

5 「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5報 魚肉の水晒し期間におけるボトリヌスE型菌の発育と毒素産生について

5 Studies on Protection against Outbreaks of Type E Botulism due to "Izushi", Part 5.
On the Growth and Toxin Production of *Cl. botulinum* Type E in Fish Muscle during Leaching.

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)
技 師 安 藤 芳 明
技 師 唐 島 田 隆
技 師 井 上 勝 弘

序 論

1 「いずし」におけるボトリヌスE型中毒と「水晒し」の関連性

一般に「いずし」の製法は、魚の水晒し→漬け込み(熟成)→き出し(漬け上つた水を切る操作を云う)の3段階を経て行われるもので、このうち特に最初の水晒しは、魚肉中の血液や有臭成分を流し出すことによつて、魚肉本来の「なま臭味」を消す意味で大切であり、この操作の如何によつてはでき上つた製品の風味の良し悪しにも影響してくるものである。

一方「いずし」におけるボトリヌスE型中毒発生機構からみて、この水晒しは大いに問題点があると云えよう。先に飯田等¹⁾はボトリヌスE型菌(以下ボE菌と略す)芽胞を接種した魚を水道水に浸漬して室温に放置した際、3日後に毒素の産生が認められることを報告し、また唐島田等²⁾は同様にボE菌芽胞を接種した魚を用いて実験的に「いずし」を漬けた場合、水晒し過程における毒素産生の有無を調べたところ、比較的低温(0~8°C)で行つた際は毒素は証明されなかつた(ただしトリプシンによる活性化処理は行っていない)が、室温(5~18°C)では1週間後に毒素が証明されたと報告している。これらの実験結果は、明らかにボE菌が水晒し過程においても発育し得る可能性を示すものである。

水晒しで問題となるのは、まず第1に水質である。従来の中毒例をみると、その大半は井戸水あるいは河川水をそのまま使用しているが、ボE菌が主として土じよう由来性である点、水による汚染の危険性を充分含んでいたと考えられる。Brygoo³⁾(1953)によると、ボE菌毒素は高濃度の塩素滅菌水(500ppm)で稀釈すると、短時間に破壊されると云う。故に水晒し用水としては、是非塩素滅菌水道水を使用することが望ましい。第2の問題点は、水晒し条件特に温度と時間である。「いずし」を上手に漬けるのに果してどの程度の水晒しを行つたらよいかは、個人の製法によつて、また原料魚種によつてもいろいろ違ふようであるが、

元来水晒しは「血出し」を目的とするものであるから、必要以上に晒すことはかえつて魚肉の味覚成分や栄養成分を損失してしまうので無意味である。そればかりでなく後述のようにボE菌の発育に好条件を与える可能性も充分あると考えられる。即ち、水晒しを比較的高温度で行つたり、あるいは低温度でも長期間行えば、当然雑菌の繁殖による酸化還元電位の低下や蛋白質の二次的分解による(細菌又は魚肉内自己消化酵素による)栄養源の供給が起り、必然的にボE菌の発育が起るであろう。

2 ボトリヌスE型菌の発育に要する最低限界温度

以上の見地から、ボトリヌスE型中毒発生防止上水晒しは、できるだけ低温で、しかも短期間に仕上げる必要があるべくからざる条件である。それではボE菌の発育は、果して最低どの位の温度で起るであろうか? これに関して従来二、三の報告がある。Dolman ら⁴⁾(1950)は鯀(にしん)の筋肉内にボE菌芽胞(VH株)を接種した場合、6°Cにおいてわずかではあるが毒素の産生がみられたと報告している。Ohye and Scott⁵⁾(1957)はボE菌10株について、cooked meat 培地における発育条件を調べた結果、5°Cにおいてすべて発育がみられ、そのうち4株は8週間後に毒素の産生が証明されたが、他の6株はそれが証明されなかつたと報告している。また同時に彼らは10株を2.5°Cで22週間培養したが、発育はみられなかつたと述べている。坂口ら⁶⁾(1960)はDolman らの実験と同様に、魚体内にボE菌芽胞(天王株)を接種して4°Cに保存した場合、3週間後にトリプシンによる活性化処理によつてのみ毒素の産生(Protoxinの生成)が証明されたと報告している。

最近 Schmidt ら⁷⁾(1960)は、放射線によるかん詰食品の保蔵問題に関連して、ボE菌芽胞のガンマー線による照射殺菌試験を行つた際、生存芽胞が低温でもかなり生育し得ることをみている。即ち、一般にE型菌はAおよびB型菌に比して放射線に対する抵抗性は弱く、後2者の約半分程度であるが、生存菌は6°Cでも充分発育し得ることを認めている。また彼らによると、ボE菌は元来低温でもか

なり発育する性質を有しており、3.3°Cでも発育し得ることを認めた。

以上の諸報告例をみても分るように、ボE菌の発育最低限界温度はかなり低いものである。従つて「いずし」におけるE型中毒発生病因子として、水晒しの温度および時間は極めて重大な意義を有するものと云わざるを得ない。そこでわれわれは今回、水晒しの条件がボE菌の発育と毒素産生に及ぼす影響を知るため、魚体に実験的にボE菌芽胞を接種した後種々の温度で水晒しを行い、血出し効果、肉質の変化及び毒素産生の有無等を調べた。その結果極めて有意なる成績が得られたので以下これについて報告する。

実験材料並びに方法

菌株：ボトリヌスE型菌 *Cl. botulinum Type E* 岩内株を使用した。

魚及び菌の接種：市販の新鮮なニハタハタ（身長平均約15cm）の内臓を取り去つた後良く水洗したものを使用

し、水晒し開始前に芽胞浮游液 0.5cc（芽胞数約 10^4 個/cc）を1匹づつ脊部に注射した。

水晒し：大型シャールに上記魚5匹づつを1組として入れ、これに約2lの水道水を加え、次に示すような温度範囲を保つように調節しながら水晒しを行つた。この際水の更新は昼間は3回（午前9時、午後1時、同5時）とし、夜は行わなかつた。なお比較の為、水道水を連続放水した試料についても実験した。

(試料番号)	(温度範囲)
I	0 ~ 4°C
II	5 ~ 10°C
III	10 ~ 15°C
IV	15 ~ 25°C
V	平均 5°C の水道水に放水浸漬

肉質の変化：浸漬後一定時間毎に魚1匹づつを取り出し、筋肉の一部を切り取りこれに4倍量の水を加えてホモゲナイズしたものについて pH（ガラス電極 pHメーター

第1表 水晒しによる魚肉の変化

試料番号	日数	pH	揮発性塩基窒素 mg%	アミノ態窒素 mg%	全窒素 mg%	ピラミドンテスト	一般細菌数 (肉g当り)	感能試験
I	0	7.2	10.5	95.0	165.0	+++	4.3×10^3	肉に腐敗臭なし
	1	7.3	6.3	34.1	60.0	++	4.8×10^3	
	2	7.3	2.1	63.0	130.0	+	5.2×10^4	
	3	7.1	2.3	58.0	98.0	-	4.0×10^6	
	4	7.1	1.2	54.9	54.5	-	5.2×10^6	
II	0					+++		肉に腐敗臭なし
	1	7.2	6.3	51.1	86.0	++	7.9×10^5	
	2	7.3	1.7	19.1	86.0	+	4.0×10^6	
	3	7.2	1.1	58.0	82.0	-	1.7×10^6	
	4	7.2	1.1	34.0	87.8	-	1.7×10^6	
III	0					+++		晒液と肉に腐敗臭あり 肉にやや腐敗臭あり 同上
	1	7.2	6.7	36.9	48.9	++	1.4×10^6	
	2	7.2	1.7	43.7	48.9	+	4.6×10^7	
	3	7.2	2.0	46.5	58.4	-	9.0×10^7	
	4	7.2	1.4	54.6	45.4	-	8.1×10^7	
IV	0					+++		晒液に腐敗臭あり 同上 肉に腐敗臭あり 同上
	1	6.9	14.4	21.3	40.8	++	1.2×10^7	
	2	7.2	3.5	49.3	62.4	±	1.3×10^9	
	3	7.2	1.8	50.8	48.9	-	5.0×10^7	
	4	6.9	1.9	46.9	56.0	-	1.6×10^9	
V	0					+++		肉に腐敗臭なし
	1	7.1	5.1	55.3	48.9	+	4.3×10^3	
	2	7.2	1.4	23.9	38.6	-	1.7×10^5	
	3	7.3	1.5	48.9	-	-	2.4×10^5	
	4	7.2	0.8	50.5	49.0	-	4.1×10^6	

使用),揮発性塩基窒素(コンウエイの微量拡散法による),アミノ態窒素(バンスライク法による),全窒素(ケルダール法による)並びに一般細菌数(肉エキス寒天培地に25°Cで48時間混稀積培養)等を測定した。また血出し効果を見る為、肉の一部についてピラミドンテストを行った。なおこれらの試験は、いずれもその日の第1回目の水の更新前の試料について実施した。

毒性試験：水晒し1週間後の試料について行った。即ち、脊部の肉一部を取りこれと等量の生理食塩水を加えてホモゲナイズした後遠沈し、その上清に等量の0.2%トリプシン液を加えて37°Cに1時間作用せしめて活性化処理を行い、次にその0.5ccをマウスの腹腔内に注射して毒性の有無を判定した。

実験結果

1 水晒し中の肉質の変化

前記実験条件による水晒しを行った場合、肉質の変化を調べた結果は第1表のとおりである。

これらの測定成績をみると、0~4°Cで行った試験(No. I)及び5°Cの水道水で放水浸漬を行った試料(No. V)ではあまり肉質の変化はみられないが、細菌数は1週間後にはほぼ1,000倍に増加した。しかし比較的高温で水晒しを行った試料(No. IV)ではやや腐敗の徴候がみられ、24時間後に既にpHの低下、揮発性塩基及び細菌数のいちじるしい増加がみられた。全窒素及びアミノ態窒素は、24時間後急激に減少する(エキス分が取り去られる為)が、それ以後の変化はあまりみられなかつた。血液反応については、放水浸漬を行った試料(No. V)のみ48時間でマイナスを示したが、他は全部72時間でマイナスを示した。

2 毒素産生

次に水晒し1週間後の各試料について毒素試験を行ったところ、第2表に示す結果が得られた。

第2表 水晒し魚肉における毒素産生

試料番号	I	II	III	IV	V
マウス生死	○ ○	○ ○	● ●	● ●	○ ○

(○：マウス生 ●：死)

即ち、10~25°Cで水晒しを行った試料では明らかに毒素の産性が認められたが、10°C以下の試料ではそれは認められなかつた。

考 察

以上われわれが今回行った実験結果によると、ボE菌の毒素産生は水晒し期間中にも起り得ることは明白である。水温が上昇して室温近くなれば、細菌の繁殖によつて肉質の腐敗が起り、これにともなつてボE菌の発育が行われるものであり、この事実は既に唐島田ら⁸⁾が好気性細菌とボ

菌との共生現象について実験した結果によつても明らかである。

先に神沢ら⁹⁾は水晒しに際して、酢酸を添加してpHを5以下に保つことによつて、ボE菌の発育を阻止し得ることを報告している。しかしながら、実際問題として肉の内部まで均一にしかも短時間にpHを下げることは、魚肉自体の緩衝作用の影響でむずかしく、従つて魚体表面に附着している芽胞の発育は阻止し得ても、一旦内部に浸入した芽胞の発育はなかなか阻止し得ないであろう。「いずし」は元来酸味食品であり、漬け込みを充分注意して行えば乳酸菌等の旺盛な繁殖によつて迅速なpHの低下が起り、熟成の終わったものでは通常pH4~5である。従つてこの範囲ではボE菌の発育並びに毒素産生は、あまり問題とはならないと考えられる。しかるに往々自家製「いずし」においてE型中毒が発生している事実は、恐らく水晒し方法に欠かんがあるものと想像される。即ち、前にも述べたとおり、水質の不良、水晒し中の温度の上昇、長期間の水晒し等がそれである。

われわれの実験で明らかのように、水晒しによる血出し効果は温度にはあまり関係なく、むしろ水の更新回数を多くした方が良く、放水浸漬した場合は1日3回更新の場合より1日短縮される。即ち、水道水で放水しながら水晒しを行えば、2日間で充分血出しの目的は達せられる。これはなま魚を用いた場合であるが、冷凍魚を用いた場合は更に時間が短縮されることも予想される。

「いずし」を自家用に漬ける季節は、1年中でも比較的寒い時季(10~1月)に限られている。それでも実際的には水温の調節はむずかしく、往々にして室温近くまで上昇することはあり得るであろう。また従来の中毒例をみると、水晒し期間は5~7日位が多く、この間不注意に温度を上げたことによつて不幸を招いたものと考えられる。従つて放水しない場合でも、水を併用することによつて水温を5°C以下に保ち、水の更新回数はなるべく多くして、2ないし3日間行えば、水晒し期間中ボE菌の毒素産生は極力防止し得るであろう。

結 論

「いずし」の製造過程中、水晒し期間中魚にボトリヌスE型菌が発育して毒素産生の起る可能性、並びにその防止方法について検討し、次の結論が得られた。

1 実験的にボトリヌスE型菌芽胞を接種した魚を水温10~25°Cで水晒しを行った、24時間後魚肉の腐敗が認められ、1週間後に毒素の産生が認められた。これに対して、5°C以下で行った際は毒素の産生は認められなかつた。

2 水晒しによる血出し効果は、水温には関係なく、水の更新回数を多くする方が良好である。

3 ボトリヌスE型中毒発生防止の見地から、水晒しは

5°C 以下の水道水に放水浸漬を2日間行うのが理想的である。

本実験に当り、有益なる御教示を贈つた疫学科長飯田広夫博士に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 飯田, 神沢, 中村 : 北海道立衛生研究所報 (特報 5), 10, 昭 31
- 2) 唐島田他 : 同誌, 17, 昭 31
- 3) Brygoo, E. R. : Ann. L'inst. Pasteur, 84, 1040, 1953
- 4) Dolman, C. E. et al. : Canad. J. Publ. Health, 41, 215, 1950
- 5) Ohye, D. F. and Scott, W. J. : Australian J. Biol. Sci., 10, 85, 1957
- 6) Sakaguchi, G. et al. : Jap. J. Med. Sci. & Biol., 13, 21, 1960
- 7) Schmidt, C. F. et al. : Schmidt よりの私信による
- 8) 唐島田, 井上 : 北海道立衛生研究所報, 第 9 集, 58, 昭 33
- 9) 神沢, 飯田 : 同誌, 第 8 集, 33, 昭 32