

# 水産食品のウェルシュ菌に関する研究

谷 口 忠 敬

## Studies on *Clostridium perfringens* in Sea-Foods

Tadataka TANIGUTI

### 目 次

	(頁)
第1章 緒 論 .....	2
第2章 ウェルシュ菌の新検出培地 .....	3
第1節 ウェルシュ菌の新增菌・鑑別培地の作成 .....	3
第2節 魚貝類からのウェルシュ菌検出における同培地の適用性 .....	4
考 察 .....	9
要 約 .....	9
第3章 ウェルシュ菌の新孢子形成培地 .....	9
第1節 ウェルシュ菌の新孢子形成培地の作成 .....	10
第2節 新培地によるウェルシュ菌の孢子形成法および形成孢子の性状 .....	14
考 察 .....	19
要 約 .....	19
第4章 Hobbs 型ウェルシュ菌の耐熱性 .....	19
第1節 標準 Hobbs 型ウェルシュ菌の孢子形成培養における耐熱性および非耐熱性孢子の形成 .....	20
第2節 標準 Hobbs 型ウェルシュ菌孢子の休眠 .....	22
要 約 .....	26
第5章 生鮮魚貝類からのウェルシュ菌の検出および分離菌株の諸性質 .....	26
第1節 魚貝類におけるA型ウェルシュ菌の検出率と分離菌株の耐熱性 .....	26
第2節 魚貝類からの Hobbs 型ウェルシュ菌の検出とその型別 .....	31
第3節 魚貝類から分離したウェルシュ菌の耐熱性、抗原型とサリシン発酵能との関係 .....	35
考 察 .....	39
要 約 .....	41
第6章 魚肉加工食品からのウェルシュ菌の検出および同菌に起因する食中毒の予防 .....	42
第1節 魚肉加工食品あるいは魚肉すり身からのA型ウェルシュ菌の検出 .....	42
第2節 ウェルシュ菌に起因する食中毒の予防 .....	45

	I. Hobbs 型ウェルシュ菌のフリルフラマイド, テトラサイクリンおよびタイロシンに対する感受性 .....	45
	II. 魚肉ねり製品あるいは魚肉ソーセージに接種した Hobbs 型標準株の生育に対する, フリルフラマイドの阻止効果および貯蔵温度の影響 .....	50
考	察 .....	54
要	約 .....	55
第7章	水産食品に対するウェルシュ菌の新検査方式 .....	55
要	約 .....	57
第8章	総 括 .....	57
謝	辞 .....	59
文	献 .....	60
	Summary .....	63

## 第1章 緒 論

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) はヒトや動物の腸管, 下水あるいは土じょうなど自然界に広く分布している。本菌は戦争の際には外傷感染によるガス壊疽の原因として注目される。他方, 食品中で増殖した本菌を多量に摂取するとガス壊疽とは性質の全く異なる食中毒を起こす。

ウェルシュ菌による食中毒は, 古くは 1895年に Klein<sup>1)</sup>, 1943年に Knoxら<sup>2)</sup> および 1946年に McClung<sup>3)</sup> によって報告されているけれども, 1953年に Hobbs ら<sup>4)</sup> が系統的に詳しく報告してから注目されるようになった。ウェルシュ菌にはA~Fの6つの型(毒素産生型)があるが, 食中毒に関与するのはA型およびF型である。Hobbs らの研究により食中毒はおもにA型の耐熱性(100°, 1~4時間)株によるとされ, これら耐熱性株は凝集反応により現在1~17型<sup>4-6)</sup> に分類されている。なお, F型による食中毒は Zeisslerらや Hain によって報告されているが, その後は全く事例がない<sup>7)</sup>。

A型菌による食中毒は, 中には症状の激しいものもあるが, 一般に軽症で一両日で正常にもどるものが多く, 特に衰弱した者または高齢者でない限り生命の危険はない。しかし, F型菌による食中毒は壊死性腸炎とも呼ばれ, 症状は激しく, そのために死亡するものも多い。

英国 (England and Wales) における統計によると 1956~1965年<sup>8)</sup> の間に毎年 64~110件のウェルシュ菌食中毒が発生しており, ブドウ球菌 (*Staphylococci*) とほぼ同数を示している。さらに, 1962~1965年<sup>7-10)</sup> の食中毒の事例について検討すると, ウェルシュ菌食中毒の過半数は集団発生であって, 全集団発生の26~42%を占めていることが注目される。わが国においては, 1959年に山県らが報告して以来27件の本食中毒<sup>11-30)</sup> が報告されているが, やはり過半数が患者数100名を越す集団発生であり, また, その原因は集団給食に多い。従ってA型菌による食中毒は一般に軽症であるとはいえ, 本食中毒が起きた場合の社会的損失はかなり大きい。

ウェルシュ菌による食中毒は加熱食品によって起こるのが特徴とされ, 英国などでは鶏肉や牛肉など食肉の調理・加工食品がおもな原因食品になっている<sup>8-10, 31)</sup>。わが国では,

諸外国とは異なり、魚貝類の調理・加工食品による事故が比較的によく、本食中毒の半数近くを占めている。魚肉調理・加工食品の主原料である生鮮魚貝類からのウェルシュ菌の検出は中川ら<sup>32)</sup>および善養寺<sup>6)</sup>によってなされているにすぎない。また分離ウェルシュ菌の毒素産生型、Hobbs 型およびその他の特性についてはほとんど明らかにされていない。従って、本論文では 1966年 6 月から同年の10月にわたって生鮮魚貝類からウェルシュ菌の検出を試み、本菌による生鮮魚貝類の汚染状況を明らかにした。同時に、分離菌株について毒素産生型および Hobbs 型を型別し、更に、分離菌株の耐熱性および生化学的諸性質についても検討した。研究に当たっては、先ずウェルシュ菌を増殖させ鑑別する新培地を作成してウェルシュ菌の検出を容易かつ確実にする一方、胞子を形成させる新培地の作成によって分離菌株のウェルシュ菌としての同定を確実にした。また、Hobbs 型株における耐熱性あるいは非耐熱性胞子の形成を明らかにし、更に、胞子を同調的に形成させて胞子の休眠状態を観察した。他方、魚肉加工食品からのウェルシュ菌の検出も行なった。また、ウェルシュ菌食中毒の予防方法の一助として、多数の Hobbs 型株に対する数種防腐剤の最小生育阻止濃度を測定した。更に、魚肉ねり製品および魚肉ソーセージを対象に、接種ウェルシュ菌 (Hobbs 型株) の生育に対するフリルフラマイドの効果および貯蔵温度の影響も試験した。

## 第2章 ウェルシュ菌の新検出培地

ウェルシュ菌食中毒は、諸外国ではおもに鳥獣肉食品に起因するが<sup>8-10, 31)</sup>、わが国では魚貝類の調理・加工食品に起因することが比較的が多い<sup>33, 34)</sup>。従って、調理あるいは加工原料として利用される生鮮魚貝類について、ウェルシュ菌による汚染状況を明らかにすることは、食品衛生上から有意義なことと考えられる。これら日常食品のウェルシュ菌による汚染を調査するには、適切な選択培地が必要である。

### 第1節 ウェルシュ菌の新増菌・鑑別培地の作成

ウェルシュ菌の選択培地としては、カナマイシン加卵黄培地 (CW寒天培地)<sup>35)</sup>、亜硫酸塩・ポリミキシン・サルファダイアジン培地 (SPS 寒天培地)<sup>36)</sup> およびトリプトン・亜硫酸塩・ネオマイシン培地 (TSN 寒天培地)<sup>37)</sup> などがある。前2者を採用した場合には、*Clostridium bifermentans* や球菌類が随伴生育するのでウェルシュ菌の純離が煩雑である。一方、後者 (TSN 寒天培地) を用い46°で培養すると、*Cl. bifermentans* の生育が阻止され、ウェルシュ菌の純離が有利になる。しかし、これを分離培地として使用した場合には、多量の検体を接種するのに適しないなど若干の欠点がある。このため、Marshallら<sup>37)</sup> のウェルシュ菌定量用 TSN 寒天に、乳糖とL-アスコルビン酸ナトリウムの添加および寒天濃度の減少などの改変を施した新培地 (LAS 培地) をウェルシュ菌の選択増菌・鑑別培地として作成した。

#### LAS 培地の調製

LAS 培地はつぎの a 液、b 液を混合して調製する。

a 液) ポリペプトン 15g, 酵母エキス 10g, 乳糖 2g, 塩化ナトリウム 5g, 硫酸第一鉄 ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.25g, 寒天 1g, 精製水 1000ml, pH を 7.2~7.3 に調整した後、試験管 (2.3×15cm) に 30ml ずつ分注し、121°, 15分間滅菌・滅菌後の pH は 7.0~7.1。

b 液) ポリミキシンB 硫酸塩 6mg, ネオマイシン硫酸塩 15mg, 亜硫酸ナトリウム 75mg および L-アスコルビン酸ナトリウム 300mg, 精製水 10ml。

使用直前に a 液 30ml に対し b 液 1.0ml をろ過滅菌して添加する。

## 第2節 魚貝類からのウェルシュ菌検出における新培地の適用性

LAS 培地を使用して生鮮魚貝類からウェルシュ菌の増菌・検出を試みた。その結果、分離213株のうち93%が辺野喜<sup>5)</sup>のウェルシュ菌同定基準に一致し、この培地がウェルシュ菌の選択的増菌・鑑別培地として実用できることが明らかになったので、その詳細を述べる。

### 実験方法

#### 1. ウェルシュ菌の分離試料および試験期間

供試魚貝類のうち、魚類はアジ、サバ、コノシロなど29種、171個体、ケンサキイカは8個体、クロアワビは2個体、アカマテガイは4個体および小エビ剥き身は8個体で、計193個体を試料にした。各試料は長崎市内の4地域の小売店で購入した。入手後、直ちに4～5°に保ち4時間以内に供試した。なお、ウェルシュ菌の分離は1966年6月から同年10月の間に実施した。

#### 2. 検体からのウェルシュ菌の増菌および分離

試料からの検体の採取は無菌箱、滅菌器具を使用し、すべて無菌的に行なった。各検体からのウェルシュ菌の分離には、まず、LAS 培地で増菌培養した後に、分離する方式を採用した。

##### i. LAS 培地によるウェルシュ菌の増菌培養

魚体からのウェルシュ菌の検出は、体表および消化管について、それぞれ加熱および無加熱検体に分けて行なった。すなわち、無加熱検体の場合には、LAS 培地 31 ml 入り試験管の底部に検体(体表: 背部皮膚 10cm<sup>2</sup> あるいは消化管: 1～2g)を投入後、ゴムせんで密せんする。加熱検体の場合には、LAS 培地の a 液 30ml 入り試験管の底部に検体を投入し、80°湯浴中で20分間加熱後、45°まで急冷してから、これに b 液 1.0 ml を添加し、同様に密せんする。46°、24～48時間培養し、培地の黒変とガス産生が認められた場合をウェルシュ菌の増菌培養-陽性と判定する。

なお、貝類は、無菌的に開殻後、エラと消化管を、エビ剥き身はそのままを検体とし、イカは魚類と同様に体表と消化管にわけてウェルシュ菌の検出を行なった。

##### ii. 増菌培養からウェルシュ菌の分離

上述の増菌培養で陽性反応が認められたものを直ちに37°に移し、24時間以内に1白金耳を0.5%卵黄加CW寒天<sup>35)</sup>平板(カナマイシンの添加不必要であった)に塗布し、37°で嫌気培養(水素ガス充てん、Deoxo\*使用)する。この平板上に生育した乳糖分解(酸の産生)とレンチナーゼ反応がともに陽性の集落をウェルシュ菌として釣菌<sup>35)</sup>する。なお純離菌株はクックドミート培地で37°、24時間培養後、室温(25°以上)で保存した。

#### 3. 分離菌株の性状試験

分離菌株を同定するために、Table 2-2 に示したウェルシュ菌の性状について試験した。

\* 室温ではたらく触媒 (Engelhard 社製)

これら性状は、特記しない限り、常法によって試験した。

- i. **孢子形成試験**：孢子の形成は第3章の孢子形成新培地によって行なった。
- ii. **運動性試験**：グルコース無添加の半流動チオグライコレート培地（寒天 0.2%）にせん刺培養し、培地全体の混濁の有無で判定する方法<sup>38)</sup>によった。
- iii. **硝酸塩の還元試験**：硝酸カリウム0.1%添加チオグライコレート培地（グルコースは無添加あるいは0.1%，寒天は0.1%）を使用した。接種直前に100°，15分間加熱，急冷後，せん刺培養した。
- iv. **インドール形成試験**：試験培地は、ポリペプトン2.0%，酵母エキス0.5%，リン酸水素二ナトリウム（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）1.0%，チオグライコール酸ナトリウム 0.1%，寒天 0.2%，pH 7.2 を用い、判定は Kovacs 試薬<sup>39)</sup>によった。
- v. **炭水化物分解試験**：チオグライコレート培地（グルコースおよび酵母エキス無添加，寒天 0.3%，pH 7.0）に供試糖類 1.0%を加えたものを試験培地とした。キシロース，フルクトース，ガラクトース，マンノース，マルトース，トレハロース，ラフィノース，マンニット，イノシットおよびサリシンはその水溶液をろ過滅菌して培地に添加し，他の供試糖類は別に加熱滅菌した水溶液を培地に添加して使用した。37°，3日間せん刺培養後，0.2% BTB 溶液を滴下し，酸の生成が認められたものを陽性とした。
- vi. **レンチナーゼ抑制試験<sup>5)</sup>**：卵黄加CW寒天平板（直径9cm）の中心部にA型抗毒素血清（Wellcome Research Laboratories 社製）2滴を直径約5cmに塗布し，乾燥後に画線培養する。血清塗布面で，供試菌のレンチナーゼ作用が完全に抑制された場合を陽性とした。
- vii. **溶血性試験**：牛血液寒天平板培養におけるベーター溶血性を常法に従って試験した。Yamamoto ら<sup>40)</sup>は二重溶血環の形成をウェルシュ菌の特徴としているが，ここではベーター溶血が認められたものはすべて陽性とした。

## 実験結果

### 1. LAS 培地によるウェルシュ菌の鑑別と他の簡易鑑別試験との一致性

従来，食中毒原因細菌の判定には，簡易・じん速性の必要から，きわめて限られた鑑別試験法が設けられている。ウェルシュ菌定量用の TSN 寒天培地<sup>37)</sup>では，硫化水素を産生して培地を黒変するコロニーをウェルシュ菌と鑑別している。その他，レンチナーゼ反応<sup>35)</sup>，運動性<sup>36)</sup>，硝酸塩の還元<sup>36)</sup>などの各試験もこの菌の鑑別に応用されている。

増菌用に作成した LAS 培地では，乳糖 0.2%を添加したために，ウェルシュ菌の生育が確実になり，また培地の黒変のほかに乳糖の分解に基づくガス産生を新たに鑑別要因として加えることができた。LAS 培地を用いて増菌培養を行なった結果，Table 2-1 に示したような細菌が分離された。すなわち，i) 培地を黒変し，ガスを産生する菌株が大多数で，そのほかに，ii) 培地を黒変するがガスを産生しないものと，iii, iv) のように黒変もガス産生も認められないものが少数例で認められた。

すべての LAS 陽性培養から，乳糖を分解するレンチナーゼ陽性の桿菌がほとんど純培養に近い状態で分離された。これら分離株は Table 2-1 に示したように，すべて運動性がなく，また硝酸塩を還元した。すなわち，上述の諸性質において Table 2-1 記載のウ

エルシュ菌鑑別条件に一致した。しかし、TSN 寒天培地でのように、単に培地の黒変のみで陽性と鑑別したときは、ii) のように、少数ではあるがウェルシュ菌に該当しない細菌を含む危険がある。また、LAS 陰性培養からは、レンチナーゼ陽性、乳糖から酸産生、非運動性および硝酸塩の還元陽性の各鑑別条件に完全に一致する細菌は分離されなかった。

Table 2-1. Agreement between Characters of Strains Isolated from Cultures with LAS Medium and Criteria for Presumptive Identification of *Clostridium perfringens*

Groups and numbers of isolated strains	Enrichment culture with LAS medium*2			Egg yolk-CW agar (lactose agar)-plate		Motility	Reduction of nitrate
	Blackening	Gas	Growth	Lecithinase	Acid		
i) Rods, 213*1	+	+	+	+	+	-	+
ii) Rods, 3	+	-	+	-	-	+	-
iii) Rods, 1	±	-	±	-	-	+	-
iv) Cocci, 11	-	-	±	-	+	-	-
<i>Cl. perfringens</i>	+	+	+	+	+	-	+

\*1 i) presumed as *Cl. perfringens*

\*2 Culture temperature : 46°C. Composition of LAS medium : a) polypeptone 15 g, yeast extract 10 g, lactose 2 g, NaCl 5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25 g, agar 1 g, distilled water 1000 ml, pH 7.2~7.3. Pour 30 ml into each test tube (2.3×15cm), then sterilize at 121°C, for 15 min (pH after sterilization 7.0~7.1). b) polymyxin B sulfate 6mg, neomycin sulfate 15 mg, sodium sulfite 75 mg, sodium ascorbate 300 mg, distilled water 10 ml. To 30 ml of the solution a), 1.0 ml of the solution b) prepared freshly is added just before use

## 2. 分離菌株の性状とウェルシュ菌同定の各種基準性状との一致性

LAS 培地を用いて魚貝類から増菌・分離した 213 菌株は、すべて偏性嫌気性、グラム陽性の桿菌で、卵円形の孢子を形成し、非運動性であった。また、亜硫酸塩から硫化水素を産生したほか、レンチナーゼ反応および同反応の A 型抗毒素血清による抑制試験、乳糖分解試験および硝酸塩の還元試験の各鑑別試験がそれぞれ陽性であった。すなわち、これら分離株は、*Cl. bifermentans* と明確に異なり、ウェルシュ菌かあるいはこの菌のごく近縁に位置すると考えられる。

分離菌株のウェルシュ菌同定に際しては、まず、i) わが国の辺野喜<sup>5)</sup>の基準 (B E 基準), ii) アメリカの食品に適用された Strong<sup>ら</sup><sup>4)</sup>の基準 (S 基準), iii) Bergey<sup>42)</sup> の *Clostridium* 属内の検索表の基準 (セルロース発酵および色素産生試験を省略。B 基準), iv) B 基準に更に Bergey<sup>42)</sup> 記載の 10 種類の糖分解、レンチナーゼ反応、硝酸塩の還元およびインドール産生の各試験を加えた基準 (B B 基準) の 4 同定基準を適用した。

分離 213 菌株の性状と各同定基準との一致率を Table 2-2 に示した。すなわち、B E 基準では 93%、B 基準では 83%、S 基準では 67%であったが、B B 基準ではわずかに 12%が一致したにすぎなかった。

一致率が B 基準の 83% に対し S 基準で 67% と低いのは、主としてサリシンの分解試験結果が S 基準に一致しないためである。B 基準ではサリシンの分解はまれであるとしている

Table 2-2. Agreement between Characters of Strains Isolated from LAS-Positive (Blackening and Gas-Producing) Cultures and Criteria for Identification of *Cl. perfringens*

Tests	Criteria for identification				Nos. of strains agreed with tests	
	*3 B	BB	BE	S	Positive, (%)	Negative
Aerobic culture, no growth	○	○	○	○	213 (100)	0
Gram staining, positive	○	○	○	○	213 (100)	0
Spores (ovoid, not swollen)	○	○	—	—	213 (100)	0
Non-motility	○	○	○	○	213 (100)	0
Gelatin liquefaction, positive	○	○	—	○	196 ( 92)	17
Coagulated albumin, no liquefaction	○	○	—	—	213 (100)	0
Iron milk, stormy fermentation	○	○	○	○	203 ( 95)	10
H <sub>2</sub> S from sulfite, positive	—	—	—	○	213 (100)	0
Lecithinase, positive	—	○	○	○	213 (100)	0
Lecithinase-inhibition test*2, positive	—	—	○	—	213 (100)	0
Nitrate reduction, positive	—	○	—	○	213 (100)	0
Indole, no production	—	○	○	○	213 (100)	0
Beta-hemolysis (bovine blood), positive	—	—	—	○	210 ( 99)	3
Xylose (acid and gas)*1	—	○	—	—	55 ( 26)	158
Glucose (acid and gas)	○	○	○	○	213 (100)	0
Fructose (acid and gas)*1	—	○	—	—	208 ( 98)	5
Galactose (acid and gas)	—	○	—	—	213 (100)	0
Mannose (acid and gas)	—	○	—	—	213 (100)	0
Lactose (acid and gas)	○	○	○	○	213 (100)	0
Sucrose (acid and gas)	○	○	○	○	205 ( 96)	8
Maltose (acid and gas)	—	○	—	○	211 ( 99)	2
Trehalose (acid and gas)*1	—	○	—	—	160 ( 75)	53
Raffinose (acid and gas)*1	—	○	—	—	148 ( 69)	65
Starch (acid and gas)*1	○	○	—	—	203 ( 95)	10
Glycogen (acid and gas)*1	—	○	—	—	189 ( 89)	24
Inositol (acid and gas)*1	—	○	—	—	180 ( 85)	33
Inulin (acid and gas)*1	—	○	—	—	40 ( 19)	—
(no action)	—	○	—	—	173 ( 81)	—
Glycerol (acid and gas)*1	○	○	—	—	211 ( 99)	—
(no action)	○	○	—	—	2 ( 1)	—
Salicin (acid and gas)*1	○	○	—	—	51 ( 24)	—
(no action)	○	○	—	○	167 ( 76)	51
Mannitol (no action)	○	○	—	○	210 ( 99)	3
Numbers of identified strains	177	25	198	142		
Percentages of identified strains per all tested strains	83	12	93	67		

\*1 Also only acid production was judged as positive, because various strengths of acid- and gas-productions were observed in different test strains

\*2 Complete inhibition of lecithinase action with Type A serum (Wellcome Research Laboratories)

\*3 B...the key in Bergey's manual<sup>42)</sup> to the species of genus *Clostridium*, but cellulose fermentation and pigment production-tests were omitted. BB...the B criterion which was supplemented with the carbohydrate fermentation tests and the other tests listed in Bergey's manual<sup>42)</sup>. BE...Benoki's criterion<sup>5)</sup> S...the criterion of Strong *et al.*<sup>41)</sup>  
 o...included, —...excluded

が、S基準ではこれを陰性と規定してしまっている。それ故、S基準からサリシンの項を除外すると、分離菌株の84%がウェルシュ菌に該当することになり、B基準によった場合の一致率に近似した。

B B基準では10種の糖類の分解試験が付加されているために、ウェルシュ菌該当率がB基準の83%からわずかに12%に低下した。最も一致率が低いのはキシロース分解性の26%であり、分離菌株の約3/4がキシロースを分解せずB B基準に一致しなかった。しかし、B B基準からキシロース分解試験を除外しても、分離菌株のウェルシュ菌該当率は40%まで上昇するにすぎなかった。すなわち、B B基準の糖類分解試験を適用した場合には、たとえキシロースを基準から除外しても、同定される範囲はTable 2-2の種々の糖類（フルクトース、ガラクトース、マンノース、マルトース、トレハロース、ラフィノース、グリコーゲンおよびイノシット）を分解する菌株に限定された。それ故、Hobbsの標準13株（1~13型）について、キシロース、フルクトースなど前述の9種の糖類分解試験を行なった結果、とくにキシロース、トレハロースおよびイノシットにおいては、13株中の9、10および9株がそれぞれ陰性であり、B B基準に一致しなかった。また、残りの陽性株でも、その分解は微弱であった。

ウェルシュ菌の同定にわが国で使用されているB E基準およびアメリカの食品検査に適用されたS基準では、ウェルシュ菌の同定で重要な孢子の確認が除外されている。これは孢子の形成が困難視されていたためであろう。しかし、本実験では、第3章-第2節の孢子形成法により、すべての分離菌株について孢子を確認しているので、B EおよびS基準によったときでも従来よりも信頼性が高い。

### 3. 加熱と無加熱の体表および消化管検体におけるLAS培地のウェルシュ菌選択性の比較

LAS培地によるウェルシュ菌の増菌・検出において、LAS陽性培養(213例)からウェルシュ菌が分離確認された比率を、加熱(80°C, 20分)と無加熱の体表および消化管の各検体にわけ、前述の各同定基準ごとに示すとTable 2-3のとおりである。無加熱検体に限った場合、体表-陽性培養および消化管-陽性培養からウェルシュ菌が分離確認された比率は、それぞれB E基準によったときに92%、97%；B基準のときに84%、82%；S基準のときに74%、75%であった。すなわち、陽性培養からウェルシュ菌の分離確認率は体表

Table 2-3. Isolation Rate of *Cl. perfringens* from LAS-Positive Cultures

Specimens	Isolation rate of <i>Cl. perfringens</i>			Numbers of LAS-Positive cultures
	*BE	B	S (%)	
Unheated				
Body-surface	92	84	74	151
Alimentary canal	97	82	75	28
Average	93	84	74	Total 179
Heated (80°C, 20 min)				
Body-surface	93	76	34	29
Alimentary canal	100	60	0	5
Average Total	94	74	29	Total 34

\*Signs are the same ones as described in Table 2-2



と消化管の間では大差なく、むしろ同定基準による相違が大であった。

一方、無加熱・陽性培養および加熱・陽性培養からのウェルシュ菌の分離確認率を比較してみると、B E基準によったとき、それぞれ平均93%、94%；B基準のときに84%、74%；S基準のときに74%、29%であった。すなわち、陽性培養からウェルシュ菌の分離確認率はB E基準によったときには無加熱・加熱検体間ではほとんど差がなかった。しかし、SおよびB基準によったときには、無加熱と加熱の間に分離確認率の相違が認められ、とくにS基準でその差が大であった。前述したように、無加熱の体表と消化管の間では、このような相違は認められなかった。従って、S基準によるこの無加熱と加熱の間の相違は、加熱処理が1つの選択因子として作用していることを示すものであろう。

## 考 察

LAS 培養では、容易かつ確実に嫌気培養するために、L-アスコルビン酸ナトリウムを添加した。従って、チオグライコレート添加 TSN 重層培養<sup>37)</sup>とは異なり、チオグライコレートの分解により培地が黒変するようなことはなく、亜硫酸塩の還元に基づく培地黒変の判定が容易、確実になった。また、この培地では、培地黒変のほか、乳糖からのガス産生を鑑別要因として加えたために、増菌と同時に TSN 寒天培地よりもウェルシュ菌の鑑別を有効に行なうことができた。

普通の増菌培養によったときには随伴菌によってウェルシュ菌が抑制されることもある<sup>43)</sup>が、LAS 培地による増菌培養では、このようなことはまったく認められなかった。なお、定量用 TSN 寒天では検体を多量に接種することは困難であるが、増菌用に作成した LAS 培地では比較的多量の検体の接種も容易であり、そのために汚染度の低い日常食品からのウェルシュ菌検出にも適していると考えられる。

## 要 約

ウェルシュ菌の新增菌・鑑別培地 (LAS 培地) を作成した。これを用いて生鮮魚貝類193個体からウェルシュ菌の増菌分離を試み、その適用性を検討した。

1) ウェルシュ菌定量用の TSN 寒天培地に対し次の改変、すなわち乳糖・L-アスコルビン酸ナトリウムの添加および寒天濃度の減少を行ないウェルシュ菌の新選択増菌培地 (LAS 培地) を作成した。

2) LAS 培地はウェルシュ菌の増菌と同時に鑑別にも適し、TSN 寒天培地による鑑別よりもすぐれていた。

3) 増菌培養によって得た213例のLAS陽性(ウェルシュ菌鑑別-陽性)培養からウェルシュ菌が分離確認された比率は、辺野喜、Bergey (検索表) および Strong らの各同定基準によった場合、それぞれ93%、83%、67%の高率であった。

4) ウェルシュ菌に対するLAS培養の選択性は、辺野喜の基準によったときには、加熱検体の場合も無加熱検体の場合とほぼ同様であった。

## 第3章 ウェルシュ菌の新孢子形成培地

ウェルシュ菌の同定において、孢子の確認は基本的な検索事項の一つである。しかし、ウェルシュ菌は一般に孢子形成が最も困難なものの一つとされている<sup>44)</sup>。このため、すべての菌株に適用できる新孢子形成培地の作成を試みた。

### 第1節 ウェルシュ菌の新孢子形成培地の作成

ウェルシュ菌の孢子形成能は、菌株によって相違し、また培地および培養条件によって著しく変動する。すなわち、この菌の孢子形成培地として広く知られているEllner培地<sup>45)</sup>などによっても、すべての菌株に確実に孢子を形成させることは容易ではない<sup>46,47)</sup>。このため、Ellner 培地で孢子形成が困難であった菌株について、孢子形成に対する培地成分の影響に関し検討を加え、供試全菌株に高率に孢子を形成させることができたので、これらの結果について記述する。

#### 実験方法

1. 供試菌株：Hobbs 博士から恵与された Hobbs 型標準株（1～13型，13株），東京都立衛生研究所から分譲を受けた食中毒由来株（W111，W157（5型）），国立予防衛生研究所から分譲されたA型株（SW），B型株（B406），および当研究室保存のA型株（65，79，830，854，912）の計22菌株を，この試験に用いた。

2. 孢子形成試験：クックドミート培地で，37°，15時間培養後に，4時間の継代培養を行なった旺盛に生育している菌液の0.5mlを，各試験培地15mlに接種し，37°，24時間嫌気培養した後に，孢子の形成状況を観察した。孢子の確認は，Dorner法およびConklin法による孢子染色と，位相差顕微鏡による形態の観察によった。培養は水素充てん(Deoxo触媒)嫌気培養法によった。このほかに，培地を100°，15分間加熱後急冷し，その底部に接種してから密せん培養する方法も用いた。

3. 孢子形成培地：孢子形成には，Ellner 培地をもとに，実験結果を逐次検討して，組成変更を行なったところの Table 3-1 に示した培地を用いた。なお，表以外にも，添加物質の種類や濃度について試験したが，関連個所において述べる。

Table 3-1. Media Tested for Sporulation of *Cl. perfringens*

Components, %	Media			
	E(Ellner)	AE	AEA	AGA
Polypeptone	1.0	1.0	1.0	1.0
Yeast extract	0.3	0.3	0.3	1.0
Ammonium acetate	—	0.15	0.15	0.15
Starch	0.3	0.3	0.3	—
Glycerol	—	—	—	1.0
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.02	0.02	0.02	0.02
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	6.7	1.1	1.1	1.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.15	0.025	0.025	0.025
Sodium ascorbate**	—	—	0.02	0.02
pH	7.8	7.8*	7.8*	7.8*

All media were sterilized at 121°C for 15 min, except sodium ascorbate

\*Adjusted by addition of 2 N-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.3 ml/100 ml)

\*\*Sterilized by filtration and added the sterilized to test media just before use

4. 保存培養：供試菌は，すべてクックドミート培地に接種し，37°，1日培養後，室温（20°以上）に放置し，3カ月毎に植え継ぎ保存培養した。

## 実験結果

### 1. 酢酸アンモニウムの添加およびリン酸塩濃度の孢子形成に対する影響

多数のウェルシュ菌について、Ellner 培地を用いて孢子形成と生育との関係を調べた結果、デンプンの発酵力が強くてよく生育する菌株、および逆にデンプンの発酵力が弱く生育が劣る菌株には、孢子形成が困難なものが多かった。また発酵力および生育が両者の中間の菌株は孢子を形成しやすい傾向を示した。これらの事実から、ウェルシュ菌の孢子形成は、培養中に蓄積される代謝成分とその濃度によってかなりの影響を受けるものと想像された。

*Clostridium botulinum* は、培養中に蓄積された酢酸を孢子の形成とともに消費し<sup>48)</sup>、また Forespore の成熟に L-アラニン、L-プロリン等のスティ克蘭ド反応系経由のエネルギー源を要求する<sup>49)</sup> といわれる。*Clostridium thermosaccharolyticum* 3814 においても、孢子形成の進行とともに、培地中の蓄積酢酸が減少し、これが孢子の脂質中に取り込まれる<sup>50)</sup>とされている。また Ellner 培地によった場合には、変形膨大細胞が現われる傾向がみられる<sup>47)</sup>。それ故、Ellner 培地への酢酸アンモニウムの添加と同培地中のリン酸塩濃度の低下とが、孢子形成におよぼす影響を合せて試験した。

供試株は、Ellner 培地において孢子形成が困難であった W111, W157, B406 の 3 株とし、培地を 100°, 15 分間加熱・急冷後、その底部に接種し、密せん培養する Ellner の方法によって嫌気培養した。試験結果は Table 3-2 のようである。すなわち、Ellner 培地に酢酸アンモニウムを添加し、リン酸塩濃度を減少した培地 (A E 培地) によった場合に、3 株とも孢子形成率がいちじるしく上昇した。また、酢酸アンモニウムの代りに、酢酸ナトリウムあるいはリン酸アンモニウムを加えると、W157 には酢酸塩が、B406 にはアンモニウム塩が、それぞれ有効であった。また、W111 は A E 培地および酢酸アンモニウム無添加 A E 培地中にも孢子を形成した。なお、A E 培地中の栄養細胞および孢子形成細胞は、ともに Ellner 培地における場合よりも、一般に小形であった。

Table 3-2. Effects of Phosphate-Concentration and of Ammonium Acetate-Addition on Sporulation of *Cl. perfringens* (W 111, W 157 and B 406)

Test media	Sporulation rate*2			Cell forms
	W111*1	W157	B406	
E (Ellner)	0	< 5	< 1	large
E+0.15% ammonium acetate	0	40-60	10-30	large
AE-ammonium acetate	20-30	5	< 5	small
AE	20-30	40-50	10-50	small

Data show the mean of 3 experiments

Incubation : 37°C, 24 hr

\*1 W111 and W 157 : distributed from Tokyo-to Laboratories for Medical Science, Japan; B 406 : from National Institute of Health, Japan

\*2 Percentage of free spores and spore-forming cells per total cells

### 2. アスコルビン酸ナトリウム添加の効果

前述のように、孢子形成に効果が認められた A E 培地を用いて Hobbs 型標準株 13 株 (1 ~13 型) の孢子形成を試みたが、その結果、2 型と 3 型以外の菌株では孢子形成が認めら

れなかった。

嫌気性菌の孢子形成には、酸素分圧が影響する<sup>51)</sup>ので、孢子形成が認められなかった7型株を用いて、この点について種々の検討を試みた。その結果、AE培地に、使用直前に0.02% L-アスコルビン酸ナトリウムを添加(ろ過滅菌)し、沸騰水中に試験管を2分間浸漬、急冷してから、菌を接種し、水素充てん嫌気ジャー中で培養する方法によって、多数の孢子を確実に形成させることができた(以下の実験では、嫌気培養は特記しない限りすべてこの方法で実施)。また、窒素ガス置換あるいはパラフィン重層法によっても、同様に孢子形成が認められた。なお、培地のpH調整に当たっては、水酸化ナトリウム溶液によるよりも炭酸ナトリウム溶液を用いる方が、孢子形成に良い傾向が認められた。

上記のL-アスコルビン酸ナトリウム添加AE培地をAEA培地とし、Hobbs型標準株(13株)の孢子形成を、Ellner培地と比較試験した(ここでEllner培地の場合にも、100°、15分間加熱後急冷、接種後の培養は、AEA培地と同様に、嫌気ジャー中で実施した)。Table 3-3に示したように、Ellner培地では、13株とも孢子を形成せず、AEA培地では7株に孢子の形成を認め、残りの6株については孢子は認められなかった。孢子形成株の中には、60~80%の高率の孢子形成を示す菌株も認められた。

Table 3.3. Comparison of Sporulation Rates of Hobbs' Standard Strains between Ellner's Medium and AEA Medium

Strains*		Exp. 1		Exp. 2	
		E	AEA	E	AEA
8359	Type 1	0	0	0	0
8238	2	0	70	0	60
8239	3	0	5	0	5
8247	4	0	10	0	10
8678	5	0	< 5	0	0
8679	6	0	10	0	10
8449	7	0	60	0	70
8235	8	0	20	0	10
8798	9	0	80	0	80
8799	10	0	0	0	0
9851	11	0	0	0	0
10239	12	0	0	0	0
10240	13	0	0	0	0

Data show percentage of free spores and spore-forming cells per total cells after 24 hr incubation at 37°C

\*Distributed from Dr. Betty C. Hobbs; Central Public Health Laboratory, London

### 3. グリセリンおよび酵母エキス添加の孢子形成に対する効果

グルコースのように易発酵性物質が存在すると、一般に細菌の孢子形成が困難になる<sup>45, 52)</sup>。デンプンの発酵は菌株によって強弱が認められ、前述のようにEllner培地で孢子形成が困難であった菌株は、デンプン発酵力が強いにあるいは弱いかのいずれかであるような傾向が認められた。また、Ellner培地からデンプンを除去すると、孢子形成率がいちじるしく低下した。従って、ウェルシュ菌のすべての菌株に共通して孢子形成に有効に作

用するような炭素・エネルギー源として、デンプン以外の適切な発酵性物質の存在が必要と考えられる。Ellner<sup>45)</sup> はマンニット、ラフィノースがデンプンに代りうるとしているが、この菌の孢子形成にデンプンよりも有効に作用する発酵性物質についての報告は見あたらない。

著者は、別に分離したウェルシュ菌約200株の性状検査において、大部分の菌株が微弱ではあるがグリセリンを発酵することを認めた。また、発酵力が比較的強い菌株でも、グルコースやデンプンのような旺盛な発酵をしなかった。従って、グリセリンはウェルシュ菌の生育には必ずしも適当ではないけれども、栄養細胞を孢子形成に誘導しやすいのではないかと考えたので、その孢子形成に対する効果を試験した。この際グリセリンをデンプンに代えて用いると、一般にこれら細菌の生育がかなり劣るので、これを補う意味で、酵母エキスの添加量の影響も合わせて試験した。

供試株には前記 AEA 培地で孢子形成を認め得なかった Hobbs 型標準株中の5型と11型の2菌株を、また、基礎培地にはデンプンおよび酵母エキス無添加 AEA 培地を用い、孢子形成に対するグリセリンおよび酵母エキス添加濃度の影響を同時に試験した。37°、24時間培養の結果を Table 3-4 に示した。すなわち、5型と11型株では、それぞれグリセリンの添加量が0.3%、0.5%以上の場合に孢子形成率がいちじるしく増加し、また酵母エキスも高濃度(1.0%)の添加において孢子形成が良好であった。グリセリン1.0%と酵母エキス1.0%の添加は有効に作用して、両菌株ともに80%以上の孢子形成率を示した。

Table 3-4. Effect of Glycerol and Yeast Extract on Sporulation of Hobbs' Standard Strains (8678 and 9851)

Strains	Yeast extract, %	8678 (Type 5)			9851 (Type 11)		
		0.3	0.5	1.0	0.3	0.5	1.0
Glycerol, %	0	0	0	0	0	0	0
	0.3	35	50	75	0	< 5	0
	0.5	80	80	80	65	65	65
	1.0	>80	>80	>80	65	80	>80

Basal medium: AEA medium without starch and yeast extract

Data show percentage of free spores and spore-forming cells per total cells after 24 hr culture at 37°C

上述のグリセリン1.0%、酵母エキス1.0%添加培地を AGA 培地とし、この培地による孢子形成を5型と11型以外の供試 Hobbs 型標準株(11株)について試験した結果、いずれの菌株においても80%以上の多数の孢子形成を確認した。また他の供試株 W111, W157 および B 406においても、それぞれ50%、80%、80%以上の孢子形成を示した。

なお、*Azotobacter* 属のある種においては、エタノールやブタノールのように簡単な有機化合物が炭素源として使用されるときに Cyst を形成し、グルコースやショ糖では生育のみを促進しその形成が抑制される<sup>53)</sup>。この事実は供試ウェルシュ菌の孢子形成に対するグルコースとグリセリンの作用の相違に類似する。また、その Cyst は *Bacillaceae* 科の孢子に類似する<sup>54, 55)</sup>ともいわれる。それ故、Hobbs 標準5型株を用いて、ブタノール、プロバノール、エタノールの孢子形成に対する効果を試験したが、いずれもわずかにその効果が認められる程度にすぎなかった。

#### 4. AGA 培地に対するコバルトイオン添加の補足効果

胞子の形成は、栄養型の増殖とは別の新しい生合成であり、それにあずかる諸酵素が強力に作用するためには、胞子形成時の金属イオンの影響も問題になる *Cl. botulinum* の場合には、 $\text{Ca}^{2+}$  が  $\text{NH}_4^+$  と  $\text{PO}_4^{3-}$  の存在下で胞子の形成を促進し<sup>51)</sup>、またウェルシュ菌の胞子形成に  $\text{Mg}^{2+}$  が有効である<sup>45)</sup>といわれる。

AGA 培地、37°、24時間培養で胞子形成が不良(10%以下)であった菌株(6株)を対象に、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Co}^{2+}$  の2価金属イオンの AGA 培地に対する添加の影響を試験した結果、 $\text{Mg}^{2+}$  の除去はかえって胞子形成に対し抑制的であり、 $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$  10mg/L) の添加効果は僅少であったが、 $\text{Co}^{2+}$  の添加はかなり促進的に作用した。AGA 培地に、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を用いて、 $\text{Co}^{2+}$  として 4mg/L を加えた場合の効果を Table 3-5 に示した。すなわち、供試菌は AGA 培地において 45~80% の胞子形成を示すには3日間の培養を必要としたが、 $\text{Co}^{2+}$  添加 AGA 培地 (AGACo 培地) では胞子形成がいちじるしく促進され、24時間培養において 30~90% の多数の胞子形成が認められた。

Table 3-5. Effect of Cobalt Ion on Sporulation of *Cl. perfringens* in AGA Medium

Media Incubation days	AGA		AGA plus $\text{Co}^{2+}$	
	1	3	1	3
Strains*, SW	0	50	40	80
	< 5	80	70	80
	< 5	80	90	
	0	45	70	
	0	80	80	
	<10	80	30	80

Data show percentage of free spores and spore-forming cells per total cells  
 $\text{Co}^{2+}$  (4 mg/L) was added as  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

\*SW : distributed from National Institute of Health, Japan

The other strains : isolated from fishes in the authors' laboratory

#### 第2節 新培地によるウェルシュ菌の胞子形成法および形成胞子の性状

前節において、ウェルシュ菌に対する新胞子形成培地 (AGACo 培地) を作成した。しかし対象とした供試菌株が 22株の少数にすぎなかった。また、ウェルシュ菌の胞子形成の確認には一般に数種の培地による試験が必要とされている<sup>44, 47)</sup>。著者も別に、Ellner 培地<sup>45)</sup>、Angelotti らの培地 (SEC 培地)<sup>36)</sup>、ハートインフュージョンブロスおよびクックドミート培地などについて試験したが、有効培地が菌株によって相違する場合をしばしば認めた。これらのことから、更に多数の一般のウェルシュ菌に対する AGACo 培地の適用性について検討した。すなわち、Hobbs 型標準 13株と、他の 4 研究機関から分与を受けた A 型 7株、B~F 型 12株、および著者らが生鮮魚貝類から分離したウェルシュ菌 (A 型) 198株とに対し AGACo 培地の適用を試み、好結果を得た。また AGACo 培地で形成した胞子の性状についても若干の検討を行なった。

#### 実験方法

1. 供試菌株 : Hobbs 博士から分与された Hobbs 型標準 13株、長崎大学熱帯医学研究

所、国立予防衛生研究所、東京都立衛生研究所および長崎県衛生研究所から分与されたA型7株、B～F型12株、その他に著者らが生鮮魚貝類から分離したウェルシュ菌（A型）198株を供試した（Table 3-6）。なお魚貝類からの分離株は辺野喜の同定基準<sup>5)</sup>によって同定し、分離株の毒素産生型は抗毒素血清（Wellcom Research Laboratories 社製）によるマウスに対する毒性中和試験<sup>56, 57)</sup>によって決定（第5章-第1節に詳述）した。

2. 供試培地および培養法：AGACo培地組成および培養法を Fig. 3-1 に示した。なお前培養の検討にあたっては、前節の前培養条件を基準として比較した。

3. 胞子の確認：胞子は、培養菌体を滅菌生理食塩水で1～2回洗浄後、胞子染色によって確認した。胞子染色は Bartholomew and Mettwer の方法<sup>58)</sup>にしたがって標本を火炎固定後、Conklin の方法<sup>58)</sup>によってマラカイトグリーンで染色し、サフラニンで対比染色する方法によった。なお一部については、位相差顕微鏡による検鏡および石炭酸フクシンによる染色性の観察も併用した。

4. 形成胞子の対熱性試験：ハートインフュージョンブロス（Difco 社製）37°、15時間培養の0.3mlを、AGACo培地10mlに接種し、37°で48時間培養する。この培養液0.5mlをハートインフュージョンブロス（pH 7.0に調整）5.0mlに添加・接種し、ただちに100°、15分間加熱し、急冷後にグルコースを1.0%に添加してから37°で48時間嫌気培養（水素ガス充てん、Deoxo 使用）し、生育の有無によって耐熱性を判定した。

なお、比較のために、クックドミート培地培養菌液の耐熱性も同様の方法で試験した。クックドミート培地の調製は Manual of Microbiological Methods<sup>59)</sup>にしたがった。

## 実験結果

### 1. 新培地（AGACo培地）を使用したウェルシュ菌の胞子形成方式の適用性について

a. 胞子形成試験法：前節では主として、AGACo培地の作成経過について述べたが、本項では多数の菌株の処理を容易にし、また胞子形成を確実にする目的から、前培養、接種、胞子形成培養について、再度の検討を行なった。

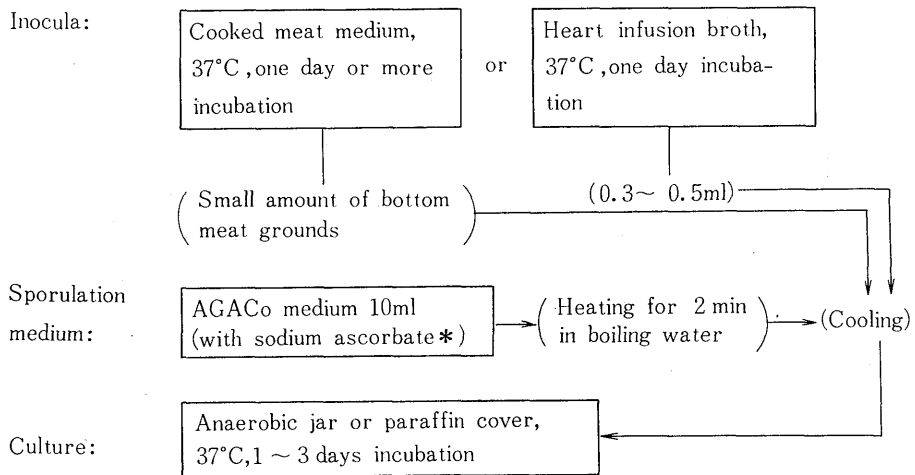
i. 前培養：前節においては接種用前培養はクックドミート培地、37°、4時間培養を使用した。しかし、多数の菌株を処理するに当たっては、かなり負担となるので、24時間培養からの接種について試験した。その結果、ハートインフュージョンブロスあるいはクックドミート培地、24時間培養液を接種した場合でも、クックドミート培地、4時間培養の培養液を接種した場合と同様の胞子形成が認められた。なお、25°、3か月間保存のクックドミート培養の底部肉カスの少量を直接AGACo培地に接種した場合でも、生育が見られる限り、胞子形成にはほとんど悪影響を認めなかった。

ii. 接種：試験管に10mlずつ分注したAGACo培地（使用直前にL-アスコルビン酸ナトリウム0.02%をろ過滅菌して添加）を沸騰水中で2分間加熱し、急冷後、これに前培養を接種する。前培養がハートインフュージョンブロス、37°、24時間培養の場合にはその0.3～0.5mlを、クックドミート培地24時間培養の場合には底部肉カスの少量あるいは培養液0.3～0.5mlを接種する。クックドミート培地、2日間以上の培養を接種するときには、液部接種よりも底部肉カス接種の方がとくに確実であった。

iii. 胞子形成培養：接種後、ただちに37°で1～3日間嫌気培養する。嫌気培養法の相

違による孢子形成率の変動は、水素ガス充てん (Deoxo 使用)、窒素ガス置換およびパラフィン重層法においては、認められなかった。

以上の結果から、Fig. 3-1 に示した孢子形成試験法を設定した。なお、AGACo 培地中へ添加した  $\text{Co}^{2+}$  は、前節で述べたように孢子形成に必要な培養時間の短縮に有効であるが、必ずしもその添加は必要でない。



Composition of AGACo medium (%):

Polypeptone .....	1.0	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ .....	1.1
Yeast extract .....	1.0	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0.025
Glycerol .....	1.0	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^{**}$ .....	16 mg/L
Ammonium acetate ..	0.15	2N - $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .....	13 ml/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	0.02	Sodium ascorbate* .....	0.02

pH 7.8, sterilized at 121°C for 15 min

\* Sodium ascorbate solution (sterilized by filtration) should be added just before use

\*\* Addition fo cobalt ion is optional

Fig. 3-1. A Scheme for Sporulation Test of *Cl. perfringens* by Using AGACo Medium

b. 適用性: Hobbs 型標準株13株 (1~13型), A型205株, B~F型12株, 計 230株のウェルシュ菌に対し, AGACo 培地による孢子形成試験法を適用した結果を Table 3-6 に示した。すなわち, AGACo 培地によった場合には, 毒素産生型および菌株による孢子形成の相違はほとんどなく, すべての供試株が40~80%以上の多数の孢子を形成した。



Table 3-6. Application of New Sporulation Medium (AGACo medium) against 230 Strains of *Cl. perfringens*

Strains*		Nos. of test strins	Sporulation rate**
Type A	Hobbs' standard strains <sup>a)</sup> Type 1~13	13	80 <
	W 157 <sup>d)</sup> , W 635 <sup>d)</sup> , CW 2 <sup>c)</sup>	3	80 <
	W 111 <sup>d)</sup> , PB6K <sup>b)</sup> , A <sup>b)</sup> , SW <sup>c)</sup>	4	50 <
	Strains <sup>f)</sup> isolated from fishes, shellfishes and shrimps	81 67 50	80 < 50 < 40 <
Type B	B 406 <sup>c)</sup> , B <sup>b)</sup> , BW 6 <sup>e)</sup>	3	60~80 <
Type C	C 406 <sup>c)</sup> , C <sup>b)</sup> , CW 8 <sup>e)</sup>	3	40~60 <
Type D	D 406 <sup>c)</sup> , D <sup>b)</sup> , DW 12 <sup>e)</sup>	3	80 <
Type E	E 406 <sup>c)</sup> , E <sup>b)</sup>	2	70~80 <
Type F	F <sup>b)</sup>	1	80 <

\* Distributed from a) Dr. Betty C. Hobbs (strains are the same as the ones in Table 2); b) Institute for Tropical Medicine, Nagasaki University, Japan; c) National Institute of Health, Japan; d) Tokyo-to Laboratories for Medical Sciences, Japan; e) Nagasaki Prefectural Institute of Public Health, Japan; f) Isolated in the author's laboratory

\*\*Percentage of free spores and spore-forming cells per total cells

## 2. 新培地 (AGACo 培地) 中に形成した胞子の性状について

ウェルシュ菌の胞子は、形成培地によってその性状に相違が見られる。Hallら<sup>47)</sup>は、SEC 培地の場合にくらべて、Ellner 培地では耐熱性が低く、また大型の変形膨大胞子が多く見られる傾向にあるとしている。このために、AGACo 培地中に形成した供試菌の胞子について、形態、染色性、および耐熱性などの性状を観察した。その結果を記述する。

a. 形成胞子の形態、とくに染色性：AGACo 培地中に形成した胞子の1例を Fig. 3-2 に示した。すなわち、形成した胞子は卵円形の正常胞子であって、胞子囊中に1あるいは



Fig. 3-2. Endospores of *Cl. perfringens* (Hobbs' Standard Strain 8679)  
Produced in AGACo Medium

Incubated at 37°C for 24 hr. Phase contrast microscopy. A measure with 1 $\mu$  scales

は2個を含み、なかには長細胞中に数個の胞子を蔵するものも見られる。いずれの供試株でも、胞子形成の初期においては、胞子囊中の胞子は比較的小型であるが、さらに1~2日以上培養した場合には種々の大きさの胞子が見られる。これを位相差顕微鏡で検鏡したときには、胞子囊中の屈折率が大きい成熟した大型胞子に見えるが、石炭酸フクソンで染色すると、濃染される胞子様細胞の存在比率が培養とともに増大する傾向が認められた。これらの観察から、形成した胞子は、成熟後に休眠するのではなく、培養期間中に次第に発芽段階へ進行するものと想像される(次章で詳述する)。

**b. 形成胞子の耐熱性:** ウェルシュ菌の胞子は耐熱性が普通低く<sup>7,60)</sup>、また耐熱株でさえも人為培養で形成した胞子は、必ずしも耐熱性を示さない<sup>4,7,32)</sup>ことが一般に知られている。また、赤真ら<sup>61)</sup>はウェルシュ菌培養菌液の耐熱性試験において、Angelotti らの SEC 培地<sup>36)</sup>よりもクックドミート培地で形成した胞子が耐熱性にすぐれることを報告している。この点に関連して、AGA 培地で形成した Hobbs 型標準株13株の胞子の耐熱性と、これら菌株のクックドミート培地で形成した胞子の耐熱性とを比較検討した。

AGA 培地 (Co<sup>2+</sup> 無添加) およびクックドミート培地、37°, 2日間培養液(加熱試料として0.5mlを採取)の100°, 15分間加熱に対する耐熱性を Table 3-7 に示した。すなわち、AGA 培地に形成した胞子の耐熱性は弱く不安定であって、耐熱性胞子の形成培地としては明らかにクックドミート培地に劣るようである。

Table 3-7. Comparison of Heat Resistances between Spores Produced in AGA Medium and Those in Cooked Meat Medium

Hobbs' standard strains*	Heat resistance (100°C, 15min)					
	Cooked meat medium			AGA medium		
8359 (Type 1)	+	-	-	-	+	+
8238 (Type 2)	+	+	+	+	+	+
8239 (Type 3)	+	+	+	-	-	-
8247 (Type 4)	-	-	+	-	-	-
8678 (Type 5)	-	-	+	-	-	-
8679 (Type 6)	+	-	-	-	+	-
8449 (Type 7)	-	+	+	-	-	-
8235 (Type 8)	+	+	+	-	-	+
8798 (Type 9)	+	+	+	-	-	+
8799 (Type 10)	+	+	+	+	+	+
9851 (Type 11)	+	+	+	+	+	-
10239 (Type 12)	+	+	+	-	-	-
10240 (Type 13)	-	-	+	-	-	-

+ heat-resistant; - heat-sensitive

Sporulation cultures: incubated at 37°C for 2 days

Spore suspension: 0.5 ml of the each sporulation culture was added into 5.0 ml of heart infusion broth (pH 7.0)

Heating: the spore suspension was heated in boiling water

Culture of heated suspension: 1% glucose was added into the spore suspension, and the suspension was incubated at 37°C in an anaerobic jar for 2 days

\*Distributed from Dr. Betty C. Hobbs: Central Public Health Laboratory, London

## 考 察

孢子形成用培地の作成を試みるまえに、供試株の一部について、Ellner 培地、SEC 培地、ハートインフュージョンブロスあるいはクックドミート培地などによる孢子形成を試験した。その結果、Hobbs 型標準株 5, 7 および 8 型株はクックドミート培地で多数の孢子を形成するが Ellner 培地では孢子形成が認められず、逆に A, W 635 は Ellner 培地で多数の孢子形成が認められハートインフュージョンブロスあるいはクックドミート培地では孢子形成が認められなかった。また B 406, P B 6 K は Ellner 培地、SEC 培地、ハートインフュージョンブロスあるいはクックドミート培地によっても孢子形成が認められなかった。このように孢子形成に対する培地の有効性が菌株によって相違した。AGACo 培地によった場合には、これらの供試株を含めたすべての供試菌 230 株に対し、共通に多数の孢子を形成させることができた。従って、AGACo 培地はウェルシュ菌の同定に必要な孢子形成試験培地として十分に応用性がある。

Hall ら<sup>47)</sup>は、ウェルシュ菌が Ellner 培地では SEC 培地よりも大型の孢子を形成する傾向にあることを報告し、また Schneider ら<sup>62)</sup>は *Cl. botulinum* を培地中に浸漬した透析袋中で培養すると、通常培養では認められない大型孢子の形成を、とくに長時間培養後に認めている。AGACo 培地においては、菌株にほとんど関係なく、小型から大型までの種々の大きさの孢子が観察されたが、正常型孢子は培養時間の経過とともに減少し、同時に染色性の孢子様細胞の増加が見られた。この現象は菌株に関係なく、Hobbs 型標準株を含めた供試菌一般について認められた。一方、次章で述べるように、LGA 培地を用いて Hobbs 型標準株 8238 について孢子を同調的に形成させた場合、孢子は休眠せずに形成段階から発芽段階へ速やかに移行した。また同標準株は耐熱性株であるにもかかわらず形成孢子のごく一部が耐熱性を示すにすぎなかった。これらのことから、おそらくウェルシュ菌の孢子は比較的活性化された状態に留まり、耐久型としての性質は一般的にかなり低いのではないかと想像される。

## 要 約

ウェルシュ菌の新孢子形成培地 (AGACo 培地) を作成し、ウェルシュ菌 230 株について新培地の適用性を確かめた。同時に形成孢子の性状について若干の検討を行なった。

1) Ellner 培地に対し次の改変、すなわち、酢酸アンモニウムと L-アスコルビン酸ナトリウムの添加、デンプンの代わりに 1% グリセリンの添加、リン酸塩濃度の減少およびコバルトイオンの添加を行ない新孢子形成培地 (AGACo 培地) を作成した。

2) AGACo 培地の使用によって、Hobbs 型標準株および毒素産生型に関係なく、すべての供試菌 230 株に対し 40~80% 以上の多数の孢子を形成させることができた。

3) しかし、AGACo 培地中に形成された孢子は、休眠状態を持続せず、その染色性の変化から、培養期間中に徐々に発芽段階へ進行すると想像された。また、AGA 培地による Hobbs 型標準株 (13 株) 孢子の耐熱性は弱く不安定であり、耐熱性孢子形成培地としては、クックドミート培地に劣るようであった。

## 第 4 章 Hobbs 型ウェルシュ菌の耐熱性

ウェルシュ菌は一般に孢子を形成しにくく<sup>44)</sup>、また孢子の耐熱性は A 型の耐熱性株 (Hobbs 型株) および F 型株を除けばきわめて弱い<sup>7)</sup>。

前章では、新孢子形成培地 (AGACo 培地) を作成し、非耐熱性株はもちろん耐熱性株でも、同培地中に形成された孢子は培養期間中に次第に発芽段階へ進むと想像した。

本章では、Hobbs 型株について耐熱性および非耐熱性孢子形成状態を観察し、耐熱性株であるにもかかわらず孢子の大多数が非耐熱性であり、ごく少数が耐熱性であるにすぎないことを知った。更に、その理由を解明するために孢子の休眠状態を形態学的に観察し、若干の知見を得た。また低温度培養、好氣的条件および塩濃度が、孢子の形成段階から発芽段階への移行におよぼす影響も試験したので、これらも合わせて記述する。

### 第1節 標準 Hobbs 型ウエルシュ菌の孢子形成培養における耐熱性および非耐熱性孢子形成

Hobbs 型標準株は耐熱性株であるけれども、耐熱性を示した培養液中の孢子の大部分が耐熱性を有するかどうかは疑問である。この点を明らかにするために、同標準株の孢子形成培養について、形態学的に孢子と認められるものの全数と耐熱性孢子数とを測定比較した。

#### 実験方法

##### 1. 供試菌株

Hobbs 博士から分与された Hobbs 型標準13菌株の中で耐熱性が最も強い菌株 8238 (2型) を供試した。

なお、一部の実験では、長崎大学熱帯医学研究所から分与された非 Hobbs 型株すなわち A 型 2 株 (PB6K, A), B 型 1 株 (B), C 型 1 株 (C) および D 型 1 株 (D) の各ウエルシュ菌も比較のために供試した。

##### 2. 孢子形成培地

AGA 培地、クックドミート培地<sup>59)</sup> および LGA 培地を孢子形成培地として使用した。LGA 培地については次節に詳述する。

##### 3. 孢子形成培養法

a. 前培養：クックドミート培地 37°、18~24 時間培養の底部肉カスの少量を、再び同培地に接種し、37° で 10 時間前培養した。

b. 孢子形成培養：孢子形成培地 30ml に上記前培養の底部肉カスの少量を接種し、37° で所定時間培養する。培養は特記しない限り、すべて嫌気ジャー(水素ガス充てん、Deoxo 使用) 中で行なった。なお、クックドミート培地は接種直前に沸騰水中に 15 分間浸漬後急冷したものを、また AGA および LGA 培地は同様に沸騰水中に 2 分間浸漬後急冷したものを使用した。

##### 4. 孢子耐熱性試験

AGA 培地 22 時間の培養液 1.0ml をハートインフュージョンブロス (pH 7.0, Difco 社製) 9.0ml に接種し、ただちに 80°, 20分; 90°, 10分および 100°, 10分間加熱後急冷する。これにろ過滅菌した乳糖および L-アスコルビン酸ナトリウム溶液を、最終濃度がそれぞれ 0.2% および 0.02% になるように添加する。37° で 48 時間嫌気培養後、細菌の生育が認められたものを耐熱性が陽性とした。

## 5. 全孢子数および生菌数の測定

**全孢子数**：生菌数に孢子形成率を乗じた値を全孢子数とした。孢子を位相差顕微鏡により形態学的に確認し、視野の全細胞に孢子が認められる場合を孢子形成率 100%とした。

**生菌数**：培養液 1.0ml を 1.0%ポリペプトン水 (pH 7.0) 9.0ml 入り試験管に加え、これに水素ガス 1.2 L を通気-置換した後密閉し、40回強く振とうする。これを原液とし、パラフィン重層希釈水で順次10倍に希釈混和 (ゴム帽つきピペットで静かに混和) し、混和法によって菌数測定平板を作った。37°, 48時間嫌気培養後、集落を計数し生菌数を算出する。希釈水および菌数測定培地の組成をつぎに示す。

**希釈水**：1.0%ポリペプトン水 (pH 7.0) を 8.9ml ずつ分注し、流動パラフィンを約 5 mm の厚さに重層後、121°, 15分間加圧滅菌する。使用直前に、ろ過滅菌した 10% L-アスコルビン酸ナトリウム溶液の 0.1ml を添加した。

**菌数測定培地**：0.2%乳糖加ハートインフュージョン寒天培地 (Difco 社製)。使用直前に、最終濃度が 0.1%になるように、L-アスコルビン酸ナトリウム溶液をろ過滅菌して添加した。

## 6. 耐熱性孢子数の測定

孢子形成培養液 1.0ml を 1.0%ポリペプトン水 (pH 7.0) 9.0ml 入り試験管に加え、80°, 90°あるいは100°で所定時間加熱後、45°~40°まで急冷する。これに水素ガス 1.2 L を通気-置換した後密閉し、40回強く振とうした。これを原液とし、生菌数と同じ方法で生残孢子数を測定した。

## 実験結果

### 1. Hobbs 型標準株 (8238) と非 Hobbs 型株との耐熱性の比較

ウェルシュ菌の孢子は耐熱性変異株を除けば一般に弱く、90°, 30分に耐えない<sup>7)</sup>といわれる。耐熱性は菌株によって相違するが、孢子形成培地<sup>47, 61)</sup>や懸濁培地<sup>63, 64)</sup>などによっても相違するので、AGA 培地 37°, 22時間培養について、標準株 (8238) と非 Hobbs 型株との耐熱性を同時に測定比較した。

供試 6 菌株 (8238, A, PB6K, B, C および D) は、すべて孢子形成率 50%以上であったにもかかわらず、100°, 10分間の加熱に耐えたものは標準株 (8238) のみであった。A, B および C の各菌株は 90°, 10分に、また D 株は 80°, 20分にしか耐えなかった。レンチナーゼ作用が特に強い PB6K は 80°, 20 分にも耐えなかった。Weiss ら<sup>65)</sup> あるいは Yamagishi ら<sup>66)</sup> はレンチナーゼ作用が強いほど耐熱性が弱いと報じている。

### 2. Hobbs 型標準株 (8238) における耐熱性孢子と非耐熱性孢子的形成

標準株 (8238) が AGA 培地で形成した孢子は 100°, 10分間の加熱に耐えたが、全孢子中にしめる耐熱性孢子的比率は明らかでない。

AGA, LGA およびクックドミート培地 22時間培養について、全孢子数と 80°, 20分; 90°, 10分および 100°, 10分間加熱後の生残孢子数とを測定比較した (Table 4-1)。すなわち 3 培地とも、孢子のごく一部が耐熱性を示すにすぎず、その大部分が非耐熱性であった。これは、ウェルシュ菌の場合 80°, 10分および 70°, 10分間の加熱に耐える細胞数は形態学的に測定した孢子よりも少ないという Nishida ら<sup>67)</sup>の報告や、同菌の Ellner 培地

Table 4-1. Formation of the Heat-Resistant and Heat-Sensitive Spores of *Cl. perfringens* Hobbs' Standard Strain 8238 (Type 2)

Media for sporulation	Log of numbers of surviving spores/ml			Total spores (Before heating)
	80°C 20 min	90°C 10 min	100°C 10 min	
AGA	2.8	1.6	1.3	7.6
LGA	2.8	—	—	7.4
Cooked meat	4.2	3.2	2.9	7.6

Data show mean of three estimations. Sporulation cultures: incubated at 37°C for 22 hours

形成胞子はごく一部しか 80°, 10分に耐えないという Canada ら<sup>68)</sup>の結果と同様である。

各加熱温度の場合とも、加熱後の生残胞子数は、クックドミートの方が AGA よりも多かった。このことは、AGA 培地が耐熱性胞子の形成培地としてはクックドミート培地に劣るという前章の結果を裏付けるものである。

## 第2節 標準 Hobbs 型ウェルシュ菌胞子の休眠

標準株8238は耐熱性株であるにもかかわらず胞子の大多数が非耐熱性 (80°, 20分) であったので、その理由を解明するために非耐熱性胞子の休眠状態を形態学的に観察した。

### 実験方法

#### 1. 供試菌株

Hobbs 型標準株 8238 (2型) を供試した。

#### 2. 胞子形成培地および培養法

胞子を同調的に形成させるために AGACo 培地に若干の改変を加えた LGA 培地を胞子形成培地として使用した。LGA 培地はつぎの a, b 液を混合して調製する。

##### LGA 培地の調製

**a 液:** ポリペプトン 10g, 酵母エキス 10g, グリセリン 5g, グルタミン酸 0.74g, オキニプロリン 0.66g, リン酸水素二ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 9.4g, リン酸二水素カリウム 0.87g, 硫酸マグネシウム ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 0.20g, 塩化コバルト ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 16mg, 塩化カルシウム 10mg, ラウリル硫酸ナトリウム (和光製品) 0.20g, 精製水 1000ml, pH 7.5 に調整後 30ml ずつを試験管 (2.3×15cm) に分注し、それぞれに肉カス 0.2g ずつを添加後、121°, 15分間加圧滅菌する。

**b 液:** L-アスコルビン酸ナトリウム 0.20g, チアミン塩酸塩 10mg, 精製水 10ml。

使用直前に a 液 30ml に対し b 液 0.3ml をろ過滅菌して添加する。

なお、胞子形成培養法は前節に記述した。

#### 3. 胞子の休眠状態の観察

LGA-胞子形成培養について、所定時間毎に染色標本を作り、胞子の非染色性の持続を休眠の指標として観察する。染色標本の作製法をつぎに示す。

**染色標本の作製:** 胞子形成培養液から遠心分離 (3,000 RPM, 5分間) した菌体を滅菌

生理食塩水で1回遠心洗浄後、常法にしたがって塗まつ標本を作り、5倍希釈 Ziehl の石炭酸フクシン液で15秒間染色後、水洗・乾燥する。

## 実験結果

### 1. 非耐熱性孢子形成から発芽への過程

a. 同調的孢子形成培養法の検討：AGACo およびクックドミート培地による孢子形成培養では、孢子形成あるいは発芽段階の細胞が混在し、休眠期間の測定が困難であったので、AGACo 培地を基にし、ラウリル硫酸ナトリウムの添加による同調的孢子形成培養法について検討した。

AGACo 培養では細胞がやや大形であったので、この傾向を除くために、グリセリン濃度の減少、酢酸アンモニウムに代わるグルタミン酸とオキシプロリンの添加、塩化カルシウムおよびチアミン塩酸塩の添加など培地組成を変更した。一方で著者は、卵黄加 CW 寒天平板培養において、レンチナーゼ抑制試験に使用する $\alpha$ 抗毒素血清(Wellcome Research Laboratories 社製)の塗布がウェルシュ菌の孢子形成を促進することを認め、またレンチナーゼ抑制作用を有するラウリル硫酸ナトリウム<sup>69)</sup>の添加が前者と同様に孢子形成に有効に作用することを見いだした。よって、前記の組成変更 AGACo を基本培地とし、ラウリル硫酸ナトリウムの添加量と孢子の同調的形成との関係を検討した結果、ラウリル硫酸ナトリウム 200ppm で標準株(8238)の孢子を同調的に形成させることに成功した。また肉カスは接種菌の生育と孢子形成を不変にするために必要であった。著者はこのような検討の結果、同調的孢子形成培地として実験方法2に示した LGA 培地を作成した。

b. LGA 培養における孢子の形成から発芽への過程とその進行速度：LGA 培養における標準株(8238)の孢子形成と発芽の過程を要約すると Fig. 4-1 のようである。すなわち、A段階では Forespore の形成を認めない好塩基性の栄養細胞であるが、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 段

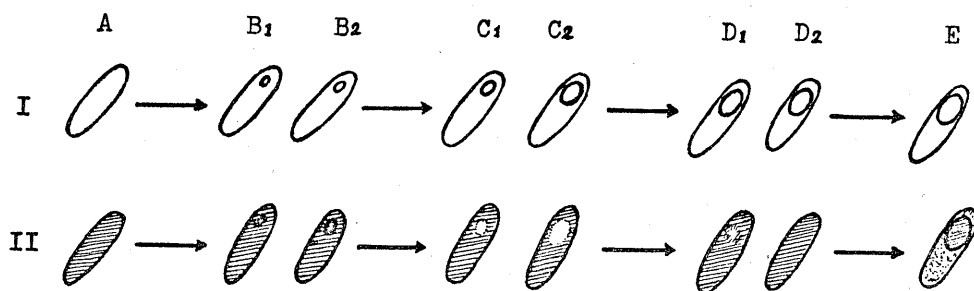


Fig. 4-1. Stages of the Formation-Process and Germination-Process of Heat-Sensitive Spores of *Cl. perfringens* Hobbs' Standard Strain 8238 (Type 2)

I: cells observed through phase-contrast optics. II: stained cells

A: vegetative cell, basophilic; forespore not obvious. B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>: small forespore eccentrically located, basophilic, encystment of forespore. C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>: refractile spores which resist staining with carbol-fuchsin; enlargement of spore. D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>: spore-like refractile cell within a mother cell; the spore-like cells (germinating cells) are becoming as basophilic as the mother cells. E: basophilic germinated cell (reduced refractivity) within a faintly-stained mother cell. Sporulation culture: LGA medium, at 37°C. Staining technique: Ziehl's carbol-fuchsin diluted fivefold, 15 sec

階になって偏心的位置に小さい Forespore の形成が見られる。これら Forespore は、B<sub>1</sub> 段階から B<sub>2</sub> 段階にかけて包被を形成するが、まだ易染色性である。つぎに、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub> 段階に進み、胞子は屈折率が増大し、5 倍希釈 Ziehl の石炭酸フクシンによって染色されないようになる。しかし、胞子は大きくなり続ける。D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub> 段階では、屈折率は大きく、位相差顕微鏡で観察するときは正常胞子と全く変らないが、すでに易染色性にかたむき、母細胞と同様に染色されるところの形態が胞子に似た発芽細胞となりつつある。その後、母細胞の染色性は低下し、うすく染色された母細胞中に濃染された発芽細胞が認められるようになる (E 段階)。なお、Ellner 培地によるウェルシュ菌の胞子形成過程に関する細胞学的観察は Smith ら<sup>70)</sup> および Hoeniger ら<sup>71)</sup> によって詳細になされている。

LGA 培養における、標準株 (8238) の胞子形成および発芽段階と培養時間との関係を Table 4-2 に示した。14 時間培養までは嫌気ジャー中で、それ以後はパラフィン重層法によって培養した。14 時間培養では Forespore を認めないが、16 時間培養ではすべての細胞が Forespore (B 段階) を形成し、18 時間培養で非染色性の胞子 (C 段階) となった。しかし、更に 2 時間後の 20 時間培養では、母細胞と同様に染色される胞子様発芽細胞 (D 段階) となった。

Table 4-2. Rapidity of the Formation and Germination of Heat-Sensitive Spores of *Cl. perfringens* 8238 in the LGA Culture

Incubation time (hr)	Stages*							
	A	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	E
14	100%	0	0	0	0	0	0	0
16	0	50	50	0	0	0	0	0
18	0	0	0	50	50	0	0	0
20	0	0	0	0	0	10	90	0
22	0	0	0	0	0	5	95	0

Incubation temperature : 37°C. Anaerobic conditions : anaerobic jar method (gas-replacement with hydrogen) for 14-hours incubation, paraffin cover method after 14-hours incubation

\*Stages of the formation-process and germination-process of spores in Fig. 4-1

胞子の非染色性の持続と成長の停止をもって休眠と見なすと、非染色性である C 段階の期間は長くても 2~4 時間以内にすぎず、しかも C<sub>1</sub> 段階になってから母細胞の径一杯になるまで成長することから、胞子は休眠せず形成段階から発芽段階へ連続的に移行すると考えられる。従って、C 段階の胞子でも 80°, 20 分間の加熱に耐えることができないのであろう。

## 2. 低温度培養、塩濃度および好気条件が非耐熱性胞子の形成段階から発芽段階への移行におよぼす影響

a. 胞子形成後の低温度 (3°) 培養の影響 : C 段階の胞子を形成した LGA 培養を 3° に移した場合には、24 時間後もなお C 段階にとどまり、37° で培養を続けた場合に比べて著しく遅く、48 時間後に初めて D 段階になった (Table 4-3)。この事実は、ウェルシュ菌胞子の低温度における生残率が、栄養細胞のそれよりも高いという Canada ら<sup>68)</sup> の結果



Table 4-3. Effect of a Low Temperature (3°C) on the Germination of Heat-Sensitive Spores of *Cl. perfringens* 8238 in the LGA Culture

Holding temp. (°C)	Holding time (hr)*		
	0	24	48
3	C	C	D
3	B <sub>1</sub>	D~E	
37	B <sub>1</sub> or C	D	

B<sub>1</sub>, C, D and E show the stages of the formation-process and germination-process of spores

\* Holding time at each temperature after sporulation

と関連していると考えられ、興味深い。

B<sub>1</sub>段階の Forespore を形成した LGA 培養を 3° に移した場合には、24時間後に D~E 段階にあり、C 段階胞子の 3° 放置の場合よりもその移行が速やかであった。これは 3° では胞子の形成過程は停止し、B<sub>1</sub> 段階の Forespore は成熟せずに、すなわち C 段階に達せずにそのまま発芽過程に進み、見掛け上速やかに D~E 段階に達したものと考えられる。

**b. 塩濃度および好気条件の影響：** ウェルシュ菌胞子の発芽は不適當な酸化還元電位で阻害され<sup>72)</sup>、高濃度の塩化ナトリウムは嫌気性菌 (PA 3679h) 胞子の完全発芽を妨害し<sup>73)</sup>、また胞子形成培地あるいは胞子懸濁液中のカルシウムイオン濃度は *Cl. botulinum* 胞子の耐熱性に影響する<sup>74)</sup>といわれる。

供試ウェルシュ菌 (8238) について、好気条件や、塩化ナトリウムあるいは塩化カルシウム溶液が、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 段階 (Forespore 形成) あるいは C 段階 (胞子形成) にある細胞 (滅菌生理食塩水で 2 回、各滅菌懸濁用溶液で 1 回洗浄) の胞子形成段階から発芽段階への移行におよぼす影響を試験した (Table 4-4)。

B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 形成段階の胞子は 37°、好気条件下で発芽段階へ移行しえたので、先ず同条件下で塩濃度の影響を試験した。塩化ナトリウムは高濃度 (10 および 5%) ほど形成過程を遅延させ、B<sub>2</sub> 段階細胞よりも B<sub>1</sub> 段階細胞に対し影響が特に大であった。しかし、C 段階胞子の発芽の遅延は、10% 塩化ナトリウムにおいてもほとんど認められなかった。なお、供試菌の生育は 3% 塩化ナトリウムで抑制され、6% 塩化ナトリウムで阻止された。

塩化カルシウムは、塩化ナトリウムと異なり、高濃度よりもむしろ低濃度 (0.95%) で形成および発芽過程を遅延させた。しかし、高濃度 (9.5%) では同調的に C 段階胞子が形成され、その後速やかに発芽した。

なお、10% 塩化ナトリウムおよび 9.5% 塩化カルシウム溶液における胞子の形成から発芽への移行は好気条件下よりも嫌気条件 (水素ガス置換, Deoxo 使用) 下で速やかであった。

以上のことから、非耐熱性胞子は低温度培養、好气的条件あるいは高濃度塩のもとでも発芽し、徐々に死滅してゆくものと考えられる。

Table 4-4. Effects of Sodium Chloride, Calcium Chloride and Aerobic Conditions on the Rapidity of Formation and Germination of Heat-Sensitive Spores of *Cl. perfringens* 8238

Solutions for suspending		Incubation time (days)						
		0	1	2	4	6	9	11
Distilled water, AE*		B <sub>1</sub>	D	E				
		B <sub>2</sub>	E	E				
NaCl	1% AE	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> 75% C 25%	D	E			
	5	B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub> 70% C 30%	C 40% D 60%	D~E		
	10	B <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C 50% D 50%	D~E		
10%,	AE	B <sub>2</sub>	C	C 50% D 50%	D	D~E		
	10	C	C 10% D 90%	D				
10%,	AN*	B <sub>2</sub>	C 20% D 80%	D	D	D~E		
CaCl <sub>2</sub>	0.95% AE	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> 80% C 20%	B <sub>2</sub> 60% C 40%	C	C 40% D 60%	D~E
	4.5	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>2</sub> 70% C 30%	C	D	D~E	
	9.5	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	C	D~E	D~E	D~E	
9.5%	AN	B <sub>1</sub>	D	D	D~E	D~E	D~E	

B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, C, D and E show the stages of the formation-process and germination-process of spores

\*AE: aerobic condition, AN: anaerobic condition (gas-replacement with hydrogen)

## 要 約

Hobbs 型ウェルシュ菌 8238 (2 型) の孢子について、耐熱性孢子数および全孢子数を測定比較し、同時に非耐熱性 (80°, 20分) 孢子の休眠状態を観察した。

1) AGACo, LGA およびクックドミート培地のいずれの培養でも、孢子の大多数は非耐熱性であり、ごく少数が耐熱性であった。

2) LGA 培地により同調的に培養した場合、非耐熱性孢子はほとんど休眠せず、形成段階から速やかに発芽段階へ移行した。

3) 非耐熱性孢子形成段階から発芽段階への移行は低温度 (3°) 培養、好氣的条件によって遅延された。高濃度 (10%) 塩化ナトリウムは形成過程を遅延させ、低濃度 (0.95%) 塩化カルシウムは形成および発芽過程を遅延させた。

## 第 5 章 生鮮魚貝類からのウェルシュ菌の検出および分離菌株の諸性質

### 第 1 節 魚貝類における A 型ウェルシュ菌の検出率と分離菌株の耐熱性

ウェルシュ菌による食中毒は主として A 型の耐熱性株による<sup>4,7)</sup> ので、本節では、生鮮魚貝類からの A 型ウェルシュ菌の検出と分離菌株の毒素産生型および耐熱性を検討した結

果を記述する。なお、分離菌株の Hobbs 型・型別については次節に記述する。

## 実験方法

### 1. 分離試料および試験期間

供試魚貝類は、長崎市内の4地域の小売店で購入し、入手後ただちに4～5°に置き、4時間以内にウェルシュ菌の分離に供試した。これら試料からのウェルシュ菌の分離は1966年6月から同年10月の間に行った。試験の全期間を通じて収集処理した試料は、魚類：29種（マアジ、カイワリ、マサバ、マルソウダ、トビウオ、サンマ、マイワシ、コノシロ、アカカマス、クロサギ、イサキ、クロダイ、イボダイ、インモチ、シロギス、クロイシモチ、カワハギ、ヒラメ、マガレイ、ヒメダイ、イトベラ、カサゴ、メバル、イトヨリ、カナガシラ、マダイ、キダイ、アカアマダイおよびキントキダイ）、イカ：1種（ケンサキイカ）、貝類：2種（クロアワビおよびアカマテガイ）および小エビ剥き身の193個体であった。これら試料の月別の供試個体数を Table 5-1 に示した。

Table 5-1. Numbers of Fishes Tested in Each Month

Samples	Jun.	Jul.	Aug.	Sept.	Oct.	Total
Fish	36	41	44	40	10	171
Squid	2	4	2	0	0	8
Shellfish	0	2	4	0	0	6
peeled shrimp	0	4	4	0	0	8
Total	38	51	54	40	10	193

### 2. ウェルシュ菌の増菌・分離培養法

LAS 培地を用いて増菌培養し、つぎに卵黄加CW寒天培地<sup>35)</sup>で分離培養する第2章-第2節の方法によってウェルシュ菌を純離した。なお、各試料の体表（皮膚）検体および消化管検体はそれぞれを加熱（80°，20分）処理と無加熱とに分けて供試した。

### 3. 分離菌株の性状試験

分離菌株がウェルシュ菌であるかどうかを同定するために必要な性状のみを試験した。試験方法は第2章-第2節に記述の通りである。

### 4. 分離ウェルシュ菌の毒素産生型の型別法

分離ウェルシュ菌の毒素産生型の決定は、マウスを用い、抗毒素血清による保護試験<sup>56, 57)</sup>によった。毒素液は Robertson のチヨップドミートブロス培地<sup>73)</sup>による37°，5時間培養の遠心上澄液をろ過滅菌したもの、およびこのろ液にトリプシン1.0%を加え、37°で1時間処理したものを使用した。毒素液（無処理ろ液あるいはトリプシン処理ろ液）の1.0mlに、A型-抗毒素血清（Wellcome Research Laboratories 社製）0.2mlと滅菌生理食塩水0.4mlとを加えて計1.6mlとし、30分間室温に放置後、この混液の0.3mlずつを各試験用マウス（体重12～15g）に静脈注射する。無処理ろ液接種群もトリプシン処理ろ液接種群も、試験マウス数は3匹ずつとし、注射後3日間観察する。注射処理によって

試験マウスが6匹とも死亡せず、また該当菌株が卵黄加CW寒天平板培養において $\alpha$ 毒素の産生を示した場合にA型と決定した。

### 5. 耐熱性試験法

分離ウェルシュ菌の耐熱性はクックドミート培地で培養した菌液について試験した。すなわち、クックドミート培地<sup>59)</sup>、37°、48時間培養の培養菌液0.5mlを、pH7.0に調整したハートインフュージョンブロス (Difco社製) 培地 5.0mlに接種 (接種から加熱直前まで5~10°に保持) し、ただちに100°で15分および60分間加熱した。加熱終了後、急冷した。つぎに細菌の生育を確実にかつ明確にするために、これにろ過滅菌したグルコースおよびL-アスコルビン酸ナトリウム溶液を、それぞれ最終濃度が1.0%および0.02%になるように添加した。37°で2日間培養後、細菌の生育が認められたものを耐熱性が陽性と判定した。なお、細菌の培養はすべて嫌気ジャー (水素ガス置換, Deoxo 使用) 中で行なった。

## 実験結果

### 1. 加熱および無加熱検体からのA型ウェルシュ菌の検出状況

魚貝類からのウェルシュ菌の分離は、80°、20分間加熱処理した検体と無加熱検体との両方について行なったが、加熱条件を80°、20分間とした理由はつぎの通りである。

わが国におけるウェルシュ菌食中毒は耐熱性株 (患者ふん便から100°、60分間の加熱に耐えて分離される) による。しかし、ふん便による直接汚染でない場合には、耐熱性株でもその孢子の前歴によって耐熱性が減弱している可能性が多い。したがって、高温長時間の耐熱性よりも孢子の有無に重点をおき、細菌培養における孢子の有無の判定<sup>44)</sup>に使用されている80°、20分間の加熱処理を採用した。一方、耐熱性株でも栄養細胞の状態では魚貝類を汚染している場合には、この加熱条件には耐えないので、このような汚染におけるウェルシュ菌の検出は無加熱検体によった。

また、魚貝類のウェルシュ菌による汚染の原因が体表にあるのか、消化管内にあるのかを知る目的から、体表 (皮膚) と消化管とを検体としてウェルシュ菌の検出を行なった。

6月から10月までの全試験期間中に、辺野喜の同定基準<sup>5)</sup> (BE基準) によった場合、

Table 5-2. Detection of *Cl. perfringens* Type A in Respective Specimen-Groups

Samples, Numbers	Numbers of isolated <i>Cl. perfringens</i> Type A*1						
	*2 Body-surface		Alimentary canal		Total		
	N	H	N	H	N	H	
Fish, 29 spp.	171	124	20	23	5	147	25
Squid	8	6	1	2	0	8	1
Shellfish	6	1	1	2	0	3	1
Peeled shrimp	8	8	5	—	—	8	5
Total	193	139	27	27	5	166	32

All the isolates were positive in sporulation tests with AGACo medium

\*1 An attempt was made to isolate one strain per one specimen. The isolates were identified by Benoki's criterion (see the footnote of Table 5-3), and were typed by means of a mouse protection test

\*2 N……unheated specimens, H……heated (80°C, 20 min) specimens

魚類171個体から 172菌株，イカ 8 個体から 9 菌株，貝類 6 個体から 4 菌株およびエビ剥き身 8 個体から13菌株，計 198菌株のウェルシュ菌が分離された (Table 5-2)。これら分離ウェルシュ菌は，加熱検体からよりも無加熱検体から，また消化管検体からよりも体表検体から数多く検出された。更に，これら分離ウェルシュ菌の毒素産生型を型別した結果，すべての菌株がA型に一致し，B～F型該当菌株は認められなかった。つぎに，これらA型ウェルシュ菌の魚貝類からの月別検出率を，無加熱検体と加熱検体とに分けて述べる。

#### a. 無加熱検体からのA型ウェルシュ菌の検出率

無加熱の体表および消化管検体からのA型ウェルシュ菌の月別検出率を Table 5-3 に示した。ウェルシュ菌の同定はBE基準に従ったが，比較のためにB基準 (Bergey<sup>42)</sup> の species 検索表の基準，ただしセルロース発酵と色素産生試験は省略)およびS基準(Strong<sup>41)</sup>の同定基準)によった場合も併記した。

Table 5-3. Detection Rate of *Cl. perfringens* Type A in Unheated Specimens in Each Month

Specimens	Criteria*1	Detection rate (%)				
		Jun.	Jul.	Aug.	Sept.	Oct.
Body-surface	BE	68	88	74	70	0
	B	60	80	70	63	0
	S	50	67	65	60	0
Alimentary canal	BE	16	18	15	15	0
	B	13	13	13	15	0
	S	13	13	8.7	15	0

\*1 BE……Beneki's criterion<sup>5)</sup> (aerobic growth: negative, Gram positive rods, non-motility, iron milk: stormy fermentation, lecithinase inhibition test with Type A serum: positive, indole production: negative, acid and gas from glucose, lactose and sucrose); B……the key in Bergey's manual<sup>42)</sup> to the species of genus *Clostridium*, but cellulose fermentation- and pigment production-tests were omitted; S……the criterion of Strong et al.<sup>41)</sup>

体表検体：6月から9月にわたって，かなり高率にウェルシュ菌が検出された。すなわち，検体からの検出率は7月において最も高く，BE，BおよびSの各基準によったとき，それぞれ88%，80%および67%であった。また，6月においても，BE，BおよびSの各基準によったとき，それぞれ68%，60%および50%の検出率であった。しかし，気温が急に低下した10月では，供試試料が少数ではあったが，ウェルシュ菌を検出し得なかった。

消化管検体：6月から9月までの検出率はBE，BおよびS基準によったとき，それぞれ18～15%，15～13%および15～8.7%であった。すなわち，消化管から各月ともにおおよそ同程度の率で検出されたが，体表に比べてその検出率は著しく低かった。10月には，体表検体と同様に，まったく検出されなかった。

#### b. 加熱検体からのA型ウェルシュ菌の検出率

加熱処理した体表および消化管検体から，A型ウェルシュ菌の検出状況を Table 5-4

に示した。6月から9月までの検出率は、BE基準によると、体表および消化管検体でそれぞれ29%以下、5.3%以下で、無加熱検体に比べて著しく低率であった。しかし、月別間の相対的な変動が、体表、消化管ともに、無加熱のときよりも大であると認められた。すなわち、7月の体表検体のように他の月に比べて高い検出率（BE基準によったとき29%）を示す場合や、9月の消化管検体のようにウェルシュ菌がまったく検出されない場合が見られた。

Table 5-4. Detection Rate of *Cl. perfringens* Type A in Heated (80°C, 20 min) Specimens in Each Month

Specimens	Criteria*1	Detection rate (%)				
		Jun.	Jul.	Aug.	Sept.	Oct.
Body surface	BE	2.6	29	11	13	0
	B	2.6	26	7.4	10	0
	S	0	9.8	3.7	7.5	0
Alimentary canal	BE	5.3	4.5	2.2	0	0
	B	2.6	2.2	2.2	0	0
	S	0	0	0	0	0

\*1 Signs are the same ones as described in Table 5-3

## 2. 分離ウェルシュ菌の耐熱性と各同定基準との関係

赤真ら<sup>61)</sup>はクックドミート培地を用いた孢子形成培養が、SEC培地<sup>36)</sup>による形成孢子よりも耐熱性が強いとした。また著者のAGACo培地による形成孢子の耐熱性はクックドミート培地を用いた孢子形成培養よりも弱く不安定であった。このために分離ウェルシュ菌の耐熱性を、クックドミート培地、37°、48時間培養菌液について試験した。

分離菌株の耐熱性の有無と各同定基準との関係を分離検体別に示すと Table 5-5 の通りである。無加熱検体の場合、BE基準に従って、体表から139菌株、消化管から27菌株、

Tadle 5-5. Relationships between Heat-Resistance of Isolated *Cl. perfringens* and Identification-Criteria, and between Heat-Resistance and Specimen-Groups

Specimens	Numbers of isolated <i>Cl. perfringens</i> *2						
	Heat-resistant			Heat-sensitive			
	*1 BE	B	S	BE	B	S	
Unheated	Body-surface	0(-)*3	0(-)	0(-)	139(100)	126(91)	111(80)
	Alimentary canal	0(-)	0(-)	0(-)	27(100)	25(93)	21(78)
	Total	0(-)	0(-)	0(-)	166(100)	151(91)	132(80)
Heated (80°C, 20 min)	Body-surface	14(100)	11(79)	3(21)	13(100)	11(85)	7(54)
	Alimentary canal	1(100)	1(100)	0(0)	4(100)	2(50)	0(0)
	Total	15(100)	12(80)	3(20)	17(100)	13(76)	7(41)

\*1 BE, B and S are the same ones as described in Table 5-3

\*2 All the isolates were positive in sporulation tests with AGACo medium

\*3 Parentheses show percentage of BE-, B- and S-strains in isolated strains

計166菌株を分離したが、これらはすべて100°、60分の加熱に耐えず、100°、15分にすら耐えなかった。BE基準株のうちBおよびS基準株のしめる比率は、体表と消化管の検体間には大差なく、両検体の平均値でそれぞれ91%と80%であった。加熱検体の場合、体表から14菌株、消化管から1菌株、計15菌株の耐熱性株(100°、60分)を分離し、また体表から13菌株、消化管から4菌株、計17菌株の非耐熱性株(100°、15分に耐えない)を分離した。すなわち分離菌株の約半数が耐熱性を有した。BE基準株のうちBおよびS基準株のしめる比率は、非耐熱性株のとき、体表、消化管の平均値がそれぞれ76%と41%であり、前述の無加熱検体からの分離菌株に比べるとS基準株の存在率が約1/2に低下している。耐熱性株では、BE基準株のうちB基準株のしめる比率は平均80%、S基準株のしめる比率は平均20%であり、非耐熱性株に比べてS基準株の存在率がさらに低かった。

上述のように、無加熱検体から分離したウェルシュ菌はすべて耐熱性を示さず、それらの多くがS基準株であった。しかし、加熱検体から分離した耐熱性株では、S基準に一致しないものがとくに高率に認められた。

## 第2節 魚貝類からの Hobbs 型ウェルシュ菌の検出とその型別

ウェルシュ菌による食中毒は主としてA型の耐熱性株に原因し<sup>4,7)</sup>、現在この耐熱性株はHobbsらによって1~17型の抗原型に分類され<sup>4,5,30)</sup>、そのうち1~13型は原因頻度の高いものとして一般視されている<sup>6)</sup>。

前節では、6~9月の食中毒多発期に、市販の魚貝類からA型ウェルシュ菌が高率に分離されることを明らかにしたので、本節では、これら分離ウェルシュ菌198株についてHobbs型(1~13型)の型別を行なった。その結果、32株のHobbs型菌を確認したので、それらの抗原型、耐熱性、検体におけるHobbs型菌株の月別検出状況、および分離ウェルシュ菌の耐熱性とHobbs型に対する一致率との関係などについて記述する。

## 実験方法

### 1. Hobbs 型の型別に供試した分離ウェルシュ菌

供試菌株は1966年6月から同年9月までの間に魚貝類から分離した198株で、いずれも辺野喜<sup>5)</sup>の同定基準によってウェルシュ菌と同定したA型株である。なお、供試菌株の耐熱性はクックドミート培地で培養した菌液を100°、15および60分加熱する前節の方法によって試験した。

### 2. Hobbs 型型別用の免疫血清の作成

免疫用抗原の作成には、Hobbs博士から分与されたつぎの13標準株を使用した。

No. 8359 (Type 1), No. 8238 (Type 2), No. 8239 (Type 3),  
No. 8247 (Type 4), No. 8678 (Type 5), No. 8679 (Type 6),  
No. 8449 (Type 7), No. 8235 (Type 8), No. 8798 (Type 9),  
No. 8799 (Type 10), No. 9851 (Type 11), No. 10239 (Type 12),  
No. 10240 (Type 13).

標準株を卵黄加 Todd 変法平板培地上に37°で嫌気培養(水素充てん, Deoxo 使用)後、スムーズ集落を釣菌し、チオグライコロート培地に接種した。18~24時間培養後、その0.1mlをTodd変法平板培地に塗布接種し、18~24時間嫌気培養した。つぎに、平板

上に生育した菌体を 0.4%ホルマリン加生理食塩水に懸濁させて遠心後、同液で2回洗浄した。最後に、この菌体を 5 mg/ml の濃度に再び同液に懸濁させ、5°に2日間放置後、免疫原として使用した。免疫原は使用期間を通じて5°に貯蔵する。この免疫抗原液の0.5, 1.0, 2.0, 3.0 および 4.0ml を、4日間隔で順次に、家兎(2~2.5kg)の耳静脈内に注射した。最後の静注から7日目に試験的に採血し、凝集素価が1,000倍以上のものは3日以内に頸動脈から全採血した。凝集素価が1,000倍未満のものは、さらに免疫抗原液4mlを静注し、7日目に全採血した。血清は常法によって採取し、56°, 30分加温して非動化後、1%チメロサルを1/100容混合し、-20°に凍結貯蔵した。この方法によって凝集素価が500~2,000倍の血清が得られた。なお、前記の Todd 変法培地<sup>7)</sup>の組成はつぎの通りである。

**Todd 変法培地組成：** エルリッヒ肉エキス 10g, ハートインフュージョンブイヨン (栄研製) 7.5g, 塩化ナトリウム 2.0g, 炭酸水素ナトリウム 2.0g, リン酸水素ニナトリウム ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 0.8g, ポリペプトン 10g, 酵母エキス 3.5g, グルコース 2.0g, 寒天 20g, 精製水 1000ml。

### 3. 分離ウェルシュ菌の凝集反応

i) **ためし凝集反応：** 各免疫血清は、0.02%チメロサル加生理食塩水で、凝集素価の1/100に希釈して使用した。凝集反應用抗原としては、Toddの変法培地で平板培養した菌体を生理食塩水に濃厚に懸濁させた生菌液および同菌液を100°, 60分加熱した死菌液を使用した。スライド上の血清希釈液1滴に、生菌液あるいは死菌液1白金耳を加えてかきまぜ、10秒以内にきわめて強く凝集が認められたものを陽性とした。

ii) **定量凝集反応：** 抗原としてはホルマリン死菌と加熱死菌とを用いた。ホルマリン死菌抗原としては、Todd変法培地で平板培養した菌体を0.4%ホルマリン加生理食塩水に1mg/mlの濃度に浮遊させて使用した。加熱死菌抗原としては、Toddの変法培地による平板培養菌体の懸濁液(5mg/ml生理食塩水)を100°, 60分加熱後、1mg/mlに希釈して使用した。

免疫血清を倍数希釈し、0.5mlずつの希釈液を2列にし、1列にはホルマリン死菌を、他の列には加熱死菌を、それぞれ0.5mlずつ混和した。37°で4時間作用させ、1夜冷蔵庫(5°)に放置後、凝集の有無を肉眼的に判定した。ホルマリンおよび加熱死菌の両方、あるいはいずれか一方が、免疫血清の凝集素価またはそれに近い価まで凝集したときに、その血清の抗原型を被検菌の抗原型とした<sup>5)</sup>。

## 実験結果

### 1. 分離ウェルシュ菌の Hobbs 型の型別および同型分離株の耐熱性

魚貝類から分離したウェルシュ菌198株について Hobbs 型(1~13型)の型別を行なった結果、32株(16%)が Hobbs の抗原型に一致した(Table 5-6)。すなわち4型8株、5および9型各7株、13型4株、2型2株、3, 6, 8および12型各1株が検出された。耐熱性株は4型4株、13型2株の計6株であったが、これらの型に一致した菌株でもその半数は非耐熱性であった。また、耐熱性株はすべて加熱検体から検出されたことは注目すべきである。

分離菌株はすべて辺野喜の基準<sup>5)</sup>(BE・ただしAGACo培地による孢子形成試験を補足)で同定したが、それらの生化学的性状を群別して表わす手段として、Bergey検索表<sup>42)</sup>



Table 5-6. Serological Types and Heat-Resistance of *Cl. perfringens* Hobbs' Type Strains Isolated from Fishes

Isolates	Hobbs' Types	Heat-resistance*1	Specimens*2	Agreement with criteria*3
853	2	--	s	BE, B, S
637	2	-	ac	BE, B, S
641	3	-	s	BE, B, S
632	4	-	s	BE, B, S
919	4	-	s	BE, B, S
758	4	-	hs	BE, BB
757	4	+	hs	BE, BB
761	4	+	hs	BE, B
764	4	+	hs	BE, BB
639	4	-	hac	BE
771	4	+	hac	BE, B
714	5	-	s	BE, B
715	5	-	s	BE, B
718	5	-	hs	BE, B, S
719	5	-	hs	BE, B, S
720	5	-	hs	BE, B
93	5	-	s	BE, B, S
94	5	-	s	BE, B, S
613	6	-	s	BE, B, S
69	8	-	s	BE, B, S
621	9	-	s	BE, B, S
710	9	-	s	BE, B, S
88	9	-	s	BE, B, S
820	9	-	s	BE, B, S
822	9	-	s	BE, B, S
96	9	-	s	BE, B, S
766	9	-	ac	BE, B, S
770	12	-	ac	BE, B, S
72	13	-	s	BE
725	13	-	s	BE, B, S
837	13	+	hs	BE
929	13	+	hs	BE

+ heat-resistant; - heat-sensitive

\*1 Resistance of cooked meat cultures (37°C, 48 hr) to heating at 100°C for 60 min

\*2 Specimens: s...body-surface, hs...body-surface heated at 80°C for 20 min, ac...alimentary canal, hac...alimentary canal heated at 80°C for 20 min

\*3 Criteria for identification with which each of the isolates was in agreement: BE...Beneki's criterion<sup>5)</sup> (aerobic growth...negative; Gram positive rods; non-motility; iron milk...stormy fermentation; lecithinase inhibition test with Type A serum...positive; no indole production; acid and gas from glucose, lactose and sucrose) which was supplemented with the sporulation test by using AGACo medium; B...Bergey's key<sup>42)</sup> to the species of genus *Clostridium*, but cellulose fermentation and pigment production-tests were omitted; S...the criterion of Strong et al.<sup>41)</sup>; BB...B-criterion which was supplemented with the fermentation tests of ten kinds of carbohydrate, the lecithinase test, the nitrate reduction test and the indole production test, described in Bergey's manual<sup>42)</sup>

(B. ただしセルロース発酵試験および色素産生試験を省略), Strong ら<sup>41)</sup>の基準(S) およびBに更に Bergey<sup>42)</sup> 記載の 10種類の糖分解試験, レシチナーゼ反応, 硝酸塩還元試験およびインドール産生試験を加えた基準(BB)による同定結果も付記した(Table 5-6)。BE・B・S該当株は全部の検出抗原型株中に見られ, とくに2, 3, 6, 8, 9 および12型ではすべてがBE・B・S該当株であった。しかし, 4, 5および13型では同一抗原型のうちに該当同定基準の組合わせが異なった菌株が存在した。

BE・B・S該当の20株はすべて非耐熱性であったが, Sに該当しない12株中の半数, すなわち, BE・Bあるいは, BE・BB該当中の4株(4型)およびBEのみ該当中の2株(13型)が耐熱性であった。このようにSに該当しない菌株中に耐熱性株が見られたが, この傾向は, 前節で述べたように, Hobbs 型株に限らず分離ウェルシュ菌全体として見た場合も同様であった。

## 2. 加熱および無加熱検体から分離したウェルシュ菌の Hobbs 型に対する一致率および耐熱性

加熱(80°, 20分)検体および無加熱検体から分離したウェルシュ菌の Hobbs 型(1~13型)に対する一致率を耐熱性株(100°, 60分)と非耐熱性株とに区別して示すと Table 5-7 のようである。

Table 5-7. Agreement of Antigenic Characters of Isolated *Cl. perfringens*\*2 with Hobbs' Serological Types, in Heated- and Unheated- Specimen Groups

Specimens	Agreement with Hobbs' Types		Average
	Heat-sensitive	Heat-resistant	
Unheated	13% (21/166)*1	0% (0/0)	13% (21/166)
Heated	29% (5/17)	40% (6/15)	34% (11/32)
Average	14% (26/183)	40% (6/15)	16% (32/198)

\*1 A numerator shows numbers of Hobbs' Type isolates, and a denominator shows numbers of all isolates

\*2 Isolates were identified as *Cl. perfringens* by Beneki's criterion

a. 無加熱検体の場合: 分離ウェルシュ菌166株はすべて非耐熱性であり, そのうちの13% (体表から18株, 消化管から3株, 計21株)がHobbs型株であった。この結果は, 無加熱検体から分離したウェルシュ菌(一般食品-58株, 食中毒時検体-64株)の大部分が非耐熱性であり, Hobbs型に対する一致率が13%であった清田ら<sup>77)</sup>の結果と同様である。

b. 加熱検体の場合: ウェルシュ菌の検出は少なく, 供試魚貝類193個体の体表と消化管検体から32株が分離されたにすぎなかった。しかし, 分離菌株のHobbs型に対する一致率は無加熱検体の13%に比べて平均34%(32株中の11株)と高く, 非耐熱性株では29%(17株中の5株)が, 耐熱性株では40%(15株中の6株)がそれぞれHobbs型株であった。すなわち, 検体を加熱処理することによって分離ウェルシュ菌のHobbs型に対する一致率が増加し, 少数ではあったが体表から5株, 消化管から1株, 計6株の耐熱性Hobbs型株

が選択的に分離された (Table 5-7 および 5-6)。この傾向は、健康人のふん便から Hobbs 型ウェルシュ菌を分離する場合、検体を加熱処理すると分離菌株の Hobbs 型に対する一致率が高まるという赤真ら<sup>6)</sup>の結果と同じである。

### 3. Hobbs 型ウェルシュ菌の検体数に対す月別の検出率

A型ウェルシュ菌が市販魚貝類から6～9月に高率に分離されることを前節で明らかにしたが、Hobbs型菌株の検体数に対する月別の検出率を示すと Table 5-8 の通りである。

すなわち、体表(皮膚)の無加熱検体では、6, 7, 8および9月に、それぞれ13% (5株), 9.8% (5株), 7.4% (4株) および10% (4株)の比率で、ほぼ平均してHobbs型株が検出された。これに比べて、体表の加熱検体では、7月に14% (7株)とやや高率にHobbs型株が検出されたけれども、6月には全く検出されず、また8および9月にそれぞれ1株ずつ(1.9 および 2.5%)が検出されたにすぎなかった。一方、消化管からは、Hobbs 型株の検出が少なく、無加熱検体では6月に1株(2.6%), 7月に2株(4.5%), 加熱検体では6および7月にそれぞれ1株ずつ(2.6および2.2%)が検出されたにすぎず、8および9月には加熱・無加熱の両検体ともその検出が見られなかった。なお、気温・水温の低下する10月には体表からも、消化管からも検出されなかった。

Table 5-8. Detection Rate of Hobbs' Type Strains in Fishes in Each Month

Specimens	Detection rate (%)			
	Pody-surface		Alimentary canal	
	Unheated	Heated (80°C, 20 min)	Unheated	Heated (80°C, 20min)
Months				
June	13 (5/38)*	0 (0/38)	2.6 (1/38)	2.6 (1/38)
July	9.8(5/51)	14 (7 <sup>a</sup> )/51)	4.5 (2/45)	2.2 (1 <sup>b</sup> )/45)
August	7.4(4/54)	1.9 (1 <sup>c</sup> )/54)	0 (0/46)	0 (0/46)
September	10 (4/40)	2.5 (1 <sup>d</sup> )/40)	0 (0/40)	0 (0/40)
October	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)	0 (0/10)
Jun.~Sept.	9.9(18/183)	4.9 (9/183)	1.8 (3/169)	1.2 (2/169)

\* Non-parenthesis shows detection rate (numbers of Hobbs' Type isolates x 100/numbers of specimens). Parenthesis: a numerator shows numbers Hobbs' type isolates, and a denominator shows numbers of specimens. Each specimen was subjected to isolating one strain of *Cl. perfringens*

a) 3 of 7 strains were Type 4 heat-resistant strains. The other strains were heat-sensitive. b) Type 4 heat-resistant strain. c) d) Type 13 heat-resistant strains (see the footnote of Table 5-6 with respect to heat-resistance)

### 第3節 魚貝類から分離したウェルシュ菌の耐熱性、抗原型とサリシン発酵能との関係

Bergey<sup>42)</sup>の同定基準では、ウェルシュ菌はサリシンをまれにしか発酵しないとしているが、魚貝類から分離したウェルシュ菌の中に比較的多数のサリシン発酵陽性株が検出されることを第2章-第2節で述べた。一方、食中毒を対象とした実用的な本菌の同定においては、わが国の食品に適用されている辺野喜<sup>5)</sup>の規準の場合はサリシン発酵試験を採用していないが、アメリカの食品に適用されている Strong ら<sup>41)</sup>の規準ではサリシン発酵陰性

株をウェルシュ菌としている。

本節で、分離ウェルシュ菌の耐熱性あるいは Hobbs 抗原型と、サリシン発酵能との関係を検討した結果、サリシン発酵陽性株が耐熱性分離株の大部分を占めること、また同発酵陽性株は Hobbs 型に一致する可能性が比較的大であることなどを確かめた。これらの結果を本節に記述する。

## 実験方法

### 1. 供試菌株

1966年6月から同年9月までの間に魚貝類から分離し、辺野喜の同定基準<sup>5)</sup>によってウェルシュ菌と同定したA型ウェルシュ菌198株、および Hobbs 博士から分与されたHobbs型標準13株(1~13型)を供試した。

### 2. 供試分離菌株の性状試験法

生化学的性状試験、耐熱性試験および Hobbs 型の型別法は第2章-第2節および第5章の第1あるいは第2節に記述した。供試分離菌株の生化学的性状試験は分離してから6~9か月の間に行なった。なお、サリシン発酵試験においてはサリシンは和光製特級品を使用した。

## 実験結果

### 1. Strong らの同定基準に一致しない魚貝類分離ウェルシュ菌の生化学的性質と耐熱性との関係について

魚貝類から辺野喜の同定基準に一致するウェルシュ菌198株を分離したが、そのうちの56株は Strong らの同定基準(S基準)に一致しないこと、および耐熱性分離株の大部分も同基準に一致しないことを第2章-第2節および第5章の第1並びに第2節で述べた。本項ではこれら分離菌株とくにS基準に一致しない菌株の生化学的諸性質と耐熱性との関係について検討した結果を記述する。

#### a. 生化学的性質とくにサリシン発酵能と耐熱性との関係

分離菌株をS基準株と非S基準株とに分け、S基準に一致しない生化学的性質と耐熱性との関係を Table 5-9 に示した。S基準に一致しない生化学的性質のなかで、サリシン発酵陽性が最も多く非S基準56株中の48株を占め、つぎにゼラチン液化陰性株が多くサリシン発酵陽性および陰性群中にそれぞれ7株ずつを占めている。一方、分離菌株の耐熱性(100°, 60分)と生化学的性質との関係を見ると、耐熱性分離菌15株のうちサリシン発酵陽性が最も多く11株を占めたのに対し、同発酵陰性は非S基準1株とS基準3株の計4株にすぎなかった。

Table 5-9. Relationship between the Heat Resistance and Some Biochemical Properties, Especially the Salicin Fermentability, of *Cl. perfringens* Isolated from Fishes

Groups of isolates	Salicin fermentation	Properties which were in disagreement with Strong's criterion	Numbers of isolates Heat-resistant*2/ All isolates
Disagreement with Strong's criterion	Positive*1	Nothing except salicin fermentation	7 / 37
		Gelatin liquefaction, negative	1 / 7
		Mannitol fermentation, positive	2 / 3
		$\beta$ -Hemolysis, negative (bovine blood agar)	1 / 1
		Total	11 / 48
	Negative	Gelatin liquefaction, negative	0 / 7
	$\beta$ -Hemolysis, negative (bovine blood agar)	1 / 1	
	Total	1 / 8	
	Total	12 / 56	
Agreement with Strong's criterion	Negative		3 / 142
Total			15 / 198*3

\*1 Acid or acid and gas from salicin, after incubation at 37°C for 3 days

\*2 Resistance of cooked meat cultures (37°C, 48 hr) to heating at 100°C for 60 min

\*3 Identified by Benoki's criterion

b. 加熱あるいは無加熱検体から分離した菌株中におけるサリシン発酵陽性株の検出率  
耐熱性株の大部分はサリシンを発酵した。しかし、サリシン発酵陽性群のうちには耐熱性を示さないものも多数存在した (Table 5-9)。

Table 5-10. Detection Rate of Salicin-Fermenters in the Isolates from Heated or Unheated Specimens

Groups of isolates	Detection rate, %				Total
	Salicin-fermenters		Salicin-unfermenters		
	Heat-resistant	Heat-sensitive	Heat-resistant	Heat-sensitive	
From heated specimens*	34 (11)	31 (10)	13 (4)	22 (7)	100 (32)
From unheated specimens	0 (0)	16 (27)	0 (0)	84 (139)	100 (166)

Parentheses show the numbers of the isolates

\* Heated at 80°C for 20 min

分離株を加熱 (80°, 20分) 検体分離株と無加熱検体分離株とに分け、それぞれについてサリシン発酵能と耐熱性を示すと Table 5-10 のようである。加熱検体分離株中ではサリシン発酵陽性株が 65% (32株中の 21株) の高率を占め、その半数が耐熱性 (100, 60分) であった。しかし無加熱検体分離株中では同発酵陽性株の検出は 16% (166株中の27株) の低率にすぎず、また耐熱性株も認められなかった。

## 2. ウェルシュ菌のサリシン発酵能と Hobbs 型との関係について

ウェルシュ菌食中毒はおもに耐熱性 A 型ウェルシュ菌 (Hobbs 型株) に原因する。一方、分離ウェルシュ菌はすべて A 型であり、そのうちの耐熱性分離株あるいは加熱検体からの分離株の多くがサリシン発酵陽性であったので、分離株のサリシン発酵能と Hobbs 型との関係について検討した。

### a. サリシン発酵陽性あるいは陰性株中における Hobbs 型株の検出率

サリシン発酵陽性株と陰性株とに分けて、分離株中における Hobbs 型株の検出率を示すと Table 5-11 のようである。サリシン発酵陽性株における Hobbs 型株の検出率は 25% (48株中の 12株) にすぎなかったが、同発酵陰性株における検出率 13% (150株中の 20株) に比べると高かった。なお、Hobbs 型に一致した 32株のうち 6 株が耐熱性を示したが、これらはすべてサリシン発酵陽性であった。

Table 5-11. Detection Rate of Hobbs' Type Strains in the Salicin-Fermenters or Salicin-Unfermenters

Groups of isolates	Detection rate, %				Total
	Hobbs' Type		Non-Hobbs' Type		
	Heat-resistant	Heat-sensitive	Heat-resistant	Heat-sensitive	
Salicin-fermenters	12.5 ( 6)	12.5 ( 6)	10 ( 5)	65 (31)	100 (48)
Salicin-unfermenters	0 ( 0)	13 (20)	3 ( 4)	84 (126)	100 (150)

Parentheses show the numbers of the isolates

### b. Hobbs の抗原型とサリシン発酵能との関係

分離ウェルシュ菌の一部はサリシンを発酵するが、その発酵力はグルコースに対するように強烈ではなく、酸の生成が明確であってもガス生成は微弱なものが比較的が多かった。従って、本項では前述のように酸の生成をもってサリシン発酵陽性とした。Hobbs の標準株はサリシンを発酵しない<sup>4)</sup>とされているが、試験法により相違することも考えられるので、標準13株 (1~13型) についても改めて試験した。

Hobbs の標準 13株のうち 7 株がサリシン発酵陽性であり (Table 5-12)、とくに耐熱性が強かった 8238 (2 型) は酸、ガスの生成がともに明確であった。また、分離 Hobbs 型株では 32株中の 12株がサリシン発酵陽性であり (Table 5-12)、しかも前述したようにそのうちの 6 株が耐熱性株であった (Table 5-11)。

Hobbs の各抗原型とサリシン発酵能との関係を Table 5-12 に示した。Hobbs 標準株と分離 Hobbs 型株とを合わせた全供試株について見ると、2, 3, 4, 5, 6, 9 およ

Table 5-12. Relationship between the Salicin-Fermentability and Each of the Serological Types of Hobbs' Type Strains

Groups of strains	Salicin fermentation	Numbers of strains												Total	
		Hobbs' Types													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Standard*	+	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	7
	-	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	6
Isolated	+	0	0	0	6	3	0	0	0	0	0	0	0	3	12
	-	0	2	1	2	4	1	0	1	7	0	0	1	1	20

\* Distributed from Dr. Betty C. Hobbs; Central Public Health Laboratory, London. Tested three times on the standard strains

び13型では同一抗原型株中にサリシン発酵陽性と陰性株が存在し、Hobbs の各抗原型とサリシン発酵能との間には関連性は認められなかった。

## 考 察

わが国のウェルシュ菌食中毒はA型の耐熱性株(Hobbs型株)によるといわれる。食中毒多発期に当たる6～9月にわたって魚貝類から多数のA型株が分離された。分離株の耐熱性は孢子の状態その他の試験条件によって影響されるけれども、加熱検体から分離した32株のうち、約半数の15株が耐熱性(100°, 60分)を示した。無加熱検体から分離した166株はすべて耐熱性を示さなかった。従って、加熱処理(80°, 20分)が耐熱性ウェルシュ菌の検出に重要な役割を果たすと考えられる。しかし、この事実が i) 耐熱性株による汚染(孢子および栄養細胞による汚染)が非耐熱性株による汚染に比べて著しく少ないことを意味するのか、ii) 耐熱性株および非耐熱性株による汚染の間に量的差はなく、これらウェルシュ菌による汚染がおもに孢子の形で行なわれており、ヒートショックを加えない場合にはとくに非耐熱性株の孢子が優先的に発芽し、逆に80°, 20分間の加熱処理を加えた場合には耐熱性株の孢子が選択的に発芽し、非耐熱性株の孢子の大部分が死滅することを意味するのか、iii) 耐熱性株の分離培地中での生育が非耐熱性株によって、著しく抑制されることを意味するのかは明らかでない。

加熱検体から分離したHobbs型11株のうち5株は非耐熱性であった(Table 5-6および5-7)。しかし、これら非耐熱性株でも80°, 20分間の加熱処理に耐えて分離されているので、ある程度の耐熱性を有していたものである。従って、これら分離Hobbs型株が、自然状態で食品を汚染した場合には、実際の調理・加工時の加熱処理に耐えて、その後、増殖する可能性がある。

7月から9月までの間に体表の加熱検体からHobbs型9株が分離され、そのうちの7株(耐熱性3株、非耐熱性4株)は7月に分離されている(Table 5-8)。このように、一定時期の、一定試料区分(7月の4試料区分中の2試料区分)の加熱検体から、耐熱性あるいは非耐熱性のHobbs型株が集中的に検出されたことは、高気温・天候などの影響のほか、汚染因子として上陸での特別の汚染源が存在したためであろう。この点に関して、山県ら<sup>78)</sup>は陸揚げ直後の魚体から耐熱性ウェルシュ菌が検出されなかった事実から、魚貝類のウェルシュ菌汚染は陸揚げしてから消費者に渡る間に行なわれると推定している。

A型株が6~9月にわたって魚貝類の体表-無加熱検体から高率(68~88%, BE基準による)に検出され、それらの一部はHobbs型に一致した。しかし、これら無加熱検体-分離株は、すべて孢子形成能をもつにもかかわらず、耐熱性試験では非耐熱性であった。Hobbsら<sup>4)</sup>は耐熱性株でも分離後の培養菌体は必ずしも耐熱性を示すとは限らないとしている。Hallら<sup>79)</sup>は、加熱処理(100°, 60分)食品からウェルシュ菌が全く検出されず、無加熱食品から分離したウェルシュ菌の0.8%が耐熱性を示すにすぎなかったことから、Cincinnatiにおける食中毒は食品が加熱調理後に非耐熱性株によって再汚染されて引き起こされるとしている。また最近Suttonら<sup>80)</sup>も比較的耐熱性の低いウェルシュ菌による食中毒事例を報告し、同様に加熱調理後の2次汚染によったものとしている。更にHauschildら<sup>81)</sup>は肉汁およびヒトの腸管内で耐熱性のない孢子を形成する菌株が、ヒトに食中毒徴候を起こさせ得ることを報告している。従って、魚貝類の体表-無加熱検体から、耐熱性は示さなかったけれども、A型株が高率に検出され、その一部がHobbs型に一致したことは食品衛生上から無視できないと考えられる。また、第6章で述べるように魚肉すり身、魚肉ねり製品あるいは魚肉乾製品からもA型株が多数検出され、その一部はHobbs型に一致した。

生鮮魚貝類の体表からA型ウェルシュ菌が夏期に高率に検出された。しかし、ウェルシュ菌は偏性嫌気性菌であるので、魚貝類が本菌によって汚染されても加熱処理を受けず鮮魚として取り扱われている間は、本菌が優先的に大量に増殖することは考えられない。一方、ウェルシュ菌投与による食中毒症状の発現には最少 $5 \times 10^8$ の菌量が必要といわれる<sup>82)</sup>。すなわち、生鮮魚貝類の生食による本菌食中毒の事例が見当たらないのはこのような理由によるのであろう。

消化管からのウェルシュ菌の検出率は18%以下(Table 5-3および5-4)にすぎなかった。中川ら<sup>32)</sup>は市販魚類の腸管材料を、直接に平板に塗布培養したとき、ウェルシュ菌が認められないとしている。これらのことから、ウェルシュ菌が魚貝類の腸管内に正常菌そうあるいは潜在菌そうとして常在するとは考え難い。しかし、コノシロの消化管では6試料中の5試料から、マルソウダの消化管では4試料中の4試料からウェルシュ菌が検出された。従って、ウェルシュ菌が海岸や河川の泥質中におそらく分布し、魚類の食性によっては消化管内に移行し、分布すると想像される。飯塚ら<sup>83)</sup>も冷凍タラの内臓からウェルシュ菌を分離し、分離菌株は魚類の生息環境に由来することを示唆している。なお、消化管から分離された32株(Table 5-2)のうち5株(耐熱性1株、非耐熱性4株)がHobbs型に一致した(Table 5-8)ことは注目される。

ウェルシュ菌の同定について、BE基準とS基準とを対照して見ると、魚貝類から分離したウェルシュ菌(BE基準に一致)のうち、無加熱検体-分離株の多くはS基準に一致したが、加熱検体-分離株、とくに耐熱性-分離株の多くはS基準に一致しなかった。従って、食中毒を対象にウェルシュ菌を検索する場合には、S基準では耐熱性株を見落とすおそれがある。

分離ウェルシュ菌の一部がS基準に一致しないおもな性質はサリシン発酵陽性とゼラチン液化陰性であった。また耐熱性分離株の大部分はサリシン発酵陽性であった(Table 5-9)。Nishidaら<sup>67)</sup>はふん便および土じょうから分離したウェルシュ菌について、分離時の加熱処理の程度が高いほどサリシン発酵陽性株の検出率が高くなり、またふん便の場合にはゼラチン液化陰性株の検出率も高くなるとしている。魚貝類を対象とした本研究で



も加熱検体分離株あるいは耐熱性株中にサリシン発酵陽性株が高率に検出されたが (Table 5-10), Nishida らの場合と同様に, 加熱処理がサリシン発酵陽性株の出現に選択的に作用したためと考えられる。魚貝類の加熱検体から分離した菌株中におけるゼラチン液化陰性株の検出率は16%にすぎず, サリシン発酵陽性株の検出率65%に比べてかなり低かった。Nishida らは土じょう分離の場合は, 加熱処理によりゼラチン液化陰性株の検出率が増加しないとしており, 魚貝類におけるウェルシュ菌の汚染源と土じょうとの関連も考えられ, 興味深い。しかし, Nishida らは一方で, ゼラチン液化陰性株でも微弱ではあるがゼラチン液化能を所有し, 菌株の保存(2年間)により標準生物型(ゼラチン液化陽性)にかかわるとしている。

魚貝類分離株中の約1/4はサリシン発酵陽性であった (Table 5-9)。また同発酵陽性株は陰性株よりも Hobbs型に対する一致率が高く, しかも耐熱性である傾向を示した (Table 5-10 および 5-11)。この事実から, 食中毒を対象として魚貝類から分離するウェルシュ菌の検査に当たっては, 非S基準株のうちサリシン発酵陽性株はとくに重視されねばならない。

## 要 約

食中毒多発期にあたる6~9月にわたって, 市販の生鮮魚貝類(体表および消化管)からウェルシュ菌の検出を試みた。更に, 分離菌株の毒素産生型, Hobbs型, 耐熱性, サリシン発酵能などの諸性質を試験し, つぎの結果を得た。

1) 魚貝類 193個体からウェルシュ菌 198株(辺野喜の基準)を分離した。分離菌株はすべてA型であった。体表の無加熱検体から6~9月にわたって高率(68~88%)にウェルシュ菌が検出されたが, 10月には検出されなかった。消化管からの検出は一部の魚種を除いて散発的であった。検体を加熱処理(80°, 20分)することによって, 検出率は低下したけれども, 耐熱性(100°, 60分)株が選択的に分離された。また加熱検体から分離した菌株, とくに耐熱性分離株の多くは Strong らの同定基準に一致しなかった。

2) 分離ウェルシュ菌 198株のうち, 32株(16%)が Hobbs型に一致し, Hobbsの2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12 および 13型-菌株が検出された。加熱検体から分離したウェルシュ菌は無加熱検体分離株に比べて Hobbs型に対する一致率が高く, また加熱検体から分離した Hobbs型11株のうち6株は耐熱性を所有した。無加熱検体から Hobbs型株が6~9月にわたって平均して検出された。しかし, 検出された Hobbs型21株はいずれも耐熱性を示さなかった。

3) 分離ウェルシュ菌 198株の約1/4(48株)がサリシン発酵陽性であった。耐熱性株では, 分離15株のうち11株がサリシン発酵陽性であった。また同発酵陽性株の検出率は加熱検体分離株中で高く(65%), 無加熱検体分離株中で低かった(16%)。サリシン発酵陽性分離株の Hobbs型に対する一致率は25%にすぎなかったが, 同発酵陰性分離株のそれ(13%)に比べると高かった。Hobbsの各抗原型とサリシン発酵能との関連は認められなかった。

## 第6章 魚肉加工食品からのウェルシュ菌の検出および同菌に起因する食中毒の予防

### 第1節 魚肉加工食品あるいは魚肉すり身からのA型ウェルシュ菌の検出

ウェルシュ菌による食中毒は、わが国では鳥獣肉の調理・加工食品のほかに、魚貝類の調理・加工食品による場合が比較的が多い。

前章では、魚肉調理・加工食品の主原料である生鮮魚貝類からA型ウェルシュ菌が夏期に高率に検出され、また Hobbs 型株も検出されることを記述した。本節では、各種魚肉ねり製品、魚肉乾製品および魚肉すり身からウェルシュ菌の検出を試み、分離菌株の毒素産生型並びに Hobbs 型の型別を行なったのでその結果を記述する。

### 実験方法

#### 1. 分離試料および試験期間

供試魚肉製品は長崎市内の小売店で購入し、入手後ただちに4～5°に置き、4時間以内にウェルシュ菌の分離に供試した。魚肉ねり製品および魚肉乾製品からのウェルシュ菌の分離は1969年7月に、魚肉すり身からの分離は同年の7月から10月にわたって行なった。収集処理した試料数は、揚げかまぼこ 42, ちくわ 26, 蒸しかまぼこ 19, ケーシングかまぼこ 20, 魚肉乾製品 26 および魚肉すり身 118 であった。

#### 2. ウェルシュ菌の増菌・分離培養法

LAS 培地を用いて増菌培養し、つぎに卵黄加CW寒天培地で分離培養する第2章-第2節の方法によってウェルシュ菌を純離した。なお、各試料は無菌的に細切した後、加熱(80°, 20分)処理と無加熱とに分けてそれぞれ4gずつをLAS培地40mlに接種した。

#### 3. 分離菌株の同定および性状試験法

分離菌株のウェルシュ菌としての同定は辺野喜の基準に従った。ただしAGACo培地による孢子形成試験を補足した。同定に必要な性状の試験法は第2章-第2節に記述した。

#### 4. 分離ウェルシュ菌の毒素産生型の型別法

分離ウェルシュ菌の毒素産生型の決定は第5章-第1節に述べた方法、すなわちマウスを用いた抗毒素血清による保護試験によった。

#### 5. 耐熱性試験

クックドミート培地で培養した菌液を100°, 15および60分加熱する第5章-第1節の方法を採用した。

#### 6. 分離ウェルシュ菌のHobbs型の型別法

a. 抗原：CW卵黄寒天培地平板培養菌を生理食塩水に浮遊させ、10mg/mlの濃厚菌液を作り抗原とした。

b. Hobbs 型型別用の免疫血清：Hobbs の1～13型免疫血清(東芝化学工業製)を使用した。

c. 凝集反応：混合血清Ⅰ(1～5型)、Ⅱ(6～9型)、Ⅲ(10～13型)の各1滴をスラ

イド上にとり、少量の抗原を加えてよく混合する。約 30秒後に明瞭な凝集が認められた場合その混合血清を構成する各型因子血清を用いて前と同じ要領で凝集反応を行なった。約 15秒以内に明瞭な凝集を認めた因子血清の番号を被検菌の Hobbs 型と決定した。被検菌は生理食塩水では凝集しないことを確認した。

混合血清 I, II, III のいずれでも凝集しないときは、抗原を 100°, 60分加熱し、再び同様に凝集反応を行なった<sup>6)</sup>。それでも凝集しないものは型別不能株とした。

## 実験結果

### 1. 魚肉ねり製品および魚肉乾製品からの A 型ウェルシュ菌の検出

7月に購入した魚肉ねり製品および魚肉乾製品の加熱(80°, 20分)および無加熱検体からの A 型ウェルシュ菌の検出率を Table 6-1 に示した。分離菌株はすべて A 型であった。

Table 6-1. Detection Rate of *Cl. perfringens* Type A in the Kamaboko (Fish Cake) Products and in the Dried Fish Products

Samples	Detection rate, %	
	Unheated specimens	Heated (80°C, 20 min) specimens
Kamaboko products		
Agekamaboko	26 (11/42)	17 (7*/42)
Chikuwa	27 (7/26)	3.8 (1/26)
Mushikamaboko Outer	11 (2/19)	11 (2/19)
Inner	11 (2/19)	0 (0/19)
Cased kamaboko	0 (0/20)	0 (0/20)
Dried fish products		
	27 (7/26)	31 (8*/26)

Parenthesis : a numerator shows numbers of Type A isolates, and a denominator shows numbers of specimens

\* One strain out of the isolates was heat-resistant (100°C, 60 min)

**無加熱検体**：揚げかまぼこ、ちくわおよび魚肉乾製品からそれぞれ26, 27および 27%の率で A 型株が検出されたが、ケーシングかまぼこでは全く検出されなかった。蒸しかまぼこの場合には内層と外層に分けて試験したが、両層ともに 11%の検出率であった。他方、善養寺<sup>84)</sup>は 3.1%、久保田<sup>85)</sup>は 26.9%の率で魚肉ねり製品からウェルシュ菌を検出している。

**加熱検体**：魚肉乾製品では、無加熱検体と同程度以上、すなわち 31%の率で A 型株が検出され注目される。揚げかまぼこおよび蒸しかまぼこ(外層)ではそれぞれ 17%および 11%の検出率であり、ちくわでは 3.8%の検出率にすぎなかった。なお耐熱性株(100°, 60分)は揚げかまぼこおよび魚肉乾製品からそれぞれ 1 株ずつ分離された。

### 2. 魚肉すり身における A 型ウェルシュ菌の検出状況

魚肉すり身の加熱(80°, 20分)および無加熱検体からの A 型ウェルシュ菌の月別の検出率を Table 6-2 に示した。分離菌株はすべて A 型であった。7~10月の検出率は無加熱検体で平均 42%、加熱検体で平均 5.1%であった。気温の低下が目立った 11月にはいずれからも検出されなかった。

Table 6-2. Detection Rate of *Cl. perfringens* Type A in Ground Fish Meat in Each Month

Specimens	Detection rate, %					
	Jul.	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Jul.~Oct.
Unheated	53 (16/30)	35 (14*1/40)	50 (15/30)	23 ( 5/18)	0 ( 0/10)	42 (50/118*2)
Heated (80°C, 20min)	3.3 ( 1/30)	5 ( 2*1/40)	6.7 ( 2/30)	5.6 ( 1/18)	0 ( 0/10)	5.1 ( 6/118*2)

Parenthesis : a numerator shows numbers of Type A isolates, and a denominator shows numbers of specimens

\*1 One strain out of the isolates was heat-resistant (100°C, 60 min)

\*2 Ground fish meat without vegetables : 98 specimens, ground fish meat with vegetables : 20 specimens, total : 118 specimens

Table 6-3. Detection Rate of *Cl. perfringens* Type A in the Ground Fish Meat with or without Vegetables

Samples	Detection rate, %	
	Unheated specimens	Heated (80°C, 20 min) specimens
Without vegetables	41 (40*/98)	6.1 ( 6*/98)
With vegetables	50 (10 /20)	0 ( 0 /20)
Average	42 (50/118)	5.1 ( 6/118)

Parenthesis : a numerator shows numbers of isolates, and a denominator shows numbers of specimens

\* One strain out of the isolates was heat-resistant (100°C, 60 min)

なお、魚肉すり身を野菜混入すり身と無混入すり身とに区分した場合、両者におけるA型ウェルシュ菌の検出率には大差はなかった (Table 6 - 3)。

### 3. 分離菌株の Hobbs 型の型別

魚肉ねり製品、魚肉乾製品および魚肉すり身からそれぞれ 32株、15株および 56株、計 103株のA型株を分離した。これら分離株について Hobbs型(1~13型)の型別を行なった結果、14株(14%)がHobbs型に一致した。すなわち、1型2株、2型4株、4型2株、5型3株、9、11 および 12型各1株が検出された (Table 6 - 4)。試料別に見ると魚肉ねり製品、魚肉すり身および魚肉乾製品のいずれからも Hobbs 型株が検出され、また各試料ともそれぞれ1株ずつ計3株が加熱(80°, 20分)検体から分離された。

Table 6-4. Serological Types of *Cl. perfringens* Hobbs' Type Strains Isolated from the Kamaboko Products, Ground Fish Meat and Dried Fish Products

Isolates	Hobbs' Types	Samples	Specimens
Kamaboko products			
12-am	1	Mushikamaboko	Unheated
10-dk	2	Agekamaboko	Heated*
24-bm	2	Agekamaboko	Unheated
14-im	2	Chikuwa	Unheated
10-dm	4	Agekamaboko	Unheated
24-am	5	Agekamaboko	Unheated
Ground fish meat			
26-hm	1		Unheated
20-om	2	〃	Unheated
25-cm	4	〃	Unheated
9-dm	5	〃	Unheated
28-ck	9	〃	Heated*
3-am	11	〃	Unheated
Dried fish products			
26-pk	5		Heated*
18-bm	12	〃	Unheated

\* Heated at 80°C for 20 min

## 第2節 ウェルシュ菌に起因する食中毒の予防

ウェルシュ菌食中毒は、おもにA型の病原性ウェルシュ菌、とくに Hobbs 型株耐熱性株によって起こり、加熱食品が原因食品となっている。本節では、ウェルシュ菌食中毒の予防方法の一助として、多数の Hobbs 型株に対する数種防腐剤の最小生育阻止濃度を測定した。更に魚肉ねり製品および魚肉ソーセージを対象に、接種ウェルシュ菌 (Hobbs 型株) の生育に対するフリルフラマイドの阻止効果および貯蔵温度の影響を検討した。

### 1. Hobbs 型ウェルシュ菌のフリルフラマイド、テトラサイクリンおよびタイロシンに対する感受性

現在わが国で許可されている食品防腐剤のうちでウェルシュ菌などの *Clostridium* 属細菌に有効なものは、フリルフラマイドのみにすぎないが、防腐剤に対する細菌の感受性は、同一種でも菌株によってかなり相違し、また試験培地によっても影響をうける。ウェルシュ菌の多数菌株を対象として防腐剤の効果について試験した例は見当たらないので、Hobbs 型 45 菌株 (標準 13 株と魚貝類分離 32 株) に対する効果を、フリルフラマイドのほかにテトラサイクリンとタイロシンについて比較試験した。また、グルコースと塩化ナトリウムがこれら防腐剤の阻止効果におよぼす影響をも試験した。

## 実験方法

### 1. 供試菌株

つぎの Hobbs 型ウェルシュ菌 45 菌株を供試した。

標準株：第5章-第2節に記述した Hobbs 型標準 13菌株 (1~13型)。

魚貝類分離株：著者らが魚貝類の体表と消化管から分離したもので、2型2株、3型1株、4型8株、5型7株、6型1株、8型1株、9型7株、12型1株、および13型4株の計32菌株。

## 2. 供試防腐剤

フリルフラマイド〔2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)-アクリル酸アミド〕  
(FF) ……上野製薬製

テトラサイクリン (TC) ……日本レダリー社製

タイロシン酒石酸塩 (TT) ……イーライ・リリー社製

上記の防腐剤は 100ppm 水溶液を調製しておき、必要濃度に応じて精製水で希釈し、ミリアポフィルター (0.3 $\mu$ ) でろ過滅菌して試験用培地に添加した。

## 3. 生育に対する最小阻止濃度の測定法

供試菌はクックドミート培地で 37 $^{\circ}$ 、24時間培養後、その底部肉かすの少量をハートインフュージョンブロス (Difco 社製) に接種し、37 $^{\circ}$ で24時間前培養した。この前培養液の 0.3ml ずつを、防腐剤を種々の濃度に添加した試験培地 10ml に接種した。各菌株に対する最小阻止濃度 Minimal Inhibitory Concentration (MIC) の決定は 37 $^{\circ}$  で 48 時間培養後に生育の有無を肉眼的に判定する方法によった。基本培地は、0.2%グルコース加ハートインフュージョンブロス (pH 7.0) をおもに使用したが、別に比較培養のために牛肉および魚肉 (サバ、インモチ) 浸出液も使用した。これら浸出液は、細切した牛肉あるいは魚肉に2倍量の精製水を加え、15分間煮沸後ろ過し、ろ液に精製水を加えて原容量にもどし、pH 7.0 に調整後、121 $^{\circ}$ 、15分間加圧滅菌して作製した。なお、供試菌の培養はすべて嫌気ジャー (水素ガス充てん、Deoxo 使用) で行なった。

## 実験結果

### 1. Hobbs 型標準株および魚貝類分離同型株の生育に対する、防腐剤の最小阻止濃度

#### a. 試験培地の検討

防腐剤の使用に際しては、食品組成が防腐剤の効果に影響することも考慮しておく必要がある。この点を検するため、牛肉浸出液、魚肉浸出液 (サバ…赤身魚肉、インモチ…白身魚肉) および 0.2%グルコース加ハートインフュージョンブロスを用いて、魚体表面から分離した菌株 919 (4型) について各防腐剤の MIC を測定比較した結果を Table 6-5 に示す。試験培地の相違による MIC の差は、FFおよびTCではまったく認められず、TTでもわずかに認められたにすぎなかった。従って、以後の実験では特記しない限り 0.2%グルコース加ハートインフュージョンブロスを用いて MIC を測定した。

Table 6-5. Comparison of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Furylfuramide, Tetracycline and Tylosin for the Growth of *Cl. perfringens* Hobbs' Type Strain\*1 in Four Test Media

Media (pH 7.0)	MIC*3 (ppm)		
	*4 FF	TC	TT
Heart infusion broth (Difco) with 0.2% glucose	7.5	0.25	0.50
Beef infusion	7.5	0.25	0.50
Fish infusion*2 A	7.5	0.25	0.50
B	7.5	0.25	0.25

\*1 The strain 919 isolated from fish was tested

\*2 A……red-muscled fish, mackerel. B……white-muscled fish, white croaker

\*3 Determined after being incubated at 37°C for 48 hours

\*4 FF……furylfuramide [2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide],  
TC……tetracycline, TT……tylosin tartarate

#### b. 標準株および魚貝類分離株の生育に対する、防腐剤の最小阻止濃度

Hobbs 型標準株および魚貝類分離同型株の生育に対する FF, TC および TT の MIC を Table 6-6 に示す。

FF について検討すると、標準株では 13 株中の約半数 (平均 6.7 株, 51%) の MIC が 0.5 ppm であり、その最高値は 5.0 ppm であった。しかし、分離株では MIC が幾分高く、MIC 2.5 ppm のものが最も多く 32 株中の 33% を占め、その最高値も 7.5 ppm であった。

FF の法定濃度におけるウェルシュ菌に対する生育阻止を MIC から検討すると、魚肉ねり製品に対する許可濃度 2.5 ppm では、標準株 13 株中平均 12 株、すなわち 92% が、分離株 32 株中平均 23.1 株、すなわち 72% がそれぞれ生育を阻止された。また食肉ハム・ソーセージに対する許可濃度 5.0 ppm では、全標準株および分離株の 94% がそれぞれ生育を阻止された。

魚肉すり身中に添加した FF は加熱処理によって相当失活するといわれる<sup>86)</sup>。魚肉ねり製品あるいは食肉ハム・ソーセージの加熱・製造においても FF がある程度失活するとすれば、許可濃度では、供試菌株によっては耐熱性胞子の発芽・増殖に対する FF の阻止効果は多くは期待できないとも考えられる。

魚肉ハム・ソーセージには、FF 20 ppm の添加が許可されており、また加熱処理による FF の失活は亜硝酸ナトリウムの添加によってかなり防止できる<sup>87)</sup>ので、魚肉ハム・ソーセージの場合には、製造後における FF の残存率を 50% 前後——少なくとも 30% 以上<sup>88)</sup>——としても、供試菌株に対する生育阻止効果は多く期待できるであろう。

TC については、標準株では過半数 (64%) の MIC が 0.10 ppm と低く、その最高値も 1.0 ppm にとどまるのに比べ、分離株では大多数 (74%) の MIC が 1.0 ppm で、その最高値も 2.5 ppm とかなり高かった。

また、TT の MIC も、標準株では大部分 (69%) が 0.25 あるいは 0.50 ppm であるのに比べ、分離株では大多数 (88%) が 0.50 あるいは 1.0 ppm と幾分高かった。

Table 6-6. MIC of FF, TC and TT for the Growth of *Cl. perfringens* Hobbs' Standard Strains and of *Cl. perfringens* Hobbs' Type Isolates from Fishes

Drugs	Groups of strains*1	MIC*2 (ppm)	Numbers of strains*3				
			Exp. I	Exp. II	Exp. III	Average	%
FF	Hobbs' standard	0.50	8	7	5	6.7	51
		1.0	1	2	6	3.0	23
		2.5	4	1	2	2.3	18
		5.0	0	3	0	1.0	8
		7.5	0	0	0	0	0
	Isolates from fishes	0.50	4	5	2	3.7	12
		1.0	8	8	10	8.7	27
		2.5	12	11	9	10.7	33
		5.0	7	5	9	7.0	22
		7.5	1	3	2	2.0	6
TC	Hobbs' standard	0.10	12	7	6	8.3	64
		1.0	1	6	7	4.7	36
		2.5	0	0	0	0	0
	Isolates from fishes	0.10	0	0	3	1.0	3
		1.0	20	25	26	23.7	74
		2.5	12	7	3	7.3	23
TT	Hobbs' standard	0.10	3	3	3	3.0	23
		0.25	4	4	6	4.7	36
		0.50	5	5	3	4.3	33
		1.0	1	1	1	1.0	8
	Isolates from fishes	0.10	1	0	1	0.7	2
		0.25	3	4	3	3.3	10
		0.50	15	15	12	14.0	44
		1.0	13	13	16	14.0	44

\*1 Strains used : Hobbs' standard—13 strains, and Hobbs' Type isolates from fishes—32 strains

\*2 Test medium : heart infusion broth with 0.2% glucose

\*3 Strains which were inhibited at a given minimal concentration



このように、FFの場合と同様に、TC、TTのMICが、標準株よりも分離株において高い傾向を示したことは注目すべきことである。なお、供試菌株の血清型とFF、TCおよびTTのMICとの間には関連性は認められなかった。

2. 塩化ナトリウムおよびグルコースの添加によるFF、TCおよびTTのMICの変化

食塩および糖類は調味料として繁用されるので、塩化ナトリウムあるいはグルコースの添加濃度が供試防腐剤のMICにおよぼす影響を試験した。

供試菌株はFFに抵抗性の強い魚体表面から分離した2菌株(822...9型, 919...4型), およびFFに抵抗性は弱いが耐熱性が強い標準株8238(2型)の3菌株とした。

a. 塩化ナトリウムの添加によるMICの減少

供試菌株の生育は3%塩化ナトリウム添加で抑制され、6%塩化ナトリウム添加で阻止

Table 6-7. Effect of Sodium Chloride Concentration on the Growth of *Cl. perfringens* Hobbs' Type Strains

Strains		NaCl %				
		0.5	1.5	3.0	4.5	6.0
Isolates from fishes	822 (Type 9)	*###	##	+	+	-
	919 (Type 4)	###	###	##	+	-
Hobbs' standard	8238 (Type 2)	##	##	+	±	-

\* Symbols : degree of growth after 48 hours at 37°C, ###=abundant, ##=moderate, +=scant, ±=trace, -=no growth. Basal medium : heart infusion broth with 0.2% glucose

Table 6-8. Changes in the MIC of FF, TC and TT for the Growth of *Cl. perfringens* Hobbs' Type Strains by Adding Sodium Chloride or Glucose

Drugs	Strains	MIC (ppm)					
		*1 Addition of NaCl			*2 Addition of glucose		
		0.5%	1.5%	3.0%	0%	0.2%	1.0%
FF	822	7.5	7.5	2.5	7.5	7.5	15.0
	919	7.5	5.0	2.5	7.5	7.5	7.5
	8238	1.0	≤0.50	≤0.50	1.0	1.0	2.5
TC	822	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	919	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	8238	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
TT	822	0.50	0.50	0.25	0.25	0.50	0.50
	919	0.50	0.50	0.25	0.25	0.50	0.50
	8238	0.50	0.50	0.25	0.25	0.50	0.50

Basal media : heart infusion broth.....\*1 with 0.2 % glucose, \*2 with 0.5 % NaCl

された (Table 6-7)。0.5, 1.5 あるいは 3.0% 塩化ナトリウムを添加した培地で供試防腐剤の MIC を測定した結果を Table 6-8 に示す。すなわち, 3.0% 塩化ナトリウム添加培地では対照培地 (0.5% 塩化ナトリウム添加) に比べて, FF と TT の MIC が 1/3~1/2 に減少したが, この MIC 減少は塩化ナトリウム濃度の増加により供試菌株の生育が抑制されるためであろう。しかし, TC の MIC は 3% 塩化ナトリウム添加によって変化しなかった。

#### b. グルコース添加による MIC の増加

グルコース添加培地および同無添加培地における供試防腐剤の MIC を Table 6-8 に示す。

TT の MIC は 0.2 および 1.0% グルコースの添加によって無添加の場合の 2 倍に増加した。これはグルコース添加により供試菌株の生育がおう盛になり, また生育の開始と共に培地の pH が低下し TT の抗菌力が弱くなる<sup>89)</sup>ためであろう。

FF の MIC は, 供試 3 菌株のうち 2 菌株 (822 と 8238) では, 1.0% グルコースの添加によって 2~2.5 倍に増加した。この理由はグルコースの添加で生育がおう盛になり, また供試菌株が FF を分解する<sup>90)</sup>ためとも考えられる。他の 1 菌株 (919) ではグルコース添加による MIC の増加は認められなかった。

TC の MIC はグルコース添加によってまったく変化しなかった。この傾向は, 試験培地の相違による MIC の差が, クロルテトラサイクリンでは FF やタイロシン乳酸塩に比べて小さいという河端らの報告<sup>90)</sup>と一致する。

### II. 魚肉ねり製品あるいは魚肉ソーセージに接種した Hobbs 型標準株の生育に対する, フリルフラマイドの阻止効果および貯蔵温度の影響

I では多数の Hobbs 型株について生育に対するフリルフラマイド (FF) の最小阻止濃度を測定した。本項では Hobbs 型標準株を実際にケーシングかまぼこ, 魚肉ソーセージあるいは揚げかまぼこに製造あるいは調理時に接種し, 貯蔵中における接種菌の生育に対する FF の阻止効果, および貯蔵温度の影響を試験した。

#### 実験方法

##### 1. 接種用ウェルシュ菌懸濁液の調製

第 5 章-第 2 節に記述した Hobbs 型標準 13 株 (1~13 型) のうちで耐熱性の最も強い菌株 8238 (2 型) を供試した。同菌株のクックドミート 48 時間培養液 1 L から遠心分離した菌体を滅菌 1% 可溶性デンプン溶液 10ml に懸濁させた。この濃厚菌液を凍結乾燥後密封して 5° に貯蔵し, 必要に応じ滅菌水 10ml を加え再度懸濁させて使用した。

##### 2. フリルフラマイド (FF) の添加法

FF (上野製薬製) を 0.4% 濃度にジメチルホルムアミドに溶解し, これを所定の濃度に試料に添加混合した。

##### 3. 試験用ケーシングかまぼこおよび魚肉ソーセージの製造

i) ケーシングかまぼこ: 長崎市内の某かまぼこ店から入手したすり身にショ糖 1.0% を添加混合した。これに 1 kg 当たり 10ml の接種用ウェルシュ菌懸濁液を添加混合し, 次に

FFを所定濃度に加え再度混合した。折径 3.5cm の塩化ビニリデンフィルムに充てんし、75° の湯浴中に 50分間浸漬加熱後、水道水で急冷した。なお、試験かまぼこの基本組成を示すと Table 6-9 のようである。

ii) 魚肉ソーセージ：試験魚肉ソーセージの基本組成は Table 6-9 のようである。アジのひき肉に所定濃度の塩化ナトリウム、L-アスコルビン酸ナトリウムおよび亜硝酸ナトリウムを添加混合後、5～10°に24時間放置塩漬した。つぎにデンプン、ラード、ショ糖およびくん液を所定量添加混合した。これに1kg 当たり 10ml の接種用ウェルシュ菌懸濁液を添加混合後、FFを所定の濃度に加え再度混合した。折径 3.5cm の塩化ビニリデンフィルムに充てんし、80°の湯浴中に 50分間浸漬加熱後、水道水で急冷した。

Table 6-9. Composition of Cased Kamaboko and Fish Sausage

Ingredients	Cased kamaboko	Fish sausage
Minced fish meat (horse mackerel)	—%	84%
Ground fish meat (frozen alaska pollack)	45	—
(lizard fish)	15	—
(white croaker)	7.5	—
(bigeyed tuna)	7.5	—
Egg albumen	13	—
Sodium chloride	3.0	2.0
Sodium ascorbate	—	0.03
Sodium nitrite	—	0.02
Starch	6.5	6.4
Sucrose	1.0	1.3
Sodium glutamate	1.5	—
Lard	—	6.0
Pyroligneous liquor (for liquid smoke)	—	0.25

#### 4. ウェルシュ菌数の測定法

試料 4g に希釈水 16ml を加え 2,000 RPM, 5 分間ホモゲナイズした。これを原液として10倍希釈し、各希釈段階につき 3 本ずつの LAS 培地に接種した。嫌気ジャー（水素ガス充てん、Deoxo 使用）中で 46°, 48時間培養後に、ガスを産生し培地を黒変したものをウェルシュ菌陽性とした。菌数の算定は最確数表によった。なお、希釈水の組成を次に示す。

希釈水：1.0%ポリペプトン水 (pH 7.0, 121° 15分加圧滅菌) 8.9ml にろ過滅菌した10% L-アスコルビン酸ナトリウム溶液 0.1ml を使用直前に添加した。

## 実験結果

## 1. ケーシングかまぼこに接種した Hobbs 型標準株の生育に対する FF の阻止効果および貯蔵温度の影響

Hobbs 型標準株 8238 を接種して製造した FF 添加ケーシングかまぼこを 5°, 20° および 30° に放置し, 所定の日数ごとにウェルシュ菌の生菌数を測定した結果を Table 6-10 に示す。FF 2.5, 5 および 20ppm 添加の場合は, 30° では6日あるいは13日後に, 20° では13日後にガスの発生を認めたが, ウェルシュ菌数の増加は5° の場合と同様に認められなかった。FF 無添加の場合は, 30° では2日後にガスが発生し,  $1.2 \times 10^7/g$  以上のウェルシュ菌数となった。20° でも8日後にはガスが発生し,  $1.3 \times 10^5/g$  のウェルシュ菌数を示した。5° ではウェルシュ菌数の増加はないが24日後でも同菌が残存した。

Table 6-10. Inhibitory Effect of FF and Influence of Storage Temperatures on Growth of Hobbs' Standard Strain 8238 Inoculated into Cased Kamaboko\*3

Storage temp. (°C)	FF conc. (ppm)	Viable count of <i>Cl. perfringens</i> /g					
		Storage days					
		0	2	6	8	13	24
5	0	$1.2 \times 10^2$	$1.2 \times 10$	$2.1 \times 10$	$1.2 \times 10$	1>	$1.2 \times 10$
	2.5	$1.2 \times 10$	1>	1>	3.6	1>	1>
	5	1>	1>	1>	1>	1>	1>
	20	1>	1>	1>	1>	1>	1>
20	0	—	4.5	$2.1 \times 10^3$	$1.3 \times 10^5*1$	$3.6 \times 10^2$	—
	2.5	—	1>	1>	1>	1>*1	—
	5	—	1>	1>	1>	1>*1	—
	20	—	1>	1>	1>	1>*1	—
30	0	—	$1.2 \times 10^7*1$	$2.5 \times 10^5$	—	$4.6 \times 10^2$	—
	2.5	—	1>	1>*1	—	—	—
	5	—	1>	1>*1	—	—	—
	20	—	1>	1>	1>	1>*1	—
30	0(ct*2)	1>	1>	1>*1	—	—	—

\*1 Gas production was observed

\*2 Uninoculated with the strain 8238

\*3 Process: immersed for 55 min at 75°C in a hot bath

## 2. 魚肉ソーセージに接種した Hobbs 型標準株の生育に対する FF の阻止効果および貯蔵温度の影響

Hobbs 型標準株 8238 を接種して製造した FF 添加魚肉ソーセージを 5°, 20° および 30° に放置し, 所定の日数ごとにウェルシュ菌の生菌数を測定した結果を Table 6-11 に示した。FF 20 ppm 添加の場合は各貯蔵温度で27日間放置してもウェルシュ菌数の増加もガス発生も認められなかった。FF 無添加の場合は 30°, 2日後にガスが発生し  $1.2 \times 10^7/g$  以上のウェルシュ菌数となった。20° では27日後にガス発生を認めたがウェルシュ菌数の増加は5° の場合と同様に認められなかった。

Table 6-11. Inhibitory Effect of FF and Influence of Storage Temperatures on Growth of Hobbs' Standard Strain 8238 Inoculated into Fish Sausage\*3

Storage temp. (°C)	FF conc. (ppm)	Viable count of <i>Cl. perfringens</i> /g					
		0	2	Storage days			
				6	10	16	27
5	0	4.6	1>	1>	2.1	4.5	4.5
	20	1>	1>	1>	1>	1>	1>
20	0	—	4.6	1>	1.8	1>	4.5*1
	20	—	1>	1>	1>	1>	1>
30	0	—	1.2×10 <sup>7</sup> *1	—	4.4×10 <sup>3</sup>	—	—
	20	—	1>	1>	1>	1>	1>
30	0(ct*2)	1>	1>	1>*1	—	—	—

\*1 Gas production was observed

\*2 Uninoculated with the strain 8238

\*3 Process : immersed for 55 min at 80°C in a hot bath

3. 揚げかまぼこに2次的に接種した Hobbs 型標準株の生育に対する貯蔵温度の影響

揚げかまぼこ(厚さ1.2cm)を2cm四方に切り、これらを2組に分けた。1組はHobbs型標準株8238を懸濁させた生理食塩水(滅菌生理食塩水1Lに接種用ウエルシュ菌懸濁液10mlを添加)中で10分間煮沸加熱してから滅菌シャーレに1片ずつ採取した。他の1組は

Table 6-12. Influence of Storage Temperatures on Growth of Hobbs' Standard Strain 8238 Inoculated Secondarily into Agekamaboko

Storage temp. (°C)	Groups*2 of samples	Viable count of <i>Cl. perfringens</i> /g					
		0	1	Storage days			
				2	3	4	6
5	a	4.5	—	1>	—	1>	1>
	b	1>	—	1>	—	1>	1>
20	a	—	—	4.5	—	1>	1>*1
	b	—	—	1>	—	1>	1>*1
30	a	—	>1.2×10 <sup>7</sup>	6.0×10 <sup>5</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>	—*1	—
	b	—	>1.2×10 <sup>7</sup>	5.5×10 <sup>6</sup>	>1.2×10 <sup>7</sup>	—*1	—
	ct	1>	1>	1>	—	1>*1	—

\*1 Slimy growth of microorganisms was observed on the out-side of the samples

\*2 a : Inoculated with the strain 8238 before cooking (boiled for 10 min)

b : Inoculated with the strain after the cooking

ct : Uninoculated with the strain

滅菌生理食塩水中で 10分間煮沸加熱した後、滅菌シャーレに同様に採取し、ウェルシュ菌懸濁生理食塩水 1 滴を滴下接種した。一部は菌を接種せず対照とした。これらの試料を 5°、20° および 30° に放置し、所定日数ごとにウェルシュ菌の生菌数を測定した結果を Table 6-12 に示した。煮沸前接種も煮沸後接種とほとんど同じ結果であった。すなわち、30° では 1 日後に  $1.2 \times 10^7/g$  以上のウェルシュ菌数に達した。これはウェルシュ菌の生育に必要な嫌気度が比較的ゆるやか<sup>6)</sup>であり、30°では特別に嫌氣的に処理しなくても、揚げかまぼこ切片の底部あるいは亀裂部分などでは、同菌の生育に必要な嫌气的条件が容易に得られるためであろう。20°では 6 日後にネトの発生を見たがウェルシュ菌数の増加は 5°の場合と同様に認められなかった。

## 考 察

魚肉すり身、魚肉ねり製品および魚肉乾製品から、無加熱検体のときそれぞれ平均 42%、27%以下および 29%の率で、また、加熱 (80°, 20分) 検体のときそれぞれ平均 5.1%、17%以下および 31%の率で A 型ウェルシュ菌が検出され、分離 103 株のうち 14 株 (14%) が Hobbs 型に一致した。また、前章で述べたように、生鮮魚貝類からも A 型ウェルシュ菌が高率に検出され、分離 198 株のうち 32 株 (16%) が Hobbs 型に一致した。一方、1965~1969 年の統計<sup>91-95)</sup>によると、わが国での食中毒発生件数のうち 36.1~46.4% は原因物質が不明である。更に、本菌による食中毒の検査術式は繁雑で、まだこの検査室でも行なえるほど一般化していない<sup>6)</sup> こと、また本菌による食中毒は一般に軽く届け出されない場合も考えられる<sup>96)</sup> ことなどを合わせ考えると、本菌による食中毒はわが国においてももっと多いと考えられる。

Hobbs 型標準株 8238 を接種して製造したケーシングかまぼこおよび魚肉ソーセージの場合、30°、2 日の貯蔵で  $1.2 \times 10^7/g$  以上のウェルシュ菌数に達した。また、揚げかまぼこに調理 (煮沸) 前あるいは後に 2 次的に標準株 8238 を接種した場合、揚げかまぼこを 1 片ずつ嫌氣的処理を行わずに放置したときでさえも、20°ではウェルシュ菌の生育は認められなかったが、30°においては 1 日後に  $1.2 \times 10^7/g$  以上のウェルシュ菌数に達した。他方、ウェルシュ菌を調理・加工直前に接種した鳥獣肉調理・加工食品の場合も、接種ウェルシュ菌が 23~37°では急速に、12~15°では除々に増殖することが報告<sup>97-99)</sup>されている。従って、本菌による食中毒を防止するためには調理・加工後は速やかに冷却して 10°以下に冷蔵するか、60°以上の温度で熱蔵するかして本菌の増殖を阻止する必要がある。標準株 8238 を接種したケーシングかまぼこあるいは魚肉ソーセージを 5°に貯蔵した場合、24 日あるいは 27 日後においても接種ウェルシュ菌は生残した。従って、一旦冷蔵したものでも室温に長く放置しないように注意する必要がある。なお、食品中でウェルシュ菌が増殖しても一般に耐熱性はなく、耐熱性があっても第 4 章で明らかにしたように耐熱性胞子はごく少数しか存在しない。従って、摂取直前に再度加熱処理すれば本菌による食中毒の予防に役立つであろう。

ケーシングかまぼこおよび魚肉ソーセージに F F をそれぞれの許可濃度、すなわち 2.5 ppm および 20 ppm ずつ添加した場合、接種ウェルシュ菌 (標準株 8238) は 30°においてもその生育を阻止された。しかし、魚貝類分離 Hobbs 型株の中には、耐熱性は示さなかったけれども、F F の MIC が 7.5 ppm の菌株も存在したので、かまぼこにおける許可濃度、すなわち 2.5 ppm の F F 添加では本食中毒に対する十分な予防効果は期待できないと考え

られる。従って、調理・加工時あるいはその前後におけるウェルシュ菌による汚染の防止にも留意せねばならない。

## 要 約

魚肉ねり製品、魚肉乾製品および魚肉すり身からウェルシュ菌の検出を試み、分離菌株の毒素産生型ならびに Hbbs型（1～13型）の型別を行なった。他方、多数の Hobbs 型株に対するフリルフラマイド（FF）、テトラサイクリン（TC）およびタイロシン（TT）の最小生育阻止濃度（MIC）を測定した。同時に魚肉ねり製品および魚肉ソーセージを対象に接種菌（Hobbs 型株）の生育に対する FF の阻止効果あるいは貯蔵温度の影響を試験した。

1) 揚げかまぼこ、ちくわおよび蒸しかまぼこ（7月）からウェルシュ菌の検出率は無加熱検体のとき 11～27%、加熱（80°、20分）検体のとき 3.8～17%であった。魚肉乾製品（7月）の場合は無加熱検体で 27%、加熱検体で 31%であった。魚肉すり身（7～10月）の場合は無加熱検体で平均 42%、加熱検体で平均 5.1%であった。分離ウェルシュ菌 103株（辺野喜の基準）はすべて A 型であった。そのうち 14株（14%）が Hobbs 型に一致し、1, 2, 4, 5, 9, 11 および 12 型-菌株が検出された。

2) Hobbs 型標準株（13株）および魚貝類分離 Hobbs 型株（32株）の生育に対する FF, TC および TT の MIC はそれぞれ 7.5 ppm 以下、2.5 ppm 以下および 1.0 ppm 以下であった。これら防腐剤の MIC は標準株よりも魚貝類分離株において高い傾向が認められた。FF および TT の MIC は 3% 塩化ナトリウム添加で減少したが、0.2 あるいは 1.0% グルコース添加では菌株によって増加した。TC の MIC はこれら添加物によって変化しなかった。

3) Hobbs 型標準株 8238 を接種してケーシングかまぼこおよび魚肉ソーセージを製造した場合、FF 無添加ケーシングかまぼこでは 30°、2 日で  $1.2 \times 10^7/g$  以上、20°、8 日で  $1.3 \times 10^5/g$  のウェルシュ菌数に達した。5° 貯蔵ではウェルシュ菌数の増加はないが 24 日後も生残した。FF 無添加魚肉ソーセージの場合も 30°、2 日で  $1.2 \times 10^7/g$  以上のウェルシュ菌数に達した。FF 2.5 ppm 以上添加ケーシングかまぼこおよび FF 20 ppm 添加魚肉ソーセージは 30° においても接種菌の生育を許さなかった。標準株 8238 を揚げかまぼこに調理（煮沸）前あるいは後に 2 次的に接種してから、揚げかまぼこをシャーレに 1 片ずつ採取し嫌氣的処理を行わずに放置した場合、30° では 1 日後に  $1.2 \times 10^7/g$  以上のウェルシュ菌数に達した。5° および 20° では接種菌の生育は認められなかった。

## 第 7 章 水産食品に対するウェルシュ菌の新検査方式

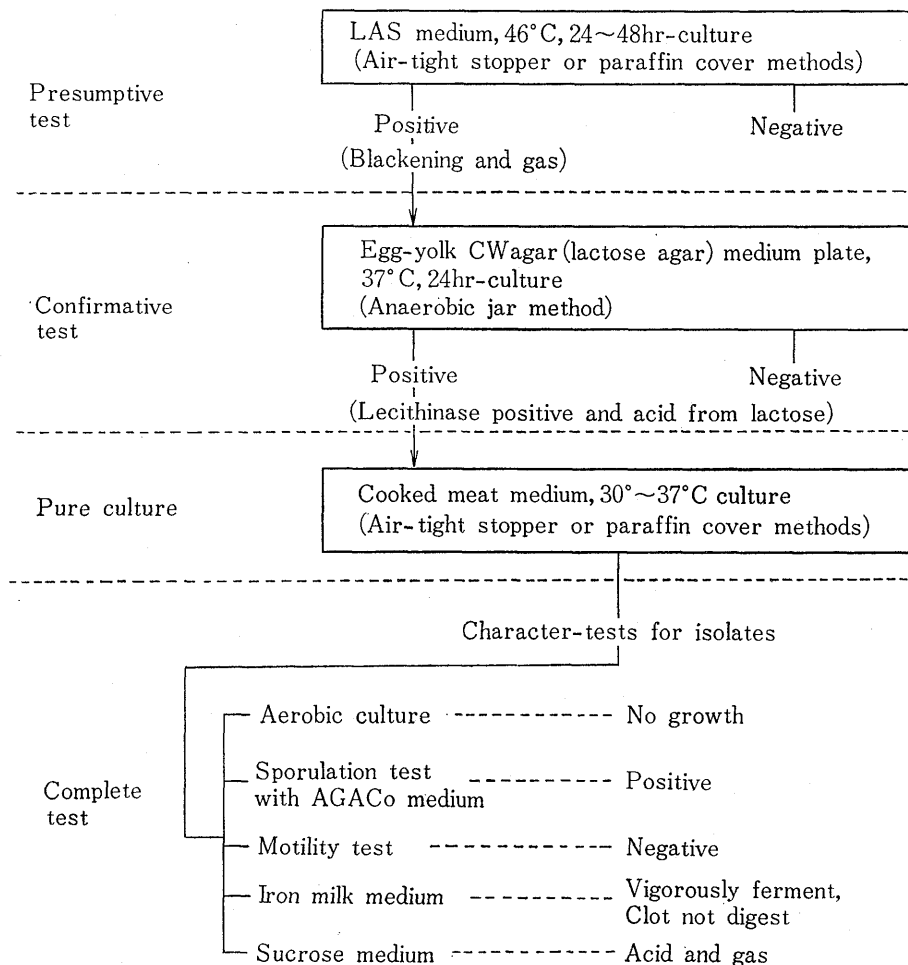
第 2 章および第 6 章において、LAS 培地を用いて魚貝類および魚肉加工食品からウェルシュ菌の検出を試みた。その場合、レンチナーゼ陽性の乳糖から酸を産生する菌株がすべての LAS 陽性培養から分離された。また、これら分離細菌 327 株の中で 301 株（92%）が BE 基準に一致した。BE 基準に一致しなかった 26 株は、鉄ミルク培地試験あるいはショ糖分解試験のみが BE 基準に相違し、他の試験事項はすべて BE 基準に一致した（Table 7-1）。これらの結果から、LAS 培地（46° 培養）を使用した場合の水産食品のウェルシュ菌の検査法として Fig. 7-1 に示した新検査方式が提案される。すなわち、LAS 陽性培養をもってウェルシュ菌の推定試験陽性とし、LAS 陽性培養から卵黄加 CW 寒天平板培

Table 7-1. Agreement of Egg Yolk-CW Agar Positive\*2 Strains Isolated from LAS-Positive Cultures with Benoki's Criterion

Groups of isolates	Properties which were in disagreement with Benoki's Criterion	Numbres of isolates		
		Groups of specimens Fishes	Processed fish products	Total
Disagreement with Benoki's Criterion	Iron milk (Stormy fermentation), negative	10	10	26*1(8%)
	Sucrose fermentation, negative	8	1	
	Total	15*1	11	
Agreement with Benoki's Criterion		198	103	301 (92%)

\*1 Three strains out of 15 or 26 strains were Iron-milk negative, and also were sucrose-fermentation negative

\*2 Isolated from every one of LAS-positive cultures

Fig. 7-1. A Scheme for Detection of *Cl. perfringens* in Sea-Foods by Using the LAS Medium



地を用いて乳糖分解性のレンチナーゼ陽性株が分離されれば確定試験陽性とする。その分離株が分類学的にウェルシュ菌同定の基本事項であるところの偏性嫌気性、胞子形成陽性（AGACo 培地使用）および非運動性の3条件を満足し、更に鉄ミルク培地試験およびショ糖分解試験において陽性であれば、ウェルシュ菌が完全に確認された（完全試験陽性）と判定する。なお、ウェルシュ菌の生菌数測定<sup>37,100</sup>に際し、LAS 陽性をウェルシュ菌の推定試験陽性とし、最確数で算定すれば、LAS 培地（46° 培養）によるウェルシュ菌の定量的測定も十分に可能である。

## 要 約

LAS 培地を用いて、魚貝類および魚肉加工食品から分離した菌株の辺野喜の基準に対する一致性を検討した。その結果、Fig. 7-1 に示したところの LAS 培地の使用による水産食品におけるウェルシュ菌の新検査方式を提案した。

## 第8章 総 括

ウェルシュ菌は、ヒトや動物の腸管内に常在し、また下水や土じょう中にも分布するので、本菌による食品の汚染も広い範囲に及ぶと考えられる。ウェルシュ菌による食中毒は病原性ウェルシュ菌、主としてA型の耐熱性株（Hobbs 型株）に原因するとされている。本菌による食中毒は、英国などではおもに食肉の調理・加工食品がその原因食品になっているが、わが国では魚貝類の調理・加工食品が原因食品の約半数を占めている。魚肉の調理・加工食品の主原料である生鮮魚貝類からのウェルシュ菌の検出は中川らおよび善養寺によってなされているにすぎない。また、分離ウェルシュ菌の毒素産生型、Hobbs 型およびその他の特性についてはほとんど明らかにされていない。従って、本論文では、1966年6月から同年の10月にわたって生鮮魚貝類からウェルシュ菌の検出を試み、本菌による汚染状況を明らかにした。同時に、分離菌株について毒素産生型および Hobbs型を型別し、更に分離菌株の耐熱性および生化学的諸性質についても試験検討した。研究に当たっては先ずウェルシュ菌の増菌・鑑別新培地を作成してウェルシュ菌の検出を容易かつ確実にする一方、胞子形成のための新培地の作成によって分離菌株のウェルシュ菌としての同定を容易かつ確実にした。また、Hobbs 型株における耐熱性および非耐熱性胞子の形成を明らかにし、更に胞子を同調的に形成させて、胞子の休眠状態を観察した。他方、魚肉加工食品および魚肉すり身からウェルシュ菌の検出も行なった。また、多数の Hobbs 型株について、フリルフラマイド（FF）、テトラサイクリン（TC）およびタイロシン（TT）の最小生育阻止濃度（MIC）を測定した。更に、魚肉ねり製品および魚肉ソーセージを対象に接種ウェルシュ菌（Hobbs 型株）の生育に対するFFの阻止効果および貯蔵温度の影響も試験した。以下にその概要を記述する。

1) ウェルシュ菌を選択的に増菌培養するために、同菌定量用のトリプトン・亜硫酸塩・ネオマイシン培地（TSN 寒天培地）に対し、次の改変、すなわち乳糖と L-アスコルビン酸ナトリウムの添加および寒天濃度の減少を行ない、新增菌・鑑別培地（LAS 培地）を作成した。LAS 培地はウェルシュ菌の増菌と同時に鑑別にも適し、TSN 寒天培地による鑑別よりもすぐれていた。魚貝類の体表あるいは消化管検体を接種し、増菌培養して得た213例の LAS 陽性（ウェルシュ菌鑑別-陽性）培養からウェルシュ菌が分離確認された比率は、辺野喜、Bergey（検索表）および Strong らの各同定基準によった場合、それぞれ

93%, 83%, 67%の高率であった。またウェルシュ菌に対する LAS 培養の選択性は、辺野喜の基準によったときには、加熱検体の場合も無加熱検体の場合とほぼ同様であった。

2) 孢子形成のために、Ellner 培地に対し次の改変, すなわち酢酸アンモニウムと L-アスコルビン酸ナトリウムの添加, デンプンの代わりに1%グリセリンの添加, 磷酸塩濃度の減少およびコバルトイオンの添加を行ない, 新孢子形成培地 (AGACo 培地) を作成した。AGACo 培地の使用によって, Hobbs 型標準株および毒素産生型に関係なく, すべての供試菌 230株に対して孢子を形成させ, 各供試菌の孢子形成率は 40~80%以上であった。しかし, AGACo 培地によって形成された孢子は, 休眠状態を持続せず, その染色性の変化から, 培養期間中に徐々に発芽段階へ進行するものと想像された。また, AGA 培地で形成された Hobbs 型標準株 (13株) 孢子の耐熱性は弱く不安定であり, 耐熱性孢子形成培地としては, クックドミート培地に劣るようであった。

3) Hobbs 型ウェルシュ菌 8238 (2型) は耐熱性株であるにもかかわらず AGA, LGA およびクックドミート培地のいずれの培養でも, 形成された孢子の大多数は非耐熱性 (80°, 20分) であり, ごく少数が耐熱性であるにすぎなかった。その理由を明らかにするため, 種々検討し, AGACo 培地を改変して作成した LGA 培地により同調的に培養した場合, 非耐熱性孢子はほとんど休眠せず, 形成段階から速やかに発芽段階へ移行した。非耐熱性孢子の形成段階から発芽段階への移行は低温度 (3°) 培養, 好气的条件によって遅延された。高濃度 (10%) 塩化ナトリウムは形成過程を遅延させ, 低濃度 (0.95%) 塩化カルシウムは形成および発芽過程を遅延させた。なお, Hobbs 型株を含めたウェルシュ菌一般の孢子を AGACo 培養を用いて観察した前述の結果と合わせ考えて, おそらくウェルシュ菌の孢子は比較的活性化された状態に留まり, 耐久型としての性質は一般にかなり低いのではないかと想像された。

4) 魚貝類から分離したウェルシュ菌198株 (辺野喜の基準) はすべてA型であった。体表の無加熱検体から6~9月にわたって高率 (68~88%) にウェルシュ菌が検出されたが, 気温・水温が低下する10月には検出されなかった。消化管からの検出は一部の魚種を除いて散発的であった。検体を加熱処理 (80°, 20分) することによって検出率は低下したが, 耐熱性 (100°, 60分) 株が選択的に分離された。また, 加熱検体から分離した菌株, とくに耐熱性分離株の多くは Strong らの基準 (S基準) に一致しなかった。

分離ウェルシュ菌198株のうち, 32株 (16%) が Hobbs 型に一致し, Hobbs の 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12 および 13型-菌株が検出された。加熱検体から分離された Hobbs 型株では, 11株中の6株が耐熱性を示した。このように耐熱性の Hobbs 型株が検出されたことは注目すべきである。無加熱検体から Hobbs 型株が低率ではあるけれども6~9月にわたって検出された。しかし, 検出された Hobbs 型 21株はいずれも耐熱性を示さなかった。他方, 耐熱性株でも分離後の培養菌体は必ずしも耐熱性を示すとは限らないといわれ, また, 最近是非耐熱性株による調理加熱後の2次汚染に起因する食中毒も報告されているので, 無加熱検体に関する上記の事実は食品衛生上から無視できない。

分離ウェルシュ菌198株の約1/4 (48株) がサリシン発酵陽性であった。耐熱性株では分離15株のうち11株がサリシン発酵陽性であった。また, 同発酵陽性株の検出率は加熱検体分離株中で65%で比較的高かった。しかし, 無加熱検体分離株中では16%にすぎなかった。サリシン発酵陽性分離株の Hobbs 型に対する一致率は25%にすぎなかったけれども, 同発酵陰性分離株のそれ (13%) に比べると高かった。すなわち, サリシン発酵陽性株は陰

性株よりも Hobbs型に対する一致率が高く、しかも耐熱性である傾向を示した。一方、S基準ではサリシンの発酵は陰性と規定されている。従って、食中毒を対象とする魚貝類におけるウェルシュ菌の検査に当たっては、S基準による同定は不相当であり、また、非S基準株のうちサリシン発酵陽性株は特に重視されねばならないと考えられる。なお、Hobbsの各抗原型とサリシン発酵能との関連は認められなかった。

5) 揚げかまぼこ、ちくわおよび蒸しかまぼこ(7月)からのウェルシュ菌の検出率は、無加熱検体のとき11~27%、加熱(80°, 20分)検体のとき3.8~17%であった。魚肉乾製品(7月)の場合は無加熱検体で27%、加熱検体で31%であった。魚肉すり身(7~10月)の場合は無加熱検体で平均42%、加熱検体で平均5.1%であった。分離ウェルシュ菌103株(辺野喜の基準)はすべてA型であった。そのうち14株(14%)がHobbs型に一致し、1, 2, 4, 5, 9, 11および12型-菌株が検出された。

Hobbs型標準株(13株)および魚貝類から分離されたHobbs型株(32株)の生育に対するFF, TCおよびTTのMICは、それぞれ7.5 ppm以下、2.5 ppm以下および1.0 ppm以下であった。これら防腐剤のMICは標準株よりも魚貝類からの分離株において高い傾向が認められた。FFの法定濃度との関係を検討すると、魚肉ねり製品に対する許可濃度2.5 ppmでは標準株の92%、分離株の72%がそれぞれ生育を阻止された。食肉ハム・ソーセージに対する許可濃度5.0 ppmでは全標準株および分離株の94%が生育を阻止された。魚肉ハム・ソーセージには20 ppmの添加が許可されており、製造後におけるFFの残存率を50%前後——少なくとも30%以上としても、供試した菌株に対する生育阻止効果は期待できるであろう。なお、FFおよびTTのMICは3%塩化ナトリウム添加で減少したが、0.2あるいは1.0%グルコース添加では菌株によっては増加した。TCのMICはこれら添加物によって影響されなかった。

Hobbs型標準株8238を接種してケーシングかまぼこおよび魚肉ソーセージを製造した場合、製造後も耐熱性胞子は生残した。FF無添加ケーシングかまぼこでは30°, 2日の貯蔵で $1.2 \times 10^7/g$ 以上、20°8日で $1.3 \times 10^5/g$ のウェルシュ菌数に達した。5°貯蔵ではウェルシュ菌数の増加はないが、24日後でも生残した。FF無添加魚肉ソーセージの場合も、30°, 2日で $1.2 \times 10^7/g$ 以上のウェルシュ菌数に達した。FF 2.5 ppm以上添加ケーシングかまぼこおよびFF 20 ppm添加魚肉ソーセージは30°においても接種菌の生育を許さなかった。標準株8238を揚げかまぼこに調理(煮沸)前あるいは後に2次的に接種したのち、揚げかまぼこをシャーレに1片ずつ採取し、嫌氣的処理を行わずに放置した場合でも、30°においては1日後に $1.2 \times 10^7/g$ 以上のウェルシュ菌数に達した。しかし、5°および20°では接種菌の生育は認められなかった。

6) LAS培地を用いて、魚貝類および魚肉加工食品から分離した菌株の辺野喜の基準に対する一致性を検討した。その結果、Fig. 7-1に示したところのLAS培地の使用による水産食品に対するウェルシュ菌の新検査方式を提案した。

## 謝 辞

この研究を行なうにあたり、終始適切な御指導と御はげましを賜りました九州大学豊水正道教授に心から感謝します。

また、常に有益な御助言を賜りました九州大学北御門学助教授、ならびに長崎大学銭谷武平教授に深く感謝します。

## 文 献

- 1) E. Klein : Zbl. Bakteriologie. Abt. I. Orig., 18, 737 (1895)
- 2) R. Knox, E. K. MacDonald : Med. Officer, 69, 21 (1943)
- 3) L. S. McClung : J. Bacteriol., 50, 229 (1945)
- 4) B. C. Hobbs, M. E. Smith, C. L. Oakley, G. H. Warrack, J. C. Cruickshank : J. Hyg., 51, 75 (1953)
- 5) 辺野喜正夫 : 食品衛生研究, 15 (6), 5 (1965)
- 6) 善養寺 浩 : 食品衛生研究, 19 (6), 14 (1969)
- 7) 善養寺 浩 : 食衛誌, 6, 133 (1965)
- 8) 天野立爾 : 食衛誌, 8, 358 (1967)
- 9) 天野立爾 : 食衛誌, 6, 466 (1965)
- 10) 天野立爾 : 食衛誌, 7, 354 (1966)
- 11) H. Yamagata, Y. Iwafune, Y. Shimamura : Japan. J. Microbiol., 3, 365 (1959)
- 12) 飯田広夫 : 食衛誌, 6, 208 (1965)
- 13) 中村 豊, 飯田広夫 : 北海道衛生研究所特報, 1 (1959)
- 14) 青山 敏, 渡辺泰子, 中田二三男, 山田美禰雄, 大島豊三, 渡辺敏平, 清水 正 : 日本伝染病学会雑誌, 34, 634 (1960)
- 15) 堀 道紀, 松本達昭 : 食品衛生研究, 11 (6), 53, 63 (1961)
- 16) 林 薫, 釘田芳文, 田原守夫, 山県 宏 : 長崎大学風土病紀要, 3, 1 (1961)
- 17) 飯田広夫 : 食衛誌, 6, 219 (1965)
- 18) 林 薫, 釘田芳文, 田原守夫, 山県広 : 長崎大学風土病紀要, 3, 87 (1961)
- 19) 杉谷 哲, 高松茂夫 : 日本公衛誌, 8 (8), 681 (1961)
- 20) 山県 宏, 川口信行, 粟屋 稔, 島村雄三郎, 染川 敏 : 食品衛生研究, 11 (4), 51 (1961)
- 21) 山県 宏, 川口信行, 粟屋 稔, 島村雄三郎, 染川 敏 : 食品衛生研究, 11 (4), 55 (1961)
- 22) 食品衛生研究, 11(11), 76 (1961)
- 23) 辺野喜正夫 : 食衛誌, 6, 317 (1965)
- 24) 浅川 豊, 中津川修二 : 食衛誌, 7, 266 (1966)
- 25) 岸本敬之 : 食衛誌, 10, 110 (1969)
- 26) 安川 章, 吉村 陽, 高尾 朔, 外村佳子, 清田亮夫, 明橋八郎, 飯田才一, 岩尾守義, 大森玄洞, 横川 洋 : 日本公衛誌, 14 (3), 129 (1967)
- 27) 高柳文雄 : 食品衛生研究, 19 (4), 104 (1969)
- 28) 善養寺 浩 : 食品衛生研究, 19 (6), 14 (1969)
- 29) 佐々木重夫, 後藤ヤイ子, 長浦小一郎, 富田平内, 鈴木保吉, 大越 伝, 田口元勝, 五十嵐勝亥, 齊藤 長 : 食品衛生研究, 16 (1), 77 (1966)
- 30) 善養寺 浩, 坂井千三, 伊藤 武, 丸山 務, 工藤泰雄 : 食衛誌, 11, 282 (1970)
- 31) B. C. Hobbs : J. Appl. Bacteriol., 28, 74 (1965)
- 32) 中川正明, 山岸高由, 西田尚紀 : メディヤ-サークル, No.53, 17 (1964)
- 33) 久保田憲太郎 : メディヤ-サークル, No.29, 1 (1962)
- 34) 山県 宏 : メディヤ-サークル, No.29, 19 (1962)
- 35) 赤真清人, 大谷 昌, 亀山昭一, 伊藤明治, 村田良介 : 日細菌, 21, 564 (1966)
- 36) R. Angelotti, H. E. Hall, M. J. Foter, K.H.Lewis : Appl. Microbiol., 10, 193 (1962)
- 37) R. S. Marshall, J. F. Steenbergen, L. S. McClung : Appl. Microbiol., 13, 559 (1965)
- 38) Society of American Bacteriologists : Manual of Microbiological Methods, p.150 (1957), McGraw-Hill Book Co. Inc. New York.
- 39) Ibid., p. 156 (1957)

- 40) R. Yamamoto, W. W. Sadler, H. E. Adler, G. F. Stewart : *Appl. Microbiol.*, 9, 337 (1961)
- 41) D. H. Strong, J. C. Canada, B. B. Griffiths : *Appl. Microbiol.*, 11, 42 (1963)
- 42) R. S. Breed, E. G. D. Murray, N. R. Smith and Ninety-four Contributors : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th. Ed. p. 635, 666 (1957), The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- 43) Society of American Bacteriologists : *Manual of Microbiological Methods*, p.133 (1957), McGraw-Hill Book Co. Inc. New York.
- 44) *Ibid.* p. 131 (1957)
- 45) P. D. Ellner : *J. Bacteriol.*, 71, 495 (1956)
- 46) 相磯和喜, 辺野喜正夫, 川城 巖, 松井武夫, 宮木高明, 豊川行平 : *食品衛生学*, P.416 (1963) 朝倉書店.
- 47) H. E. Hall, R. Angelotti, K. H. Lewis, M. J. Foter : *J. Bacteriol.*, 85, 1094 (1963)
- 48) L. E. Day, R. N. Costilow : *J. Bacteriol.*, 88, 690 (1964)
- 49) *Ibid.* : *J. Bacteriol.*, 88, 695 (1964)
- 50) C. G. Pheil, Z. J. Ordal : *Appl. Microbiol.*, 15, 893 (1967)
- 51) E. Leifson : *J. Bacteriol.*, 21, 331 (1931)
- 52) W. Burrows, R. J. Porter, J. W. Moulder : *Textbook of Microbiology*, 6 th. Ed. p. 597 (1959), W. B. Saunders Co. Philadelphia.
- 53) S. Winogradsky : *Ann. Inst. Pasteur*, 60, 351 (1938)
- 54) K. A. Bisset : *J. Gen. Microbiol.*, 13, 442 (1955)
- 55) M. D. Socolofsky, O. Wyss : *J. Bacteriol.*, 81, 946 (1961)
- 56) C. L. Oakley, G. H. Warrack : *J. Hyg.*, 51, 102 (1953)
- 57) M. E. Brooks, M. Sterne, G. H. Warrack : *J. Pathol. Bacteriol.*, 74, 185 (1957)
- 58) Society of American Bacteriologists : *Manual of Microbiological Methods*, p. 21 (1957), McGraw-Hill Book Co. Inc. New York.
- 59) *Ibid.* p. 43, 111 (1957)
- 60) 蜂須賀養悦 : 芽胞, P.5 (1962) 岩波書店.
- 61) 赤直清人, 大谷 昌, 伊藤明治, 亀山昭一, 村田良介 : *日細菌*, 21, 645 (1966)
- 62) M. D. Schneider, N. Grecz, A. Anellis : *J. Bacteriol.*, 85, 126 (1963)
- 63) K. F. Weiss, D. H. Strong : *Nature*, 215, 530 (1967)
- 64) C. H. Kim, R. Cheney, M. Woodburn : *Appl. Microbiol.*, 15, 871 (1967)
- 65) K. F. Weiss, D. H. Stromg : *J. Bacteriol.*, 93, 21 (1967)
- 66) T. Yamagishi, S. Ishida, S. Nishida : *J. Bacteriol.*, 88, 646 (1964)
- 67) S. Nishida, N. Seo, M. Nakagawa : *Appl. Microbiol.*, 17, 303 (1969)
- 68) J. C. Canada, D. H. Strong, L. G. Scott : *Appl. Microbiol.*, 12, 273 (1964)
- 69) 赤堀四郎 : 酵素ハンドブック, P.445 (1966) 朝倉書店.
- 70) A. G. Smith, P. D. Ellner : *J. Bacteriol.*, 73, 1 (1957)
- 71) J. F. M. Hoeniger, P. F. Stuart, S. C. Holt : *J. Bacteriol.*, 96, 1818 (1968)
- 72) E. S. Wynne, D. A. Mehl, W. R. Schmieding : *J. Bacteriol.*, 67, 435 (1954)
- 73) C. L. Duncan, E. M. Foster : *Appl. Microbiol.*, 16, 406 (1968)
- 74) H. Sugiyama : *J. Bacteriol.*, 62, 81 (1951)
- 75) S. Frankel, S. Reitman : *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis (A Textbook on Laboratory Procedures and Their Interpretation)*, 6 th. Ed. Vol. 1, p. 480 (1963), C. V. Mosby Co. St. Louis.

- 76) 三舟求真人：長崎大学風土病紀要，5，1 (1963)
- 77) 清田亮夫，安川 章，高尾 朔，外村佳子：日本公衛誌，14(6)，112 (1967)
- 78) 山県 宏，川口信行：山口県衛生研究所業績報告，No. 3，47 (1968)
- 79) H. E. Hall, R. Angelotti : Appl. Microbiol., 13, 352 (1965)
- 80) R. G. A. Sutton, B. C. Hobbs : J. Hyg., 66, 135 (1968)
- 81) A. H. W. Hauschild, F. S. Thatcher : J. Food Sci., 32, 467 (1967)
- 82) F. E. Dische, S. D. Elek : Lancet, 13, 71 (1957)
- 83) 飯塚 広，崔 涓卿：食衛誌，9，124 (1968)
- 84) 善養寺 浩，坂井千三，伊藤 武，工藤泰雄，齊藤クラ，辺野喜正夫，長崎 護，三木 博，北 博正：日本公衛誌，13 (7)，152 (1966)
- 85) 久保田憲太郎，山崎茂一，刑部陽宅，大崎 純，田中政美，厚村治身：日本公衛誌，13 (7)，152 (1966)
- 86) 小島 渥，松田敏生：日水誌，31，214 (1965)
- 87) 松田敏生，小島 渥：日水誌，31，365 (1965)
- 88) 小島 渥，松田敏生：日水誌，31，459 (1965)
- 89) 河端俊治，渋谷公代，鈴木 健：日水誌，31，357 (1965)
- 90) 河端俊治，植松智之，古庄一夫：日水誌，32，892 (1966)
- 91) 食品衛生研究，16 (8)，58 (1966)
- 92) 食品衛生研究，17 (8)，49 (1967)
- 93) 厚生省食品衛生課：食品衛生研究，18 (10)，60 (1968)
- 94) 厚生省食品衛生課：食品衛生研究，19 (9)，21 (1969)
- 95) 厚生省食品衛生課：食品衛生研究，20 (9)，65 (1970)
- 96) 稻垣尚起，小崎道雄，松井武夫，善養寺 浩，辺野喜正夫：食衛誌，6，286 (1965)
- 97) M. Woodburn, C. H. Kim : Appl. Microbiol., 14, 914 (1966)
- 98) D. H. Strong, N. M. Ripp : Appl. Microbiol., 15, 1172 (1967)
- 99) M. Solberg, B. Elkind : J. Food Sci., 35, 126 (1970)
- 100) J. H. Green, W. Litsky : J. Food Sci., 31, 610 (1966)

## Studies on *Clostridium perfringens* in Sea-Foods

Tadataka TANIGUTI

### Summary

*Clostridium perfringens* is a normal inhabitant of the human and mammalian intestine, and is also distributed in sewage and soil. Consequently, many different kinds of foods may be contaminated with the microorganisms. Welchii food poisoning is mainly caused by Type A heat-resistant (Hobbs' Type) strains of *Cl. perfringens*. In England and Wales, the media of infection on the food poisoning are almost invariably meat dishes made from heated meat. In Japan, about a half of the media are fish dishes made from heated fish and processed fish products. Detection of *Cl. perfringens* in raw fishes, which are the main material of fish dishes and of processed fish products, had been made only by Nakagawa et al. and Zen-yoji et al. Toxicological Types, Hobbs' Serological Types and other characteristics of the strains isolated from fishes are not yet revealed.

In this paper, therefore, detection of *Cl. perfringens* in raw fishes was undertaken for the period from June to October 1966, and the incidence of contamination with the microorganisms was made clear. At the same time, the isolates were typed toxicologically, and were tested for serological relationships to Hobbs' Types. Moreover, heat resistance and biochemical properties of the isolates were also tested and were discussed. In the first place on the investigations, a new differential enrichment-medium (LAS medium) was prepared, and detection of *Cl. perfringens* became easy and accurate by using the medium. Identification of isolates as *Cl. perfringens* also became easy and exact by applying a new sporulation medium (AGACo medium) which was prepared by the author. In addition, it was made clear that a Hobbs' Type strain forms both heat-resistant and heat-sensitive spores. Observations of dormancy were made on the spores which were synchronously formed. On the other hand, detection of *Cl. perfringens* in processed fish products and in ground fish meat was also made. Then minimal inhibitory concentrations (MIC) of furylfuramide (FF), tetracycline (TC) and tylosin (TT) for the growth of many Hobbs' Type strains were determined as an aid of preventing food poisoning by *Cl. perfringens*. Besides, the inhibitory effect of FF and the influence of storage temperatures on the growth of inoculated *Cl. perfringens* (a Hobbs' Type strain) were tested on Kamaboko (fish cake) and fish sausage.

1) In order to enhance selectively the growth of *Cl. perfringens*, a new

differential enrichment-medium (LAS medium) was prepared by modifying the TSN agar for estimation of *Cl. perfringens*. The TSN agar was modified by addition of lactose and sodium ascorbate and by decrement of agar concentration. The LAS medium was used as an enrichment medium, and was simultaneously applied as a differential medium, that is, in the selective enrichment-culture of *Cl. perfringens* with the LAS medium, the presence of the microorganisms was judged by both blackening the medium and producing gas in the medium. Then the differentiation with the LAS medium was more accurate than that with TSN agar medium in which the presence of the microorganisms was judged only by blackening the medium (Table 2-1). When identified by the criteria of Benoki, in Bergey's manual (key to the species of genus *Clostridium*) and of Strong et al., the rate of isolation of *Cl. perfringens* from the 213 LAS-positive (differentiation of *Cl. perfringens*: positive) enrichment cultures inoculated by the body surface and alimentary canal specimens of fishes, showed the high percentages of 93, 83 and 67 respectively (Table 2-2). There was a little difference (in selecting *Cl. perfringens* in the LAS 46°C-cultures) between the heated and unheated specimens when the isolates from the cultures were identified by Benoki's criterion (Table 2-3),

2) A new sporulation medium (AGACo medium) was prepared by modifying Ellner's medium. The modification was made by adding ammonium acetate and sodium ascorbate, substituting starch with glycerol, decrementing phosphate concentration and adding cobalt ion (Tables 3-1~3-5, Fig. 3-1). Spores were produced in the percentages of sporulation above from 40 to 80 by use of the AGACo medium from all tested 230 strains, regardless of Hobbs' standard strains and of Toxicological Types of test strains (Table 3-6). However, the spores formed in the AGACo medium were relatively unstable. It seemed that those spores proceeded gradually to the stage of germination during the incubation period because resistance of the spores to staining was observed to decrease along with the incubation time after the sporulation. The heat resistance of spores of Hobbs' standard 13 strains formed in the AGA medium was weak. The AGA medium appeared to be inferior to the cooked meat medium as a sporulation medium for the test of heat resistance (Table 3-7).

3) Though *Cl. perfringens* Hobbs' Type strain 8238 (Type 2) is a heat-resistant strain, a far greater number of spores formed in the AGA, LGA or cooked meat medium were heat-sensitive (80°C, 20 min), and only a very small number of those spores were heat-resistant (Table 4-1). In the synchronized cultures with the LGA medium prepared by modifying the AGACo medium, the heat-sensitive spores rapidly proceeded from the stages of spore-formation to the stages of germination almost without taking dormancy (Fig. 4-1 and Table 4-2). The rapidity decreased at a low temperature (3°C) or under aerobic conditions (Tables 4-3 and 4-4). The formation process was delayed by adding sodium



chloride at a concentration of 10 per cent, and both the formation process and the germination process were delayed by adding calcium chloride at a concentration of 0.95 per cent (Table 4-4). In putting together the results of those experiments and the results of the preceding observation on the spores of all tested *Cl. perfringens* strains including Hobbs' Type strains when the spores were formed with the AGACo medium, it was presumed that the spores of *Cl. perfringens* are relatively active, and in general they have little or no significance in the dormant stage.

4) Every one of *Cl. perfringens* 198 strains (Benoki's criterion) isolated from fishes was Type A. For the period from June to September, *Cl. perfringens* was detected in the high percentages (68~88%) in the unheated specimens of the body-surface of fishes, but the microorganisms were not detected in the specimens in October when it became cool. The rate of detection of *Cl. perfringens* in the alimentary canal of fishes was generally low except a few kinds of fishes (Tables 5-3 and 5-4). Though the detection rate decreased, heat-resistant (100°C, 60 min) strains were isolated selectively by applying heat-treatment (80°C, 20 min) to the specimens. And the majority of the strains isolated from the heated specimens did not agree with the identification-criterion of Strong et al. (S criterion), especially in the case of heat-resistant strains (Table 5-5).

The thirty-two strains (16%) out of isolated *Cl. perfringens* 198 strains were in agreement with Hobbs' Types in agglutination test, that is, the 32 Hobbs' Type strains belonging to the Types 2~6, 8, 9, 12 and 13 were detected (Table 5-6). In the Hobbs' Type strains isolated from the heated specimens, the 6 strains out of 11 strains were heat-resistant. It is noticeable that heat-resistant Hobbs' Type strains were isolated thus (Tables 5-6 and 5-7). In unheated specimens, Hobbs' Type strains were detected through the period from June to September, though the detection rate showed a low percentage (Table 5-8). However, every one of the 21 strains detected as Hobbs' Type strain did not possess heat resistance (Tables 5-6 and 5-7). The above facts on the unheated specimens may be not neglected from the standpoint of food hygiene because it has been recognized that heat-resistant *Cl. perfringens* is not always heat-resistant in the case of cultures after the isolation, and it has been reported recently that food poisoning is caused by secondary contamination after cooking with heat-sensitive *Cl. perfringens*.

About a quarter (48 strains) of the isolated *Cl. perfringens* 198 strains were salicin-fermentative (acid, or acid and gas). In heat-resistant strains, the 11 strains out of the 15 strains isolated were salicin-fermentative (Table 5-9). Then the detection rate of salicin-fermenters in the isolates from heated specimens showed a relatively high percentage of 65, but that in the isolates from unheated specimens was no more than 16 per cent (Table 5-10). Though the agreement rate of the salicin-fermenters with Hobbs' Serological Types was no more than

25 per cent, it was higher in comparison with that (13%) of the salicin-unfermenters (Table 5-11). That is, there were the tendencies that the salicin-fermenters agree with Hobbs' Types at higher rate than the salicin-unfermenters, and are heat-resistant. On the other hand, *Cl. perfringens* has been regarded as a salicin-unfermenter in the S criterion. Therefore, in the detection of *Cl. perfringens* in fishes as a causative agent of food poisoning, it is considered that the identification of isolated strains by the S criterion is improper, and that the salicin-fermenters among the isolates which were in disagreement with the S criterion are especially important. Besides, there was no correlation between each of the Serological Types of Hobbs' Type strains and the salicin-fermentability (Table 5-12).

5) The detection rate of *Cl. perfringens* in Agekamaboko, Chikuwa and Mushikamaboko (July) was 11~27 per cent in the unheated specimens, and was 3.8~17 per cent in the heated (80°C, 20 min) specimens. The detection rate in dried fish products (July) was 27 per cent in the unheated specimens, and was 31 per cent in the heated specimens (Table 6-1). In the case of ground fish meat, the detection rate in average from June to October was 42 per cent in the unheated specimens, and was 5.1 per cent in the heated specimens (Table 6-2). Every one of the isolated *Cl. perfringens* 103 strains (Benoki's criterion) was Type A. Fourteen strains (14%) out of those isolated 103 strains agreed with Hobbs' Types in agglutination test, that is, 14 strains belonging to the Type 1, 2, 4, 5, 9, 11 and 12 were detected (Table 6-4).

The MIC of FF, TC and TT for the growth of Hobbs' standard strains (13 strains) and of Hobbs' Type strains (32 strains) isolated from fishes were 7.5 ppm and less, 2.5 ppm and less and 1.0 ppm and less respectively. There was the tendency that the MIC of those antiseptics are higher in the strains isolated from fishes than in the standard strains (Table 6-6). The relationships between the legal concentration of FF in Japan and the MIC of FF are as follows. At the FF concentration of 2.5 ppm permitted in Kamaboko products, 92 per cent of the standard strains and 72 per cent of the isolated strains could not grow. At the FF concentration of 5.0 ppm permitted in sausage and ham, all the standard strains and 94 per cent of the isolated strains could not grow. In the case of fish sausage and fish ham, the inhibitory effect of FF on the growth of the test strains may be expected because the addition of 20 ppm of FF is legally permitted, and it has been estimated that the remaining activity of FF after processing is about a half or at least 30 per cent of the initial activity (Table 6-6). Besides, the MIC of FF and TT decreased in the medium with 3 per cent sodium chloride, but increased in the medium with 1.0 or 0.2 per cent glucose in some test strains. The MIC of TC was not influenced by the addition of those substances (Table 6-8).

In the cased Kamaboko and fish sausage which were processed after inoculating

the Hobbs' standard strain 8238, the heat-resistant spores of the inoculum survived even after the processing (treated for 55 min at 75°C or 80°C). In the cased Kamaboko without FF, the viable count of *Cl. perfringens* reached  $1.2 \times 10^7$  / g and more after the storage for 2 days at 30°C, and the count increased to  $1.3 \times 10^5$  / g after the storage for 8 days at 20°C. In the storage at 5°C, the number of the viable cells of *Cl. perfringens* did not increase, but the microorganisms survived also after 24 days (Table 6-10). Also in the fish sausage without FF, the viable count of *Cl. perfringens* came to  $1.2 \times 10^7$  / g and more after the storage for 2 days at 30°C (Table 6-11). In the cased Kamaboko with 2.5, 5.0 and 20 ppm of FF, and in the fish sausage with 20 ppm of FF, the inoculated strain could not grow even at 30°C (Tables 6-10 and 6-11). When the standard strain 8238 was secondarily inoculated before or after cooking (boiled for 10 min) into Agekamaboko, the viable count of *Cl. perfringens* in the cooked Agekamaboko reached  $1.2 \times 10^7$  / g and more after one day at 30°C without an anaerobic treatment. At 5° and 20°C, however, the growth of the inoculated strain was not recognized (Table 6-12).

6) An investigation was made on whether the strains, which were isolated from fishes and from processed fish products by using the LAS medium, agree with Beneki's criterion. As a result of the investigation, a new scheme which was illustrated in Fig. 7-1 for detection of *Cl. perfringens* in sea-foods by using the LAS medium has been proposed.