菌について

(昭和 42 年 9 月 4 日受理)

鹿 江 雅 光* 戸 田 光 敬*
神 笠 武 昭* 久 楽 由 雄*

Studies on Enterococci

I. Enterococci in Poikilothermal Animals

Masamitsu KANOE, Mitsuyoshi TODA, Takeaki KAMIKASA
and Yoshio KUDARA

(Faculty of Agriculture, Yamaguchi University:
Yoshida, Yamaguchi-shi, Yamaguchi)

Enterococci were obtained from 410 samples (45.2%) of 906 various poikilothermal materials. Of these samples examined, enterococcal strains were isolated at fairly high level (70%) from intestinal contents of fish and insects, while they were not frequently detected from those of frogs, plants and soils.

The bacterial counts of enterococci in certain samples tested were at the level from 10^3 to 10^5 per g.

The classification method for enterococcus group reported by Shimazaki et al. was used in this study.

According to biological properties, the majority of the isolated strains were identified as the type B-II (*Str. faecium*). Most of the remainders were classified as the type A-II (*Str. faecalis* and *Str. faecalis* var. *liquefaciens*), and only a few strains showing the beta-haemolysis were isolated.

Furthermore, some strains among the isolated could not be clearly classified.

(Received September 4, 1967)

まえがき

従来、腸球菌については、食品の汚染指標菌としての見地から多くの関心が払われ、食品における本菌の汚染状況¹⁾、分離方法²⁾³⁾等について、いくつかの知見が明らかにされてきた。

一方、最近、魚介類ならびに植物などの材料からも、腸球菌が時おり検出され^{4)~6)}、自然界における本菌のあり方が次第に注目されるようになってきた。しかしながら、現在までに得られた成績はわずかなものにすぎず、冷血動物などにおける、腸球菌の保有状況ならびに分離菌株の詳細はなお明らかでない。

このことは、腸球菌の生態ならびに食品衛生上、汚染指標菌としての本菌の意義を論ずるうえに、今後検討さ

れなければならない課題の一つと思われる。そこで、今回冷血動物を主にした各種材料について、本菌の保有状況等の解明ならびに分離菌株の検討を試みたところ、以下に述べるような成績を得たので、これを報告する。

材料および実験方法

実験材料は Table 1 のとおりで、海水魚については、志岐・対馬海域において水揚げ後、約10数時間水漬けした魚類と、瀬戸内沿岸において釣り上げた材料ならびに水族館飼育魚類のそれぞれの腸内容をできるだけすみやかに検索した。淡水魚についても、水族館飼育ならびに近郊河沼より収集した魚類の腸内容について、同様に検索を行なった。カエルおよび昆虫等については、近郊田畑において捕獲した材料の腸内容を検索し、また、植物については、本学農学部附属農場の各種野菜と近辺の空

* 山口大学農学部：山口県山口市吉田

Table 1. Occurrence of Enterococci from Various Sources

Source	No. of examined species	No. of samples	No. of positive samples
Fish *1 (Marine)	34	225	163
Fish *1 (Limnetic)	10	56	49
Frog *1	3	163	41
Insect *1	9	157	117
Plant *2	35	178	24
Soil		127	16
Total	91	906	410 (45.2%)

*1: Intestinal contents

*2: Leaves

地由来試料のそれぞれ葉の部分を検索の対象とした。土壌については、おもに西日本各地を中心とした、本邦各地のヒトの糞尿汚染の少ないと思われる山岳地帯の地表下 10 cm の土壌について検討を行なった。

実験方法のうち、増菌培地については、被検材料の特殊な点を考慮し、従来報告された種々培地のうち、 Na_2N_3 含量の比較的小さい橋本⁷⁾の培地を使用した。被検材料を適量、本培地に投入し、 37° 、48 時間培養後、その 1 白金耳を馬血液寒天平板培地上に塗抹し、分離培養を行なった。分離菌については、所定の方法ならびに既報⁸⁾のごとく、グラム染色、カタラーゼ試験、ブドウ糖からのガス産生試験、 60° 、30 分の耐熱性、 10° および 45° における発育性、40% ウン胆汁抵抗性、pH 9.6 ブドウ糖ブイオンおよび 6.5% 食塩加ブイオンにおける発育性、0.1% メチレン青牛乳における発育態度、Potassium Tellurite 試験 (以下 P.T. 試験と略) および Triphenyl Tetrazolium Chloride 試験 (以下 T.T.C. 試験と略)、溶血性、ゼラチン液化能、 50° 発育性および数種糖類分解性の各種試験を行ない、同定および型別を行なった。つぎに、材料中の菌数算定は、水揚げ後滅菌ポリ袋に入れ、冷蔵庫内に 10 数時間ほど保存したアジおよびサバの腸内容と、採取直後のカエルおよび淡水魚の腸内容ならびに土壌材料の各 1 g 乃至 0.5 g を滅菌生理食塩水に入れ、常法のごとく 10 倍希釈し、適当な希釈液 0.1 ml を、0.01% NaN_3 加馬血液寒天平板培地上に滴下、拡散し、 37° 、1 夜培養後、出現した集落について、前述の性状を検討し、原材料における腸球菌の菌数を推定した。

実験成績

腸球菌の分離状況は Table 1 に示すとおりで、各種冷血動物ならびに植物あわせて 91 種、906 例の材料のうち、410 例 (45.2%) から本菌に属する株が分離された。

冷血動物における腸球菌の検出率は、淡水魚のそれが

最も高く、魚種ならびに材料採集場所に関係なく、高率 (87%) に本菌が分離された。同様に、海水魚および昆虫材料からも比較的高率 (70%) に本菌が検出され、また、捕獲後凍結保存されたクジラ腸内容についても、13 例の材料すべてに菌が認められた。なお、本成績は便宜上海水魚の成績に包括させた。一方、カエルでは、対象とした 3 種類はいずれも本菌を保有する例が少なく、上記冷血動物に比べ、本材料のそれは低率 (25%) であった。非動物性材料のうち、数種の植物からは低率 (13%) に本菌が検出されたが、材料収集場所により、検出状況が若干異なり、本学附属農場由来材料にみられたように、腸球菌の検出率が高い例も認められた。西日本を主とした各地の山岳地帯の土壌については、菌陽性の材料はきわめて少なく、区分別にみて最も低い検出率 (11%) であった。

つぎに、検出状況の季節的消長についてみると、Fig. 1 のように、春季 (3 月 ~ 5 月) はいずれの材料においても、菌陽性例数が少ないが、初夏 (6 月) から秋 (10 月 ~ 11 月) にかけて検出率の上昇が認められる傾向を得た。

Fig. 2 は数種材料における腸球菌の菌数の、それぞれ 5 例の平均を示したものである。これらにおける菌数は g 当たり 10^2 個に及んだが、各材料における平均は、おおむね 10^3 個 ~ 10^5 個の菌数であった。なお、キンギョ

*1 ○—○: Fish (Marine) △—△: Fish (Limnetic)
 ×—×: Frog □—□: Insect
 ◇—◇: Plant ▽—▽: Soil

*2 No. of positive samples
 No. of examined samples

Fig. 1. Seasonal occurrence of enterococci from various sources

*1: Each block shows the range of maximum and minimum log counts of enterococci per g in five samples

*2: Log mean value of enterococcal counts

*3: Bacterial counts of enterococci in one sample

Fig. 2. Bacterial counts of enterococci in examined samples

については1例のみの成績であり、その菌数は 10^4 個であった。土壤については、本菌陰性の材料が多く、Fig. 2 に示したものは延べ 20 例近くについて検討して得られた成績で、前述の各材料に比べ、腸球菌の菌数は最も少なかった。

つぎに、各材料より検出された菌株について P.T. 試験および T.T.C. 試験を行なったところ、Table 2 の結果が得られた。各由来株はいずれも両性状を欠く株が最も多く、次いで両性状陽性の株、ならびに T.T.C. 還元性のみを欠く株が認められた。なお、魚類およびカエ

Table 2. Potassium Tellurite Test and Triphenyl Tetrazolium Chloride Test of Isolated Strains

P. T. *1	+	-	+	-
T. T. C. *2	+	-	-	+
Fish (Marine)	39*3	95	30	3
Fish (Limnetic)	15	24	7	4
Frog	11	29	10	3
Insect	16	63	33	1
Plant	3	13	5	0
Soil	5	7	3	0
Total	89	231	88	11

*1: Potassium tellurite 1 : 2500

*2: 2, 3, 5-Triphenyl tetrazolium chloride

*3: No. of strains showing the reaction

Table 3. Identification of Enterococci Isolated from Various Sources

Type*1	A I	A II		A III		B I	B II	
Species	<i>Str. faecalis</i> var. <i>zymogenes</i>	<i>Str. faecalis</i>	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	<i>Str. faecalis</i>	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	<i>Str. durans</i>	<i>Str. faecium</i>	Unclassified
Source	<i>Str. faecalis</i> var. <i>zymogenes</i>	<i>Str. faecalis</i>	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	<i>Str. faecalis</i>	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	<i>Str. durans</i>	<i>Str. faecium</i>	Unclassified
Fish (Marine)	0	55*2	10	4	1	0	88	9
Fish (Limnetic)	0	20	0	0	0	0	19	11
Frog	0	7	9	0	0	0	21	16
Insect	1	11	30	3	0	1	56	11
Plant	0	1	5	1	0	0	12	2
Soil	0	6	1	1	0	0	6	1
Total	1	100 (45)*3	55 (38)	9	1	1	202 (88)	50

*1: Type of enterococci, reported by Shimazaki et al. (1965)

*2: No. of strains

*3: No. of a typical strains

ル由来株では、P.T. 試験のみ陰性の株が若干観察された。

Table 3 は、これら 419 株について、その他の生物学的性状を検討して得られた成績であり、島崎ら⁹⁾の B II

*: Same as Table 3

Fig. 3. Distribution of isolated strains

型 (Skadhauge¹⁰⁾ の *Str. faecium* に相当) に属する株が、検査各材料より最も多く分離され、氏らの A II 型 (Bergey's Manual¹¹⁾ における *Str. faecalis* および *Str. faecalis* var. *liquefaciens* のそれぞれ一部に該当) に属する株がこれに次いだ。なお、これら菌型に属する株には、前述の性状のほか、50° における発育性、アラビノース、ラフィノースおよびラクトースの分解性がそれぞれ異なる非定型的菌株が半数近く含まれている。氏らの A I 型 (*Str. faecalis* var. *zymogenes*) および B I 型 (*Str. durans*) に属する株はそれぞれ 1 株認められたにすぎなかった。さらに、従来の記載に一致しない未同定株もカエル、淡水魚および昆虫由来株中に若干認められた。

出現各菌型 (種) と各種由来との関係については、Fig. 3 のように、いずれからでも、半数あるいはそれに近い割合で、B II 型菌が認められ、次いで A II 型菌が分布している成績を得た。なお、供試材料の収集場所、ならびに採取時期と分離菌株の性状との関係についても検討したが、著明な関連性は認められなかった。

考 察

腸球菌は、ヒトおよび各種温血動物の消化管に常在するために、食品衛生上、汚染指標菌としての意義について、大腸菌群とともに従来多くの検討がなされてきた。

一方、海産魚介類および昆虫等の各種冷血動物からの本菌分離も、近年報告^{5,6)} されるようになってきた。このことについては、従来ヒト等の生活との関係が重要視され、ヒトおよび動物の糞尿汚染の結果本菌が検出されるものと考え¹²⁾ られていた。しかしながら、昆虫などにおいては、腸球菌が比較的高率に認められたり、あるいは従来の成績に一致しない菌株が分離され¹³⁾ たりして、このような見解には若干不明な点も認められる。自然界、とくに冷血動物等における本菌の分布状況については、今日、十分な解明はなされておらず、細菌学的な興味からも、また、食品衛生上の観点からも、これらの詳細な検討が望まれる。

わたくしたちはこのような理由から、今回、冷血動物を中心とした各種材料について、本菌の保有状況等の解明を試みたところ、Table 1 の成績を得た。すなわち、魚類 (海水魚および淡水魚)、昆虫等の材料から比較的高率に本菌が検出され、また、クジラについても、堀江の記載¹⁴⁾ に類似する成績を得た。一方、同様な結果が予測されたカエル等のそれについては、その検出率はかなり低いものであった。植物、土壌などの材料についても同様の成績で、たまたま検出される例についても、附属農場由来材料の成績のように、ヒトとの関連性が推測されるようなものが多かった。

季節的には、気温または水温の高い環境下において、検出率の上昇がみられたが、大部分の材料について、採取後直ちに検査を行なっているので、二次汚染により検

出率の上昇をきたしたものと考えるににくい。

魚類、とくに海水魚より本菌が比較的高率に分離されることは興味深い、そのあり方については、海流などに魚類の周遊性など検討しなければならないことがらも多く、今後の検討に待たなければならない。

つぎに、二、三の材料における菌数をみると、ヒトおよび各種動物などのそれ⁷⁾ に比べ、概して少なく、とくに予想に反して菌陽性率の高い魚類にこの傾向が認められ、腸球菌のあり方が、温血動物におけるそれと若干異なるように思われた。

さて、近年、腸球菌の主要な鑑別点とされている P.T. 試験¹⁰⁾ および T.T.C. 試験¹⁵⁾ について、前者は中等度大の黒色集落の発育をみた場合、また、後者は赤紫色の通常大集落が発現した場合を、それぞれの試験陽性とみなすと、供試菌株中には両試験の成績が一致する株のほか、P.T. 試験陽性、T.T.C. 試験陰性の株も比較的多く認められ、また、この成績が相反する株もわずかに検出された。このような両性状の一致をみない株は、市乳および粉乳由来株にも若干みられ¹⁶⁾ ており、それぞれ *Str. faecalis* あるいは *Str. faecium* の非定型的な株と従来考えられている。このほか、両試験に対して中間的な発育性状を示す株も得られており、両試験の判定方法については、さらに吟味、検討の必要性があるように思われる。

出現菌型 (種) についてみると、各種材料由来 400 株余りのうち、島崎ら⁹⁾ の B II 型 (*Str. faecium*) に属する株が最も多くみられ、氏らの A II 型菌 (*Str. faecalis* および *Str. faecalis* var. *liquefaciens* のそれぞれ一部) がこれに次いだ。 β 溶血性の本菌は、従来、各種材料よりしばしば検出されているが、今回の実験材料からはわずかに 2 株認められたにすぎなかった。このことは、冷血動物より分離される株の一特徴かもしれない。また、若干の未同定株も検出されたが、これらの分類については今後の検討が必要と考えられる。

出現各菌型 (種) と分離材料の間には密接な関係はみられず、一定の由来より特定の菌型 (種) の株が検出されることはなかったが、半数またはそれに近い割合で、B II 型に属する株が分離されたことから、これら冷血動物には、該菌型が広く分布していると考えられた。

自然界からの腸球菌分離に関して、Mundt¹²⁾ および Deibel¹⁷⁾ はヒトなどによる汚染の結果と見なしているが、冷血動物各材料からの本菌検出状況および分離菌株の性状からみると、二、三の由来における本菌の棲息性をうかがうこともできる。しかし、温血動物に比べその菌数はかなり少ない。元来、少ない菌数であるのか、あるいは検査方法の不適によるものか不明であるが、いずれにしても、植物および土壌等における本菌のあり方は異なるように思われる。これらを明らかにすることは、自然界における腸球菌の生態を究明するためにも、

今後研究されねばならない課題であろう。さらにまた、非定型的な菌株の分類についても、解明されねばならない問題と考えられ、これについても機会を得て十分検討したい。

総 括

魚類（海水魚および淡水魚）、カエル、昆虫等の腸内容、植物ならびに土壌などのそれぞれ各種の材料、計 906 例について、腸球菌の保有状況を検索したところ、410 例（45.2%）より本菌が検出された。このうち、魚類および昆虫からは、それぞれ70%前後に腸球菌が分離されたが、カエル、植物および土壌のそれは低率であった。

つぎに、二、三の材料における腸球菌の菌数を検討したところ、その多くは $10^3 \sim 10^6$ 個/g であった。

生物学的性状により、分離菌株 419 株を同定したところ、約半数の株は島崎らの B II 型 (*Str. faecium*) に属し、A II 型 (*Str. faecalis* および *Str. faecalis* var. *liquefaciens* のそれぞれ一部) がこれに次いだ。なお、 β 溶血性の株はまれに認められるにすぎなかった。また、非定型的な株ならびに未同定株も検出された。

終わりにのぞみ、ご指導、ご助言を賜わった、恩師、東京大学教授 尾形学先生に感謝の意を表し、本実験に協力して下さった関係各位に深謝します。

文 献

- 1) 市川忠次, 田口 昭: 食衛誌. **3**, 161 (1962).
- 2) E. M. Barnes: J. Appl. Bacteriol. **19**, 193

(1956).

- 3) 堀江 進: 日水産. **25**, 294 (1959).
- 4) J. O. Mundt, A. H. Johnson, R. H. Khatchkian: Food Res. **23**, 186 (1958).
- 5) 青木竜身: 日獣医師. **12**, 111 (1959).
- 6) G. N. Eaves, J. O. Mundt: J. Insect Pathol. **2**, 289 (1960).
- 7) 橋本秀夫: 広大水畜産. **3**, 503 (1961).
- 8) 越智勇一, 尾形 学, 鹿江雅光: 日獣学会誌. **22**, 353 (1960).
- 9) 島崎保家, 尾形 学, 越智勇一: 同上. **27**, 97 (1965).
- 10) K. Skadhauge: "Studies on Enterococci with Special Reference to the Serological Properties" (1950) Einar Munksgaards, Copenhagen.
- 11) R. S. Breed, E. G. D. Murray, N. R. Smith: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 7th Ed. (1957) Williams and Wilkins.
- 12) J. O. Mundt: Hlth. Lab. Sci. **1**, 159 (1964).
- 13) J. O. Mundt: Appl. Microbiol. **11**, 136 (1963).
- 14) 堀江 進: 日水産. **25**, 488 (1959).
- 15) E. M. Barnes: J. Gen. Microbiol. **14**, 57 (1956).
- 16) 橋本秀夫, 伊藤烈, 他: 食衛誌. **5**, 415 (1964).
- 17) R. H. Deibel: Bact. Rev. **28**, 330 (1964).