

2 「いずし」におけるボツリヌス E 型中毒発生防止に関する研究 (第7報)

ボツリヌス菌の発育中に発生する揮発酸臭について

北海道立衛生研究所 安藤 芳明 唐島田 隆

緒 言

今日、多くの家庭で作られているいわゆる「自家製いずし」は、その原料や製造過程からみて、ボツリヌス菌(とくにE型菌)によつて汚染される機会がかなりあるものと考へねばならない。そこで万一ボツリヌス菌が発育した場合、中毒の発生を未然に防止するため、食用に供する前になんらかの方法で、これを予知することができないものであろうか? しかし今日食品のボツリヌス中毒を簡単に、しかも適確に予知する方法は、残念ながら未だ見出されておらない。従つて今のところ、ある程度は感能検査に頼るほかないであろう。しかし、この方法のうちでも肉眼的検査は、E型菌のように蛋白分解性の弱い菌の場合困難である。そこで目下唯一のよりどころは、臭気の判定である。

一般に食品のにおいの成分は、微量でしかも複雑であるが、細菌汚染による腐敗臭として、アミン臭と揮発酸臭が最も典型的である。前者はアンモニアまたは揮発性アミン類によつて、後者は揮発性脂肪酸によつて感ぜられるものが大部分である。

ボツリヌス菌の発育中に産生されるアミン類については、Prévo \acute{t} et Thouvenot¹⁾の研究がある。それによると、臭気に関与すると思われる揮発性アミンとしては、イソアミルアミンがC型およびD型菌にかなり多量に見出されたが、メチルアミン・ブチルアミン等の生成量は各型菌とも微量ないし根跡程度であり、むしろ不揮発性有毒アミンのプトレスチン・トリプタミン・チラミン・ヒスタミン等が各型菌にそれぞれ特異的に見出された。

一方ボツリヌス菌の発育中には、他の嫌気性細菌と同様に代謝産物としてかなりの揮発酸が生成される。すなわちボツリヌスA型およびB型菌を含む他の多くの蛋白分解性*Clostridium*属菌は、Stickland反応と呼ばれる一対のアミノ酸の酸化還元反応によるエネルギー代謝を行ない、その結果相当する揮発性脂肪酸を生成することが知られている²⁾。

以上のようにボツリヌス菌の発育にともない、アミン臭または揮発酸臭の発生は必然的であるが、実際に感能検査において役立つのは後者である。その理由は上述のように揮発性アミンの生成量は僅少であるばかりでなく、嫌気性細菌による食品の発酵では酸性に傾く場合が多く、従つて遊離アミン量は少ない。このことはとくにいずしのような酸性の食品の場合にいちじるしい。著者らの経験でもE型中毒検体いずしのほとんどは、アミン臭は感ぜられなく、

揮発酸臭とくに酪酸臭が強く感ぜられた。

先に著者ら³⁾はE型菌の発育にともない発生する酪酸臭の本体を明らかにするため、ペーパークロマト法によつて検索し、正酪酸の存在を証明した。今回は近年においの成分研究に急速に発達したガスクロマト法を応用することにより、E型のみならず他の型菌についてもその産生する揮発酸成分を比較検討するとともに、実際の中毒例より入手した検体について揮発酸の検出を試み、それらの原因菌の産生する揮発酸との関連性についても検討した。

実験方法

1 使用菌株

当所保存の下記各型菌株を使用した。

Clostridium botulinum, Types A 190; B Lamanna; C β 468, C β Asahikawa, C β Yoichi; D 1873; E: Iwanai, E VH; F Denmark

なお比較のため、ボツリヌス菌以外の*Clostridium*属菌として次の菌を使用した。

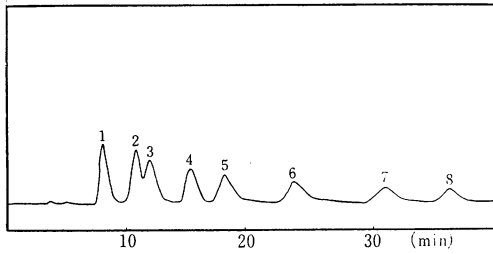
Clostridium sporogenes, *Clostridium welchii*

2 ガスクロマトグラフィー

試料の調製 揮発酸の調製には、菌培養液の場合、その100mlに対してn-H₂SO₄ 30mlを加え、また中毒検体の場合その30gを秤取してこれにn-H₂SO₄ 40mlを加えてよくすりつぶした後、いずれも水蒸気蒸留を行なつた。留液(約500ml)を稀NaOHで中和した後蒸発乾固する。残さに再び水を加え硫酸酸性(pH 1.0)とした後、液体抽出装置を用いて約48時間連続エーテル抽出を行なう。抽出液に焼芒硝を加えて脱水した後、エーテルの大部分を留去して少量となしそのまま分析用試料とした。

ガスクロマト分析 柳本製GCG-2形装置を用い、保持相として銅管カラム(内径5mm、長さ3m)にPolyethylene glycol adipateをDiasolid L(80~100メツシユ)に10%に附加させたものを充てんした。カラム温度130.5°C、キャリアーガス用ヘリウム流量26ml/分、感度4mV。成分同定には第1図に示すような標準物質の混合ガスクロマトグラムより、酢酸に対する相対保持時間を求めて比較することにより、また成分重量比は、上記結果より第1表に示すような各標準酸の μ g当りのピーク面積を求めておき、これより各試料について求めたピーク面積比を重量比に換算した。

第1図 標準脂肪酸のガスクロマトグラム



第1表 標準脂肪酸の相対保持時間および相対感度

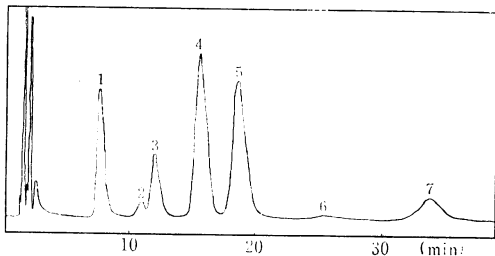
ピーク番号	脂肪酸名	相対保持時間	酸1μg当りピーク面積 (cm ²)	相対感度
1	酢酸	1.00	5.14	1.00
2	プロピオン酸	1.39	5.44	1.05
3	イソ酪酸	1.56	5.90	1.14
4	正酪酸	2.07	5.22	1.01
5	イソ吉草酸	2.48	5.19	1.00
6	正吉草酸	3.36	4.98	0.96
7	イソカブロン酸	4.50	4.77	0.92
8	正カブロン酸	5.33	4.33	0.84

結果および考察

1 各型菌の産生する揮発性脂肪酸

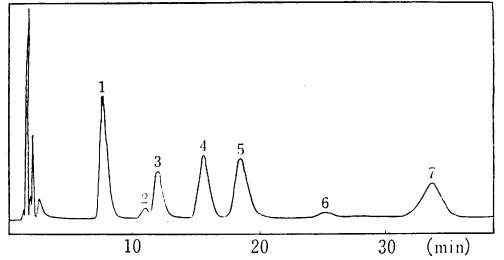
ボツリヌス菌は今日まで毒素の血清学的性状によりA・B・C (αおよびβ)・D・E・Fの6型に分類されている。そしてこれらの菌の生理的性状は、一般にA・B・Fは蛋白分解性を、C・D・Eは糖分解性を有するといわれている。従つてこれらの菌の代謝によつて産生される揮発酸組成も、それぞれ異なることが予想される。そこで各型菌をcooked meat broth (CM 培地)※に30°C、10日間培養した後揮発酸の検出を試みた。その結果各菌について得られたガスクロマトグラムは、第2～12図に示すとおりである。また成分割合を一括して示すと、第2表のとおりである。

第2図 *Cl. botulinum*, Type A 190 (CM 培地)

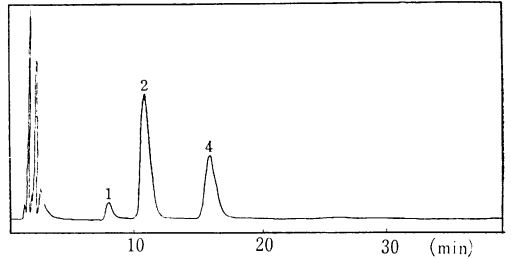


※ 本培地(栄研製)の培養前における揮発酸含有量は、微量であり、しかも酢酸のみであつた。

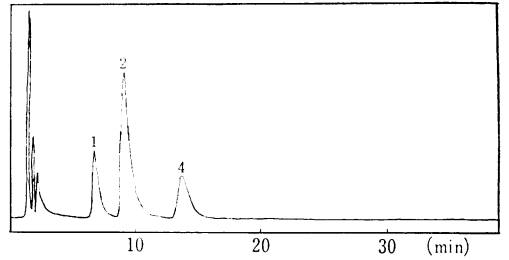
第3図 *Cl. botulinum*, Type B Lamanna (CM 培地)



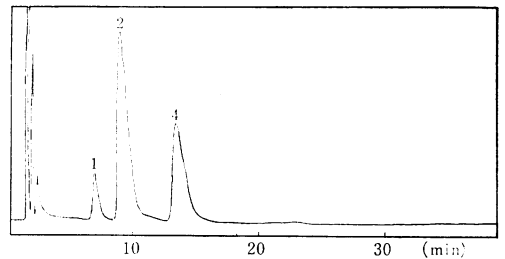
第4図 *Cl. botulinum*, Type Cβ 468 (CM 培地)



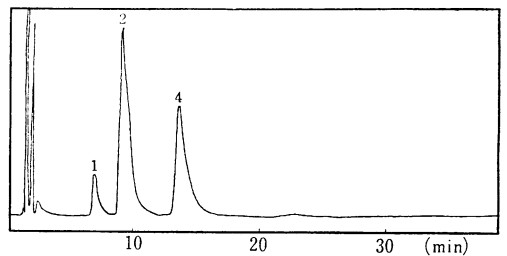
第5図 *Cl. botulinum*, Type Cβ Yoichi (CM 培地)



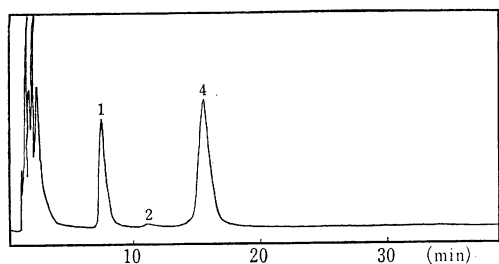
第6図 *Cl. botulinum*, Type Cβ Asahikawa (CM 培地)



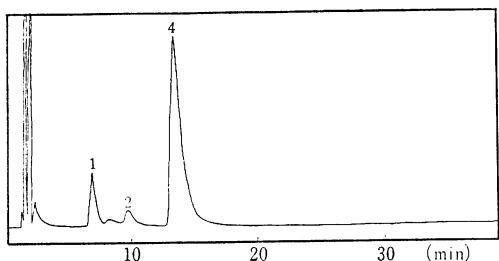
第7図 *Cl. botulinum*, Type D 1873 (CM 培地)



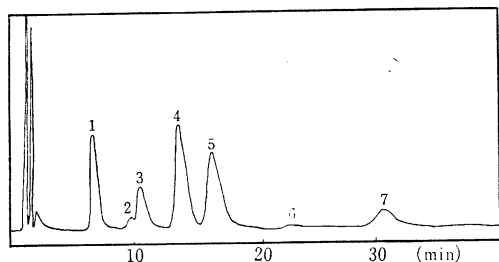
第8図 *Cl. botulinum*, Type E Iwanai (CM 培地)



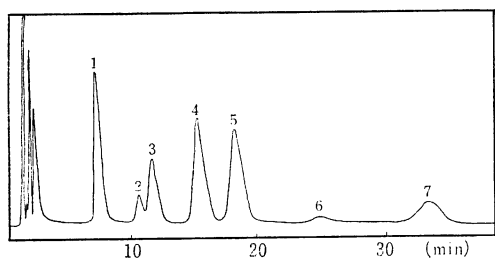
第9図 *Cl. botulinum*, Type E VH (CM 培地)



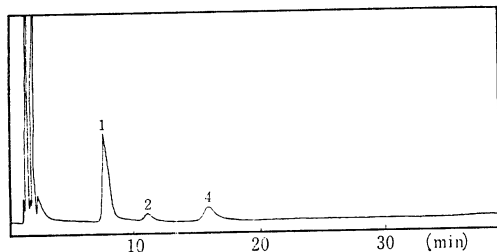
第10図 *Cl. botulinum*, Type F Denmark (CM 培地)



第11図 *Cl. sporogenes* (C1M 培地)



第12図 *Cl. welchii* (CM 培地)



第2表 各菌の産生する揮発性脂肪酸組成

菌名	揮発性脂肪酸重量比(%)						
	酢酸	プロピオン酸	イソ酪酸	正酪酸	※イソ吉草酸	正吉草酸	イソカプロ酸
<i>Cl. botulinum</i> A 190	15.2	2.2	8.5	31.2	33.7	0.0	8.3
〃 B Lamanna	21.8	1.7	10.0	19.2	22.4	2.6	22.0
〃 Cβ 468	5.3	57.1	—	37.5	—	—	—
〃 Cβ Yoichi	22.8	54.9	—	22.1	—	—	—
〃 Cβ Asahikawa	9.9	53.5	—	36.5	—	—	—
〃 D 1873	8.9	51.1	—	39.9	—	—	—
〃 E Iwanai	29.4	0.6	—	69.9	—	—	—
〃 E VH	12.9	5.9	—	81.1	—	—	—
〃 F Denmark	16.9	2.1	9.1	32.6	28.2	0.0	10.8
<i>Cl. sporogenes</i>	20.7	4.2	10.5	23.8	27.8	2.0	10.5
<i>Cl. welchii</i>	68.0	6.1	—	25.8	—	—	—

※ 活性 α-メチル酪酸を含む。

これらの結果によると、各型菌はその産生する揮発酸の種類および割合などから、次の3つのグループに分けることができる。すなわち酢酸・プロピオン酸・正酪酸のような直鎖状酸のほかイソ酪酸・イソ吉草酸（または活性αメチル酪酸）・イソカプロン酸のような側鎖状酸をも産生するA・B・F型菌グループ（*Cl. sporogenes*を含む）と、直鎖状酸のみで側鎖状酸を全く含まないが、とくにプロピオン酸の生成量の多いCβ・D型菌グループ、およびとくに正酪酸の生成量の多いE型菌グループ（*Cl. welchii*を含む）等である。しかもこれらのグループに属する菌は、生理的性状もそれぞれ類似している。

Clostridium 属のうちでも蛋白分解性を有する菌は、Stickland 反応によりアラニンから酢酸のような直鎖状酸を、またバリンやロイシンからそれぞれイソ酪酸やイソ吉草酸のような側鎖状酸を産生する。従つてA・B・F型菌グループは、Stickland 反応によるエネルギー代謝を行なっていることは明白である。しかし今回これらの菌に見出されたイソカプロン酸については、従来該反応による代謝産物として証明された報告はない。そこで果して該反応によつて生成されるものかどうか、もしそうであるとすればどのアミノ酸から生成されるものかを知るため、まずA型またはB型菌にとつて必須アミノ酸（アルギニン・フェニルアラニン・チロシン・バリン・ロイシン・イソロイシン・スレオニン・メチオニン・トリプトファン等）より成る合成培地にB型菌を接種し、30°Cに10日間培養した後揮発酸の検出を試みた。その結果は第13図に示すとおりであり、酢酸・プロピオン酸・イソ酪酸・イソ吉草酸等の存在が認められたが、イソカプロン酸は全く見出されなかつた。このことからイソカプロン酸は、Stickland 反応による代謝産物ではなく、おそらくCM培地中に存在する

とが分る。しかもこれらの中毒検体中の揮発酸組成は、前述の培養実験において示されたような原因菌の産生する揮発酸パターンをよく反映している。このことから疑わしい中毒検体の揮発酸組成を知ることにより、その原因菌の型をある程度推定し得るものと考えられる。

要 約

ボツリヌス菌の発育中に発生する揮発酸臭の化学的本体を明らかにするため、各型菌について、cooked meat brothに産生する揮発性脂肪酸をガスクロマトグラフィーにより検索して次の結果を得た。

1 A・B・F型菌では、いずれも・酢酸・プロピオン酸・正酪酸・イソ酪酸・正吉草酸・イソ吉草酸・イソカプロン酸等が認められた。

2 C β およびD型菌では、酢酸・プロピオン酸・正酪酸等が認められ、このうちとくにプロピオン酸の生成量が多かつた。

3 E型菌では、酢酸と正酪酸が認められ、とくに後者の生成量がいちじるしかつた。

さらに実際の中毒検体(C β およびE型)について揮発酸の検出を試みたところ、それらの成分組成は原因菌の産生する揮発酸パターンをよく反映していた。

終わりに臨み、本稿の校閲を賜わつた疫学部長飯田広夫博士に厚く御礼をのべます。

文 献

- 1) A. R. Prévot *et* H. Thouvenot : *Ann. Inst. Pasteur*, 103, 925, (1962).
- 2) B. Nisman : *Bact. Rev.*, 18, 16, (1954).
- 3) 安藤芳明・井上勝弘 : 本所報, 11, 22, (1960).
- 4) C. E. Dolman and L. Murakami : *J. Infect. Dis.*, 109, 107, (1961).
- 5) J. Mager and S. H. Kindler : *J. Gen. Microbiol.*, 10, 130, (1954).
- 6) F. W. Leaver *et. al.* : *J. Bact.*, 70, 521, (1955).
- 7) 唐島田隆他 : 本所報, 15, 17, (1965).

2 Studies on the Protection against Outbreaks of Type E Botulism due to "Izushi" (Part 7) On the Volatile Acidic Odor Produced by *Clostridium botulinum* during Growth

Yoshiaki Ando and Takashi Karashimada
(Hokkaido Institute of Public Health)

In order to establish the chemical nature of volatile acidic odors produced by *Clostridium botulinum* during growth, volatile fatty acids were determined by gas

chromatography in the cultures of cooked meat broth inoculated with each of the six toxin-types. The results were as follows :

1 Acetic, propionic, *n*-butyric, *iso*-butyric, *n*-valeric, *iso*-valeric (*iso*-valeric/or active α -metyl-butyrlic), and *iso*-caproic acids were identified in the cultures of types A, B and F. The branched acids except *iso*-caproic acid were deduced to be the metabolic products derived from some branched amino-acids by "Stickland reaction".

2 Acetic, propionic, and *n*-butyric acids were identified in both the cultures of types C β and D. A high proportion of propionic acid among the resulting acids suggests these organisms appear to obtain some of their energy by propionic acid fermentation similar to that displayed by propionibacteria.

3 *n*-Butyric acid, in higher proportion, as well as acetic acid were identified in the cultures of type E, suggesting that this organism obtains most of its energy by butyric acid fermentation similar to that displayed by butyric acid bacteria.

Further the chemical nature of the off-odor of foodstuffs contaminated with botulinum toxin was examined. An abnormally high proportion of *n*-butyric acid, being responsible for the "butyric" off-odor, was found in home-made "Izushi" of raw fish and rice cake, which had caused an episode of human type E botulism. Also a high proportion of propionic acid, as well as acetic and *n*-butyric acids were found in raw whale meat, which caused an outbreak of C β botulism in mink.

Accordingly, the patterns of the volatile fatty acids presented each type of *Clostridium botulinum* seem to be reflected in that of foodstuffs contaminated with respective type of the organisms.