

# 乳肉より分離された緑膿菌の血清型別と酵素産生能について

雨宮 淳三・リムセンキヤツツ・佐藤 平二

(昭和 50 年 8 月 30 日 受理)

## Serological and Enzymatic Investigation of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Milk and Meat

Junzo AMEMIYA, Lim Seng KIAT and Heiji SATO

(Laboratory of Veterinary Public Health)

### 緒 言

緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) は近年、獣医領域においても感染症例が増加しつつあり Lusis らの総説<sup>9)</sup> に詳しい。わが国においても菊地<sup>5)</sup>、野宮<sup>12)</sup>、大前<sup>17)</sup>、Shimizu<sup>15)</sup> らの報告があり、乳房炎、ミンク、実験動物などにおいて看過し得ない病原性菌として注目されるようになった。特に本菌が早くから菌交代症の原因菌の一つとして知られ、近年本菌が伝達性薬剤耐性因子 (R 因子) をもつことが明らかにされるにおよび<sup>4,8,3)</sup> その方面からも強い関心もたれるようになっている。*Pseudomonads* は低温でも発育するものがあり乳肉の品質に影響を与え、乳肉衛生の面からも重要な意味をもっている。著者らは緑膿菌感染に対する有効なワクチンをつくる目的でわが国の家畜における緑膿菌の分布と菌型を知るための調査を行なっているが、今回は生乳、牛乳房炎材料、各種条件下の豚肉および膿瘍よりの緑膿菌の分離を試み、分離菌の血清型を調べ、さらに食品衛生と関係するとされる菌の生物学的活性<sup>2,6)</sup> とくにプロテナーゼ (ゼラチナーゼ、カゼイナーゼ) とリパーゼの産生能について検査したのでその結果を報告する。

### 実験材料および実験方法

#### A. 材料および採取方法

1. 生乳：鹿児島市内のミルクプラントに搬入された畜舎別集乳罐より、10 ml の生乳を滅菌試験管に採取した。また種子島における乳房炎罹患牛からも法のごとく乳汁を滅菌容器に採取した。

2. 豚肉：鹿児島市食肉センターで解体された直後のものと、5°C に冷蔵されたものの表面を滅菌ガーゼまたは綿棒でふきとり、普通ブイヨン中で 37°C 一夜増菌した。また病巣を認めた場合は患部を 70% アルコールで清拭したのち、なるべく無菌的に内容物をと

り分離培養を行なった。

#### B. 菌の分離と同定

生乳材料と豚病巣由来の材料は増菌せず枝肉由来の材料は一夜ブイヨンで増菌ののち市販の NAC 培地平板に塗抹培養し、緑、青緑、黄緑、または茶褐色の集落をつくるものを拾いグラム染色で陰性の桿菌をさらに法に従いオキシダーゼ陽性、グルコン酸酸化反応陽性 (モリブデン酸法<sup>11)</sup>)、カタラーゼおよび 42°C での発育陽性、シモンズ培地上でクエン酸利用能陽性のものを *Pseudomonas aeruginosa* と同定した。これらの菌は Sato<sup>14)</sup> らの方法により Lanyi<sup>7)</sup> の標準血清に対して concavity slide 凝集反応を行なって血清型別を行なった。

#### C. 酵素活性試験

分離菌の蛋白分解能としてはゼラチン、カゼインに対する作用を調べ、脂肪分解能はリパーゼ活性試験を行なった。

1. ゼラチナーゼ活性：ゼラチン分解能の試験は Smith<sup>16)</sup> の方法を参考とし、一部修正した方法を用いた。すなわち被検菌をブレインハートインフュージョンブロスに 37°C 24 時間、培養したのち 10,000 rpm 30 分間遠心沈殿し、上清を Tris 緩衝液で 10 倍、5 倍、3 倍、2.5 倍に希釈し、その 5 ml を小三角コルベにとり同量の 10% ゼラチン溶液に加え 20 分間、incubate したのち 100°C 1 分間加熱し、ただちに 0°C の冷水で 37°C に冷却し 37°C でオストワルド粘度計による流速測定を行ない粘度の減少からゼラチナーゼの有無を決定した。相対粘度は下記の式により比較した。

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0}$$

$\eta_{rel}$  : 相対粘度

$\eta$  : 溶液粘度

$\eta_0$  : 溶媒粘度

2. カゼイナーゼ：カゼイナーゼの測定は坂崎<sup>13)</sup>の方法を参考にした。すなわち 10% リトマスミルク培地に同量の 2 倍濃度酵母エキス寒天培地を 50°C に保ち均等に混合し、ペトリ皿に厚さ 2 mm の平板をつくり、ブレインハートインフュージョンブロス 37°C 一夜培養の菌を穿刺培養した。12 時間ごとに接種菌によって作られる透明環を測定してその半径でカゼイナーゼの比較を行なった。しかし、この透明環のうち塩化第二水銀液を滴下して透明環の消失するものはカゼイナーゼ陰性とした。

3. リパーゼ活性：リパーゼの活性は Boissonnas<sup>(14,15)</sup>の方法によって測定した。5 cc ずつ分注した 6 本のブレインハートインフュージョンに被検菌を 37°C で培養し、24 時間おきに 1 本ずつ取り、3,000 rpm 10 分間遠沈し、その上清 1 cc を 5 ml 基質混合液にまぜて、20°C 9 分間 water bath で反応させたのち冷却し、0.02 N の苛性ソーダで滴定し、滴定量 1 ml を 100 Lipase Unit とした。

基質混合液は次の組成から成る。すなわち Tween 20: 50 ml, フェノールレッド: 10 ml, 0.2 M 酢酸ソーダ: 100 ml, 蒸留水: 90 ml。

#### 実験成績および考察

##### A. 緑膿菌の検出および分離菌の型別

それぞれの由来を異にする検体より分離された緑膿

菌の分離成績を一括して Table 1 に示しているが生物学的性状のうち他の性状は条件を満たしたが 42°C で発育しなかったものは *Pseudomonas fluorescens* とした。生乳中の緑膿菌は二回の検査の結果、188 検体中 43 株 (22.8%) の割合に検出され同時に 16 株 (8.5%) の *Ps. fluorescens* も分離された。分離緑膿菌の血清型は 9 型におよび型別不能が 2 株あった。そのうちでも、高い頻度を示したものは Group 1, (以下 G 1 と略す) 3 および 7 であった。すなわち分離全株に対してそれぞれ 31%, 19% および 14% を占めた。種子島における牛乳房炎より分離された緑膿菌の型別では緑膿菌による乳房炎は 68 例中 4 例で 5.8% でありその型別によれば G 1 によるもの G 3 によるもの、それぞれ 2 例ずつであった。大前<sup>17)</sup>らの乳房炎由来緑膿菌が多くを型を示していることからみても、この成績で血清型と病気との関係について結論を下すには例が少なすぎるので、さらに多数例について検討したい。

次に解体直後の豚枝肉表面より 6 回にわたり分離された成績では 271 検体より 184 株 (検体の 67.8%) の緑膿菌が分離され、同時に 25 株 (検体の 9.2%) の *Ps. fluorescens* が分離された。検査の日時による分離菌の菌型に多少の変動はあるが通算すると、10 型の血清型が枝肉表面に分布することが明らかにされた。そしてその血清型の出現頻度をみると、G 1,

Table 1. Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from milk and pork.

Materials	No. of specimens	No. of strains	Lanyi's serogroups													UC*	No. of <i>Ps. fluorescens</i>
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Milk	188	43 (22.8%)	14	2	8	1	4	1	6		2		3			2	16 (8.5%)
Mastitis milk	68	4 (5.8%)	2		2												
Fresh meat	271	184 (67.8%)	46	7	36	10	45	17	11	4		2		1	5	25 (9.2%)	
Refrigerated meat	119	23 (19.3%)	1	2	5	3	3	2	3		1	3				17 (14.2%)	
Lung abscess	23	11 (47.8%)			3		3				4					1	3 (13.0%)
Subcutaneous abscess	31	15 (48.3%)					7	6			2						2 (6.6%)
Total	700	280	63	11	54	14	62	26	20	4	9		8		1	8	63
Frequency of serotype (%)			22.5	3.9	19.3	5.0	22.1	9.2	7.1	1.4	3.2		2.8		0.3	2.8	

\*: untypable

G5, G3, G6の順序となり、生乳の場合に比べると、生乳でのG5が少ないのがやや異なるようであるが、出現頻度の多い上位4型は同様である。これに対して5°Cに冷蔵された枝肉表面の*Ps. aeruginosa*は5回にわたる119頭での成績では緑膿菌は23株(検体の19.3%) *Ps. fluorescens*は17株(検体の14.2%)そして19株の緑膿菌は9型に分布した。すなわち解体直後のものと比べると著しい相違は一般的に冷蔵により多くの緑膿菌が死滅するらしく、とくにG1が冷蔵肉から消失していることが注目された。しかし現時点ではG1と低温の間にはいかなる関係があるかは検討していない。もし、このように冷蔵により緑膿菌が減少するのであれば、冷蔵肉における緑膿菌の衛生上の意義は限定されるのではないかと思われる。次に解体豚の肺膿瘍病巣から分離された緑膿菌をみると3回にわたる23例での検索の結果11株(検体の47.8%)の*Ps. aeruginosa*が分離され、その血清型はG9, G5, G3および分類不能の4型に分かれた。興味をひいたこととしてはこれまでの出現頻度の著しく少ないG9が肺膿瘍から分離されたことである。また*Ps. fluorescens*と思われる3株が肺膿瘍から分離されたことは本菌が非病原性であるとされる点からは興味があるが42°Cにおける発育能を失なった緑膿菌である可能性も強い。皮下膿瘍から分離された緑膿菌の成績は31頭中15例(検体の48.3%)の*Ps. aeruginosa*と*Ps. fluorescens*の2株(検体の6.6%)が分離された。この場合もG9が出現したが、G5, G6に属するものが多数を占めた。このことからG9は健康部位には少ないが病原性が疑われる菌なのではないかと想像され、今後詳しくしらべる必要があると思われる。また豚の膿瘍中からかなり高い頻度に緑膿菌が分離されたという事実は他の病原

菌と混合感染という例が多かったが、これらが相互にどのようにかかわりあっているのかははなはだ興味深い。緑膿菌の分離に際し700検体から63株(9%)の*Ps. fluorescens*が分離され、冷蔵肉に比較的高率であったことは、*Ps. fluorescens*を42°Cで発育せぬものと分類したことから、好冷性と関連があるのかも知れない。また病巣より本菌が他の菌と随伴して分離されたことは本菌が非病原性とされていたことから考えると意外であるが何らかの役割を果たしているのか、あるいは単に混在しているのかは興味がある。

**B. 酵素作用**

1. ゼラチナーゼ活性：由来を異にする緑膿菌の培養上清中のゼラチナーゼ活性を測定した結果はTable 2にまとめてあるが、牛乳由来の菌はゼラチナーゼ陽性のものが多いのに対して、解体直後生肉由来の菌はすべて陰性であったことが注目された。これは日越ら<sup>2)</sup>の生乳由来の*Pseudomonads*は生肉由来のものに比し蛋白、脂肪分解能を示すものが多いといっている成績とやや似た傾向といえようが、冷蔵肉由来の緑膿菌ではゼラチナーゼ陽性と陰性が同数であったことの意義は明らかではなかった。ただ注意されたことは、同じ由来で同一血清型に属する菌株はゼラチナーゼの有無がすべて同様の結果を示したことでこの点に関しては今後さらに検討してみたい。

2. カゼイナーゼ活性：由来を異にする分離緑膿菌からなるべく各血清型を含むように株をえらびカゼイン分解能をしらべた結果はFig. 1に示したが供試24株は何れもカゼイン分解能があるが一般に生肉由来のものが生乳由来のものに比してやや強い活性をもつように思われた。病巣由来の6株中、乳房炎由来の1株と豚膿瘍由来の1株が強い活性を示したが、とくに乳房炎の原因緑膿菌にカゼイン分解能が強いものが多い

Table 2. Gelatinase-activity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from milk and pork.

Lanyi's serogroup	Strains isolated from											
	Milk		Mastitis		Fresh meat		Refrigid. meat		Lung abscess		Subcut. abscess	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1	3	0	0	1	0	3	0	3				
2	1	0			0	3		3				
3	3	0	0	1	0	3	2	0	0	1		
4	1	0			0	3	0	2				
5	2	0			0	3	3	0	0	1	0	1
6	0	1			0	3	0	3			0	1
7	0	3			0	3	3	0				
9	3	0			0	3			0	1	0	1
11	3	0			0	1						

のならばその病原性との関係を知る上で興味があり、今後、この点に留意して研究する必要があると思われる。

しかし血清型とカゼイン分解能にとくに関係があるとは思われなかった。

### 3. リパーゼ活性：異なる由来の27株について

リパーゼ活性をしらべた成績は Fig. 2 に示した。緑膿菌のリパーゼ活性の曲線には3通りのパターンがあるように思われる。すなわち、日数の経過とともに活性が増し、6日目に降下するもの、2日目または3日目に最高値を示し以下降下するもの、そして変動を続けながら6日目以降も活性を失なわないものにと大別さ

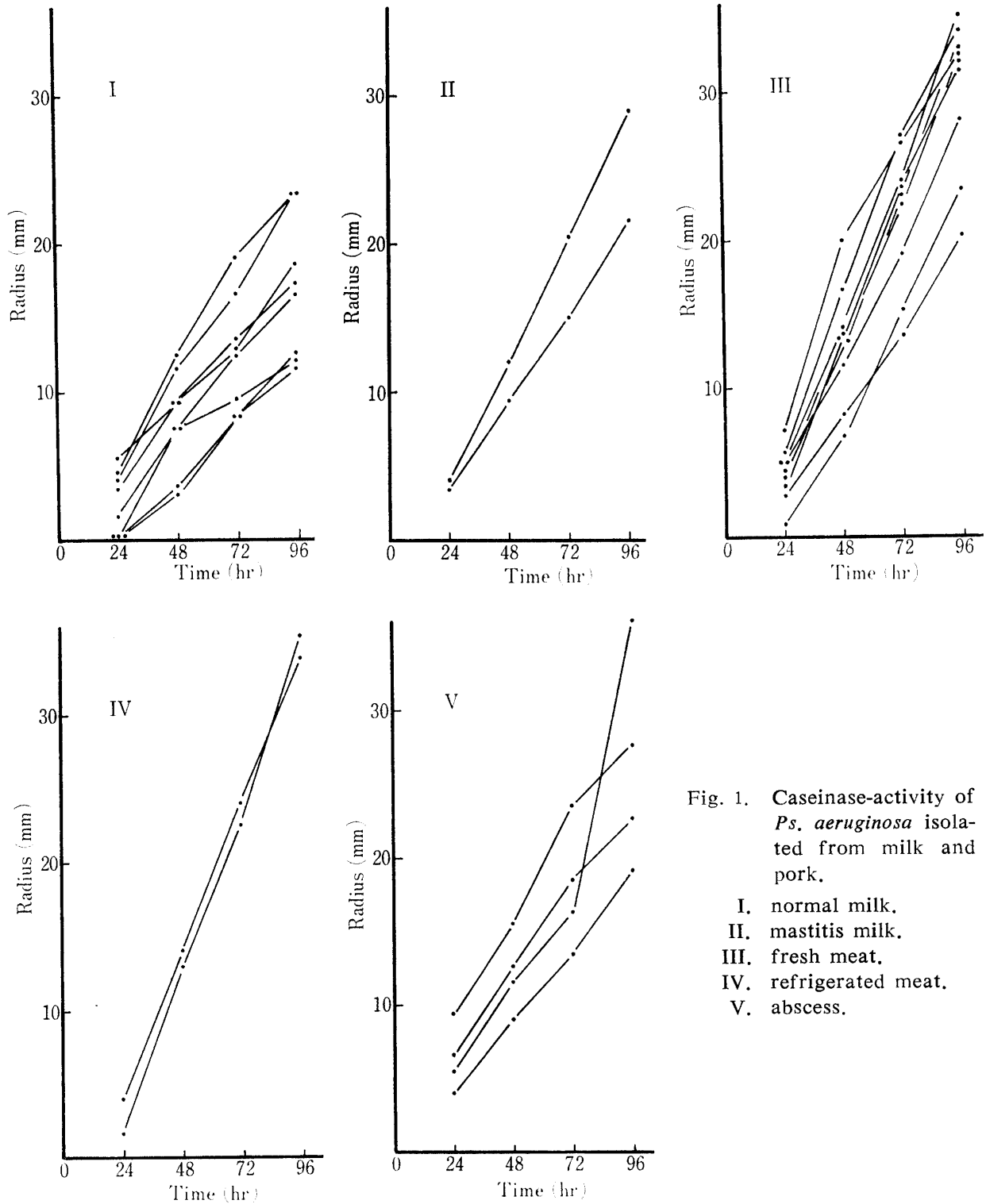


Fig. 1. Caseinase-activity of *Ps. aeruginosa* isolated from milk and pork.

- I. normal milk.
- II. mastitis milk.
- III. fresh meat.
- IV. refrigerated meat.
- V. abscess.

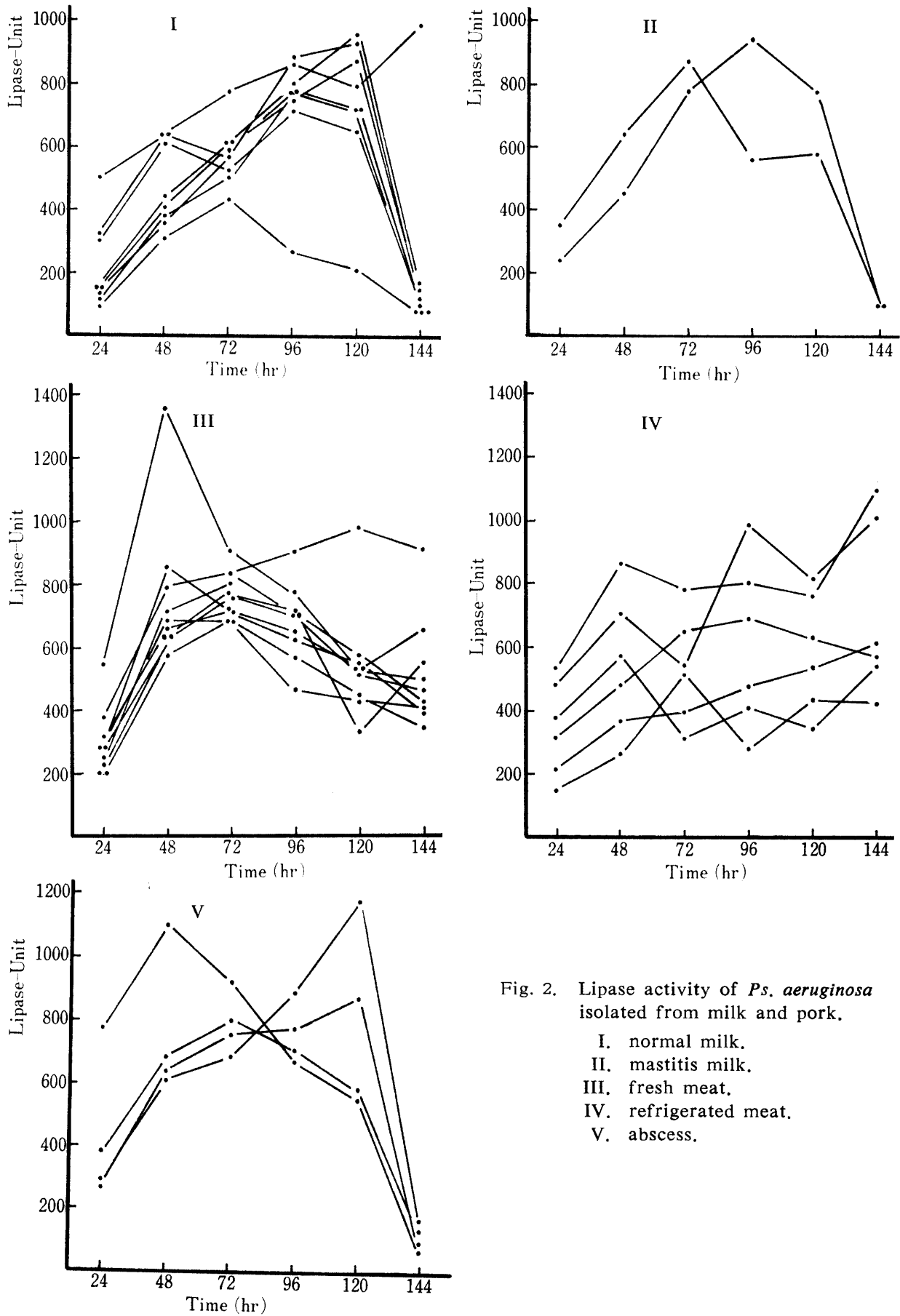


Fig. 2. Lipase activity of *Ps. aeruginosa* isolated from milk and pork.

- I. normal milk.
- II. mastitis milk.
- III. fresh meat.
- IV. refrigerated meat.
- V. abscess.

れた。概観すると生乳由来の緑膿菌は第一の型に属し、豚肉由来のものは第二、第三の型に属するが膿瘍由来以外の豚肉由来菌は6日目にいたるものもリパーゼ活性を示すものが多く、とくに冷蔵肉より分離されたものはリパーゼ活性を持続するような傾向があった。乳房炎、生肉由来のものと膿瘍由来の菌株の中3株のとくに強い活性を示したものがあったが、これらが病原性とかかわるかどうかは今後の検討による。

以上の酵素産生能の比較では酵素能は菌の生棲部位に強く影響されているように思われた。

### 要 約

1. 生乳および生豚肉、牛乳房炎、豚の膿瘍病巣を含む700検体より280株の *Pseudomonas aeruginosa* と63株の *Pseudomonas fluorescens* を分離した。

2. 分離された緑膿菌は Lanyi の標準血清による凝集反応による分類を行なった結果、鹿児島地域では12血清型と未分類のものが分布していることが明らかにされた。

3. 緑膿菌の各血清型別から分離頻度の高かったものを順にあげると、Group 1, 5, 3, 6, の順であり、この血清型に属するものは205株で全株の73.2%を占める。

4. 豚の膿瘍から分離された緑膿菌は Group 9 に属するものが25%に達し、健康材料から分離されたものと比較して著しく G 9 の検出頻度が高く Group 9 型のもは豚に対して病原性をもつことが推察された。

5. 分離緑膿菌について培養液中のゼラチナーゼ、カゼイナーゼ、およびリパーゼの活性を測定した結果、その活性は分離の由来に関係するようである。

6. ゼラチナーゼ分解能については由来を同じくする同じ血清型に属する株は活性の有無について同じ傾向を示すことが明らかにされた。

謝辞 稿を終えるにあたり、本研究の一部は文部省科学研究費によって行われたことを附記し、謝意を表します。検体採取で中種子町一氏明治氏、野尻盛喜氏、鹿児島食肉センター検査員諸氏に謝意を表します。

### 文 献

- 1) 新井武利・桑原章吾：日本細菌学雑誌，**23**，493-494 (1968)
- 2) 日越博信・浜田輔一：日本獣医学雑誌，**34**，135 (1972)
- 3) 伊予部志津子・布施愛索・蓮田勝美・三橋進：日本細菌学雑誌，**28**，81 (1973)
- 4) Kawakami, T., Mikoshima, F., Nagasaki, S. and Matumoto, H.: *J. Antibiotics*, **15**，607-609 (1972)
- 5) 菊地英夫・稲田幸吉・大田原重雄：日本獣医師会誌，**26**，409-410 (1973)
- 6) 黒木治夫・江原 茂・赤司 景：同上，**22**，303-306 (1969)
- 7) Lanyi, B.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **13**，295-316 (1967)
- 8) Lowbury, E. J. L. and Babb, J. R.: *Lancet*, **No. 7784**，941-944 (1972)
- 9) Lysis, P. I. and Soltys, M. A.: *Vet. Bull.*, **41**，169-176 (1971)
- 10) 京都大学農学部農芸化学教室：農芸化学実験書，**Vol. 1**，163-165，産業図書 (1957)
- 11) ————：同上，**Vol. 2**，621-623 (1957)
- 12) 野宮文三：日本細菌学雑誌，**27**，641-645 (1972)
- 13) 坂崎利一：培地学各論，**Vol. 1**，110-112，納谷書店 (1968)
- 14) Sato, H. and Diena, B. B.: *Canad. J. Microb.*, **20**，473-476 (1974)
- 15) Shimizu, T., Homma, J. Y., Aoyama, T., Onodera, T. and Noda, H.: *Infection and Immunity*, **10**，16-20 (1974)
- 16) Smith, H. L. and Goodner, K.: *The Jefferson med. college Bull.*, **76**，662-665 (1958)
- 17) 大前憲一・寺門誠致・小山敬士・小枝鉄雄・畦地速見・清水健：日本獣医師会誌，**27**，386-390 (1974)

### Summary

An increasing incidence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in man and domestic animal has been reported elsewhere. It has become very important to limit the incidence of *Ps. aeruginosa* infection by immunological means, since *Ps. aeruginosa* has a low sensitivity to antibiotics and wide distribution around animal-feeding-environment. Furthermore, *Ps. aeruginosa* in milk and meat is suspected of playing a role in food-hygiene.

This paper deals with the serotyping of strains isolated from milk, pork-meat and purulent or mastitis materials around Kagoshima area carried out to determine the distribution-pattern and the predominant serogroup of *Ps. aeruginosa* found therein, using a modification of Lanyi's serogrouping-scheme. Several enzymatic activities such as gelatinase, caseinase and lipase of isolated strains were also investigated in connection with milk and meat-hygiene-control.

The results of serological typing of the 280 strains of *Ps. aeruginosa* isolated from 700 specimens consisting of milk, mastitis milk, fresh pork meat, refrigerated meat and abscess, showed that the predominant serogroups were Groups 1, 5, 3 and 6 with the following frequencies 22.5%, 22.1%, 19.3% and 9.1%. These four serogroups represented 73.2% of all strains.

There was no noticeable correlation between serogroups and the source of isolation, excepting conceivable relevance between swine-abscess and serogroup 9. Six out of 25 strains isolated from swine-abscess belonged to Group 9 with frequency of 23%, while it remained as low as 3.2% through all the strains isolated.

It seems that enzymatic activity of isolated *Ps. aeruginosa* considerably pertains to the source from which the strains were isolated rather than to serogroups. Gelatinase activity, however, of the strains belonging to the same serogroup showed similar enzymatic activity so long as the strains isolated from the same kind of source are concerned.