

食中毒事例から分離された好塩細菌 の蛋白分解作用について

長崎大学風土病研究所病理部 (主任: 登倉 登教授)

井 上 千 代 子
いの うえ ち よ こ

Proteolytic Activity of Halophile Bacteria Isolated from Food Poisoning Incidents. Chiyoko INOUE, Pathological Department (Director: Prof. Noboru TOKURA), Research Institute of Endemics, Nagasaki University.

この論文の概要については、1961年6月24日(長崎)、長崎医学会第261回例会に於いて口演発表した。

滝川(1955)、野坂等(1956)、滝川 & 中橋(1957)が食中毒患者より検出した培地食塩至適濃度2~3%の好塩細菌が、藤野(1951/52)によってシラス食中毒例から分離された *Pasteurella pirahaemolytica* と同様の性状を持つことが知られ、好塩細菌の病原性が初めて示唆されたが、滝川 & 中橋(1958)はその後も下痢患者便から散発的に同一性状の好塩細菌を分離している。柳沢等(1957/58)は、食中毒タコより分離した石川株 (*Achromobacter*)、市販のカレイから得た No. 17 (*Pseudomonas*) 及び滝川株 (*Pseudomonas*) の人体内服実験を行なって、食中毒の発症を確認し、また、本菌中には histidine 脱炭酸酵素を持つものもあり、allergy 様食中毒の原因菌ともなり得ることを指摘しており、飯田等(1958)は海水及び魚から好塩性の histamine 産生菌12株を分離し、それがモルモットに allergy 様食中毒を起こすことを認めた。このようにして或種の好塩細菌の病原性が次々に実証されている。林等(1960)は、1957年及び1959年に、長崎市内で発生した食中毒例から好塩細菌を分離し、それによる実験的汚染液を与えられた仔猫が中毒様症状を起こして43~46時間で斃死するのを観察し、又、汚染液のアミン様分割の経口投与による中毒様症状の発症を認め、ペーパークロマトグラフィを行なって、Rf 0.48 及び 0.65 の ninhydrin 陽性物質が中毒症発症に関与するものと想像し、in vitro でも毒性物質を産生することは明白であるが、他面、in vivo でも食物を分解して中毒症状を誘発することが考えられると述べている。汚染中毒が考えら

れる場合、その細菌の蛋白分解作用が強い程、有毒性物質の産生も多く、それだけ食中毒を起因することも強いと考えられるのであるが、従来、好塩細菌の蛋白分解作用の知見が乏しいので、それについて著者は二、三の実験を試みた。

実験方法並びに成績

使用菌株: 林等(1960)が、長崎市内において、1957年某工場食中毒発生の際分離した MP1~MP6 の6株、1959年F町における食中毒例より FP1 及び FP2 の2株、及び同年O町発生例より採取した OP101~OP104 の4株の他、標準株として滝川 & 中橋(1957)のN4株及び藤野(1951)のEB102を用い、合計14株を3%食塩加普通寒天培地に継代保存して実験に使用した。

実験 I. 一般蛋白分解試験

1) **牛乳消化:** 2%食塩加リトマス青牛乳培地に供試菌を移植し、37°/2週間経過を観察したところ、培養24時間後より13例(EB102株は対照と同じく不変)にリトマスの脱色を認め、2日目より軟かく凝固し、4日目頃よりペプトン化を認め始め、その程度は漸次増加し、消化作用強度(++)のものでは2週間にて殆ど全培地(5cc)が液化し、消化作用中度(+)の他の株では約半量の牛乳の液化が認められた。

2) **gelatin の液化:** 3%に食塩を加えた15% gelatin の高層培地に供試菌を穿刺し、22°C で培養して2週間観察したところ、培養48時間後より13例(EB102株は不変)において、表面穿刺孔周囲に始

まる皿状の液化を認め、次いで層状となり、液化部の増加を見、液化作用強度(++)のものは2週間に於て殆ど全培地(5cc)が液化し、液化作用中等(+)の株では全培地の $\frac{2}{3}$ 程度の液化を認めた。

3) indole 産生: 3%食塩加ペプトン水に供試菌を移植し、37°Cに培養して、2日目、4日目、6日目に SALKOWSKI-北里の法を用いて検査し、9株において陽性、5株において陰性で、SIM 培地に於いて EHLICH-BÖHME 法によっても同様の結果を得た。

4) H₂S 産生: 3%に食塩を加えた醋酸鉛寒天培地、KLIGLER 培地及び SIM 培地に供試菌を穿刺し、37°Cで培養して2週間観察したが、全例陰性に終わった。

5) urease 作用: 3%に食塩を加えた CHRISTENSEN の液体尿素培地に供試菌を培養し、37°C/2週間観察したが、全例陰性であった。

6) ammonia 産生: 3%食塩加ペプトン水に供試菌を移植し、37°C/5日間培養後、NESSLER 試薬を加えて、全例に ammonia 産生を認めた。

7) 凝固血清溶解: 2%食塩加牛血清を高層凝固培地とし、供試菌を穿刺して 37°Cに培養して観察した

ところ、培養24時間後より13株(EB102を除く)において血清表面の穿刺孔周囲より溶解が始まり、次第に溶解部が増大し2週間後には凝固血清に深い亀裂を作る9株と、表面平滑で全体がプリン型(表中○印)のもの4株があり、いずれも表面は暗褐色の粘稠液で掩われるのを見た。EB102株は、穿刺孔に変化がなく、血清内部に乾燥性の複雑な亀裂を生じ、色調も黄色透明化して、他の株とは明かに異なる作用を示した。対照の無菌血清では、乾燥するに従って、表面全体に凹みを生じたが、穿刺孔、血清内部及び色調の変化はなかった。

8) 溶血作用: 3%食塩加寒天に5%の家兎脱繊維血を混じた平板培地に供試菌を塗抹し、37°Cに培養して、寒天表面集落周囲の透明化を観察した。培養48時間後、10株において明かな溶血環を作り、集落周囲に限界明瞭な透明環を示した。残り4株は陰性であった。

以上の蛋白分解作用は、普通食塩含有(0.5%)培地に於いては、菌の発育が非常に悪く、全例陰性であった。上記の成績を一表に纏めれば次の如くなる。

表 1 分離菌の一般蛋白分解作用

菌 株	牛乳消化	ゼラチン液 化	インドール 産生	硫化水素 産生			尿素分解	アンモニア 産生	凝固血清 溶解	溶血作用
				醋酸塩	Kligler	SIM				
MP 1	+	++	+	-	-	-	-	+	+°	+
MP 2	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
MP 3	+	++	+	-	-	-	-	+	+°	+
MP 4	++	+	+	-	-	-	-	+	+	-
MP 5	+	+	+	-	-	-	-	+	+°	+
MP 6	+	+	+	-	-	-	-	+	+°	+
OP 101	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
OP 102	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
OP 103	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
OP 104	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
FP 1	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
FP 2	++	++	+	-	-	-	-	+	+	+
N 4	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
EB 102	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-

供試菌は、EB102の *Pasteurella parahaemolytica* の1株を除いて、すべて *Pseudomonas* sp. pr. *ichthyodermis* と見做されているが、OP群の4株に限って indole 陰性になっているので、MP群、FP群及びN群とは別種なのかもしれない。

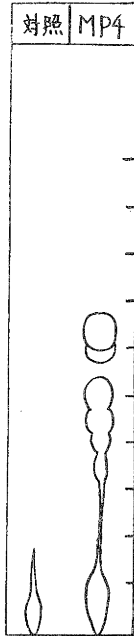
実験Ⅱ. ペーパークロマトグラフィーによる観察

1) 牛乳消化分解物：2%食塩加牛乳培地に供試菌

を移殖し、37°C/2週間分解用させた後、遠心沈澱(3000r. p. m./20分間)して上澄をとり、約0.05ccmを一回試料として実験に用いた。東洋濾紙 No. 50を用い、溶媒は n-ブタノール・醋酸・水(4:1:2)によって、一次元上昇法を行なって試料を展開し、0.2% ninhydrin-水飽和ブタノール溶液を噴霧し、90°C~100°C に加熱乾燥して呈色物質を観察した。

表 2 牛乳分解物のペーパークロマトグラフィーによる検査(一次元展開)

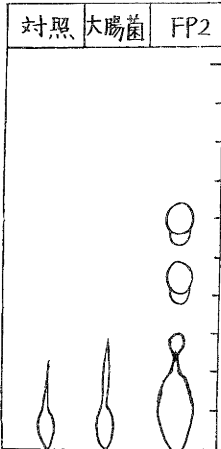
菌 株	Rf 値						対照	MP4
	0.58	0.52	0.43	0.36	0.29			
MP 1	0.58	0.52	0.43	0.36	0.29			
MP 2	0.60	0.52	0.44	0.40	0.36	0.29		
MP 3	0.58	0.54	0.48	0.43	0.35	0.30		
MP 4	0.64	0.60	0.52	0.46	0.41	0.33		
MP 5	0.57	0.53	0.43	0.35	0.32	0.27		
MP 6	0.55	0.49	0.41	0.33	0.29	0.23		
OP 101	0.60	0.54	0.46	0.40	0.35	0.29		
OP 102	0.62	0.55	0.47	0.40	0.35	0.24		
OP 103	0.58	0.54	0.46	0.39	0.35	0.24		
OP 104	0.58	0.51	0.45	0.41	0.32	0.27		
FP 1	0.57	0.52	0.44	0.34		0.25		
FP 2	0.57	0.48	0.43	0.39	0.32	0.24		
N 4	0.58	0.54	0.43	0.35	0.32	0.27		



溶媒：n-ブタノール醋酸・水(4・1・2) 発色：0.2%ニンヒドリン溶液噴霧

表 3 牛乳分解物の除蛋白後の検査

菌 株	Rf 値						対照	大腸菌	FP2
	0.63	0.55	0.49	0.42	0.24	0.13			
MP 3	0.63	0.55	0.49	0.42	0.24	0.13			
MP 5	0.60	0.50	0.44	0.39	0.22	0.13			
OP 101	0.66	0.59	0.52	0.48	0.43	0.12			
OP 104	0.65	0.57	0.50	0.45	0.39	0.11			
FP 1	0.57	0.55	0.45	0.39	0.25	0.12			
FP 2	0.61	0.57	0.48	0.41	0.27	0.15			
N 4	0.65	0.63	0.52	0.48	0.44	0.17			
大腸菌 026					0.20	0.09			
対 照					0.18	0.08			



発色した5~6個の spot の形は、13株において大体類似し、その Rf 値は表2に示すように菌株によって必ずしも一定はしないが、対照の無菌牛乳培地に比べて明かに ninhydrin 陽性物質が増加したことが知られた(表2)

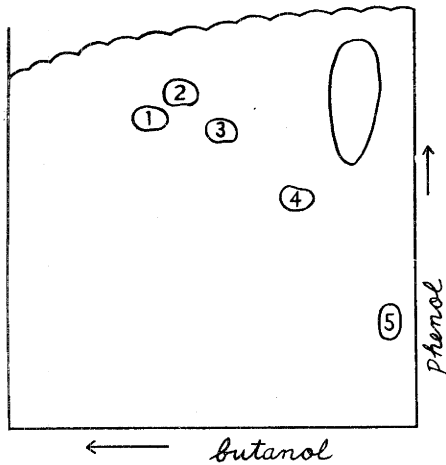
次に上記牛乳分解液 5ccm に対して、90%エチルアルコール 20ccm を加えてよく混和し、約30分間室温に放置して除蛋白した後、遠心沈澱(3000 r.p.m. /20分間)してその上澄をとり、45°C 乃至 50°C の加温のもとに減圧濃縮して 1.0ccm とし、その 0.05 ccm を一回試料として前記溶媒によって一次元展開を行ない、7例共略々類似した5個の Spot を認め(表3)、その Rf 値は前回と同様に菌株によって必ずし

も一定しない数値を示したが、対照に用いた無菌牛乳培地、大腸菌 O 26 株培養の普通牛乳(酸性凝固を示す)に比べて明かに ninhydrin 陽性物質の増加が見られた。

更に前試料について二次元法(溶媒: 前溶媒並びに0.28%にアンモニアを含むフェノール・水(4:1))を実施し、図1に示すような map を得、同一条件で展開した既知アミノ酸の map (図2)と比較し、常に leucine phenylalanine, valine, alanine, asparagic acid と考えられる spot を認め、その他にも塩基性アミノ酸を含むペプチッドのグループと考えられる大きい spot が認められた。

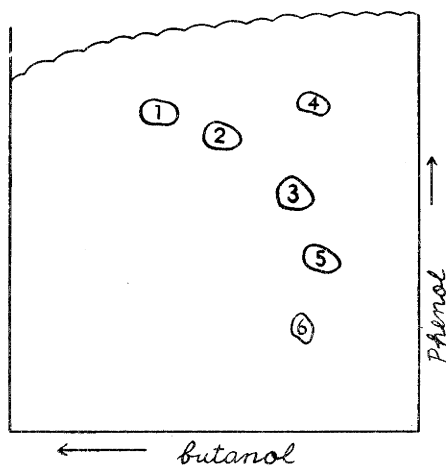
2) ゼラチン分解物: 3%食塩加ゼラチン培地

図 1 牛乳分解物 (OP 104)



spot	solvent	
	butanol	phenol
1	0.64	0.83
2	0.57	0.88
3	0.47	0.78
4	0.29	0.57
5	0.06	0.27

図 2 既知アミノ酸



spot	solvent	
	butanol	phenol
1) leucine	0.65	0.84
2) valine	0.49	0.77
3) alanine	0.31	0.58
4) arginine	0.27	0.81
5) glycine	0.25	0.43
6) glutamic acid	0.29	0.27

表 4 ゼラチン分解物の検査

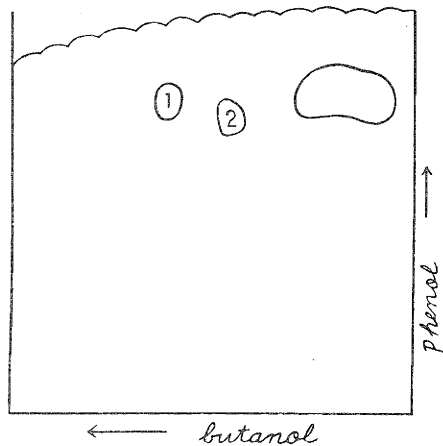
菌 株	Rf 値					対照	MP3
	MP 1	0.58	0.52	0.44	0.29	0.14	
MP 2	0.61	0.51	0.46	0.30	0.16		
MP 3	0.61	0.53	0.47	0.30	0.13		
MP 4	0.60	0.52	0.45	0.29	0.16		
MP 5	0.58	0.52	0.45	0.29	0.12		
MP 6	0.58	0.51	0.44	0.29	0.15		
OP 101	0.58	0.51	0.45	0.30	0.15		
OP 102	0.61	0.52	0.44	0.30	0.16		
OP 103	0.61	0.52	0.45	0.30	0.14		
OP 104	0.61	0.53	0.46	0.29	0.15		
FP 1	0.58	0.52	0.46	0.31	0.13		
FP 2	0.58	0.52	0.44	0.31	0.13		
N 4	0.61	0.53	0.45	0.30	0.15		

表 5 ゼラチン分解物の除蛋白後の検査

菌 株	Rf 値			MP2
	MP 2	0.62	0.46	
OP 101	0.59	0.45	0.17	
FP 2	0.59	0.45	0.17	
N 4	0.61	0.45	0.19	
対 照	呈色なし			

(gelatin 3%, KH_2PO_4 0.02%, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0.03%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002%) に供試菌を移植し, $37^\circ\text{C}/2$ 週間分解作用を受けた液体の約 0.05ccm を一回試料として前述の方法で一次元ペーパークロマトグラフィを行なった。表 4 に示すようにように, 13 例において大体同様の Rf 値を持つ ninhydrin 陽性物質を認めたが, EB102 及び無菌ゼラチン培地では全く ninhydrin 呈色物質を認めず, 明かに供試菌によるゼラチンの分解作用が行われた事を示した。

図 3 ゼラチン分解物 (MP2)



spot	solvent	
	butanol	phenol
1	0.61	0.81
2	0.46	0.74

次に上記ゼラチン分解液を前述の牛乳と同様の方法でアルコール除蛋白した後、1.0ccm 迄減圧濃縮し、その 0.05ccm を一回試料として一次元ペーパークロマトグラフィを行なって、表 5 に示すような、4 株に殆ど近似した Rf 値を持つ ninhydrin 呈色物質の発現を認めた。

更に前試料について二次元法（溶媒は前述と同じ）を実施し、図 3 に示すような map を認め、同一条件で展開した既知アミノ酸呈色（図 2）と比較し、leucine、及び valine と考えられる spot を認め、その他にもペプチドの集まりと考えられる ninhydrin 陽性物質を認めた。

考 察

海産物を食用に供することの多い我が国において、それによる食中毒が大きな比率を占めている事は軽視できない問題であるが、相磯（1959）は1957年度に発生した食中毒の65%、患者の46%は魚介類が原因であると、その高率を指摘し、又、柳沢（1957）は、東京都の市場に入荷した魚介類46検体中32株の好塩細菌を分離し、魚種別、魚獲地別を問わず、相当高度に本菌が分布していることを示唆した。児玉等（1960）も鱈による食中毒例から *Pseudomonas enteriis* II 型（滝川株と同じ）を31名中10名から検出し、海水中に *Pseudomonas* が異常に増殖した際、魚が保菌者となって人体に食中毒を起こす可能性があると述べている。このように水産食品による食中毒と海水菌の関係が研究の対象とされて来たが、塩見（1959）は健康者便、下痢患者便から27株、海産食品より25株の好塩細菌を検出し、生物学的性状、血清学的性状、薬剤耐性などの諸点に於いて、海産食品株と尿便株の両者間に大差を認められず、滝川（1955）による病原性好塩細菌とは可成りの相異を認めている。一方、富平（1960）は、分離海水菌44株と滝川株との間に特別な相異点を見出すことはできず、滝川株は海水に由来する *Pseudomonas* の一種と考えられると言っている。要するに、相磯（1957）が述べているように、好塩細菌は多くの種、属、科を含むものであり、食中毒菌として毒性或は病原性が問題となる株或は種を病原性好塩細菌と呼び、広義の好塩細菌中に一つの限定をおく他にないと考えられる。

林等（1960）が1957年に食中毒例から分離した好塩細菌（MP1～MP6）は、千葉大学腐敗研究所の富平（1960）によって長崎株として分類同定され、滝川株と同一群の *Pseudomonas* sp. pr. *ichthyodermis* に

入れられたものであり、1959年長崎市2個所の食中毒例から分離された菌株も前者と殆ど同一群と見做されたものである。富平（1960）によっても海水、魚から分離された44株の好塩細菌、滝川株及び長崎株の蛋白質並びに窒素化合物に対する活性が全般的に強力であることが認められているが、Bergey's Manual（1957）による海水菌の grouping によれば、滝川株、藤野株、児玉等（1960）及び林等（1960）による病原性好塩細菌が所属すると考えられる group 1 は gelatin 分解、indole 産生株となっており、他の2群に比べ蛋白分解作用の強い group と考えられ、また、塩見（1959）による病原株と一般海水菌の比較を見ると、一般海水菌の蛋白分解作用が菌株によって不一致であるのに、病原株では殆ど一致して、その分解作用を示しているの、このことから好塩細菌の蛋白分解作用と病原性とは或程度の関係を持つものと考えられる。

Fujino（1952）により分離された *Pasteurella pirahaemolytica* は、分離当時、gelatin を液化し、溶血作用著明と記載されているが、本実験に用いた結果は、山地等（1958）の報告と等しく、EB 102 株は両作用共に陰性であった。また、本株の毒力は培養の世代つられて減じていると記されており、毒力の減弱と蛋白分解作用の減弱が殆ど並行していると考えられる。

供試菌株及び滝川株による蛋白分解作用は、上述の成績から見て、非常に活性の強いものであると考えられた。

結 語

長崎市内発生の食中毒例から分離された好塩細菌（*Pseudomonas* sp. pr. *ichthyodermis*）12株、滝川株（N 4）及び藤野株（EB 102）を用いて、その蛋白分解作用を観察し、かつ、牛乳消化分解物及びゼラチン液化分解物をペーパークロマトグラフィを行なって観察し、下記の成績を得た。

- 1) 牛乳消化及びゼラチン液化は、EB 102 株を除き、13株において陽性であった。
- 2) indole 産生は、OP 101～OP 104 及び EB 102 の5株は陰性で、他の9株は陽性であった。
- 3) H₂S 産生及び尿素分解作用は、全例において陰性で、ammonia 産生は全例に陽性であった。
- 4) 凝固牛血清溶解作用は、13例において陽性、EB 102株では不明であった。
- 5) 家兎血液溶血作用は、分離株の10株において明

かな溶血環を認め、他の2株及びN4株並びにEB102株においては陰性であった。

6) 供試菌による牛乳及びゼラチン分解物を一次元ペーパークロマトグラフィにより観察し、13株に大体類似した spot を認め、対照に比べて ninhydrin 陽性物質の著しい増加を示した。又、同法二次元法展開によって、二、三のアミノ酸と思われる spot を認め、

本菌による蛋白分解作用は可成り活性の強いものであることを確認した。

すなわち、食中毒事例から分離した好塩細菌 (*Pseudomonas* sp. pr. *ichthyodermis*) は、相当強い蛋白分解の活性を示すことが知られた。

御懇篤な御指導と御校閲を賜わった登倉教授並びに御援助を頂いた林講師に対して深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 相磯和嘉：日本に於ける魚介類に因る食中毒。千葉腐敗研究所報告，12 (1)：1959.
- 2) 相磯和嘉：(山地他：好塩菌に関する研究) に対する附議。日本細菌学雑誌，12 (7)：539~540，1957.
- 3) 相磯和嘉，飯田宏美，松野 仁，皆川 勝，加藤繁夫 & 会美知明：非色素産生好塩菌 (長崎株) の食中毒原因菌としての意義について。日本衛生学雑誌，13 (1)：51，1958.
- 4) 赤堀一郎 & 水島三一郎編：蛋白質化学 (1) (3)。共立出版。東京，1954.
- 5) 林 薫，釘田芳文 & 内藤達郎：鯨肉食中毒とその原因考察，特に分離 *Viridans* 群連鎖球菌の意義に関する実験的研究。長崎医学会雑誌，32 (10)：1259~1268，1959.
- 6) 林 薫，釘田芳文 & 内藤達郎：最近5年間に長崎市内に発生した細菌性食中毒事例とその成因考察。長崎医学会雑誌，2 (3)：181~197，1960.
- 7) 辺野喜正夫 & 善養寺浩：細菌性食中毒，初版。南山堂，東京，1959.
- 8) 藤野恒三郎：細菌性食中毒。最新医学，6：263~271，1951.
- 9) FUJIO, T., OKUNO, Y., NAKADA, D., AOYAMA, A., HUKAI, K., MUKAI, J. & UENO, T.: On the Bacteriological Examination of Shirasu-Food Poisoning. Med. J. Osaka University, 4 (2~3)：299~304, 1952.
- 10) 福見秀雄他：病原微生物学，初版。医学書院，東京，大阪，1959.
- 11) 飯田宏美，海瀬好和 & 相磯和嘉：ヒスタミンを産生する好塩細菌について。日本衛生学雑誌，13：354~358，1958.
- 12) 児玉 威，宮本 泰，中村一成 & 山田健次郎：鯨に因る食中毒事例と病原性好塩細菌 *Pseudo-*
monas。日本伝染病学会雑誌，33 (12)：1116，1960.
- 13) 増野 実：応用蛋白化学，初版。学術図書出版社，東京，1947.
- 14) 野坂三枝，加藤 新，滝川 巖，藤沢俊雄，河野通正，内田富士夫 & 山崎祐：或種的好塩菌によると思われる食中毒症について，特に病原体に関する研究。日本医事新報，1666：23~25，1956.
- 15) 佐竹一夫：クロマトグラフィ，8版。共立出版，東京，1960.
- 16) 柴田村治：ペーパークロマトグラフ法の実際。共立出版，東京，1953.
- 17) 塩見利雄：所謂好塩細菌に関する研究。関西医学，16：69~107，1959.
- 18) 滝川 巖 & 中橋勇次郎：病原性好塩細菌に関する研究 (第2報)。日本伝染病学会雑誌，31 (2)：115~116，1957.
- 19) 滝川 巖 & 中橋勇次郎：病原性好塩細菌の検出操作について。Modern Media, 4 (1)：10~15，1958.
- 20) 富平輝夫：海水性 *Pseudomonas* 属の研究。日本衛生学雑誌，15 (2)：165~173 1960.
- 21) 山地幸雄，小嶋雅夫，志波 剛，石関忠一 & 八田貞義：病原性好塩細菌に関する研究。(第1報) 生物学的性状並びに塩類要求。日本細菌学雑誌，13 (1)：63~69，1958.
- 22) 柳沢文徳，桐淵達次 & 山口三重：好塩細菌に関する研究，(3) Allergy 様食中毒に関する検討。日本公衆衛生雑誌，5 (11) 増刊号：79，1958.
- 23) 柳沢文徳，竹内端弥，志賀信雄 & 川島祐博：新潟県に発生せるイカ食中毒について。日本医事新報，1666，26~29，1956.
- 24) 柳沢文徳，竹内端弥，広瀬周二，石川 一，山脇正樹，関口俊次郎，出井三郎，田中香磨，木村康正 & 長谷川俊吉：好塩細菌に関する研究。日本衛生学雑誌，12 (3)：226~234，1957.

Summary

A series of investigations into the proteolytic activity of 14 strains isolated from food poisoning incidents were carried out. Used bacteria were *Pseudomonas* sp. pr. *ichthyodermis* MP 1 to 6 (HAYASHI a.o. 1957), FP 1 and 2 (HAYASHI a.o. 1959), OP 101 to 104 (HAYASHI a.o. 1959), and N4 (TAKIKAWA a.o. 1957), *Pasteurella parahaemolytica* EB 102 (FUJINO 1951). Obtained results were as follows: ——— 1) Litmus milk with addition of 2% NaCl was coagulated and digested with reduction of litmus in 13 strains excepting EB 102. ——— 2) Gelatin stab with addition of 3% NaCl was entirely or almost entirely liquefied by 13 strains excepting EB 102. ——— 3) Indole, in peptone water with 3% NaCl, was formed by 9 strains excepting the OP members and EB 102. ——— 4) Hydrogen sulfide, in lead acetate agar and Kligler's medium as well as SIM medium each containing 3% NaCl, was not produced by all 14 strains. ——— 5) Urease, in urea medium with 3% NaCl, was not demonstrated in all 14 strains. ——— 6) Ammonia, in peptone water with 3% NaCl, was produced by all 14 strains. ——— 7) Coagulated cattle serum, in addition of 3% NaCl, was peptonized by all 14 strains, though it was not marked in EB 102. ——— 8) Haemolysis, on rabbit blood agar plate, was decidedly demonstrated in 10 strains excepting MP 4, OP 103, N4, and EB 102. ——— 9) By developing the paper chromatography of milk in which with addition of 2% NaCl each strain was cultivated for two weeks at 37°C, it was found that ninhydrin-positive spots with Rf near to that of leucine, phenylalanine, valine, alanine and asparaginic acid put in an appearance in supernate of the centrifugalized fluid. Besides there was a large ninhydrin-positive blot which was thought to consist of a group of polypeptides. ——— 10) By developing the paper chromatography of 3% gelatin solution, with addition of 0.02% KH_2PO_4 , 0.03% $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.002% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 3% NaCl, in which each strain was likewise cultivated, it was found that ninhydrin-positive spots with Rf near to that of leucine and valine came out in supernate of the centrifugalized fluid. In addition to these spots there was a large ninhydrin-positive blot likely consisting of a group of polypeptides.

Thus, it was in outline demonstrated that some of halophile bacteria, *Pseudomonas* sp. pr. *ichthyodermis*, are possessed of proteolytic activity enough to cause food poisoning.

(Authoress)

Received for publication July 22, 1961.