

畜産食品に含まれる腸球菌群に関する衛生学的研究

特に汚染指標としての意義について

橋 本 秀 夫

広島大学水畜産学部畜産学科

Hygienic Studies on Enterococcus Group in Milk, Meat and Their Products, Especially on Significance as an Indicator of Pollution

Hideo HASHIMOTO¹⁾

*Department of Animal Husbandry, Faculty of Fisheries and
Animal Husbandry, Hiroshima University, Fukuyama, Japan*

(Text-fig. 1 ; Tables 1-42)

(I) 緒 言	503
(II) 腸球菌群の推定培地に関する若干の検討	506
(III) 各種畜産食品における腸球菌群の分布	512
(IV) 人及び各種動物の糞便における腸球菌群の分布	525
(V) 畜産食品及び糞便由来腸球菌群の同定分類並び に型別と由来材料との関係	530
(VI) 腸球菌群の熱抵抗性試験	544
(VII) 保存による腸球菌群の生残試験	548
(VIII) 考 察	553
(IX) 総 括	560
(X) Summary	562
文 献	564

(I) 緒 言

食品衛生の分野において細菌学的検査を行う主要な目的は、飲食品が消化器系伝染病原菌による汚染を受けているかどうかを知ることである。しかし数多い病原菌を直接食品から検出する事は繁雑且つ時間も要するので、病原菌と常に共存し、しかも検出のより容易な菌が存在するならば、その菌を目標として調べる方が簡単であり、又病原菌による汚染の有無を類推することも可能である。この様な目的の下に調べられるのが汚染指標菌であり、食品あるいは水の検査においては従来から大腸菌群が取上げられ、既に日常検査法として検索が行われて来た。しかしながら大腸菌群の中には人畜の腸管以外にも常在する *Aerobacter aerogenes* (*Klebsiella*) などが含まれていることから、たとえ大腸菌群が検出されても必ずしも真の糞便による汚染を意味しないとの疑問が持たれるに至った。そこで大腸菌群に代るべき汚染指標菌として注目されるに至ったのが *Fecal streptococci* と呼ばれる腸球菌の一

1) Former address : 北海道大学獣医学部獣医公衆衛生学教室 Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan

群である。本菌群も大腸菌群と同じく人畜の腸管内に存在する主要な常在菌である点において汚染指標菌たる資格を有する。

本菌群が汚染指標菌として大腸菌群よりすぐれていると注目される第1の点は、WINTER & SANDHOLZER (1946), MALLMANN & LITSKY (1951)⁴⁸⁾によれば大腸菌群が人の生活や汚染と関係が無い水や土壌などから屢々検出されるのに対し、腸球菌群は糞便で汚染された水、あるいは土壌のみから検出され、人の生活と関係の無い場所からは検出されなかったといわれることであり、更にMUNDTら(1958)⁵³⁾、堀江(1959)²³⁾によってもこの事実が確かめられている。第2は汚染と平行するという点であり、MALLMANN (1928), MALLMANN & SYPIEN (1934)⁴⁶⁾によればプールあるいは湖の水泳場の水を検査した時、大腸菌群は汚染の増減と関係なく出現したが、Streptococciは水泳者の増減と平行して出現したと述べられている。第3に腸球菌群は自然界において病原菌と同様死滅が早いといわれる点である。MALLMANN & LITSKY⁴⁸⁾は汚水で処理した土壌に*S. typhosa*を接種して生残を調べた結果、*S. typhosa*は最も早く消失し、次いで腸球菌が死滅したが、大腸菌群は長期間生残していたと述べ、又MALLMANN & SYPIEN⁴⁶⁾は水泳場のStreptococciは一夜で消失したが、大腸菌群は増えることもあったと報告している。第4に人と動物の糞便由来腸球菌群の型が異なるといわれる点であり、後述する様に腸球菌群の分類学的研究が進んだ結果得られた知見である。COOPER & RAMADAN (1955)¹³⁾、BARNES & INGRAM (1955)³⁾、BUTTIAUX (1958)⁹⁾、WILSENS & BUTTIAUX (1958)⁸⁸⁾は人の主要な腸球菌は*Str. faecalis*及びそのvarietiesであるが、ウシ、ヒツジ、ブタ等では*Str. faecium*が主要菌であると報告しており、この点は大腸菌群にみられない特性である。

さて以上の如く汚染指標菌として注目されるに至った腸球菌群も、MALLMANN (1928)がプールの汚染指標菌としてStreptococciが有用であると指摘した当時は余り省みるものが無かった。それはレンサ球菌検索のための培地として、大腸菌群における様な適当にして且つ簡易な選択培地が検討されなかったためである。しかるにHARTMAN (1937)が、グラム陰性菌の発育を抑制するが、レンサ球菌の発育を阻害せぬ制菌剤としてSodium azide (NaN_3)が有効であることを報告して以来、Sodium azideは大いに注目されることとなり、MALLMANN (1940)は初めてこれを液体培地に応用して糞便中の腸球菌群の菌数測定を行った。それ以来腸球菌群の検索のためSodium azideを使用する種々の改良された選択培地が報告されるに至った。すなわちHAJNA & PERRY (1943)¹⁶⁾によるS.F.培地をはじめ、PACKER (1943)⁶⁹⁾、WINTER & SANDHOLZER (1946)⁸⁹⁾、ROTHER (1948)、RITTER & TREECE (1948)⁷⁰⁾、LITSKYら(1953)⁴⁴⁾、那須(1954)⁵⁵⁾、SLANETZら(1955)⁸¹⁾、(1957)⁸²⁾、宮林(1957)⁵⁰⁾及び堀江(1960)²⁷⁾らによる報告が行われ、腸球菌群の検索は大腸菌群同様に簡易且つ確実と認められるようになった。

以上の培地を使用して主にプール、河水、飲料水等を対象として検索¹⁰⁾¹⁵⁾²⁷⁾³⁷⁾⁴²⁾⁴³⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾⁷⁰⁾⁸¹⁾⁸²⁾⁸⁴⁾が行われた結果、水の衛生学的検査においては糞便汚染指標菌としてそれ迄行われて来た大腸菌群と共に、あるいはそれに代るべき汚染指標菌としてますます注目され、既に英国においては日常検査に本菌群の検索が取り入れられているといわれている⁴³⁾⁴⁵⁾。

上述の如く水を対象とした検索が行われる一方、食品衛生の面においても本菌群が大腸菌群に代る汚染指標菌として意義を有するか否かが検討された。しかも初めは水の汚染と関係ある水産食品を対象とした報告が多く、OSTROLENKら(1947)⁶⁸⁾はカニその他、McCLESKEY

& BOYD (1949)⁴⁹⁾はカニ, WILSON & McCLESKEY (1951)⁸⁶⁾⁸⁷⁾, 坂井 (1956)⁷¹⁾はカキ, 那須 (1954)⁵⁶⁾がイカ・タコ, LARKIN ら (1956)⁴¹⁾が冷凍魚類, 柳沢ら (1954)⁹⁰⁾, 宮林 (1957)⁵¹⁾, 堀江 (1960)²⁷⁾が魚介類その他について腸球菌群を検索し, 更に大腸菌群との出現を比較しながら検討を行っている。

他方畜産食品において乳及び乳製品については腸球菌が存在する事実は早くから知られていた。SHERMAN & NIVEN (1938)⁷⁸⁾, BEAHM (1942)⁷⁾は生乳あるいは殺菌乳, NICHOLUS (1939)⁵⁷⁾は粉乳における分離レンサ球菌を同定して腸球菌の存在を報告しているが, 1943年に至り HAJNA & PERRY¹⁶⁾は初めて S.F. 培地を用いて生乳の腸球菌を, WHITE & SHERMAN (1944)⁸⁵⁾はペニシリンと Sodium azide を含む選択培地を用いて生乳及び殺菌乳の腸球菌を検査し, KOSIKOWSKY & DAHLBERG (1948)⁴⁰⁾はチーズ中の *Str. faecalis* 分離のため同様の培地を使用するなどの報告が次第にみられるに至った。我国においても井上 (1955)³²⁾がバター, 八田ら (1956)²²⁾が生乳及び市乳, 大嶋 (1956)⁶⁵⁾がチーズ, 青木ら (1957)¹⁾が粉乳及びミックスパウダーについて, 著者ら (1958)¹⁷⁾, (1959)²¹⁾も各種乳製品における検査成績並びに分離腸球菌の性状についての報告を行った。一方近年に至り肉及び肉製品の腸球菌についても検索が行われ, NIVEN (1952)はレンサ球菌が肉に存在する主要な菌であると述べている。又 BARNES & INGRAM (1955)³⁾³¹⁾, NIVEN (1955)⁵⁸⁾は缶詰ハムの腸球菌を検査して汚染の由来を論じた。更に KERELUK & GUNDERSON (1959)³⁴⁾, HARTMAN (1960)¹⁸⁾は冷凍した肉パイについて腸球菌の分布, 汚染を調査し, KERELUK (1959)³⁵⁾は分離腸球菌の同定報告を行っている。我国においても市川・国田 (1952)²⁹⁾は食中毒菌としての見地から生肉及び肉製品における本菌の分布を調査し, 宮林 (1957)⁵¹⁾は牛肉における腸球菌の夏期と冬期との分布の差を検討した。

水あるいは各種食品における腸球菌群の分布状態は次第に明らかにされて来たが, それら報告の多くは汚染の度合, すなわち陽性率並びに出現菌数を調べたものが多く, 更に進んで材料と出現菌種との関係迄検討したものは非常に少ない。

Bergey's Manual (1957)⁸⁾には Enterococcus group として, *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, *Str. faecalis* var. *zymogenes* 及び *Str. durans* の4型が記載されているが, 一部にはこの分類を不十分として *Str. faecalis* を更に *Str. faecalis* と *Str. faecium* なる2種に区別する主張がなされている。*Str. faecium* なる種名は ORLA-JENSEN (1919)が Lactic acid bacteria の分類学的研究で記述した事に始まっている。その後腸球菌群の分類に関しては, SHERMAN (1937)⁷⁷⁾, (1938)⁷⁹⁾の詳細な研究があり, 上記4菌種が記載されているが, *Str. faecium* を区別していない。しかるに1950年に至り, SKADHAUGE⁸⁰⁾は人由来の腸球菌群の分類を試みた際, Potassium tellurite (K_2TeO_3) に対する感受性の差から *Str. faecalis* と *Str. faecium* とは異った菌種として取扱うべきであると報告した事に始まり, SHARPE & SHATTOCK (1952)⁷⁵⁾, SHATTOCK (1955)⁷⁶⁾も *Str. faecium* を *Str. faecalis* から分けられるという説を支持し, 又 SEELEMANN (1954)⁷⁴⁾は *Str. faecium* を D群レンサ球菌の代表菌種として記載している。更に1956年 BARNES⁴⁾は TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) に対する腸球菌群の作用を調べて, *Str. faecalis* 及びその varieties と *Str. faecium* との間には還元性に差がある事を認め, この点からも *Str. faecalis* と *Str. faecium* とは型別出来ると主張するに至った。その後以上の分類型式を採用する報告⁵⁾⁶⁾³⁵⁾も現われ, BARNES & INGRAM (1955)³⁾は缶詰ハムについて, MOUTOUSSIS ら (1957)⁵²⁾は殺菌乳につ

いて分離腸球菌群を同定した結果 *Str. faecium* が多かったと述べ、又 MUNDT ら (1958)⁵³⁾ は植物類その他、BUTTIAUX (1958)⁹⁾、WILSSENS & BUTTIAUX (1958)⁸⁸⁾ は糞便、BUTTIAUX (1958)¹⁰⁾、LECLERC & CATSARAS (1958-59)⁴²⁾ は飲料水の検査においても *Str. faecium* が最も多く出現したと報告している。著者は *Bergey's Manual* 及び以上の報告を参考として、各種の材料から分離した腸球菌群の分類を行い、更に検査材料と出現菌型との関係についても検討を行った次第である。

畜産食品における腸球菌群の分布に関しては上述の如くかなり多くの報告がみられるが、これらを詳細に検討すると報告の多くは単に腸球菌群の定性的報告のみで定量的検査迄は行われておらず、又あっても検査例数及び種類が少なく、しかも原料から製品に至る系統的な調査研究は殆んど行われていない。勿論汚染指標菌としての意義迄深く追及した報告は殆んど見当たらない。よって著者は本邦産の畜産食品を材料として腸球菌群の定性的並びに定量的試験を行い分布状態を明らかにすると共に、分離腸球菌群の各種生物学的性状を調べて型別し、更にその成績を基として種々の角度から汚染指標菌としての意義を検討した。その結果畜産食品における腸球菌群の汚染指標菌としての意義は大腸菌群と同様に、又ある場合にはそれ以上に意義ある事を認めたので以下その成績について報告する。

(II) 腸球菌群の推定培地に関する若干の検討

著者ら¹⁷⁾が報告した如く、乳製品の腸球菌群検査に当っては那須⁵⁵⁾の処方による選択培地を使用した。本培地は Sodium azide (NaN_3) を 0.02% に含む推定培地 (B.T.B. Azide Dextrose Broth) 及び 確認培地 (B.T.B. Azide Dextrose Agar) からなっており、乳製品の如き加熱工程を経た一般生菌数の少ない材料にあっては腸球菌群以外の他種菌の発育が認められず、検査にあたり何等支障が無かったことは既に報告²¹⁾したとおりでである。しかし生乳、生肉等の如く製品に比べて菌の種類及び生菌数が圧倒的に多い非加熱材料の検査に当っては、腸球菌群以外のレンサ球菌、ブドウ球菌並びに芽胞形成菌等の発育する例もみられ本培地の選択能力に不十分な点があることを認めた。よってこれらの点を改良するため、 NaN_3 の濃度を増し更に近年芽胞形成菌の抑制剤として用いられている E.V. (Ethyl violet)²⁵⁾²⁶⁾⁴⁴⁾⁵⁰⁾⁹¹⁾ ⁹²⁾を加えた推定培地について、腸球菌群及び他種菌を供試して、腸球菌群のみの発育を許して他種菌の発育を抑制出来るかどうか、又腸球菌群自体もどの程度抑制を受けるかどうかの2点について若干の比較検討を試みた。

I 実験材料及び方法

1. 培 地

Table 1-1 に示す如き組成の基礎培地に Sodium azide (鹿印 I 級) の濃度を 0.02, 0.025, 0.03% に加えたもの及び E.V. (Bayer) を加えた培地を用意した。すなわち Table 1-2 に示すように培地 No. 1 は基礎培地に Sodium azide を 0.02% になるよう加えたものであり、B.T.B. Azide Dextrose Broth として既に乳製品の検査に使用して来たものである。培地 No. 2 及び No. 3 は基礎培地に Sodium azide をそれぞれ 0.025 及び 0.03% になるように加えたもの、培地 No. 4 は培地 No. 3 に更に E.V. を 0.00006% に加えたものである。E.V. の濃度は宮林⁵⁰⁾の報告に準じた。なお対照として基礎培地のみのもを用意した。これらの培地は 2 ml づつ小試験管に分注して滅菌された。確認培地として用いた B.T.B. Azide Dextrose Agar は那須の処方における肉エキスを酵母エキス (大五栄養化学) で置換え、又 Sodium

azide の濃度を培地 No. 2 と同じくした。すなわち Table 1-3 に示すように培地 No. 2 に酵母エキス (0.5%) 及び粉末寒天 (1.5%) を加えた培地である。

Table 1. Composition of screening media for detection of enterococcus group.

1 Basal medium	
Polypepton	20g
Dextrose	10g
NaCl	5g pH7.0
Brom thymol blue	0.032g
Distilled water	1,000ml
2 Presumptive medium	
Division	Ingredient of media
Control	Basal medium
No. 1	" " + Sodium azide (0.02%)
No. 2	" " + " " (0.025%)
No. 3	" " + " " (0.03%)
No. 4	No. 3 + Ethyl violet (0.00006%)
3 Confirmatory medium	
Presumptive medium (No. 2) + Yeast extract (0.5%) + Agar (1.5%)	

2. 供試菌株

供試菌株の一覧は Table 2 に示すとおりであって、各種腸内細菌群を主体として *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, その他腐敗に関与する菌、酵母等 96 株を供試した。*Enterococcus*, *Micrococcus*, 腸内細菌群及び *Bacillus* の 1 部とその他若干は教室保存株を使用した。 *Str. lactis*, 酵母及び *Bacillus* の 1 部は北大農学部応用菌学教室佐々木教授より、腸内細菌群の 1 部は農林省家畜衛生試験場波岡博士より分与されたものである。

Table 2. The list of organisms used.

Organism	No. of strains	Organism	No. of strains
<i>Salmonella</i>	5	<i>Serratia</i>	2
<i>Arizona</i>	1	<i>Pseudomonas</i>	1
<i>Escherichia</i>	4	<i>Achromobacter</i>	1
<i>Citrobacter</i>	5	<i>Bacillus</i>	6
<i>Klebsiella</i>	3	<i>Saccharomyces</i>	1
<i>Cloaca</i>	3	<i>Hansenula</i>	1
<i>Hafnia</i>	3	<i>Micrococcus</i>	13
<i>Proteus</i>	3	<i>Staphylococcus</i>	7
<i>Morganella</i>	3	<i>Str. lactis</i>	5
<i>Rettgerella</i>	3	<i>Str. bovis</i>	5
<i>Providencia</i>	3	<i>Enterococcus</i>	15

3. 実験方法及び判定基準

供試菌のブイヨン 37°C 20 時間培養菌液を 1 滴ずつ各推定培地並びに対照培地に接種し、

37°C 48時間培養を行って発育態度を観察した。すなわち黄変、混濁、沈澱を示したものは+、混濁、沈澱のみで黄変微弱なものは±、混濁も沈澱もみられないもの、あるいは混濁か沈澱のみを示すが黄変しないものは-と判定した。推定培地に発育した時は更に確認培地に画線培養を行って37°C 48時間培養後その発育の有無を確認した。なお確認培地上で黄変集落が発育した時は+、微小な黄変集落は±、集落を形成するが黄変しないもの及び痕跡程度の発育は-と判定した。

一方 Table 2 に示した *Str. bovis* 5株及び *Enterococcus* 15株 (生肉、粉乳及び糞便由来各5株) を特に取上げ、既報²¹⁾の培養温度を異にした際の発育の比較実験と同様の方法で各推定培地における発育態度を比較検討した。まず供試菌のブイヨン 20時間培養菌液を 1,000

Table 3-1. Growth of *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* and others in various presumptive media.

Organism	No. of strains	Growth in various presumptive media					Growth on confirmatory medium
		Control	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	
<i>S. enteritidis</i>	1	+	±~-	±~-	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	1	+	-	-	-	-	-
<i>S. choleraesuis</i>	1	+	-	-	-	-	-
<i>S. thompson</i>	1	+	-	-	-	-	-
<i>S. pullorum</i>	1	+	-	-	-	-	-
Arizona	1	+	+	±	-	-	-
<i>Escherichia</i>	4	+	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter</i>	2	+	±	±	±	±	-
"	1	+	±~-	-	-	-	-
"	2	+	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i>	3	+	-	-	-	-	-
<i>Cloaca</i>	3	+	-	-	-	-	-
<i>Hafnia</i>	3	+	-	-	-	-	-
<i>Prot. vulgaris</i>	3	+	-	-	-	-	-
" <i>mirabilis</i>	3	+	-	-	-	-	-
<i>Morganella</i>	3	+	-	-	-	-	-
<i>Rettgerella</i>	3	+	-	-	-	-	-
<i>Providencia</i>	3	+	-	-	-	-	-
<i>Serratia</i>	1	+	+	±	±	±	-
"	1	+	±~-	±~-	-	-	-
<i>Pseud. fluorescens</i>	1	+	-	-	-	-	-
<i>Achromobacter</i>	1	+	-	-	-	-	-
<i>B. mesentericus</i>	2	+	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	2	+	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i>	1	+	-	-	-	-	-
<i>B. cereus</i>	1	+	-	-	-	-	-
<i>Sacch. cerevisiae</i>	1	±	-	-	-	-	-
<i>Hansenula anomala</i>	1	±	-	-	-	-	-

Notes. + : Growth.
± : Weak growth.
- : No growth.

倍で辛うじて検出される程度に生理食塩水で稀釈したものを原液とし、更にこれを4段階に稀釈して各推定培地及び対照培地毎に各段階それぞれ5本ずつ接種培養を行った。接種量は各管0.2ml宛とし、これらを37°Cに培養して24、48及び72時間後における発育態度を比較した。

II 実験成績

1. 腸球菌群と他種菌の発育態度

Enterobacteriaceae, *Bacillus*, その他腐敗関与菌, 酵母等の各推定培地及び対照培地における発育態度は Table 3-1 に示すとおりである。対照培地には供試株すべてが発育した。但し酵母では沈澱が多量に出現したにもかかわらず、混濁、黄変は微弱であった。推定培地には、*S. enteritidis*, *Arizona*, *Citrobacter* 及び *Serratia* の1部が幾分発育を示した他はすべて陰性であった。又推定培地で発育したものは確認培地で非発育あるいは発育してもその集落は痕跡程度で黄変する迄に至らないため腸球菌と見あやまる恐れは無かった。なお *Bacillus* は培地 No. 1 においてすら全く発育は認められなかった。

Micrococcus 及び *Streptococcus* の発育態度は Table 3-2 に示す如く、*Sta. aureus* 及び *Sta. albus* の1部及び *Str. lactis* が陰性の他は程度に差はあるがすべて推定培地に発育した。*Micrococcus* はコアグラージェテストの陰陽にかかわらず培地 No. 2 に発育し、*Sta. aureus* の2株、*Sta. citreus* の1株は培地 No. 3 に発育した。*Str. bovis* は培地 No. 2 では

Table 3-2. Growth of *Micrococcus* and *Streptococcus* in various presumptive media.

Organism	No. of strains	Growth in various presumptive media					Growth on confirmatory medium
		Control	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	
<i>Micrococcus</i> (Coag. +)	8	+	+	+	-	-	-
" (" -)	4	+	+	+	-	-	-
" (" -)	1	+	+	±	-	-	-
<i>Sta. aureus</i>	1	+	+	+	±	-	-
" "	1	+	+	±	±	-	-
" "	1	+	-	-	-	-	-
" <i>albus</i>	1	+	±	-	-	-	-
" "	2	+	-	-	-	-	-
" <i>citreus</i>	1	+	+	+	±	-	-
<i>Str. lactis</i>	5	+	-	-	-	-	-
" <i>bovis</i>	2	+	+	+	-	-	-
" "	1	+	+	+	±	-	-
" "	1	+	+	+	+	-	-
" "	1	+	+	+	+	+	±~ -
" <i>faecalis</i>	2	+	+	+	+	+	+
" <i>durans</i>	1	+	+	+	+	+	+
" <i>faecium</i>	6	+	+	+	+	+	+
" <i>faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	6	+	+	+	+	+	+

Notes. + : Growth.
± : Weak growth.
- : No growth.

全株, No. 3 に 3 株, No. 4 に 1 株が発育した。しかしこれら推定培地に発育した株も確認培地では *Str. bovis* の 1 株が ±〜 を示した他はすべて発育出来なかったのに対し、腸球菌群の 15 株は全株が推定及び確認培地に完全に発育した。以上の如く *Str. bovis* の中には培地 No. 3 及び No. 4 で +, 確認培地においても ± あるいは痕跡程度に発育し、腸球菌群に最も近い発育態度を示したので、更に両者を取上げて実際の検査時における如く微量な菌量が接種された際の発育態度を比較するため次の如き実験を行った。

2. 腸球菌群及び *Str. bovis* の培地及び接種菌量の差による発育の比較

腸球菌群 (15 株) 及び *Str. bovis* (5 株) の微量菌を各培地に接種して発育を比較した成績は Table 4 に示すとおりである。培地の試験管数は各培地稀釈段階毎に 1 株当り 5 本づつ使用した。

腸球菌群において 24 時間培養では対照培地に比べて各推定培地における発育管数は少なく、特に培地 No. 4 では接種菌液の原ですら抑制されるのが目立ち、計においては対照培地のわずか 30.4% ($6\frac{4}{210}$) の発育を示すに過ぎない。培養 48 時間目において、各推定培地での発育管数の増加は対照培地のそれより多くなり、特に培地 No. 4 では著明であったが、それら発育管数の計は培地 No. 1~4 の順に対照培地の 98.1% ($21\frac{1}{215}$), 93.4% ($20\frac{1}{215}$), 90.2% ($19\frac{4}{215}$) 及び 80% ($17\frac{2}{215}$) という発育成績であった。更に培養 72 時間目における発育管数の増加は対照及び No. 3, 4 に軽度のみられたが、No. 1, 2 では変化が無かった。

一方 *Str. bovis* にあっては腸球菌群に比べて明らかに抑制の影響を受けている事が認められる。すなわち 24 時間培養では培地 No. 1 においてさえ対照培地の半分以下、培地 No. 4 では原においてすら陰性であった。培養 48 時間目において各培地における発育管数は非常に増加したが、それでも Sodium azide 及び E.V. による発育抑制の影響が明らかであり、特に培地 No. 4 では依然として全例陰性に止まっている。培養 72 時間目においては対照培地での発育管数の増加はみられなかったが、その他の培地ではすべて増加し、培地 No. 4 においては初めて発育陽性管が認められるに至った。以上の成績から *Str. bovis* は腸球菌群に比べて、Sodium azide に対する感受性がより鋭敏であることが認められた。すなわち前項において *Str. bovis* は培地 No. 3 及び 4 では +〜 の発育を示していたが、この成績は今回の No. 3 及び 4 の培地における *Str. bovis* の発育が、菌数が多い時又は培養時間が長ければ発育を来し、菌数が少ない時又は培養時間が短かければ発育不良を示したことによっても明らかになし得たものと考えられる。

III 小 括

実験成績 I に示した如く腸球菌群及び他種菌を供試株として Sodium azide 含有量を異にし、あるいは Ethyl violet を加えた各推定培地における発育を検討した結果、腸球菌群はすべて + に、*Str. bovis* は 5 株中 1 株が同程度に発育した。又 *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Arizona*, *Citrobacter*, *Serratia* 等は +〜 ± 程度で発育したが、その他多くの菌種は発育するに至らなかった。なおこれら推定培地で発育陽性を示したのものも、確認培地の段階では腸球菌群がすべて +, *Str. bovis* の 1 株が ±〜 を示した以外は発育陰性を示した事から、腸球菌群とは簡単に区別される事が判明した。すなわち培地における Sodium azide の濃度が 0.02% (培地 No. 1) では腸球菌群以外の菌でも発育可能であるが、0.025% (培地 No. 2) では腸球菌群以外の菌で発育するものがあったも確認培地の段階では抑制することが出来る。但し例外として *Str. bovis* で ±〜 に発育するものもある。又培地 No. 3 (Sodium azide

Table 4. Comparison of growth of enterococcus group and *Str. bovis* to different inoculating doses in various presumptive media.

Organism	Medium	Incubation hours (37°C)														
		24					48					72				
		Density of inoculated culture				Total (b/a)*	Density of inoculated culture				Total (b/a)*	Density of inoculated culture				Total (b/a)*
		Original	× 10	× 100	× 1,000		Original	× 10	× 100	× 1,000		Original	× 10	× 100	× 1,000	
Enterococcus group	Control	75	67	51	17	210/300	75	69	52	19	215/300	75	72	53	19	219/300
	No. 1	75	60	43	9	187	75	70	51	15	211	75	70	51	15	211
	No. 2	75	63	38	9	185	75	69	45	12	201	75	69	45	12	201
	No. 3	75	55	35	6	171	75	67	43	9	194	75	69	44	9	197
	No. 4	39	19	6	0	64	65	59	40	8	172	71	64	43	8	186
<i>Str. bovis</i>	Control	25	25	17	7	74/100	25	25	18	9	77/100	25	25	18	9	77/100
	No. 1	15	11	5	2	33	25	19	14	4	62	25	23	18	5	71
	No. 2	10	5	3	0	18	20	16	11	4	51	25	20	13	4	62
	No. 3	10	1	0	0	11	15	10	7	3	35	20	14	9	3	46
	No. 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	4	4	2	16

* Denominator (a) : No. of tubes inoculated.

Numerator (b) : No. of tubes grown.

0.03%) 及び No. 4 (No. 3 + E.V.) において腸球菌群は全株, *Str. bovis* は 1 部が発育したがその他の菌はすべて抑制された。

以上から *Str. bovis* が最も腸球菌群に近い発育態度を示す事を知ったので、又腸球菌群自体もどの程度抑制を受けるかどうかをみるため両者を取上げて実際の検査時における如く微量な菌を接種して発育性を検討した結果、実験成績 2 に示すとおり、兩種菌の Sodium azide による影響がかなり著明に現われ、培養 72 時間目において腸球菌群の発育は培地 No. 1 では対照の 4% 減、No. 2 では 8% 減、No. 3 では 10% 減と培地の Sodium azide 量が増加するにつれて発育不良となり、更に E.V. を添加した No. 4 では 15% 減の成績であった。他方 *Str. bovis* は腸球菌群よりも更に強く影響を受け、培地 No. 1 では 8% 減、No. 2 で 19%、No. 3 で 40%、No. 4 では実に 79% も抑制された。又この様な影響は菌数の少ない程著明であったが、反面培養時間の延長に伴って発育して来る傾向も認められた。

結局可検材料より腸球菌群を定量的に検出する際の推定培地としては、Sodium azide の含有量は 0.02% でも大体目的を達し得るが、*Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Str. bovis* の如き菌種に対しては 0.03% が好ましい。しかし確認培地での Sodium azide 量は 0.025% であるが腸球菌群以外の菌種の発育を抑えている点などを考慮すると、一般の菌種に対しては 0.025% とするのが妥当の様である。しかし著者ら²¹⁾が報告したように乳製品の如き加熱食品で一般生菌数の少ない材料の検査に当っては、0.02% で十分と考えている。又培養時間は 48 時間が適当である。なお Ethyl violet の培地への添加はその必要性を認めない。

(III) 各種畜産食品における腸球菌群の分布

前章の培地並びに培養方法によって各種畜産食品における腸球菌群の定性的並びに定量的検査を行って腸球菌群の分布状態を調査した。なお汚染指標菌としての腸球菌群に関する報告には、大腸菌群の検査も同時に行って両者の菌群の汚染状態を比較検討しているものが多いので、著者もこれらにならって大腸菌群の検索も行ったが、更に一般生菌数の検査も行って 3 者の出現状況から汚染の検討を試みた。

I 検査材料

1. 乳房直接採取乳

本材料は 10 戸の酪農家で飼育されていた 50 頭の牛について各分房から、初めの数搾りは棄てた後無菌的に直接試験管に採取した乳 200 例である。材料の蒐集期間は 1959 年 5 月 7 日から 6 月 7 日にわたっており、材料はすべて採取後 2 時間以内に実験室に運ばれて検査に供された。

2. プラント持込乳

本材料は 1959 年 6 月 16 日から同月 25 日迄の間に札幌市内の 1 ミルクプラントに持込まれた近郊 7 地区由来の輸送缶 50 缶より採取されたものである。これらは直ちに氷塊の入った魔法びんに納められて冷却され、1 時間以内に実験室に運ばれて検査に供された。

3. 乳製品 (1957 年度検査分)

本材料は脱脂粉乳 14, 調製粉乳 13, 全粉乳及び加糖粉乳各 2, ミックスパウダー 6, 加糖練乳 17, プロセスチーズ 7 及びバター 44 の計 105 材料であり、何れも 1956 年及び 1957 年製である。メーカーはバターのみが 14 メーカーにわたっているが、その他の製品は 3 大メーカー製である。検査は何れも製造後 6 カ月以内の期間に行われた。

4. 粉乳 (1958年度検査分)

本例は北海道内5カ所の乳製品工場から送られて来た材料で、1958年10月1日から同月31日の間に製造されたものをA工場では7~19日、B工場では16~27日の如く連続採取した脱脂粉乳69, 全粉乳12計81材料である。検査は製品の製造後すべて1月以内に行われた。

5. 生肉

本材料は札幌市内の百貨店及び精肉小売店から購入した豚肉及び牛肉で、1959年の冬期(1月26日~2月24日)は豚肉、牛肉各30例、夏期(8月15日~8月22日)は豚肉、牛肉各20例の計100材料である。これらの材料は店頭で既にうすく切られており、経木に包まれたままの状態で購入後(夏季は魔法びんを用いて)1時間以内に実験室に運ばれて試験に供された。なお購入店は冬季32軒、夏季22軒であり、このうち夏冬2回共購入した店は11軒であった。

6. 肉製品

本材料は札幌市内の4つの百貨店(1材料のみ精肉小売店)から1960年8月27日より10月4日の間に購入した8メーカー製のドメスチックソーセージ7, ドライソーセージ13, ハム17及びベーコン2の計39材料である。ソーセージ類はメーカー包装のまま、ハムは適当な大きさに分割された塊りで購入された。又ベーコン及びスモークハムの各2例はスライスされた真空包装品である。これらの材料は購入後0°Cの冷蔵庫に保存された後試験に供された。製造月日の標示のあったもの30例、無いもの9例(ドライソーセージ7, ベーコン2)である。製造月日の標示品では製造後2カ月の1例を除くほかは3週間以内で検査に供された。

II 検査方法

各材料について生乳はそのままを原液とし、乳製品は食品衛生検査指針³⁸⁾に従い共栓の稀釈びんを用いて5あるいは10倍稀釈液を調製し、これを原液とした。生肉は5gを秤量してホモジナイザーのカップに取り、生理食塩水45mlを加えてホモジナイザーにかけ、均質化した10倍稀釈液を原液とした。肉製品は包装を開き深部より10gを秤取して生肉同様ホモジナイザーにかけた5倍液を原液とした。以上の各原液について更に段階稀釈液を作り、菌数の測定に供した。すなわち各材料共腸球菌群数と共に検査指針に準じて一般生菌数及び大腸菌群数をも測定した。但し乳房直接採取乳のみは後二者を省略して腸球菌群数のみを測定した。

腸球菌群数の検査に当っては(II)章で述べた培地No.1の処方による推定及び確認培地を用いた。但しプラント持込乳、夏季検査の生肉及び肉製品の1部については培地No.2を使用した。すなわちこれら推定培地を10mlずつ分注した各段階それぞれ5本の中試験管に各稀釈液を1mlずつ接種して37°Cに48時間培養後、発育の疑わしい管については72時間迄培養し、黄変混濁したものを推定試験陽性とした。更にこの陽性管から確認培地に画線培養して37°C48時間培養後、黄変集落の発育したものを確定試験陽性とした。ついでこれら陽性を示した材料について改めて推定培地から血液寒天平板に培養を行い、発育した集落を観察して異と思われる代表集落から菌株を分離した。更にこれら分離株については(V)章に後述する如き同定試験を行い腸球菌と同定後、改めて推定培地における成績からM.P.N.法により腸球菌群数を算定した。なお1957年度検査の乳製品のみは既報²¹⁾に示した如く0.2mlずつ5本の推定培地に接種する方法で算定を行った。

大腸菌群数についてプラント持込乳はDesoxycholate Agar(栄研)を、1957年度検査の乳製品はViolet Red Bile Agar(Difco)使用したが、その他は各段階稀釈液1mlずつを5本のB.G.L.B. 醗酵管に接種し以下検査指針に従い完全試験迄行った後M.P.N.値を求めた。

一般生菌数は乳及び乳製品については乳製品用標準寒天培地(栄研)、肉及び肉製品については酵母エキス寒天培地(栄研)を用いて測定した。なおプラント持込乳については同時に総菌数(Breed 値, 個体法)をも求めて比較を行った。

Table 5. Most Probable Number (M. P. N.) of enterococcus group bacteria per ml in directly milked samples from each quarter of bovine udder.

Cow No.	Site of udder			
	Left anterior	Right anterior	Left posterior	Right posterior
41	1.3	0.8	—	—
42	—	0.4	—	—
43	—	—	0.5	0.2
49	—	—	—	0.4

Table 6. Numbers of enterococcus group bacteria, coliform bacteria and living bacteria per ml in the raw milk sampled at plant.

Sample Place No. of milking	Enterococcus group bacteria (M.P.N. per ml)	Plate count per ml		Sample Place No. of milking	Enterococcus group bacteria (M.P.N. per ml)	Plate count per ml	
		Coliform bacteria ¹⁾	Living bacteria ²⁾			Coliform bacteria ¹⁾	Living bacteria ²⁾
1 A	3.3	10	12	26 E	280	840	250
2 "	24	210	160	27 "	0.8	32	16
3 "	3.3	10	>30	28 "	0.4	5	42
4 "	33	50	>20	29 "	0.5	20	18
5 "	43	70	>45	30 "	0.2	120	38
6 B	1.7	220	>38	31 F	3.1	4,300	2,000
7 "	0.4	<10	>12	32 "	79	15	38
8 "	2.6	40	>30	33 "	350	220	210
9 "	130	<10	>28	34 "	0.7	<10	140
10 "	4.9	<10	>16	35 "	17	10	250
11 C	16,000	500	>350	36 "	4.9	10	12
12 "	3,500	3,300	90	37 "	79	440	4,000
13 "	2,400	6,800	>230	38 "	79	40	1,500
14 "	9,200	11,000	300	39 "	110	5	8
15 "	9,200	1,300	310	40 "	3.3	5	48
16 "	79	610	62	41 G	4.9	<10	250
17 "	79	1,500	140	42 "	1,600	142,000	130
18 "	24	110	90	43 "	>1,800	30	750
19 "	22	95	85	44 "	3.3	110	110
20 "	4.9	1,200	70	45 "	1.7	40	>800
21 D	790	840	400	46 "	54	2,100	160
22 "	220	440	45	47 "	0.5	30	30
23 "	0.5	1,800	240	48 "	28	390	350
24 "	0.2	75	1,300	49 "	1.7	55	250
25 "	0.4	120	46	50 "	33	70	65

Notes. 1) Medium : Desoxycholate agar (Eiken).

2) Unit : 10 thousand.

III 検査成績

1. 乳房直接採取乳

50頭の乳牛の各分房より搾乳した計200例における腸球菌群の陽性率はわずかに3% ($\frac{6}{200}$) であり極めて低率であった。なおこの陽性6例中5例は同一牛舎の3頭に出現したものである。本例の腸球菌群数は Table 5 に示すように 1 ml 当り 0.2~1.3 と非常に少ない数値を示した。

なお本材料における腸球菌群陽性例は少なかったが、腸球菌群以外のレンサ球菌あるいはブドウ球菌は、例数、菌量共腸球菌群よりはるかに多く検出された。

2. プラント持込乳

輸送缶から採取した50例についての成績は Table 6 の如くである。腸球菌群及び大腸菌群は100%陽性であった。腸球菌群数は 1 ml 当り 0.2~16,000, 大腸菌群数は 5~142,000 の範囲に分布していた。個々の材料について腸球菌群と大腸菌群の出現菌数を比較すると Table 7 の如く後者の菌数の多い方が37例で多数を占める成績であった。

Table 7. Comparison of numbers of enterococcus group bacteria and coliform bacteria in raw milk samples from plant.

Appearances	No. of samples
Enterococcus group bacteria less than coliform bacteria	37
" " " more " " "	9
Not compared	4

一般生菌数は ml 当り 8万~4,000万に分布し、400万以下44例 (88%) でわが国における原料乳としては良好なものが多かった。同時に行った Breed 値 (個体法) との関係は Table 8 の如くであり、大体平行しているのが観察される。

Table 8. Relationship of plate count and direct microscopic count (individual count) in 50 raw milk samples from plant.

Division	Range of bacterial count per ml				
	Under 10 thousand	~1 million	~4 million	~10 million	Over 10 million
Plate count	1	25	18	2	4
Breed method	1	19	15	13	2

3. 乳製品 (1957年度検査分)

製品8種計105材料についての検査成績は Table 9 に示されるが、本表については既に報告¹⁷⁾しているので簡単な記載に止める。腸球菌群は練乳、プロセスチーズを除く他製品41例から検出され、大腸菌群陽性は5例でバターのみにみられた。一般生菌数5万以上は9例でこれもバターのみにみられた。なおこのうちの8例は腸球菌群も陽性であり、更にそのうちの5例は大腸菌群も陽性であった。腸球菌群の陽性率は 39.0% ($\frac{41}{105}$) であったが、大腸菌群のそれは 4.7% ($\frac{5}{105}$) であり、前者の陽性率が遥かに高い。各製品における個々の陽性率は大腸菌群がバターで 11.3% ($\frac{5}{44}$)、腸球菌群はバターで 43.1% ($\frac{19}{44}$)、脱脂粉乳で 57.1%

Table 9. Bacteriological examinations of dairy products.

Dairy products	No. of samples	No. of positive samples		Plate count per g (ml)	
		Enterococcus group	Coliforms	Under 50 thousand	Over 50 thousand
Skim milk powder	14	8	0	14	—
Modified milk powder	13	7	0	13	—
Whole milk powder	2	2	0	2	—
Sweetend milk powder	2	2	0	2	—
Dried ice cream mix	6	3	0	6	—
Sweetend condensed milk	17	0	0	17	—
Butter	44	19	5	35	9
Processed cheese	7	0	0	7	—
Total	105	41	5	96	9

Table 10. Numbers of enterococcus group bacteria, coliform bacteria and living bacteria per g in dairy products contained enterococcus group (results in 1957).

Sample No.	Enterococcus group bacteria (M.P.N. per g)	Plate count per g		Sample No.	Enterococcus group bacteria (M.P.N. per g)	Plate count per g	
		Coliform* bacteria	Living bacteria			Coliform* bacteria	Living bacteria
S 5	20	0	530	B 1	20	0	560
// 6	10	0	430	// 2	130	0	1,200
// 10	68	0	750	// 3	45	0	75
// 11	110	0	1,300	// 4	45	0	1,400
// 12	68	0	550	// 10	68	0	120
// 13	20	0	330	// 14	20	0	800
// 17	20	0	1,100	// 19	250	0	1,400
// 26	83	0	320	// 20	10	0	35
M 2	20	0	650	// 21	10	0	45
// 10	110	0	650	// 25	23	0	8,000
// 20	39	0	580	// 26	23	0	240,000
// 21	23	0	550	// 27	85	0	930,000
// 22	70	0	200	// 28	110	300	99,000
// 27	83	0	640	// 29	10	0	28,000
// 28	550	0	470	// 31	400	30	5,300,000
W 9	39	0	650	// 32	1,700	9,000	4,800,000
// 22	10	0	530	// 33	23	0	410,000
K 7	39	0	430	// 35	650	9,300	4,400,000
// 8	4,000	0	3,000	// 36	55	100	78,000
I 1	170	0	570				
// 8	20	0	260				
// 23	10	0	330				

Notes. S: Skim milk powder, M: Modified milk powder, W: Whole milk powder, K: Sweetend milk powder, I: Dried ice cream mix, B: Butter.

* Medium: Violet Red Bile Agar (Difco).

(8/14), 調製粉乳で 53.8%(7/13), 全粉乳及び加糖粉乳ではそれぞれ 100%(2/2), ミックスパウダーで 50%(3/6) であった。

次に上記腸球菌群の陽性例41材料について、それらの腸球菌群数、大腸菌群数及び一般生菌数3者の出現の関係を示すと Table 10 の如くである。すなわち粉乳類22例において大腸菌群は陰性であり、腸球菌群は g 当り 4,000 が 1 例あったのみで残る21例は 550 以下の成績であった。生菌数も 200~3,000 で少なく、1,000 以上はわずかに 3 例のみであった。バターにおいて B1 から B25 迄の10例は大メーカー製、B26 から B36 の 9 例は小メーカー製であり、腸球菌群数は大メーカー製にあつては粉乳類同様、小メーカー製にあつても 2, 3 の例外を除いて粉乳あるいは大メーカー製同様の成績を示した。大腸菌群は大メーカー製で陰性、小メーカー製で 5 例が陽性であり、菌数は 30~9,300 で陽性 5 例中 4 例は腸球菌群数より多かった。生菌数は大メーカー製では B25 が 8,000 で最高を示したが、それ以外は粉乳類と同様に菌数は少なかった。これに反し小メーカー製にあつては一般に菌数は多く、2.8万~530万に分布し 2 万台の 1 例を除いて残る 8 例は何れも 5 万以上であり、5 万~100万 4 例、100万以上 3 例であった。

4. 粉乳 (1958年度検査分)

粉乳81材料の検査成績は Table 11 に示すとおりである。

大腸菌群は全例陰性であったため本表から除外した。それに反して腸球菌群は 100% 陽性であり、g 当りの菌数は 7~1,800 に分布していた。内訳は菌数 100 以下が 42 例 (51.8%), 110~1,000 が 36 例 (44.4%), 1,100 以上はわずか 3 例 (3.7%) であり、菌数そのものは前項の粉乳の成績と比べて大差はみられない。又各工場における毎日の出現菌数はほぼ一定しているのが観察される。

生菌数は 130~4,200 に分布し、1,000 以下 66 例、以上 15 例という良好な成績であり、腸球菌群数と同様に毎日の出現菌数はほぼ一定している。

5. 生肉 A (冬季)

豚肉及び牛肉各 30 例計 60 例について行った冬季の検査成績は Table 12 に示される。本表において左側豚肉 No. 1~28 とそれに対応する右側牛肉の No. 51~78 の各 28 例は 28 軒の小売店よりそれぞれ同時に購入されたものであり、最下段の 2 列すなわち No. 29, 30 及び No. 79, 80 の 4 例のみは別々に 4 軒の店から購入された。

腸球菌群の陽性率は豚肉において 66.6% (20/30)、牛肉において 56.6% (17/30)、両者をあわせて 61.6% (37/60) であったのに対し、大腸菌群のそれは豚肉で 83.3% (25/30)、牛肉で 80% (24/30)、両者あわせて 81.6% (49/60) を示し、大腸菌群の陽性率は腸球菌群のそれよりかなり高かった。豚肉及び牛肉の両者における腸球菌群数は g 当り 0~700 で、その菌数の内訳は 0 が 23 例、10 以下 26 例、11~100 が 8 例、110 以上 3 例であったのに対し、大腸菌群数は 0~1,300 で菌数 0 が 11 例、10 以下 17 例、11~100 が 23 例、110 以上 9 例という成績であった。更に同一材料において出現した両菌群の菌数の多少を比較すると、Table 13 に示される様に大腸菌群数の方のより多い例が、腸球菌群数の方のより多い例よりも多数を占めた。

生菌数は豚肉で 0.3 万~240 万、牛肉で 0.2 万~1,800 万に分布しており、その内訳は菌数 1 万以下が豚肉及び牛肉でそれぞれ 4, 5 例、1.1 万~10 万が共に 12 例、11 万~100 万は 11, 9 例、110 万以上 3, 4 例と両者は同じ様な傾向で出現した。

次に豚肉と牛肉の両者を同時に購入した店 28 軒について、腸球菌群と大腸菌群の出現の関

Table 11. Numbers of enterococcus group bacteria and living bacteria per g in milk powder (results in 1958).

Dairy plant	Sample	Date of manufacture	M.P.N. of enterococcus group bacteria	Plate count	Dairy plant	Sample	Date of manufacture	M.P.N. of enterococcus group bacteria	Plate count
A	S	Oct. 7	49	2,200	C	S	Oct. 5 A	170	680
"	"	8 A	70	420	"	"	5 B	240	880
"	"	8 B	23	190	"	"	6 A	17	250
"	"	9 A	46	220	"	"	6 B	350	1,000
"	"	9 B	22	300	"	"	7 A	350	680
"	"	10	33	270	"	"	7 B	920	3,200
"	"	11 A	17	300	"	"	8 A	540	1,200
"	"	11 B	33	480	"	"	8 B	130	990
"	"	12 A	46	230	"	"	9 A	79	210
"	"	12 B	130	200	"	"	9 B	920	1,500
"	"	13 A	79	350	"	"	10 A	110	370
"	"	13 B	46	350	"	"	10 B	280	1,100
"	"	14 A	79	310	D	W	Oct. 5	130	750
"	"	14 B	240	690	"	"	6	23	1,200
"	"	15 A	46	290	"	"	7	79	230
"	"	15 B	7	320	"	"	9	130	250
"	"	16 A	49	190	"	"	10	130	320
"	"	16 B	49	250	"	S	12	33	2,200
"	"	17 A	79	440	"	"	14	130	440
"	"	17 B	79	470	"	"	15	23	450
"	"	18 A	17	190	"	"	16	240	350
"	"	18 B	11	700	"	"	18	220	450
"	"	19 A	23	360	"	W	19	79	500
"	"	19 B	23	140	"	"	20	110	300
B	"	Oct. 16	1,600	2,100	"	"	21	79	190
"	"	17	1,600	1,900	"	"	22	33	300
"	"	18	920	1,200	"	"	23	170	290
"	"	19	920	940	"	"	24	130	250
"	"	20	540	760	"	"	25	350	440
"	"	21	1,800	2,600	"	S	29	64	250
"	"	22	110	570	"	"	30	33	3,500
"	"	23	350	370	"	"	31	49	230
"	"	24	350	590	E	"	Oct. 1	49	1,300
"	"	25	540	700	"	"	2	49	240
"	"	26	79	380	"	"	4	33	210
"	"	27	350	730	"	"	5	17	130
C	"	Oct. 2	220	570	"	"	6	130	300
"	"	3 A	110	680	"	"	7	79	410
"	"	3 B	540	4,200	"	"	8	79	250
"	"	4 A	170	620	"	"	9	31	240
"	"	4 B	220	2,200					

Notes. Coliforms were all negative in these samples.

S : Skim milk powder, W: Whole milk powder.

Table 12. Numbers of enterococcus group bacteria, coliform bacteria and living bacteria per g in raw meat from meat-shops (in Winter).

Sample No.	Pork			Sample No.	Beef		
	M.P.N. per g		Plate count/g (Unit : 10 thousand)		M.P.N. per g		Plate count/g (Unit : 10 thousand)
	Enterococcus group bacteria	Coliform bacteria			Enterococcus group bacteria	Coliform bacteria	
1	350	33	25.0	51	130	4.5	4.5
2	33	>7.8	7.4	52	2	0	1.0
3	22	>6.8	1.2	53	23	>11	15.0
4	13	1,300	>50.0	54	7.8	>45	5.6
5	13	4,900	240.0	55	11	23	>20.0
6	7.8	>13	22.0	56	11	0	>120.0
7	6.8	79	13.0	57	2	70	33.0
8	4.5	>17	>5.0	58	4.5	>13	3.1
9	4.5	>11	9.9	59	7.8	170	380.0
10	2	0	31.0	60	7.8	>4.5	2.8
11	2	0	6.0	61	700	43	1,800.0
12	2	0	33.0	62	4.5	79	180.0
13	4.5	790	8.0	63	0	>7.8	5.0
14	4.5	>2	2.8	64	0	0	5.4
15	2	95	200.0	65	0	33	60.0
16	2	>7.8	0.3	66	0	>7.8	0.2
17	2	1.8	8.5	67	0	>6.1	8.6
18	2	>110	6.1	68	0	>9.3	32.0
19	1.8	>21	60.0	69	0	23	3.7
20	0	>17	9.8	70	23	0	3.3
21	0	>4.5	0.3	71	7.8	>140	1.1
22	0	130	0.7	72	2	110	9.3
23	0	>2	6.2	73	2	0	0.4
24	0	>20	52.0	74	0	>14	12.0
25	0	>11	6.4	75	0	>2	>60.0
26	0	>6.8	44.0	76	0	110	>55.0
27	0	>4.5	0.9	77	0	>93	100.0
28	0	14	>140.0	78	0	>13	2.3
29	4.5	0	100.0	79	0	0	0.9
30	0	0	29.0	80	2	>2	0.8

Table 13. Comparison of numbers of enterococcus group bacteria and coliform bacteria in raw meat from meat-shops (in Winter).

Appearances	No. of samples	
	Pork	Beef
Enterococcus group bacteria less than coliform bacteria	20	20
" " " more " " "	6	6
Equal or not compared	4	4

係をみると Table 14 の如く、全部陽性が 25% (7/28)、全部陰性は 0 であった。すなわち小売店の生肉はこれら菌群の汚染を受ける機会が多い事が判明する。

Table 14. Relationship of appearance of enterococcus group and coliforms in pork and beef purchased in pair from 28 meat-shops.

Pork		Beef		No. of shops
Enterococcus group	Coliforms	Enterococcus group	Coliforms	
+	+	+	+	7
-	-	-	-	0
+	•	+	•	12
•	+	•	+	20
+	+	•	•	16
•	•	+	+	12
+	-	•	•	3
•	•	+	-	4
-	+	•	•	9
•	•	-	+	11
-	-	•	•	0
•	•	-	-	1

豚肉、牛肉の両者共腸球菌群陽性は 42.8% (12/28)、大腸菌群陽性は 71.4% (20/28)であった。豚肉において両菌群共陽性は 57.1% (16/28)、牛肉のそれは 42.8% (12/28)であり、豚肉において腸球菌群のみ陽性は 10.7% (3/28)、大腸菌群のみ陽性は 32.1% (9/28)、牛肉において腸球菌群のみ陽性は 14.2% (4/28)、大腸菌群のみ陽性は 39.2% (11/28)を示し、豚肉と牛肉の汚染度を比較すると豚肉の方が両菌群共に牛肉より汚染されている率が高かった。

生 肉 B (夏 季)

豚肉、牛肉各20例計40例の夏季における検査成績は Table 15 に示すとおりである。本例も冬季同様豚肉、牛肉の両者を同一店から購入した例は表左側の No. 31~48 とそれに対応する牛肉の No.81~98 の 18軒分である。

腸球菌群並びに大腸菌群は冬季と異り両者共 100%陽性であった。又菌数においても冬季に比べて著しく多いのが注目される。すなわち両者の生肉における腸球菌群数は g 当り、11~160,000 に分布しており、その内訳は 100 以下 9 例、110~1,000 が 12 例、1,100~1 万が 16 例、1.1 万以上 3 例であった。大腸菌群数は >7~>49,000 に分布し、大略 100 以下 5 例、110~1,000 が 10 例、1,100~1 万が 14 例、1.1 万以上 11 例であり、個々の材料について両菌群の出現菌数の多少を比較すると、Table 16 に示される様に、冬季同様大腸菌群数の方が腸球菌群数よりも多い方の例が、逆の例より多数を占めた。

生菌数は冬季のそれより 1 桁多く、8 万~>2,500 万に分布し、その内訳は 10 万以下豚肉で 0、牛肉で 1 例、11 万~100 万はそれぞれ 9、8 例、110 万~1,000 万もそれぞれ 9、8 例、1,100 万以上は 2、3 例で両者の間に同じ様な傾向で出現するのは冬季同様であるが、出現菌数は上述の如く冬季の約 10 倍の成績であった。

次に豚肉及び牛肉の両者を同時に購入した 18 軒についての冬季同様の比較は何れも 100%陽性のため検討出来なかった。すなわち夏季の小売店における生肉は全例がこれら菌群の汚

Table 15. Numbers of enterococcus group bacteria, coliform bacteria and living bacteria per g in raw meat from meat-shops (in Summer).

Sample No.	Pork			Sample No.	Beef		
	M.P.N. per g		Plate count/g (Unit : 10 thousand)		M.P.N. per g		Plate count/g (Unit : 10 thousand)
	Enterococcus group bacteria	Coliform bacteria			Enterococcus group bacteria	Coliform bacteria	
31	160,000	>24,000	>2,500	81	1,100	>24,000	1,500
32	54,000	>24,000	>2,400	82	4,900	>7,900	500
33	54,000	>33,000	65	83	11	>11	40
34	7,900	>7,900	900	84	1,800	>4,900	1,600
35	3,500	>70	44	85	2,400	>410	47
36	2,400	>180	16	86	34	700	44
37	1,300	<220	18	87	4,900	13,000	470
38	1,100	>24,000	>250	88	5,400	>24,000	>2,500
39	790	>9,500	40	89	2,200	>1,700	57
40	790	>7	23	90	3,300	240	86
41	790	>7,900	520	91	700	>49,000	280
42	490	>4,900	130	92	240	>1,400	84
43	490	790	150	93	1,400	330	220
44	460	>7,900	>93	94	79	>3,300	110
45	240	2,400	>190	95	2,400	>13,000	>300
46	22	1,300	>100	96	330	>33,000	72
47	20	130	>120	97	79	2,200	180
48	13	79	43	98	33	<220	8
49	130	>46	>110	99	240	790	>65
50	13	1,300	42	100	>1,800	>49,000	>380

Table 16. Comparison of numbers of enterococcus group bacteria and coliform bacteria in raw meat from meat-shops (in Summer).

Appearances	No. of samples	
	Pork	Beef
Enterococcus group bacteria less than coliform bacteria	12	14
" " " more " " "	1	2
Equal or not compared	7	4

染を受けている事を知った。

6. 肉 製 品

Table 17 に示すようにドメスチックソーセージ 7例 (No. 1~7), ドライソーセージ 13例 (No. 8~20), ハム 17例 (No. 21~35) 及びベーコン 2例 (No. 38, 39 但し後者は鯨製品) の計39材料について検査を行った。

腸球菌群の陽性率は23%(9/39)であり, 菌数の分布は g 当り 10以下 4例, 11~100は 2例, 100台が 2例で 1例のみが 12,000 とかけ離れて出現した。ソーセージのうちサラミソーセージのみは 2例共, 又スライスされた真空包装のスモークハム及びベーコンの 4例では 3例が

Table 17. Numbers of enterococcus group bacteria, coliform bacteria and living bacteria per g in meat products.

Sample No.	Kinds	M.P.N. per g		Plate count per g	Sample No.	Kinds	M.P.N. per g		Plate count per g
		Enterococcus group bacteria	Coliform bacteria				Enterococcus group bacteria	Coliform bacteria	
1	Sausage	0	<2	4,500	21	Lachs ham	0	<2	2,800,000
2	"	0	0	17,000	22	" "	120	<6	1,000,000
3	Bologna style sausage	0	0	350	23	" "	0	0	1,500
4	Frankfurt " "	0	0	5,000	24	" "	0	<2	22,000
5	Vienna " "	0	0	30,000	25	" "	150	<2	150,000
6	" " "	0	0	8,800	26	Pressed ham (Round form)	6	0	3,300
7	Cheese sausage	0	<2	3,000,000	27	" " (" ")	0	0	33,000
8	Russian style sausage	0	0	5,000	28	" " (" ")	2	<2	>7,500,000
9	" " "	0	0	230	29	" " (" ")	0	0	3,000
10	" " "	0	0	40	30	" " (" ")	0	0	2,500
11	" " "	0	0	4,000	31	" " (Cubic ")	0	0	1,300,000
12	Krakawa " "	0	0	>250,000	32	" " (" ")	0	0	330
13	" " "	0	0	600	33	" " (" ")	0	<4	>25,000
14	" " "	0	0	5,500	34	" " (" ")	0	<2	9,500
15	" " "	0	<2	7,300	35	" " (" ")	0	0	16,000
16	" " "	0	0	1,300,000	36	Sliced smoked ham	1	0	>100,000,000
17	" " "	0	<3	600	37	" " "	0	0	>130,000,000
18	Salami " "	17	0	2,000	38	" bacon	3	0	>44,000,000
19	" " "	11	0	850	39	Sliced bacon style of whale meat	12,000	>120	>7,500,000
20	Pepperoni " "	0	0	500					

陽性であった。なお最高の腸球菌群数（12,000）を示したのはこのうちの鯨製ベーコンである。大腸菌群の陽性率は30.7%（12/39）で、腸球菌群陽性率よりやや高く、検出頻度は製品の種類別にみるとソーセージ類に比べてハムに多く、又前記腸球菌群数の最も多かった鯨製ベーコンでは本菌群も最高に検出された。菌数の分布は100台が1例のみで残りの11例は10以下であった。両菌群共陽性は4例にみられたが、それらの菌数の比較では何れも腸球菌群の方が多かった。

生菌数は40～>1.3億に迄分布し、1万以下が53.8%（21/39）で約半数を占めるが、1.1万～10万が6例、11万～100万3例、110万～1,000万6例、1,100万以上3例であり、特にスライスされたもの（No.36～39）に菌数の多いのが注目される。なおNo.38のベーコン1例を除く他は何れも加熱処理する事なく、そのままの状態で食される可能性の多いものだけに、100万以上が25.6%（10/39）もあるのは注目すべき点である。

次に3者の菌の出現状態をメーカー別にみるとTable 18の如く、腸球菌群及び大腸菌群はそれぞれ7メーカーにみられた。乳及び乳製品には生菌数の規格が定められているが、肉製品にはそのような規格がみられない。しかし乳及び乳製品にならって一応5万を基準として分類すると、5万以下27例、5万以上12例（30.7%）であった。また生菌数は5万以下で大腸菌群も陰性の製品を一応合格とすると、表の右端に示されるように計21例（53.8%）が相当する。更にこの規格をおし進めて、腸球菌群もあわせて陰性を必要条件とすると、18例（46.1%）が合格となりその率は少しく下がる。生菌数5万以上あるいは大腸菌群陽性あるいは腸球菌群陽性といった例はメーカーを問わず検出されているのが認められる。

Table 18. Relationship between appearance of enterococcus group, coliforms and number of living bacteria in meat products manufactured by different makers.

Maker	No. of Samples	No. of positive samples		Plate count per g		Favourable*	
		Enterococcus group	Coliforms	Under 50 thousand	Over 50 thousand	No. of samples	%
A	10	1	2	9	1	8	80.0
B	6	1	4	5	1	2	33.3
C	5	1	1	4	1	4	80.0
D	5	•	1	4	1	3	60.0
E	5	2	1	2	3	2	40.0
F	5	2	2	3	2	2	40.0
G	2	1	•	•	2	•	0
H	1	1	1	•	1	•	0
Total	39	9	12	27	12	21	53.8

* : The sample which coliforms was negative and bacterial count was under 50 thousand per g, was supposed as favourable.

IV 小 括

各種畜産食品における腸球菌群、大腸菌群及び一般生菌数の出現状況をまとめるとTable 19の如くである。なお1957年度検査分の各種乳製品は材料の種類により、出現菌の傾向に差がみられるので、煉乳とプロセスチーズ、バター及び粉乳の3項目に分けて示した。非加熱材料においては、乳房直接採取乳は別としてプラント持込乳及び夏季の生肉材料では、腸

球菌群ならびに大腸菌群とも100%陽性を示し、冬季の生肉材料ではそれぞれ62%及び82%の陽性率であった。これら材料はまた生菌数も多く、大半が10万以上から更に1,000万以上にまで分布していた。

Table 19. Relationship between positive case of enterococcus group or coliforms and number of living bacteria in milk, meat and their products.

Division	No. of samples	No. of positive samples		Range of plate count per g (ml)					
		Enterococcus group	Coliforms	Under 50 thousand	51~100 thousand	110 thousand~1 million	1.1~4 million	4.1~10 million	Over 11 million
Milk from udder directly	200	6							
Raw milk from plant	50	50	50	.	1	25	18	2	4
Raw meat (in Winter)	60	37	49	19	14	20	6	.	1
" " (in Summer)	40	40	40	.	1	17	14	3	5
Sweetend condensed milk and processed cheese (in 1957)	24	.	.	24
Butter (in 1957)	44	19	5	35	2	3	.	4	.
Powdered milk (in 1957)	37	22	.	22
" " (in 1958)	81	81	.	81
Meat products	39	9	12	27	.	3	4	2	3

加熱材料たる製品において、煉乳及びプロセスチーズでは両菌群ともすべて陰性、生菌数も5万以下であったが、バターにおいて腸球菌群の陽性率は43.1%、粉乳では1957年度検査分59.4%、1958年度検査分100%、肉製品では23.0%であり、大腸菌群はバターで11.3%、肉製品で30.7%の陽性率であった。生菌数は粉乳において両年度とも5万以下であったが、バター及び肉製品では1,000万あるいはそれ以上にまで分布しているのがみられた。

非加熱材料たる持込乳及び夏季の生肉材料では腸球菌群及び大腸菌群は100%陽性であり、両菌群の陽性率を比較できないが、冬季の生肉では腸球菌群陽性率より大腸菌群のそれが大であった。また個々の材料における出現菌数の比較では、生乳、生肉を問わずすべて大腸菌群数が腸球菌群数より多い方の例が逆の例よりも多数を占めていた。

一方加熱材料とみられる乳肉製品においてバターでは腸球菌群の陽性率が腸球菌群のそれより高く、粉乳では腸球菌群のみが陽性であった。しかるに肉製品のあるものはその製造上の工程からみて完全に加熱材料とはいえないものもあり、また製品の形態からみても乳製品とは同列に論じられないが小メーカー製のバターの成績と比較的似た成績を示した。但し大腸菌群陽性率は腸球菌群のそれより高くバターと逆の成績を示した。

大腸菌群陽性のバター及び肉製品について例数は少ないが両菌群の出現菌数を比較すると、バターでは非加熱材料同様に大腸菌群の方が高い成績を示した。肉製品では両者とも陽性がわずか3例で比較が困難であるが、本3例ではすべて腸球菌群の方が多く、その他の例においても一般に腸球菌群数の方が多傾向にあった。

製品における生菌数と両菌群の出現は、生菌数5万以上の例が存したのは大腸菌群陽性例がみられたバター及び肉製品においてのみであったこと、バターにおける大腸菌群陽性の5例はすべて生菌数も5万以上であり、また生菌数5万以上の9例中8例は腸球菌群が陽性であったこと、肉製品においては腸球菌群陽性の9例中5例、大腸菌群陽性の12例中6例が生菌数も5万以上の材料であったこと等、種々の点において3者の成績の關係深いことが観察された。

次に生乳から乳製品に至る腸球菌群の出現状況を見ると、乳房から直接採取した乳ではわずか3%が陽性であり、しかもその出現菌数はほとんどがml当り小数点以下の成績を示していることから、この段階における汚染は非常に低いものと考えられる。しかしプラントに持込まれた原料乳の段階では100%陽性となり、更に製品の段階において1957年検査の煉乳、プロセスチーズは陰性、バターで43%、粉乳で59%、1958年検査の粉乳では100%陽性という成績を示した。但し粉乳の両年度における検査方法は既に述べたとおり少しく異っているため、前年度における陽性率は後年度の方法を用いていたならばあるいはもう少し高まったかも知れない。また以上の検査材料はすべて一貫した材料でないため強くいい切るのは難かしいが、何れにせよ搾乳から製品に至る過程において腸球菌群は乳房直接採取乳ではほぼ陰性であるが、プラント持込乳では100%の汚染率を示すに至り、次いで製品の段階においても数そのものは減少こそすれ依然として残存する。特に粉乳において残存する率が高いといえそうである。

以上要するにプラント持込乳、生肉等の生材料において、腸球菌群、大腸菌群及び一般生菌数三者の出現状況の間にはそれぞれ関連性のあることが認められる。またこれら生材料からの加工品においても、現段階の肉製品並びに小メーカー製のバターでは、生材料における同様の傾向が認められるが、粉乳においては大腸菌群陰性、生菌数もg当り5万はもとより5,000以下の現況であるにも拘らず、腸球菌群のみが検出されることは本菌群の汚染指標菌としての意義を深からしめるものである。

(IV) 人及び各種動物の糞便における腸球菌群の分布

前章においては各種畜産食品における腸球菌群と大腸菌群の陽性率並びにそれらの出現菌数を検査して両菌群による汚染状態を比較したが、本章においては第1次汚染源となる人及び各種動物の糞便材料について前章同様の検索を行い比較検討した。

また乳房から直接採取した乳ではほとんど陰性の腸球菌群がプラント持込原料乳及び粉乳の段階において100%陽性の例がみられたことから、特に人及びウシの糞便を重点的に取上げて腸球菌群のみの検査を行い汚染源としての糞便における分布を調査した。

I 検査材料及び方法

検査材料は1957年10月から1958年7月に至る期間と、1960年10月から12月の間に集めたものであり、前者はわれわれと比較的接触が多いと思われる9種の成獣畜(ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、イヌ、ネコ、ネズミ、ウサギ、ニワトリ)、生後2週間以内の初生児及び成人の糞便各5例計55例である。後者は児童及び成人50例、成牛30例の糞便であり総計135例である。前者の初生児は札幌市内の1病院で哺育中の乳児、成人は教室員であり、各種動物は北海道大学付属農場飼育の家畜、教室飼育の実験動物及び動物舎において捕えられたネズミである。後者の人は教室員とその家族、北大獣医学部学生及び小学児童であり、児童の糞便は札幌市

の1保健所より提供を受けた。ウシは付属農場及びその他5戸の酪農家飼育のものである。

以上の糞便材料1gに滅菌生理食塩水9mlを加えてよく磨砕し、10倍稀釈液を作って以後の実験に供した。すなわち前者の材料は腸球菌群並びに大腸菌群の両方を、後者の材料は腸球菌群のみについて検査を行った。腸球菌群の検査方法は前章で述べたとおりであるが、後者の材料については(II)章の成績に鑑み培地No.2を使用した。大腸菌群の検査は前章と同様の方法で行った。

II 検査成績

1. 人及び各種動物の糞便

各種動物9種と初生児及び成人の糞便55例について腸球菌群と大腸菌群の陽性率ならびに菌数の分布状態を調査して比較検討した。個々の材料における両菌群の出現菌数の成績は

Table 20. M.P.N. of enterococcus group bacteria and coliform bacteria per g in human and various animal feces.

Sample		M.P.N. per g		Sample		M.P.N. per g	
No.	Origin	Enterococcus group bacteria	Coliform bacteria	No.	Origin	Enterococcus group bacteria	Coliform bacteria
1	Cattle	< 12,000	1,800	31	Fowl	65,000,000	13,000,000
2	"	< 12,000	33,000	32	"	65,000,000	1,700,000
3	"	< 12,000	3,300,000	33	"	7,000,000	4,500,000
4	"	650	140,000	34	"	8,500,000	7,900,000
5	"	1,100	170,000	35	"	2,500,000	13,000
6	Horse	100,000	< 23,000	36	Rat	170,000,000	7,000,000
7	"	100	45,000	37	"	65,000,000	13,000,000
8	"	25,000	24,000	38	"	650,000	49,000
9	"	5,500	3,300,000	39	"	650,000	1,300,000
10	"	170,000	240,000	40	"	850,000	130,000
11	Sheep	4,000,000	13,000,000	41	Rabbit	400,000	> 24,000,000
12	"	1,200,000	17,000,000	42	"	12,000	< 23,000
13	"	2,500,000	22,000,000	43	"	38,000	< 23
14	"	1,700,000	79,000,000	44	"	17,000	790,000
15	"	350,000	4,900,000	45	"	< 12	< 23
16	Hog	4,000,000	3,300,000	46	Human (Suckling baby)	> 12,000,000	> 240,000
17	"	100,000	230,000	47	" (" ")	> 12,000,000	> 240,000
18	"	2,500,000	49,000,000	48	" (" ")	100,000	5,400,000
19	"	55,000	330,000	49	" (" ")	2,700,000,000	< 23,000
20	"	110,000	1,300,000	50	" (" ")	8,500,000	110,000,000
21	Dog	170,000,000	> 240,000,000	51	" (Adult)	230,000	490,000
22	"	17,000,000	> 240,000,000	52	" (")	700,000,000	7,000,000
23	"	11,000,000	330,000,000	53	" (")	< 120,000	24,000,000
24	"	180,000,000	490,000,000	54	" (")	850	79,000
25	"	25,000,000	4,900,000	55	" (")	230	49,000,000
26	Cat	100,000	78,000				
27	"	170,000	< 23				
28	"	1,000	330				
29	"	17,000,000	1,300,000,000				
30	"	120,000	11,000,000				

Table 21. Range of M.P.N. of enterococcus group bacteria and coliform bacteria per g in every 5 samples of human and various animal feces.

Origin	Enterococcus group bacteria	Coliform bacteria
Cattle	$10^2 \sim 10^4$	$10^3 \sim 10^6$
Horse	$10^2 \sim 10^5$	$10^4 \sim 10^6$
Sheep	$10^5 \sim 10^6$	$10^6 \sim 10^7$
Hog	$10^4 \sim 10^6$	$10^5 \sim 10^7$
Dog	$10^7 \sim 10^8$	$10^6 \sim 10^8$
Cat	$10^3 \sim 10^7$	$10 \sim 10^9$
Fowl	$10^6 \sim 10^7$	$10^4 \sim 10^7$
Rat	$10^5 \sim 10^8$	$10^4 \sim 10^7$
Rabbit	$10 \sim 10^5$	$10 \sim 10^7$
Human (Suckling baby)	$10^5 \sim 10^9$	$10^4 \sim 10^8$
" (Adult)	$10^2 \sim 10^8$	$10^4 \sim 10^7$

Table 20 に、各種 5 例毎にまとめた成績は Table 21 に示す。

腸球菌群及び大腸菌群は両者とも 100%陽性であった。両菌群の出現菌数は動物の種類、あるいは更に個体間においても差がみられる。そのうち個体差の比較的少なかったのは、腸球菌群ではヒツジ、イヌ、ニワトリ、ブタであり、大腸菌群ではヒツジ、ウマ、ブタ、イヌ等である。これに反して個体差の著しいものは腸球菌群では成人、ネコ、ウサギ、初生児であり、大腸菌群ではネコ、ウサギ、初生児であった。

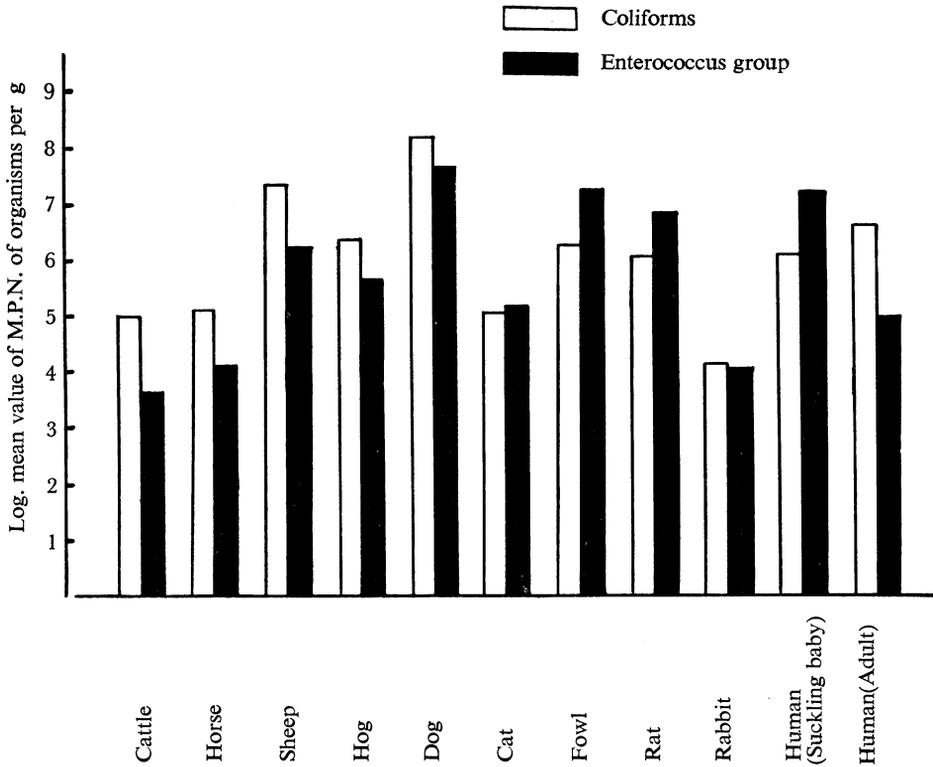
腸球菌群の g 当り菌数の最低はウサギの <12 であり、最高は初生児の 27 億である。その分布は 1 万以下 8 例、1.1 万～10 万が 12 例、11 万～100 万が 11 例、110 万～1,000 万 10 例、1,100 万～1 億 9 例、1.1 億以上 5 例であった。

一方大腸菌群数は最低がネコ及びウサギの <23 であり、最高はネコの 13 億であった。その分布は 1 万以下 5 例、1.1 万～10 万 10 例、11 万～100 万 10 例、110 万～1,000 万 13 例、1,100 万～1 億 11 例、1.1 億以上 6 例であった。両菌群の出現菌数を各例毎に比較すると、Table 22 に示すように大腸菌群数のより多い例と腸球菌群数のより多い例との割合は大略 3:2 となった。

Table 22. Comparison of numbers of enterococcus group bacteria and coliform bacteria in human and various animal feces.

Appearances	No. of samples
Enterococcus group bacteria less than coliform bacteria	31
" " " more " " "	21
Not compared	3

次に人及び各種動物 5 例毎の両菌群の菌数の対数平均値をとり、ヒストグラムにして示したのが Text-fig. 1 である、これについて出現菌数を比較すると、腸球菌群数の平均値はイヌが一番多く、ついでニワトリ、初生児、ネズミ、ヒツジの順であり、ウシが最も少ない。大腸菌群数は同じくイヌが最も多く、ついでヒツジ、成人、ブタ、ニワトリの順であった。また両菌群の出現菌数の比較では、腸球菌群の方が大腸菌群より多いのはニワトリ、ネズミ、初生児であり、大腸菌群が腸球菌群より多いのはウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、イヌ及び成人



Text-fig. 1. Logarithmic mean value of M.P.N. of enterococcus group bacteria and coliform bacteria in human and various animal feces.

Table 23. Number of enterococcus group bacteria per g in bovine feces.

Sample No.	Stall	M.P.N. of enterococcus group bacteria	Sample No.	Stall	M.P.N. of enterococcus group bacteria
1	A	49	16	C	330
2	"	49	17	"	460
3	"	79	18	"	700
4	"	79	19	"	1,100
5	"	110	20	"	1,700
6	"	240	21	"	5,400
7	"	330	22	D	70
8	"	330	23	"	110
9	"	490	24	"	1,700
10	"	17,000	25	"	13,000
11	B	45	26	E	23
12	"	330	27	"	45
13	"	460	28	"	170
14	"	4,900	29	"	240
15	"	54,000	30	F	1,700

であった。ネコ及びウサギでは両菌群の菌数の差が少なく、また前述の如く個体間の差の著しい材料であったため、この成績から両菌群数の差を明らかにすることは困難である。

以上の如く動物の種類別、個体別にみても大腸菌群数は腸球菌群数に比べて多い例が多数を占め、総体的にみても大腸菌群数の方の多いことが認められた。

2. 再びウシの糞便について

温血動物の糞便に大腸菌群が常在することは以前から認められており、菌数の分布に関しても多数の報告²³⁾⁶¹⁾⁶⁴⁾⁶⁶⁾⁶⁷⁾⁸²⁾⁸⁴⁾がなされているので、今回の材料については大腸菌群数の検査は省略した。6牛舎由来のウシ糞便30例についての腸球菌群の検査成績は Table 23 に示される。

本表にみられるように腸球菌群は100%陽性であった。g当りの菌数は23~54,000で他種動物材料の菌数に比べると一般に少なく、100以下8例、110~1,000は13例、1,100~1万6例、1.1万以上3例の成績であって、これらは前項の5例のウシの成績とほぼ似ている。牛舎別にみると、A牛舎10例の菌数は1例を除き大差のない菌数を示した。C及びE牛舎の例もほぼ同様の傾向を示している。しかしB及びD牛舎の例では菌数の分布の巾がA,C,Eに比べて大である。

3. 再び人の糞便について

本材料についても大腸菌群の検査は省略し、腸球菌群のみの検査を行った。腸球菌群は100%陽性であり、出現菌数の順に50例の成績を示すと Table 24 の如くである。

Table 24. Number of enterococcus group bacteria per g in human feces.

Sample No.	M.P.N. of enterococcus group bacteria	Sample No.	M.P.N. of enterococcus group bacteria	Sample No.	M.P.N. of enterococcus group bacteria
1	49	18	70,000	35	2,400,000
2	<230	19	79,000	36	2,400,000
3	230	20	79,000	37	2,400,000
4	2,300	21	130,000	38	2,400,000
5	3,300	22	130,000	39	2,400,000
6	3,300	23	240,000	40	3,300,000
7	4,900	24	240,000	41	3,500,000
8	11,000	25	240,000	42	3,500,000
9	11,000	26	330,000	43	5,400,000
10	<23,000	27	330,000	44	7,900,000
11	24,000	28	330,000	45	24,000,000
12	33,000	29	330,000	46	24,000,000
13	33,000	30	330,000	47	24,000,000
14	33,000	31	330,000	48	24,000,000
15	33,000	32	790,000	49	54,000,000
16	49,000	33	1,300,000	50	54,000,000
17	70,000	34	2,200,000		

菌数は49~54,000,000に分布し、一般にウシの例より多く分布の巾も大であった。しかし第1項の初生児及び成人の成績と比較すると、分布の巾はむしろ本例の方が小さい成績を示した。

III 小 括

人及び各種動物の糞便55例では腸球菌群並びに大腸菌群とも全例陽性であった。これら両菌群の出現菌数の多少を比較すると、大腸菌群数が腸球菌群数より多い例数とその逆の例数との比は凡そ3:2の割となり、大腸菌群数の多い方が多数を占めた。また各5例の平均値においても大腸菌群数の多いのは、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、イヌ及び成人であったの対し、腸球菌群数の多いのはニワトリ、ネズミ、初生児と例数が少ない。なおこれらのうちイヌにおいて腸球菌群数は $10^7 \sim 10^8$ 、大腸菌群数は $10^6 \sim 10^8$ で両菌群数とも最高値を示している。また腸球菌群数の最低を示したのはウシであった。

ウシ糞便30例の腸球菌群の検査結果も全例陽性であり、出現菌数は同一牛舎由来の材料では同程度に出現する傾向がみられた。

人糞便50例の成績も100%腸球菌群が陽性であり、出現菌数はウシに比べてはるかに多く、ほとんどが $10^8 \sim 10^7$ の範囲にあった。

結局動物の個体別、種類別からみても、食品の第1次汚染源たる糞便中において、大腸菌群数は腸球菌群数より多く検出される例が多数で、総体的にみても大腸菌群数の方の多いことが認められ、このことは他の報告者の成績⁽²³⁾⁽²⁷⁾⁽⁶¹⁾⁽⁶⁴⁾⁽⁶⁶⁾とも一致した。更には人及びウシの検査例数を追加して、特に腸球菌群のみを取上げて検討した結果、100%に検出されたのは勿論であるが、その出現菌数はウシではg当り23~54,000であったのに対し、人では49~54,000,000であり、人の糞便中の腸球菌群数は牛糞便のそれよりはるかに大であることを知った。

(V) 畜産食品及び糞便由来腸球菌群の同定分類並びに型別と由来材料との関係

(III)章及び(IV)章において述べた各種検査材料からそれぞれ分離したレンサ球菌について諸種の生物学的性状検査を行った。緒言において述べたように、わが国の報告にみられる腸球菌群の同定及び分類は *Bergey's Manual* に準拠したものがほとんどであるが、著者は *Bergey's Manual* のみによらず、近年提唱され始めた新しい分類の型式をも加味して分離腸球菌群の同定分類を試みた。また更にこのようにして得られた結果に基づいて、検査材料とそれらから出現した腸球菌群の型別との関連性を検討した結果、人糞便由来と動物糞便由来とでは、また非加熱食品由来と加熱食品由来とでは、各出現して来る腸球菌の型が異なること、すなわち検査材料により出現して来る腸球菌群の型に一定の傾向が認められたので、以下その成績結果について述べる。

I 実験材料及び方法

実験供試株は(III)章及び(IV)章で述べた畜産食品及び糞便から分離したものである。すなわち検査材料を推定並びに確認培地に培養して腸球菌群の陽性を確めた後、改めてこの推定培地から血液寒天平板培地に塗抹分離培養を行い、発育した集落を観察して異と思われた集落からそれぞれ釣菌して菌株を得た。著者ら²¹⁾が先に報告した如く推定培地には、腸球菌群以外のレンサ球菌の発育もみられるので、血液寒天から釣菌した株の中にはこれらのレンサ球菌も含まれて来る。そこでこれらの分離株を再び腸球菌群の推定培地と確認培地に培養して十分に発育することを確めた後、それらの株を保存して以後の実験に供した。なお発育の疑わしい株も対照試験のため保存したので、結局合計968株のレンサ球菌が実験に供された。

生物学的性状の検査に当っては既報²¹⁾の如く、カタラーゼ試験、グラム染色、溶血性、リトマス牛乳における発育態度、0.1%メチレン青牛乳、40%ウシ胆汁寒天、6.5%食塩ブイオン及びpH 9.6のブイオンにおける発育試験、10°C及び45°Cにおける発育、60°C 30分における耐熱性、ゼラチン液化能、各種糖類分解能及びLancefieldによるD群の沈降反応試験を行い、更にSKADHAUGE⁸⁰⁾によるPotassium tellurite(0.04%)に対する抵抗性、BARNES⁴⁾によるTTC(0.01%)の還元性試験を行った、ついでこのようにして得られた試験成績から株の同定分類を行い、検査材料とそれらから出現して来た腸球菌群の型との関係を検討考察した。

II 分離レンサ球菌の生物学的性状並びにその同定と分類

供試菌968株のカタラーゼ試験では全株が陰性を示した。グラム染色ではすべてが陽性の球菌で双球状あるいは連鎖状を示した。ウマ及びヒツジ血液寒天平板37°C 48時間培養における溶血態度は、4株がβ型を示したのみで残りの964株はα及びγ型を示した。β型の4株のうち、3株はウマ血液寒天平板上においてのみ(小林III型)、1株はウマ及びヒツジの両血液寒天平板上でともに溶血を示した(小林II型)。しかも後者の株は培養24時間目においてαとβに解離する株であった。すなわち血液寒天平板上で継代培養を行い、発育したα、βの集落からαあるいはβの集落のみをそれぞれ釣菌して継代培養を繰り返し、100代迄分離培養を行ったが、依然としてβ集落からαとβ、α集落からもαとβが解離して出現した。このような現象は今泉ら³⁰⁾が報告した非定型的腸球菌にみられた態度と似ている。

一方岡本(1954)⁶³⁾は核酸を血液寒天培地に加えることにより、溶連菌のStreptolysin-Sの産出を増加せしめることから、溶連菌と非溶連菌との鑑別が可能であると報告している。よって岡本の実験方法に従いリボ核酸(キリンビールKK製)を加えた血液寒天培地及び核酸無添加の血液寒天培地を用意して、乳製品(1957年度分)、粉乳(1958年度分)及び冬季生肉材料由来のレンサ球菌合計336株、更に対照として北大獣医学部家畜衛生学教室清水助教授より分与された溶血性レンサ球菌14株(C群4株、D群1株、E群2株、F群2株、G群1株、その他4株)、東大農学部家畜細菌学教室尾形助教授より分与された溶血性腸球菌3株を加えて、これらにつきα、β溶血性の関係を検討した。その結果対照のβ溶血株では核酸加血液寒天培地上で、核酸無添加の培地におけるよりも溶血環が一層大きくなることが観察されたが、試験株のα型あるいはγ型のものがβ型と判定されるような成績は得られなかった。すなわち腸球菌群のα型ではたとえ培地に核酸を添加してもβ型と判定されるに至るような現象は認められないものと思われる。

リトマス牛乳においては酸産生、還元及び凝固を示したものが823株、凝固性を欠くもの103株、酸産生あるいは還元のみを示したものは42株であった。ゼラチン液化は100株にみられたが、これらの株はすべてリトマス牛乳のカゼインを完全に融解した。

0.1%メチレン青牛乳、40%ウシ胆汁血液寒天、6.5%食塩ブイオン、pH 9.6のブイオン、10°C及び45°C培養における発育態度、また60°C 30分における耐熱性等の成績はTable 25に示すとおりである。以上7種の抵抗性試験のうち、60°C 30分の耐熱性試験及び10°Cにおける発育試験を除いた5種の試験において、一致して陽性を示したものは873株であり、以下これらはすべて腸球菌群として取扱うことにする。他の95株は2種以上の試験において陰性を示したものであり、腸球菌群以外のレンサ球菌と考えられる。腸球菌群と判定した873株中18株は60°C 30分の熱抵抗性試験を欠いていたが、沈降反応その他の諸性状は他の腸球菌群と全く一致した。なお各材料から検出分離された株の腸球菌群あるいはその他のレンサ

Table 25. Biological characteristics of streptococcal strains isolated from milk, meat and their products and feces.

Division	Udder milk		Raw milk		Dairy products (1957)		Powdered milk (1958)		Raw meat (Winter)		Raw meat (Summer)		Meat products		Human and animal feces		Bovine feces (1960)		Human feces (1960)		Total			
	E 6	S 5	E 98	S 4	E 52	S 15	E 155	S 5	E 53	S 56	E 113	S 1	E 28	S 1	E 76	S 2	E 124	S 4	E 168	S 2	E 873	S 95		
B.T.B. Azide	Yellow	{+	6	4	98	4	52	11	155	5	53	54	109	1	28	•	75	2	123	•	168	1	867	82
		{±}	•	1	•	•	•	•	•	•	•	2	4	•	•	1	•	1	4	•	•	•	6	13
Dextrose	Turbidity	{+	6	4	94	4	51	1	154	3	51	37	107	1	28	•	74	2	124	4	168	2	857	58
		{±}	•	1	4	•	1	4	1	2	2	18	6	•	•	1	•	2	•	•	•	•	•	16
Broth	Sediment	{+}	6	5	98	4	52	15	155	5	53	56	113	1	28	1	76	2	124	4	168	2	873	95
		{-}	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•
B.T.B. Azide Dextrose Agar	Yellow, small colony Light yellow, pinpoint colony	{+}	6	4	92	3	52	6	146	•	51	24	109	•	28	1	69	•	113	•	167	1	833	39
		{-}	•	1	6	1	•	9	9	5	2	32	4	1	•	•	7	2	11	4	1	1	40	56
Growth at pH 9.6	{+}	{+}	6	•	98	•	52	10	155	•	53	41	113	1	28	•	76	•	124	•	168	•	873	52
		{-}	•	5	•	4	•	5	•	5	•	15	•	•	•	•	1	•	•	4	•	•	•	43
Growth in 0.1% methylen blue milk	{+}	{+}	6	2	98	1	52	1	155	•	53	10	113	•	28	•	76	•	124	•	168	1	873	15
		{-}	•	3	•	3	•	14	•	5	•	46	•	1	•	1	•	2	•	4	•	1	•	80
Growth on 40% bile blood agar	{+}	{+}	6	3	98	2	52	15	155	5	53	56	113	1	28	1	76	2	124	4	168	2	873	91
		{-}	•	2	•	2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	4
Growth in 6.5% NaCl	{+}	{+}	6	2	98	1	52	9	155	•	53	26	113	1	28	1	76	•	124	•	168	1	873	41
		{-}	•	3	•	3	•	6	•	5	•	30	•	•	•	•	•	2	•	4	•	1	•	54
Survival at 60°C for 30 min.	{+}	{+}	6	2	98	1	52	11	155	5	53	16	110	•	28	1	74	1	114	•	165	1	855	38
		{-}	•	3	•	3	•	4	•	•	40	•	3	1	•	•	2	1	10	4	3	1	18	57
Growth at 45°C	{+}	{+}	6	3	98	4	52	3	155	5	53	9	113	•	28	1	76	1	124	4	168	2	873	32
		{-}	•	2	•	•	•	12	•	•	•	47	•	1	•	•	•	1	•	•	•	•	•	63
Growth at 10°C	{+}	{+}	6	3	98	•	•	•	155	•	53	•	113	1	28	1	76	•	124	•	168	2	821	7
		{-}	•	2	•	4	*	*	•	5	•	*	•	•	•	•	•	2	•	4	•	•	•	17
Liquefaction of gelatin	{+}	{+}	1	•	14	•	3	•	2	•	13	•	33	•	4	•	10	•	•	•	20	•	100	•
		{-}	5	5	84	4	49	15	153	5	40	56	80	1	24	1	66	2	124	4	148	2	773	95
Hemolysis (horse and sheep blood agar)	{β α~γ}	{β}	•	•	•	•	•	•	•	1	•	•	•	•	•	•	1	•	•	•	2	•	4	•
		{α~γ}	6	5	98	4	52	15	155	5	52	56	113	1	28	1	75	2	124	4	166	2	869	95

Notes. E : Enterococcus group. S : Streptococci other than enterococcus group. * : Not examined.

球菌としての区分は Table 25 に示されるが、冬季生肉材料からの株には腸球菌群以外のレンサ球菌が特に多くみられるが、これは腸球菌群の検査にあたり、培地 No. 1 を用いたため他のレンサ球菌の発育を許した結果と考えられる。これらレンサ球菌の各種試験に対する成績を由来材料別にみると、pH 9.6 のブイオンにおける発育は乳製品 (1957年)、生肉 (冬季及び夏季) 由来株の一部を除いてすべてが陰性であり、0.1%メチレン青牛乳発育試験では、乳房採取乳、持込乳、乳製品 (1957年)、生肉 (冬季) 及び人糞便由来株の一部を除きすべてが陰性であった。それに反して40%ウシ胆汁血液寒天培地には乳房採取乳及び持込乳の一部を除きすべてが腸球菌群同様発育した。6.5%食塩ブイオンにおける発育性及び60°C 30分の耐熱性試験では区々の成績を示した。45°Cにおける発育試験では乳製品 (1957年) 及び冬季生肉由来株に陰性例が多かった。要するに40%ウシ胆汁血液寒天培地ではほとんどの株が発育するため、腸球菌群との間に差が余り認められないが、0.1%メチレン青牛乳、次いで45°Cにおける発育には差が比較的認められた。これは既報²¹⁾の成績とほぼ同じような結果である。

ゼラチン液化性の 100株はウシ糞便以外の材料からすべて出現した。β型の腸球菌は生肉 (冬季) から 1株、人及び各種動物の糞便 (ヒツジ) から 1株、人糞便から 2株の計 4株である。なお腸球菌群とその他のレンサ球菌の腸球菌群推定培地及び確認培地における発育態度は表の上欄に示されるように区分された。

腸球菌群の型別については、糖及びアルコール類の分解態度からも試みられている¹⁴⁾²⁴⁾。

Table 26. Fermentations of streptococci isolated.

Division		Udder milk		Raw milk		Dairy products (1957)		Powdered milk (1958)		Raw meat (Winter)		Raw meat (Summer)		Human and animal feces		Total	
		E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S
		6	5	98	4	52	15	155	5	53	56	113	1	76	2	553	88
Glucose	{+}	6	5	98	4	52	9	155	5	53	50	113	1	76	2	553	76
	{-}	6	.	.	.	6	12
Maltose	{+}	6	5	98	4	52	13	155	5	53	47	113	1	76	1	553	76
	{-}	2	.	.	.	9	.	.	.	1	.	12
Lactose	{+}	6	2	96	3	52	7	152	5	50	22	101	1	76	1	533	41
	{-}	.	3	2	1	.	8	3	.	3	34	12	.	.	1	20	47
Salicin	{+}	6	4	97	4	52	11	154	2	53	37	111	1	76	1	549	60
	{-}	.	1	1	.	.	4	1	3	.	19	2	.	.	1	4	28
Rhamnose	{+}	.	.	16	.	.	2	.	.	1	2	14	.	6	.	37	4
	{-}	6	5	82	4	52	13	155	5	52	54	99	1	70	2	516	84
Sucrose	{+}	6	3	76	4	32	7	130	5	49	27	88	1	64	1	445	48
	{-}	.	2	22	.	20	8	25	.	4	29	25	.	12	1	108	40
Glycerol	{+}	4	.	85	.	34	5	114	.	39	1	81	.	52	.	409	6
	{-}	2	5	13	4	18	10	41	5	14	55	32	1	24	2	144	82
Mannitol	{+}	5	2	78	.	27	3	138	.	44	23	80	1	55	.	427	29
	{-}	1	3	20	4	25	12	17	5	9	33	33	.	21	2	126	59
Sorbitol	{+}	4	2	54	.	10	.	8	.	27	17	56	.	21	.	180	19
	{-}	2	3	44	4	42	15	147	5	26	39	57	1	55	2	373	69
Arabinose	{+}	2	2	16	.	34	.	112	.	11	5	12	.	43	.	230	7
	{-}	4	3	82	4	18	15	43	5	42	51	101	1	33	2	323	81
Raffinose	{+}	2	2	18	3	5	4	.	5	6	14	17	1	10	1	58	30
	{-}	4	3	80	1	47	11	155	.	47	42	96	.	66	1	495	58

Notes. E : Enterococcus group.
S : Streptococci other than enterococcus group.

著者も同じ目的をもって各種糖類及びアルコール類に対する試験を行った。1960年度検査分を除く腸球菌群及びその他のレンサ球菌の材料別の成績は Table 26 に示すとおりである。腸球菌群についてみると、すべてが Glucose (鹿印特級) 及び Maltose (鹿印特級) を分解し、Salicin (鹿印特級) では99%以上、Lactose (鹿印特級) では96%以上を分解した。それに反して Rhamnose (武田最純) 及び Raffinose (鹿印特級) では非分解株が多かった。その他の糖類では区々の成績を示した。これらの成績は前報²¹⁾とほとんど同じ傾向にあった。

以上の如く Glucose, Maltose, Lactose, Salicin, Rhamnose 及び Raffinose に対してはほぼ一定した分解態度を示しているのでこれらの糖類を省略し、また Bergey's Manual によれば *Str. durans* の型別のため Mannitol 及び Sorbitol の、BARNES⁴⁾ その他³⁾³¹⁾⁷⁶⁾ によれば *Str. faecium* の型別のため Arabinose の分解の有無が鑑別点となっているので、1960年度に分離した肉製品、人及びウシ糞便由来レンサ球菌327株については特に Mannitol (鹿印特級)、Sorbitol (井筒化学用)、Arabinose (鹿印特級) の3種糖類を中心として、更に必要に応じて Sucrose (Merck) 及び Raffinose に対する分解能を検査した。その成績は Table 27 に示されるが、Table 26 における成績同様区々の成績を示した。なお腸球菌群の型別と糖分解能との関係については改めて後述する。

Table 27. Fermentations of streptococci isolated from meat products and feces (results in 1960).

Division	Meat products		Bovine feces		Human feces		
	E 28	S 1	E 124	S 4	E 168	S 2	
Mannitol	{+	24	1	102	•	138	2
	{-}	4	•	22	4	30	•
Sorbitol	{+	12	•	61	•	50	1
	{-}	16	1	63	4	118	1
Arabinose	{+	12	•	102	3	97	1
	{-}	16	1	22	1	71	1
Raffinose	{+	2		15		11	
	{-}	1		4		9	
Sucrose	{+	5		1		15	
	{-}	3		•		•	

Notes. E: Enterococcus group.

S: Streptococci other than enterococcus group.

Lancefield の沈降反応による分類試験は各材料由来株を糖分解能の成績を基にして型別し、それらの各型から数株づつを取上げ合計 228株について実施した。供試抗体血清は粉乳由来腸球菌株を使用して常法によりウサギを免疫して作製した。試験結果は Table 28 に示されるように、前記各種生物学的性状より腸球菌群と判定した 207株はすべて D 群血清に反応し、その他のレンサ球菌と判定した 21株中 8 株は反応陽性を、13株は陰性を示した。なおこの 8 株は種々の生物学的性状の結果から *Str. bovis* と同定された。

以上は Bergey's Manual の腸球菌群の同定分類形式によった試験成績であるが、近年この分類形式に批判的な報告がみられるに至った。すなわち SKADHAUGE⁸⁰⁾, BARNES⁴⁾ その他の報告である。よって著者もこれらの報告を参考として、以上の腸球菌群の同定分類形式に Potassium tellurite に対する抵抗性試験並びに TTC に対する還元性試験をもつけ加えて腸

Table 28. Results of Lancefield's group D precipitation test.

Division	No. of strains	Group D precipitation test			
		Enterococcus group		Streptococci other than enterococcus group	
		+	-	+	-
Udder milk	3	2	0	0	1
Raw milk	28	27	0	1	0
Dairy products (1957)	67	52	0	3	12
Powdered milk (1958)	38	35	0	3	0
Raw meat (Winter)	16	15	0	1	0
" " (Summer)	26	26	0		
Human and animal feces	50	50	0		
Total	228	207	0	8*	13

* : *Str. bovis*.

球菌群の同定型別を試みることにした。すなわち腸球菌群と判定した873株について Potassium tellurite (鹿印特級) に対する抵抗性, TTC (Merck) に対する還元性について試験した成績は Table 29 に示すとおり, 0.04% の Potassium tellurite に耐えて発育陽性を示したものは合計 204株であったのに対し, 発育陰性あるいは痕跡程度の発育に終わったものは各材料において何れも陽性株より多く, 合計 669株であった。これらの差は粉乳, ウシ糞便において顕著であり, 乳製品, 人及び各種動物糞便, 人糞便 (1960 年度検査分) においても著しい。TTC (0.01%) の還元性も同じ結果を示した。

Table 29. Tolerance to potassium tellurite and reduction of TTC of enterococcus group isolated from milk, meat and their products and feces.

Division	No. of strains	Tolerance to 0.04% potassium tellurite		Reduction of TTC	
		+	-	+	-
Udder milk	6	3	3	3	3
Raw milk	98	52	46	52	46
Dairy products (1957)	52	9	43	9	43
Powdered milk (1958)	155	5	150	5	150
Raw meat (Winter)	53	20	33	20	33
" " (Summer)	113	51	62	51	62
Meat products	28	12	16	12	16
Human and animal feces	76	14	62	14	62
Bovine feces (1960)	124	1	123	1	123
Human feces (1960)	168	37	131	37	131
Total	873	204	669	204	669

以上両者の試験において陽性を示した 204株は *Str. faecalis* 及びその varieties であり, ゼラチン液化の 100株は *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, β 溶血 (小林 III型) の 3株は *Str. faecalis* var. *zymogenes*, 残りの 101株は *Str. faecalis* とすることが妥当と考えられる。一

Table 30. Classification of streptococci isolated from milk, meat and their products and feces.

Division	No. of strains	<i>Str. faecalis</i>	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	<i>Str. faecalis</i> var. <i>zymogenes</i>	<i>Str. faecium</i>	<i>Str. durans</i>	Unidentified enterococci	<i>Str. bovis</i>	Unidentified streptococci
Udder milk	11	2	1		2	1		1	4
Raw milk	102	38	14		16	17	13	3	1
Butter (1957)	41	2	2		17	5		3	12
Powdered milk (1957)	26	4	1		17	3	1		
" " (1958)	160	3	2		111	7	32	5	
Raw meat (Winter)	109	6	13	1	11	3	19	5	51
" " (Summer)	114	18	33		12	23	27		1
Meat products	29	8	4		12	1	3		1
Various animal feces	63	3	4		35	19	1		1
Human feces (1957-'58)	15	1	6		7				1
Human feces (1960)	170	15	20	2	96	9	26		2
Bovine feces (")	128	1			102	5	16	4	
Total	968	101	100	3	438	93	138	21	74

Table 31. Relationship between classification and fermentation of strains of enterococcus group isolated from milk, meat and their products and feces.

Division	<i>Str. faecalis</i>				<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>		<i>Str. faecalis</i> var. <i>zymogenes</i>	<i>Str. durans</i>				<i>Str. faecium</i>				Unidentified enterococci				Total						
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-		
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-		
Sucrose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	-	+	+	+	+/-	
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+/-	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+/-	
Sorbitol	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+/-	
Arabinose	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-		
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+	-	-	+/-	
Udder milk	2				1			1				1 1								6						
Raw milk	31		5 2		14			5		2 10		12		2		2		6		3		1		3		98
Dairy products	2		4		3			2		1 5		10		6		10 7 1		1				52				
Powdered milk	3				1 1			1		6		71		30		3 7		28				4	155			
Raw meat(Winter)	6				13		1*	2		1		3		4 1		3		9		2 1 1		3 3		53		
// // (Summer)	16		2		33			1		10 9 3		8		2		2		11		2 1 1		12		113		
Human and animal feces	3 1				9 1			1*		12 3 3		26		9 6		1		1				76				
Meat products	5		3		4			1				11				1				1		2		28		
Bovine feces	1							5				40		60		2		1				15		124		
Human feces	14		1		20		2*	9				73		13		10		15				11		168		
Total	101				100		3	93				438				138				873						

* β hemolysis.

方面試験において陰性を示した 669 株には *Str. durans* 及び *Str. faecium* が含まれる。BARNES⁴⁾, その他³⁾¹⁾⁷⁶⁾によれば *Str. faecium* は Potassium tellurite 及び TTC の両試験で陰性を示すと同時に Arabinose を分解することが重要な鑑別点として挙げられている。よって Potassium tellurite 及び TTC の両試験で陰性を示した 669 株中 Arabinose 分解株を *Str. faecium* とした。 *Str. durans* は Bergey's Manual によれば β 溶血を有し, Mannitol 及び Sorbitol 非分解が鑑別点とされているが, 更に Raffinose も一般に非分解とされている。 β 溶血に関しては異論が多く, SHATTOCK,⁷⁶⁾ SEELEMANN⁷⁴⁾ によれば溶血性を欠くものもあるといわれる。これらの報告に従い Potassium tellurite 及び TTC の両試験で陰性を示し, Mannitol, Sorbitol, Arabinose 及び Raffinose 非分解株を *Str. durans* とした。この中には α と β に分離した 1 株 (小林 II 型) も含まれる。また糖類分解能の成績から, *Str. faecium* にも *Str. durans* にも属しない残りの株は Unidentified enterococci とした。

以上の型別によって可検菌 968 株を分類した結果は Table 30 に示されるように, 腸球菌群は *Str. faecalis* 101 株, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 100 株, *Str. faecalis* var. *zymogenes* 3 株, *Str. durans* 93 株, *Str. faecium* 438 株, Unidentified enterococci 138 株の計 873 株, 腸球菌群以外のレンサ球菌は *Str. bovis* 21 株, 同定不能の不明レンサ球菌 74 株の計 95 株となり, 腸球菌群では *Str. faecium* が圧倒的に多く, ついで Unidentified enterococci であり, *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 及び *Str. durans* はほぼ同じく, β 溶血性を示す *Str. faecalis* var. *zymogenes* は極めて少なかった。

なお型別した腸球菌群の糖類分解能の成績を改めて検討すると, Table 31 に示されるように供試 873 株はすべて Glucose, Maltose を分解し, 大部分の株は Lactose, Salicin を分解した。 Potassium tellurite 及び TTC の両試験で陽性を示す *Str. faecalis* 及びその varieties の *liquefaciens* と *zymogenes* の 3 型のいずれかに属する 204 株はすべて Glycerol, Mannitol を分解し, Raffinose は非分解であった。なお Sorbitol に対しては 2 株のみ陰性, Sucrose に対しては 16 株が陰性であり, Arabinose に対しては 4 株が陽性を示した。以上のように *Str. faecalis* 及びその varieties の糖分解能の態度はほぼ一定しているのに比べて, *Str. durans* の 93 株では, Mannitol, Sorbitol, Arabinose 及び Raffinose に対して陰性であった他は Sucrose, Glycerol では区々の成績を示した。また *Str. faecium* の 438 株では Glucose, Maltose, Lactose, Salicin の他 Arabinose の 5 種糖類に対しすべて陽性を示したが, その他の糖類に対しては一定の傾向が見出されず区々の成績を示した。

III 各種検査材料における腸球菌群の型別による検出状況

1. 畜産食品において

食品類は種類, 成分が多様多様の上更に季節, 保存方法等環境による影響も受け易い。また畜産食品は生鮮品と加熱加工品とに大別されるから, このような性状の差により検出される腸球菌群の型に差が認められるかどうかを, 前項の同定分類成績に基づいて検討した。

TTC 及び Potassium tellurite の両試験に陽性を示した *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 及び *Str. faecalis* var. *zymogenes* の 3 種は *faecalis* 系として, また *Str. durans* 及び Unidentified enterococci はその他として一括し, 結局 *faecalis* 系, *Str. faecium*, その他の 3 群に分け, もってこれら群の単独, 2 群混合 及び 3 群混合の際の出現状況を材料別に検討した。その成績は Table 32 に示される。なお *faecalis* 系とした *Str. faecalis* 及び *Str. faecalis* var. *liquefaciens* それぞれ単独の出現状況を参考のため特に下欄に示した。

Table 32. Distribution of species of enterococcus group isolated in milk, meat and their products.

Division	Udder milk	Raw milk	Raw meat (Winter)	Raw meat (Summer)	Butter (1957)	Powdered milk (1957)	Powdered milk (1958)	Meat products
No. of samples inspected	200	50	60	40	44	37	81	39
No. of enterococcus group positive samples	6	50	37	40	19	22	81	9
Faecalis group	3	20	9	9	2	4	•	2
" " + Others	•	12	8	17	•	•	•	1
" " + <i>Str. faecium</i>	•	5 (38%)	3 (20%)	3 (35%)	2	1	4	2
" " + " " + Others	•	1	•	6	•	•	1	1
<i>Str. faecium</i>	2	4	5	1	10 (73.6%)	13 (68.1%)	47 (88.8%)	2
" " + Others	•	1	1	•	2	1	20	•
Others	1	7	11	4	3	3	9	1
<i>Str. faecalis</i>	2	14	4	3	1	4	•	2
<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	1	6	5	5	1	•	•	•

Notes. Faecalis group : *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* and *Str. faecalis* var. *zymogenes*.
 Others : *Str. durans* and unidentified enterococci.

Str. faecalis var. *zymogenes* は冬季生肉材料 1 例からのみ、他型と混合の状態では検出されなかったのにすぎなかったため省略した。

生材料である乳房直接採取乳は陽性例数も少ないため比較出来ないが、プラント持込乳において *faecalis* 系と *Str. faecium* の検出状況を比較すると、*faecalis* 系は単独、混合をあわせて検査材料の 76% (38/50) から検出されているのに対し、*Str. faecium* は同じく合計 22% (11/50) のみであり、前者の検出率が大きい。生肉 (冬季及び夏季) においても *faecalis* 系の検出率はそれぞれ 54% (29/37), 87.5% (35/40) であり、*Str. faecium* の 24.3% (9/37), 25% (10/40) に比べて高い成績を示した。

一方製造工程中に加熱されるバター及び粉乳 (1957 年度検査分) においては逆に *Str. faecium* が多く、それぞれ 73.6% (14/19), 68.1% (15/22) であり、*faecalis* 系の 21% (4/19), 22.7% (5/22) に比べて高い成績であった。また 1958 年度検査分の粉乳も同様 *Str. faecium* が 88.8% (7/8) を示し、*faecalis* 系の検出率に比して圧倒的に高かった。肉製品では各々の陽性例数が少ないため、乳製品におけるような比較は出来なかった。

2. 糞便において

人及び各種動物の糞便材料についても前項同様の検討を行った。各群の検出状況は Table 33 に示すとおりである。

Table 33. Distribution of species of enterococcus group isolated in human and various animal feces.

Division	Various animal feces	Human feces		Bovine feces
		1957~'58	1960	
No. of samples inspected	45	10	50	30
No. of enterococcus group positive samples	45	10	50	30
Faecalis group	4	6	1	•
" " + Others	1	• 7 (70%)	1 30 (60%)	•
" " + <i>Str. faecium</i>	2	1	12	1
" " + " " + Others	•	•	16	•
<i>Str. faecium</i>	24 (60%)	3 4 (40%)	15 47 (94%)	16 29 (96.6%)
" " + Others	1	•	4	12
Others	13	•	1	1
<i>Str. faecalis</i>	2	•	•	•
<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	2	6	•	•

Notes. Faecalis group : *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* and *Str. faecalis* var. *zymogenes*.
Others : *Str. durans* and unidentified enterococci.

各種動物の糞便材料においては *faecalis* 系よりも *Str. faecium* の検出率が高く、60% (27/45) に出現した。1957 年度検査分の人糞便材料では例数は少ないが、*faecalis* 系が多かった。1960 年度検査分の人糞便材料では、*faecalis* 系の 60% (30/50) に対し *Str. faecium* は更に多く 94% (47/50) を示した。ウシ糞便材料では *faecalis* 系の出現がわずか 1 例のみに対し、

Str. faecium は 96.6% (29/30) の割合に検出された。

以上の成績を要約すると、生食品類からは *faecalis* 系の、加熱食品類では *Str. faecium* の検出率が高い。糞便においては各種動物、特にウシでは *Str. faecium* の検出率が高いのに対し、人では *faecalis* 系と *Str. faecium* が同程度に検出される傾向にある。

IV 粉乳由来腸球菌群の型と工場製品別による検出状況

1958年度検査分の粉乳は、北海道内5カ所の各乳製品工場より10月1日から月末迄の1月の期間中に、それぞれ8~20日間ほぼ連日採取送付されて来たものである (Table 11 参照)。よって連日どのような状態で腸球菌群が検出され、しかも各工場別により検出される腸球菌群の菌型に特徴があるか否かを検討した。連日の検出状況は Table 11 に示されたように、腸球菌群は何れの工場を問わず全製品から検出され、その菌数も大部分が500以下の成績である。

次に検査材料から分離されたレンサ球菌160株について同定型別を行った成績は Table 34 に示されるように、*Str. faecalis* 3株、*Str. faecalis* var. *liquefaciens* 2株、*Str. durans* 7株、*Str. faecium* 111株、Unidentified enterococci 32株、*Str. bovis* 5株であった。各工場製品別に菌型の検出状況をみると、*Str. faecalis* 及び *Str. faecalis* var. *liquefaciens* は B 及び C 工場製品のものに、*Str. durans* は E 工場製品のものに検出された。以上に対して *Str. faecium* は5工場の製品すべてにみられ、88.8% (7/81) の陽性率であり、B,C,D 工場ではそれぞれ100%を示した。Unidentified enterococci も全工場製品から検出されたが、特に A 工場製品に多かった。*Str. bovis* は3工場の製品から検出されている。

なお各工場製品とも *Str. faecium* が多数検出されているが、この *Str. faecium* が更に各種糖類分解能により型別されることは既に述べた (Table 31 参照)。それで同じ *Str. faecium* が検出された各工場製品でも *Str. faecium* を更に型別したとき、工場別に差があるかどうかとの考えのもとに、糖分解能による型別と各工場製品との関係を調べた。その成績は Table 35 に示される。すなわち *Str. faecium* その他腸球菌群は14型、*Str. bovis* は2型に分けられたが、A 工場では第5、第7及び第12型の3型に、B 工場は第5型、C 工場は第6型、D 工場は第5及び第6型、E 工場は第3型というように、工場により特異的な型の株が検出されている。また出現株数の最も多かった型は、*Str. faecium* の第5型であり、特に A,B,D 工場製品に多かったが、5工場製品のすべてから検出されているので粉乳製品においては最も普遍的にみられる型であるかも知れない。

V 小 括

畜産食品及び糞便材料から分離したレンサ球菌968株について同定分類した結果、腸球菌群は873株でその内訳は、*Str. faecalis* 101株、*Str. faecalis* var. *liquefaciens* 100株、*Str. faecalis* var. *zymogenes* 3株、*Str. durans* 93株、*Str. faecium* 438株及び Unidentified enterococci 138株であった。腸球菌群以外のレンサ球菌は95株でその内訳は、*Str. bovis* 21株、不明レンサ球菌74株である。以上の分類成績をみると *Str. faecium* が最も多く検出されているが、本型菌について型別した報告は未だ我国においてはみられない。

次に腸球菌群を *faecalis* 系 (*Str. faecalis* 及びその varieties)、*Str. faecium* 及びその他 (*Str. durans* と Unidentified enterococci) の3群に大別してこれらの群が検査材料から検出される状態を検討した。その結果畜産食品において、生乳、生肉では *faecalis* 系が *Str.*

Table 34. Distribution of species of streptococci in powdered milk differentiated with each dairy plant.

Dairy plant	No. of		<i>Str. faecalis</i>		<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>		<i>Str. durans</i>		<i>Str. faecium</i>		Unidentified enterococci		<i>Str. bovis</i>	
	samples inspected	strains isolated	Samples	Strains	Samples	Strains	Samples	Strains	Samples	Strains	Samples	Strains	Samples	Strains
A	24	52	•	•	•	•	•	•	19	24	19	26	1	2
B	12	34	2	2	2	2	•	•	12	29	1	1	•	•
C	17	31	1	1	•	•	•	•	17	27	1	1	2	2
D	20	29	•	•	•	•	•	•	20	27	1	1	1	1
E	8	14	•	•	•	•	6	7	4	4	3	3	•	•
Total	81	160	3	3	2	2	6	7	72	111	25	32	4	5

Notes. Samples : No. of samples detected.

Strains : No. of strains isolated.

Table 35. Relationship between milk powder of different dairy plants and subtyping by fermentation of streptococci isolated from milk powder.

Subtype No. Division	<i>Str. faecalis</i> , <i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>		<i>Str. durans</i>		<i>Str. faecium</i>						Unidentified enterococci			<i>Str. bovis</i>		Total	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		16
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sucrose	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	
Glycerol	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
Mannitol	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	
Sorbitol	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Arabinose	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
Dairy plant A	•	•	•	•	14	•	10	•	•	•	•	26	•	•	2	•	52
// B	3	1	•	•	25	•	•	4	•	•	•	1	•	•	•	•	34
// C	1	•	•	•	1	20	•	•	3	3	•	•	•	1	1	1	31
// D	•	•	•	•	17	6	2	2	•	•	•	1	•	•	•	1	29
// E	•	•	6	1	2	1	•	•	•	•	1	•	3	•	•	•	14
Total	4	1	6	1	59	27	12	6	3	3	1	28	3	1	3	2	160

橋本：畜産食品の腸球菌群

faecium より多く、製造工程中に加熱される乳製品では逆に *Str. faecium* が *faecalis* 系より多い成績を得、特に粉乳 (1958年度検査分) においてこのことが顕著であった。但し製造工程中においてやはり加熱される肉製品では乳製品におけるような成績が得られなかった。

糞便材料において人では *faecalis* 系と *Str. faecium* の両方が高率に検出された。しかるに動物では *Str. faecium* の検出率が高く、特に牛では 97% の高率であった。以上から検査材料の種類により検出される腸球菌群の型に違いがあり、しかも一定した出現傾向があることを知った。

更に北海道内 5 カ所の乳製品工場から毎日連続的に得られた粉乳由来レンサ球菌 160 株について同定型別を行い、特にその検出状況を各工場別に観察した結果、*Str. faecium* が多く、しかも本型菌は検出率に差は認められたが、各工場製品から普遍的に検出された。また糖類分解能により、*Str. faecium* その他を 16 型に分け、前同様これらと各工場製品との関係を検討した処、例えば同じ *Str. faecium* の検出された工場製品でも、工場によりある特定の菌型が特異的にしかも毎日連続して出現していることを知った。

(VI) 腸球菌群の熱抵抗性試験

前章において述べたように、全く加熱しない検査材料たる生乳、生肉では *faecalis* 系が、これに対して加熱材料たる乳製品では *Str. faecium* が優勢に出現する傾向が認められたことから、このような菌型による出現傾向の差は、それぞれの菌型株の耐熱性の差によるものではなからうかと推定するに至った。そこで *Str. faecium* と *faecalis* 系の *Str. faecalis* 及び *Str. faecalis var. liquefaciens* の 3 菌型株を選び、種々の条件下における熱抵抗性試験を行った。

I 実験供試株及び浮遊液

実験供試株として加熱の影響を受けていない生乳 (プラント持込乳) 及び生肉 (夏季) から分離した *Str. faecalis* (以下 *faecalis* という)、*Str. faecalis var. liquefaciens* (以下 *liquefaciens* という) 及び *Str. faecium* (以下 *faecium* という) をそれぞれ各 5 株合計 30 株を選出した。

耐熱性試験用の浮遊液基質として脱脂乳及び Sφrensen の磷酸緩衝液 (pH7.0) の 2 種を用い、それぞれ 10ml づつ中試験管に分注して滅菌したものを用意した。

II 実験方法及び判定

感作温度は 63°C 及び 75°C の 2 種とし、恒温水槽を使用して温度誤差は $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以内に調節した。

作用時間は 63°C で 30 分及び 60 分、75°C では 15 分及び 30 分である。すなわちこれらは牛乳の低温殺菌法と同様のまたはそれ以上の加熱試験である。

浮遊液内における菌数は ml 当り 100 万台及び 1 万台になるように調製した。すなわちブイヨン 37°C 20 時間培養菌を 4°C の氷室に納めて一旦冷却した後取出し、所定の菌数となるよう緩衝液で適宜稀釈してから接種調製した。他方調製と同時に同じ稀釈菌液から平板培養法による生菌数の計算を行い確実を期した。

所定の菌数を接種した中試験管をそれぞれの温度に一定時間作用させた後直ちに流水で冷却して生残の判定に供した。各供試菌株の生残判定は、脱脂乳浮遊液では 37°C の孵卵器内に納置して増菌培養を行い、培地の凝固及び血液寒天平板培地に培養することにより、緩衝

液の方はブイヨンによる増菌培養及び血液寒天平板培地に培養することにより確認した。これら増菌及び血液寒天培地への培養は5日目まで反復試験を行って生残を観察した。

III 実験成績

熱抵抗性試験は温度、時間、浮遊液基質及び菌数4種の組合せにより、1供試株当り16通りの試験が行われた。生乳由来株についての実験成績はTable 36に示されるとおりである。浮遊液菌数は *liquefaciens* が100万台で ml 当り 329~400万、1万台はその $\frac{1}{100}$ の 3.29~4.00万であった。*faecalis* は同じく 176~370万及び 1.76~3.70万、*faecium* は 325~370万及び 3.25~3.70万であり、全体として 176~400万及び 1.76~4.00万の間に分布していた。これらの菌数は検定の結果同一母集団に属することが認められた ($P < 0.01$)。

熱抵抗性試験の結果、菌数100万台において 63°C 30分加熱では全供試株が浮遊液基質たる脱脂乳及び緩衝液の如何を問わず生残した。また 63°C 60分においても全供試株が生残した。しかし両種浮遊液すべてに生残出来たのは *faecium* のみで、*liquefaciens* 及び *faecalis* では何れか一方の浮遊液にのみ生残した例もみられた。75°C 15分では何れか一方の浮遊液でのみ、*liquefaciens* は2株、*faecalis* は3株より生残出来なかったのに対し、*faecium* は5株すべてが生残した。75°C 30分では何れの菌型においても生残した株は1例もみられなかった。

菌数1万台のものにおいて 63°C 30分では *liquefaciens* は1株のみ生残したのに対し、*faecalis* 及び *faecium* は全株生残した。60分の加熱では *liquefaciens* 株の生残はなく、*faecalis* は1株のみであったのに対し、*faecium* は全株生残した。75°C 15分では *liquefaciens* 及び *faecium* がそれぞれ1株ずつ生残した。しかし *liquefaciens* の生残例は以上の実験結果からみて実験誤差とも考えられる。75°C 30分では全株死滅していた。

熱抵抗性試験の結果は以上の如く、浮遊液菌数100万台では 75°C 15分、1万台では 63°C 30分及び60分の成績にみられるように、明らかに菌型による熱抵抗性に差が認められた。すなわち *liquefaciens* の熱抵抗性が最も弱く、*faecium* が最も強く、*faecalis* はその中間に位置することを実験的にも立証することが出来た。

生肉由来株について行った熱抵抗性試験の成績はTable 37に示すとおりである。供試15株の浮遊液菌数は100万台では 181~355万、1万台では 1.81~3.55万であって前記生乳由来株についての実験例における菌数と大体一致した。試験結果は菌数100万台のものは 63°C 30分の加熱では全株生残し、60分においても *liquefaciens* 及び *faecalis* が1株ずつ死滅したのみであった。75°C 15分では *liquefaciens* 及び *faecalis* が2株ずつ、*faecium* は4株が生残した。30分では *faecium* の2株のみが生残を示した。

菌数1万台において 63°C 30分加熱では *liquefaciens* 及び *faecalis* が1株ずつ、*faecium* は3株が生残したのみであった。75°C 15分及び30分では全株死滅した。

生肉由来株では以上の如く浮遊液菌数100万台においては *liquefaciens* と *faecalis* の間に差が認められなかった。しかしこの2者と *faecium* との間には 75°C 15分及び30分加熱の成績にみられるように差が生じた。一方菌数1万台において 63°C 30分加熱では *liquefaciens* と *faecalis* との間はかなり明らかな差が認められ、更に60分加熱の成績では *faecalis* と *faecium* との間に差を生じた。結局生肉由来株の熱抵抗性試験でも生乳由来株におけると同様3菌型の間に明らかに差が認められ、*liquefaciens* の熱抵抗性が最も弱く、*faecium* が最も強い結果を示した。

Table 36. Thermoresistance tests of *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* and *Str. faecium* isolated from raw milk.

Type	Strain No.	Level of million (No. of bacteria/ml)	63°C		75°C		Level of 10 thousand (No. of bacteria/ml)	63°C		75°C	
			30'	60'	15'	30'		30'	60'	15'	30'
<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	1	3.29 million	++	++	+°	-	32.9 thousand	-	-	-	-
	2	3.34	++	+°	-	-	33.4	-	-	-	-
	3	3.37	++	+°	+	-	33.7	-	-	+	-
	4	3.71	++	+°	-	-	37.1	+	-	-	-
	5	4.00	++	++	-	-	40.0	-	-	-	-
<i>Str. faecalis</i>	11	1.76	++	++	-	-	17.6	+	-	-	-
	12	2.04	++	++	+	-	20.4	+	+°	-	-
	13	2.57	++	+	+°	-	25.7	+	-	-	-
	14	2.87	++	+°	-	-	28.7	+	-	-	-
	15	3.70	++	++	+°	-	37.0	+	-	-	-
<i>Str. faecium</i>	21	3.25	++	++	+°	-	32.5	++	+	-	-
	22	3.26	++	++	+	-	32.6	++	+	-	-
	23	3.34	++	++	+	-	33.4	++	+	-	-
	24	3.55	++	++	+	-	35.5	+	+	-	-
	25	3.70	++	++	+	-	37.0	+	+	+	-

Notes. Used suspension : Sørensen's phosphate buffer solution (pH 7.0) and skim milk.

++ : Survive in both buffer solution and skim milk.

+ : Survive in skim milk only.

+° : Survive in buffer solution only.

Table 37. Thermoresistance tests of *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* and *Str. faecium* isolated from raw meat.

Type	Strain No.	Level of million (No. of bacteria/ml)	63°C		75°C		Level of 10 thousand (No. of bacteria/ml)	63°C		75°C	
			30'	60'	15'	30'		30'	60'	15'	30'
<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	6	1. 81 million	++	+	-	-	18. 1 thousand	-	-	-	-
	7	2. 86	++	+	-	-	28. 6	-	-	-	-
	8	3. 22	+	+	-	-	32. 2	+	+	-	-
	9	3. 50	++	++	+	-	35. 0	-	-	-	-
	10	3. 55	+	-	+	-	35. 5	-	-	-	-
<i>Str. faecalis</i>	16	2. 23	+	++	-	-	22. 3	-	-	-	-
	17	2. 45	++	+	-	-	24. 5	++	-	-	-
	18	3. 00	+	+	+	-	30. 0	+	-	-	-
	19	3. 09	++	-	+	-	30. 9	++	-	-	-
	20	3. 43	++	+	-	-	34. 3	++	+	-	-
<i>Str. faecium</i>	26	2. 31	+	+	+	-	23. 1	+	-	-	-
	27	2. 81	++	+	++	-	28. 1	-	-	-	-
	28	3. 10	++	++	+	+	31. 0	+	+	-	-
	29	3. 15	++	+	+	++	31. 5	+	+	-	-
	30	3. 30	++	++	-	-	33. 0	++	+	-	-

Note. Signs employed in this table are those in table 36.

IV 小 括

生乳及び生肉からそれぞれ分離した *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 及び *Str. faecium* 各5株計30株を供試菌として感作温度, 時間, 浮遊液基質及び菌数を組合せて種々の条件下にてこれら菌株の熱抵抗性試験を行った. その結果生乳あるいは生肉由来を問わず *Str. faecalis* var. *liquefaciens* の熱抵抗性が最も弱く, *Str. faecium* が最も強く, *Str. faecalis* がこの中間に位する成績を得た. また基質中に含まれる菌数の多少により, 加熱による菌の死滅態度は異なり, 含有菌数の少ないもの程死滅し易い結果を得た.

(VII) 保存による腸球菌群の生残試験

糞便及び食品中に含まれる腸球菌群並びに大腸菌群は時日の経過とともにその菌数はどのように変化し, またどちらが長く生残するかを追及するため, 糞便及び乳製品の自然含有例について, また実験的に両者の菌を接種した滅菌脱脂乳の材料について, これらを種々の条件下に保存して両菌群の生残試験を行った.

I 実験材料及び方法

糞便材料は(IV)に述べた人及び各種動物の菌検索を終了した生理食塩水による10倍稀釈液46例である. これらを室温(年間を通じて約5~25°C)に放置して3カ月毎に腸球菌群並びに大腸菌群の生残の有無を追及した. これらの検査材料は綿栓した中試験管内に保存され, 蒸発乾固を防ぐため時々滅菌蒸留水が注入された. 両菌群に対する生残の確認は腸球菌群は既述の推定培地 No. 1, 2 及び確認培地により, 大腸菌群は B.G.L.B. 醗酵管及び E.M.B. 培地により確認試験まで行って判定した.

乳製品のうちバターは Table 10 に示されたもののうち生菌数が g 当り 5 万以上のもの 7 例, 2.8 万のもの 1 例である. これらを 4°C の冷蔵庫に保存しながら 2 カ月毎に取出して糞便材料同様に両菌群の変化を観察した. 脱脂粉乳は既報¹⁷⁾で述べた昭和 30 年度検査分の材料 8 例である. ポリエチレン袋入りの検体を室温に保存しながら 3 カ月毎に腸球菌群の変化を追及した.

次に食品中における腸球菌群並びに大腸菌群は保存温度を異にしたとき, 時日の経過とともにどのような消長を示すかをみるため, 上述の自然例に対して実験的に両者の菌を滅菌脱脂乳へ接種して観察を行った. まず *Str. faecium* 及び *E. coli* の各 1 株をそれぞれブイヨンに 37°C 18 時間培養後, 単独あるいは混合して滅菌脱脂乳に加え, 22°C で 16 時間増殖させた後, これらを 4°C, 室温及び 37°C の 3 群に分けて保存しながら 1 月毎に両者の菌の消長を調べた. 単独接種例は各温度 2 例ずつ計 12 例, 混合接種例は各温度 1 例ずつ計 3 例, 合計 15 例である.

II 実験成績

1. 糞便における成績

実験開始時における腸球菌群数並びに大腸菌群数は Table 20 に示されたとおり, 腸球菌群数は g 当り <12~2, 700, 000, 000, 大腸菌群数は <23~1, 300, 000, 000 の範囲にあった. 実験開始時において大腸菌群数が腸球菌群数より多かったもの 29 例についての成績が Table 38 に示される. 本表において保存 3 カ月第 1 回目の試験で何れかの菌群が既に死滅しているものは No. 23, 30, 48 及び 55 の 4 例, 第 2 回 6 カ月目で両者の菌群とも死滅したものは No. 4, 5, 19 の 3 例, 39 カ月目でなお生残して試験続行中 (→印) のものは 11 例である.

Table 38. Longevity of enterococcus group and coliforms in human and various animal feces preserved in room temperature (5~25°C)
(Twenty nine samples which the number of coliform bacteria was greater than the one of enterococcus group bacteria at the beginning of examination).

Sample No.	Origin of feces	Months elapsed															
		Beginning	3	6	9	12	15	18	21	24	37	30	33	36	39		
2	Cattle	⊗	⊗	⊗	—												
3	"	⊗	⊗	⊗	—												
4	"	⊗	⊗	—													
5	"	⊗	⊗	—													
7	Horse	⊗	⊗	⊗	△	—											
9	"	⊗	⊗	△	△	—											
10	"	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	○	○	○	—							
13	Sheep	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	△	△	△	△	△	△	—				
14	"	⊗	⊗	△	△	—											
15	"	⊗	⊗	△	△	—											
17	Hog	⊗	⊗	△	—												
18	"	⊗	⊗	△	—												
19	"	⊗	⊗	—													
20	"	⊗	⊗	○	—												
21	Dog	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	△	△	△	—							
22	"	⊗	⊗	⊗	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	→	
23	"	⊗	△	△	△	—											
24	"	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	→						
29	Cat	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	△	△	△	→						
30	"	⊗	○	○	○	○	○	○	○	○	→						
39	Rat	⊗	⊗	△	△	△	—										
41	Rabbit	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	→					
44	"	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	△	△	△	→						
48	Human (Suckling baby)	⊗	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	→	
50	" (" ")	⊗	⊗	⊗	○	○	—										
51	" (Adult)	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	→		
53	" (")	⊗	⊗	⊗	⊗	△	△	△	△	△	△	△	△	△	→		
54	" (")	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	→		
55	" (")	⊗	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	→		

Notes. ⊗ : Both enterococcus group and coliforms survive.

△ : Only enterococcus group survives.

○ : Only coliforms survives.

— : Both enterococcus group and coliforms are negative.

→ : Survival test is continued.

腸球菌群並びに大腸菌群の両者が同時に死滅しているものは No. 2, 3, 4, 5 及び 19 の 5 例、両菌群ともなお生残して試験続行中は No. 24, 41, 51 及び 54 の 4 例である。既に死滅あるいはなお生残して試験続行中の何れにせよ、腸球菌群が大腸菌群より長く生残している例は No. 7, 9, 13, ……等の 15 例、これに反して大腸菌群の方が長く生残している例は No. 10, 20, 30, 50 及び 55 のわずか 5 例に過ぎない。本表における材料はすべて保存開始時において大腸

菌群数の方が腸球菌群数より多い材料であったにも拘らず、保存による生残試験の結果は以上の如く、腸球菌群の方が長く生残する例が多い結果となった。

次に保存開始時において腸球菌群数の方が大腸菌群数より多かった17例についての成績は Table 39 に示すとおりである。保存3カ月目第1回検査時において、No. 27, 28 は既に両菌群とも死滅していた。39カ月目でなお生残して試験続行中は No. 25, 46 及び49の3例である。本表において腸球菌群が大腸菌群より長く生残しているのは14例であり、これに反して大腸菌群の方が長く生残しているのは、No. 43 のわずか1例であった。

Table 39. Longevity of enterococcus group and coliforms in human and various animal feces preserved in room temperature (5~25°C)
(Seventeen samples which the number of enterococcus group bacteria was greater than the one of coliform bacteria at the beginning of examination).

Sample No.	Origin of feces	Months elapsed													
		Beginning	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39
8	Horse	⊕	⊕	△	△	—									
25	Dog	⊕	⊕	⊕	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	→
26	Cat	⊕	△	△	△	△	—								
27	"	⊕	—												
28	"	⊕	—												
33	Fowl	⊕	⊕	⊕	△	—									
34	"	⊕	⊕	△	△	△	△	△	—						
35	"	⊕	⊕	△	△	△	△	△	△	△	—				
36	Rat	⊕	⊕	△	△	—									
37	"	⊕	⊕	△	△	△	△	—							
38	"	⊕	⊕	△	△	△	△	△	△	—					
40	"	⊕	⊕	⊕	△	△	△	△	△	△	△	—			
43	Rabbit	⊕	⊕	⊕	○	○	—								
46	Human (Suckling baby)	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	△	△	△	△	△	△	△	→
47	" (" ")	⊕	⊕	⊕	⊕	△	△	△	—						
49	" (" ")	⊕	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	→
52	" (Adult)	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	△	—				

Note. Signs employed in this table are those in table 38.

以上の如く本表における検査材料は実験開始時、すでに腸球菌群数の方が大腸菌群数より多く存在していた材料であったためか、前表の材料に比べて更に腸球菌群の方が大腸菌群より長く生残した例が多数を占めた。

2. バター及び脱脂粉乳における成績

4°Cの冷蔵庫に保存しながら2カ月毎に取出して検査したバターについての成績は Table 40 に示すとおりである。大腸菌群は陽性材料の5例中、No. 28 では製造後4カ月以内、No. 31, 36 では7カ月以内に消失し、No. 32, 35 は前3例よりも含有菌数が多いためか7カ月目でなお生残していた。腸球菌群の減少も大体含有菌数に比例し、菌数の少ない No. 33 では4カ月以内、No. 29 は5カ月以内、No. 26, 28 は6カ月以内で消失し、比較的菌数の多かった No. 31, 32, 35 及び36では7カ月目でなお生残を示した。すなわち No. 28, 36 の如く大腸菌群数の方が長い材料にあっても腸球菌群の方が長く生残することが観察された。

Table 40. Longevity of enterococcus group and coliforms in butter preserved at 4°C.

Sample No.	Months elapsed since manufacture at the first examination	Results every 2 months			
		1	2	3	4
28	0	(1.1×10^2 * 3.0×10^2)	+	+	-
31	1	(4.0×10^2 * 3.0×10^2)	+	+	+
36	1?	(5.5×10^2 * 1.0×10^2)	+	+	-
32	1	(1.7×10^3 * 9.0×10^3)	+	+	+
35	1?	(6.5×10^2 * 9.3×10^3)	+	+	+
29	1	1.0×10^3	+	-	-
26	2	2.3×10^3	+	-	-
33	2?	2.3×10^3	-	-	-

Notes. ? : Presumptive months elapsed.

* : Coliforms.

+ : Survival.

- : Death.

粉乳に含まれる生菌数が保存の経過に伴って減少する事実は既に報告¹⁹⁾²⁰⁾したが、今回の脱脂粉乳における観察は腸球菌群数のみについて行った。なお大腸菌群の観察は本菌群が粉乳から検出される例が近年の製品では皆無のため出来なかった。成績は Table 41 に示されるように、含有菌数は一般に上述のバター例より多く、生存期間も長い傾向にあり、観察期間中死滅した例は No. 3 及び No. 5 の 2 例に過ぎず、しかもこれらの例も製造後 15~17 カ月間はなお生残していた。

Table 41. Longevity of enterococcus group in skim milk powder preserved in room temperature (5~25°C).

Sample No.	Months elapsed since manufacture at the first examination	Results every 3 months						
		1	2	3	4	5	6	7
1	7	5.0×10^3	+	+	+	+	+	+
2	5	7.5×10^3	+	+	+	+	+	+
3	5	1.5×10^4	+	+	+	+	-	-
4	4	2.3×10^4	+	+	+	+	+	+
5	3	5.3×10^4	+	+	+	+	-	-
6	2	6.1×10^4	+	+	+	+	+	+
7	6	6.5×10^4	+	+	+	+	+	+
8	4	3.2×10^5	+	+	+	+	+	+

Notes. + : Survival.

- : Death.

3. 保存温度を異にした人工接種脱脂乳における成績

Str. faecium 及び *E. coli* を単独あるいは混合して実験的に滅菌脱脂乳に接種し 22°C で 16

時間培養後、これらを4°C、室温及び37°Cの3群に分けて保存しながら1月毎に両者の菌の消長を追及した。その成績はTable 42に示される。

Table 42. Changes of number of *Str. faecium* and *E. coli* cultured in sterilized skim milk during their preservation at different temperature.

Species	Preserved at	Number of organisms per ml				
		At beginning	After 1 month	After 2 months	After 3 months	After 4 months
F	4°C	1.1×10^7	1.6×10^8	2.2×10^8	3.3×10^8	3.2×10^8
	R.T.	//	5.5×10^8	4.6×10^8	6.5×10^8	4.6×10^8
	37°C	//	3.2×10^5	0	0	0
	4°C	1.0×10^8	2.9×10^8	3.5×10^8	3.2×10^8	3.1×10^8
	R.T.	//	6.5×10^8	6.2×10^8	6.0×10^8	4.8×10^8
	37°C	//	2.1×10^5	5.5×10^4	2.3×10^5	0
C	4°C	1.3×10^8	2.3×10^8	8.9×10^7	2.7×10^6	9.7×10^6
	R.T.	//	8.7×10^4	1.6×10^2	0	0
	37°C	//	0	0	0	0
	4°C	4.0×10^8	3.3×10^8	1.1×10^8	1.4×10^7	4.9×10^6
	R.T.	//	4.9×10^6	1.3×10^3	0	0
	37°C	//	0	0	0	0
F+C ($\begin{matrix} F \\ C \end{matrix}$)	4°C	2.9×10^7	4.4×10^7	8.0×10^6	1.6×10^7	
		2.6×10^6	4.0×10^7	6.7×10^6	1.2×10^7	
		2.6×10^7	3.9×10^6	1.3×10^6	3.8×10^6	
F+C ($\begin{matrix} F \\ C \end{matrix}$)	R.T.	2.9×10^7	1.9×10^8	2.4×10^8	2.2×10^8	
		2.6×10^6	1.9×10^8	2.4×10^8	2.2×10^8	
		2.6×10^7	8.0×10^4	0	0	
F+C ($\begin{matrix} F \\ C \end{matrix}$)	37°C	2.9×10^7	7.3×10^5	6.0×10^3	0	
		2.6×10^6	7.3×10^5	6.0×10^3	0	
		2.6×10^7	0	0	0	

Notes. F : *Str. faecium*.
C : *E. coli*.
R.T. : Room temperature (5~25°C).

22°C 16時間培養で腸球菌は最大値まで発育増殖出来なかったためか、4°C並びに室温保存ではその後も増数を続け、保存後2~3カ月目で漸く最大値に達している例もみられる。しかし大腸菌は22°C 16時間培養でほぼ最大値に達している模様である。

接種菌の消長は、単独接種例では、4°Cにおいて両種菌とも、室温では腸球菌が4カ月目でなお生残を示したが、大腸菌は3カ月目で既に死滅し、37°Cでは腸球菌が2~4カ月、大腸菌は1カ月目で死滅するのが認められた。混合接種例において、保存開始時における大腸菌数は腸球菌数の10倍も存在したにも拘らず単独接種例同様大腸菌の方が早く死滅した。以上人工接種脱脂乳においては、大腸菌の死滅は腸球菌よりも早く、また保存温度が高い程両種菌ともすみやかに死滅した。

III 小 括

人及び各種動物の糞便稀釈材料を室温に長期間保存して腸球菌群並びに大腸菌群の生残状態を追及した結果、保存開始時において腸球菌群数の方が大腸菌群数より多い例は勿論、少ない例においても腸球菌群の方が大腸菌群より長く生残する例の多いことが認められた。また冷蔵庫に保存したバターの場合においても糞便の例同様一般に腸球菌群の方が長く生残した。一方脱脂粉乳を室温に放置してその中に含まれる腸球菌群の生存期間を検討した結果、製造後少なくとも15~17カ月以上生残することを知った。また *Str. faecium* 並びに *E. coli* を実験的に滅菌脱脂乳に接種し、保存温度を4°C、室温及び37°Cの3段階に分けて両者の菌の消長を観察した結果、*E. coli* の死滅は *Str. faecium* より早く、また保存温度が高い程両菌の死滅がすみやかであった。

(VIII) 考 察

汚染指標菌としての腸球菌群に関する研究はその選択培地の改良進歩と相俟って進んで来た。緒言において述べた如く、腸球菌群の選択培地は多くの研究者の努力により、近年著しく改良が加えられて来たが、基本は他種菌に対する制菌剤としての Sodium azide の使用であり、更に Ethyl violet の添加あるいは45°C培養法との併用である。しかし Sodium azide の濃度は報告者によって一定しておらず、各研究者が独自の処方をもって最良の培地と推奨しているのが現状である。

著者ら²¹⁾は B.T.B. Azide Dextrose Broth を用い37°Cと45°Cにおける腸球菌群の発育を比較した結果、37°Cに比べて45°C培養における発育が著しく阻害されたことから、腸球菌群の定量的検査に当っては45°C培養が不適当であることを既に報告した。また乳製品の如き加熱材料にあっては、推定培地の Sodium azide の濃度が0.02%で十分であったが、生乳、生肉等の非加熱材料の如く、腸球菌群以外の他種菌が圧倒的に多い材料では、腸球菌群以外のレンサ球菌あるいはブドウ球菌等の発育がみられ選択能力に不十分な点があることを知ったので、まず今回は主として Sodium azide の濃度を増すことと、Ethyl violet の併用について若干の検討を試みた次第である。

腸球菌群選択培地として初期に報告された HAJNA & PERRY¹⁶⁾ の S. F. 培地には Sodium azide が高濃度 (0.05%) に含まれ、更に培養温度は45°Cを採用していることから、腸球菌群そのものも非常に発育を阻害され定量的検査には不適当であることが MALLMANN & SELIGMANN (1950)⁴⁷⁾ によって既に指摘されている。一方 Sodium azide を低濃度 (0.02%) で使用した推定培地については LITSKY ら⁴⁴⁾、堀江²⁶⁾及び那須⁵⁵⁾の報告があり、LITSKY らの培地では腸球菌群以外のグラム陽性球菌と桿菌が発育するため、確認培地の段階において Sodium azide を0.04%とし、更に Ethyl violet を添加することによって検査の確実を期している。堀江は LITSKY らの培地を改良して、確認培地の段階では Sodium azide の濃度を0.025%とし、更に CHILDS & ALLEN (1953)¹²⁾ の報告を参考として45°Cにおける培養法を組合せることによって他種菌の発育を抑制し、ほぼ満足すべき成績を得たと報告している。那須の培地は著者らによる検討の結果、上述の如く不十分な点が認められている。さて推定培地について検討した結果は Table 3 に示されたように、培地 No. 1 (Sodium azide 0.02%) では腸球菌群以外の他種菌の発育することが認められた。培地 No. 2 (Sodium azide 0.025%) においてもやはり発育する他種菌はあったが、同濃度に Sodium azide を含む確認培地への

培養では *Str. bovis* の発育が不十分ながら認められた他は他種菌の発育が抑制され、またたとえ発育するものがあったとしても集落が黄変するまでに至らなかったことから、Sodium azide は0.025%の濃度で十分選択能力が発揮されることを知った。また Ethyl violet を特に添加する必要性は認められなかった。

次に培地 No. 2 においても発育を示した *Str. bovis* 及び腸球菌群を供試菌として、微量な菌を接種した場合の発育性を各推定培地で比較検討したところ、Table 4 に示されたように腸球菌群は培地 No. 1 においても対照培地の4%減、培地 No. 2 で8%減、Ethyl violet 添加の培地 No. 4 では15%減の成績を得、*Str. bovis* は更にこれ以上の抑制を受けた。これらの成績から Sodium azide の濃度は検査に支障がない限り、出来るだけ低濃度にすることが必要であることを改めて確認した。しかし多種多様にわたる食品材料については、単一の培地を使用するよりも大腸菌群の検査における乳糖ブイヨンと B.G.L.B 培地の使い分けの如く、検体によって腸球菌群検索の培地も変えることが、検査を容易にするため必要であると考えるに至った。すなわち生乳、生肉等の如く出現する菌が多種多様でしかも菌数が多い検体では培地 No. 2 を、乳製品の如く加熱工程を経る結果、出現菌の傾向がほぼ一定し、かつ菌数の少ない検体では培地 No. 1 で十分である。但し Sodium azide の濃度を高めて使用するとき、それだけ腸球菌群自身も発育抑制の影響を受けて実際の菌数よりも少なく出現することを考慮すべきである。なお改訂された食品衛生検査指針 I (1959)³⁹⁾には腸球菌群検査用培地が記載されており、Sodium azide の濃度が0.04%となっているが、以上述べて来た理由により、腸球菌群が多量に存在する検体について定性試験を行うのならば兎も角、腸球菌群の含有菌数が極めて少ない検体についての定量的試験を行うためには Sodium azide の濃度が高過ぎることは明らかであり改訂が望まれる。

畜産食品における腸球菌群の分布成績は Table 5, 6, 10, 11, 12, 15, 17 に示されたように、プラント持込乳、生肉(夏季)において腸球菌群は100%陽性であった。これらはまた大腸菌群も100%陽性であり、しかも大腸菌群の出現菌数の方が大であった(Table 7, 16参照)。冬季検査の生肉では腸球菌群は62%、大腸菌群は82%の割合に陽性で本検体もその大部分において菌数は大腸菌群の方が大であった(Table 13参照)。しかるに製品においては腸球菌群の陽性率の方が高い成績を示した。粉乳(1958年度検査分)において腸球菌群は全材料から検出されたのに対し、大腸菌群は1例も検出されなかった。八田ら²²⁾は市乳の検査においてこれと全く同様な結果を得たと報告している。なお畜産食品あるいは一般食品についてのその他の報告をみると、WILSONら⁸⁶⁾⁸⁷⁾はカキ、那須⁵⁶⁾はイカ、タコ、宮林⁵¹⁾は生肉、貝類、サラダ、市川・国田²⁹⁾は生肉、堀江²⁷⁾は鮮魚介類等の非加熱食品においては一般に大腸菌群の陽性率が腸球菌群のそれより高く、また菌数も多いと述べている、一方村磯⁵⁴⁾は生菓子の餡、宮林⁵¹⁾はコロケ、シュウクリーム、青木ら¹⁾は粉乳、ミックスパウダー、市川・国田は肉製品等の如き加熱食品においては腸球菌群が大腸菌群に比べて陽性率が高いと報告しているが、耐熱性の弱い大腸菌群が死滅し、より耐熱性を有する腸球菌群が生残するのは当然のことと考えられる。今回検査した畜産食品において上述の報告同様、生乳、生肉材料にあっては大腸菌群の陽性率が、乳製品にあっては腸球菌群陽性率が高い成績を示した。但し製造工程中に加熱されると思われる肉製品においては、やはり加熱を受ける乳製品同様の成績を得られなかったが、これは製造方法、製品の性質、形態も異なり、また保存料その他の添加等によって影響を受けたためかも知れない。更に現今のわが国における肉製品の製造状態をみると、乳製品製造におけるような高度の衛生水準にないものが多いと想像されるため、種

々の条件により加熱材料たるにも拘らず非加熱材料の如き結果が得られたのではなからうかとも考えられる。

村磯、宮林は上述のような腸球菌群の検出率の高い食品にあっては、大腸菌群よりもむしろ腸球菌群を汚染指標菌として検索する方が、食品の安全性をより高めるという点で、また加熱前における原料の汚染状況を推測出来る点において優れているのではなからうかと述べているが、このことは汚染指標菌の条件の一つとして重要なことと思われる。

次に腸球菌群、大腸菌群及び一般生菌数三者の出現状態を検討すると Table 19 に示された如く、プラント持込乳及び夏季生肉材料では腸球菌群も大腸菌群も全例陽性であり、生菌数もすべて g 当り 5 万以上から 1, 100 万以上にまで分布していた。冬季生肉材料では両菌群ともその検出率は 100% に達せず、生菌数も幾分少なく全例の 32% は 5 万以下であったが、その他は 400 万以下あるいは 1, 100 万以上にまで分布していた。加工品において粉乳では両年度分とも腸球菌群のみ陽性であり、大腸菌群は陰性、生菌数もすべて 5 万以下であった。小メーカーのバター及び肉製品においては腸球菌群が陽性であったが、これらには生菌数 5 万以上の例が存在した。以上のことから生菌数と腸球菌群あるいは大腸菌群との関係を考察すると、大腸菌群の方が腸球菌群よりも生菌数の多い材料と、より関連性があるように見受けられる。事実バターにおいて大腸菌群陽性の 5 例はすべて生菌数も 5 万以上の材料であった。しかし生菌数の多い材料が必ずしもすべて大腸菌群陽性とは限らず、個々の材料について観察すると、腸球菌群陽性例と生菌数の多い例とが関連している場合も多い。結局腸球菌群、大腸菌群及び生菌数三者の検査を行い総合的に判定することが、最も汚染を確実に知る方法と考えられる。宮林⁵⁰⁾は食品汚染の状況を判定するため腸球菌群を検査するには、大腸菌群の検査もあわせて行い、両者の成績を比較して総合的に判定することが必要と述べ、BUT-TIAUX¹¹⁾は大腸菌群と腸球菌群の両者が存在した検体では糞便による汚染が確実に存在したことを意味すると述べていることはこの間の事情を物語っている。

乳及び乳製品の成分規格等に関する省令には生菌数及び大腸菌群についての成分規格が明確に定められている。本省令が公布された当時の主旨は、乳幼児にとって必需品である乳及び乳製品の品質の衛生管理を特に一般食品よりも厳格に行う必要があると認めたからであり、品目の範囲も限定されていた。最近一部改正が行われてバター及びチーズ等 2, 3 が追加されて品目の範囲も拡大されたが、乳及び乳製品が乳幼児の必需品であることに変わりはなく、更に老幼病弱者の蛋白補給源として重要な位置を占めつつある今日、このような食品については衛生保持を如何に厳格に行っても行い過ぎるということはなく、三者の出現状態からこれら製品の安全性を高めることは必要欠くべからざるものと考えられる。

乳製品のうち煉乳、プロセスチーズでは腸球菌群も大腸菌群も陰性であった。煉乳について腸球菌群を調べた報告は見られないが、プロセスチーズについては大嶋⁶⁵⁾の報告があり、腸球菌群は生チーズでは陽性であったが製品では陰性であったと述べていることから、これらの製品には普通腸球菌群がみられない材料と考えてよいかも知れない。換言するとこれらの製品から腸球菌群が検出されたときは、殺菌が不十分であったか、殺菌後の汚染があったと考えられる訳である。

汚染指標菌としての見地から調べられた水、土壌あるいは食品等における腸球菌群の分布に関しても数多くの報告がみられる。一方その汚染源としての人あるいは各種動物の糞便における腸球菌群の分布に関しても数多くの報告がなされている。SMITH & SHERMAN(1938)⁸³⁾は人の糞便について腸球菌群を検索しているが、分離に際しては未だ腸球菌群の選択培地

が用いられていない。1946年 WINTER & SANDHOLZER⁸⁹⁾ は WHITE & SHERMAN⁸⁵⁾ の培地を改変した選択培地を用いて、人、家畜及び野獣の腸球菌群並びに大腸菌群を調べて両菌群の菌数を比較し、大腸菌群数は比較的一定しているが、腸球菌群数は分布の巾が大であると報告した。

従来糞便中に含まれる腸球菌群の菌数は一般に大腸菌群数の $\frac{1}{10}$ を越えることは稀であるとされていた。それは現在の如き良好な腸球菌群の選択培地がなかったためでもある。しかし腸球菌群の選択培地を用いて行った人及び各種動物の糞便検査成績⁹⁾²³⁾²⁷⁾⁶⁷⁾によれば、やはり大腸菌群数の方が腸球菌群数より大であったと報告している。SLANETZ & BARTLEY⁸²⁾ は Membrane filter法により、人、ウシ及びその他の動物の糞便40例について両菌群の菌数を比較した結果、腸球菌群の方が大であったと報告しているが、これは SLANETZ らがいわゆる腸球菌群と称している菌群の範囲を拡大して *Str. bovis* 及び *Str. equinus* 等をも含めた際の成績である。さて今回著者が行った人及び各種動物55例の検査結果は、Table 20 に示したように両菌群とも 100%陽性であったが、菌数の比較では上述の報告同様大腸菌群数の方が腸球菌群数よりも多い例が多数を占めていた (Table 22 参照)。しかしニワトリ、ネズミ、初生児では逆に腸球菌群数の方が大腸菌群数より多い成績を示した。ネズミの糞便において腸球菌群の菌数あるいは検出率が腸球菌群のそれらより大であるとの報告は OSTROLENK & HUNTER⁶⁷⁾、佐久間⁷³⁾によってなされており、また青木²⁾は溶血性腸球菌の検出率が高かったと報告している。各種伝染病あるいは食中毒菌の媒介者であるネズミにおいて腸球菌群の菌数あるいは検出率が腸球菌群のそれらよりも大であったという事実は、食品の汚染状態を調べるため腸球菌群を指標菌として使用する意義を高めるものである。

プラント持込乳、粉乳及び生肉等において腸球菌群は 100%陽性を示していたが、これらの汚染源調査という意味で、人及びウシの糞便を特に取上げて、しかも腸球菌群のみを対象として検索を行った。成績は Table 23, 24 に示された如く、人50例では全例陽性であった。BUTTIAUX⁹⁾ はウシ、ヒツジの糞便では腸球菌群の陰性例も認められたと報告し、青木²⁾も各種動物の糞便を検査して相当数の陰性成績を得、特にウシではわずか 7% ($\frac{2}{28}$) の検出率であったと報告しているが、著者のウシ 30例の成績は 100%陽性であった。ウシにおける出現菌数は $10 \sim 10^4$ であり、人の $10 \sim 10^7$ に比べ分布の巾も小である。腸内細菌叢が食餌成分によって影響を受けることは想像されるところであり、これらの関係については大嶋⁶⁴⁾⁶⁶⁾の報告にも詳しいが、腸球菌群もその影響を受けているであろうことは論を俟たない。ウシにおいて各牛舎毎の出現菌数が一定した傾向を示したことは、環境を同じくする上に同一飼料の給飼等が大きく影響していたためと考えられる。人において分布の巾が大であったのはウシと全く逆の理由によったものであろう。人及び各種動物各 5 例の腸球菌群の平均出現菌数は Text-fig. 1 に示したとおりであるが、ウシにおける腸球菌群の出現菌数は 11種の材料中最低の成績を示している。しかしこの成績は後から行われた 30例の出現菌数とはほぼ同じ成績であった。なお 11種の糞便材料中腸球菌群の出現菌数が最大を示したのはイヌにおいてであるが、大嶋⁶⁶⁾もウシ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ブタ及びイヌの 6 種の糞便を調べてイヌにおける菌数が最大であったと報告している。我国においてイヌが各種 *Salmonella* の有力な媒介者であること⁵⁹⁾⁶⁰⁾⁷²⁾、更に *Salmonella* の中には食中毒の原因菌となり得るものが多数あることは周知の事実であるが、このようなイヌの糞便において腸球菌群並びに大腸菌群がともに最高に存したということは、両者の菌群がともに汚染指標菌として有用であることを物語る一面である。

さて大腸菌群の汚染指標菌としての価値が低いといわれる理由として本菌群の中には糞便由来以外の自然界に常在する *A. aerogenes* (*Klebsiella*)等が含まれているため、大腸菌群が検出されたとしても真の糞便による汚染かどうかは疑わしいという意味のことを緒言において述べた。しかしこの説に対しては今日大腸菌群を更に IMViC test による型別を行うことにより、土壌由来といわれている *A. aerogenes* と真の糞便由来といわれている *E. coli* とを区別出来ることから、*E. coli* の検出を目標とすれば、汚染指標菌としての価値はすたれないとの反論がある、ここにおいて BUTTIAUX¹¹⁾は最近数年間における人の糞便内大腸菌群を調査した結果、近年の抗生物質使用の影響によって、腸内菌叢に変化が起り、糞便内における *E. coli* が減少し、代って *A. aerogenes* が増加して来たことと述べ、従来の *E. coli* は糞便由来、*A. aerogenes* は主として土壌由来という説に批判を加えている。更に D 群レンサ球菌は人あるいは動物の糞便内において大腸菌群と同じかあるいはそれ以上に出現する例も多いためから汚染指標菌としての価値が増大して来たことと報告しているのは興味深い。

腸球菌群の分類に関しては未だ種々の異論があるので、著者は Bergey's Manual⁸⁾、SEELEMANN⁷⁴⁾ の Biologie der Streptokokken, その他⁴⁾⁷⁵⁾⁷⁶⁾⁸⁰⁾の報告を参考として分類を試みた。レンサ球菌の分類に関する研究は我国にも多く、小林一門、越智らその他の報告があり、越智ら⁶²⁾の分類によれば、レンサ球菌は熱抵抗性 (60°C 30分) 及び胆汁抵抗性 (40%) によって 3 群に分けられ、腸球菌群は両者の抵抗性を有するものとされているが、SEELEMANN その他との関連性については不明である。

さて畜産食品から分離したレンサ球菌 592 株、糞便から分離したレンサ球菌 376 株計 968 株について各種抵抗性試験、糖分解能、Potassium tellurite に対する抵抗性及び TTC の還元性、Lancefield による D 群の血清沈降反応及びその他の生物学的性状の検査を行い、それらの成績を総合的に判定した結果、腸球菌群 873 株、腸球菌群以外のレンサ球菌 95 株に分けられた。腸球菌群の内訳は Table 30 に示されたように *Str. faecalis* 101 株、*Str. faecalis* var. *liquefaciens* 100 株、*Str. faecalis* var. *zymogenes* 3 株、*Str. durans* 93 株、*Str. faecium* 438 株、Unidentified enterococci 138 株であり、腸球菌群以外のレンサ球菌は *Str. bovis* 21 株及び不明レンサ球菌 74 株であった。

上述の如く腸球菌群を分類した結果 *Str. faecium* は腸球菌群合計 873 株中の 50% を占める成績であった。我国における食品あるいは糞便から分離された腸球菌群の分類に関する報告は Bergey's Manual に従っているものが多いため、*Str. faecium* を独立の種として型別した報告は見当たらない。堀江²⁴⁾は糖分解能の成績から腸球菌群を I, II, III 型に分け I 型が ORLA-JENSEN の *Str. faecium* に相当するものであると述べているが、Potassium tellurite に対する抵抗性及び TTC の還元性試験を欠除しており、従って SKADHAUGE⁸⁰⁾、BARNES⁴⁾、その他⁷⁴⁾⁷⁵⁾⁷⁶⁾の報告との関連性までは言及していない。*Str. faecium* は特に Potassium tellurite 及び TTC に対する感受性の差から型別されることを既に述べたが、更に他の主要な鑑別点として Arabinose を分解することが必要条件³⁾⁴⁾³¹⁾³⁵⁾⁷⁶⁾として挙げられている。しかし SEELEMANN⁷⁴⁾、MOUTOUSSIS^ら⁵²⁾は非分解株の例外もあると述べているから、この点を考慮すると著者が Unidentified enterococci として分けた 138 株の中には Atypical faecium も含まれていると想像される。かくすれば著者の検査株において *Str. faecium* の出現率は更に増大する訳で、腸球菌群の中において本菌種の占める比率及び価値はますます増大するものと考えられる。緒言において述べたように MUNDT^ら⁵³⁾、その他⁹⁾¹⁰⁾⁴²⁾⁸⁸⁾も *Str. faecium* が最も多く検出される型の腸球菌であると報告しているが、著者の成績も全くこれらと一致

した。

次に腸球菌群の同定分類成績に基づいて材料別に出現菌型を検討した結果、Table 32に示されたように、畜産食品において生乳、生肉等の非加熱材料では *faecalis* 系 (*Str. faecalis* 及びその varieties) が *Str. faecium* 及びその他 (*Str. durans* 及び Unidentified enterococci) より多く、加熱材料の乳製品では *Str. faecium* の出現率が最も大であった。

一方糞便における成績をみると、人の糞便からは *faecalis* 系が検出されるが、ブタ、ウシ、ヒツジでは少なく、*Str. faecium* がその主要な菌であるといわれている³⁾¹³⁾。また BUTTIAUX⁹⁾ は人、ブタ、ウシ及びヒツジの糞便由来腸球菌群を分類した結果、*Str. faecium* はすべての材料から多数検出されたが、*faecalis* 系はウシ、ヒツジに少なく人、ブタでは多いと報告し、前者の報告とはブタの点で異っていた。更に WILSENS & BUTTIAUX⁸⁸⁾ はウシの糞便 37例を調べて 100%に *Str. faecium* を検出している。著者の成績では Table 33 に示されたように、各種動物及びウシの糞便では *Str. faecium* が最も多く検出され、特にウシでは 96.6% の出現率であった。人ではウシ及び各種動物と同様に *Str. faecium* が多数検出されたが、更に *faecalis* 系が多く検出された点において動物の糞便材料とは異った成績を示した。

以上から糞便中の腸球菌群としては、一般に人においては *faecalis* 系と *Str. faecium* が、その他の動物特にウシにおいては *Str. faecium* のみがより多く存するようである。人と動物由来の主要な腸球菌の型が異なるという点は、大腸菌群にみられない腸球菌群の特性と考えられ、著者の成績も以上の報告と同じような結果が得られた。これらの事実から検出された腸球菌群を型別することにより、人あるいは動物の糞便による汚染の違いをある程度区別することも可能と考えられる。

さて非加熱材料に *faecalis* 系が、加熱材料に *Str. faecium* が多かったという事実は、これら菌種間の熱抵抗性に差があったためではなかろうかという疑問を抱かした。よって *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 及び *Str. faecium* の 3 菌型について浮遊液基質、感作温度、作用時間、接種菌数等の条件を考慮して熱抵抗性試験を行った。接種菌数は出来るだけ同じになるよう注意を払ったが、検定の結果はすべて同じ母集団に属することが確められた ($P < 0.01$)。試験の成績は Table 36, 37 に示されたように、*Str. faecium* の熱抵抗性が最も強く、*Str. faecalis* var. *liquefaciens* が最も弱く、*Str. faecalis* がその中間に位した。この試験結果は生材料では *faecalis* 系が、加熱材料では *Str. faecium* が多かったという成績を裏書きするものである。八田ら²²⁾ は *Str. faecalis* を供試菌として菌数と温度とを種々組合わせて熱抵抗性試験を行った結果、株により差があることを認めているが、この実験において使用した *Str. faecalis* 株の中には *Str. faecium* 株もあったのではなかろうかと推定されるので、両者の型を区別していたならば、あるいは一定した傾向がみられたかも知れない。また IYENGAR³³⁾ は *Str. faecalis* 及び *Str. liquefaciens* を供試菌として著者と同じような条件の下に熱抵抗性試験を行い、幾分 *Str. liquefaciens* の方が *Str. faecalis* より感受性があるような成績を得ているが、著者の成績にみられる如き顕著な差を得ていない。INGRAM & BARNES³¹⁾ は罐詰ハムから分離した腸球菌群 17株を同定した結果、*Str. faecalis* が認められず 16株が *Str. faecium* であったという成績を得た。更にブタの腸管から得た腸球菌群の同定の結果も *Str. faecium* が多く、*Str. faecalis* が認められなかったことから、罐詰ハムから分離された *Str. faecium* はブタ腸管由来のものであろうと推定した。更に BARNES⁵⁾⁶⁾ はベーコン工場における材料及び種々の器具について腸球菌群を調べた

結果では *faecalis* 系が *Str. faecium* 同様多かったことから、罐詰ハム製造の過程においても当然 *faecalis* 系と *Str. faecium* の汚染を受けて両者の菌が出現せねばならぬという結論に達した。しかし罐詰ハムから実際に検出されたのは *Str. faecium* のみであったことから、この理由は両者の菌の熱抵抗性の差あるいはハム中における両者の菌の発育の違いによるものかも知れないと推論したが、それ以上を明らかにしていない。しかし BARNES らが罐詰ハムの検査で *Str. faecium* のみが検出されたという成績は、著者の実験結果から、その製品以前の段階すなわち生肉原料では *faecalis* 系と *Str. faecium* の両方の汚染を受けていたことは明らかであり、この汚染された生肉原料が罐詰ハムに加工される工程中で加熱操作を受けるため熱抵抗性の弱い *faecalis* 系が死滅し、より耐熱性を有する *Str. faecium* のみが生残した結果と推定される。また KERELUK³⁵⁾ は冷凍肉パイから分離した腸球菌群を同定した結果、ニワトリ、七面鳥、牛肉のパイでは、*faecalis* 系が多いが、罐詰のマグロを用いて作ったマグロのパイのみは *Str. faecium* が多かったと報告している。本例における出現菌型の差も罐詰ハムの例同様、加熱の影響によって *Str. faecium* のみが生残った罐詰のマグロをパイの原料としたため、マグロのパイのみに *Str. faecium* が多く出現したのであろう。すなわち同じ腸球菌であっても菌型により熱抵抗性に差があることから、加熱を伴う材料にあっては検出菌種に偏りがみられた訳である。このような腸球菌群の特異性を利用して加熱食品にあっては、出現腸球菌群を同定して *faecalis* 系か、*Str. faecium* かを型別することにより、その食品の加熱の程度、あるいは殺菌後の汚染状態をある程度推定出来るものと考ええるに至った。

著者は更に5工場由来の粉乳81材料から分離した160株のレンサ球菌を分類し、更に糖分解能によって型別した成績に基づいて、工場別の出現菌型を検討した結果、Table 35 に示されたようにある特定の型の菌が工場別にしかも毎日連続して出現していることを知った。このことは工場所在地の地方に特定の型の菌が分布しているためか、あるいは粉乳製造過程のどこかで特定の型の菌による汚染を常時受けているのではないかとの疑いを生ぜしめる。しかし後者の場合5工場すべてにこのような現象が起きているとは考えられないから、やはり腸球菌群の分布が地方によって異なる結果であろうと考えたい。このように工場によって出現する菌の型が異り、しかも特定の工場の製品から一定した型の菌が連続出現したということは、製品から分離した腸球菌群を型別することにより、どこの工場由来の製品であるかを推定出来る点で興味ある成績と思われる。

腸球菌群と大腸菌群の保存による生残試験において、糞便材料では Table 38, 39 に示されたように保存後3年以上を経過してもなお生残している材料を含めて、供試材料46例中腸球菌群の方が長く生残したもの29例、それに反して大腸菌群の方が長く生残したもの6例、両菌群同じが11例で腸球菌群の方が長く生残することを知った。しかも46例中、試験開始時における両菌群の菌数は腸球菌群よりも大腸菌群の多い方が29例であったにも拘らずこのような成績が得られたのである。OSTROLENK⁶⁸⁾ は糞便あるいは糞便で処理した土壌を保存して調べた結果、腸球菌群の方が長く生残したと述べているが、他方 MALLMANN & LITSKY⁴⁸⁾ は汚水で処理した土壌では大腸菌群の方が長く生残したと述べ、更に堀江²⁸⁾ は井戸水、海水を種々の条件で保存した結果も大腸菌群の方が長く生残する成績を得ている。これらの成績は試験材料に含まれている有機物の量と関係があり、腸球菌群の増殖が起らない程度の有機物の存在下でも大腸菌群の増殖が起り、菌数が増加するため生存期間も延長したような結果が得られたものと考えられる。*Str. faecium* と *E. coli* を実験的に接種した脱脂乳の保存試験

では Table 42 示されたように *Str. faecium* が *E. coli* より長く生残したが、これは上述の堀江の成績とは逆に22°C 16時間増殖後の保存開始時において、*E. coli* の発育増殖は殆んど最高にまで達していたが、*Str. faecium* は未だ最高の発育増殖までに至らず、なお保存中に増殖を続けたことも *Str. faecium* が長く生残した理由の一つと考えられる。またバターを4°Cの低温で保存したとき、大腸菌群数が腸球菌数より多い材料にあっても腸球菌の方が長く生残した (Table 40)。KERELUK³⁶⁾は両者の菌群を実験的に肉水に接種して-6°Fで保存したときは腸球菌群の死滅が大腸菌群のそれより低かったといい、堀江²⁸⁾もまた魚介類を実験的に汚水に浸漬させたものを-20°Cで長期間保存したとき、大腸菌群は漸次死滅する傾向が認められたのに対し、腸球菌群の減少はみられなかったと述べている。なおまた脱脂粉乳を室温に保存して含まれる腸球菌の消長を観察した成績は Table 41 に示されたように、20~25ヵ月後でも生残が認められた。

以上の如く著者の実験あるいは他の報告例においてもみられるように、種々の食品を種々の条件下に保存したとき、その中に含まれる大腸菌群の死滅は一般に腸球菌群よりもすみやかであった。乳肉製品の如き保存食品にあっては、製造直後には生残していたかも知れない大腸菌群も一定期間を経過した後では死滅し、腸球菌群のみが生残している場合が多いと考えられる。従ってこのような例では汚染指標としての大腸菌群のみの検査では判定が不満足な点もあるゆえ、腸球菌群の検査も同時に行うことが必要である。

(IX) 総 括

各種畜産食品に含まれる腸球菌群について、まずその推定培地を検討した後、これら食品における定性的並びに定量的検査を行ってその検出と分布状態を、また検出された菌の型別と検査材料との関係を検討し、更に検出菌の菌型の差による熱抵抗性試験及び腸球菌群の保存による生残試験を行った。一方汚染源としての人及び各種動物の糞便についても畜産食品におけると同様の調査研究を行って両者間の関係を考察した。更に大腸菌群、一般生菌数との関係をも考慮し、総合的に畜産食品に含まれる腸球菌群に関する衛生学的研究、特に汚染指標菌としての意義について検討を加えた。

以上の成績を要約すると次の如くである。

1. 選択培地を用いるときは、検査材料の汚染の程度に応じて培地を使い分けることが望ましい。但し Sodium azide の濃度が高まるにつれて腸球菌群自身の発育も抑制されることを考慮して使用すべきである。
2. 畜産食品の腸球菌群並びに大腸菌群の分布において、生食品では両菌群ともほとんど100%陽性であり、菌数の比較では大腸菌群の方が多かった。しかし加熱食品では腸球菌群の陽性率が高く、特に粉乳において大腸菌群は100%陰性にもかかわらず腸球菌群は100%陽性の成績であった。
3. 人60例、動物75例の糞便において腸球菌群は100%陽性であった。
4. 畜産食品及び糞便由来のレンサ球菌 968株を同定した結果、*Str. faecalis* 101株、*Str. faecalis* var. *liquefaciens* 100株、*Str. faecalis* var. *zymogenes* 3株、*Str. durans* 93株、*Str. faecium* 438株、Unidentified enterococci 138株、*Str. bovis* 21株、不明レンサ球菌 74株に分類された。なお *Str. durans* 及び *Str. faecium* の同定基準は Bergey's Manual のそれとは異なる。

5. 腸球菌群873株中 *Str. faecium* は最も多くその半数を占めた。
6. 畜産食品において食品別に検出菌型を検討した結果、生食品では *Str. faecalis* 及びその varieties の出現が *Str. faecium* より多く、加熱食品では *Str. faecium* の方が多かった。
7. 粉乳由来腸球菌群を糖分解能により型別した結果、特定工場製品から特定の型の菌が検出される傾向があった。
8. 人及び各種動物の糞便においては、個体別、種類別にみても大腸菌群数が腸球菌群数を上廻る例が多く、また人の糞便における腸球菌群数はウシの糞便におけるよりも遥かに多かった。
9. 糞便における検出菌型を比較検討すると、*Str. faecium* は動物特にウシの糞便において検出率が高く、人糞便においては *Str. faecalis* 及びその varieties と *Str. faecium* とは同程度に出現する傾向にあった。
10. *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 及び *Str. faecium* の3菌型を対象として種々の条件下で熱抵抗性試験を行った結果、*Str. faecium* の耐熱性が最も強く、*Str. faecalis* var. *liquefaciens* が最も弱く、*Str. faecalis* が中間に位する成績を得た。本実験結果は生食品と加熱食品における出現菌型の差を実験的にも説明するものである。なお菌型を問わず含有菌数が少なければそれだけ死滅し易かった。
11. バター、糞便及び人工接種脱脂乳を室温その他の温度で保存して含まれる腸球菌群と大腸菌群の消長を追及した結果、何れも腸球菌群の方が長く生残した。このような現象は、試験開始時において大腸菌群数の方が多し例においても認められた。なお保存温度が高いほど両菌群の死滅は早い。
12. 室温保存の粉乳中の腸球菌群は、製造後15~17カ月以上においても生残した。
13. 乳肉及びそれらの製品については生菌数、大腸菌群とともに腸球菌群の検査もあわせて行い、三者の出現状態から総合的に汚染を判定することが食品の安全性をより高めるものである。
14. 乳製品の如く腸球菌群の出現率が、大腸菌群よりも高い食品にあっては、大腸菌群よりもむしろ腸球菌群を汚染指標菌として検索する方が、食品の安全性をより高めるといふ目的にかなうものである。
15. 煉乳、プロセスチーズの如き製品から腸球菌群が検出される時は、加熱殺菌が不十分であったか、あるいは殺菌後の汚染が疑われる。
16. 保存食品にあっては、製造直後には存在したかも知れない大腸菌群が保存の経過に伴って死滅することから、保存による減少の少ない腸球菌群を汚染指標として調べる方が、製造前あるいは製造後の汚染状態を推測出来る点においても有利である。
17. 畜産食品において、生材料及加熱材料とにおける出現腸球菌群の菌型の差は、耐熱性の差によるものであることが実験的にも証明されたが、これらの成績から加熱材料においては出現する腸球菌群を型別することにより、加熱の程度もしくは殺菌後の汚染をある程度推定することが可能である。
18. 人及び各種動物の糞便から出現する腸球菌群の型には一定の傾向が認められるので、食品から検出された腸球菌群の型別により、人由来の汚染か動物由来の汚染かをある程度推定出来る。
19. 各種伝染病あるいは食中毒原因菌の主要な媒介者であるネズミの糞便において、腸球

菌群の菌数が大腸菌群のそれより高い傾向にあることは、腸球菌群の食品汚染指標菌としての意義を高めるものであろう。

20. 人及び各種動物の糞便11種中腸球菌群並びに大腸菌群の菌数がともに最高を示したのはイヌであったが、わが国における *Salmonella* の主要な媒介者がイヌであることを考慮すると、大腸菌群とともに腸球菌群を汚染指標菌として検索することは意義が深い。

以上の調査研究成績から腸球菌群の汚染指標菌としての意義は、畜産食品においては大腸菌群と同等に、またある場合にはそれ以上重要であることを認めた。なお上記の諸点から腸球菌群の型別に当っては、Bergey's Manual (1957) の分類型式に *Str. faecium* を付加すべきことを強調したい。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導御校閲を賜わった恩師平戸勝七教授及び浜田輔一教授に衷心より感謝するとともに、御協力を戴いた加藤英一助教授、田坂隆美学士並びに教室員各位に謝意を表す。また菌株を御恵与下された北大農学部佐々木西二教授、同獣医学部清水亀平次助教授、東大農学部尾形学助教授及び農林省家畜衛生試験場波岡茂郎博士の御厚意に深謝する。

なお本研究は文部省科学試験研究費補助金に負うところが多かった。ここにあわせて感謝の意を表す。

本報告の1部は第45回(昭和33年4月)、第49回(昭和35年4月)及び第51回(昭和36年4月)日本獣医学会並びに第13回(昭和32年9月)、第20回(昭和33年9月)及び第27回(昭和34年9月)日本獣医公衆衛生学会においてそれぞれ発表した。

(X) SUMMARY

Studies on enterococcus group as an indicator of pollution in water, soil, foods and others have been recently reported by many investigators. Though the presence and significance of enterococcus group in various food materials, especially in fish and other marine products had been investigated, there are a few investigations on enterococcus group in milk, meat and their products.

Therefore, this investigation was undertaken to ascertain the significance of enterococcus group as an indicator of pollution in milk, meat and their products. First, the screening media for enterococcus group were examined and the best was determined. Then, using this screening medium, the qualitative and quantitative examinations for enterococcus group in milk, meat and their products and feces of human and various animals were made, on the other hand the counts of coliform bacteria and all living bacteria too were done. Next, the identification, the relationship between the materials inspected and the species of strains detected, the thermo-resistance test and the longevity of enterococcus group were studied respectively.

The results obtained are summarized as follows:

1. When the screening medium for enterococcus group is used, the content of sodium azide (NaN_3) in the medium must be adjusted from 0.02 % to 0.025 % according as the grade of contamination in the inspected materials. But, according as the concentration of NaN_3 become thick, it is necessary to notice that growth of enterococcus group is inhibited (Tables 3 and 4).

2. In the distribution of enterococcus group and coliforms in milk, meat and their products, both organisms are detected at nearly 100% and the number of coliform bacteria was predominant in raw materials, but in the heat-treated milk products enterococcus group bacteria was dominant. Enterococcus group are positive in all samples of milk powder, whereas coliforms are negative (Tables 6,7,9~17).

3. Distribution of enterococcus group was 100% in 60 human and 75 animal feces (Tables 20,23 and 24).

4. Of 968 streptococcal strains isolated from milk, meat and their products and feces, 101 were classified as *Str. faecalis*, 100 as *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, 3 as *Str. faecalis* var. *zymogenes*, 438 as *Str. faecium*, 93 as *Str. durans*, 138 as unidentified enterococci, 21 as *Str. bovis* and 74 as unidentified streptococci (Table 30).

5. Of 873 strains of enterococcus group, 438 strains were *Str. faecium*; *Str. faecium* occupied the half of strains of enterococcus group.

6. The frequency of detection of *Str. faecalis* and its varieties was greater than the one of *Str. faecium* in raw milk and meat, but in heat-treated foods *Str. faecium* was superior (Table 32).

7. The strains of *Str. faecium* originated from powdered milk were divided into 7 subtypes by their fermentative reaction to carbohydrates. Moreover, it is noted that a definite subtype was detected in the milk powder obtained from a definite dairy plant (Tables 34 and 35).

8. In human and animal feces, the M.P.N. of coliform bacteria was generally greater than the one of enterococcus group bacteria without reference to individual or race or species of human and animals (Tables 20~22). The M.P.N. of enterococcus group bacteria in human feces was far greater than the one of bovine (Tables 23 and 24).

9. In comparison the species of enterococci detected from human feces with the one from animal feces, *Str. faecium* was highly positive in the latter, especially in bovine. In the case of human feces, however, *Str. faecalis* and its varieties as well as *Str. faecium* were isolated to the same grade (Table 33).

10. When the thermoresistance tests of *Str. faecalis*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* and *Str. faecium* were tested under the various conditions, the thermoresistance of *Str. faecium* was the most stable, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* was the most labile and *Str. faecalis* was in the midst of these two. From these results, it was experimentally proved that there is a difference of species of enterococci detected between raw and heat-treated foods (Tables 36 and 37).

11. When the longevities of enterococcus group and coliforms were compared with samples of butter, feces and inoculated skim milk being preserved at various temperature, it was found that the longevity of enterococcus group was longer than the one of coliforms. Such result was always obtained without reference to the number of enterococcus group bacteria or coliform bacteria included (Tables 38~40 and 42).

12. Enterococcus group in powdered milk preserved at room temperature survived at least for 15~17 months after manufacture (Table 41).

13. It is the most suitable measure to know how food materials are contaminative that the estimations of number of living bacteria, coliforms and enterococcus group in food materials are performed at the same time.

14. In such milk products as the positive rate of enterococcus group is higher than the one of coliforms, it will be found that the inspection of enterococcus group is better than the one of coliforms for ascertaining the grade of cleanliness of food materials.

15. If the enterococcus group was detected from dairy products such as condensed milk and processed cheese, an insufficient pasteurization or a recontamination after pasteurization are suspected.

16. In preservative foods, for example in certain milk products, it is worthy to survey the presence of enterococcus group as an indicator of pollution, because enterococcus group is usually survival longer than coliforms in foods preserved.

17. In such heat-treated foods as milk powder, it may be possible that the grade of heating or the recontamination after pasteurization is presumed by typing of enterococci detected.

18. As there is a difference of species between the strains derived from human feces and the strains from animal feces, when the typing of enterococci isolated from various foods is made, it may be presumed which the contamination of food originated from human or animal feces.

19. In rats' feces, the M.P.N. of enterococcus group bacteria was generally larger than the M.P.N. of coliform bacteria (Table 20).

20. Both M.P.N. of enterococcus group bacteria and coliform bacteria in dogs' feces were found to be the highest in all 11 kinds of human and animal feces surveyed (Text-fig. 1).

From the above-mentioned results, it was found that the significance of enterococcus group as an indicator of pollution is equal to the one of coliforms, in some instances the significance of enterococcus group is even superior to the coliforms. Also, the author believe that *Str. faecium* is worthy to be shared one species among enterococcus group.

文 献

- 1) 青木竜身, 加藤亮哥, 永瀬章一, 山本博之, 松村一弥, 中原正良, 木下喜雄. 1957. 日獣会誌, **10** : 22-25.
- 2) 青木竜身. 1959. 同誌, **12** : 111-115.
- 3) BARNES, E. M. & INGRAM, M. 1955. Ann. Inst. Pasteur, Lille, **7** : 115-119.
- 4) BARNES, E. M. 1956. J. gen. Microbiol., **14** : 57-68.
- 5) ———— 1956. J. appl. Bact., **19** : 193-203.
- 6) BARNES, E. M., INGRAM, M. & INGRAM, G. C. 1956. Ibid., **19** : 204-211.
- 7) BEAHM, E. H. 1942. Amer. J. Hyg., **36** : 147-152.
- 8) BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. & SMITH, N. R. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., Williams & Wilkins, Baltimore.
- 9) BUTTIAUX, R. 1958. Ann. Inst. Pasteur, **94** : 778-782.
- 10) ———— 1958. Ibid., **95** : 142-148.
- 11) ———— 1959. J. appl. Bact., **22** : 153-158.

- 12) CHILDS, E. & ALLEN, L. A. 1953. *J. Hyg.*, **51** : 468-477.
- 13) COOPER, K. E. & RAMADAN, F. M. 1955. *J. gen. Microbiol.*, **12** : 180-190.
- 14) GUTHOF, O. & WINKLER, F. 1955. *Zbl. Bakt. I. Orig.*, **162** : 236-255.
- 15) GYLLENBERG, H., NIEMELÄ, S. & SORMUNEN, T. 1960. *Appl. Microbiol.*, **8** : 20-22.
- 16) HAJNA, A. A. & PERRY, C. A. 1943. *Amer. J. publ. Hlth*, **33** : 550-556.
- 17) 浜田輔一, 橋本秀夫, 田坂隆美, 加藤英一, 後藤仁. 1958. *日獣会誌*, **11** : 352-355.
- 18) HARTMAN, P. A. 1960. *Appl. Microbiol.*, **8** : 114-116.
- 19) HASHIMOTO, H., HAMADA, S. & ISHIKAWA, T. 1958. *Jap. J. vet. Res.*, **6** : 63-68.
- 20) ——— 1960. *Ibid.*, **8** : 47-52.
- 21) 橋本秀夫, 浜田輔一. 1959. *日獣会誌*, **12** : 532-536.
- 22) 八田貞義, 川浪昇, 浦部幹雄, 酒井雄学, 青山好作, 栗栖弘光, 宮沢文雄, 藤波竜恵. 1956. *日医大誌*, **23** : 223-227.
- 23) 堀江 進. 1959. *日水会誌*, **25** : 294-300.
- 24) ——— 1959. 同 誌, **25** : 488-496.
- 25) ———, 関根 隆. 1960. 同誌, **26** : 161-168.
- 26) ——— 1960. 同 誌, **26** : 169-182.
- 27) ——— 1960. 同 誌, **26** : 183-192.
- 28) ——— 1960. 同 誌, **26** : 614-622.
- 29) 市川忠次, 国田 昭. 1952. *獣医畜産新報*, No. **78** : 31-32.
- 30) 今泉 清, 新井照雄, 田嶋嘉雄. 1959. *日本獣医学雑誌*, **21** : 307-315.
- 31) INGRAM, M. & BARNES, E. 1955. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, **7** : 101-114.
- 32) 井上憲政. 1954. *栄養学雑誌*, **12** : 100-104.
- 33) IYENGAR, M. K. K., LAXMINARAYANA, H. & IYA, K. K. 1957. *Indian J. Dairy Sci.*, **10** : 90-99.
- 34) KERELUK, K. & GUNDERSON, M. F. 1959. *Appl. Microbiol.*, **7** : 320-323.
- 35) KERELUK, K. 1959. *Ibid.*, **7** : 324-326.
- 36) KERELUK, K. & GUNDERSON, M. F. 1959. *Ibid.*, **7** : 327-328.
- 37) KJELLANDER, J. 1960. *Acta Path. Microbiol. Scandinavica*, **48** : Suppl., No. 136.
- 38) 厚生省編. 1951. *食品衛生検査指針*, 協同医書出版社.
- 39) ——— 1959. 同 上, 同 上.
- 40) KOSKOWSKY, F. V. & DAHLBERG, A. C. 1948. *J. Dairy Sci.*, **31** : 285-292.
- 41) LARKIN, E. P., LITSKY, W. & FULLER, J. E. 1956. *Amer. J. publ. Hlth*, **46** : 464-468.
- 42) LECLERC, H. & CATSARAS, M. 1958-'59. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, **10** : 193-200.
- 43) LITSKY, W., ROSENBAUM, M. J. & FRANCE, R. L. 1953. *Appl. Microbiol.*, **1** : 247-250.
- 44) LITSKY, W., MALLMANN, W. L. & FIFIELD, C. W. 1953. *Amer. J. publ. Hlth*, **43** : 873-879.
- 45) ——— 1955. *Ibid.*, **45** : 1049-1053.
- 46) MALLMANN, W. L. & SYPIEN, A. 1934. *Ibid.*, **24** : 681-688.
- 47) MALLMANN, W. L. & SELIGMANN, E. B. 1950. *Ibid.*, **40** : 286-289.
- 48) MALLMANN, W. L. & LITSKY, W. 1951. *Ibid.*, **41** : 38-44.
- 49) MC CLESKEY, C. S. & BOYD, A. F. 1949. *Food Technol.*, **3** : 337-339.
- 50) 宮林 晃. 1957. *千葉医学会誌*, **33** : 107-116.
- 51) ——— 1957. 同 誌, **33** : 117-125.
- 52) MOUTOUSSIS, C., PAPAVALIIOU, J. & SAMARAKI, V. 1957. *Acta Microbiol. Hellenica*, **2** : 114-124.
- 53) MUNDT, J. O., JOHNSON, A. H. & KHATCHIKIAN, R. 1958. *Food Res.*, **23** : 186-193.
- 54) 村磯旺嗣. 1954. *千葉腐研報*, **7** : 63-66.
- 55) 那須昭夫. 1954. *日本衛生学雑誌*, **8** : 173-181.
- 56) ——— 1954. 同 誌, **8** : 182-187.
- 57) NICHOLUS, A. A. 1939. *J. Dairy Res.*, **10** : 202-249.
- 58) NIVEN, C. F. 1955. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, **7** : 120-123.
- 59) 越智勇一, 田嶋嘉雄, 村瀬信雄, 坂崎利一他. 1956. *日本獣医学雑誌*, **18** : 13.
- 60) 越智勇一, 田嶋嘉雄, 石井富士雄, 坂崎利一他. 1957. 同 誌, **19** : 20-21.
- 61) 越智勇一, 光岡知足. 1958. *日獣会誌*, **11** : 1-7.
- 62) 越智勇一, 尾形 学, 鹿江雅光. 1960. *日本獣医学雑誌*, **22** : 353-360.
- 63) 岡本 肇. 1954. *細胞化学シンポジウム*, **3** : 145-174.

- 64) 大嶋竹一. 1956. 栄養学雑誌, **14** : 83-91, 111-122, 151-158.
- 65) ————. 1956. 同 誌, **14** : 179-180.
- 66) ————. 1957. 同 誌, **15** : 125-140.
- 67) OSTROLENK, M. & HUNTER, A.C. 1946. *J. Bact.*, **51** : 735-741.
- 68) OSTROLENK, M., KRAMER, N. & CLEVERDON, R.C. 1947. *Ibid.*, **53** : 197-203.
- 69) PACKER, R. A. 1943. *Ibid.*, **46** : 343-349.
- 70) RITTER, C. & TREECE, E. L. 1948. *Amer. J. publ. Hlth*, **38** : 1532-1538.
- 71) 坂井 稔. 1956. 広島県衛生研究所報, 第6号 : 65-112.
- 72) 坂崎利一, 橋爪敬三郎, 小堀 進, 岡田 啓, 久池井忠男, 三浦四郎, 岩森秀夫, 渡辺正太. 1958. 日本獣医学雑誌, **20** : 264.
- 73) 佐久間安雄. 1938. 千葉医学会誌, **16** : 1673-1686.
- 74) SEELEMANN, M. 1954. *Biologie der Streptokokken*, 2 Aufl., Hans Carl, Nürnberg.
- 75) SHARPE, M. E. & SHATTOCK, P. M. F. 1952. *J. gen. Microbiol.*, **6** : 150-165.
- 76) SHATTOCK, P. M. F. 1955. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, **7** : 95-100.
- 77) SHERMAN, J. M. 1937. *Bact. Rev.*, **1** : 3-97.
- 78) SHERMAN, J. M. & NIVEN, C. F. 1938. *J. Inf. Dis.*, **62** : 190-201.
- 79) SHERMAN, J. M. 1938. *J. Bact.*, **35** : 81-93.
- 80) SKADHAUGE, K. 1950. *Studies on Enterococci with Special Reference to the Serological Properties*, Einar Munksgaads, Copenhagen (cited from SHATTOCK).
- 81) SLANETZ, L. W., BENT, D. F. & BARTLEY, C. H. 1955. *Publ. Hlth Rep.*, **70** : 67-72.
- 82) SLANETZ, L. W. & BARTLEY, C. H. 1957. *J. Bact.*, **74** : 591-595.
- 83) SMITH, F. R. & SHERMAN, J. M. 1938. *J. Inf. Dis.*, **62** : 186-189.
- 84) SULLIVAN, M., BARTLEY, C. H. & SLANETZ, L. W. 1957. *Amer. J. publ. Hlth*, **47** : 618.
- 85) WHITE, J. C. & SHERMAN, J. M. 1944. *J. Bact.*, **48** : 262.
- 86) WILSON, T. E. & MC CLESKEY, C. S. 1951. *Food Res.*, **16** : 313-319.
- 87) ————. 1951. *Ibid.*, **16** : 377-382.
- 88) WILSENS, A. & BUTTIAUX, R. 1958. *Ann. Inst. Pasteur*, **94** : 332-340.
- 89) WINTER, C.E. & SANDHOLZER, L. A. 1946. *J. Bact.*, **51** : 588.
- 90) 柳沢文徳, 那須昭夫, 村磯旺嗣, 山崎義人. 1954. 公衆衛生, **15** (2) : 89-91.
- 91) 柳沢文徳, 竹内端弥, 山崎義人, 宮林 晃. 1954. 医学と生物学, **33** : 225-228.
- 92) 柳沢文徳, 宮林 晃, 竹内端弥. 1954. 千葉腐研報, **7** : 59-62.