

## 近年における粉乳中の腸球菌の変化

橋 本 秀 夫

(広島大学水畜産学部畜産学科)

### Recent Tendency of Enterococci in Milk Powder in Japan

Hideo HASHIMOTO

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

(Tables 1-4)

各種乳製品のうち、とくに粉乳の腸球菌について、われわれは一連の報告<sup>1-6)</sup>を行なってきた。それらの中で、粉乳は他の食品に比べて腸球菌の占める割合が多いという事実、例えば粉乳の生菌数検査で、プレートカウント寒天培地に発育した全集落が腸球菌のみという事例すら観察されたことを報告したが、このような特性を利用して近年製造されている乳製品細菌叢の変化を、粉乳の腸球菌を指標として追及しようと試みた。

本邦各地の6乳製品工場から、1年間にわたって送付されてきた各種粉乳検体について調査した腸球菌の分布成績は既に報告した<sup>3), 4)</sup>。それから1年後および3年後に再び同一工場から粉乳の送付を受け、前後3回5年間にわたる同一工場由来の粉乳について腸球菌の分布を調査し、この間における腸球菌の出現状況の変化を追及することができたので、これらの成績について報告する。

#### 材料および方法

##### 第I回目の検体

昭和37年5月から翌年の5月にわたって製造された粉乳で、北海道2カ所、東北、中部、中国および四国地方各1カ所の計6乳製品工場(A~F)から、毎月送付されてきた各種粉乳検体472例。

##### 第II回目の検体

昭和39年5月に製造された粉乳で、第I回目と同じ工場(D工場のみ欠)から送られてきた粉乳検体25例。

これらは第I回目と同様、1日1検体ずつ各工場5日分の粉乳である。

##### 第III回目の検体

昭和41年4~5月に製造された粉乳で、上記と同じく各工場5日分の合計30例。

##### 第IV回目の検体

追加試験分として昭和42年10月にC工場から送られてきた5日分の粉乳5例。

以上、総計532例について検体受領後直ちに腸球菌の検査を行なった。

腸球菌の分離方法、分離菌の同定、分類および菌数の算出方法はすべて以前に報告<sup>2), 3), 7)</sup>した方法と同様に行なったが、とくに第III回目における腸球菌の菌数測定にあたっては、既報<sup>6)</sup>同様、MPNの成

績の他にプレートカウント寒天培地に発育した集落の成績からも菌数を算定した。

なお、6工場の殺菌処理方法として、A、B、C工場ではH.T.S.T.殺菌、D、E、F工場ではU.H.T.殺菌が行なわれていた。

### 成績および考察

#### 1. 腸球菌の陽性率

本邦各地の6乳製品工場から、前後3回5年間にわたって送られてきた各種粉乳検体の腸球菌陽性率はTable 1に示すとおりである。

Table 1. Positive rate and numbers of enterococci in milk powder from six dairy plants

Dairy plant	Exp.* No.	No. of samples	No. of positive samples (%)	Range of MPN per g				
				<10	~10 <sup>2</sup>	~10 <sup>3</sup>	~10 <sup>4</sup>	~10 <sup>5</sup>
A	I	85	37 (43.5)	33	1	3		
	II	5	4 (80.0)	3	1			
	III	5	3 (60.0)	2	1			
B	I	85	81 (95.3)	59	20	2		
	II	5	5 (100.0)	3	2			
	III	5	5 (100.0)		2	3		
C	I	85	78 (91.8)	22	29	23	4	
	II	5	5 (100.0)	1	2	2		
	III	5	0 (0)					
	IV	5	5 (100.0)		3	2		
D	I	66	43 (65.2)	8	27	8		
	II	Not examined						
	III	5	2 (40.0)	2				
E	I	81	81 (100.0)	12	52	14	2	1
	II	5	5 (100.0)		5			
	III	5	5 (100.0)	2	3			
F	I	70	14 (20.0)	11	2	1		
	II	5	0 (0)					
	III	5	0 (0)					
Total		532	373 (70.1)	158	150	58	6	1

\* I: May 1962-May 1963

II: May 1964

III: April-May 1966

IV: October 1967

A工場の検体では腸球菌の陽性率が43.5~80%を示し、3回共100%には至らなかった。これに対しB工場例では3回共100%か、あるいはそれに近い陽性率を示した。

C工場例ではI、II回目共陽性率が高かったが、III回目は0となり、追加のIV回目では100%となっている。

D工場例はII回目に検体の送付が無く、またIII回目は出現菌数そのものが極めて少なかつたにもかか

ならず、陽性率の点ではⅠ回目に近い成績を示した。

E工場例は6工場例中最も陽性率が高く、3回共100%であった。これに比べて最後のF工場例の方は陽性率が低く、第Ⅰ回目において既に6工場例中最低の成績を示していたもので、Ⅱ、Ⅲ回目は0に終わっている。

以上、3回の成績を通じてみると、各工場毎の腸球菌陽性率はそれ程変化が認められなかった。すなわち、陽性率の高い工場では常に高く、低い工場では3回共低いという成績であった。ただし、C工場例のみはⅠ回目92%、Ⅱ回目100%を示したのにもかかわらず、Ⅲ回目は一挙に0となり、本工場例のみは大きな変化が認められた。本工場については、その後現地におもむき、殺菌方法、処理工程など製造過程について詳細に調査したが、Ⅱ回目とⅢ回目の製造時における処理方法は全く変わっておらず、何故100%から急激に0になったかは不明であった。

そこで、本工場については再び粉乳検体の送付を依頼し、第Ⅲ回目の検査から1年半後の昭和42年10月製造の粉乳5日分について、第Ⅳ回目としての追加検査を前回同様に行なった。

その結果、腸球菌は100%陽性であった。この成績から判断すると、C工場例においてはⅢ回目の時点において何等かの原因で腸球菌は消失していたが、再び100%の成績が得られたことから、結局は本工場例においても他工場例同様、腸球菌の陽性率は一定に近いことが推定された。

## 2. 腸球菌の菌数

Table 1の右側に腸球菌陽性例の菌数分布を示したが、これらはMPNの方法によって求めた数値で、しかも $\bar{x}$ 当たりの菌数で表わしてある。

第Ⅰ回目の検査でE工場例のように $10^4$ 以上を示したのもあったが、ほとんどは $10^3$ 以下であった。なお、本表で $<10$ の欄に示されているものの中には、 $\bar{x}$ 当たり小数点以下の例も含まれている。

次に粉乳の生菌数検査に際して、プレートカウント寒天培地に発育した全集落が腸球菌によって占められている事例があることを既に報告(第Ⅱ回目分に概当)<sup>6)</sup>したが、このようなことから第Ⅲ回目の検査においてもこの事実があるかどうかを確かめようと考え実施した。これらの成績はTable 2に示すとおりで、平板上の集落数はB95の検体を除いてすべて10倍稀釈段階における成績である。

A工場の検体は第Ⅱ回目の成績と比べて一般生菌数が若干増加したのみで、そのうちに占める腸球菌の集落数、あるいはMPNの成績は同じような傾向を示した。

B工場例は、これも一般生菌数が増加しているが、同時に腸球菌の数も増え、発育した集落の30%近くを占めている。

なお、B95の成績では、10倍稀釈段階の生菌数が平板上で200個以上を示し、その上拡散集落に覆われて腸球菌集落の判定および分離が困難であったため、本例のみは100倍稀釈段階の成績を示した。

C工場例は第Ⅱ回目の生菌数検査で拡散集落が少なく、しかも発育した集落の約80%が腸球菌という成績であった<sup>6)</sup>。第Ⅲ回目の検査においても、やはり拡散集落が少なく一般生菌数もⅡ回目同様、1平板当たり30個以下の成績であったことから、腸球菌の出現状況も同じ程度を予想して検索したがすべて陰性であった。すなわち生菌数検査の寒天平板においても、MPN算定のための液体選択培地の成績においても腸球菌はすべて陰性に終わった。これらの成績は反復検査の結果も同様であった。従って本成績の表は省略する。

そこで、前項に述べたごとく、第Ⅳ回目の検索を行なったのであるが、その結果は表に示されるように、腸球菌は全例陽性で、菌数もプレートカウント寒天培地に発育した集落の約30%を占める成績であった。これは第Ⅱ回目の78.6%に比べると低率であるが、粉乳の主要菌叢として腸球菌が関与している例としては、やはり特異的な成績といえよう。

D工場例は第Ⅱ回目に検体の送付が無かったもので、Ⅲ回目の成績では平板に発育した集落数は何れも10個以下、腸球菌も5検体15枚の平板上でわずか1個がみられたに過ぎなかった。MPNの成績においても2検体が陽性を示したが、菌数そのものは $\bar{x}$ 当たり小数点以下の成績であった。このようなこと

Table 2. Number of enterococci in milk powder from each plant on Plate Count Agar

Plant A (III)			Plant B (III)			Plant C (IV)			Plant E (III)						
Sample No.	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Sample No.	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Sample No.	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Sample No.	Colonies per plate*		MPN 0.1 g
	Total colonies	Enterococci			Total colonies	Enterococci			Total colonies	Enterococci			Total colonies	Enterococci	
A91	(70)	5	3.5	B91	135	27	16	C96	42	3	2.4	E87	6	3	0.8
	(70)	5			78	21			41	3			3	3	
	65	2			71	29			34	0			2	2	
A92	(70)	0	<0.1	B92	(39)	**	5.4	C97	34	11	4.9	E88	3	3	1.3
	(65)	1			(35)	10			30	15			1	1	
	(60)	0			31	6			24	5			1	1	
A93	(100)	0	0	B93	41	6	5.4	C98	81	23	7.9	E89	5	4	0.8
	(90)	0			41	5			73	23			4	3	
	(73)	0			21	4			61	17			1	1	
A94	56	0	0	B94	88	24	54	C99	72	22	54	E90	4	4	1.3
	56	0			(72)	19			66	26			3	3	
	(50)	0			56	14			47	18			2	2	
A95	72	0	0.3	B95*	19	4	35	C100	28	11	13	E91	6	1	4.9
	(53)	2			16	8			28	5			3	2	
	(41)	1			9	2			27	7			0	•	

\* Dilution 1:10, except B95 sample (1:100)

\*\* Not examined

( ) : Number of countable colonies except disturbed ones by spreaders

から、本工場例の成績も表を省略する。

次にE工場であるが、本例は生菌数そのものは何れも1平板当たり10個以下で少ないが、そのうちに占める腸球菌の比率は高かった。このような出現傾向は第II回目の成績と全く同じで、とくにE88およびE90の検体のごときは、発育した集落のすべてが腸球菌であった。すなわち、各検体3枚の平板の集落数を合計すると75% (33/44) が腸球菌であった。

前報<sup>6)</sup>において粉乳の細菌叢の中で腸球菌が主要菌叢を示す特異な事例のあることを報告したが、本工場例が上述のC工場例と共にそれに概当しており、しかも前後3回の検査を通じて腸球菌の陽性率が6工場例中最も高い成績を示した。すなわち、生菌数検査の培地に発育した集落の中で腸球菌の占める割合が高く、その出現態度は、II, III回目共特異的であった。粉乳におけるこのような腸球菌の出現成績は、乳製品の細菌学という点からも極めて興味深い現象であった。

最後のF工場例は上述のE工場例と異なり、検査した6工場例中最も生菌数の少なかったもので、腸球菌も陰性であった。従って本例も表は省略する。

以上、選択培地を用いたMPNの成績の他に、プレートカウント寒天培地に発育した集落の成績からも腸球菌の菌数を調べた。その結果、粉乳の細菌叢の中で腸球菌が主要菌叢を示す事例が前回に引続き、第III回目においても観察された。

### 3. 分離腸球菌の分類型別成績

分離腸球菌は既報<sup>2),3),4)</sup>のごとく選択培地を通して、ヒツジ血液寒天培地に発育したのから、集落態度を観察して異なると思われるものをすべて釣菌分離したものである。ただし第III回目においては、この他に前項で述べたように生菌数検査用の培地に発育したすべてのレンサ球菌も加えて同定試験を行なった。

血液寒天培地によって分離したレンサ球菌について所定のごとく同定、分類試験を行なった結果、腸球菌以外のレンサ球菌も少数例認められた。そこでこれらを除外した腸球菌のみ合計897株について、さらに糖分解の成績によって型別を行ない、工場別に3回にわたる出現菌型の変遷を検討した。

これらの成績はTable 3に示すとおりである。

第I回目の分離菌型別の成績は既に報告<sup>4)</sup>したとおりで、SubtypeのNo.はこれに従った。A, B, E工場の第III回目の成績で( )で示された数字はプレートカウント寒天培地によって分離した菌株の成績である。また糖分解の成績は、BARSIEKOWの培地を用いて2週間観察したものであるが、Glycerolについては48時間以内の分解陽性は+, 48時間以後に陽性となったものは(+)で示してある。

さて、糖分解の結果により各菌種を更に型別し、これらの成績から3回にわたる出現腸球菌の菌型の変化を検討した処、以下のとおりであった。

A工場例では第I回目にNo. 6型の*Str. faecium*が多かったが、II回目にはNo. 17のタイプのみとなり、さらにIII回目ではNo. 5のタイプが多いというように主要菌は一定しなかった。

B工場例では、*Str. faecium*が主体で、No. 5のタイプが毎回多数出現している。ただし、第I回目で特長のあった非薄型の集落はII, III回目ではみられなかった。

C工場例では同じくNo. 5のタイプが圧倒的に多かったが、II回目ではNo. 6のタイプのみとなっている。

D工場例の成績では、第I回目は表にも示されるように各種のタイプが多数検出され、中でもNo. 5のタイプがB, C工場例同様に多かったが、II回目は検体の送付が無く、III回目は2例の陽性検体があったが菌株数が極めて少なく、このような成績に終わっている。

E工場例は3回共腸球菌陽性率が100%を示したものであるが、出現菌型は3回共No. 5のタイプが主要菌型であった。

最後のF工場例は、第I回目のみ腸球菌陽性で、II, III回目は0ということから、菌型の変化は検討できなかった。

Table 3. Changes of fermentative types of enterococci isolated from milk powder on three experiments

Subtype No.	Item	<i>Str. faecalis</i>	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	<i>Str. faecium</i>										<i>Str. durans</i>	Unclassified	Total	
		1	2 4	5 6 7 8 9 10 11 12 13	15	16 17											
	Sucrose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+		
	Glycerol	+	+	+	(+)	(+)	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	(+)	(+)	(+)	
	Mannitol	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	
	Sorbitol	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Arabinose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
	Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	
Plant A	I	4	• •	2	25	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	6	3	40
	II	•	• •	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	6	6
	III	{	• •	6	• •	1	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	7
Plant B	I	3	1 •	82	4	•	5	•	2	•	•	•	•	•	5	•	102
	II	•	• •	8	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	8
	III	{	4	5 •	16	• •	9	• •	• •	• •	• •	• •	2	• •	• •	• •	36
Plant C	I	2	• •	119	4	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	125
	II	•	• •	•	9	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	9
	III	•	• •	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
Plant D	I	3	4 1	50	2	17	•	8	3	•	•	•	•	1	3	•	92
	II	Not examined															
	III	•	• •	•	•	2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	2
Plant E	I	4	2 •	147	15	2	15	•	1	5	4	3	•	•	•	•	198
	II	•	• •	12	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	12
	III	{	• •	12	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	• •	12
Plant F	I	2	• •	7	•	9	•	2	•	•	•	•	•	•	•	•	20
	II	•	• •	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
	III	•	• •	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0

( ): Strains isolated by the Plate Count Agar

Glycerol (+): Positive after incubation over 48 hr

次にB工場例の成績に再び戻って、もう少し詳細に検討を加えると、第III回目の試験株は、従来どおり選択培地を用いて増菌法によって分離した菌株の他に、プレートカウント寒天培地から直接分離したすべての腸球菌も加えて型別したものであるが、Table 3の成績では増菌法で分離した菌と直接プレートから分離した( )内の菌とは、すべて一致した成績を示している。このようにすべての菌型が対応して出現している状況はA工場例においても同様である。しかしながら、このような成績も個々の検体別に分けて検討すると、それらの成績はTable 4に示すとおりで、増菌法由来株とプレート法由来株とは比較的一致した成績の部分もあるが、必ずしもすべての検体において一致した成績が得られなかった。

B91およびB94の検体では比較的対応した成績を示しているが、B92ではNo. 8型の*Str. faecium*の

Table 4. Comparison of fermentative types of enterococci isolated from milk powder by the enrichment method and the plate method

(Plant B, the third experiment)

Subtype No.		<i>Str. faecalis</i>	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	<i>Str. faecium</i>		
				1	2	5
Item						
Sucrose		+	+	+	+	-
Glycerol		+	+	(+)	-	-
Mannitol		+	+	+	+	+
Sorbitol		+	+	-	-	-
Arabinose		-	-	+	+	+
Raffinose		-	-	-	-	-
B 91	E	•	2	4	2	•
	P*	•	•	4	70	3
B 92	E	2	•	4	1	•
	P*	•	•	•	15	1
B 93	E	1	2	1	•	1
	P*	1	1	1	10	2
B 94	E	1	•	4	2	•
	P*	6	1	2	45	3
B 95	E	•	1	3	4	1
	P**	•	•	•	14	•

\* : Dilution (1:10)

\*\* : Dilution (1:100)

E : Enrichment method (B. T. B. Azide Dextrose Broth)

P : Plate method (Plate Count Agar)

みが一致しているだけで他は対応していない。その点 B93は非常に一致しているが、プレート法由来が一番多く分離された No. 8 型が増菌法では示されていない。また B95 は増菌法由来が 4 菌型に対してプレート法由来が 1 菌型と対応が少ないが、これには説明がつけられる。それは前述のように本検体は他に比べて生菌数が多く、しかも拡散集落に覆われて 10 倍稀釈段階の平板から菌分離が困難であったので 100 倍段階から分離を行なっているため、プレート法由来の菌型の種類が少なくなったものと考えられる。

以上、個々の検体についての検討では、このように増菌法由来と直接プレートから分離した菌株との間には菌型に不一致な点もあったが、5 例の検体を平均した場合には Table 3 にみられたように一致した成績として示された。

なお、表としては示さなかったが、A および E 工場例についての同様の検討では本例と異なり、個々の検体においてもほとんどが対応した成績を示していた。

さて、増菌法によって分離した菌株の型別の成績では、I ~ III 回を通じて *Str. faecium* の No. 5 のタイプが最も高い検出率を示した。このような成績に対して以前における報告<sup>3),4)</sup>では、わが国の粉乳から分離される腸球菌は *Str. faecium* が主要菌であって、しかもその中で No. 5 のタイプの菌が最も多いということ述べてきた。しかしながら第 III 回目の成績で直接プレートから分離した菌株、すなわち生

菌数検査用のプレートカウント寒天培地に発育したすべての腸球菌を鈎菌して型別した結果、A、E工場例は別としてB工場例では、No. 5のタイプよりもむしろNo. 8のタイプの方がはるかに多かった。このような成績から、ある検体にどのような菌種あるいは菌型が多いかというためには、やはり個々の菌種あるいは菌型毎に定量的な検査を行わない限り、正しい成績が得られないものと考えられる。しかしこのような検索は検体によって、あるいは対象とする菌の種類によって比較的簡単に検査ができる場合と、できない場合があって、すべての事例に対して応用する訳には行かない。その点、粉乳は腸球菌を目標とした場合には以上のような追及も可能であって、極めて特異的な検体であった。

以上、3回にわたる分離腸球菌の型別の結果、出現菌型に変化のみられる工場例もあったが、B、E工場例のように長い間菌型が変わらず、同じタイプの菌が継続的に出現している例が観察された。また、出現菌は *Str. faecalis* および *Str. faecium* の No. 5, 6, 7, 8 のタイプが多く、中でも No. 5 のタイプの菌が最も多数検出された。

## 総 括

本邦各地の6乳製品工場から送付されてきた前後3回5年間にわたる同一工場由来の粉乳について、腸球菌の陽性率、菌数および菌型の変化を検討した。その結果は次のとおりであった。

1) 腸球菌の陽性率は工場毎に違いはあるがそれぞれにおいて同じような傾向を示し、陽性率の高い工場は3回共高く、低い工場では常に低く著変は認められなかった。

2) 腸球菌陽性検体の菌数は、ほとんどが  $10^8$  以下で漸減の傾向にあったが、これも大きな変化は認められなかった。

3) 分離腸球菌の型別の成績では、3回の調査で菌型の変化している例もあったが、3回共同じ菌型が主要菌として出現している例も多く、全体としてはやはり No. 5 型の *Str. faecium* が最も多数検出された。

以上、粉乳の腸球菌の出現状況から近年の乳製品細菌叢の変化を検討すると、全般的には菌数は減りつつあるが、余り大きな変動は無かったものと推定された。

終りにのぞみ、長期間粉乳試料を提供して頂いた雪印、明治、森永各乳業会社の御厚意に対し深く感謝の意を表す。

また本研究の一部は、森永奉仕会研究奨励金によった。ここに併せて謝意を表す。

本報の要旨は第14回日本食品衛生学会（昭和42年11月、岡山）において発表した。

## 文 献

- 1) 橋本秀夫、浜田輔一：日獣会誌，**12**，532-536 (1959)
- 2) 橋本秀夫：広大水畜紀要，**3**，503-566 (1962)
- 3) 橋本秀夫、伊藤烈、池辺慶三：食衛誌，**4**，300-307 (1963)
- 4) 橋本秀夫、伊藤烈、石田貞雄、川口元紀：食衛誌，**5**，415-419 (1964)
- 5) 橋本秀夫、川上英之：食衛誌，**6**，506-510 (1965)
- 6) 橋本秀夫：食衛誌，**8**，21-27 (1967)
- 7) 橋本秀夫：メディヤサークル，No. 54，9-15 (1964)



## SUMMARY

The incidence, number and fermentative types of enterococci in milk powder were examined in 532 samples collected from six dairy plants of five districts in Japan (Hokkaido, Northern Honshu, Central Honshu, Western Honshu and Shikoku). These tests were conducted from May 1962 to May 1963, in May 1964 and from April to May 1966.

The positive rate of enterococci was found to be constant for each plant all the three times.

In most of the samples examined the number of enterococci was less than 1,000 per g.

The fermentative types of enterococci varied in three experiments, however, the main and most constant type was subtype No. 5 of *Str. faecium*.

From these results, it was presumed that the bacteriological quality of dairy products manufactured in recent years in Japan had not changed.