

示した。コリラート培地 (Idexx 製) をあらかじめ滅菌した50ml試験管に入れ、試料水50mlを注入し、溶解した後、37℃、24時間培養し黄変したものを酵素法陽性とした。また、紫外線照射 (366nm) により蛍光を示したものを MUG 陽性とした。

(2) 酵素法陽性菌の分離および同定

酵素法により陽性を示した培養管から1白金耳を採り、DHL 寒天培地に塗抹したのち37℃で24時間培養した。成長したコロニーの形態の異なるものを選び、1試料から1～4個ほど釣菌してガゼイン・ソイ混合ペプトンブイヨン培地に接種し、8～12時間培養したのちガゼイン・ソイ混合ペプトン寒天培地に接種し、保存菌株とした。保存菌株はTSI寒天、SIM、VP半流動、シモンズ・クエン酸の各試験培地に接種し、基本的な性状を確認したのち、腸内細菌同定キット (バイオテスト1号、栄研化学) により菌種の同定を行った。なお *Kluyvera* 属の菌種の同定はアスコルビン酸ナトリウム発酵試験[®] によって行った。

(3) 分離菌株の大腸菌群試験

保存菌株少量をガゼイン・ソイ混合ペプトンブイヨン培地に接種して8～12時間培養したのち、ガゼインソイ・混合ペプトン寒天培地に接種して8～12時間培養した。これ

表1 試料別の大腸菌群試験結果

	試料数	A	B	C	D
水道原水	44	23	4	0	17
水道浄水	41	1	0	0	40
地下水	48	13	1	1	33
河川水	8	8	0	0	0
その他	8	3	0	0	5
合計	149	48	5	1	95

A: 酵素法陽性、LB-BGLB 法陽性

B: 酵素法陽性、LB-BGLB 法陰性

C: 酵素法陰性、LB-BGLB 法陽性

D: 酵素法陰性、LB-BGLB 法陰性

をLB培地およびコリラート培地に接種し、以下(1)と同様に試験した。なお、コリラート培地は脱イオン水で溶解、濾過滅菌し、小試験管に3ml分注したものをを用いた。

試料別の大腸菌群試験結果を表1に示した。全149試料のうち、酵素法およびLB-BGLB法共に陽性だったものは48試料、共に陰性だったものは95試料で、両試験方法で結果が一致したものは全体の約96%であった。また、酵素法陽性、LB-BGLB法陰性であったものは5件、その逆は1件であった。

酵素法陽性試料から分離された菌種を表2示した。腸内細菌同定キットにおけるONPG試験陽性のものを、便宜

表2 酵素法陽性診療から分離された細菌種

ONPG 陽性菌	試料数
<i>Citrobacter freundii</i>	11
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	17
<i>Escherichia coli</i>	16
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
<i>Kluyvera ascorbata</i>	3
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	4
<i>Serratia fonticola</i>	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	5
<i>Serratia marcescens</i>	4
unidentified species	4
ONPG 陰性菌	試料数
<i>Morganella morganii</i>	1
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1
<i>Proteus vulgaris</i>	2
<i>Proteus mirabilis</i>	1
<i>Providencia alcalifaciens</i>	1
<i>Providencia stuartii</i>	1
unidentified species	10

的に酵素法陽性原因菌とみなした。その結果、*Enterobacter cloacae* が最も多く検出され、次いで *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* が多く検出された。ONPG試験陽性菌のうち、*Plesiomonas shigelloides* のみがオキシダーゼ陽性菌であり、明確に大腸菌群の定義からはずれる種であった。ONPG陰性の菌も酵素法陽性試料から分離され、*Proteus* や *Providencia* などが主な分離菌であり、 β -ガラクトシダーゼを有しない菌種も酵素法の培地に生育することがわかった。

両試験方法による結果が一致しない試料からの分離菌種を表3に示した。酵素法陽性、LB-BGLB法陰性のものは、*Enterobacter* および *Kluyvera* 属の菌であった。酵

表3 酵素法とLB-BGLB法で不一致を示した試料からの分離菌

酵素法陽性: LB-BGLB法陰性	試料数
<i>Enterobacter agglomerans</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	2
<i>Kluyvera ascorbata</i>	1
unidentified species	1
酵素法陰性: LB-BGLB法陽性	試料数
<i>Escherichia coli</i>	1

表4 酵素法陽性試料からの分離菌の大腸菌群試験陽性株数

	株 数	酵素法	MUG	LB	BGLB	試験不可	不一致
ONPG 陽性菌							
<i>Citrobacter freundii</i>	11	11	0	10	10	0	1
<i>Enterobacter agglomerans</i>	3	3	0	0	0	0	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	19	18	0	4	3	1	15
<i>Escherichia coli</i>	17	17	15	16	16	0	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2	0	2	2	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	3	0	3	3	0	0
<i>Kluyvera ascorbata</i>	3	3	0	0	0	0	3
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	4	3	0	0	0	1	3
<i>Serratia fonticola</i>	1	1	0	1	0	0	1
<i>Serratia liquefaciens</i>	5	5	0	0	0	0	5
<i>Serratia marcescens</i>	5	4	0	0	0	0	4
unidentified species	4	4	0	1	1	0	3
ONPG 陰性菌							
<i>Morganella morganii</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	1	0	0	0	0	1	0
<i>Proteus vulgaris</i>	2	0	0	0	0	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Providencia alcalifaciens</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Providencia stuartii</i>	1	0	0	0	0	0	0
unidentified species	10	0	0	1	1	3	1

酵素法：特定酵素基質法 MUG：4-メチルウンベリフェリル- β -D-グルクロニド分解による蛍光

LB：乳糖ブイヨン培地法 BGLB：プリリアントグリーン乳糖胆汁ブイヨン培地法

素法陰性、LB-BGLB 法陽性の試料について、BGLB 培地から酵素法陽性の試料同様に分離し、菌種の同定を行った結果、*E. coli* であった。この試料の LB-BGLB 法による最確数は 2/100ml であったことから、この不一致は Edberg らが指摘したと同様な試料水中の細菌の不均一分布に由来するサンプリングエラーによるものであると考え³⁾。

酵素法および LB-BGLB 法による分離菌株の試験結果を表 4 に示した。分離菌は 94 株で、保存中に死滅した 6 株を除いて 88 株を試験に用いた。これらの中で 48 株が両試験方法で一致した結果を示した（一致率 55%）。不一致であった菌は、*Enterobacter* 属、*Kluyvera ascorbata*、*Serratia* 属、*P. shigelloides* であり、ほぼ酵素法のみで陽性となった。分離菌のうち *Enterobacter* 属の菌の株数が多いことが一致率の低下の主たる原因である。逆に、*C. freundii*、*E. coli*、*Klebsiella* 属は、ほぼ両法の試験結果が一致していた。また、*E. coli* を特異的に検出する方法である MUG 試験は、*E. coli* 17 株中、2 株が陰性であった。

今回の結果では、一致率は 96% と高い値が得られ、これまでに報告されたものと同レベルであった^{3,8,9)}。酵素法は

大腸菌群でありながら従来法では検出できない *Enterobacter*、*Serratia* 属なども検出できるので、従来法と比べ優れた方法と言える。大腸菌群に明確に含まれない *P. shigelloides* が、今回の結果では酵素法で陽性を示した。この菌種は病原微生物の範中に入り¹⁾、飲料水としての安全性を考えると、大腸菌群陽性と判断しても何ら問題はないと思われる。しかしながら、菌種によって両法の陽性率がかなり異なっているので、例えば、最確数で大腸菌群の菌数を求める場合には、両試験方法の検査結果はかなりの違いがでることが予想される。酵素法はあくまでも飲料水の大腸菌群のスクリーニング試験として開発された経緯があり¹⁾、その他の目的で酵素法を用いる場合は従来法などの結果との比較検討が必要であると思われる。

文 献

- 1) Edberg, S. C. et al. : Appl. Environ. Microbiol., 54, 1595 (1988)
- 2) Edberg, S. C. et al. : Appl. Environ. Microbiol., 55, 380 (1989)
- 3) Edberg, S. C. et al. : Appl. Environ. Microbiol.,

- 55, 1003 (1989)
- 4) Edberg, S. C. *et al.* : Appl. Environ. Microbiol., 56, 366 (1990)
- 5) 厚生省生活衛生局水道環境部監修：上水試験方法，日本水道協会 (1993)
- 6) 古畑勝則他：東京都立衛生研究所年報，42, 194 (1991)
- 7) 平田強他：水道協会雑誌，61(11)，27 (1992)
- 8) 渕祐一他：大分県衛生環境センター年報，21,50 (1993)
- 9) 京都市衛生公害研究所：京都市衛生公害研究所年報，60, 135 (1994)
- 10) Farmer, J. J., III, *et al.* : J. Clin. Microbiol., 13, 919 (1981)
- 11) Sakazaki, R. *et al.* : Jpn. J. Med. Sci. Biol., 12, 355 (1959)