

調 査 研 究 の 部

飯ずしにおけるボツリヌスE型菌の毒素産生抑制実験について

小林 運 蔵*

I はじめに

魚飯ずしによるボツリヌス食中毒の防止対策の1つとして、安全な飯ずしの調理方法を検討することが必要である。この点に関してはすでに中村等(1958)¹⁾や中村(1966)²⁾によって醋酸や乳酸菌等を添加する方法が報告されているが、我々も、これらの報告をふまえて、in vitroでの毒素産生抑制条件特に乳酸菌による抑制条件を中心に検討したのでその結果を報告する。

II 実験方法並びに実験成績

A 食塩濃度別毒素産生抑制実験

2~7%の食塩を段階的に加えた肝片加 Bacto—Pepton にボツリヌスE型芽胞を加えて30°C, 7日間培養して、ボツリヌス菌の増殖性並びに毒素産生性を検討した成績を第1表に示す。即ち、2%及び3%の食塩濃度ではポ

表1 食塩濃度別毒素産生阻止実験成績

肝々ブイオン 実験項目	食塩濃度別(%)					K 普通 肝々
	2	3	4	5	7	
E型菌増菌数	G-5※	G-3	—	—	—	G-8
マウス毒素試験	※※	●	○	○	○	●

※ ガフキー番号

※※ マウスへい死

ツリヌス菌の増菌ならびに毒素産生が認められたが、4%以上では認められなかった。

県内における飯ずしの実態調査(小林, 金, 1968)³⁾では魚の重量に対する塩の使用量は約4~10%であったが、これに米飯, 糍, 野菜その他の調味料等を添加するので、食塩の終末濃度は2~5%程度と推定され、従って飯ずしの約半数は毒素産生の条件をそなえているものと推定される。

B 醋酸濃度別毒素産生抑制実験

酢酸のボツリヌス菌発育並びに毒素産生に及ぼす影響を検討した結果を第2表に示す。即ち、PHを4.0~6.6迄段階的に整調した肝々ブイオンにボツリヌスE型芽胞を加え30°C, 7日間培養した。その結果、PH4.6以下

表2 醋酸濃度別毒素産生阻止実験成績

肝々ブイオン 実験項目	醋酸PH別						K 普通 肝々 7.2
	4.0	4.2	4.6	4.8	5.0	6.6	
E型菌増菌数	—	—	—	G-6	G-7	G-9	G-10
マウス毒素試験	○	○	○	●	●	●	●
飯ずし実態調査	52 %			48 %			

では増菌並びに毒素産生が認められなかったが、4.8以上ではG-6以上の増菌を認め且つ毒素も産生された。

飯ずし漬けの実態調査(小林, 金, 1968)³⁾でみると、上記の結果から安全と思われるPH4.6以下のものは52%で約半数は毒素産生が可能な条件下にある。従って、食塩や醋酸をより多くつかうことが望ましいわけであるが、飯ずしとしての味覚を損なわない程度とするには問題があろう。

C 乳酸菌によるボツリヌス菌の増殖抑制並びに毒素産生抑制

1 培養基別乳酸菌の増殖性比較

上述の如く、味を損なわない方法の1つとして乳酸菌の利用が考えられているが、我々が実験に供した乳酸菌は市販乳酸菌飲料由来の6株(第3表)である。

先ず培養基条件として乳酸菌並びにボツリヌス菌が共に発育良好である培地を選択する必要があるため、第3表に示した4種類の培地における増殖性を検討した。

実験の結果は肝々ブイオンが最も良好であったので、以下の実験にはすべて肝々ブイオンを使用した。又、供試菌株6種類の内、L.lactis, L.bulgaricus, S.lactisの3株が嫌気性培養でもやや発育可能であったので以下の実験にはこの3株をもっておこなった。

* 秋田県衛生科学研究所 細菌病理科

表3 培養基別乳酸菌増殖性の比較実験成績

培養基別 菌株名	肝々 ブイヨン	ハタハタ ブイヨン	クツクド ミート	10 % 脱脂乳	嫌気性 培養
L. bulgaricus	1.7×10 ¹¹	3 ×10 ¹⁰	+	1 ×10 ¹⁰	+
L. lactis	1.2×10 ¹¹	9 ×10 ¹⁰	+	7 ×10 ¹	+
L. acidphilut	2.5×10 ¹¹	3.7×10 ¹¹	+	1.1×10 ¹⁰	-
S. thermophilus	5 ×10 ⁵	1.2×10 ⁵	+	3 ×10 ⁴	-
S. lactis	1.3×10 ¹⁰	1.1×10 ⁹	+	3.5×10 ⁹	+
S. cremoris	1 ×10 ⁵	1.4×10 ⁵	+	6 ×10 ⁷	-

2 乳酸菌の温度別発育条件

実際の飯ずしの漬込み季節の温度を考慮して前記3株の発育温度域を検討した。

その結果、第4表に示す如く、10℃ではS. lactis、

のみ120時間培養で漸くG-2程度の増菌が認められたが、他の2株は15℃、96~120時間培養で僅かに増殖する程度であった。

表4 乳酸菌の温度別発育条件

温度別 菌株名	10 °C	15 °C	18 °C	22 °C	35 °C	45 °C
L. bulgaricus	-	+ (96 h-G 2) ※	+ (72 h-G 4)	+ (72 h-G 4)	+ (24 h-G 7)	+ (48 h-G 5)
L. lactis	-	+ (120 h-G 2)	+ (72 h-G 5)	+ (72 h-G 6)	+ (24 h-G 8)	+ (48 h-G 4)
S. lactis	+ (120 h-G 2)	+ (96 h-G 4)	+ (48 h-G 6)	+ (48 h-G 7)	+ (24 h-G 8)	+ (48 h-G 2)

※ (培養時間-ガフキー番号)

3 温度別乳酸菌のボツリヌス菌毒素産生抑制実験

表5 温度別乳酸菌のボツリヌス菌毒素産生阻止実験成績 (培養10日間)

温度別毒素 試験 菌株名	10°C	13°C	15°C	18°C	22°C	30°C
L. bulgaricus	●	●	●	○	○	○
L. lactis	●	●	●	○	○	○
S. lactis	●	○	○	○	○	○
対照 (CI, botulinum)	●	●	●	●	●	●

培養温度別による乳酸菌のボツリヌス菌毒素産生抑制効果をみるために、ボツリヌス芽胞(9×10⁴)に乳酸菌(1.3~170×10⁸)を混合培養した結果、第5表に示す如く、S. lactisは13℃以上で毒素産生を阻止し、又他の2菌株も18℃以上で阻止し得た。

4 醋酸濃度別乳酸菌の増殖性比較

乳酸菌の発育に及ぼす醋酸濃度の影響をみるため第6表に示す実験を行なった。実験の結果、乳酸菌はPH4.0~6.6のすべてのPH域において増殖が認められ、且つ、ボツリヌス芽胞との混合培養においても毒素産生が阻止された。

表6 醋酸濃度別乳酸菌の増菌比較

肝々ブイヨン 醋酸濃度	起 始 PH 4.0	4.2	4.6	4.8	5.0	6.6
1 L. bulgaricus	G-3 終末4.0	G-3 4.0	G-4 4.2	G-5 4.1	G-5 4.2	G-7 4.2
2 L. lactis	G-3 4.0	G-4 4.0	G-7 4.2	G-8 4.2	G-7 4.2	G-7 4.2
5 S. lactis	G-3 4.0	G-4 4.2	G-4 4.2	G-6 4.2	G-8 4.2	G-8 4.4

5 食塩濃度別乳酸菌の増殖性比較

食塩濃度の乳酸菌発育に及ぼす影響を検討した結果、第7表に示す如く、L. bulgaricus 及び L. lactis の2株

が7%濃度でやや発育が低下したのみで、その他はすべて発育良好であり、且つ、毒素産生阻止能も観察された。

表7 食塩濃度別乳酸菌の増殖比較

菌株No.	菌株名	肝々パイヨン 食塩濃度				
		2 %	3 %	4 %	5 %	7 %
1	L. bulgaricus	G — 8	G — 7	G — 5	G — 5	G — 2
2	L. lactis	G — 8	G — 7	G — 6	G — 5	G — 2
5	S. lactis	G — 9	G — 9	G — 9	G — 7	G — 5

D ボツリヌス芽胞の耐塩及び耐酸性に関する実験

最後に、ボツリヌスE型芽胞の耐塩性及び耐酸性について実験した。即ち、10%、15%、20%の3種の食塩濃度培地を作り、これにボツリヌス芽胞を加え30日間室温に放置してこの間におけるボツリヌス芽胞の毒素産生能について検討した。第8表に示す如く、10%及び15%食塩濃度で30日間、又20%濃度でも15日間を経てもボツリヌス芽胞は死滅することなく、新製の肝々培地に移すと毒素を産生した。又、醋酸に対しては3%、4%及び5%濃度で30日間においても死滅せず、新製の肝々培地に移すと毒素を産生した。

表8 ボツリヌス芽胞耐塩耐酸試験

食塩 醋酸	濃度 %	耐芽胞 日数	マウス実験			
			10日	15日	20日	30日
食塩濃度	10	%	●	●	●	●
	15	%	●	●	●	●
	20	%	●	●	○	○
醋酸濃度	3	%	●	●	●	●
	4	%	●	●	●	●
	5	%	●	●	●	●

III 考察及びまとめ

安全な飯ずし作りを目的として、in vitroでのボツリヌス菌の増殖並びに毒素産生の抑制条件を種々検討したが、上述の実験結果の示す如く、実際の飯ずしを考慮すると、食塩や醋酸の添加の加減だけでは十分な毒素産生抑制効果があげられないことが再確認された。

それ故に、乳酸菌添加というもう一つの阻止因子を考えin vitroでの実験を行なったのであるが、結果は予想されたように、乳酸菌によるボツリヌス菌の増殖抑制並びに毒素産生抑制効果は顕著に認められた。即ち、毒素産生を抑制阻止する最も有効な条件として、飯ずしのPHを常に4.6以下に維持することが必要であると考えられているが、乳酸菌の利用はこの目的に合致するものであることがわかったのである。

しかし乍ら、乳酸菌は低温における発育が悪く、従って飯ずしを漬込みする室温を15°C以上に保つ必要があるため、低温で発育可能な菌種の選択も含めてこの点について更に検討する必要がある。又、上述のin vitroの実験で得られた食塩、醋酸及び乳酸菌の三者の至適阻止条件についても、実際の飯ずしづくりに直接適用され得るものかどうかといった点についてなお検討を要するであろう。

いずれにしても、本実験を足掛りとして今後安全な飯ずし作りの条件をin vitroと並行して実際の飯ずし作りの面においても検討していく考えである。

文 献

1. 神沢謙三, 飯田広夫, 飯ずし中におけるボツリヌスE型菌の毒素産生阻止・北海道衛研所報, 8, 33—38 (1958)
2. 中村儀之丞, 青森県におけるボツリヌス中毒の研究について, 青森衛研所報, 7, 1—66 (1966)
3. 小林運蔵, 金鉄三郎, ハタハタ飯ずしの実態とボツリヌス菌の調査, 秋田衛研所報, 13, 46—50 (1968)
4. 安藤芳明, 唐島田隆, 毒素産生におよぼす乳酸菌の拮抗作用, 北海道衛研所報, 13 (1962)