

魚肉練り製品における嫌気性菌の 分布に関する研究

Distribution of Clostridium in Fish-paste Foods

小 林 と よ 子
浅 見 望

緒 言

近年、加工食品および食材料の多様化に伴ない、包装食品が多量に出回る様になってきた。包装は2次汚染を防ぐと共に、製品を嫌氣的に維持し、内部に混在する好気性菌の發育を阻害して貯蔵性を高める作用をする¹⁾。

ところで、魚肉練り製品は水産加工食品中、特にその生産量の多い日本独得の加工食品である。練り製品における加熱処理は、生産地あるいは製品により加熱方法、温度、時間が異なり、加熱後の製品に残存する微生物の数と種類も一様ではない²⁾。これらの食品における嫌気性菌の分布に関する研究は食中毒菌に限られ、しかもその報告は極めて少ないのが現状である^{3, 4)}。

著者らは、食品中の嫌気性菌の分布を検討する一連の目的で、包装食品ソーセージ類および冷凍食品中の嫌気性菌の分布を検討し、食中毒の原因菌となりうる *C. perfringens* をはじめ、*Clostridium* 属が高頻度に分離されることを報告した^{5, 6)}。

今回は、魚肉練り製品における嫌気性菌の分布を検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 検査材料

魚肉練り製品 51 検体 (ちくわ 25, かまぼこ 16, はんぺん 10) で、いずれも市販品を供試した。これらの製品はいずれも AF-2 の使用禁止以後に製造されたものを実験に供した。食品は、前報に述べた如く、*Anaerobic glove box* 内⁷⁾で無菌操作のもとで乳鉢にて 1g/ml の乳剤として用いた。

2. 増菌培養による嫌気性菌の分離

1) 使用培地

i) 嫌気性菌用増菌培地：^{5, 6)} 前報に述べた GAM 半流動高層培地, PRAS-(Pre reduced Anaerobically sterilized) 肝々ブイオンを用いた。これらの培地はいずれも中試験管に 10 ml 宛分注した。被検食品の乳剤を培地に投入し, 増菌培養した。

ii) 分離用平板培地：増菌培養液から嫌気性菌を分離するための培地としては GAM 寒天培地およびカナマイシン (KM) 100 $\mu\text{g/ml}$ 添加した 5% 卵黄加 CW 寒天培地, 並びに KM 不含の 5% 卵黄加 CW 寒天培地を用いた。増菌培養液から嫌気性菌を分離するためには (i) 培養液の非加熱処理では KM 含有卵黄加 CW 寒天培地に塗抹, (ii) 加熱処理 (70°C 15 分間) では KM 不含卵黄加 CW 寒天培地に塗抹した。

3. 食品中の嫌気性菌の定量培養

前報に準じて, 培養操作はすべて Anaerobic glove box 内で行ない, 検査材料, 培地に対する空気 (酸素) の影響をさけた。検体は表面部を取り除き, その内部の 1 g を秤量, 乳鉢で細砕,⁸⁾ 希釈液を用いて 10 倍乳剤とした。さらに 10 段階希釈法によって 10^{-4} 倍まで希釈した。夫々の希釈液 0.1 ml 宛を上記の分離用平板培地に塗抹, 接種した。

定量培養に用いた乳剤は, さらに PRAS- 肝々ブイオンに投入して増菌培養後, 嫌気性菌の分離を行なった。

4. 嫌気性培養法

嫌気性培養は 37°C に調節された Anaerobic glove box 内, または Steel Wool 法⁹⁾ (N_2 90%, CO_2 10%) にて 37°C, 3~4 日間培養した。

5. 分離菌の同定

嫌気性菌の同定は各種生化学的性状とガスクロによる代謝産物としての各種脂肪酸の分析等から VPI manual¹⁰⁾ に従って同定した。

C. perfringens を疑う菌株は *C. perfringens* の α -抗毒素血清 500 u/ml (千葉県血清研究所) の半面抗毒素法による Lecithinase 中和試験によって同定した。なお, *C. perfringens* と同定された菌株は 17 型の Hobbs 型診断用抗血清 (東芝化学工業 K. K.) による血清型別を試みた。

実 験 成 績

1. 魚肉練り製品中の嫌気性菌の菌数

魚肉練り製品を Anaerobic glove box 内で, 定量培養法によって嫌気性菌の菌数を検討したところ, 30 検体中, ちくわ 3 例のみに嫌気性菌が $10^2/\text{g}$ 以上に検出された。表 1 に示す如く, 嫌気性菌はすべて *C. bifermentans* で, その菌数は夫々 $3.5 \times 10^2/\text{g}$, $10 \times 10^2/\text{g}$,

表 1. 魚肉練り製品中の嫌気性菌数

食 品	菌 数 /g	菌 種
ち く わ	3.5×10^2	C. bifermentans
ち く わ	10×10^2	C. bifermentans
ち く わ	4.5×10^2	C. bifermentans

わくわ：22例（19例は 10^2 /g 以下） かまぼこ：8例（すべて 10^2 /g 以下）

注：好気性菌の菌数は $0.5 \times 10^2 \sim 10^5$ 以上/g

4.5×10^2 /g であった。その他の 27例は菌数が 10^2 /g 以下であったためか、嫌気性菌は検出できなかった。

好気性菌はちくわ、かまぼこ共に検体の大部分から検出され、その菌数は $10^2 \sim 10^5$ /g であった。

なお、この実験では嫌気性菌を対象としているため、好気性菌は菌数のみにとどめ、分離菌の菌種同定は行なわなかった。

2. 増菌培養による魚肉練り製品からの細菌検出率

魚肉練り製品 51 検体の増菌培養法による細菌検出率は 92.2%（51 検体中 47 例陽性）であった。

ちくわ、かまぼこおよびはんぺんにおける菌検出率は表 2 に示す如くである。

表 2. 魚肉練り製品からの細菌検出率

検 体 名	検 体 数	好 気 性 菌		嫌 気 性 菌	
		陽 性 例	検 出 率	陽 性 例	検 出 率
ち く わ	25	25	100%	15	60%
か ま ぼ こ	16	13	81.3	7	43.8
は ん ペ ン	10	9	90.0	7	70.0
計	51	47	平均 92.2	29	平均 56.9

ちくわでは 25 検体中、好気性菌の検出率は 100%、嫌気性菌の検出率は 60.0% であった。かまぼこでは 16 検体中、好気性菌の検出率は 81.3%、嫌気性菌の検出率は 43.8% であった。はんぺんでは、10 検体中、好気性菌の検出率は 90.0%、嫌気性菌の検出率は 70.0% であった。

すなわち、3 種類の魚肉練り製品からの好気性菌の検出率は、ちくわが最も高く、次いではんぺん、かまぼこであった。同様に嫌気性菌の検出率も、ちくわおよびはんぺんが高く、次いでかまぼこの順であった。

3. 魚肉練り製品からの嫌気性菌の分離状況

各種の魚肉練り製品における嫌気性菌の分布を増菌培養法で検討したところ、多くの検体において、同一検体に2～3種の *Clostridium* の菌種が分布している事が明らかとなった。

ちくわ : *Clostridium* が検出されたちくわ 15 検体における菌分離状況を表3に示した。

表 3. ちくわからの嫌気性菌の分離 (増菌培養)

菌種	食品No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	計
<i>C. bifermentans</i>		●	●	●	●				●	●	●	●	●	●	●		11株
<i>C. sporogenes</i>		●	●	●	●	●	●	●						●	●		9
<i>C. subterminale</i>			●				●										2
<i>C. perfringens</i>																●	1
<i>C. putrefaciens</i>								●									1
<i>C. limosum</i>									●								1
好気性菌		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	

注 ● : 菌検出

No.2 の検体では *C. bifermentans*, *C. sporogenes*, *C. subterminale* および 好気性菌が同時に分離され、最少限 *Clostridium* の3菌種が混在していた。

すなわち、3種類の *Clostridium* が同時に分離された検体は1例、2種類の *Clostridium* が同時に分離された検体は8例、1種類の *Clostridium* が分離された検体は6例であった。なお、好気性菌は *Clostridium* が分離されたすべての検体から検出された。

ちくわから分離された *Clostridium* の各菌種の内訳は *C. bifermentans* の11株が最も多く次いで *C. sporogenes* 9株、*C. subterminale* 2株、*C. perfringens*, *C. putrefaciens*, *C. limosum* の夫々1株の6菌種、25株であった。

かまぼこ : *Clostridium* が検出されたかまぼこ 7 検体における菌分離状況を表4に示した。

表 4. かまぼこからの嫌気性菌の分離 (増菌培養)

菌種	食品 No.	1	2	3	4	5	6	7	計
<i>C. bifermentans</i>		●	●	●	●	●			5株
<i>C. sporogenes</i>							●		1
<i>C. putrefaciens</i>				●					1
<i>C. butyrioum</i>								●	1
好気性菌			●		●	●	●	●	

注 ● : 菌検出

2種類の *Clostridium* が同時に分離された検体は1例のみで、6例は1種類の *Clostridium* のみが分離された。なお、好気性菌は5検体から *Clostridium* と同時に分離され、2例からは好気性菌は増菌培養法でも分離されなかった。すなわち、No. 1 と No. 3 の2検体では *Clostridium* のみが分離され、好気性菌は分離されなかった。

かまぼこから分離された *Clostridium* の菌種の内訳は *C. bifermentans* の5株が最も多く、次いで *C. sporogenes*, *C. putrefaciens* および *C. butyricum* が夫々1株の4菌種、8株であった。

はんぺん：*Clostridium* が検出されたはんぺん7検体における菌分離状況を表5に示した。

表 5. はんぺんからの嫌気性菌の分離 (増菌培養)

菌種	食品 No.	1	2	3	4	5	6	7	計
<i>C. perfringens</i>		●	●	●					3株
<i>C. sporogenes</i>		●				●			2
<i>C. tyrobutyricum</i>		●			●				2
<i>C. putreficum</i>				●				●	2
<i>C. bifermentans</i>			●						1
<i>C. subterminale</i>		●							1
<i>C. felsineum</i>			●						1
<i>C. oceanicum</i>							●		1
好気性菌		●		●	●	●	●	●	

注 ●：菌検出

No. 1 の検体では *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*, *C. subterminale* および好気性菌が同時に分離された。また、No. 2 の検体では *C. perfringens*, *C. bifermentans* および *C. felsineum* が、No. 3 の検体では *C. perfringens*, *C. putreficum* および好気性菌が同時に分離された。

すなわち、4種類、3種類および2種類の *Clostridium* が同一検体から同時に分離された検体は夫々1例、1種類のみ *Clostridium* が分離された検体は4例であった。

はんぺんから分離された *Clostridium* の菌種の内訳は *C. perfringens* の3株が最も多く、次いで *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum* および *C. putreficum* が夫々2株、*C. bifermentans*, *C. subterminale*, *C. felsineum* および *C. oceanicum* が夫々1株の8菌種、13株であった。

4. *C. perfringens* の菌型と材料

魚肉練り製品から分離した

C. perfringens の Hobbs 血清型別と食品との関係を表6に示した。

魚肉練り製品から *C. perfringens* の分離率は、7.8% (51例中4例) であった。分離された *C. perfringens* の

表 6. *C. perfringens* の菌型と材料

材	料	Hobbs 血清型別
はんぺん	いか入り	型別不能
	のり巻	型別不能
	肉だんご	型別不能
ちくわ		13 型

魚肉練り製品からの *C. perfringens* 分離率
4例/51例=7.8%

Hobbs 血清型ははんぺんからの3株はいずれも型別不能株で、ちくわから分離された1株は13型であった。

5. 魚肉練り製品から分離した Clostridium の菌種

ちくわ、かまぼこおよびはんぺんから分離した47株の Clostridium の菌種を表7に示した。

表 7. 魚肉練り製品から分離した嫌気性菌

菌種	食品	ちくわ	かまぼこ	はんぺん	計
C. bifermentans		11	5	1	17
C. sporogenes		9	1	2	12
C. perfringens		1		3	4
C. subterminale		2		1	3
C. putrificum				2	2
C. putrefaciens		1	1		2
C. tyrobutyricum				2	2
C. butyricum			1		1
C. limosum		1			1
C. felsineum				1	1
C. oceanicum				1	1
計		25	8	13	46株

C. bifermentans 17株 (37.0%) および C. sporogenes 12株 (26.1%) が最も多く、この2菌種で全分離菌株中の63%を占めていた。次いで、C. perfringens 4株 (8.7%), C. subterminale 3株 (6.5%), C. putrificum, C. putrefaciens および C. tyrobutyricum が夫々2株 (各4.3%), C. butyricum, C. limosum, C. felsineum および C. oceanicum が夫々1株 (各2.1%) であった。

C. bifermentans はちくわ、かまぼこから多く分離され、C. sporogenes はちくわから多く分離された。

考 察

著者らは、^{5, 6)} 前報で包装食品ソーセージ類および冷凍食品における嫌気性菌の菌種レベルでの分布を検討し、Clostridium による汚染の著しいことを報告した。

本報では、魚肉練り製品のうち、ちくわ、かまぼこ、はんぺんについて、主として嫌気性菌を対象として汚染状態を検討した結果、これらの食品は、ソーセージ類および冷凍食品と同様に Clostridium による汚染が比較的高いことが明らかとなった。とくにちくわおよびはんぺんでは Clostridium の汚染が著しく 60~70% にみとめられたが、かまぼこでは約44%であった。その理由は、製造過程における加熱処理の差によるものと考えられる。ちくわ、かまぼこおよびはんぺんから分離された嫌気性菌は、すべて有芽胞嫌気性菌である Clostridium で、

無芽胞嫌気性菌は全く検出されなかった。これらの食品における *Clostridium* の菌数は少なく、殆んどが $10^2/g$ 以下であった。30 検体について行なった菌数測定では 3 例のちくわから *C. bifermentans* が $10^2 \sim 10^3/g$ 検出されたのみである。また、同時に検討した好気性菌の菌数は全例に $10^2 \sim 10^5/g$ 以上であった。しかし、魚肉練り製品の内部は著しく嫌氣的¹¹⁾であり、かつ、本実験において検出された *Clostridium* は土壌および動物の糞便中に常在する菌群¹²⁾で、蛋白分解能の強い菌株が多い。また、食中毒の原因菌となりうる *C. perfringens* も検出されており、菌数が少ないからとして無視することは出来ないであろう。

さらに、これらの食品に土壌由来菌の *Clostridium* が多く存在していたことは、食中毒の起因菌で、土壌常在菌であるボツリヌス菌 (*C. botulinum*) の汚染も無視することはできない。とくに、現在では AF-2 など食品防腐剤の添加が禁止されているため、とくに留意する必要があるといえる。

ま と め

市販魚肉練り製品の細菌による汚染状態を調べる目的をもって、ちくわ 25 検体、かまぼこ 16 検体、はんぺん 10 検体、合計 51 検体の魚肉練り製品について細菌検査を行なった結果、次のことを要約する。

1. 好気性菌陽性例は 51 検体中 47 例 (92.2%) で、嫌気性菌陽性例は 51 検体中 29 例 (56.9%) であった。
2. 分離された嫌気性菌 46 株はすべて有芽胞嫌気性桿菌である *Clostridium* で、無芽胞嫌気性菌は検出されなかった。
3. 分離された *Clostridium* の菌種は *C. bifermentans*, *C. sporogenes* が最も多く、次いで *C. perfringens*, *C. subterminale*, *C. putrificum*, *C. putrefaciens*, *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. limosum*, *C. felsineum*, *C. oceanicum* であった。
4. かまぼこには *C. bifermentans* が多く分布し、ちくわでは *C. bifermentans* と *C. sporogenes* が多く分布していた。しかし、はんぺんでは特定の菌種に限定されないで、多くの菌種が分布していた。
5. 多くの検体において、同一検体に 2~3 種の *Clostridium* が分布していた。

終りに、種々な便宜をはかり、御指導賜わった岐阜大学医学部微生物学教室の鈴木祥一郎教授、上野一恵助教授に深く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Roth, L. A. and D. S. Iark (1972): *Canad. J. Microbiol.*, 18, 1761.
- 2) 相磯和嘉監修 (1976): 食品微生物学, 医歯薬出版, 東京。
- 3) Hauschild, A. H. W. et al. (1975): *Can. Inst. Food sci. Technol. J.*, 8, 84-88.
- 4) 松田典彦ほか (1975): 食衛誌, 16, 99-104.
- 5) 小林とよ子ほか (1976): 東海学園女子短期大学紀要, 11, 19-24.
- 6) 小林とよ子ほか (1977): 東海学園女子短期大学紀要, 12, 19-28.
- 7) 上野一恵 (1977): 検査と技術, 5, 267-268.
- 8) Ueno, k. (1972): *Anaerobic Bacteria, Role in Disease*, C. C. Thomas, U. S. A.
- 9) 上野一恵 (1964): *メデイヤサークル*, 57, 1-5.
- 10) Holdeman, L. V. et al. (1975): *Anaerobe Laboratory Manual*, Virginia Polytechnic Institute and State University, U. S. A.
- 11) 横関源延 (1959): 日水誌, 24, 765-769.
- 12) Smith, LD. S. (1976): *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*, C.C. Thomas, U. S. A.