HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	大腸菌群の水産食品中に於ける分布の研究：第2報 函館近海に於て漁獲されるスルメイカに於ける腸球菌の分布について
Author(s)	谷川, 英一; 小山, 光
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 5(1), 78-85
Issue Date	1954-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22850
Type	departmental bulletin paper
File Information	5(1)_P78-85.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

大腸菌群の水産食品中に於ける分布の研究

第2報　函館近海に於て漁獲されるスルメイカに於ける腸球菌の分布について

谷川英一・小山　光
（北海道大学水産学部水産食品製造学教室）

Studies on the Coli-Group Distributed in Marine Foods

II. *Enterococci* in squid (*Ommastrephes sloani pacificus*) caught in the sea near Hakodate

Eiichi TANIKAWA and Akira OYAMA
Faculty of Fisheries, Hokkaido University

Abstract

The authors have first examined whether the Most Probable Number of *Enterococci* in surface and viscera of squid may be give some indication of the contamination by human faecal, or wheter the using jointly of M. P. N. of coli-score and *Enterococci* may more accurately show the contamination than the using of M. P. N. of coli-score only. As a consequence, the authors have ascertained that the use jointly of M. P. N. of coli-score and M. P. N. of *Enterococci* is favourable for learning accurately the degree of the contamination.

Then the authors have studied the M. P. N. of *Enterococci* (a) in squid before landing at several landing places in Hakodate Harbour and (b) in squid which was bought at several stores in Hakodate City. M. P. N. of *Enterococci* was determined by Mallmann and Seligmann's method by using azide dextrose broth and by employing the Hoskins' table. Following results were obtained.

(1) On the surface skin and in viscera (mainly intestines) of squid before and after landing, the presence of *Enterococci* was recognized.

(2) The number of organisms of *Enterococci* on the surface skin of squid is larger than the number in viscera of squid in both cases, before and after landing.

(3) After landing, the number of *Enterococci* has increased over that found before landing. This may be due to the contamination by washing squi dusing sea-water near the landing places after landing, or by handling of fish dealer, or by contacting with soil.

(4) In fact, there are many organisms of *Enterococci* in the sea water near the landing places, and the most of them were *Enterococci* of human origin. It must be forbidden to wash squid with the sea water.

(5) The authors will assert repeatedly as in the previous report that consumers must always wash squid meat sufficiently and very carefully with city service water, when they wish to eat it as sliced raw meat.

魚介類は我国において常食に次いで供されるものであり，特に魚種によつては好んで生食，即ち刺身等として食べられる。生食の場合には腸チフス菌，赤痢菌等の如き消化器系統の病原菌による汚染が考えられ

る。これら消化器系統の病原菌の検出指標菌として大腸菌属の検出が唯一のものとされておつた[1]。これは大腸菌属がその検出法最も簡便な為である。然るに最近米国においては日本よりの冷凍輸入食品に対して汚染の指標として大腸菌属の他に腸球菌の検出をも併せ行い，その汚染の程度を一層正確に知ろうと企図して居る。

自然界における腸球菌（主として連鎖状球菌）の分布状態を決定した研究は少なく，Bergey's Determinative Bacteriology[2]によると一般に腸球菌は人間及び温血動物の腸管に由来する事が記載されて居り，又Shermann氏（1937），[1] Ostrolenk及びHunter（1946）両氏[5]等の研究によつてもこの事が証明されている。尚下水，汚物で汚染された水の中，不衛生な水泳プール中にも *Streptococci* の存在が認められたが[3]これらは多くは人間，動物の糞便から由来したこと[1]が報告されている。

腸球菌は人間，動物の糞便中において *Escherichia coli* の¼を超えないが，[4] 少数だからと云つて糞便中の腸球菌の有する衛生学的意義を何等減少せしめるものでなく，[1] 化学試験，及び他の環境要因に対する抵抗性は人間，動物の糞便による汚染の指標として重要であり，[5] 汚染の，より正確な指標となり得る事が述べられている，[1] 著者等は本研究において先ず大腸菌属検出法に併行して腸球菌の量を以て魚介類の汚染の程度を知り得るか否か，腸球菌の検出法の吟味，等の目的を以て函館近海において漁獲されるスルメイカの表皮，内臓についてその分布をみた。函館近海において漁獲されるスルメイカの大腸菌群最確数については既に第1報[6]において報告しており，こゝに腸球菌の検出によつて更にその正確を期さんとしたものである。

I．大腸菌群検出と腸球菌検出による汚染度の指標としての比較

従来用いられて来た大腸菌群の指数と腸球菌の指数とが同一試料について同様の傾向を示すものであれば，汚染度の指標として腸球菌の指数を併用する事も意義のある事である。こゝでは両者の指数の傾向をみる為に本実験を行つた。

1．培養基と試験法

大腸菌群検出法はAmerican Public Health Association Method[7]により乳糖添加肉汁培養基，Brilliant Green添加乳糖肉汁（B. G. L. G.），遠藤氏培養基等を用い，推定，確定，完全試験を経てその最確数（M. P. N.）を得た。

腸球菌の検出法については水中の連鎖状球菌を分離する為に多くの培養基が報告されている。[3] 尚Mallmann及びSeligmann（1950）両氏はLactose broth, Azide broth, S. F. broth, Azide dextrose brothにより，川水を試料として *Streptococci* の指数をみたが，その対数平均はLactose brothでは930，Azide brothでは3,700，S. F. brothでは690，Azide dextrose brothでは9,200なる事をみている。而してAzide dextrose brothは *Streptococci* の量的測定に対して最上の好適培養基である事を報告している。Azide dextrose brothは0.02%のSodium azideを添加する事によつて腸球菌に対して栄養をより多く与え，同時にグラム陰性の細菌の繁殖を抑制する為に作られたものである。[3] 著者等はRoth[8]氏により推奨されたAzide dextrose brothを使用したが，その組成はTryptose 1.5%，Beef extract 0.45%，Dextrose 1.5%，Sodium chloride 1.5%，Sodium azide 0.02%であつて，その基質のpHを7.2とした。

この Azide dextrose broth を用い Mallmann 及び Seligmann 氏等の方法によつて推定，確定試験を行つた。即ち推定試験は大腸菌群検出時と同様試料 1g を十進稀釈法で稀釈したものを 1cc 宛 Azide dextrose broth に接種して37°Cに48時間培養して酸の生成状態をみる。更に確定試験は酸を生成した培養液を他の試験管に移し，沈澱の部分をスライドガラス上に塗沫し，グラム染色し，連鎖状球菌が見られたならばその試験管は陽性とし，その陽性の試験管数によつて大腸菌群の最確数の表によつて指数を求めた。

2．実験結果

大腸菌群最確数及び腸球菌の最確数をヤリイカ内臓，スルメイカ内臓，飲料水，海水等について検査した。その結果は第1表の如くである。

Table 1. Number of acid producing tubes which were added with the samples of squid meat, which were not yet landed, in the azide dextrose broth

samlpe \ dilution		1	1/10	1/100	1/1,000	1/10,000	1/100,000	M.P.N./g
Loligo bleederi viscera	*Coli*-group				2	3	4	2,200
	Enterococci			4	0	0		130
Ommastrephes sloani pacificus viscera	*Coli*-group			2	2	0		930
	Enterococci			5	0	0		230
Drinking water	*Coli*-group		4	2	1			26
	Enterococci		0	0	0			0
Sea water	*Coli*-group	5	5	2				54
	Enterococci	5	2	0				5

以上の4試料についての比較によれば大腸菌群最確数に比し，腸球菌の最確数は少なくなつており，大腸菌群の最確数の少いものは腸球菌最確数も亦少くなつている。大体両者は平行して増減するものと思われる。従つて従来の大腸菌群の最確数検定の他に腸球菌最確数を検定する事も有意義の事と思われる。

II. 函館近海で漁獲されるスルメイカに於ける腸球菌の検出について

第1報[6]において筆者の一人，谷川は国沢，阿部と共に函館近海で漁獲されるスルメイカについて大腸菌群の最確数を検査したが，イカの表皮，内臓共に大腸菌属の存在することを認め，陸揚げ前の表皮には夫程多数の大腸菌属はみられなかつた。而して特に内臓にあるものは所謂魚型大腸菌[8]と認められるものが大部分であつた。陸揚げ後のイカの表皮における大腸菌群の最確数の増加は明らかに人型大腸菌の増加によることがみられ，これは恐らく陸揚げ後の船着場附近の海水の使用によるものと考えた。本実験においては主として函館港内で陸揚げされるイカ及び魚店舗に出されたイカにつき腸球菌最確数による汚染度を知らんとした。

1. 実　験　法

(1) イカ原料の採取法

函館港内に着船したイカ釣船よりの採取及び市内魚店舗における試料採取法は第1報[6]と同じ方法によつた。

(2) 試料の調製法

陸揚げ地区 A, B, C, D, E, F 並びに魚店舗所在地区 G, H, I, J, K, L 各地区より抽出した各4尾のスルメイカの内臓及び表皮を各 1 g 宛取り，無菌箱内で擂潰し，これを生理的食塩水で十進法により稀釈し，試料とし，Azide dextrose broth に接種した。

(3) 培養法と表示法

Azide dextrose broth に接種したものは 37°C で 48 時間培養し，その酸生成結果及び外観（混濁，沈澱）からみて，基質の pH が 4.2～4.4 のものは卄，又は＋とした。この中卄は混濁せるもの，＋は透明のもので，鏡検すれば何れも球菌の存在を認め得るものである。又 pH 6.0附近のものは土，pH 6.4附近のものは干，pH 7.2 附近のものは〒として示した。尚〒は 48時間培養では発育不十分で 72時間培養を要するもので

あり，更に培養時間を延長すれば＋又は卄になる可能性もある。例えば推定試験における48時間培養において∓を示したものが更に24時間の培養時間の延長により，卄になつたもの 40.4%，＋になつたもの 27.7% 土になつたもの6.4%，∓になつたもの2.1%，全然変化しなかつたもの23.4%，と云う割合を示し，大部分のものは卄又は＋に移行している。又全然 pH の無変化のもので透明のものは鏡検によつても腸球菌の存在が認められないので－として示した。

推定試験においてこれらの表示法によつて卄及び＋を腸球菌検出陽性とし土，∓，及び∓は擬陽性とし－は陰性とした。但し擬陽性の中，培養時間を24時間延長して陽性になつたもの及び完全試験においてグラム染色してグラム陽性の球菌が2ヶ以上連鎖しているのを認めた時はこれを陽性として数えた。これら陽性の数を各稀釈について記載した。

2. 実 験 結 果

(1) 陸揚げ前のスルメイカに分布せる腸球菌最確数について

Table 2. Number of acid producing tubes which were added with the samples of squid meat which were not yet landed, in the azide dextrose broth

Districts	Part	Sample No. 1				Sample No. 2				Sample No. 3				Sample No. 4			
		1/10¹/100¹/1,000¹/10,000				1/10¹/100¹/1,00·¹/10,00				1/10¹/100¹/1,000¹/.0,000				1/10¹/10⁰¹/1,000¹/10,000			
A	Surface skin	5	0	0	0	5	5	0	0	5	5	1	0	5	5	0	0
	Viscera	5	0	0	0	5	1	0	0	5	3	0	0	2	0	0	0
B	Surface skin	4	1	0	0	5	2	0	0	5	5	1	0	5	5	0	0
	Viscera	5	5	0	0	1	5	5	0	4	5	3	0	5	2	0	0
C	Surface skin	5	3	0	0	5	5	0	0	5	3	0	0	5	5	2	0
	Viscera	0	0	0	0	4	5	2	0	5	1	0	0	5	3	2	0
D	Surface skin	1	1	0	0	1	4	2	0	0	0	0	1	5	4	0	0
	Viscera	1	2	0	0	5	3	3	0	1	0	0	0	5	3	0	0
E	Surface skin	4	1	1	0	5	2	0	0	5	3	0	0	5	5	0	0
	Viscera	5	2	0	0	2	0	0	0	5	3	0	0	5	1	0	0
F	Surface skin	5	5	0	0	5	2	0	0	5	5	5	2	5	5	5	0
	Viscera	5	3	0	0	5	1	0	0	5	4	0	0	2	1	0	0

実験結果は第2表の如くであつて同表の数値よりこれを1g当りの腸球菌最確数をもつて表わすと第3表及び第1図の如くである。

第3表及び第1図よりみるに，腸球菌最確数は表皮においてはその存在が認められなかつたものは一つもなく，すべての試料に認められた。その最確数は各々の試料によつて差が大きい。内臓についても略々同様であつて，試料による差は表皮程大ではないが，試料の中には全然認められないものもあつた。又内臓と表皮とを比べると表皮の方が腸球菌の数が大きい。

最確数表より得た上記数値の平均値を1gについて求めると，表皮の場合は，

$$\overline{X}=\frac{213+164+235+42+97+267}{6}=\frac{1018}{6}=169.7$$

即ち1gにつき約170ヶの腸球菌が存在する事が推定される。又内臓の場合は $\overline{X}=\frac{35+94+57+67+42+62}{6}=\frac{357}{6}=59.5$ 即ち内臓中には1gにつき約60ヶの腸球菌が存在することが推定される。併し上記の実験において得られた数値は試料により最確数の差が大であり，陸揚げ前のイカ原料を各一括した試料群の代表値とすること，即ちイカ原料全体の腸球菌の分布として推察する事は困難であるが，大体の傾向は察知する事が出来る。

Table 3. M. P. N. of *Enterococci* in surface skin and viscera of squid which was not yet landed (per g)

Districts	Part	Sample No. 1	Sample No. 2	Sample No. 3	Sample No. 4	Average
A	Surface skin	23	240	350	240	213
	Viscera	23	33	79	45	35
B	Surface skin	17	49	350	240	164
	Viscera	240	24	64	49	94
C	Surface skin	79	240	79	540	235
	Viscera	0	56	33	140	57
D	Surface skin	4	15	18	130	42
	Viscrea	61	180	2	79	67
E	Surface skin	21	49	79	240	97
	Viscera	49	45	79	33	42
F	Surface skin	240	49	540	240	267
	Viscera	79	33	130	68	62

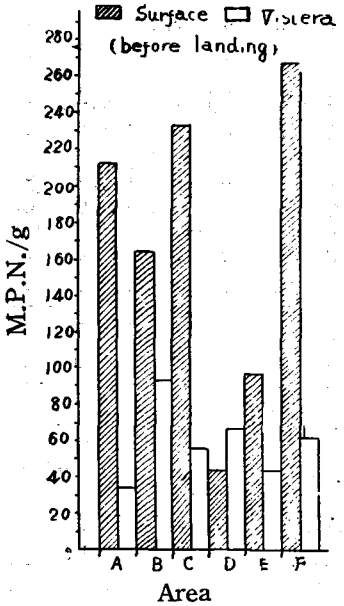

Fig. 1

(2) 陸揚げ後のスルメイカに分布せる腸球菌最確数について

次に陸揚げ後即ち函館市内を6地区に分けた各地区内の2ケ宛の魚店舗より2尾宛採取購入したスルメイカの表皮及び内臓をAzide dextrose broth に接種した酸生成試験管数及びそれより算出せる腸球菌最確数は夫々第4表，第5表及び第2図の如くである。

第5表の中，表皮及び内臓の腸球菌の最確数の平均値を夫々求めると，表皮の場合は，$\overline{X}=\frac{562+117+1518+332+1434+1183}{6}$ =866 即ち表皮 1g 当り 866ケの腸球菌の存在が推定される。

又内臓の場合は，$\overline{X}=\frac{33+57+290+122+323+263}{6}=181.3$ 即ち内臓1g当り181ケの腸球菌の存在が推定される。

陸揚げ後のスルメイカの表皮及び内臓についても夫々の各試料

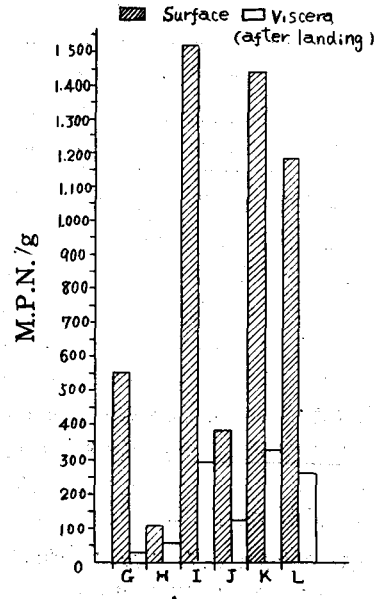

Fig. 2

Table 4. Number of acid producing tubes which were added with the samples of squid meat, which were landed, in the azide dextrose broth

Districts	Part	Sample No. 1				Sample No. 2				Sample No. 3				Sample No. 4			
		1/10¹	1/100¹	1/1,000¹	1/10,000	1/10¹	1/100¹	1/1,000¹	1/10,000	1/10¹	1/100¹	1/1,000¹	1/10,000	1/10¹	1/100¹	1/1,000¹	1/10,000
G	Surface skin	5	2	1	0	5	2	0	1	3	0	0	0	5	3	0	0
	Viscera	1	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	3	2	0	0
H	Surface skin	0	0	0	0	2	1	0	0	4	1	0	0	5	0	0	0
	Viscera	1	0	0	0	3	1	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0
I	Surface skin	3	3	0	0	5	4	0	0	5	5	0	0	5	4	2	0
	Viscera	5	1	0	0	5	1	0	0	4	1	0	0	5	1	0	0
J	Surface skin	4	2	0	0	5	5	3	1	3	0	0	0	4	0	0	0
	Viscera	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	5	1	0	0
K	Surface skin	5	5	5	1	5	5	4	1	2	0	0	0	5	2	0	0
	Viscera	5	1	0	0	4	1	0	0	0	0	0	0	5	3	0	0
L	Surface skin	5	4	1	0	5	3	0	0	4	4	3	0	5	4	1	0
	Viscera	5	3	0	0	1	1	0	0	2	0	2	0	4	0	0	0

Table 5. M. P. N. of *Enterococci* in surface and viscera of squid which was landed (per g)

Districts	Part	Sample No. 1	Sample No. 2	Sample No. 3	Sample No. 4	Average
G	Surface skin	700	680	78	790	572
	Viscera	20	20	78	14	33
H	Surface skin	0	68	170	230	117
	Viscera	20	110	20	78	57
I	Surface skin	170	1,300	2,400	2,200	1,518
	Viscera	330	300	170	330	290
J	Surface skin	220	1,100	78	130	382
	Viscera	0	78	78	330	122
K	Surface skin	3,500	1,700	45	490	1,434
	Viscera	330	170	0	790	323
L	Surface skin	1,700	790	540	1,700	1,183
	Viscera	796	40	91	130	263

の最確数に大なる差異があり，この値をもつて直ちに函館市内全魚店舗における腸球菌の分布数とする事は早計であるが，夫々の傾向をみる事は出来る。即ち腸球菌最確数は陸揚げ前と同様陸揚げ後も表皮の方が内臓よりも大であり，しかも表皮，内臓共に腸球菌の最確数は陸揚げ後は陸揚げ前より大である。こゝで興味ある事はH地区より抽出された試料に腸球菌の最確数の少い事である。これは同地区に市立保健所があり，業者の衛生知識が普及されている結果と思われる。

(3) 海水中の腸球菌の検出

漁獲されたスルメイカは陸揚げ後海水で洗滌されることが多いので，海水中の腸球菌をも検出しておく必

要がある。海水はイカ陸揚げ地区 A, B, C, D, E, F の6地区において採水し，50 cc 容の試験瓶に入れて実験室に持ち帰り，前項同様，推定，確定両試験を行つた。その実験結果は第6表の如くである。

Table. 6. Distribution of *Enterococci* in sea water

Districts	Sea water	1/10 diluted	1/100 diluted	1/1,000 diluted	M.P.N./g
A	5	5	3	0	92
B	5	2	0	0	49
C	5	5	4	0	1,600
D	5	5	2	0	54
E	5	3	1	0	110
F	5	5	3	0	920

第6表に示した実験結果よりみるに，函館港内における海水中には何れの地区にも腸球菌の存在が認められた。即ち港内何れの地区の陸揚げ地でも海水は人糞その他で汚染されている事が考えられる。故に之等海水をもつて陸揚げ後イカを洗滌すれば海水中の腸球菌の附着する可能性は大である。C地区，F地区のイカ原料の表皮に腸球菌の存在の多い事は同地区の海水中に腸球菌の最確数の多い事と関連している事と思われる。

III. スルメイカより分離された腸球菌の性状について

前記の Azide dextrose broth において酸生成したものより，これを Azide dextrose agar を用いて平板培養し，黄変した集落を釣菌し，球菌の2ヶ以上連鎖したものを純粋培養しその性状を調べたがその性質は次の如くである。

(1) グラム陽性，(2) 運動性活潑であるが不規則的である。(3) 最適発育温度は37°C であるが，45°C でも発育し得る。(4) Azide dextrose broth に1.5%の割合に Agar を加えた培養基（A. D. A. 培養基）の平板培養ではその集落は培養基表面のものは小形の実円であり，内部構造は顆粒状であり，その中心部は周囲よりも色が濃い。培養基内部のものはラグビー・ボール状をなすものが多かつた。集落の色は酸生成により僅かに黄色を呈するが，多数集落が発生すれば基面を一様に黄変せしめる。(5) 培養基のpHは培養後3.9～4.4となり沈澱を生ずる。(6) ガスを形成しない。(8) A. D. A. 培養基には大腸菌属は発育出来ないが，グラム陽性の桿菌のあるものは発育する。

以上の如き諸性質並に他の二，三の性質判定により，*Streptococcus faecalis ANDREWS* and *HORDER*[2] と類似するものと考えている。

IV. 討議及び結論

陸揚げ前のイカ原料の表皮に多数の腸球菌が存在する事は，漁獲後デッキの上に放置して居る間にデッキに附着していたものが附着するとか，又漁夫の手，履物，被服等より附着したものと思われる。又陸揚げ後の腸球菌の増加は表皮の場合は容器，手，土壌よりの附着が一応考えられ，又海水洗滌による増加も大なる要因となる。内臓の場合は海水による洗滌が最も大きな要因であろう。故に漁獲物の洗滌，保管等には衛生的の注意を要する。特にイカを陸揚げ前，陸揚げ後に拘らず海水で洗滌する事は禁止すべきであると考える。又各家庭においても生食の時は水道水又は清浄なる水をもつてよく洗滌する必要がある。

V. 要　　約

(1) 先ず腸球菌を大腸菌属と共に人，その他動物の糞便等による汚染度の指標として用い得るか否か，又腸球菌検出併用によつてそれらの汚染度を更に正確に知り得るか否かを実験したが，腸球菌の検出によつて汚染の程度を知る事が出来，又両法を併用する事によつて，より正確に汚染度を知り得る事が判明した。

(2) 函館近海において漁獲されたスルメイカについて腸球菌による汚染状態を陸揚げ前と陸揚げ後に分けて実験したが，イカの表皮，内臓共に腸球菌の存在が認められた。

(3) 陸揚げ前のイカ原料も陸揚げ後のイカ原料も共に表皮に存在する腸球菌の最確数は内臓のそれよりも大であつた。

(4) 陸揚げ前よりも陸揚げ後の方が表皮，内臓共に腸球菌の最確数は大であつた。この事は陸揚げ後外部よりの汚染即ち海水による洗滌，取扱者の手，土壌よりの汚染によるものと思われる。

(5) 函館港内の海水中には腸球菌の存在する事が認められた。即ち之等海水による洗滌は汚染度を増加する恐れが多分にあり，海水によるイカの洗滌は禁止しなければならない。

(6) 購買者がイカを生食する場合は常に水道水又は衛生的に清浄な水によつて洗滌しなければ不安である。

参　考　文　献

(1) Ostrolenk M., Krasmer N. & Cleverdon, R. C. (1947). *Journ. Bacteriol.* **53**, 197-203.

(2) Bergey's *Dererminative Bacteriology*. p. 339.

(3) Mallmann W. L. and Seligmann E. B. (1950). *Amer. Journ. Public Health* **40** (3), March.

(4) 厚生省編纂 (1950). 衛生検査指針 III. p. 20.

(5) Ostrolenk, M. and Hunter, C. (1946). *Journ. Bacteriol.* **51** (6), 735-741.

(6) 谷川・国沢・阿部 (1953). 北大水産彙報 **4** (2), 185-191.

(7) 厚生省編纂 (1950). 衛生検査指針 III, p. 2.

(8) Tanikawa, E. (1937). Biological studies on the organisms of coli-group isolated from the intestines of oysters. *Arch. f. Mikrobiol.* **8**, 288, Berlin.