

2 「いずし」におけるボトリヌス E 型中毒発生防止に関する研究

第 1 報

魚肉における *Clostridium botulinum* Type E の発育と酸化還元電位の関係

Studies on Protection Against Outbreaks of Type E Botulism in "IZUSHI" Part 1

The Growth of *Clostridium Botulinum* Type E in Fish Flesh

in Relation to the Oxydation-Reduction potential

北海道立衛生研究所 (所 長 中 村 豊)

技 師 安 藤 芳 明

技 師 井 上 勝 弘

技 師 飯 田 広 夫

緒 論

研究のいとぐち

わが国におけるボトリヌス中毒は、1951年中村等¹⁾が北海道岩内郡において発生した鯨の「いずし」による中毒例を報告したのが最初で、それ以来今日まで既に約20件に達するが、その原因食はすべて魚類またはその加工品である。しかもこれらの中毒は *Clostridium botulinum* Type E の産生する毒素によるものである。

一方外国における本菌による中毒例を見ても、1936年 Meyer²⁾等が鰯罐詰による例を最初に報告して以来、今日まで11例中1例の例外を除いて、すべて魚加工品によるものである。Dolmam 等³⁾はE型中毒を“Fish borne botulism”と称し、魚類と密接な関係を有することを指摘している。

E型中毒が魚に発生し易い原因としてまず考えられるのは、ボトリヌスE型菌芽胞が元来土壤、砂等に広く分布し、魚の陸揚げから加工までに汚染される可能性があることである。

次に考えられるのは、魚肉自体が本菌の発育や毒素産生に対して好適な培地となる可能性である。これらに関しては、先に飯田等⁴⁾が北海道におけるボトリヌスE型菌芽胞の分布を調査し、特にオホーツク海沿岸の砂や網走湖の土壤中に濃厚に分布していることを報告し、また同氏等⁵⁾は中毒が「いずし」に発生し易い事実にかんがみ、実験的に芽胞を新鮮な魚体に接種して放置することにより、毒素の産生がみられること、すなわち特別に嫌気状態を考慮しなくても毒素の証明されることを報告した。佐伯⁶⁾はカレイ肉をペプシンで消化し、これに糖を添加した培地を考案し、これにボトリヌスE型菌を培養した結果、2,000 MLD/ml の毒素の産生を認め、肝タブイヨンに優ると述べている。また伊藤等⁷⁾はカレイやカキの煮汁に Corn steep liquor を添加して培養し、30,000MLD/ml の毒素濾液を得たと報告している。これらの事実はボトリヌスE型菌が魚を主体とする培地に十分発育し、かつ毒素を産生する可能性を裏書きしているものである。

魚肉が細菌の発育栄養源として有効な培地となり得ることは、既に古くから知られており、これについては多数の研究がこれまで発表された。

戸塚⁸⁾は既に1900年に種々の魚肉汁が多く細菌の繁殖に有効なことを発表し、里見⁹⁾はスルメエキスにおける大腸菌の発育について、日高¹⁰⁾は鯉煎汁につき、遠藤¹¹⁾はカキエキスにおける葡萄球菌その他の細菌の発育について、有馬¹²⁾は鯛エキスにおける腸チフス菌、赤痢菌、大腸菌の発育及び枯草菌、脾脱疽菌の芽胞形成能を見ており、いずれも魚肉エキスはリービツヒエキスに匹敵するものであると述べている。また最近富山等¹³⁾は魚肉を自己消化することにより、種々の細菌に対して有効な培養基を考案している。

しかしながらこれらの報告はいずれも好気性細菌に関するものであり、嫌気性細菌に関しては殆んど報告されていない。すなわち前記飯田等の実験の外は、Dolman 等³⁾が生の鯉にボトリヌスE型菌“VH”株を接種し、その発育の可能性を論じたに過ぎない。ボトリヌスE型菌が魚肉においていかなる条件、あるいはメカニズムによつて発育が可能であるかについては何ら明らかにされていない。しかもこの点を明らかにすることは魚肉におけるボトリヌス発生を防止する上から、きわめて重要な意義を有するものといえよう。ここにおいてわれわれは種々の魚肉について、ボトリヌスE型菌発育の諸条件につき研究する必要を感じ、実験を進めんとするものである。本報においては、魚介肉中の本菌発育に対する栄養及び発育因子は第二次とし、先ず魚介類培地における発育及び毒素産生と酸化還元電位の関係について検討し、更に培地の二、三の成分と電位との関係について論及する。

細菌と酸化還元電位

細菌の発育と酸化還元電位 (Eh) とは密接な関係を有し、従来これについての研究はかなり多い。細菌の発育を可能ならしめる培地の Eh, すなわち limiting potential (L.P.) は嫌気性細菌の発育条件として重要な意義を有する。今文献上二、三の *Clostridium* 属につき、その L.P. をみると次の如くであり、菌種によりやや異なるが、大体 +0.1 ボルト位である。

| 菌 種 | L.P. (Volt) | 測 定 者 |
|-------------------------|---------------------|-------------------------------|
| <i>Cl. tetani</i> | +0.11 (PH7.00~7.65) | Fildes ¹⁴⁾ |
| <i>Cl. sporogenes</i> | +0.114 (PH7.00) | Hanke & Katz ¹⁵⁾ |
| <i>Cl. welchii</i> | +0.114 (PH6.88) | Hanke & Balley ¹⁶⁾ |
| <i>Cl. histolyticum</i> | +0.06 (PH7.00) | Hanke & Balley ¹⁶⁾ |

また細菌の発育過程において培養液に白金電極を浸して得られる電極電位は、Yudkin¹⁷⁾によると細胞自体によるよりはむしろ細胞外代謝物質の電動能によるとされている。しかしながら、生活細菌はそのエネルギー源として、多くの非電動能物質を細胞内に取り入れ、それ自体の有する酵素系によつて酸化還元機構を営み、その結果として培養液より電極への電子の授受が行われ、ここに Eh の発生がもたらされるものと解釈される。

久保等¹⁸⁾によると生体は遊離エネルギー準位としての酸化還元的場を有しており、これは種々の酵素系によつて支配されているという。この説に従えば、好気性細菌におけるターミナル酸化還元系としてのチトクローム系酵素 (チトクローム C の $E_0' = +0.27v$)、酵母などに存在する黄色酵素系 (FAD の $E_0' = -0.20v$)、あるいは *Clostridium* 属のある種における酸化還元系として Stickland 反応に参与する補酵素系 (DPN の $E_0' = -0.32v$) などは、細菌の発育過程に表われる Eh の緩衝作用、あるいは終極電位 final potential (F.P.) と密接な関係を有するものである。故にこれらの酵素系の有する場を一定に保持させることは菌の発育にとつて不可欠である。一般に嫌気性細菌の発

育する Eh は好気性細菌のそれに比して著しく低い。従つてその発育には種々の Eh の低い還元性物質の存在を必要とする。

Cl. botulinum の培養中における Eh を測定した例としては、Plotz et Geloso¹⁹⁾ がブイヨンにおける真空培養を行つた結果、その F.P. は大抵の有芽胞嫌気性細菌のそれに類似していると報告している。これに対して Gillespie & Rettger²⁰⁾ は *Cl. botulinum* と *Cl. tetani* を比較したところ、その F.P. は前者が -0.30 v, 後者が -0.35 v で異なることから、Eh は菌種によつて特性づけられるものであるとした。しかしながら F.P. は、培養液の種類や培養条件によつてもかなり変動するものであり(後述のわれわれの実験においても見られた)、それをもつて菌種の分類に応用せんとするのは未だ検討の余地があると思われる。

魚肉と酸化還元電位

一般に魚肉をボイルすると嫌気状態が一定に保たれる。これに関して Lepper & Martin²¹⁾ が研究したところによると、これは魚肉中に存在するグルタチオンや不飽和性脂肪等の自動酸化による遊離酸素の吸収によるものであり、また魚肉蛋白の結合残基としての SH は酸化還元電位を低下せしむるのに重要な役割を果しているという。

Watson²²⁾ は新鮮な魚肉圧搾汁を放置して、その Eh の時間的変化を調べた結果、表面においては $+0.3$ v に緩衝されているが、内部は急速に -0.08 v まで低下することを見、このことから魚肉の腐敗には *aerobiosis* と *anaerobiosis* の両方が関与すると述べている。

このように魚肉汁の Eh はその成分と関係があり、従つて魚種による相違が考えられる。また魚体の鮮度、すなわち自己消化から雑菌による腐敗に至るまでの過程においても、当然差異が生ずるものと考えられる。よつてわれわれは魚肉培地の Eh 測定に当り、この点をも考慮に入れて実験を試みた。

実験材料と方法

菌株芽胞

Clostridium botulinum Type E 岩内株より所定の方法により作製した凍結乾燥芽胞を、用に臨み滅菌食塩水に浮遊せしめて使用する。

魚介類培地の作製

出来るだけ新鮮な市販魚介類を 3 枚におろし(但し介肉はそのまま)、肉質部のみを取り、これと同量の水を加え、ホモゲナイザーにかけて粥状とする。その 50g ずつを大型試験管に分注し、流動パラフィン 5 ml ずつを重層(Eh 測定用のみ)した後、高圧滅菌 (120°C , 30分) する。同一種については 2 本ずつ作製し、1 本は Eh 測定用、他は成分の分析及び毒素試験用とする。

培地成分の分析

培地中の固形物を除いた液について次の試験を行つた。

揮発性塩基性窒素 : Conway の微量拡散法による。

トリメチルアミン態窒素 : Conway のホルムアルデヒド法による。

トリメチルアミンオキシド : Dyer 等²³⁾ の方法に準じて行う。試料 4 ml に 20% トリクロール酢酸 4 ml を加え、30 分後濾過し、沈澱を 2% トリクロール酢酸で洗い、その洗液及び濾液約 20 ml に 0.2 ml の 6 N-HCl と 0.4 g の Devarda 合金を加え、20 分間沸騰浴中加熱後濾過し、沈澱を洗いその洗液及び濾液を合して 30~50 ml とする。次いでその 1 ml をとり、トリメチルアミンを測定し、還元前のトリメチルアミン量を差引きトリメチルアミンオキシドとして計算する。

全窒素：マイクロケルダール法による。

アミノ態窒素：バンスライク法による。

揮発性酸：試料 5 ml をとり硫酸酸性とした後常法により水蒸気蒸溜し、初溜 100 ml を 1/50 N-NaOH で滴定して酢酸に換算する。

SH 化合物：梶田²⁴⁾の方法による。試料 1 ml にリン酸バッファー (PH 7.0) 4 ml を加え、これに 0.01 M フェリシアンカリ (特級品を再結晶せるもの) 1 ml を加え 38°C で 30 分放置後、蒸溜水 2 ml 0.1 N トリクロール酢酸 2 ml を加え再び 30 分室温放置する。生成した沈澱を乾燥濾紙を用いて濾過した透明濾液について、ベックマン型光電光度計を用いて 420 m μ における吸光度を測定し、あらかじめフェリシアンカリで作製した標準曲線から残存フェリシアンカリのモル濃度を知り、これに対応する SH 化合物の量をシステインとして計算する。

PH：ガラス電極 PH メーターによる。

グリコーゲン：Folin-Wu の方法による。

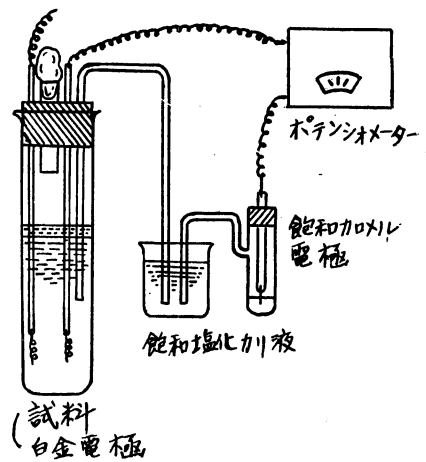
酸化還元電位の測定

魚肉培地は高圧滅菌後冷却を待ち、直ちにあらかじめ滅菌した寒天橋及び 2 本の白金極 (メタノール炎で良く磨いたもの) を挿入し、そのまま 37°C に 1 夜静置する (この間培地成分と遊離酸素とは動的平衡に達するものと考えられる)。次いで芽胞液 1 ml (芽胞数は別記の方法により測定して 10,000/ml) を接種し、直ちに Eh の変化を時間一電位曲線として追跡する。培養及び Eh の測定はすべて 37°C で行い、また標準電極として飽和カロメル電極を用い、電位差計はガラス電極 PH メーターを代用した。なお測定の前には雑菌試験を行つた。測定装置は第 1 図の如くである。

毒性試験

10 日間培養液を高速遠沈し、その上清を生理食塩水で稀釈し、この十進法稀釈液の 0.5 ml をマウス腹腔内に注射し、72 時間以内にボトリヌス B 型特有の症状を呈して斃死したものを陽性とする。

Fig. 1 培養基の Eh 測定装置



実験成績

1. 各種嫌気性培地における発育と酸化還元電位

普通ブイオンに種々の還元性物質を添加して、次のような培地を作製し、ボトリヌス B 型菌芽胞を接種してその発育と Eh, PH 等の変化を観察した。

- (a) システイン・ブイオン (システイン 0.1%)
- (a) (a) + グルコース (グルコース 0.5%)
- (b) Na-チオグリコレート・ブイオン (Na-チオグリコレート 0.1%)
- (b) (b) + グルコース (グルコース 0.5%)
- (c) Na-ヒドロサルファイド・ブイオン (Na-ヒドロサルファイド 0.03%)
- (c) (c) + グルコース (グルコース 0.5%)
- (d) 肝々ブイオン
- (e) V.f ブイオン

発育度の表示は、培養液より一定時間毎にその 10 ml を取り、遠沈せしめた生菌を食塩水で洗滌後、再び 10 ml の食塩水に浮遊せしめ、その濁濁を光電比色計 (フィルター 660 m μ) による吸光度 (-log T) として読んだ。

その結果は第 1 表の如くであり、これを図示すると第 2 ~ 9 図の如くである。

第1表 各種嫌気性培地における発育と Eh, PH の時間的变化

| 培地 測定 時間 | a | | | a' | | | b | | | b' | | |
|----------------|--------|-----|-------|--------|-----|-------|--------|-----|-------|--------|-----|-------|
| | Eh (v) | PH | -logT | Eh | PH | -logT | Eh | PH | -logT | Eh | PH | -logT |
| 0 | -0.112 | 7.7 | | -0.117 | 7.5 | | -0.207 | 7.8 | | -0.210 | 7.5 | |
| 8 | -0.095 | — | | -0.111 | 7.5 | | -0.202 | — | | -0.212 | — | |
| 11 | -0.087 | 7.7 | | -0.108 | 7.5 | | -0.205 | 7.8 | | -0.215 | 7.5 | |
| 18 | -0.080 | 7.7 | | -0.150 | — | | -0.205 | — | | -0.215 | — | |
| 24 | -0.090 | — | | -0.182 | — | | -0.202 | — | | -0.212 | — | |
| 33 | -0.105 | 7.7 | | -0.220 | 7.5 | 0.046 | -0.210 | 7.8 | | -0.270 | 7.5 | |
| 36 | -0.094 | 7.8 | | -0.188 | 6.7 | 0.086 | -0.202 | 7.8 | | -0.240 | 7.4 | 0.012 |
| 40 | -0.085 | 7.5 | | -0.160 | 6.7 | 0.233 | -0.200 | 7.5 | | -0.233 | 7.1 | 0.066 |
| 46 | -0.077 | 7.3 | 0.004 | -0.140 | 6.0 | 0.229 | -0.195 | 7.5 | 0.018 | -0.231 | 6.0 | 0.341 |
| 57 | -0.065 | 7.3 | 0.004 | -0.123 | 6.0 | 0.144 | -0.195 | 7.5 | 0.013 | -0.210 | 5.5 | 0.301 |
| 67 | -0.060 | 7.3 | 0.004 | -0.103 | 5.6 | 0.125 | -0.202 | 7.5 | 0.014 | -0.215 | — | — |
| 83 | -0.055 | 7.3 | 0.004 | -0.090 | 5.3 | | -0.207 | 7.5 | 0.022 | -0.214 | 5.5 | 0.305 |
| 110 | -0.050 | 7.3 | 0.004 | -0.050 | — | | -0.205 | — | | -0.208 | — | |

| 培地 測定 時間 | c | | | c' | | | d | | | e | | |
|----------------|--------|-----|-------|--------|-----|-------|--------|-----|-------|--------|-----|-------|
| | Eh | PH | -logT | Eh | PH | -logT | Eh | PH | -logT | Eh | PH | -logT |
| 0 | -0.432 | 7.6 | | -0.435 | 7.6 | | -0.093 | 6.7 | | -0.065 | 8.1 | |
| 8 | -0.397 | — | | — | — | | -0.183 | — | | — | — | |
| 11 | -0.285 | 7.2 | 0.032 | -0.290 | — | 0.181 | -0.345 | — | 0.602 | -0.155 | 8.0 | 0.041 |
| 18 | -0.190 | 7.0 | 0.036 | -0.163 | 5.9 | 0.469 | -0.215 | 6.2 | 0.699 | -0.202 | 7.5 | 0.056 |
| 24 | -0.120 | — | — | -0.114 | — | — | -0.090 | — | — | -0.275 | — | — |
| 33 | -0.102 | 7.2 | 0.027 | -0.095 | 5.6 | — | -0.177 | — | — | -0.247 | — | — |
| 36 | -0.072 | 7.1 | 0.032 | — | — | 0.362 | -0.170 | 5.7 | 0.541 | -0.245 | 7.5 | 0.056 |
| 40 | — | 7.1 | 0.022 | -0.080 | 5.6 | — | -0.170 | — | — | -0.245 | — | — |
| 46 | -0.030 | — | — | -0.073 | 5.6 | 0.272 | -0.174 | — | 0.416 | -0.240 | 7.8 | 0.092 |
| 57 | — | — | — | -0.070 | — | — | -0.170 | 5.7 | — | -0.235 | — | 0.260 |
| 67 | +0.015 | 7.1 | — | -0.065 | 5.6 | — | -0.169 | — | — | -0.230 | 7.6 | — |
| 83 | — | — | — | -0.052 | — | — | -0.170 | — | — | -0.227 | — | — |
| 110 | +0.019 | 7.1 | — | -0.052 | 5.6 | — | -0.172 | 5.9 | — | -0.225 | 7.8 | 0.131 |

Fig. 2 培地 (a) における時間-Eh 曲線

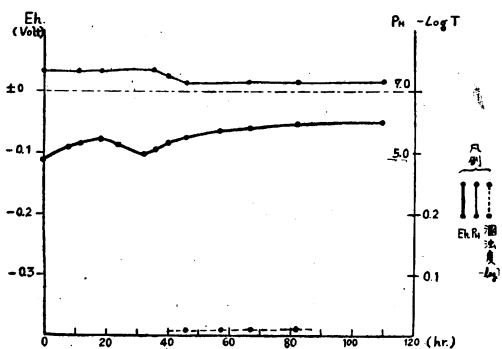


Fig. 3 培地 (a)

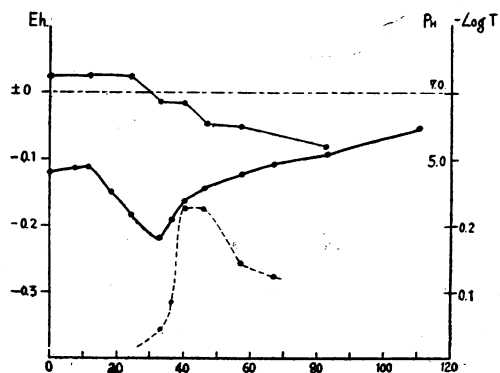


Fig. 4 培地 (b)

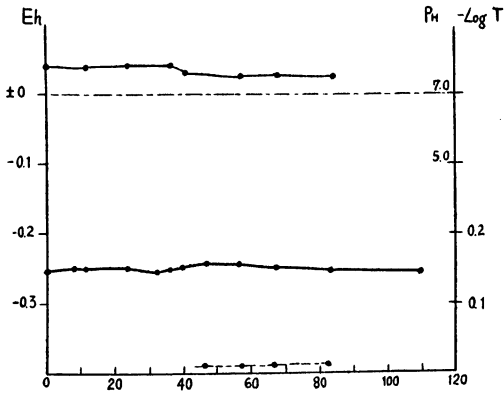


Fig. 5 培地 (b)

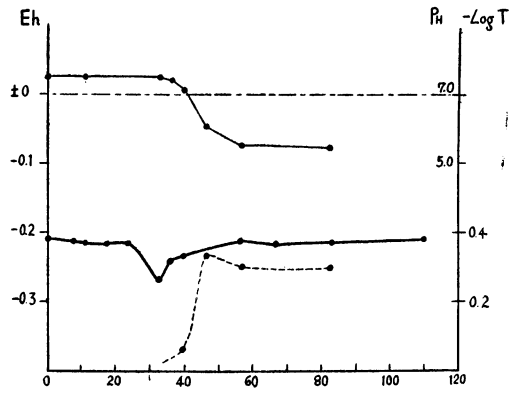


Fig. 6 培地 (c)

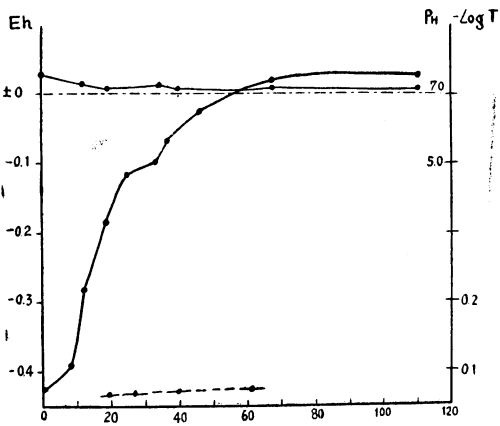


Fig. 7 培地 (c)

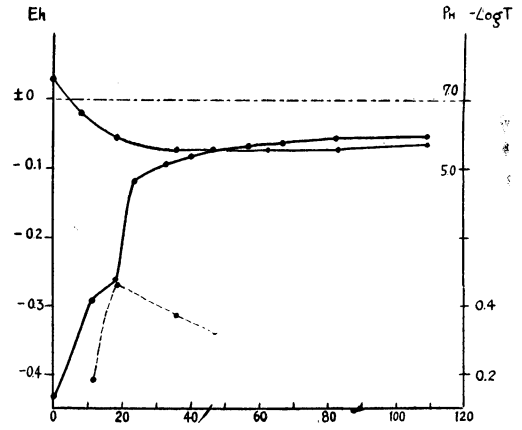


Fig. 8 培地 (d)

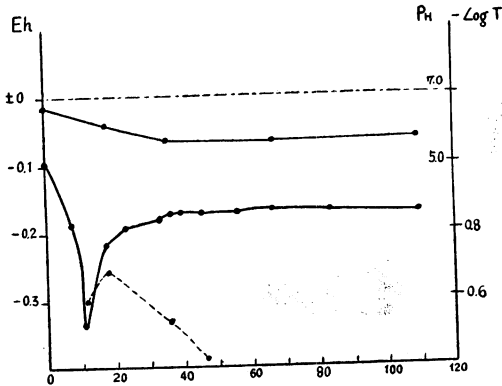
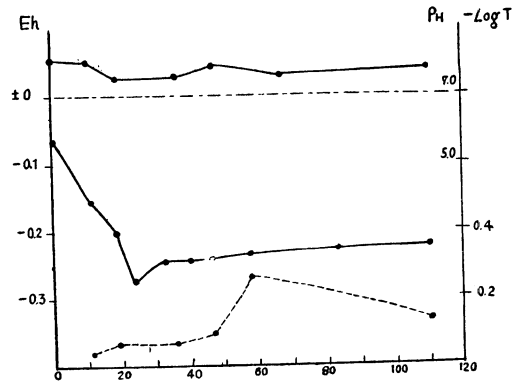


Fig. 9 培地 (e)



これらの培地における毒素産生状態は第2表の如くである。

これらの結果を見ると、システイン・ブイオン (Fig. 2) では Eh はかなり安定に保たれているが、PHの低下及び発育は認められず、毒素産生をも認められなかつた。しかるにこれにグルコースを添加した場合 (Fig. 3) では、Eh が一旦低下すると同時に発育及び PHの低下が認められ、再び Eh が上昇し、次いで安定な F.P. を保っている。そして毒素産生も認められた。同様にチオグ

第2表 毒素産生

| 培地 | 稀 釈 倍 数 | | | | | | | |
|----|---------|---|----|---|-----------------|---|-----------------|---|
| | 原 | | 10 | | 10 ² | | 10 ³ | |
| a | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| a' | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ○ |
| b | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| b' | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ○ |
| c | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| c' | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| d | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ |
| e | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ | ○ | ○ |

註 ○マウス生, ●マウス死。

リコレート・ブイヨン (Fig. 4) は, かなり Eh が低下した安定な培地であるにもかかわらず, 発育は認められず, 一方グルコースを添加した場合 (Fig. 5) は顕著な発育が認められた。ハイドロサルファイド・ブイヨンでも同様なことが認められたが, ハイドロサルファイド自体がきわめて不安定なため, 自動酸化せられ, その結果 Eh が上昇し, 発育はあまり良好ではなかつた。肝マブイヨン及び V.f ブイヨンはともに初めの Eh が低く, 発育も良好であつた。特に肝マブイヨンは他のブイヨン培地に比べて Eh の低下並びに発育がすみやかであつた。すなわちボトリヌス E 型菌芽胞の発育には, エネルギー源としてグルコースのような炭素源が必要であり, しかもこれは Eh の低下にも関係するようである。F.P. は各培地によつて異なり一定しなかつた。すなわち F.P. は菌の活性よりもむしろ培地の組成に支配されることがわかる。

2. 芽胞数の酸化還元電位に対する影響

嫌気性細菌の発育には培地の L.P. がある程度以下でなければならぬが, 大きな Inocula を接

第3表 芽胞数と Eh との関係

| 芽胞数 測定 時間 | 1.3×10 ⁴ /ml | | 1.3×10 ³ /ml | | 1.3×10 ² /ml | | 1.3×10 ¹ /ml | | 0 |
|-----------------|-------------------------|-----|-------------------------|----|-------------------------|----|-------------------------|----|--------|
| | Eh (v) | 濁濁 | Eh | 濁濁 | Eh | 濁濁 | Eh | 濁濁 | Eh |
| 0.0 | +0.075 | — | +0.075 | — | +0.075 | — | +0.075 | — | +0.075 |
| 5.0 | -0.010 | — | +0.070 | — | +0.065 | — | +0.067 | — | +0.087 |
| 8.0 | ±0 | ± | +0.068 | — | +0.065 | — | +0.068 | — | +0.105 |
| 10.0 | ±0 | ± | +0.073 | — | +0.070 | — | +0.070 | — | +0.155 |
| 13.0 | -0.002 | + | +0.070 | — | +0.070 | — | +0.070 | — | +0.155 |
| 15.5 | -0.005 | + | +0.060 | — | +0.070 | — | +0.070 | — | +0.155 |
| 23.5 | -0.185 | ++ | +0.065 | — | +0.065 | — | +0.060 | — | +0.155 |
| 28.0 | -0.165 | ++ | +0.043 | ± | +0.045 | ± | +0.060 | — | +0.155 |
| 33.0 | -0.165 | ++ | +0.035 | ± | +0.035 | ± | +0.050 | ± | +0.155 |
| 50.0 | -0.165 | +++ | +0.025 | + | +0.025 | + | +0.040 | ± | +0.155 |
| 57.0 | -0.165 | +++ | +0.013 | + | +0.025 | + | +0.035 | ± | +0.155 |
| 77.0 | -0.175 | +++ | +0.015 | + | +0.020 | + | +0.035 | ± | +0.155 |
| 98.5 | -0.165 | +++ | +0.015 | + | +0.020 | + | +0.035 | ± | +0.155 |

註 +は肉眼的濁濁の度を合わす。—はなし。

種した培養では、電位がかなり不安定な場合でも十分発育し得ることは従来から認められている。

Reed & Orr²⁵⁾ はペプトン・フォスフェート培地に大量の *Clostridium welchii* を接種した場合、Eh は +0.225v より +0.025v まで低下し、また同一培養液を高速遠沈して菌体を沈下せしめ、その中に電極を入れると菌体自体の還元電位差が生じ、更に -0.200v まで低下することを見ている。

われわれはグルコース・ブイオンにおけるボトリヌスE型菌の芽胞数と培養中の Eh との関係について実験した。

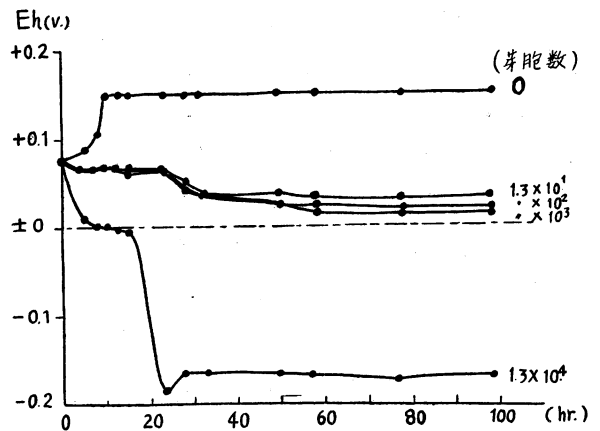
培地：グルコース (0.5%) を普通ブイオンに添加し、そのまま高圧滅菌した培地につき前記方法で Eh を測定する。培養は 37°C で行つた。

芽胞数の測定：肝ぞうのホモジネートを同量の普通ブイオンで約 30 分間煮出した液を濾過し、濾液に寒天を 2.5% の割に加え、PH 7.0 に修正後、濾過した透明液を試験管 (17×1.7cm) に 20ml ずつ分注して培地とする。菌計数にはこの培地を 50°C に温めながら芽胞各稀釈液 1 ml を均等に接種し、次いで冷却を待ち表面にチオグリコロート寒天液を流して重層し、37°C に培養して 72 時間までに生ずる集落数を算える。

その結果は第 3 表及び第 10 図の如くである。

この結果によると、グルコース・ブイオン自体の L.P. はかなり高く、+0.075~+0.155v であるが、大量の芽胞を接種した場合には発育が起り、Eh はかなり低下することがわかる。すなわち接種する芽胞数が 1.3×10^3 /ml までは Eh の低下が見られないが、それ以上では顕著な低下が見られる。この事実からボトリヌスE型菌芽胞は、発芽及び発育に必要なエネルギー源と十分な栄養がある場合、大体 1 万個以上の接種量であれば、厳密な嫌気性を考慮しなくても発育する可能性を示している。

Fig. 10 グルコース・ブイオンにおける芽胞数と時間-Eh 曲線



3. 各種魚介類培地における発育と Eh

実験に供した培地の性状は第 4 表の如くである。

第 4 表 各種魚介類培地の一般的性状

| 魚種 | 成分 | PH | 全窒素 (mg%) | アミノ窒素 (mg%) | 揮発性基塩基窒素 (mg%) | トリメチルアルファミン窒素 (mg%) | トリメチルオキサミド (mg%) | 揮発性発酸 (mg%) | -SH (mg%) | グリコーゲン (g%) |
|----|----|-----|-----------|-------------|----------------|---------------------|------------------|-------------|-----------|-------------|
| イ | カ | 6.5 | 1,475.0 | 93.3 | 69.4 | 44.4 | 137.6 | 15.6 | 3.6 | 0.000 |
| マ | ス | 6.4 | 260.0 | 85.0 | 32.4 | 5.0 | 0.0 | 6.6 | 38.7 | 0.000 |
| マ | グ | 6.0 | 795.0 | 142.7 | 31.7 | 2.6 | 0.0 | 10.2 | 47.2 | 0.000 |
| サ | バ | 6.0 | 532.0 | 99.5 | 27.2 | 6.0 | 0.0 | 28.2 | 50.9 | 0.000 |
| ホ | ツ | 6.4 | 574.0 | 215.0 | 16.2 | 2.3 | 0.4 | 26.2 | 43.9 | 2.282 |
| フ | ナ | 6.7 | 656.7 | 59.4 | 24.1 | 0.0 | 0.0 | — | 30.3 | 0.000 |

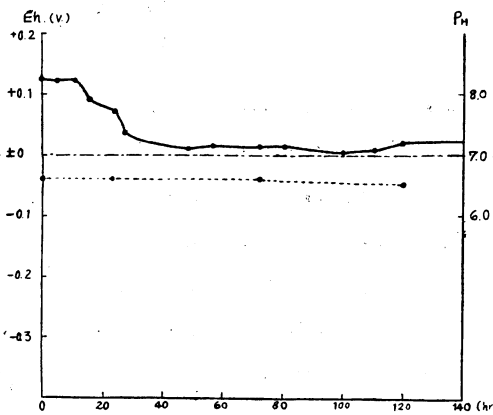
これらの培地におけるボトリヌスE型菌の発育中の Eh の変化を第 5 表及び第 11~16 図に示し

た。また毒素産生を第6表に示した。

第5表 魚介類培地におけるボトリヌスE型菌発育中の Eh の時間的变化

| 培地 時間 | イカ | マス | マグロ | サバ | ホッキ貝 | フナ |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 0 | +0.127 | -0.061 | -0.025 | -0.005 | -0.077 | -0.132 |
| 5 | +0.124 | -0.086 | -0.063 | -0.009 | -0.070 | -0.155 |
| 11 | +0.127 | -0.140 | -0.078 | -0.010 | -0.072 | -0.244 |
| 15 | +0.092 | -0.225 | -0.196 | -0.182 | -0.175 | -0.382 |
| 24 | +0.077 | -0.333 | -0.248 | -0.340 | -0.226 | -0.348 |
| 28 | +0.037 | -0.308 | -0.333 | -0.300 | -0.140 | -0.329 |
| 48 | +0.015 | -0.245 | -0.300 | -0.303 | -0.148 | -0.330 |
| 56 | +0.020 | -0.200 | -0.265 | -0.285 | -0.135 | -0.329 |
| 72 | +0.021 | -0.199 | -0.230 | -0.284 | -0.123 | -0.334 |
| 80 | +0.020 | -0.190 | -0.235 | -0.213 | -0.115 | -0.330 |
| 100 | +0.026 | -0.190 | -0.225 | -0.210 | -0.115 | -0.330 |
| 128 | +0.028 | -0.190 | -0.231 | -0.210 | -0.115 | -0.335 |
| 144 | +0.025 | -0.190 | -0.215 | -0.220 | -0.100 | -0.330 |

Fig. 11 イカ培地における時間-Eh 曲線



(凡例 — Eh
..... pH)

Fig. 13 マグロ培地

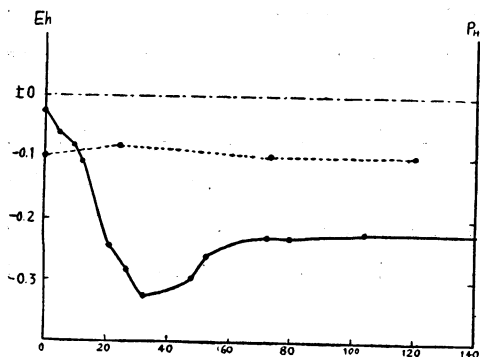


Fig. 12 マス培地

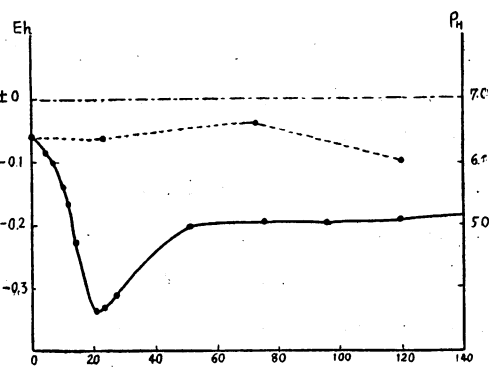


Fig. 14 サバ培地

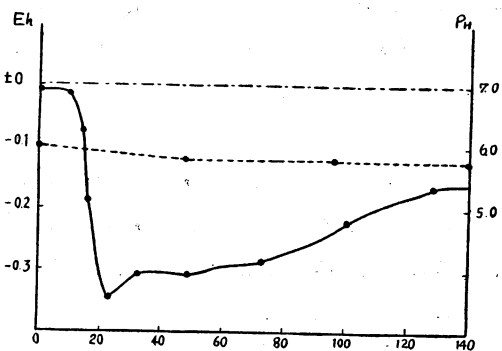


Fig. 15 ホツキ貝培地

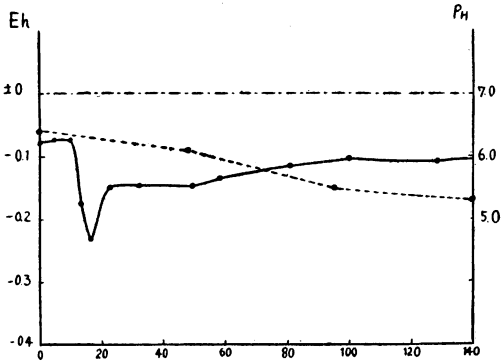
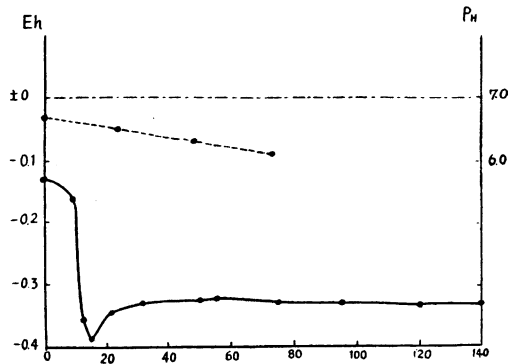


Fig. 16 フナ培地



第6表 魚介類培地における毒素産生

| 培地 | 稀 釈 倍 数 | | | |
|------|---------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 原 | 10 ¹ | 10 ² | 10 ³ |
| イカ | ○ ○ | ○ ○ | ○ ○ | ○ ○ |
| マス | ● ● | ○ ○ | ○ ○ | ○ ○ |
| マグロ | ● ● | ● ● | ● ● | ○ ○ |
| サバ | ● ● | ● ● | ○ ○ | ○ ○ |
| ホツキ貝 | ● ● | ● ● | ● ● | ○ ○ |
| フナ | ● ● | ● ● | ● ● | ○ ○ |

魚介類培地の成分はその種類により多少の相違はあるが、細菌の栄養源としては十分と考えられる。しかしながら培地の Eh はそれぞれ異なり、イカの場合では Eh が高いため菌の発育及び毒素産生が認められなかった。その他の魚介類ではいずれも Eh は低下し、菌の発育が見られた。一般に培地の Eh は -SH 含量やトリメチルアミノオキサイド含量に関係するように思われるが、これについては後述する。本実験の結果によれば、魚介類培地では前記ブイヨン培地と異なり、特に還元性物質を添加しなくてもボトリヌス E 型菌は発育し得る。このことは勿論前述のように L.P. や芽胞数にも関係してくるが、培地中に発芽及び発育に必要なエネルギー源（炭水化物またはその類似物質と考えられる）が存在し、かつ発育を好適ならしめるような酸化還元系の発生が大いに関与しているものといえる。菌の発育中における F.P. は魚種によりかなりの相違があつたが、これはそれぞれ成分の相違による各種電動能物質による Eh の緩衝作用の影響と思われる。またこの F.P. と毒素産生には有意な関係はみられなかった。しかしながら Eh の安定性は菌の発育と密接な関係があるから、当然 Eh の変化の少ない F.P. を保つことは毒素産生にも影響するものと考えられる。

4. 魚肉の自己消化と Eh

「いずし」のうま味はその軟化せる肉質と、適当な酸味によるものといえよう。これにはその製造過程に起る自己消化酵素、あるいは有用微生物により行われる蛋白の分解や酸形成が関与するものと考えられる。しかしながら、これをボトリヌス菌発育の見地からすれば、蛋白の分解が行われることは該菌に十分な栄養源を供給することになるから、ボトリヌス発生防止上きわめて危険なことといわねばならない。

※ ボトリヌス E 型菌は一般に蛋白分解能が小さいと言われている。

一般に魚肉の自己消化酵素の作用最適条件は、海水魚では PH4.5, 温度 40~50°C であり、淡水魚では PH4.5, 温度 23~27°C であるといわれている。従つて「いずし」のような酸味食品を室温以上に上げて製造すると、自己消化が旺盛となり、蛋白質の分解が促進され、その結果 PHが上昇する。このような条件では嫌气的条件さえ与えられれば、ポトリヌス菌の発育上きわめて良好であることはおのずから明らかである。

今魚肉の自己消化に伴う Eh 及び成分の変化を見るため、新鮮なサバ及びカレイ肉のホモジエートを用い、PH4.5 に調整し、45~50°C の恒温槽中で自己消化せしめた。その結果は第 8 表及び第 17~18 図の如くである。

第 8 表 魚肉の自己消化と Eh, -SH, アミノ基の時間的变化

| 魚種 測定 時間 | サバ | | | カレイ | | |
|----------------|--------|-----------|--------------|--------|-----------|--------------|
| | Eh | -SH (mg%) | アミノ態窒素 (mg%) | Eh | -SH (mg%) | アミノ態窒素 (mg%) |
| 0 | +0.135 | 13.3 | 78.2 | +0.115 | 2.4 | 44.6 |
| 3 | +0.001 | 23.6 | 94.9 | -0.035 | 4.8 | 50.2 |
| 6 | +0.003 | 47.2 | 162.0 | -0.029 | 8.4 | 56.9 |
| 12 | +0.001 | 66.0 | 319.6 | -0.034 | 15.1 | 66.1 |
| 24 | +0.001 | 77.5 | 402.3 | -0.036 | 15.1 | 66.1 |
| 48 | -0.004 | 52.0 | 569.9 | -0.030 | 20.5 | — |
| 72 | -0.004 | 49.6 | 593.1 | -0.030 | 20.2 | — |

Fig. 17 サバの自己消化

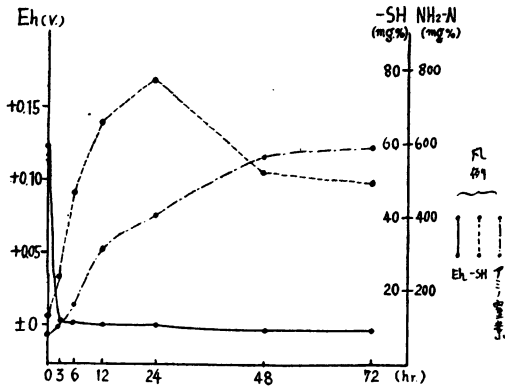
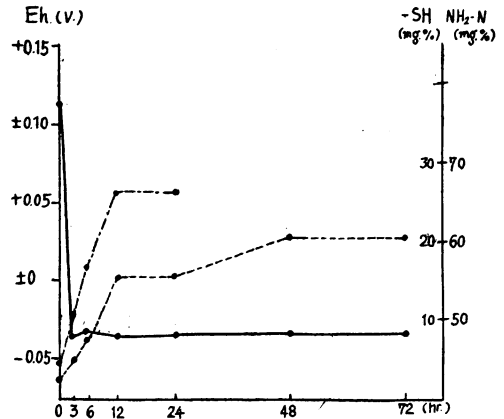


Fig. 18 カレイの自己消化



これら結果によると、魚肉は自己消化開始後約 3 時間にして著しい Eh の低下が見られ、同時に SH 基や遊離アミノ基の増加が起つた。サバとカレイとでは明らかに自己消化の程度が異なり、前者の方が旺盛である。これは一般に赤味魚（サバのような廻遊性魚に多い）の方が、白味魚（カレイのような底棲魚に多い）より自己消化が強いといわれている事実と一致する。しかしながら Eh の低下度合は両種において大差なく、また SH 基との量的関係（すなわちサバの方が SH 含量が多いにもかかわらず Eh の低下に大差がない）も認められない。また SH 基は 48 時間以後、やや減少する（これは自動酸化によるためであろう）にもかかわらず、Eh はほとんど変化しない。これらの事実より、魚肉の自己消化によつて起る Eh の低下は、勿論 SH 基の増加は重要な一因子である

が、これ以外にも何らかの酸化還元系の発生が関与するように思われる。

5. 魚肉の腐敗と Eh

魚肉蛋白の分解は自己消化酵素の外、附着している種々の細菌の腐敗作用にもよる。殊に「いずし」ではその前処理、すなわち「水晒し」を行う間に、水温が上昇すると腐敗が進行する可能性がある。種々の細菌の増殖により遊離酸素が消費され、且つ魚肉の分解が起れば、Eh は必然的に低下し、その結果ボトリヌスE型菌の発育を可能ならしめることが考えられる。よつてわれわれは腐敗の進行と Eh との関係並びにボトリヌスE型菌が一般の腐敗細菌と共棲した場合の毒素産生について実験した。

新鮮なカレイ肉のホモジエネート（水を2倍量加えた）にボトリヌスE型菌芽胞 10^4 個を接種し、 25°C に放置し、その腐敗過程、Eh 及び毒素産生を観察した。対照として芽胞を入れないものを置いて同様に試験した。その結果は第9表の如くである。

第9表 カレイ肉の腐敗とボトリヌスE型菌の毒素産生

| 区分 | 時間 | 揮発性塩基窒素 (mg%) | トリメチルアミン態窒素 (mg%) | 揮発性酸 (mg%) | PH | -SH (mg%) | Eh (v) | 一般細菌数 (1ml当り) | ※毒性 |
|-----|-----|---------------|-------------------|------------|-----|-----------|--------|-------------------|------|
| 実験区 | 0 | 6.0 | 0.6 | 4.8 | 6.2 | 2.4 | +0.126 | 2.0×10^5 | (-) |
| | 9 | 9.5 | 3.2 | 9.6 | 6.6 | 9.0 | -0.094 | 5.0×10^6 | (-) |
| | 24 | 15.8 | 11.5 | 50.6 | 6.6 | 13.3 | -0.274 | 5.0×10^7 | (-) |
| | 48 | 43.1 | 12.3 | 128.5 | 6.6 | 23.3 | -0.179 | 2.0×10^9 | (-) |
| | 72 | 84.6 | 14.3 | 264.0 | 6.8 | 20.0 | -0.193 | 1.6×10^9 | (+)死 |
| | 96 | 161.1 | 15.8 | 475.2 | 7.2 | 20.6 | -0.214 | — | (+)死 |
| | 120 | 251.8 | 15.8 | 588.0 | 7.4 | 21.8 | -0.200 | — | (+)死 |
| 対照区 | 0 | 6.0 | 0.6 | 4.8 | 6.2 | 2.4 | +0.133 | 2.0×10^5 | (-) |
| | 9 | 9.2 | 2.9 | 7.2 | 6.6 | 9.0 | +0.004 | 4.1×10^6 | (-) |
| | 24 | 20.5 | 11.8 | 47.8 | 6.6 | 15.1 | -0.264 | 4.8×10^8 | (-) |
| | 48 | 46.0 | 12.2 | 105.1 | 6.6 | 25.4 | -0.164 | 1.7×10^9 | (-) |
| | 72 | 87.7 | 14.3 | 292.3 | 6.8 | 20.5 | -0.176 | 1.0×10^9 | (-) |
| | 96 | 164.0 | 15.8 | 462.0 | 7.4 | 20.0 | -0.204 | — | (-)死 |
| | 120 | 241.7 | 15.8 | 496.8 | 7.6 | 20.0 | -0.200 | — | (-)死 |

※ マウスのボトリヌス特有の症状を呈したものを(+), しかるざるものを(-)とする。

この結果によると、Eh は対照においてさえ初期腐敗の徴候の現われる 24 時間以内に既に急激な低下を示し、ボトリヌスE型菌の発育を可能ならしめている。本実験においては毒素の産生は、3 日目に至つて認められ、この時は著しい腐敗臭が感ぜられた。

6. トリメチルアミノオキサイドの Eh に及ぼす影響

先に魚肉培地におけるボトリヌスE型菌の発育を見た際、イカの場合では Eh の低下が見られず、また毒素の産生も認められなかつた。イカのエキスは、その成分において他の魚類に比し著しく窒素源に富み、細菌の栄養源としては劣らないが、トリメチルアミノオキサイド (T.M.A.O.) の含有量が多い。よつてこのものの影響について考察する必要がある。

Castell²⁰⁾は魚肉の腐敗に関与する種々の細菌を用い、その培養基中に T.M.A.O. を添加し、培養中の Eh の変化を研究した結果、Eh は T.M.A.O. 還元能を有する細菌と有さないものと異なるこ

と、また T.M.A.O. 自体はこれを還元する酵素 (T.M.A.O. レダクターゼ) が存在しなければ、培養中の Eh に対して何ら緩衝作用を示さないことなどを明らかにしている。しかしながら通常の嫌気性培地に T.M.A.O. を添加した際、細菌の還元酵素が存在しなくても Eh が上昇するのは、T.M.A.O. が何らかの理由で還元性物質の活性を阻害するからであろうとした。

T.M.A.O. が嫌気性細菌の培養中の Eh に及ぼす作用としては次の二つの見方が考えられる。一つはその緩衝電位が高いこと (Castell によれば、+0.12v~+0.14v とされている) で、これは勿論細菌の還元能の有無に関係してくる。他の一つは培地中の還元性物質が T.M.A.O. によつて酸化されるため、二次的に Eh が上昇することである。われわれはこれらの問題をとり上げて実験を行うこととした。

(i) ボトリヌス菌の T.M.A.O. 還元能試験

培地：プロテオース・ペプトン(Difco)2%, イーストエキス(Difco)2%, デキストリン1%, PH 7.2 とする。この培地に別にあらかじめ滅菌した T.M.A.O. 溶液を静かに加え、終末濃度 0.1% となるようにする。添加後は加熱することなく直ちに菌を接種する。

培養並びに試験：上記の基本培地であらかじめ前培養した生菌 1 ml を T.M.A.O. 添加培地に接種し、37°C に 24時間培養後、トリメチルアミンを定量する。対照として菌を接種しないものを置く。

その結果は次の如くである。

| 菌種 | トリメチルアミン量 (mg %) |
|-------------------------------------|------------------|
| <i>Clostridium botulinum</i> Type A | 19.6 |
| <i>Cl. botulinum</i> Type B | 22.5 |
| <i>Cl. botulinum</i> Type E | 5.7 |
| 対照 | 0.1 |

すなわちボトリヌス菌はいずれも還元能を有することが分る。しかも A, B型は E型に比しはるかに強い還元能を示した。次に T.M.A.O. を含有する嫌気性培地にボトリヌス E型菌を培養した場合、いかなる電位をとるかを知るため色素法により観察した。

培地及び方法は前回同様であるが、T.M.A.O. は 1% となるように加えた。培養は 37°C で 24時間おこなつた。その結果は次の如くである。

第 10 表 I.M.A.O. 添加嫌気性培地におけるボトリヌス E型菌の発育と電位

| 酸化還元色素 | E _h ' | 試料 | 対照 [※] 1 | 対照 ^{※※} 2 |
|-----------------|------------------|----|-------------------|--------------------|
| Toluidin blue | +0.011 | + | + | + |
| Resazurin | -0.050 | + | + | + |
| Indigo carmin | -0.125 | - | + | - |
| Nile blue | -0.142 | - | + | - |
| Cresyl violet | -0.163 | - | + | - |
| Janus green | -0.256 | - | + | - |
| Neutral red | -0.340 | - | + | - |
| Benzyl viologen | -0.363 | - | + | - |
| Methyl viologen | -0.446 | - | + | - |

註 色素還元される+, されない-

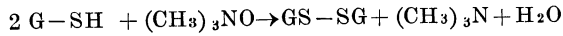
※ T.M.A.O. なし。

※※ 培地のみ。

この場合、菌の発育度合は対照 1 と全く変らなかつた。すなわち T.M.A.O. は菌の発育に対しては何ら阻害を示さないが、培養中の Eh を著しく上昇せしめることがわかる。この事実は、さきに Castell²⁶⁾ が還元能を有する細菌について観察した事実と一致しており、これはボトリヌス E 型菌の有する還元酵素による T.M.A.O. の緩衝電位の影響と考えられる。

(ii) T.M.A.O. の嫌気性培地に対する作用

T.M.A.O. の還元は細菌酵素によつて行われるほか、種々の還元剤によつても行われる。すなわち Devarda 合金、三塩化チタン、ハイドロサルファイド等である。また Ackermann 等²⁷⁾ は、肝ぞう中に次の如く反応するグルタチオンに結合せる耐熱性 SH 化合物の存在を認めている。



グルタチオン結合型 SH
トリメチルアミノキサイド
酸化型 SH
トリメチルアミン

われわれはかかる SH 系を含有する次の如き培地に T.M.A.O. をそれぞれ 0.1, 0.5, 1.0% の割合に添加した後加熱滅菌した際、それらの Eh を比較するため、あらかじめ添加した酸化還元色素の還元状態を観察した。

培地：肝ぞうブイオン（牛肝ぞう 1 分を 2 分の普通ブイオンで煮出した上清）システイン・グルコースブイオン（システイン 0.1%, グルコース 0.5%）チオグリコレート・グルコース・ブイオン（チオグリコレート 0.1%, グルコース 0.5%）グルコース・ブイオン（グルコース 0.5%）

上記各培地にあらかじめ色素を 0.002% となるように加え、T.M.A.O. を添加後 100°C に 30 分間加熱し、次いで 5 分間冷水で冷却後 37°C に 30 分間保ち、色素の褪色状態を観察する。その結果は第 11 表の如くである。

第 11 表 T.M.A.O. 添加各種嫌気性培地の電位

| 培地 | T.M.A.O. (%) | グルコース・ブイオン | | | | 肝ぞう・ブイオン | | | | システイン・ブイオン | | | | チオグリコレート・ブイオン | | | |
|---------------------|--------------|------------|-----|-----|-----|----------|-----|-----|-----|------------|-----|-----|-----|---------------|-----|-----|-----|
| | | 0 | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 0 | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 0 | 0.1 | 0.5 | 1.0 | 0 | 0.1 | 0.5 | 1.0 |
| o-Cresol indophenol | +0.191 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Thymol indophenol | +0.174 | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Toluylene blue | +0.115 | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| Thionine | +0.062 | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - |
| Cresyl blue | +0.045 | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - |
| Toluidin blue | +0.011 | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - |
| Resazurin | -0.050 | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - | + | - | - | - |
| Indigo carmine | -0.125 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Nile blue | -0.142 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Cresyl violet | -0.163 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Janus green | -0.256 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Neutral red | -0.340 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Benzyl viologen | -0.363 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

註 色素還元される+, されない-

この表から明らかなように、T.M.A.O. を添加後加熱した際、いずれも Eh の上昇が認められた。

今これらの培地にボトリヌスE型菌芽胞（約 10^4 個）を接種して、その発育状態を観察すると次の如くである。

第 12 表 T.M.A.O.添加後加熱嫌気性培地におけるボトリヌスE型菌の発育状態

| 培 地 | 添 加 T. M. A. O. (%) | 発 育 (hr) | | | |
|---------------------|---------------------------|----------|-----|-----|-----|
| | | 24 | 48 | 72 | 96 |
| グルコース・フイヨン | 0.0 | — | ++ | +++ | +++ |
| | 0.1 | — | — | + | +++ |
| | 0.5 | — | — | — | — |
| | 1.0 | — | — | — | — |
| 肝ぞう・フイヨン | 0.0 | +++ | +++ | ++ | ++ |
| | 0.1 | + | +++ | +++ | ++ |
| | 0.5 | — | — | — | — |
| | 1.0 | — | — | — | — |
| システイン・グルコース・フイヨン | 0.0 | +++ | +++ | ++ | ++ |
| | 0.1 | — | — | — | — |
| | 0.5 | — | — | — | — |
| | 1.0 | — | — | — | — |
| チオグリコレート・グルコース・フイヨン | 0.0 | +++ | +++ | +++ | ++ |
| | 0.1 | — | — | — | — |
| | 0.5 | — | — | — | — |
| | 1.0 | — | — | — | — |

註 濁濁 +++>++>+, なし —。

すなわち T.M.A.O. を 0.1% 以上添加した培地では、Eh の上昇のため、発芽は抑制され、また 0.5% 以上では全く発育は阻止されている。

(iii) T.M.A.O. による SH 化合物の酸化

上述の結果より明らかなように、T.M.A.O. は培地の酸化還元系、特に SH 基に作用することが予想される。よつて代表的 SH 化合物としてシステイン及びチオグリコール酸をえらび、その酸化速度について若干の実験を行つた。

方 法 :

M/10 トリメチルアミノオキサイド 10ml

M/100 SH 化合物 10ml

リン酸バッファー (PH 7.0) 10ml

を混ぜ合せ、一定温度 (37°C 並びに 100°C) に放置し、一定時間毎にその 1 ml をとり、システインをフェリシアンカリ法、チオグリコール酸をヨード法により測定し、それらの酸化率を求める。

$$\text{酸化率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{各時間のSH}}{\text{初めのSH}}\right) \times 100$$

対照として、T.M.A.O. の代りにあらかじめ酸素を煮沸して追出した蒸留水を用いた。

システインの酸化は第 13, 14 表及び第 19, 20 図の如くである。

第13表 システインの酸化 (37°Cの場合)

| 経過時間 (hr) | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 5 | 24 | |
|-------------|----|------|------|------|------|------|------|
| システイン (mg%) | 試料 | 30.2 | 26.0 | 21.8 | 18.2 | 12.7 | 2.6 |
| | 対照 | 30.2 | 27.8 | 25.0 | 19.1 | 16.7 | 2.6 |
| 酸化率 (%) | 試料 | 0.0 | 13.9 | 27.8 | 39.7 | 57.9 | 91.3 |
| | 対照 | 0.0 | 7.9 | 17.2 | 36.7 | 44.7 | 91.3 |

第14表 システインの酸化 (100°Cの場合)

| 経過時間 (min) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 | 60 |
|-------------|----|------|------|------|------|------|------|
| システイン (mg%) | 試料 | 30.2 | 19.9 | 14.5 | 9.6 | 6.0 | 2.6 |
| | 対照 | 30.2 | 23.0 | 23.0 | 23.2 | 23.0 | 23.0 |
| 酸化率 (%) | 試料 | 0.0 | 34.1 | 51.9 | 68.2 | 80.1 | 91.3 |
| | 対照 | 0.0 | 23.8 | 23.8 | 23.1 | 23.8 | 23.8 |

Fig. 19 システインの酸化 (37°C)

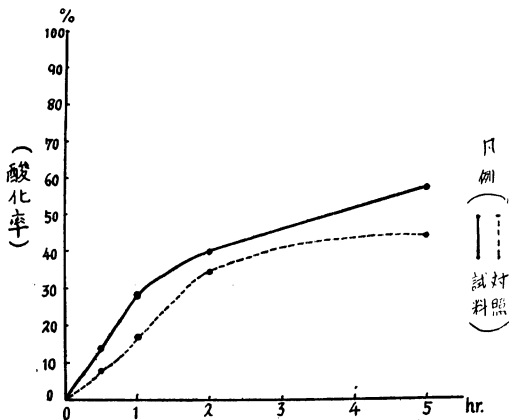
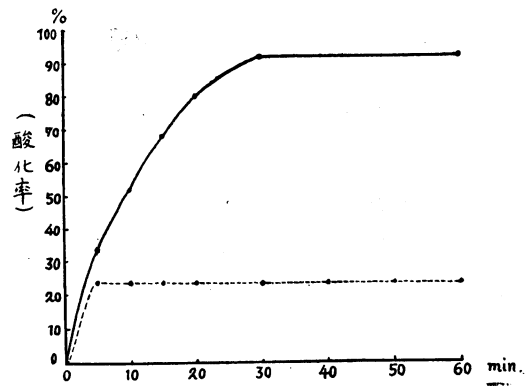


Fig. 20 システインの酸化 (100°C)



これらの結果によると、システインは 37°C においては初めの 30 分以内に何ら酸化を受けないが、100°C では速かに酸化される。しかしながら、37°C では自動酸化の影響が現われている。

チオグリコール酸の酸化は第 15, 16 表及び第 21, 22 図の如くである。

チオグリコール酸もシステインと同様、37°C では殆んど酸化されなく、むしろ自動酸化の影響が見られる。しかしながら 100°C では初めの 60 分間に大部分が酸化を受けることがわかつた。

第15表 チオグリコール酸の酸化 (37°Cの場合)

| 経過時間 (hr) | 0 | 0.5 | 1 | 2 | 5 | 24 | |
|----------------|----|------|------|------|------|------|------|
| チオグリコール酸 (mg%) | 試料 | 38.9 | 38.0 | 33.5 | 29.0 | 25.3 | 19.8 |
| | 対照 | 31.7 | 30.8 | 29.0 | 25.3 | 24.5 | 17.9 |
| 酸化率 (%) | 試料 | 0.0 | 2.3 | 13.8 | 25.2 | 34.9 | 49.1 |
| | 対照 | 0.0 | 2.8 | 8.5 | 20.1 | 32.7 | 43.5 |

第16表 チオグリコール酸の酸化 (100°Cの場合)

| 経過時間 (min) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 45 | 55 | 60 |
|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| チオグリコール酸 (試料) | 38.9 | 37.6 | 34.9 | 29.9 | 24.9 | 19.0 | 14.5 | 10.8 | 7.7 | 4.5 | 2.7 |
| (mg%) (対照) | 31.7 | 27.6 | 28.1 | 28.1 | 28.1 | 28.1 | 28.1 | 28.1 | 28.1 | 28.1 | 28.1 |
| 酸化率 (試料) | 0.0 | 3.3 | 10.3 | 25.7 | 35.9 | 48.8 | 62.7 | 74.3 | 80.2 | 88.4 | 93.0 |
| (%) (対照) | 0.0 | 12.9 | 11.3 | 11.3 | 11.3 | 11.3 | 11.3 | 11.3 | 11.3 | 11.3 | 11.3 |

Fig. 21 チオグリコール酸の酸化 (37°C)

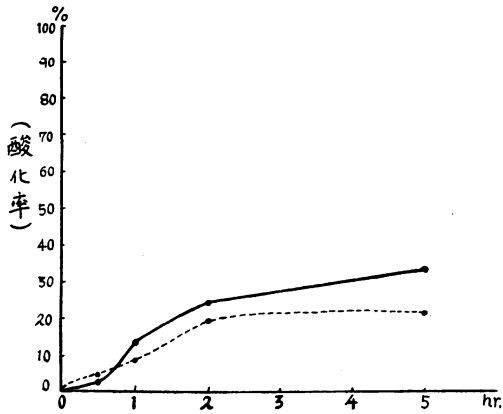
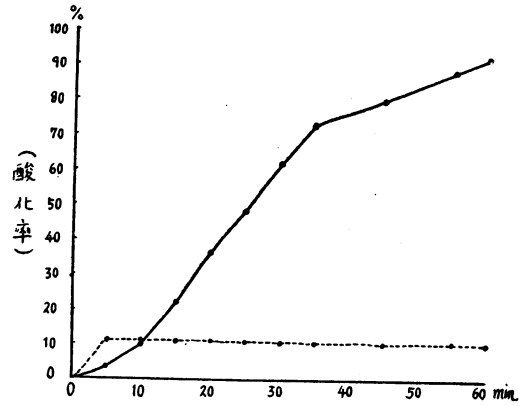


Fig. 22 チオグリコール酸の酸化 (100°C)



考

察

ボトリヌスE型菌の発育条件として、培地の Eh はまず第一に考慮されねばならないが、われわれの今回行った実験より考察すれば、それは必要にして十分な条件とは言い得ない。すなわち芽胞の発芽又は菌の発育におけるエネルギー源および栄養素の問題が入ってくる。特にエネルギー源としての糖及びそれに関連した物質は重要である。しかしながら実際に市販魚肉中の遊離糖は定量的にきわめて少ない。従つて糖以外に魚肉中に存在してボトリヌスE型菌の発芽増殖を促す物質の存在が考えられる。これについては目下検討中である。また実際問題として、「いづし」の製造に「こうじ」や砂糖を使用することがあるが、これはボトリヌスE型菌の発育源となり得るから、余程注意しなければならないと考えられる。従来培地中に糖を余り加えると、酸性に傾き毒素産生が劣るとされているが、魚肉のような培地は一般に PH の緩衝作用が強いから、余りその影響はないように見受けられる。この点については更に研究する予定である。

ボトリヌスE型菌芽胞は他の嫌気性菌芽胞と同様十分な栄養源とエネルギー源さえあれば、L.P.が高い場合でも多量に接種することにより、菌自体の電位降下作用によつて、培地の Eh を低下させ得る。従つて実際魚類が陸揚げされる時、局部的に多量の芽胞によつて汚染されることがあれば、そこから十分発育が可能となることも考えられよう。

また魚肉は生のまま放置すれば、それ自体の有する自己消化酵素により、あるいは二次的に腐敗細菌により蛋白の分解が起り、それと同時に Eh の低下が起る。その結果ボトリヌスE型菌の発育を可能ならしめる。「いづし」の製造において、酢を用いることは菌の発育を阻止する意味において

有効ではあるが、自己消化によるPHの上昇に注意しなければならない。すなわち最初に加える酢の量について検討する必要がある。この問題についても今後研究を進めてゆきたい。

T.M.A.O. は培地中で加熱されると、耐熱性 SH 基を酸化せしめ、その結果 Eh の上昇をもたらす。しかしながら通常の培養温度 (37°C 以下) ではこれが行われないし、またボトリヌス菌は T.M.A.O. 還元酵素を有しているから、T.M.A.O. を多量に含有する魚肉においても、生の状態では十分発育し得るものと考えられる。Castell²⁸⁾ は種々の細菌の発育に及ぼす T.M.A.O. の影響を調べているが、ボトリヌス菌についてはわれわれと同様な見解をとっており、発育は阻止されないと述べている。この点ボトリヌス菌は他の一般腐敗細菌と同様に、魚肉に対する親和性があるといえよう。

加熱魚肉汁は一般に安定な嫌気の状態を生ずる。特に T.M.A.O. 含量の少ない魚介類ではそうである。故に加熱滅菌された魚肉でも何らかの理由で二次的汚染があれば、ボトリヌス菌の発育は可能である。最近²⁹⁾ 本邦においても魚罐詰によるボトリヌス E 型中毒が発生したと報ぜられている。このことは単に罐詰のみでなく、広く水産加工品 (フィッシュソーセージやねり製品等) の全般にわたって注意を促す警告であろう。

結 論

1. 種々の嫌気性培地におけるボトリヌス E 型菌の発育中の酸化還元電位を測定した。
2. グルコースは発育のエネルギー源として重要であり、電位の低下と密接な関係を有する。
3. グルコース・ブイオンにおける発育は芽胞数に関係し、これは芽胞自体の電位降下作用によるものとする。
4. 加熱魚肉汁におけるボトリヌス E 型菌の発育中の電位を測定した。
5. 魚肉は一般に安定な嫌気の状態を保つが、電位を上昇せしめる一因子として T.M.A.O. があげられ、これが魚肉中の耐熱性 SH 化合物を酸化せしめることを実験的に証明した。
6. 魚肉の自己消化及び腐敗において、電位の降下がみられ、これに伴いボトリヌス E 型菌が発育し、毒素産生の起ることを実験的に証明した。

終りにあたり、本研究の端緒を与えられた中村豊所長、ならびにボトリヌス E 型菌岩内株の凍結乾燥芽胞を作製してわれわれの実験に供せられた神沢謙三技師に厚く感謝の意を表します。

引 用 文 献

- 1) 中村等：本誌 (特報) 昭 27 及び Japanese Journal of Medical Science & Biology Vol. 9, 45 (1956)
- 2) Meyer et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 35, 278 (1936)
- 3) Dolman et al. : Canad. p. Pub. Health, 41, 215 (1950)
- 4) 飯田等：本誌 (特報 3) 昭 29
- 5) 飯田等：本誌 (特報 5) 昭 31, 10~16 頁
- 6) 佐伯：本誌 (特報 5) 昭 31, 28~31 頁
- 7) 伊藤等：医学と生物学, 39, 昭 31, 77 頁
- 8) 戸塚：東京医学会雑誌, 14, 359 (1900)
- 9) 里見：細菌学雑誌, 203, 746 (1911)

- 10) 日高： 福岡医科大学雑誌, 20, 1696 (1927)
- 11) 遠藤： 細菌学雑誌, 350, 305 (1925)
- 12) 有馬： 医学研究, 6, 1225 (1932)
- 13) 富山： 九州大学農学部学芸雑誌, 13, 297 (1951)
- 14) P. Fildes： Brit. J. Exp. Path., 10, 151 (1929)
- 15) M. E. Hanke & Y. J. Katz： Arch. Biochem., 2, 183 (1943)
- 16) M. E. Hanke & J. H. Balley： Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 59, 163 (1945)
- 17) J. Yudkin： Biochem. J., 29, 1130 (1935)
- 18) 久保： 酸化還元電位 (昭 27)
- 19) H. Ploiz et J. Geloso： Ann. Inst. Past., 45, 613 (1930)
- 20) R. W. H. Gillespie & L. F. Rettger： J. Bac., 36, 605 (1938)
- 21) E. Lepper & C. J. Martio： Brit. J. Exp. Path., 10, 327 (1929)
- 22) D. W. Watson： J. Fish. Res. Bd. Can., 4, 252 (1939)
- 23) W. J. Dyer et al.： ibid., 8, 309 (1952)
- 24) 梶田： 生化学, 26, 547 (1954)
- 25) G. B. Reed & J. H. Orr： J. Bac., 45, 309 (1943)
- 26) C. H. Castell： J. Fish. Res. Bd. Can., 7, 567 (1950)
- 27) D. Ackermann et al.： Ber. Deu. Chem. Ges., 2750 (1926)
- 28) C. H. Castell： J. Fish. Res. Bd. Can., 6, 431 (1946)
- 29) 厚生省調査成績書 (昭 31) による。