HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	さしみにおけるEC・テストと従来法の比較
Author(s)	坂井, 稔; 絵面, 良男; 金子, 竜男 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 18(4), 370-384
Issue Date	1968-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23336
Type	departmental bulletin paper
File Information	18(4)_P370-384.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

さしみにおけるEC・テストと従来法の比較

坂井　稔*・絵面良男*・金子竜男*・大野元経*・林　功**

Comparison of the Recovery of *E. coli* from Sliced Raw Fish "SASHIMI" by EC Test at 45.5°C and Current Method

Minoru SAKAI, Yoshio EZURA, Tatsuo KANEKO,
Motonori OHNO, and Isao HAYASHI

Abstract

An evaluation of the EC confirmation test for the estimation of *E. coli* as an index of fecal contamination was determined in a water bath at 45.5°C.

A variety of sliced raw fish "SASHIMI" and some shellfish were examined after primary incubation in presumptive broth. The procedure for the enumeration of *E. coli* was essentially the same as the recommended method for shellfish (Kelly, 1960) except that confirmatory incubation in EC medium was used at 45.5°C (Fishbein, 1961, 1963) instead of 44.5°C. These and subsequent procedures were shown on Fig. and Table 1. Results obtained were summerized as follows;

1. The specificity of the 45.5°C EC test for *E. coli* is very high, namely, EC gas positive (the partially confirmed test) MPN (most probable number) and *E. coli* completed test MPN were not as great as in coliform MPNs, but the *E. coli* MPNs, both gas positive and completed test agreed well in most of the samples tested.

2. Out of 67 samples tested, 877 tubes gave positive confirmation of coliform organism and a total of 1,960 strains obtained from these tubes, however only 230 strains (13.7%) were determined to *E. coli* by means of the IMViC procedure.

On the other hand, 368 strains (97.1%) in 379 strains which were obtained from 211 tubes of EC gas positive was determined to *E. coli*.

3. It is possible to replace the tryptose in lauryl tryptose broth (L.T.B.) with the polypeptone (lauryl polypeptone broth, L.P.B.) at the presumptive test, but in the use of brilliant green lactose bile broth (B.G.L.B.) as a replacement for L.T.B. or L.P.B., it seems that MPN will decline to same extent.

4. It is impossible to detect *E. coli* var. 2 and 3 by the EC test, therefore it is necessary that the sanitary signification of *E. coli* var. 2 and 3 should be made clear.

緒　　言

食品衛生の立場から水や各種の食品の安全性を確保するための細菌学的規準はいかに規制すべきかという問題が永年論議されている。この問題は結局菌数の制限をどのように定め，屎便汚染指標細菌としていかなる細菌を選び，またどのような検査法を採択すべきかという問題に集約し得る。現在指標細菌としてもっとも広く採用されている大腸菌群(coliform organisms)は，人獣の腸管内を本来の生息場所とするいわゆる "faecal coliform organisms" の外に，その他の自然環境で死物寄生的に広く分布する種々の Type の "non-faecal coliform organisms" を包含し，大腸菌群の検出あるいはその

* 北海道大学水産学部微生物学講座
** 食品衛生監視員道南ブロック協議会

定量的測定値が必ずしも屎便の汚染あるいはその汚染度を意味しない場合もある。しかるにこれらのものは多少の例外あるいは Type の上での量的差はあっても人獣の屎便中に混在しているのが常である。faecal coliform organisms は他の多くの消化器系伝染病々原菌とともに，本来の生息環境と著しく異なる腸管以外の環境においての増殖性に乏しくかつ生存期間も短い。例えば海水中において定型的屎便系大腸菌の *E. coli* は海洋細菌との共存下できわめて短時日間に死滅することが知られている[1]。食品衛生上の屎便汚染の意義には消化器系伝染病々原菌の介在の可能性を推察する目的があり，汚染時点からの時間的経過は重要な意義をもつ。*E. coli* の検出は，汚染時点からの経過時間の短いことを暗示することから消化器系伝染病に対する危険性が推察される。現在汚染指標として大腸菌群が広く採用されその検査法も確立されているが，このことは上水道衛生の歴史とともに開発・検討・改良されてきたものであり，本来は給水衛生に関連したものである。水の衛生においてこのような比較的スペクトルの広い大腸菌群が指標として採用されるゆえんは，日常生活ではきわめて大量の水が消費され，その安全度はきわめて高いことが要求される点にあり，また水のもつ細菌学的対象物としての性格からも現行の検査法で矛盾はなく，このことによって今日安全給水が確保されている。しかし元来衛生水質試験法として発展してきたこの考え方や方法をそのまま汚染度のきわめて高い水のみならず，その構成々分のきわめて複雑な各種の食品，特に製造工程中に種々の処理を受ける食品や貯蔵過程を経過した食品にまで応用することはおのずから別問題として検討されなければならない。食品の物理化学的性状は細菌とメジムウ間の応答に影響するであろうし，また共存するフローラの様相に変化を与えることも考えられ，さらに生産から消費までに至る過程によっては指標細菌としての意義はまったく失なわれるおそれもある。また例え好ましいことではなくとも各種の食品に対し飲用水程度の清浄度を要求することは必ずしも実際的ではなく，また逆に大腸菌群をもって屎便汚染の指標とすること自体にも前述のごとき問題もあって統計的推察ながら若干の疑義ももたれるところから許容範囲という問題も生じてくる。以上のことなどから最近各方面において食品の汚染指標としての大腸菌群の意義が再検討されている。米国公衆衛生局は貝類の衛生取締に関し Manual (1946)[2] を発刊してかきおよびその養殖海域に対する細菌学的規準を示したが，この規準に対する多くの疑問が貝類衛生研究会(1956)において種々討議された結果，カナダの規準にならって従来の大腸菌群最確数 (coliform MPN) および生菌数の規準を大きく緩和するとともに（例えば市場レベルでのかきの acceptable class の規準，coliform MPN 230/100g 以下を 16000/100g 以下と緩和するなど），その後の2年間において大腸菌群の指標としての適性，あるいは適正規準値を明らかにすることを目的に広汎な協同調査を行ない，その結果は 1958 年の研究会に提出されたが，異る生産地から出荷されたかきが中間業者を経て距離の異る各地の市場に達する間に，ほとんどすべての例において *E. coli* MPN の変化はきわめて僅少であるにかかわらず，coliform MPN は数倍あるいはそれ以上に上昇するなどの点から coliform MPN はかきの衛生的品質の規準としての意義の少ないことが指摘され，以後指標細菌として *E. coli* を採用することが採択された[3]。また *E. coli* の検査法としては推定試験培地 Lauryl Sulfate Tryptose (LST)，35±0.5°C，24～48 時間培養でガスの発生が認められたものを確認培地 EC 培地[4] に移殖，44.5±0.2°C の恒温槽（あるいは 45.5±0.2°C の恒温器）で 24～48 時間培養し，ガス発生を認めた場合その純粋培養菌について IMViC・テストを行なって *E. coli* の完全試験とする。この場合 EC ガス陽性と *E. coli* 完全試験の両者から得られる MPN はよく一致することから暫定基準の指標細菌，すなわち faecal coliform organisms (*E. coli*) の MPN は EC 培地による確定試験の結果をもって表すことが推奨法として採択された[3]。その後米国保健教育福祉局の Fishbein は供試菌として，LST ガス陽性管より EC 培地に移殖し 44.5°C，48 時間培養でガスを産生した広い範囲から集められた冷凍食品由来菌並に屎便由来菌について研究し，*E. coli* は 44.9°～45.5°C で 92% 以上の菌株がガスを産生するに対し，Aerogenes 株ではわずか 2% に過ぎず，両グループの分別温度は 45.5°C にあることを報告 (1962)[5]，さらに各種の冷凍食品および nutmeat を検体として

44.5°C, 45.5°C 並に 24 時間, 48 時間培養について比較検討した結果, 44.5°C は 45.5°C に比し検出率においてはわずかながら勝る (4%) が, 特異性において 2～3 倍劣り, 24 時間と 48 時間培養では, 後者は検出率において 4.3% 勝るも, 特異性において 3.5 倍も劣ることから, EC・テストは 45.5±0.1°C, 24 時間で実施することを推奨し (1964)[6], この方法は現在 Association of Official Analytical Chemists (AOAC) の公定法として採用されている[7]。その他 Mackenzie *et al.* (1948)[8] は水の検査において, 推定試験に引きつづき 44°C における BGLB とペプトン水 (インドール検査用) による確定試験を推奨し, 英国食品衛生研究所 (The British Food Hygiene Laboratory) はこの方法を加工食品の *E. coli* 検査法として採用している。また Mossel (1962)[9] は乳, アイスクリームの検査において, 推定, 確定試験の双方に 44°C における BGLB を利用するとともに, 44°C におけるトリプトース水 (インドール検査用) による培養を補足することを推奨している。わが国では鈴木 (1963)[10], 佐々木 (1963)[11], 鈴木 (1965)[12], 坂井 (1965)[13], 渡辺ら (1966)[14], 務中 (1966)[15], 渡辺ら (1966)[16], 渡辺ら (1967)[17] などにより EC・テストの検討が行なわれているが, 坂井[13] が前記 Fishbein[5,6] の 45.5°C, 24 時間培養法を支持する以外はすべての研究者は Kelly *et al.* (1960)[3] の 44.5°C, 24 時間培養法を推奨している。なお鈴木[12] は比較的栄養の高い一般食品は選択・増菌培養を行なわず直接 EC 法による方が *E. coli* の検出率の高いことを指摘し, 務中[15] は牛乳に関する研究で, 乳糖量を 0.1～0.05% に減量した EC 培地を推奨し, 培養温度を 37°C から 1°C/hr の割合で上昇させ 7 時間後に 44.5°C にセットすることにより EC・テストでガス陰性の I 型以外の *E. coli* も短時間内に (10～12 時間) ガス陽性に誘引し得るとの興味ある報告を行ない, また渡辺ら[17] は選択培地として Streptomycin を 10mμ/ml 添加した SMEC 培地を考案し, *E. coli* I, II 型の選択性の顕著であることを報告している。一方 Raj & Liston (1961)[18], Hall *et al.* (1967)[19] などは EC・テストの精度に対し強く批判的な報告をしており, また Kelly[12] は海水・貝類以外の牛乳・乳製品などの一般食品中の大腸菌群は一般に発育に対する活性が高く *E. coli* 以外の Type も EC・テストにおいてガスを産生するとの意見をもち, 鈴木[12] は検体中に *Klebsiella* が多く存在する場合 EC・テストの信頼度は低下すると推察している。なお Fishbein[6] は高温培養は発育に対する活性を阻害するよりはむしろガス産生機序の阻害に大きく作用すると見ている。また坂崎 (1966)[20] は Coli-Aerogenes group に包含される多くの菌の人, 動物および自然界における実際的分布状況から, あるいは人, 動物, 水など由来を異にする菌株において本質的な相違点の認められないことなどから *Escherichia* 以外の菌を non-faecal coliform organisms とすることに反対し, また消化器系伝染病感染の危険防止の意味からも EC・テストを広く一般食品にまで濫用すべきでないことを強調している。なお最近 Fishbein *et al.* (1967)[21] は多数の冷凍食品について種々な方法を AOAC 法と比較検討した結果, 単に LST 培地での推定試験を 44°C, 24 時間で実施するのみで *E. coli* に対する最高の検出率が得られるとの注目すべき報告を行なっている。

今後衛生細菌学領域において, 坂崎[20] のごとき EC・テストの一般食品への応用についての是非論に関する研究の外に, 渡辺ら[17] のごとき培地に対する検索, 務中[15], Fishbein *et al.*[21] らのごとき検査時間の短縮, その他 EC・テストに関する各種ファクターについての研究など EC・テスト手技上の改良についての研究が必要であろう。本研究は現行の大腸菌群検査法[22] が少なくとも数日間を必要とし, しかも鑑別試験まで実施する場合は 10 日前後の日数を要して食品衛生行政上緊急を要する場合の利用価値の乏しいことから, わが国における食中毒発生状況から原因食品として最高の比率を占める魚貝類のうち, 特に生のまま摂食されるさしみについて緊急検査法の意味で EC・テストを取り上げ, まず従来法との比較, 選択・増菌培地としての BGLB および増菌手段を省略した場合 (直接法) について検討を行なったものである。

本研究の要旨は第 22 回日本公衆衛生学会 (大阪, 1965 年 10 月) において報告した。

検体及び実験方法

検体：まず予備的実験に供すべき検体として，1964年10月中旬より1965年2月下旬に至る冬期間を中心に函館市内の店舗で調理されたさしみを主体に前後9回（検体数 12），引きつづき本実験の供試験体として1965年4月下旬より9月中旬に至る夏期間を中心に北海道・道南地区の7保健所管内の店舗から10回（検体数 55），それぞれ約 300g 宛購入し，直ちに滅菌された容器に納め，ドライアイスを容れた携帯用容器によって実験室に運び実験に供した。

培養温度：EC 培地における培養は Fishbein (1962, 1964)[5,8] にしたがって 45.5±0.1°C に調節された恒温槽を使用した。なお EC・テストにおいては ±0.1～0.2°C のごとき厳重なる温度管理が要求されるところから，がわ国でも佐々木[11]，務中[15] らはドイツ Haake 社製恒温槽を使用しているが，近年国産品で十分その目的が達せられるようになり，多くは大洋科学社製サーモニット C-100 型，UP-50 型あるいは C-550 型が使用されている。著者らは UP-50 型および C-550 型を使用したが，予め多素子サーミスター自動温度記録計をもって実験室内における数カ所の空間および恒温槽内の各所の温度を同時に記録して槽内温度の調節状況を検査した結果，室内の空間においては位置によりかなりの温度差が認められる場合でも常に槽内温度は正確に維持され，また気温の日差の激しい季節には恒温槽を 25±2°C の恒温室に納置することにより完全に温度誤差を ±0.1°C 以内に管理することが可能であることを確め得た。

接種試料：Kelly *et al.* (1960) の推奨法[3] に準拠して，まず検体の約 200g と同重量の希釈液（リン酸緩衝滅菌生理的食塩水）を滅菌ブレンダーカップ中にとり，寒剤による冷却条件下で 14,000rpm, 90秒間で2倍希釈試料を作製し，その 2g と 8g の希釈液を混和して10倍希釈，その 1g と 9g の希釈液で100倍希釈，以下同様に10進法希釈を行ない，各希釈について5本1組の推定培地に 1ml 宛（2倍希釈は 2ml）接種し，これをもって各系列の接種量を 1g, 0.1g, 0.01g, 0.001g‥‥と算定した。なお Lear (1962)[23] は Kelly 法[3] に拠りブレンダーを使用 (14,000rpm, 2min.) して調成した soft-shell clam（かきの場合も同様である）の2倍希釈が均質化直後において平均 0.65g/ml，30分後で 0.75g/ml，60分後においても 0.8g/ml に過ぎず，これは均質化操作により発生する気泡によるもので MPN 測定上に誤差を与え，この誤差はその後の高度希釈により益々増大することを指摘し，その防止策として接種量を容量によらず重量によることおよび発泡防止剤の使用を勧告している。このようなことは緒言で述べたごとく，元来水質試験法を一般食品に応用することにより起る問題点の一つと考えられる。著者らは今回の実験を前述のごとく Kelly 法に準拠して実施したが，Lean[32] により提供された問題点については今後検討するつもりである。

検査法：Figure に示すごとく，推定試験においてガスの産生を認めた発酵管について従来法による大腸菌群検査およびこれに併行させた EC・テストを行なった。EC ガス陽性管については従来法通り EMB 培地への培養，釣菌，LB 培地への培養をつづけ，いずれの場合も同一の EMB 平板より釣菌した集落のうち1本でも LB 培地でガス産生を認めた場合は遡って該当する EC 培地あるいは BGLB を陽性として，その陽性管数から確定試験の MPN を求めるとともに，LB 陽性管からは再び EMB 平板培養により純粋培養を求め，各菌株について IMViC・テストを行ない，その結果 (++−−)，(−+−−) および (−−++) を示した菌株についてはさらに EC 培地による 45.5±0.1°C，24時間培養を行なって Table 1 により菌型決定を行ない，*E. coli* を証明した管数から *E. coli* MPN（完全試験）を求めた。

実験結果および考察

1. 予備的実験の成績

まず1964年10月中旬より1965年2月下旬に至る冬期間を中心に函館市内の店舗より購入した

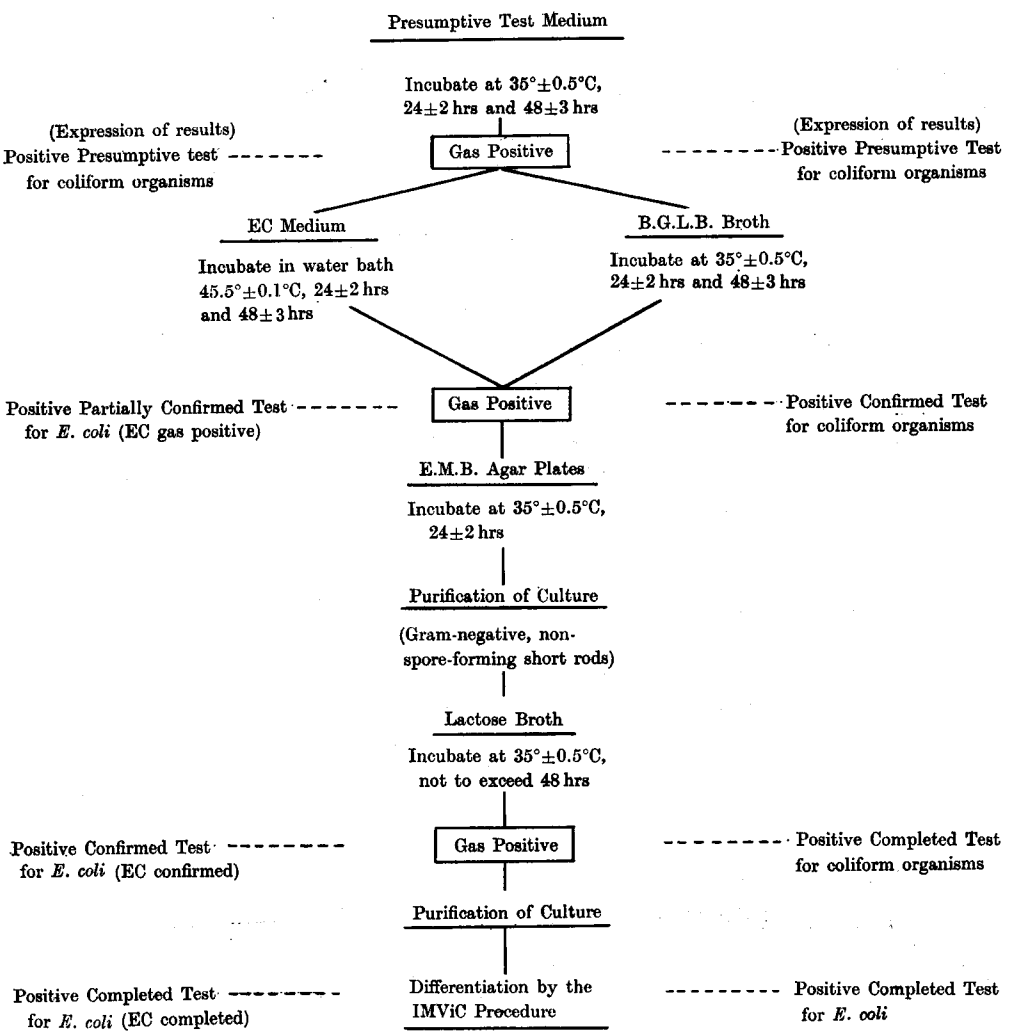

Figure. Liquid confirmatory procedure for the enumeration of *E. coli*

さしみを主体とする12検体について実施した予備的実験の成績はTable 2に示す通りである。Table 2の第1例のごとく coliform MPN 18,000 を越える汚染度の高いものが存在したが，確定試験での陽性管15本から求められた24菌株中には faecal coliform organisms，すなわち *E. coli* type は1株も存在せず，このような結果は第5および9例においても同様であった。また第4および10例を除き従来法の完全試験により求められる *E. coli* MPN は確定試験により求められる coliform MPN に比し一般にきわめて低い値を示した。これに対し EC 法における EC ガス陽性 MPN (確定試験) は，従来法における coliform MPN に比し遙かに低い値を示し，またこれらより求められる菌株はほとんど *E. coli* I 型で，したがって EC ガス陽性 MPN は *E. coli* MPN (完全試験) にほとんどの例において一致した。以後の実験結果においても同様であるが，従来法と EC 法の *E. coli* MPN は一般的に EC 法の方が若干高い傾向が認められることから EC 法の特異性は高く評価されるべき

Table 1. Classification of the coliform group

Type	Gas in medium at 45.5°C	Indole	M.R.	V.P.	Growth in citrate	Remarks column*	
						Type	Probable habitat
Escherichia coli group							
var. i (type I)	+	+	+	−	−	*Esch. coli*, type I, faecal	Human and animal intestine
〃 ii (〃 II)	−	−	+	−	−	*Esch. coli*, type II	Doubtful; possibly partly intestinal
〃 iii (〃 III)	−	+	+	−	−	Irregular, type I	Human and animal intestine
〃 iv (〃 IV)	+	−	+	−	−	Irregular, type II	Doubtful
Citrobacter freundii group							
var. i (type I)	−	−	+	−	+	Intermediate, type I	Mainly soil
〃 ii (〃 II)	−	+	+	−	+	Intermediate, type II	Mainly soil
Klebsiella aerogenes group							
var. i (type I)	−	−	−	+	+	*Klebs. aerogenes*, type I** *Klebs. cloacae****	Mainly vegetation
〃 ii (〃 II)	−	+	−	+	+	*Klebs. aerogenes*, type II	Mainly vegetation
〃 iii (〃 III)	−	−	−	+	−		
〃 iv (〃 IV)	+	−	−	+	+	Irregular, type VI	Jute and hemp yarm
Irregular group	Reactions variable					Irregular, other types	Doubtful

* C. S. Wilson and A. A. Miles (1964): *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, 5th ed., p. 2513. Edward Arnold, Ltd., London.

** Gelatin liquefaction (7 days): negative

*** 〃 〃 (〃): positive

Table 2. Preliminary examination of EC test

No.	Sample (Kinds of fish)	Date	Sampling place	Method	Liquid presumptive medium	MPN		No. of positive tubes	No. of isolates	Type (IMViC)						
						Confirmed test	Completed test (*E. coli*)			E_1	E_2	I_1	I_2	A_1	A_2	Irreg.
1	Halibut (*Hirame*)	Oct. 13, 1964	Hakodate	Current method EC test	LTB	>18,000 0	0 0	15 0	24 0	—	—	—	—	—	—	24
2	〃	Nov. 2, 1964	〃	〃	〃	1,700 330	490 330	10 6	25 12	12 12	1 —	— —	— —	8 —	2 —	2 —
3	〃	Nov. 19, 1964	〃	〃	〃	950 45	20 45	9 2	17 6	2 6	— —	— —	1 —	8 —	1 —	5 —
4	Bluefin tuna (*Maguro*)	Nov. 26, 1964	〃	〃	〃	9,200 9,200	9,200 9,200	13 13	39 26	22 26	— —	— —	1 —	3 —	8 —	5 —
5	Oyster (*Kaki*)	Dec. 2, 1964	〃	〃	〃	5,400 82	0 0	13 4	24 8	— —	— —	9 —	— —	6 1	9 7	— —
6	Bluefin tuna (*Maguro*)	Dec. 15, 1964	〃	〃	〃	790 20	18 20	8 1	19 2	— 2	1 —	4 —	1 —	8 —	— —	5 —
7	〃	Jan. 17, 1965	〃	〃	〃	460 0	40 0	7 0	22 0	—	2	6	—	8	4	2
8	〃	〃	〃	〃	〃	1,700 68	140 68	10 3	33 6	8 6	— —	9 —	5 —	5 —	— —	6 —
9	〃	Feb. 8, 1965	〃	〃	〃	1,300 0	0 0	9 0	31 0	—	—	11	2	5	3	10
10	〃	〃	〃	〃	〃	230 330	230 330	5 6	20 14	9 14	— —	— —	— —	4 —	— —	7 —
11	〃	Feb. 23, 1965	〃	〃	〃	170 0	20 0	6 0	18 0	—	1	10	—	1	2	4
12	〃	〃	〃	〃	〃	3,500 20	18 20	11 1	42 2	— 2	2 —	16 —	— —	12 —	2 —	10 —
Total				Current method EC test Total				116 36 152	314 76 390	53 68 121	7 0 7	65 0 65	10 0 10	68 1 69	31 7 38	80 0 80

ものと考えられる。しかしながら *E. coli* II 型の検出される検体においては，当然のことながら従来法は EC 法に比し高い *E. coli* MPN を示すことがある。この問題については後述することとする。なお Table 2 における検体については Kelly *et al.* (1960)[3] の方法にしたがって推定試験における選択・増菌培地として LTB (Lauryl Tryptose Broth, Difco) を使用した。

2. 本試験

予備的実験の成績には若干の疑義はあっても，EC 法は *E. coli* の検出法として特異性の高いことが認められたので，1965年4月下旬より9月中旬に至る夏期間を中心とする時期において，北海道・道南地区における7保健所管内の店舗よりさしみを主体とする 55 検体を入手し，これらについて予備的実験同様の試験を実施するとともに，推定試験における選択・増菌培地について若干の検討を行なった。

1. 従来法と EC 法の比較

この実験においては選択・増菌培地として，Kelly *et al.* (1960)[3] の方法の LTB の組成中 Tryptose を Polypeptone (大五栄養化学社製) に置き換えた培地 (LPB と呼称する) を供試した。Table 3 に示すごとく，従来法で得られる coliform MPN は EC 法の EC ガス陽性 MPN より常に相当高い値を示し，また全般的に従来法においては確定試験による MPN と完全試験による MPN が極端に異なるに反し，EC 法は EC ガス陽性 MPN と *E. coli* MPN とがよく一致し Table 2 における場合と同様であった。すなわち EC 法由来の 139 株のうち 136 株 (98.5%) は *E. coli* と判定され，それらはいづれも *E. coli* I 型であり，その他若干の菌株が *Klebsiella* と判定されたに過ぎない。この点 EC 法の false positive は *Klebsiella* による頻度が高いとする諸家[12,16,18] の報告によく一致する。これに対し従来法に由来する 431 株のうち *E. coli* と判定されたものはわづか 77 株 (17.9%) に過ぎず，そのうち *E. coli* II 型 17 株，III 型 5 株が存在した。従来法由来株で出現頻度の高いものは *Klebsiella* I および II 型，*Citrobacter* I および II 型で，また不定型 (Irregular type) もかなり多数検出され，*E. coli* に対する特異性は勿論認められなかった。このような所見は以後の実験においてもほぼ同様である。

次に予備的実験において指摘したごとく，一般的には EC 法による *E. coli* MPN は従来法による *E. coli* MPN より高い数値が得られるが，従来法において *E. coli* I 型以外の *E. coli* が検出される場合，従来法の *E. coli* MPN が EC 法の *E. coli* MPN より高い値を示すことがしばしば見られる。このことに関し，従来衛生細菌学の領域において *E. coli* I 型と称された IMViC(＋＋－－) のものは Table 1 に示す分類法では，EC・テスト陽性の *E. coli* I 型および陰性の III 型，また従来 *E. coli* II 型と称された (－＋－－) は EC・テスト陰性の II 型および陽性の IV 型と分類されている。したがって EC 法においては *E. coli* の II および III 型は検出されず，*E. coli* completed MPN には II および III 型は関与しない結果となる。ゆえに Table 3 の第 4, 6, 12, 14, 17, 23 例に見られるごとく EC 法による *E. coli* MPN が従来法による *E. coli* MPN より低い値を示す例においてはほとんどその原因が *E. coli* II および III 型に関連している。このことは *E. coli* I 型 (typical faecal *E. coli*) の出現頻度が他の II, III 型の出現頻度に比しはるかに高いことから影響は少いものと考えられるが，Kelly *et al.* (1960)[3] の指摘する MPN 値の低い検体において EC 法による MPN のバラツキがやや大であるという点に関連性があるように思われる。またこのことは従来の IMViC 分類法で菌型を決定した菌株を供試して EC・テストの精度について実験が行なわれる場合大きな誤りをおかすことになり注意を要する。

分類細菌学の一般法則から lactose-fermenting coliform bacilli を分類するような場合は別として，水の検査など衛生細菌学領域においてはそれらの生息場所，特に屎便系，非屎便系などそれらの来源を考慮に入れて分類されることが望ましい。前述のごとく坂崎[20] は一般食品の検査法として EC・テストを採用することに強い反対意見を表明しているが，一方 Wilson & Miles (1964)[24] の記載

Table 3. Comparison of the recovery of *E. coli* by EC test and current method

No.	Sample (Kinds of fish)	Date	Sampling place	Method	Liquid pre-sumptive medium	MPN		No. of positive tubes	No. of isolates	Type (IMViC)										Irreg.
						Confirmed test	Completed test (*E. coli*)			E_1	E_2	E_3	E_4	C_1	C_2	K_1	K_2	K_3	K_4	
1	Rockfish (*Soi*)	April 20, 1965	Esashi	Current method EC test	LPB	330 0	0 0	6 0	10 0	–	–	–	–	1	–	7	–	–	–	2
2	〃	〃	〃	〃	〃	28,000 0	0 0	12 0	24 0	–	–	–	–	1	–	14	4	–	–	5
3	Rockfish (*Yanagi-nomai*)	〃	〃	〃	〃	11,000 0	0 0	9 0	18 0	–	–	–	–	–	–	15	–	–	–	3
4	Greenling (*Ainame*)	〃	〃	〃	〃	400 0	180 0	2 0	2 0	–	1	–	–	–	–	–	–	1	–	–
5	Bluefin tuna (*Maguro*)	〃	〃	〃	〃	20 0	0 0	1 0	1 0	–	–	–	–	–	–	1	–	–	–	–
6	Oyster (*Kaki*)	〃	〃	〃	〃	5,400 200	612 200	11 1	20 2	2 2	–	3 –	– –	– –	– –	2 –	– –	13 –	– –	– –
7	Rockfish (*Soi*)	〃	〃	〃	〃	3,200 0	0 0	10 0	16 0	–	–	–	–	–	1	4	–	11	–	–
8	Halibut (*Hirame*)	May 10, 1965	Hakodate	〃	〃	680 0	0 0	3 0	4 0	–	–	–	–	1	–	3	–	–	–	–
9	Bluefin tuna (*Magnro*)	〃	〃	〃	〃	0 0	0 0	0 0	0 0											
10	Halibut (*Hirame*)	〃	〃	〃	〃	200 0	0 0	1 0	2 0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2
11	Bluefin tuna (*Maguro*)	〃	〃	〃	〃	450 0	0 0	2 0	4 0	–	–	–	–	2	–	2	–	–	–	–
12	Rockfish (*Soi*)	〃	〃	〃	〃	260 0	45 0	7 0	11 0	–	3	–	–	2	2	–	1	–	–	3
13	Bluefin tuna (*Maguro*)	〃	〃	〃	〃	2,700 0	0 0	7 0	15 0	–	–	–	–	–	–	13	2	–	–	–
14	〃	〃	〃	〃	〃	680 0	400 0	3 0	4 0	–	3	–	–	–	–	1	–	–	–	–
15	〃	〃	〃	〃	〃	550 0	0 0	3 0	4 0	–	–	–	–	–	–	2	1	1	–	–
16	Flounder (*Karei*)	June 7, 1965	Yakumo	〃	〃	0 0	0 0	0 0	0 0											
17	Halibut (*Hirame*)	〃	〃	〃	〃	390 0	100 0	9 0	14 0	–	7	–	–	7	–	–	–	–	–	–

18	〃	〃	〃	〃	〃	20 0	0 0	1 0	2 0	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—
19	〃	〃	〃	〃	〃	0 0	0 0	0 0	0 0											
20	Flounder (*Karei*), Halibut (*Hirame*)	〃	〃	〃	〃	2,500 790	0 790	13 8	26 16	— 16	— —	— —	— —	1 —	1 —	23 —	1 —	— —	— —	— —
21	Bluefin tuna (*Maguro*)	〃	〃	〃	〃	93 20	0 0	4 1	5 2	— —	— —	— —	— —	— —	— —	3 2	2 —	— —	— —	— —
22	Halibut (*Hirame*), Bluefin tuna (*Maguro*)	〃	〃	〃	〃	9,200 20	18 20	13 1	25 2	— 2	1 —	— —	— —	5 —	— —	18 —	1 —	— —	— —	— —
23	Bluefin tuna (*Maguro*)	〃	〃	〃	〃	3,500 20	45 20	13 1	24 2	1 2	1 —	— —	— —	3 —	— —	11 —	7 —	— —	— —	1 —
24	Pacific saury (*Samma*)	June 21, 1965	Imakane	〃	〃	810 700	45 700	14 8	22 16	2 16	— —	— —	— —	5 —	— —	9 —	— —	— —	— —	6 —
25	Flounder (*Karei*)	〃	〃	〃	〃	4,300 490	68 490	14 7	25 13	1 13	1 —	1 —	— —	2 —	1 —	6 —	3 —	— —	— —	10 —
26	Shrimp (*Ebi*)	〃	〃	〃	〃	3,500 45	45 45	11 2	19 3	3 3	— —	— —	— —	6 —	— —	8 —	1 —	— —	— —	1 —
27	Flounder (*Karei*)	〃	〃	〃	〃	810 20	20 20	14 1	28 2	2 2	— —	— —	— —	3 —	— —	21 —	2 —	— —	— —	— —
28	Yellowtail (*Buri*)	〃	〃	〃	〃	450 110	18 110	13 4	22 8	1 8	— —	— —	— —	1 —	— —	19 —	1 —	— —	— —	— —
29	Atka mackerel (*Hokke*)	〃	〃	〃	〃	>18,000 4,300	1,800 4,300	15 14	30 28	12 28	— —	— —	— —	1 —	— —	5 —	6 —	— —	— —	6 —
30	〃	〃	〃	〃	〃	16,000 5,400	320 5,400	14 12	26 24	18 24	— —	— —	— —	1 —	— —	6 —	1 —	— —	— —	— —
31	Greenling (*Ainame*)	〃	〃	〃	〃	>18,000 3,500	1,700 3,500	15 11	28 21	13 20	— —	1 —	— —	1 —	2 —	7 —	3 1	— —	— —	1 —
Total				Current method				240	431	55	17	5	0	43	7	200	38	26	0	40
				EC test				71	139	136	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
				Total				311	570	191	17	5	0	43	7	202	39	26	0	40

(Table 1 を参照) あるいは Bardsley (1938)[25], Stuart *et al.* (1942)[26] らによれば *E. coli* I 型, Irregular 1 型 (Table 1 による *E. coli* III 型) および一部の *E. coli* II 型 (Table 1 による *E. coli* II 型) の自然的生息場所は哺乳類の腸管と考えられている。また Taylor (1942, 1951)[27,28] によれば Intermediate-aerogenes-cloaca (I.A.C.) group はまだよくは解明されていないが, それらの生息場所は第一義的には腸管でないと考えられている。EC・テストにおいては Irregular II 型 (Table 1 による *E. coli* IV 型) はガス陽性であるが屎便や水ではほとんど検出されず, また *E. coli* II 型 (Table 1 による *E. coli* II 型) と Irregular I 型 (Table 1 による *E. coli* III 型) は EC ガス陰性であるが, Bardsly[25] はこれらのものは屎便中における大腸菌群フローラとしてはきわめて小部分に過ぎず, 実際的には問題にならないとしている。しかしながら坂崎[20] の指摘した意見はきわめて重要であり, 一般食品検査に EC・テストを採用する賛否については今後十分に検討される必要があるとともに, また EC・テストで検出し得ない *E. coli* II および III 型に対する衛生学的意義および務中[15], 渡辺ら[17] のごとき *E. coli* II および III 型の検出法についての検討も必要と考えられる。

ii. 推定試験用選択・増菌培地としての LTB と LPB の比較

次に Table 4 は推定試験における選択・増菌培地として Kelly *et al.*[3] の原法通りの LTB とその組成中の Tryptose を Polypeptone(大五栄養化学社製) に置き換えた LPB との比較を試みた結果であるが, この8検体の成績からはいづれが勝れているかを判定することは出来なかった。また従来法と EC 法の結果の比較については前述の場合とまったく同じ結果が得られた。

iii. 推定試験用選択・増菌培地としての BGLB と LPB の比較

緒言において述べたごとく EC・テストにおける推定試験用選択・増菌培地としては一般に LTB と BGLB が使用されている。Table 4 の結果から LTB と LPB の間に選択・増菌用培地としての精度において差違は認められなかったので, この実験においては LPB と BGLB との間における比較を行ないその結果を Table 5 に示した。すなわち coliform MPN, EC ガス陽性 MPN のいづれも BGLB は同等あるいはそれ以下の値を示し, *E. coli* MPN においても一般的には BGLB の方が低い値を示した。なお第8例の従来法において BGLB の方が高い値を示すのは前述したごとく *E. coli* II 型に起因するものである。

iv. EC 法と EC・直接法の比較

Table 6 は従来法の推定試験に LPB を使用し, EC 法においては選択・増菌培養を行なわず直接 EC 培地に試料を接種してテストした成績である。すなわち9月に入手した8検体については常に直接法において同等以上の高い値が得られた。このことは鈴木 (1965)[12] の指摘しているごとく汚染度の高い検体においては選択性の低い前培養における培地で *E. coli* が他型菌の増殖に圧倒されるためと考えられる。したがってこのような検体においてはむしろ推定試験を省略することが可能であり大腸菌検査の時間的短縮が期待される。

結　　言

食品衛生の立場から, 大腸菌群 (coliform organisms) をもって屎便汚染指標とする問題について永年論議されて来たが, 最近に至りその価値の低いことが指摘されている。また従来からの検査法は大腸菌群の定量試験のみでも数日を要し, さらに IMViC・テストまで実施して, *E. coli* MPN を求めるためには少なくも9日間以上の日数を必要とし緊急を要する場合の利用価値はきわめて乏しい。

著者らは米国において Kelly *et al.* (1960)[3] によって貝類の衛生取締に関連して研究・改良された EC・テストを Fishbein (1962, 1964)[5,6] の推奨する 45.5±0.1°C の恒温槽で, 主としてさしみに応用し, これに併行して実施した従来法と比較検討を行ないかつ推定試験における選択・増菌培地について若干の考察を試みた結果, 次のごとき知見を得た。

1) EC・テストの *E. coli* に対する特異性はきわめて高く, 従来法によるよりも *E. coli* の検出率は

Table 4. Comparison between LTB and LPB for liquid presumptive medium

No.	Sample (Kinds of fish)	Date	Sampling place	Method	Liquid pre-sumptive medium	MPN: Confirmed test	MPN: Completed test (*E. coli*)	No. of positive tubes	No. of isolates	Type (IMViC): E_1	E_2	E_3	E_4	C_1	C_2	K_1	K_2	K_3	K_4	Irreg.
1	Halibut (*Hirame*)	July 12, 1965	Hakodate	Current method	LPB	24,000	0	10	19	—	—	—	—	13	—	6	—	—	—	—
				EC test	〃	0	0	0	0											
				Current method	LTB	16,000	20	14	22	1	—	—	—	17	—	4	—	—	—	—
				EC test	〃	45	45	2	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	Bluefin tuna (*Maguro*)	〃	〃	〃	〃	92,000	0	13	21	—	—	—	—	13	1	4	2	—	—	1
						0	0	0	0											
						>18,000	0	15	22	—	—	—	—	17	—	1	4	—	—	—
						20	20	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	〃	〃	〃	〃	〃	>18,000	40	15	23	2	—	2	—	18	—	1	—	—	—	—
						68	68	3	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						>18,000	20	15	25	1	—	—	—	19	1	4	—	—	—	—
						78	78	3	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	〃	〃	〃	〃	〃	280	18	9	12	—	—	1	—	5	1	5	—	—	—	—
						20	20	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						470	0	10	12	—	—	—	—	4	2	3	1	—	—	2
						0	0	0	0											
5	Halibut (*Hirame*)	July 26, 1965	Kikonai	〃	〃	>18,000	40	15	29	1	1	—	—	21	—	1	2	3	—	—
						20	20	1	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						>18,000	18	15	29	—	1	—	—	26	2	—	—	—	—	—
						0	0	0	0											
6	Whale (*Kujira*)	〃	〃	〃	〃	160,000	610	13	21	5	—	—	—	6	—	4	3	3	—	—
						1,400	1,400	4	8	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						>180,000	2,300	15	20	5	2	—	—	7	—	2	1	—	—	3
						2,300	2,300	5	8	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	Japanese scallop (*Akazara-gai*)	〃	〃	〃	〃	140	20	6	9	1	—	1	—	1	2	2	—	—	—	2
						93	93	4	6	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						110	18	5	6	2	—	—	—	1	1	1	1	—	—	—
						170	170	5	10	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	Oyster (*Kaki*)	〃	〃	〃	〃	690	110	13	24	4	—	—	1	9	—	2	5	—	—	3
						130	130	4	7	6	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
						450	45	13	32	3	—	—	—	20	2	2	3	—	—	2
						45	45	2	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total				Current method				196	326	25	4	4	1	197	12	42	22	6	0	13
				EC test				35	55	54	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
				Total				231	381	79	4	4	2	197	12	42	22	6	0	13

Table 5. Comparison between BGLB and LPB for liquid presumptive medium

No.	Sample (Kinds of fish)	Date	Sampling place	Method	Liquid pre-sumptive medium	MPN Confirmed test	MPN Completed test (*E. coli*)	No. of positive tubes	No. of isolates	Type (IMViC) E_1	E_2	E_3	E_4	C_1	C_2	K_1	K_2	K_3	K_4	Irreg.
1	Bluefin tuna (*Maguro*)	Aug. 9, 1965	Kameda	Current method	LPB	>180,000	1,400	15	28	6	1	—	—	4	—	13	2	—	—	2
				EC test	〃	54,000	54,000	12	19	19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
				Current method	BGLB	>180,000	830	15	38	6	1	—	—	8	3	18	—	—	—	2
				EC test	〃	24,000	24,000	10	11	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	Yellowtail (*Buri*)	〃	〃	〃	〃	160,000	450	14	23	3	—	—	—	10	—	6	4	—	—	—
						780	780	3	5	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						8,100	200	14	26	1	—	—	—	11	—	12	2	—	—	—
						200	200	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	Bluefin tuna (*Maguro*)	〃	〃	〃	〃	>180,000	200	15	27	1	—	—	—	7	1	5	12	—	—	1
						450	450	2	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						160,000	400	14	27	4	—	—	—	6	—	8	8	—	—	1
						400	400	2	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	〃	〃	〃	〃	〃	>180,000	0	15	27	—	—	—	—	5	2	14	5	—	—	1
						450	450	2	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						160,000	180	14	27	2	—	—	—	6	—	14	4	—	—	1
						180	180	1	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	〃	〃	Yakumo	〃	〃	1,600,000	2,000	14	22	—	—	1	—	4	—	12	5	—	—	—
						0	0	0	0											
						540,000	0	12	23	—	—	—	—	2	—	13	7	—	—	1
						0	0	0	0											
6	〃	〃	〃	〃	〃	1,600,000	45,000	14	26	2	—	—	—	10	3	6	4	—	—	1
						45,000	45,000	2	3	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						540,000	0	12	21	—	—	—	—	12	2	4	1	—	—	2
						11,000	11,000	4	8	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	〃	〃	〃	〃	〃	160,000	7,900	14	29	12	—	—	—	6	2	2	5	—	—	2
						7,900	7,900	8	14	14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						160,000	1,700	14	28	10	—	—	—	6	3	7	—	—	—	2
						7,900	7,900	8	14	14	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	Halibut (*Hirame*)	〃	〃	〃	〃	>1,800,000	0	15	28	—	—	—	—	16	2	9	—	—	—	1
						2,000	2,000	1	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						>1,800,000	1,800	15	29	—	1	—	—	17	2	3	2	—	—	4
						0	0	0	0											
Total				Current method				226	429	47	3	1	0	130	20	146	61	0	0	21
				EC test				56	88	88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				Total				282	517	135	3	1	0	130	20	146	61	0	0	21

Table 6. Comparison between Kelly method and EC direct method

No.	Sample (Kinde of fish)	Date	Sampling place	Method	Liquid pre-sumptive medium	MPN Confirmed test	MPN Completed test (*E. coli*)	No. of positive tubes	No. of isolates	Type (IMViC) E_1	E_2	E_3	E_4	C_1	C_2	K_1	K_2	K_3	K_4	Irreg.
1	Shrimp (*Ebi*)	Sept. 3, 1965	Mori	Current method	LPB	54,000	0	12	23	—	—	—	—	7	3	8	3	—	—	2
				EC test	LPB	0	0	0	0											
				EC test	(—)	200	200	1	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	Bluefin tuna (*Maguro*)	〃	〃	〃	〃	35,000	200	13	23	1	—	—	—	14	1	2	1	—	—	4
						680	680	3	4	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						1,100	1,100	4	8	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3	Yellowtail (*Buri*)	〃	〃	〃	〃	79,000	4,500	8	16	—	2	1	—	9	—	2	—	2	—	—
						2,000	2,000	1	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						2,000	2,000	1	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	Bluefin tuna (*Maguro*)	〃	〃	〃	〃	>1,800,000	0	15	29	—	—	—	—	8	3	13	4	—	—	1
						0	0	0	0											
						2,000	2,000	1	2	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	Shrimp (*Ebi*)	Sept. 16, 1965	Imakane	〃	〃	4,900	0	7	11	—	—	—	—	6	—	2	2	—	1	—
						0	0	0	0											
						0	0	0	0											
6	Squid (*Ika*)	〃	〃	〃	〃	>18,000	200	15	35	—	—	1	—	17	7	6	4	—	—	—
						780	780	3	5	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						1,700	1,700	5	7	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	Bluefin tuna (*Maguro*)	〃	〃	〃	〃	160,000	220	14	25	1	—	—	—	19	1	1	2	—	—	1
						450	450	2	4	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						450	450	2	4	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
8	Flounder (*Karei*)	〃	〃	〃	〃	>180,000	360	15	28	1	1	—	—	19	7	—	—	—	—	—
						1,100	1,100	4	7	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
						1,100	1,100	4	6	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Total				Current method				99	190	3	3	2	0	99	22	34	16	2	1	8
				EC test				13	21	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				EC test (direct)				18	31	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
				Total				130	242	55	3	2	0	99	22	34	16	2	1	8

はるかに高いことが知られた。すなわち本実験に供した 67 検体について従来法による確定試験陽性管 877 管より分離された 1,690 菌株のうち *E. coli* と判定されたものは 230 株 (13.7%) であるに対し，EC ガス陽性管 211 管より分離された 379 菌株のうち *E. coli* は 368 株 (97.1%) であった。

2) EC ガス陽性管により算出される MPN は *E. coli* 完全試験より得られる *E. coli* MPN とほとんど同じ値が得られる。すなわち EC・テストによる定量試験は 2～3 日間を要するに過ぎず衛生行政上の価値はきわめて高い。

3) Kelly *et al.* (1960)[3] の原法に規定されている LTB の組成の Tryptose を Polypeptone (大五栄養化学社製) に置き換えても使用可能であるが，BGLB を代用する場合は求められる定量値は若干低いとことが予想された。

4) EC・テストは検体中に存在する *E. coli* II および III 型の検出が出来ない。しかしながら *E. coli* I 型の出現頻度は他の型に対して圧倒的に高いことからその影響は比較的少ないものと考えられるが，II および III 型を含有する検体の場合 EC completed MPN は従来法による *E. coli* MPN より低値を示すことがある。今後 *E. coli* II および III 型の衛生学的意義の検討が必要と思われる。

最後に，本実験に供した検体は EC・テストの精度を検査する目的で蒐集したものであり，したがって市販品としては不適当な程度に鮮度の低下しているものもあえて供試したことを附記して置く。

参 考 文 献

1) Mitchell, R., Yankofskey, S., & Jannasch, H. W. (1967): *Nature* **215**, 891.
2) U. S. Depertment of Health, Education and Welfare, Public Health Service (1946): *Manual of recommended practice for the sanitary control of the shellfish industry*. PHS Pub. 33.
3) ———, ———, ——— (1960): *Bacteriological criteria for market oysters*. Robert A. Taft Sanitary Engineering Center, Technical Report. F60-2.
4) Hajna, A. A., & Perry, C. A. (1943): *Am. J. Pub. Health* **33**, 550.
5) Fishbein, M. (1962): *Appl. Microbiol.* **10**, 79.
6) ——— & Surkiewicz, B. F. (1964): *Ibid.* **12**, 127.
7) Association of Official Analytical Chemists (1966): *Methods of Analysis, J. Assoc. Offic. Anal. Chemists* **49**, 246.
8) Mackenzie, E. F. W., Taylor, E. W., & Gilbert, W. E. (1948): *J. gen. Microbiol.* **2**, 197.
9) Mossel, D. A. A. (1962): *J. Appl. Bacteriol.* **25**, 20.
10) 鈴木 昭 (1963): メディヤ・サークル **47**, 359.
11) 佐々木 譲 (1963): 同誌 371.
12) 鈴木 昭 (1965): *Modern Media* **11**(5), 197.
13) 坂井 稔 (1965): 第22回日本公衆衛生学会総会・演説要録, 160.
14) 渡辺昭宣・伊藤連太郎・友野加智子 (1965): 食衛誌. **7**(6), 481.
15) 脇中昌己 1966): 広島大医誌. **14**(9·10), 489.
16) 渡辺昭宣・伊藤連太郎・友野加智子 (1966): 日獣会誌. **19**(12), 612.
17) ———・友野加智子・伊藤連太郎 (1967): 食衛誌. **8**(2), 141.
18) Raj, H. & Liston, J. (1961): *Appl. Microbiol.* **9**(2), 171.
19) Hall, H. E., Brown, D. F., & Lewis, K. H. (1967): *Ibid.* **15**(5), 1062.
20) 坂崎利一 (1966): メディヤ・サークル **11**(3), 73.
21) Fishbein, M., Surkiewicz, B. F., Brown, E. F., Oxley, H. M., Padron, A. P., & Groomes, R. J. (1967): *Appl. Microbiol.* **15**(2), 233.
22) 厚生省 (1959): 衛生検査指針. III-1.
23) Lear, D. W. (1962): *Appl. Microbiol.* **10**(1), 60.
24) Wilson, G. S., & Miles, A. A. (1964): *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*. 5ed. 2563p. London; Edward Arnold (Publishers) LTD.
25) Bardsley, D. A. (1934): *J. Hyg. Camb.* **38**, 309.
26) Stuart, C. A., Zimmerman, A., Baker, M., & Rustingian, R. (1942): *J. Bacteriol.* **43**, 557.
27) Taylor, C. B. (1942): *Ibid.* **42**, 23.
28) ——— (1951): *Ibid.* **49**, 162.