

市販包装食品中の嫌気性細菌分布に関する研究

——魚肉練り製品におけるボツリヌス菌の分布——

小林とよ子

Bacterial Flora in Commercial Film-Packed Food

——Distribution of *C. botulinum* in Fish Jelly Products——

Toyoko Kobayashi

嫌気性菌を対象とした市販包装食品中の細菌分布を検討する一連の目的で、包装食品ソーセージ類¹⁾、調理冷凍食品および魚肉練り製品中の嫌気性菌の分布²⁾を検討した。その結果、これらの食品は *Clostridium* による汚染が極めて高率であり、かつ特定の菌種が多く分離されることを報告した。

Clostridium は動物、ヒトの消化管あるいは魚類、土壌など自然界に広く常在しており、これらの菌が食品を汚染することは十分考えられる。事実、ボツリヌス菌は魚介類や土壌に存在することはよく知られている^{5, 6, 7)}。

よって、製造上、加熱処理温度が比較的低く、かつ保存期間の限られる魚肉練り製品を対象として、北海道産および中部地区産の魚肉練り製品中におけるボツリヌス菌の汚染の程度を検討したので報告する。

実験方法

1. 検査材料

実験に用いた魚肉練り製品の種類と検体数を表1に示した。

(1) 北海道産魚肉練り製品：北海道で製造された10社の市販魚肉練り製品200検体について検討した。検体はすべて札幌市内の中央卸売市場にて購入後、直ちに実験室に空輸した。輸送された食品は直ちに、 -20°C の低温庫にて凍結保存した。食品の種類はハム・ソーセージ18検体、カマボコ51検体、チクワ12検体、ハンバーグ5検体、ハンペン89検体、ナルト巻11検体、オードブル14検体の合計200検体である。

表 1. 魚肉練り製品の種類と検体数

種 類	検 体 数	
	北海道産	中部地区産
ハム・ソーセージ	18	0
カ マ ボ ヲ	51	0
チ ク ヲ	12	25
ハンバーグ	5	0
ハンペン	89	25
ナルト巻	11	0
オードブル	14	0
合 計	200	50

(2) 中部地区産魚肉練り製品：岐阜および愛知県下で製造された、15社の市販魚肉練り製品50検体について検討した。食品の種類はチクワ25検体およびハンペン25検体の合計50検体である。

実験に際して、凍結された食品は滅菌ビニール袋に入れ、約40°Cの恒温槽で解凍して実験に用いた。これらの食品は昭和52年7月25日から53年1月27日までに製造されたものである。

2. 使用培地

食品からボツリヌス菌の検出には、次の培地を用いた。

(1) 増菌用培地：自家製の Chopped meat broth⁷⁾ および PRAS- (Pre-Reduced Anaerobically Sterilized) GAM 糖分解用ブイヨン⁸⁾を用いた。

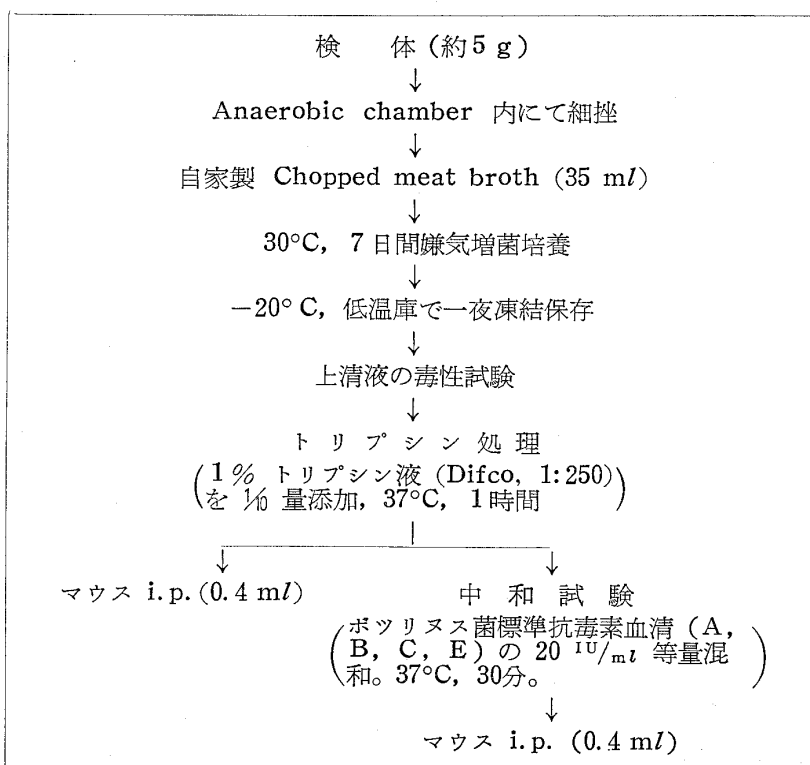
Chopped meat broth の作製方法は、蒸留水 1000 ml に対し、良質な脂肪の少ない牛挽肉 500 g を大型フラスコ中で十分混和後、5°C の冷蔵庫にて一夜浸漬した。次に、100°C、90分間加熱後、濾過し、濾液は PH 7.4 に調整した。この濾液に対し、Proteose peptone No.2 (Difco) 1%、NaCl 0.5%、Soluble starch 0.5%、および Yeast extract (Difco) 0.3% を加え、100°C、30分間加熱した。このブイヨンを再び濾過後、PH 7.4 に再調整した。一方、肉汁を作製したときの残りの肉滓約 5 g と、大理石片 (2~3 g) を大型試験管 (2.5×20 cm) に投入、ついで、上記のブイヨンを約 30 ml 分注後、120°C、15分間滅菌した。この培地は食品の増菌培養を行なう 2 日前に、約15分間煮沸して培地の脱気を行ない、急冷後、直ちに、内部が嫌氣的に保持されている Anaerobic chamber 内に入れ、Chopped meat broth 全体を十分嫌氣的にした。

(2) 菌分離用平板培地：上記増菌培地で増菌した上清液のマウス毒性試験と抗毒素血清による中和試験で、ボツリヌス毒素を証明した場合には、その増菌培養液からボツリヌス菌の分離を行なった。それには、GAM 寒天培地 (ニッスイ) および次の2種類の5%卵黄加 CW 寒天培地を用いた。非加熱処理検体から分離する場合には、GAM 寒天培地と、カナマイシン (KM) 100 µg/ml 含有の卵黄加 CW 寒天培地を用い、加熱処理検体およびアルコール処理検体から分離する場合には、GAM 寒天培地と KM 不含の卵黄加 CW 寒天培地を用いた。

3. 魚肉練り製品からのボツリヌス菌の増菌培養法

魚肉練り製品からのボツリヌス菌の増菌培養法を図1に示した。

図1 食品からのボツリヌス菌検出法



Anaerobic chamber 内で、検体約 5 g を乳鉢にて細挫、GAM プイオンにて乳剤とし、完全に嫌氣的にされた上記の Chopped meat broth 増菌培地に投入した。30°C, 7日間 Anaerobic chamber 内で嫌氣的に増菌培養後、-20°C の低温庫に入れて一夜凍結した。ついで、この増菌培養液を用いて、ボツリヌス毒素の証明を行なった。

4. ボツリヌス毒素の証明と同定

ボツリヌス毒素の証明は、各被検材料の培養上清液 1 ml に、リン酸緩衝液 (PH 6.0) で溶解したトリプシン 1% (Difco 1:250) を 1/10 量加え、PH 6.0 に再修正し、37°C の恒温槽中で 60 分間作用させた。その 0.4 ml を dd-y 系マウスの腹腔内に注射し、5 日間観察した。定型的なボツリヌス中毒症状を呈した場合には、上記のトリプシン処理培養液とボツリヌス菌の A, B, E および C 型の各標準抗毒素血清 (国立予防衛生研究所および千葉県血清研究所より分与) 20 IU/ml を等量混合し、37°C の恒温槽中で 30 分間反応後、その 0.4 ml をマウス腹腔内に注射した。中和処理を行なった培養液を注射したマウスが生き残り、対照の血清未処理液を注射したマウスが斃死した場合、ボツリヌス毒素陽性として、毒素型を決定した。

ボツリヌス菌の分離は、ボツリヌス菌の毒素が証明された増菌培地を用いて、(1) 非処理培養液、(2) 70°C、15分間加熱処理、および(3) 50%アルコール処理（培養液に等量の95%エチルアルコールを加え、充分混和後、室温にて60分間放置した。その間、15分毎に振盪混和した）を、夫々GAM寒天培地、5%卵黄加CW寒天培地に塗抹培養して、ボツリヌス菌の分離を行なった。

分離培地上の疑わしい集落については、夫々毒素の証明、生化学的性状および代謝産物である揮発性脂肪酸と難揮発性脂肪酸をガスクロを用いて分析し、VPI manual⁸⁾に従って菌種を同定した。

5. 嫌気培養法

嫌気培養法は、Anaerobic chamber (N₂ 80%, CO₂ 12%, H₂ 8%) 内、または Steel wool 法 (N₂ 80%, CO₂ 20%) を用いた。また、毒素産生を目的とした増菌培養には、30°C で7日間嫌気培養を行なった。一方、菌分離に際しては 37°C、2日間培養を行なった。

実 験 成 績

1. 北海道産魚肉練り製品の肉とボツリヌス菌の検出

魚肉練り製品中におけるボツリヌス菌の汚染の程度を検討した結果、北海道産の魚肉練り製品 200 検体中、4 例 (2%) からボツリヌス毒素が証明され、その成績を表 2 に示した。

表 2. 北海道産魚肉練り製品の肉とボツリヌス菌の検出

食 品	検 体 数	ボツリヌス菌の検出			
		毒 素		菌 分 離	
		陽 性	陰 性	陽 性	陰 性
ハム・ソーセージ	18	0	18	0	18
カマボコ	51	0	51	0	51
チクワ	12	2 (A)	10	2 (A)	10
ハンバーグ	5	0	5	0	5
ハンペン	89	1 (E) 1 (A)	87	1 (A)	88
ナルト巻	11	0	11	0	11
オードブル	14	0	14	0	14
合 計	200	4 (A:3) (E:1)	196	3 (A)	197

注 A: C. botulinum A型

E: C. botulinum E型

その毒素型はA型3例，E型1例であった。また，A型毒素を証明した3例からはいずれもA型ボツリヌス菌を分離したが，E型毒素を証明した検体からは，ボツリヌス菌は分離出来なかった。

一方，中部地区産の魚肉練り製品50検体はいずれもボツリヌス毒素陰性であった。

2. ボツリヌス菌を分離した食品とその毒素型

ボツリヌス菌およびボツリヌス毒素が証明された食品の種類とその毒素型を表3に示した。

A型ボツリヌス菌が分離された食品は，焼チクワ，チーズチクワおよびシューマイ揚げの3検体であった。また，E型ボツリヌス毒素が証明された食品は真空包装のイカ巻ハンペンであった。

表 3. ボツリヌス菌を分離した食品とその毒素型

食 品	ボツリヌス毒素型	菌 分 離
焼 チ ク ワ	A	+
チ ー ズ チ ク ワ	A	+
シ ュ ー マ イ 揚 げ	A	+
イ カ 巻 ハ ン ペ ン	E	-

3. 魚肉練り製品から分離したボツリヌス菌の性状

これらの食品から分離されたボツリヌス菌3株の生化学的諸性状を表4に示した。

これらの菌株はいずれもA型毒素を産生し，その生化学的諸性状は定型的なボツリヌス菌の性状を示した。

考 察

従来から，我国におけるボツリヌス食中毒は北海道，東北地方，琵琶湖周辺において“いずし”を原因食品とするE型菌によるものであることは衆知のところである。A型菌あるいは，B型菌による食中毒は極めて少なく，原因食品も輸入食品であった。しかし，東京都における食中毒を始め，外国食品を摂食していないボツリヌスA型菌の食中毒が散発的に発生し，原因食品は不明とされている。

著者は，AF-2禁止以後のハム・ソーセージ類，魚肉練り製品中のClostridiumの分布を数年来研究して来た。その結果，これらの食品には土壤あるいは魚，動物の腸管内に常在するClostridiumの汚染が著しく高いことを明らかにした^{1, 2, 3, 4)}。従って，著者のこれまでの実験から魚肉練り製品にボツリヌス菌の汚染が推定された。

北海道産魚肉練り製品200検体から，ボツリヌス菌4例(2%)を検出した。その内訳は，A型ボツリヌス菌3例，E型ボツリヌス菌1例であった。我国の市販魚肉練り製品におけるこ

表 4. 魚肉練り製品から分離したボツリヌス菌の性状

性状	菌 株		
	焼 チ ク ワ	チーズチクワ	シューマイ揚げ
Esculin PH	—	—	—
Esculin hyd.	+	+	+
Dulcitol	—	—	—
Adonitol	—	—	—
Fructose	+ ^w	+ ^w	—
Galactose	—	—	—
Glucose	+	+	+ ^w
Glycerol	—	—	—
Inulin	—	—	—
Raffinose	—	—	—
Melibiose	—	—	—
Melezitose	—	—	—
Mannose	—	—	—
Mannitol	—	—	—
Lactose	—	—	—
Salicin	—	—	—
Starch PH	+ ^w	+ ^w	+ ^w
Starch hyd.	—	—	—
Trehalose	+ ^w	+ ^w	—
Xylose	—	—	—
Gelatin	+	+	+
Milk	D	cd	cd
Indole	—	—	—
Nitrate red.	—	—	—
H ₂ S	+	+	+
脂 肪 酸	A, B, iv, ib, ic	A, iv, ib, b	B, iv, a, pi, bi, c
抗血清による中和 (型)	A	A	A

注) — : 陰性 + : 陽性 +^w : 弱陽性 D : 消化
 cd : 凝固, 遅れて消化 A : 酢酸 B : 酪酸
 iv : イソ吉草酸 ib : イソ酪酸 P : プロピオン酸
 ic : イソカプロン酸 大文字は大量, 小文字は少量。

の高率なボツリヌス菌検出は, 1) 試料の処理に際して, 十分な嫌気的環境に留意した事。2) 増菌培地として自家製の殿粉加 **Chopped meat broth** を用いた事。3) 対象食品が魚肉練り製品であった事によると考える。Smith (1977)^{7, 10)} は獣肉および獣肉製品よりも魚肉製品にボツリヌス菌の分布が高いとしている。また多くの研究者は自家製の **Chopped meat broth** を用いて好成績をあげている。

我国における市販食品中のボツリヌス菌の分布に関する報告はみられない。しかし, 外国においては, Insalata (1969)¹²⁾ らは, インスタント調理食品 400 検体のうち, 真空包装された

フランクフルト・ソーセージからB型ボツリヌス菌1例を検出した。また、半加工肉製品73検体からB型ボツリヌス菌1例を検出した。Abrahamsson (1971)¹¹⁾らは、半加工肉製品372検体からA型ボツリヌス菌5例とB型ボツリヌス菌1例を検出した。Prévo¹³⁾t (1953)らは、牛肝臓の3例からA型ボツリヌス菌を、2例からB型ボツリヌス菌を検出した。さらに羊の脚からA型ボツリヌス菌を検出した。Kautter (1974)¹⁴⁾らは、986検体の新鮮カニ肉からボツリヌス菌6例(0.6%)を検出した。その内訳はE型ボツリヌス菌4例、B型ボツリヌス菌2例であった。また、低温殺菌したカニ肉1000検体からF型ボツリヌス菌1例を検出した。

Greenberg (1966)¹⁵⁾らは、生肉2358検体(鶏肉1078検体、牛肉624検体、豚肉656検体)中、鶏肉の1例にのみC型ボツリヌス菌を検出した。

今回の実験で魚肉練り製品からA型ボツリヌス菌が3例から分離されたが、その汚染経路については明らかでない。しかし、原料肉である魚および土壌からの汚染がまず考えられる。

我国における土壌調査において、北海道を始め、青森、岩手、⁵⁾東京、⁶⁾滋賀¹⁶⁾などの土壌、^{17,18,19)}河川および海底の泥、魚などからE型ボツリヌス菌が高頻度に見出されている。小野⁵⁾らは北海道全土の土壌からボツリヌス菌およびE型毒素を13.1%に検出し、特に屈斜路湖からは約80%の高率に検出した。山本⁶⁾らは、青森県内の湖沼から6.7%、特に湖底では25%にボツリヌス菌を検出した。ついで徳地^{17,18)}らは、滋賀県内の11河川から10.1%、特に琵琶湖周辺土壌から54.2%にボツリヌス菌を検出した。

また、我国の土壌におけるA型菌の証明はこれまで^{20, 21, 22)}数例の報告があり、²²⁾豊川²²⁾らは青森地方の土壌および魚介類におけるボツリヌス菌の分布を検討し、田光沼の魚類よりA型2株を分離している。従って、魚肉練り製品におけるボツリヌス菌の汚染は実験方法に十分留意して行なえば、検出率が高まることが推察される。よって、さらに広範な検討を行なう必要があると考えられる。

ま と め

市販の魚肉練り製品におけるボツリヌス菌の汚染状況を調査した結果、北海道産魚肉練り製品200検体中、A型毒素3例、E型毒素1例を検出した。なお、A型毒素を証明した3検体からは、夫々ボツリヌス菌をも分離したがE型毒素を証明した検体からはボツリヌス菌は分離出来なかった。

中部地区産魚肉練り製品50検体はいずれもボツリヌス毒素陰性を示した。

終りに種々御便宜をはかり、御指導を賜った岐阜大学嫌気性菌実験施設、上野一恵教授に深謝致します。また、ボツリヌス抗毒素血清の分与を受けた千葉県血清研究所、近藤久博士および国立予防衛生研究所、近藤了博士に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 小林とよ子, ほか (1976) : 東海学園女子短期大学紀要, 11; 19-24.
- 2) 小林とよ子, ほか (1977) : 嫌気性菌感染症研究会講演記録, 7; 30-36.
- 3) 小林とよ子, ほか (1978) : 東海学園女子短期大学紀要, 13; 17-24.
- 4) 小林とよ子, ほか (1978) : 嫌気性菌感染症研究会講演記録, 8; 86-90.
- 5) 小野悌二, ほか (1967) : 北海道衛生研究所報, 17; 1-12.
- 6) 山本耕一, ほか (1976) : 青森県衛生研究所報, 14; 19-22.
- 7) Smith, L.D.S. (1976) : The pathogenic Anaerobic Bacteria C.C. Thomas, U.S.A.
- 8) Holdeman, L. V. et al. (1975) : Anaerobe Laboratory Manual, Virginia Polytechnic Institute and State University, U.S.A.
- 9) 伊藤 武, ほか (1977) : 嫌気性菌感染症研究会講演記録, 7; 70-74.
- 10) Smith, L.D.S. (1975) : Appl. Microbiol., 30; 2, 319-323.
- 11) Abrahamsson, K. (1971) : Appl. Microbiol., 21: 543-544.
- 12) Insalata, N. F. (1969) : Appl. Microbiol., 17: 542-544.
- 13) Prévot, A.R. (1953) : Ann. Inst Pasteur, 85; 544-575.
- 14) Kautter, D.A. et al. (1974) : Appl. Microbiol., 28; 722.
- 15) Greenberg, R.A. (1966) : Appl. Microbiol., 14, 5, 789-793.
- 16) 石母田四郎, ほか (1969) : 岩手県衛生研究所報, 13; 133-135.
- 17) 徳地幹夫, ほか (1973) : 滋賀県立衛生公害研究所報, 9; 23-28.
- 18) 徳地幹夫, ほか (1974) : 滋賀県立衛生公害研究所報, 10; 5-8.
- 19) 林 賢一, ほか (1974) : 滋賀県立衛生公害研究所報, 10; 9-17.
- 20) 宮崎正之助, ほか (1944) : 日本医学, 3397, 19.
- 21) Wakamatsu, T. et al. (1953) : Kitasato Arch. Exp. Med., 25, 163-186.
- 22) 豊川安延, ほか (1978) : 日本細菌学雑誌, 2; 33.