



Title	大腸菌族鑑別の一便法 : Imvic systemに代わるM. M. V. G. systemについて
Author(s)	中原, 呉郎
Citation	長崎大学風土病研究所業績 3. p.974-980, 1954
Issue Date	1954-12-25
URL	http://hdl.handle.net/10069/4865
Right	

This document is downloaded at: 2020-10-28T17:37:58Z

大腸菌族鑑別の便法

— Imvic system に代わる M.M.V.G. system について —

長崎大学風土病研究所病理部（主任：登倉教授）

中 原 呉 郎
なか はら るう

前 書

衛生細菌学的水質検査は、(1) 推定試験 = presumptive test, (2) 確定試験 = confirmed test, (3) 完全試験 = completed test という3段階によつて行われるが、畢竟、乳糖陽性 = lactose-positive の集落について、それが糞便汚染 = faecal pollution に由来するかどうか、換言すれば、*Escherichia* 属であるか、*Aerobacter* 属であるか、それが最重要な判定の根拠になる。*Escherich* (1885) の発見以来、近年に至る研究によつて、大腸菌群 = colon group の複雑性は益々強調されて来たが、現在、(系統細菌学的分類方法は別として、) 実用的見地から見て、*Escherichia* 属と *Aerobacter* 属とを鑑別するためには、Parr (1936) の謂う IMViC なる記憶符号 = mnemonic で現される4反応による方法が一般に用いられている：I = indole ; M = methyl-red ; V = Voges-Proskauer ; C = citrate であつて、i は音便 = euphony に他ならない。この検査系列に従えば、++-- が *Escherichia coli* の定型であつて、--++ が *Aerobacter aerogenes* の定型である。しかし、実際には、indole 陰性又は methyl red 陰性の *Escherichia* の非定型も見られ、Voges-Proskauer 陰性又は citrate 陰性の *Aerobacter* の非定型も見られる他、中間型 = intermediates として4反応の諸種の配合によつて数多の型を生ずる。Parr (1936) は、16型の出現が可能であるが、最頻繁に遭遇するのは、++-- (typical

coli), --++ (atypical *coli*), +-+- (intermediate), --++ (typical aerogenes) であると述べている。

IMViC の検査成績によつて判定すれば、*Escherichia coli* においては、Voges-Proskauer (-) と同時に methyl red (-) が定義的な性質であつて、indole 及び methyl-red に就いては、++(I), +- (II), +- (III) という3型がある。*Aerobacter aerogenes* にあつては、indole (-) と同時に methyl-red (-) が定義的な性質であつて、Voges-Proskauer 及び citrate については、++(I), +- (II), --(III) という型を生ずる。Voges-Proskauer と citrate とが同時に揃つて陰性でない株、indole と methyl red が同時に揃つて陰性でない株、すなわち、定義的に見て、*Escherichia* 群でも *Aerobacter* 群でもないものは、全部中間型 (intermediates) として9型が挙げられている。

IMViC の方法は、現在、大腸菌族の鑑別のために一般に容認されているし、Stuart, Griffin & Baker (1938) も、また、Vaughn & Levine (1942) も、*Escherichia intermediates*, *Aerobacter* に分類する事に賛成している。また、糞便系 = faecal strain は、原則として、硫化水素を産生するという属性を持つているし、*Escherichia coli* と *Aerobacter aerogenes* の集落の外観の相違も著明であるという事実もある。*Escherichia* を糞便系 = faecal strain

と見做し、*Aerobacter*を非糞便系=nonfaecal strain と見做すことは、原則的には正しいけれども、*Aerobacter*も偶発的に糞便から出ることであつて、Stuart (1941)は *Aerobacter*の糞便系・非糞便形を鑑別する方法はないと述べている。Parr (1938)は、No hope is offered for short cuts or simplifications in the bacteriology of water and foods……と述べてはいるが、IMViCの方法にしても、成績判定上曖昧な場合もあり、中間型が何処から来たのかを判断するのに悩まされる場合もある。衛生細菌学的水質検査における大腸菌族の鑑別のために一層簡便で適確な方法が考案されてもよいと思う。

(1) Indole testのこと

諸種の細菌が tryptophane から indoleを産生するという事実は、Kitasato (1889)以来、細菌生理学の上に幾多の業績を生んだが、系統細菌分類学への応用にかけては、不確実な不満足な点も免かれなかつた。しかし、爾來、Zipfel (1912), Frieber (1912), Fellers & Clough (1925), Kulp (1925), Koser & Galt (1926)等の研究の結果、それは細菌分類の補助手段として信頼すべき地位を占めるに至つた。現在一般に賞用されているのは、Gnezda (1899), Böhme(1905), Goré(1921), Holman & Gonzales(1922), Kovács(1929/32)等の方法である。Indoleの定量的証明のためには Happold & Hoyle(1934)の方法が知られている。Reed (1942)の報告によれば、二三の細菌においては、indoleが産生されるよりも崩壊することが速いために、“a false negative reaction”が起り得るといふ。IMViC検査系列においては、indole(-)が *Aerobacter*群と同定するための絶対条件ではあるが、indole(-)の *Escherichia*の非定型もあるので、indole反応だけで両群を鑑別できないことは言うまでもない。

(2) Methyl-red test のこと

Coli-typhoid groupの腸管細菌の産生する酸度を滴定することは、Petrushky(1889/90)

の研究に始まり、Smith(1895)は aerogenesが coliに較べて酸産生の遙に弱いことを知り、Michaelis & Marcora(1912)は、coliが乳糖を分解して pH=5.0 に及ぶ酸を作ることを証明し、Clark & Lubs(1915)は、coli-typhoid groupの鑑別のために、methyl-redを標示剤として用いる方法を考案した。Dextrose phosphate peptone waterに5日培養の後、この標示剤を加えると、高濃度の水素イオンが発生している場合には、赤色を呈し(methyl-red positive)、有機酸を分解して炭酸塩とし、蛋白質からアンモニウム化合物を形成し、中性範囲からアルカリ性に進んでいる場合は黄色を呈する(methyl-red negative)。

IMViCにおいては、*Aerobacter*であるためには methyl-red(-)が絶対の条件であるが、*Escherichia*にも methyl-red(-)の非定型があるので、methyl-red testだけで両群を鑑別するのは安全ではない。Indole testと methyl-red testとが同時に陰性である場合に限つて *Aerobacter*と同定される。

(3) Voges-Proskauer reaction のこと

Voges & Proskauer(1898)は、*Escherichia*を除いた或種の細菌は、葡萄糖培地に培養された後、濃厚苛性カリ液を滴下されると、螢光性を帯びた赤色反応を呈することを知つたのであるが、それは、Harden(1906), Harden & Walpole(1906), Harden & Norris(1911)の研究によつて、acetylmethylcarbinolが産生され、アルカリと空中の酸素のために酸化されて、diacetylを生ずる結果であることが判明した。Voges-Proskauer reactionは、Durham(1901)によつて coli-aerogenes groupの鑑別に應用され、coliは陰性で、aerogenesは陽性であると報告された。MacConkey(1909)は糞便系の大部分の細菌は VP(-)であるという事実を突止めた：人糞株は¹¹/178、馬糞株は⁸/87が陽性に過ぎない、犢、山羊、豚、鶯鳥からの67株は全部が陰性であつた。

Acetylmethylcarbinol(acetoin)の証明のためには、O'Meara (1931), Tittsler (1933),

Barritt (1936) の方法を併合した Coblenz (1943) の方法も行われる: 葡萄糖ブイヨンに菌苔を濃厚に浮遊させ、30°C に6時間保った後、 α -naphthol (95% ethyl alcohol 100 ccm + α -naphthol 5g) を 0.6ccm を加え、0.3% creatine 含有の 40%KOH を 0.2ccm を滴下し、1 分間充分に振盪する。濃赤色乃至淡紅色を呈すれば陽性である。Leifson (1932) の試薬も用いられる。

IMViC においては、VP(-) が *Escherichia* であるための絶対条件であるが、VP(-) の *Aerobacter* の非定型も存在するので、VP だけで両群を鑑別するのは冒険であると云わねばならない。

(4) Citrate test のこと

Coli-aerogenes group の鑑別に citrate を用いることを試みたのは Brown (1921) の報告に始まる。Koser (1923/24/26) は、citrate を単一炭素源として合成培地に加え、MR(+), VP(-), citrate(-) を a coli type

とし、MR(-), VP(+), citrate(+) を an aerogenes type とし、MR(+), VP(-), citrate(+) を an intermediate type とし、それは、Bardsley (1926/34), Pawan (1931) 等の追試によつて、coli から intermediates を分別するには価値ある方法であるとされた。しかし、間もなく、Kline (1935), Stuart, Griffin & Baker (1938), Parr (1938/39), Griffin & Stuart (1940) 等の報告によつて、coli にも citrate 利用性を獲得する株のあることが知られた。

現在、IMViC においては、*Escherichia* であるためには、citrate(-) が絶対条件であるが、*Aerobacter* にも citrate(-) の非定型があるから、citrate test だけで両群を鑑別することは許されない。VP(-), citrate(-) という二条件が同時に揃えば *Escherichia* と云えるのである。

(5) IMViC による検査成績の判定を要約すれば次表のようになる:

表 I Imvic system による大腸菌族の分類

Type	Indole	MR	V P	citrate
<i>Escherichia coli</i> I	+	+	-	-
〃 II	-	+	-	-
〃 III	+	-	-	-
<i>Aerobacter aerogenes</i> III	-	-	-	+
〃 II	-	-	+	-
〃 I	-	-	+	+
Intermediates : 9 types	(--) を除く : (++), (+-), (-+)		(--) 除く : (++), (+-), (-+)	

すなわち、総合成績において、(++--) が *Escherichia* の定型であり、(--++) が *Aerobacter* の定型であつて、(? ? --) 又は (-- ? ?) てないものが中間型であるが、(? ?) が同時に揃つて陰性であつてはならない。

IMViC 検査系列は、現在一般に用いられている選択方法であつて、Wilson & Miles (1946) は、"Some of the discrepancies in the literature are doubtless ascribable to carrying out these tests under unfavourable conditions." と述べているが、"unfavourable

conditions” を容易に避けられるような簡便な方法が望まれてもよい。著者は、indole test 及び citrate test を廃し、methylene blue の還元試験 = reductase test と、 $\text{CO}_2 : \text{H}_2$ ratio の検査を導入し、M. M. V. G. system なる新法を案出し（日本細菌学会第3回九州支部会、昭和25・11・12、長崎）、実際に応用して現在に及んでいる。

(6) Reductase test のこと

Methylene blueは、“A hydrogen acceptor”として作用し、還元状態では青色を失うが(leuco base)、しかし、酸素に触れば青色を再現する。Thunberg(1929)は、methylene blueの還元を利用し、動物組織中の呼吸酵素 = dehydrogenases の存在を証明した。爾来、諸家の研究によつて、dehydrogenases は、高等植物及び高等動物ばかりでなく、酵母並びに細菌によつても産生される事が知られ、methylene blue による reductase test は細菌生理学惹いては細菌分類学にも応用される

ことになった。また、衛生細菌学的食品検査において、牛乳中に含まれる細菌の多寡の検査にも用いられている。Methylene blue に代えて resazurin を使うこともできる。

(7) Gas ratio のこと

Smith(1895)は、醗酵管を用いて、Escherichia coli に較べると、Aerobacter aerogenes のガス産生が迅速かつ多量であることを認め、しかも、 $\text{CO}_2 : \text{H}_2$ ratio が coli より aerogenes において常に高いことを知つた。Russel & Bassett (1899), Harden (1901/05), Harden & Walpole(1906)等の追認の結果、 $\text{CO}_2 : \text{H}_2$ ratio によつて大腸菌族が2群に大分されることになり、それが現在でも一般に承認されている。すなわち、aerogenes は $\text{CO}_2 : \text{H}_2$ 2:1 であり、coli は $\text{CO}_2 : \text{H}_2$ 1:1 である。また、糞便系細菌株の86%は gas ratio 1:1 であり、非糞便系細菌株の95%は gas ratio 2:1 であるという。

実 験 成 績

A. 実験方法

実験全般を通じて下記の培地を用いた：—

peptone	10.0gr
第二リン酸カリ (K_2HPO_4)	5.0gr
ブドウ糖	10.0gr
蒸 溜 水	1000.0cc

peptone、ブドウ糖を普通使用される量の倍量にしたのは、それによつて反応が速に現れ、結果を読むのに便利であることを知つたためである。この液体培地を口径7分位の試験管に分注し、その中に凝集反応用試験管(径0.8cm 高さ6.5cm くらいのもの)、または破損した Einhorn 管の角の部分のものを逆立ちさせ、 $100^\circ\text{C}/30$ 分、3日間、3回滅菌する。この際、Durham 管と違って長いから、逆立ち管の上部に滴状に空泡を残すことがあるが、これは第4回の蒸気滅菌を施すことによつて完全に消失するのが常である。

実験操作は下記の順序に従つて行われる：—

(1) Methylene blue reduction test (MB)

被検菌株を上記の培地に播種し、 $37^\circ\text{C}/48\sim 72$ 時

間の後、小試験管に 1~2cc 余りの少量の培養液を取り、これに methylene blue の飽和水溶液を 1gtt 落とし、振動混和して放置すると、大概、反応は間もなく表われるが、1時間後今1度確かめる。還元作用のあるものは無色になる。完全脱色なら強陽性、緑変程度なら弱陽性、無変化なら陰性。

(2) Methyl-red test (MR)

前記還元試験と同様にして、1~2cc 余りの培養液を小試験管に取り、これに methyl-red の溶液の数滴を落とす。酸を形成している時は赤色となり(陽性)、alkali が生じている時は黄色となる(陰性)。

methyl-red 溶液の処方：—

methyl-red	0.1gr
alcohol	300.0cc
— 溶解後 —	
Aq. dest.	200.0cc

Methyl-red 陽性の赤色を生じて、Voges-Proskauer 反応のために KOH を入れれば消えてしまうし、gas 比を見るのに何の妨げにもならないから、3検査を同一培養管で行つてもかまわないわけであ

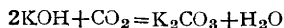
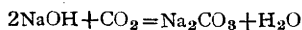
るが、Voges-Proskauer 反応の桃色が薄くて、methyl-red 陰性の黄色のために幾分か判定に困る場合もあるので、原則として、methyl-red test のための材料は別の小試験表に取るのがよい。普通72~96時間で葡萄糖の消費が終わつて、培養液の pH が決まるわけであるが、このように48時間目に取出すと、coli で $\text{pH}=5.8\pm 0.1$ で少々高いので、MR test は濃真紅に至らないが、methyl-red 陽性とするには充分である。出来うれば、滅菌駒込ピペットで培養液を別にとつておいて、50~72時間値を見れば尙良い。

(3) 第三段階として Voges-Proskauer 反応 (VP) 及び gas 比 (CO_2/H_2 ratio) を同時に見る。

逆立ち試験管の gas 底面を見通して、7分試験管の管壁に、墨かガラス鉛筆かですの線をつける。(勿論、Einhorn 管の角の部分を用いた時は、目盛りが入つているのでしをつける必要もなく、便利かつ精確である。)その後で培養液の上に10%の KOH 溶液又は NaOH 溶液を 5 cc 余り加える。

Einhorn 管の場合は、親指で蓋をして逆にすることにより容易に混じられるが、この場合、逆にすることが出来ないで、少し気長に軽く、逆立ち試験管が培養管の壁にかちかちとぶれる様に振つて後、孵卵器に入れ、3時間して取り出してみれば、上昇していつた gas の底面と初めのしるの間が CO_2 であり、gas として残つたものが H_2 である。2度生ずる gas 底面と、逆立ち試験管の円い底部の端(培養管の中では上端になる)の間の距離は、物尺を外側から管壁にくつつけて読む。酸酵試験管の上端の部分は丸底になつていて目盛の度合が違ふわけであるから、Einhorn 管の目盛の刻みを参考にして、大体の読みを飲込んで置かねばならない。此の方法で gas ratio を見るに充分である。

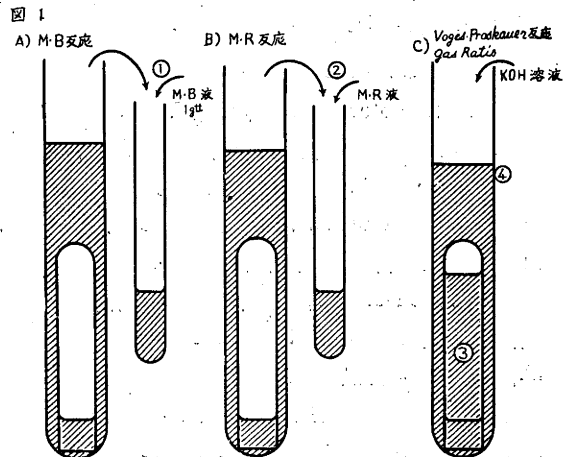
Gas ratio の検査は NaOH でも KOH でも同様の結果が得られる。



VP 反応のためにもどちらでもよい。Gas ratio を見た培養を室温に放置すると、VP 陽性の場合には acetylmethylcarbinol が alkali と空気中の O_2 によつて diacetyl に変化して、ちょうど螢光燈の輝

いた明かるい桃色に似た色が液の上の方に表われて来る。VP 反応は18~24時間待つて反応を読む。著者の方法では、培養時間が短いから、判定は必ず明かるい所で読む。

以上、(1)(2)(3)の操作手順を図示すると、図1の様になる。



B. 検査成績

著者の方法——M. M. V. G. による成績を総括すれば、大腸菌族 = coli-aerogenes の分類は次表に示されるようになるのであつて、IMViC によるそれと本質的に抵触するところはない。

すなわち、coli と同定されるためには、 $\text{CO}_2:\text{H}_2 < 1$, MB (-), VP (-) が絶対条件であつて、MR (+) が coli I 型, MR (-) が coli II 型となる。また、aerogenes と同定されるためには、 $\text{CO}_2:\text{H}_2 > 1$, MB (+), MR (-) が絶対条件であつて、VP (+) が I 型, VP (-) が II 型となる。Intermediates = 中間型には、coli 及び aerogenes の 4 型以外の (干) の配合を持つ数型が現われ得る管であるが、いづれにしても、 $\text{CO}_2:\text{H}_2 = 1$ という特性が認められる。しかし、言うまでもなく、Escherichia 又は Aerobacter と同定するためには、形態学的並びに生理学的の基本性状の検査成績が前提となるのであつて、IMViC による分類に優先性を認めねばならないから、IMViC と M.M.V.G. の矛盾しない関聯を求めると、coli と云うためには、citrate (-) が絶対条件であつて、I 型は indole (干) でよいが、II 型は indole (+) でなければならない。Aerogenes の資格としては、

indole(-) が絶対条件であつて、I型は citrate(干) 及び citrate の双方が同時に揃つて陽性でなければ
 よいが、II型は citrate (+) でなければならぬ。ならないことは、IMViC表から定義づけられる。
 M.M.V.G. のすべてが陰性である中間型は、indole

表 II M. M. V. G. system による大腸菌族の分類

Types	CO ₂ :H ₂	MB	MR	V P
Escherichia coli I	<1	-	+	-
〃 II	<1	-	-	-
Aerobacter aerogenes I	>1	+	-	+
〃 II	>1	+	-	-
Intermediates	≐1	+	(+)	-
	≐1	-	(+)	(+)
	≐1	-	-	(+)
	≐1	-	-	-

上記以外の(干)の配合が有り得るが、実際に於いては、下記の場合が多い：-

備考：(+)は弱陽性を示す。

還元試験=reductase test に於いては、methylene blue を使用するのが普通であるが、resazurin も代用されることになつてゐるし、著者の経験では、malachite green も代用されないことはない。

CO₂ : H₂ ratio に就いては、coli に於いては1 : 2~1 : 3以下の場合が多く、aerogenes に於いて

は2 : 1~3 : 1以上の場合が多いのであつて、coli で1<となり、aerogenes で1<となるようなことはない。このことは大腸菌族の分類では決定的な重要性を示すと思われる。Gas ratio が1:1に近いことが中間型の特性と思つてよい。

結

1%ブドウ糖・0.5%リン酸塩・1%ペプトン培地に Durham 醱酵管より長い試験管を倒置し、1本の試験管で、methylene blue test (MB), methyl-red test (MR), Voges-Proskauer reaction (VP), gas ratio の4反応を同時に見る簡便な方法を考案し、M. M.

び

V. G. system と命名し、衛生細菌学的水質検査に於ける大腸菌族の分類に応用した。

本法は、Imvic system と同様に、E. coli, A. aerogenes, intermediaetes をよく分類し、gas ratio の加わつてゐる事から少々正確とも考えられる。

文

1) **Barritt, M. M.** : The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphthol. J. Path. Bact., 42 : 441, 1936.
 2) **Böhme, A.** : Die Anwendung der Ehrlich'schen Indolreaktion für bakteriologische Zwecke.

献

Zbl. Bakt., I. O. 40 : 129-133, 1905.
 3) **Clark, W. M. & Lubs, H. A.** : The differentiation of bacteria of the colon-aerogenes family by the use of indicators. J. Inf. Dis., 17 : 160, 1915.
 4) **Coblentz, J. M.** : Rapid detection of the

production of acetyl-methylcarbinol. Am. J. Publ. Hlth., 33: 815, 1943.

5) **Escherich, T.**: Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglinge. Fortschr. Med., 3: 515—547, 1885.

6) **Fellers, C. R. & Clough, R. W.**: Indole and skatole determination in bacterial Cultures. J. Bact., 10: 105—133, 1925.

7) **Frieber, W.**: Beiträge zur Frage der Indolbildung und der Indolreaktionen sowie zur Kenntnis des Verhaltens indolnegativer Bakterien. Zbt. Bakt., I. O. 87: 254—277, 1921.

8) **Gnezda, J.**: Sur les reactions nouvelles des bases indoliques et des corps albuminoides. Compt. Rend. Acad. Sci., 128: 1584, 1899.

9) **Goré, S. N.**: The cotton-wool plug test for indole. Ind. J. Med. Res., 8: 505—507, 1921.

10) **Harden, A. & Walpole, G. S.**: Chemical action of *Bacillus lactis aerogenes* (Escherich) on glucose and mannitol: Production of 2:3-butylene glycol and acetyl methylcarbinol. Proc. Roy. Soc., B, 77: 399, 1906.

11) **Harden, A.**: On Voges-Proskauer's reaction for certain bacteria. Proc. Roy. Soc., B, 77: 424, 1906.

12) **Harden, A. & Norris, D.**: The bacterial Production of acetyl-methylcarbinol and 2:3 butylene glycol from various substances. Proc. Roy. Soc., B, 84: 492, 1911.

13) **Holman, W. L. & Gonzales, F. L.**: A test for indole based on the oxalic acid reaction of Gnezda. J. Bact., 8: 577—583, 1923.

14) **Koser, S. A.**: Utilization of the salts of organic acids by the colon-aerogenes group. J. Bact., 8: 493, 1923.

15) **Koser, S. A.**: Correlation of citrate utilization by members of the colon-aerogenes group with other differential characteristics and with habitat. J. Bact., 9: 59, 1924.

16) **Kovács, N.**: Weitere Untersuchungen über den Indolnachweis in Bakterienkulturen. Die Indolbildung auf festen Nährböden. Zbt. Bakt., I. O. 123:

391—397, 1932.

17) **Koser, S. A. & Galt, R. H.**: The oxalic acid test for indole. J. Bact., 11: 293—303, 1926.

18) **Kovács, N.**: Eine vereinfachte Methode zum Nachweis der Indolbildung durch Bakterien. Zschr. Imm. Exp. Therap., 55: 311—315, 1928.

19) **Kulp, W. L.**: Indole studies. J. Bact. 10: 459—471, 1925.

20) **Michaelis, L. & Marcola, x.**: Die Säureproduktivität des *Bacterium coli*. Z. Immunitätsforsch., 14: 170, 1912.

21) **O'Meara R. H. Q.**: A simple delicate and rapid method of detecting the formation of acetyl-methylcarbinol by bacteria fermenting carbohydrates. J. Path. Bact., 34: 401, 1931.

22) **Parr, L. W.**: Organisms involved in the pollution of water from long stored feces. Am. J. Pub.Hlth., 28: 445, 1938.

23) **Parr, L.W.**: Sanitary significans of the succession of coli-aerogenes organisms in fresh and stored feces. Am. J. Pub. Hlth., 26: 39, 1936.

24) **Stuart, C.A., Griffin, A. M. & Baker, M. E.**: Relationship of coli-form orgnisms. J. Bact., 36: 391, 1938.

25) **Stuart, C. A.**: Sanitary significans of the coliform bacteria in water. J. New Engl. Water Works Assoc., 55: 355, 1941.

26) **Stuart, C. A., Griffin, A. M. & Baker, M. E.**: Relationship of coli-form organisms. J. Bact., 36: 391, 1938.

27) **Thunberg, T.**: Abderhalden's Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden, Lfg. 414, Abt. 4, Tl. 1, Hf. 7, 1929.

28) **Vaughn, R. H. & Levine, M.**: Differentiation of the "intermediate" coli-like bacteria. J. Bact., 44: 487, 1942.

29) **Wilson, G. S. & Miles, A. A.**: Topley & Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Third edition, London, 1946.

30) **Zipfel, H.**: Zur Kenntnis der Indolreaktion. Zbt. Bakt., I. O. 64: 65—80, 1912.