

衛生指標細菌としての大腸菌群

角野 猛*2

(Takeshi Sumino)

はじめに

食品の衛生細菌学的な良否を判断するために大腸菌群の検査が行われる。大腸菌群 (*Coliform organisms*) は乳糖を分解して酸とガスを産生するグラム陰性の好気性又は通性嫌気性桿菌と定義されている¹⁾。腸内細菌科 (*Family Enterobacteriaceae*) の大腸菌 (*Escherichia coli*), *Klebsiella*, *Enterobacter* 等の細菌はこの定義を満たす。しかし、病原性の強いサルモネラ菌属や赤痢菌は乳糖非分解性である。このように、本菌群は細菌分類学上の特定の細菌種を指すのではないので、大腸菌群の範疇に入る細菌はヒトや動物の糞便及び土壌等の自然界に広く分布している。

食品から大腸菌群が検出される意義は、その食品が直接又は間接的に糞便の汚染を受けた可能性があると判断される。大腸菌群自体が病原性を示すわけではないが、人や動物の糞便に由来する病原細菌が混入している恐れがあるという理由であり、そのような食品は衛生的には不良と判断される。

この食品衛生上の大腸菌群は古くから IMViC 反応 (インドール反応, MR 反応, VP 反応及びクエン酸の利用性) 等の各種性状から *E. coli* 型, *C. freundii* 型, *K. aerogenes* 型, *K. cloacae* 型及び *E. carotovorum* 型等以下の 9 菌型に分類されている¹⁾。

しかし、寺本ら²⁾は大腸菌群 2842 株について細菌分類学的な解析を行い、51 菌種を認めている。更に、*Escherichia coli* の中には乳糖遅又は非発酵性菌株があることなどを報告している。また、*E. coli* I, II, III 型菌を大便由来とし、他の菌型を環境由来として衛

生学的意義が判定される傾向がある^{3),4)}。しかし、人や動物の糞便から *C. freundii* 型も検出される。更に、大腸菌群の中には低温領域で良好に発育が見られるいわゆる低温性大腸菌群の存在が知られる^{5)~9)}。

従って、食品から大腸菌群から検出されたとしても衛生状態が極めて不良であったとは言いきれないが、本来は食品成分に含まれていない大腸菌群が検出されることはその原材料の取り扱い、製造過程、保存等において衛生的な処理がなされなかったと判断される。特に、高度な品質管理の行き届いた食品から検出されることは、その衛生的意義はより重要となる。本稿では食品の大便汚染指標細菌である大腸菌群について、その基本的な性質等について記述する。

1. 食品、環境及びヒト・動物糞便由来大腸菌群の菌型¹⁰⁾

食品、環境及び糞便等に由来する大腸菌群の菌型を明らかにすることを目的として、市販の食肉、スライスハム、惣菜類、漬物等 412 検体、土壌、河川水等の自然界 40 検体及びヒト、豚、馬、鶏等の家畜や家禽、更に動物園などで飼育されている動物の糞便 84 検体から大腸菌群をそれぞれ 2,800 株, 1,283 株及び 2,137 株を分離した。それらの各菌型の検出率を表 2 に示した。

食品及び環境由来菌株は *K. aerogenes* I 型が、それぞれ 27.8% 及び 19.8% で最も多かった。糞便由来の場合は *E. coli* I 型が 82.5% で最も多かった。なお、*E. coli* I 型の検出率は糞便と食品および糞便と環境の間に統計的に有意な差が認められた ($p < 0.05$)。更に、食品と環境の間にも検出率に有意な差が認められた。

ヒトや動物に由来する大腸菌群の菌型については多くの報告があり、*E. coli* I 型が最も多いことが知られ

* 「教材研究」について……これは、一般学会誌や研究会誌に見られる調理科学関係の論文の中から、学校における調理学習に出現する頻度の高いものを選んで、実技指導にすぐ役立つようにわかりやすく解説することを試みたものである。

*2 郡山女子大学

表 1. 食品衛生上の大腸菌群の分類

菌型	インドール反応	MR 反応	VP 反応	クエン酸の利用性	44.5°Cの発育	ゼラチンの液化
<i>E. coli</i> I	+	+	-	-	+	-
<i>E. coli</i> II	-	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> III	+	+	-	-	-	-
<i>C. freundii</i> I	-	+	-	+	-	-
<i>C. freundii</i> II	+	+	-	+	-	-
<i>K. aerogenes</i> I	-	-	+	+	-	-
<i>K. aerogenes</i> II	+	-	+	+	-	-
<i>K. cloacae</i>	-	-	+	+	-	+
<i>E. carotovorum</i>	-	-	+	+	-	+

表 2. 食品、環境及び糞便由来大腸菌群菌型 (%)

菌型	食品*	環境**	糞便***
<i>E. coli</i> I	6	10.5	82.5
<i>E. coli</i> II	2.0	6.7	2.0
<i>E. coli</i> III	1.3	3.4	1.9
<i>C. freundii</i> I	14.9	19.9	2.1
<i>C. freundii</i> II	5.3	9.7	2.2
<i>K. aerogenes</i> I	27.8	19.8	5.9
<i>K. aerogenes</i> II	5.5	3.7	1.6
<i>K. cloacae</i>	4.1	0.4	0
<i>E. carotovorum</i>	33.1	34.8	1.9
計	100.0	100.0	100.0

* 2800 株, ** 1283 株, *** 2137 株

ている。本実験においても同様な結果を得た。従って、食品から *E. coli* 型が検出されることは他の菌型よりも、より衛生学的意義が高いと考えられる。

2. 発育温度特性^{11),12)}

細菌の増殖曲線は誘導期、増殖促進期、対数期、増殖減退期、定常期、死滅促進期、死滅期及び死滅減退期に分けられる。

そこで、分離した大腸菌群の増殖曲線を温度勾配培養装置 (ADVANTEC 社製 TN 112 型) を用いて測定した。増殖菌量、誘導期の長さ、対数期の長さ等から相対的に判断した各菌型の最適発育温度は *E. coli* I 型は 35~41°C, *E. coli* II 型及び *C. freundii* I 型は 32~35°C, *E. coli* III 型, *C. freundii* II 型及び *K. aerogenes* 型は 32~38°C であった。一方、低温性大腸菌群の場合は 25°C~30°C であった。本実験において、*E. coli* I 型は 35°C~41°C であり、他の菌型よりも高温部に認められた。

なお、糞便内で絶対多数を占める *E. coli* I 型菌を検出する目的で EC テストが行われる。しかし、*K. aer-*

obenes 型, *C. freundii* 型の中にも 44.5°C で増殖し、十分に乳糖からガス産生能力を持つ変異株に注意しなくてはならない。また、低温性大腸菌群の至適増殖温度は上述の如く、25°C~30 度であり、中温性大腸菌群とは 2~16°C の温度差があり、さらに、両者には各増殖期の所要時間及び増殖菌量との相関関係において差が認められたが、以下の糖代謝に伴う各種有機酸生成においては両者の間には相違は認められなかった。よって、低温性大腸菌群は低温域で増殖可能な大腸菌群の変異株と推測した。

3. ブドウ糖中間代謝産物^{13)~15)}

いずれの菌型も乳酸、酢酸、ピルビン酸、ギ酸及びコハク酸が検出された。これらのうち、ギ酸の生成量は菌型により変動が著しく、*E. coli* 型及び *C. freundii* 型では 24 時間培養で痕跡程度であり、48 時間培養では検出されなかった。一方、*K. aerogenes* 型及び *K. cloacae* 型では 24 及び 48 時間培養でもその生成量は多く、*E. coli* 型及び *C. freundii* 型とは極めて対照的であった。そこで、大腸菌群各菌型のブドウ糖分解により生成された有機酸量を乳酸生成量に対する比を表 3 に示した。

表 3. 大腸菌群によってブドウ糖から生成された各種有機酸量

菌型	乳酸	酢酸	ピルビン酸	ギ酸	コハク酸
<i>E. coli</i> I	1.0	1.00	0.06	0.00	0.12
<i>E. coli</i> II	1.0	0.38	0.04	0.00	0.06
<i>E. coli</i> III	1.0	0.43	0.09	0.00	0.12
<i>C. freundii</i> I	1.0	0.37	0.05	0.00	0.17
<i>C. freundii</i> II	1.0	0.25	0.01	0.00	0.04
<i>K. aerogenes</i> I	1.0	0.12	0.12	1.64	1.00
<i>K. aerogenes</i> II	1.0	0.03	0.02	0.31	0.32
<i>K. cloacae</i>	1.0	0.07	0.03	0.51	0.44

注：乳酸量に対する生成比で示す。

衛生指標細菌としての大腸菌群

表 4. 腸内細菌科の細菌によってブドウ糖から生成された有機酸

菌種	乳酸	酢酸	ピルビン酸	ギ酸	コハク酸
<i>Escherichia coli</i> K-12	1.0	0.56	0.04	0.00	0.16
<i>Salmonell enteritidis</i> IID 604	1.0	0.19	0.03	0.01	0.17
<i>Proteus morganii</i>	1.0	0.46	0.18	0.00	0.27
<i>Proteus vulgaris</i> 12003	1.0	0.45	0.08	0.00	0.25
<i>Klebsiella pneumoniae</i> IAM 1130	1.0	0.29	0.05	0.00	0.05
<i>Serratia liquefacience</i>	1.0	0.32	0.03	0.02	0.17
<i>Hafnia alvei</i> IID 978	1.0	0.34	0.03	0.09	0.46
<i>Enterobacter cloacae</i>	1.0	0.07	0.33	1.27	0.63

注：乳酸量に対する生成比で示す。

E. coli I, II, III型の酢酸生成比はそれぞれ, 1.0, 0.38, 0.43, *C. freundii* I, II型もそれぞれ, 0.37, 0.25であり, これら菌群のブドウ糖代謝経路の中心は乳酸, 酢酸の形成系にあることが推測された。一方, *K. aerogenes* I, II型及び *K. cloacae* 型は酢酸生成比は小さく, ギ酸生成比がそれぞれ, 1.64, 0.31, 0.51と大きく, これら菌群のブドウ糖代謝経路の中心は乳酸, ギ酸の形成系にあることが推測された。

次に, 腸内細菌科の細菌について同様に見ると (表 4), *E. coli* K-12, *S. enteritidis* は乳酸・酢酸形成系, *E. cloacae* は乳酸・ギ酸系にあることが推測された。また, *H. alvei* はコハク酸生成比が大きく, 好氣的解糖が強く進行しているものと考えられた。

E. coli のブドウ糖分解に伴うガス産生については, Neuberg¹⁶⁾ は EMP 経路におけるピルビン酸の加水開裂によりギ酸, 酢酸が生成されることを明らかにし, この反応は無機リン酸及び Co-A が関与する加リン酸開裂によるものであることが Utter 等¹⁷⁾, Kalmisky 等¹⁶⁾, Chantrenne 等¹⁸⁾ により報告されている。また, 精製されたギ酸は, ギ酸放水素酵素及びギ酸脱水素酵素によって, CO₂ 及び H₂ に分解されることが, Woods, Quastel により明らかにされている。

大腸菌群各菌型のうち, *E. coli* I型は他の菌型と 44.5°C におけるブドウ糖からのガス産生能, いわゆる EC テストで区別される。しかし, 金井等は²⁰⁾ *E. coli* I型菌のうち 44.5°C で増殖するが同温度ではガス非産生の菌が動物糞便中に約 10% 存在し, この *E. coli* I型菌の糖代謝はピルビン酸からギ酸, 酢酸を形成する酵素が同温度で不活性化されたものと報告した。以上の点から大腸菌群のブドウ糖代謝経路のうち, ピルビン酸からアセチルリン酸, ギ酸, ギ酸から CO₂, H₂ への分解経路は最も変化しやすいものと考えられた。

次に, 代謝経路を中心として腸内細菌との関連性を推察した。

すなわち, *E. coli* I ~ III型の有機酸生成量は腸内細菌科の細菌 *E. coli* K-12, *S. enteritidis*, *K. pneumoniae* と同様であった。*Salmonella* と *Escherichia* は乳糖分解の有無で区別されるが, *Escherichia-Salmonella* 型として乳酸, 酢酸, ギ酸, CO₂, H₂ 及びアセトインを生成する点で共通性がある¹⁹⁾。なお, *Salmonella* の中でも *S. typhimurium*, *S. garllinarum* はガス非産生菌であることから, ピルビン酸加リン酸分解酵素及びギ酸分解酵素の両方あるいは, いずれかを持たない菌種と考えられる。

また, *C. freundii* I, II型は *E. coli* 型と同様に, 乳酸, 酢酸が多かった。本菌型の IMViC 反応は *Salmonella* と共通であること^{21), 22)}, さらに, *Escherichia* と *Salmonella* は遺伝的に近縁関係にあることが知られるので, *C. freundii* 型は *E. coli* 型と同様な衛生学的意義があるものと判断された。

次に, *K. aerogenes* 型と *K. cloacae* 型は乳酸, ギ酸が多い点で *Enterobacter cloacae* と同様であった。*Enterobacter* 属はその性状が, *Hafnia* 及び *Serratia* とよく類似していることが報告されている²³⁾。本実験でも *H. alvei* 及び *S. liquefacience* ともその有機酸生成様式は *E. cloacae* 同様に, 乳酸, ギ酸が中心であったが, 37°C, 48 時間培養すると乳酸, 酢酸が中心となり, Cowan²³⁾ が指摘するように培養条件の影響を強く受けるものであった。これらのことから, 大腸菌群の *K. aerogenes*, *K. cloacae* と分類される菌型と腸内細菌科の *E. cloacae*, *H. alvei*, *S. liquefacience* は糖代謝が類似しているものと推測された。

大腸菌群の菌型検査において, 上記のタイプいずれにも分類されない *Atypical* なものが見られる。その有機酸生成形式を見ると 3つの型に分けられた。それらのうち, IMViC 反応が - + + -, - + + +, + + + +, + + + - となる *Atypical* I 型は MR 反応と VP 反応がいずれも陽性の点で共通性がみられた。そこで, こ

れらについて VP 反応を陰性として菌型を見ると、それぞれ、*E. coli* 型、*C. freundii* 型に該当することになる。従って、*Atypical* I 型はその有機酸性生成様式から判断して、*E. coli* 型や *C. freundii* 型がアセチルメチルカルピノール生成能を獲得したものと推測された。

また、大腸菌群各菌型の増殖に伴い生成される有機酸量を見ると、いずれの菌型とも 3~6 時間では共通性があり、菌型特有の有機酸生成パターンは認められず、6~9 時間培養以後、*E. coli* 型と *C. freunsii* 型はギ酸の減少と共に、ガス産生量は少なくなった。一方、*K. aerogenes* 型はギ酸生成量、ガス産生量とも多くなった。これらのことから、ピルビン酸の加リン酸開裂反応によって、ギ酸とともに生成される酢酸は *E. coli* 型、*C. freundii* 型の場合は 6~9 時間以後にギ酸生成より酢酸生成の方向へ強く進行しているものと推測された。一方、*K. aerogenes* 型と *K. cloacae* 型は同培養時間以後ギ酸生成の方向へ強く進行しているものと推測された。

4. 菌体脂質²⁴⁾

菌体成分のうち、脂質組成が菌種によって特徴があること、及び脂質組成と微生物の増殖との関連性が指摘されている^{25),26)}。そこで、大腸菌群各菌型の特性及び中温性と低温性大腸菌群の特性を明らかにすることを目的として菌体脂質を調べた。

50 株の供試菌の菌体脂質はいずれも $C_{16:0}$ が最も多かったが、 $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $C_{17:0}$ 、 $C_{18:1}$ の組成比によって表 5 に示すように、4 タイプに分けられた。

これを腸内細菌科の細菌と比較すると、*E. coli* 型の 63.6% は *Salmonella* や *E. coli* と類似していた。脂肪酸組成はグラム陽性菌と同陰性菌では異なることが報告され、陰性菌は藍菌類と類似し、 $C_{16:0}$ が最も多いことが知られている^{27),28)}。本調査結果も $C_{16:0}$ が最も多く類似していた。

木村は³⁰⁾ 不飽和の脂肪酸の増減に最も影響を与え

る外的環境として温度があることを指摘している。また、培養温度が低くなると不飽和脂肪酸が増加することが報告されている³⁰⁾。本実験でも低温性大腸菌群は 30°C 培養では $C_{16:0}$ が最も多く、中温性大腸菌群と同様な脂肪酸組成を示したが、低温になると、 $C_{16:1}$ 及び $C_{18:1}$ の不飽和脂肪酸の割合が増加し、5°C 培養では $C_{16:1}$ が最も多くなった。従って、低温域で発育可能な大腸菌群は細胞膜が物質の供給と排泄等の機能を果たすために低温でも適当な流動性を保持しているものと考えられる。なお、栗飯原らは³¹⁾ 低温菌の培養温度が低いほど脂質の脂肪酸側鎖が短くなると述べ、これは融点を下げる効果があることを報告している。さらに、低温菌の特徴はその膜構造にあることを指摘している。これらのことから、低温性大腸菌群は低温でも発育可能なように、細胞膜の脂質組成を代えて物質の透過性が維持できるように適応しているものと考えられた。

5. 食品における大腸菌群に関する規格基準³²⁾

大腸菌群及び *E. coli* について規格基準が設定されている食品は以下の通りである。

清涼飲料水及び粉末清涼飲料水は成分規格として陰性、氷雪、氷菓の成分規格として陰性、食肉製品の乾燥食肉製品は成分規格として *E. coli* 陰性、非加熱食肉製品と特定加熱食肉製品は *E. coli* 最確数 100/g 以下、加熱食肉製品は大腸菌群陰性、鯨肉製品の成分規格として大腸菌群陰性、(魚肉すり身を除く)、ゆでだこの成分規格として大腸菌群陰性、生食用かきは保存基準として *E. coli* 最確数 230/100g 以下、更に、冷凍食品の無加熱摂取冷凍食品、加熱後摂取冷凍食品の成分規格として大腸菌群陰性の規格基準が設定されている。

おわりに

食中毒の病因物質はサルモネラ、腸炎ビブリオが以前と同様に多い。しかし、最近の特徴は貝類を原因と

表 5. 脂肪酸組成による大腸菌群の分類

菌型 型	<i>E. coli</i> I	<i>E. coli</i> II	<i>E. coli</i> III	<i>C. freundii</i> I	<i>C. freundii</i> II	<i>K. aerogenes</i> I	<i>K. aerogenes</i> II	<i>Atypical</i>	計
I	2	3	1	5	1	5	2	0	19
II	11	3	0	6	2	2	1	2	27
III	0	0	1	1	1	0	0	0	3
IV	1	0	0	0	0	0	0	0	1
計	14	6	2	12	4	7	3	2	50

衛生指標細菌としての大腸菌群

するノロウイルスや微好気の状態で良好な発育が見られるカンピロバクターを病因物質とするものが著しく増加してきたこと、施設別発生件数は家庭での発生が食堂に次いで多く見られること、冬期間にも食中毒が多発すること等である。これらの原因としては生活様式の変化、食生活の多様化及び食品衛生に対する注意度の散漫等が考えられる。更に、食材、調理器具及び調理操作等に対する衛生的な取り扱いが不適切なことによるものが大きいと考えられる。

大便汚染指標菌としての大腸菌群の検出方法は簡便化され、滅菌装置や特殊な技術も必要なく行うことが出来る。そこで、食に関する基本的な衛生教育の中に、大腸菌群検査等の細菌学的なものを取り入れ、小さいころから食品の安全な取り扱い等に関する教育を充実する必要があるものとする。

文 献

- 1) 厚生省環境衛生局 (1973), 食品衛生検査指針 I, 107~119, 日本食品衛生協会 (東京)
- 2) 寺本忠治, 坂崎利一 (1984), 食品及び環境から分離された大腸菌群の分類学的解析, 食衛誌, 25, 322~328
- 3) 坂崎利一 (1970), 医学の立場から見た大便汚染指標菌としての大腸菌, モダンメディア, 16, 308~312
- 4) 鈴木益彦 (1972), 大腸菌群に関する食品衛生学的研究, 麻布獣医大研究報告, 24, 85~101
- 5) 金子精一 (1975), 鮮魚に存在する大腸菌群の衛生学的意義, ニューフードインダストリー, 17, 3, 9~15
- 6) Schultze, W. D and Olson, Jr. J.C. (1960), Studies on psychrotrophic bacteria II Psychrotrophic coliform in stored daily products, J. Daily Sci., 43, 351~357
- 7) 佐伯和昭, 他 (1971), 低温性大腸菌群の冷蔵魚における増殖, 食衛誌, 12, 2, 95~99
- 8) 堀江進, 他 (1972), 低温性大腸菌群の山岳地における分布, 13, 5, 405~409
- 9) 堀江進, 他 (1975), 土壌における低温性大腸菌群の分布, 16, 5, 324~329
- 10) 角野猛, 等々力達也 (1988), 食品, 環境および糞便由来大腸菌群について, 日本公衛誌, 8, 365~377
- 11) 角野猛, 小暮八穂子 (1979), 低温性大腸菌群の発育に及ぼす培養温度の影響, 家政誌, 30, 571~
- 12) 角野猛 (1980), 大腸菌群各菌型のブドウ糖中間代謝産物について, 家政誌, 31, 546~552
- 13) 角野猛 (1981), 大腸菌群 Irregular 型のブドウ糖中間代謝産物について, 家政誌, 32, 322~325
- 14) 角野猛, 小暮八穂子 (1981), 大腸菌群の発育とブドウ糖分解について, 家政誌, 32, 326~329
- 15) 角野猛, 小暮八穂子 (1980), 低温性大腸菌群の乳糖分解について, 家政誌, 31, 59~63
- 16) 片桐秀郎編, 生化学講座 (1964), 11, 82~118
- 17) Utter, M. F. et al (1946), Reversibility of the phosphoroclastic split of pyruvate, J. Biol. Chem., 158, 521~531
- 18) Chantrenne, H. and Lipman, F. (1950), Coenzyme a dependence and acetyl donor function of the pyruvate-formate exchange system, J. Biol. Chem., 187, 757~767
- 19) 平戸勝七編 (1968), 獣医微生物学, 14~24, 養賢堂 (東京)
- 20) 金井美恵子, 他, EC テストにおけるガス非産生の大腸菌のギ酸形生性, 食衛誌, 16, 225~229
- 21) 吉野敏行 (1965), 大腸菌と赤痢菌の間に発現する線毛発現能について, 日細菌誌, 20, 609~616
- 22) 蜂須賀養悦, 辻川次郎 (1970), 多糖類と赤痢菌群と共通抗原を有する分離菌について, 日細菌誌, 25, 95~103
- 23) Cown, S. T. (1978), Manual for the identification of medical bacteria 2nd ed., 坂崎利一訳, 139~157, 近代出版 (東京)
- 24) 角野猛, 会田久仁子, 島貫光治郎, 等々力達也 (1989), 大腸菌群の脂肪酸組成について, 日本公衛誌, 2, 115~119
- 25) 駒形和男編 (1982), 微生物の化学分類実験法, 155, 学会出版センター (東京)
- 26) 三浦利之 (1987), 食中毒細菌と脂質, 油化学, 36, 77
- 27) 松本亮, 三輪匡雄 (1971), 細菌の脂質, 油化学, 20, 678~686
- 28) 柳田友道 (1983), 微生物科学 1, 304, 学会出版センター (東京)
- 29) 木村修一 (1971), 脂肪酸の不飽和と鎖長延長一生物の栄養形態および環境との関連で一, 油化学, 20, 670~677
- 30) 高橋甫, 他共訳, 微生物学 (上) 原書第 4 版, 342, 培風館 (東京)
- 31) 栗飯原景昭, 矢野信礼 (1970), 食品衛生の微生物, 175, 朝倉書店 (東京)
- 32) 日本食品衛生学会 (12003), 食品・食品添加物規格基準, 食衛誌, 44, 1, J 18~J 25