

胆汁末を添加した各種魚介肉・食肉培地で培養
したウェルシュ菌の孢子形成能力

赤 枝 宏・谷 口 忠 敬

Spore forming ability of *Clostridium perfringens* cultured in
seafood meat media or domestic animal meat media
with gall powder

Hiroshi AKAEDA and Tadataka TANIGUTI

Sporulation ability of *Clostridium perfringens* NCTC 8798 which was cultured in the seafood meat media or domestic animal meat media with gall powder were compared with the sporulation ability when gall powder free media were used.

The ratio of the sporulation ability when the media containing 1~5% gall powder were used to the ability when the gall powder free media were used are as follows.

In the case of red fresh fish meat media, the ratios on mackerel-, sardine-, tuna-, saurel-, and skipjuck-medium were high value in 1.2~1.9. In the case of white fresh fish meat, the ratios on flatfish-, shark-, and lizardfish-medium were high value in 1.3~1.9 but the ratios on wrasse-, croaker-, sand-borer-, sea-bream-, and ray-medium were low value in 1.0~1.4. In the case of shellfish meat, the ratios on short-necked-clam-, shrimp-, and top-shell-medium were high value in 1.3~1.9 but the ratios on oyster meat medium were 0.8~1.3. The ratios on chuck-, rib-, ham-, porker-heart-, bacon-, chicken-liver-, and chicken-breast-medium and cooked meat medium (Difco) were high value in 1.1~1.9 but the ratios on chicken white meat were 0.9~1.4. The ratios on cattle-liver-, porker-liver-, and whale-lean-meat-medium were low value in 0.3~1.0.

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 食中毒は食品と共に摂取されたエンテロトキシン (enterotoxin, E T と略記) 産生性の本菌菌株が消化管内で増殖し、孢子を形成する際に孢子囊中に E T を産生し、孢子囊中から消化管内に E T が溶出して起こるとされている (1~4)。

本菌食中毒は主としてタンパク質性の加熱調理食品を原因食品とし、特に、日本では本菌による汚染が高い魚介類 (5) の加熱食品による場合が比較的に多く、欧米では畜肉食品に起因する (4, 6) 場合が多いと言われている (7, 8)。

タンパク質性食品が摂取された時には胆汁が胆嚢

から十二指腸に多量に分泌され (9, 10), 主たる胆汁成分である胆汁酸は回腸までにその大部分 (95%以上) が再吸収される (11)。一方、胆汁酸は本菌の孢子形成を抑制すると言われる (12) が、当研究室では、胆汁末を添加したクックドミート (Cooked meat, CM と略記) 培地で継代培養を繰り返すことによって、本菌 E T 産生性菌株の孢子形成能力の低下を防止できることを認めている (13)。これらのことから、胆汁存在下での各種タンパク質性食品による培養が本菌 E T 産生性菌株の、E T 産生の前提条件となるところの、孢子形成能力あるいは孢子形成に与える影響を明らかにすることは食品衛生上か

ら重要であると考えられる。

この様な見地から、本研究においては、胆汁末を添加した29種類の各種魚介肉・食肉・CM培地で培養したET産生性ウェルシュ菌 NCTC 8798の孢子形成能力を明らかにすることを試みた。

実験方法

1. 供試菌株

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) NCTC 8798を供試した。供試菌株はCM培地 (Difco) で37℃, 3日間培養後, -30℃に凍結保存した。

2. 培地および培養法

1) 培地: 供試28種類の魚介肉・食肉の可食部(繊維と脂肪塊は除去)を2mm角に細切し、固形物1.25g, 水分量10mlになる様に純水を添加した培地, CM培地(固形物1.25gに純水10mlを添加したもの)および牛胆汁末(和光純薬)を水分量(CM培地の時は添加水分量)に対し1, 3, 5%(W/W)になるように添加した各種培地を, 120℃で20分間滅菌したものを被験培地として検討した。すなわち, 魚介肉培地としてはイワシ, アジ, サバ, カツオ, マグロ, キス, エソ, グチ, ベラ, タイ, カレイ, サメ, エイ, 小エビ, アサリ, サザエ, カキの17種類, 食肉培地としては, 牛肩, 牛リブ, CM, 牛肝臓, 豚モモ, 豚バラ, 豚心臓, 豚肝臓, 鶏胸, 鶏ササミ, 鶏肝臓, 鯨赤肉の12種類の培地を供試した。

2) 培養法: 凍結保存した供試菌株培養液を解凍後, CM培地に接種し, 75℃, 20分間の加熱処理を加え, 37℃で3日間培養した。この培養菌液0.1mlをCM培地に接種し, 37℃で12時間培養した。次にこの0.1mlを各種被験培地に接種し, 37℃で12時間培養した。この時の接種菌は胆汁末無添加の被験培地で培養後の孢子形成培養における孢子形成率が, 50%になるように(但し, 鯨赤肉の場合には90%になるように)調整した。なお, 培養には15ml容量のスクリーキャップ付バイアルを用い, ガス置換を行わず密栓して培養した。

3. 孢子形成能力(孢子形成培養における孢子形成率)の測定法

被験培地培養液0.1mlを孢子形成培地100mlに接種し, 37℃で9時間培養した。孢子形成培養液2mlを等量の生理食塩水に懸濁し, 5℃で遠心分離(3000rpm, 10分間)後, 菌体を10%中性ホルマリン2mlに懸濁し固定した。このホルマリン固定液について,

位相差顕微鏡で100細胞以上を検鏡し, 孢子形成の Stage III~V (forespore) (14) 以上を孢子形成細胞とみなし, 孢子形成率 (Sporulation rate, 以下SRと略記)を算出した。なお, 孢子形成培地には, チオグリコール酸ナトリウムのかわりにL-アスコルビン酸ナトリウムを0.5%加えた(15)DS培地(16)を使用し, 培養には120ml容量のスクリーキャップ付培養びんを用い, ガス置換を行わず密栓して培養した。

成績

胆汁末を1~5%添加した29種類の魚介肉・食肉・CM培地で培養した供試ウェルシュ菌 NCTC 8798の孢子形成能力を胆汁末無添加の場合と比較試験した。得られた成績は次のようである。

1. 胆汁末添加各種魚介肉培地で培養したウェルシュ菌の孢子形成能力

1) 赤身魚の場合

胆汁末を添加した5種類の赤身魚肉培地で培養したウェルシュ菌の孢子形成能力を Table 1 に示した。

胆汁末添加サバ, アジ, カツオ培地培養菌の孢子形成培養における孢子形成率 (SRと略記) は, 胆汁末濃度が高かった時ほど無添加の時よりも高い傾向を示し, 胆汁末5%の時に最高値を示した。イワ

Table 1. Spore forming ability of *Clostridium perfringens* NCTC 8798 which was cultured in the fish meat media with or without gall powder

Tested media		Conc. of GP in tested media (%)	Sporulation rate in sporulation medium (%)
Red fresh fish meat	Mackerel	0	50
		1	82
		3	92
		5	96
Sardine	Sardine	0	50
		1	79
		3	89
		5	75
Tuna	Tuna	0	50
		1	66
		3	78
		5	74
Saurel	Saurel	0	50
		1	60
		3	71
		5	76
Skipjack	Skipjack	0	50
		1	69
		3	72
		5	74

シ、マグロのSR値は、胆汁末3%の時に最高値を示し5%の時には3%の時よりも僅かに低かった。すなわち、胆汁末無添加のSR値に対する胆汁末添加のSR値の比は、サバ(1.6~1.9)が一番高く、次いでイワシ(1.5~1.8), マグロ(1.3~1.6), アジ(1.2~1.5), カツオ(1.4~1.5)の順で5種類いずれも高かった。

2) 白身魚の場合

胆汁末を添加した8種類の白身魚肉培地で培養したウェルシュ菌の孢子形成能力を Table 2 に示した。

胆汁末を添加した白身魚培地培養菌の孢子形成培養におけるSR値は、胆汁末濃度が高かった時ほど高い傾向がみられ、胆汁末5%の時に最高値を示した。しかし、カレイ、サメ、エソのSR値が胆汁末添加培養の時に無添加の時よりも明確に高かったのに対し、ベラ、グチ、キス、タイ、エイの胆汁末添加培養の時のSR値は、無添加の時よりも僅かに高い値を示したに過ぎなかった。すなわち、胆汁末無

Table 2. Spore forming ability of *Clostridium perfringens* NCTC 8798 which was cultured in the fish meat media with or without gall powder

Tested media		Conc. of GP in tested media (%)	Sporulation rate in sporulation medium (%)	
White fresh fish meat	Flatfish	0	50	████████
		1	85	██████████
		3	83	██████████
		5	94	██████████
Shark		0	50	████████
		1	68	██████████
		3	65	██████████
		5	88	██████████
Lizard-fish		0	50	████████
		1	66	██████████
		3	66	██████████
		5	81	██████████
Wrasse		0	50	████████
		1	58	██████████
		3	58	██████████
		5	63	██████████
Croaker		0	50	████████
		1	56	██████████
		3	56	██████████
		5	69	██████████
Sand borer		0	50	████████
		1	50	██████████
		3	56	██████████
		5	61	██████████
Sea bream		0	50	████████
		1	57	██████████
		3	57	██████████
		5	60	██████████
Ray		0	50	████████
		1	52	██████████
		3	53	██████████
		5	61	██████████

Table 3. Spore forming ability of *Clostridium perfringens* NCTC 8798 which was cultured in the shellfish meat media with or without gall powder

Tested media		Conc. of GP in tested media (%)	Sporulation rate in sporulation medium (%)	
Shell-fish meat	Short-necked clam	0	50	████████
		1	96	██████████
		3	89	██████████
		5	96	██████████
Shrimp		0	50	████████
		1	58	██████████
		3	60	██████████
		5	86	██████████
Top shell		0	50	████████
		1	69	██████████
		3	66	██████████
		5	81	██████████
Oyster		0	50	████████
		1	61	██████████
		3	66	██████████
		5	41	████████

添加のSR値に対する胆汁末添加のSR値の比は、カレイ(1.7~1.9)が一番高く、次いでサメ(1.3~1.8), エソ(1.3~1.6)の順で3種類は高かったが、ベラ(1.2~1.3), グチ(1.1~1.4), キス(1.0~1.2), タイ(1.1~1.2), エイ(1.0~1.2)の5種類はいずれも低かった。

この比は、カレイ、サメ、エソの3種類を除いた、ベラ、グチ、キス、タイ、エイの5種類の白身魚では、前述の赤身魚の場合に比べて低い傾向を示した。

3) 貝・エビ類の場合

胆汁末を添加した4種類の貝・エビ類肉培地で培養したウェルシュ菌の孢子形成能力を Table 3 に示した。

胆汁末を添加したアサリの孢子形成培養におけるSR値は、胆汁末1%の時に最高値を示し、胆汁末3,5%の時には最高値より僅かに低いか同等の値を示した。小エビ、サザエのSR値は、胆汁末濃度が高かった時ほど高い傾向を示し、胆汁末5%の時に最高値を示した。カキのSR値は、胆汁末3%の時に最高値を示したが、5%の時には無添加の時よりも低かった。すなわち、胆汁末無添加のSR値に対する胆汁末添加のSR値の比は、アサリ(1.8~1.9)が一番高く、次いで小エビ(1.2~1.7), サザエ(1.3~1.6)の順で3種類は高かったが、カキ(0.8~1.3)は低かった。

2. 胆汁末添加各種食肉・CM培地で培養したウェルシュ菌の孢子形成能力

胆汁末を添加した11種類の食肉培地およびCM培

Table 4. Spore forming ability of *Clostridium perfringens* NCTC 8798 which was cultured in the domestic animal meat media with or without gall powder

Tested media		Conc. of GP in tested media (%)	Sporulation rate in sporulation medium (%)	
Cattle	Cooked meat medium (Difco)	0	50	
		1	70	
		3	85	
		5	88	
Chuck		0	50	
		1	53	
		3	83	
		5	93	
Rib		0	50	
		1	50	
		3	82	
		5	91	
Liver		0	50	
		1	50	
		3	43	
		5	42	
Porker	Ham	0	50	
		1	74	
		3	76	
		5	95	
Heart		0	50	
		1	64	
		3	82	
		5	94	
Bacon		0	50	
		1	63	
		3	97	
		5	89	
Liver		0	50	
		1	35	
		3	29	
		5	30	

Table 5. Spore forming ability of *Clostridium perfringens* NCTC 8798 which was cultured in the chicken meat media or whale meat medium with or without gall powder

Tested media		Conc. of GP in tested media (%)	Sporulation rate in sporulation medium (%)	
Chicken	Liver	0	50	
		1	77	
		3	95	
		5	77	
Breast		0	50	
		1	79	
		3	71	
		5	73	
White meat		0	50	
		1	50	
		3	43	
		5	68	
Whale	Lean meat	0	90	
		1	80	
		3	43	
		5	29	

地で培養したウェルシュ菌の孢子形成能力を Table 4, 5 に示した。

1) 牛肉の場合

胆汁末を添加したCM培地、牛肩、牛リブの孢子形成培養におけるSR値は、胆汁末濃度が高かった時ほど高い傾向を示し、胆汁末5%の時に最高値を示したが、牛肝臓のSR値は、胆汁末濃度が高かった時ほど無添加の時よりも低かった。すなわち、胆汁末無添加のSR値に対する胆汁末添加のSR値の比は、CM (1.4~1.8) が一番高く、次いで牛肩 (1.1~1.9)、牛リブ (1.0~1.8) の順で3種類は高かったが、牛肝臓 (0.8~1.0) は低かった。

2) 豚肉の場合

胆汁末を添加した豚モモ、豚心臓の孢子形成培養におけるSR値は、胆汁末濃度が高かった時ほど高い傾向を示し、胆汁末5%の時に最高値を示し、豚バラのSR値は、胆汁末3%の時に最高値を示し、胆汁末5%の時には3%の時よりも僅かに低かった。豚肝臓のSR値は、胆汁末濃度が高かった時ほど無添加の時よりも低い傾向を示した。すなわち、胆汁末無添加のSR値に対する胆汁末添加のSR値の比は、豚モモ (1.5~1.9) が一番高く、次いで豚心臓 (1.3~1.9)、豚バラ (1.3~1.9) の順で3種類は高かったが、豚肝臓 (0.6~0.7) は低かった。

3) 鶏肉の場合

胆汁末を添加した鶏肝臓の孢子形成培養におけるSR値は、胆汁末3%の時に最高値を示し、胆汁末5%の時には3%の時よりも僅かに低かった。鶏胸のSR値は、胆汁末1%の時に最高値を示し、胆汁末3, 5%の時には1%の時よりも僅かに低かった。また、鶏ササミのSR値は、胆汁末1, 3%の時には無添加の時と同等あるいは低く、胆汁末5%の時にも無添加の時よりも僅かに高い値を示したに過ぎなかった。すなわち、胆汁末無添加のSR値に対する胆汁末添加のSR値の比は、鶏肝臓 (1.5~1.9) が一番高く、次いで鶏胸 (1.4~1.6) の順で2種類は高かったが、鶏ササミ (0.9~1.4) は無添加の時と大差なかった。

4) 鯨赤肉の場合

鯨赤肉培地の胆汁末添加培養菌の孢子形成培養におけるSR値は、胆汁末濃度が高かった時ほど低かった。すなわち、胆汁末無添加のSR値に対する胆汁末添加のSR値の比は、0.3~0.9と低かった。

考 察

被験培地で培養した供試菌株 NCTC 8798 の孢子形成能力すなわち孢子形成培養における孢子形成率は、19種類の魚介肉・食肉・CM培地（赤身魚ではサバ、イワシ、マグロ、アジ、カツオ；白身魚ではカレイ、サメ、エソ；貝・エビ類ではアサリ、小エビ、サザエ；食肉類ではCM、牛肩、牛リブ、豚モモ、豚心臓、豚バラ、鶏肝臓、鶏胸）の場合には胆汁末無添加の時よりも胆汁末を添加した時に明確に高く、7種類の魚介肉・食肉培地（白魚身のベラ、グチ、キス、タイ、エイとカキと鶏ササミ）の場合には胆汁末添加の時に無添加の時よりも僅かに高いかあるいは大差なく、3種類の食肉培地（牛肝臓、豚肝臓、鯨赤肉）の場合には胆汁末添加で無添加の時よりも低かった。被験培地によるこのような相違は恐らく肉の種類や部位による成分の相違 (17) に起因するものと考えられる。

孢子形成能力が胆汁末を添加した時に無添加の時よりも高かった魚肉・食肉培地の場合には、胆汁末の添加・無添加に関係なく、発育した栄養細胞の溶菌状態が認められなかったが、鯨赤肉培地、牛肝臓・豚肝臓培地で培養した場合には、胆汁末濃度が高いほど培養後の栄養細胞が強く溶菌状態になっていることが顕微鏡下で認められた。また、胆汁酸は本菌の発育を抑制し (18)、食肉の肝臓には胆汁酸が存在する (19)。これらのことから胆汁末添加で無添加よりも孢子形成能力が高かった魚介肉・食肉培地の場合には発育した栄養細胞が添加された胆汁末に十分に耐えて孢子形成能力を上昇させたと思われる。胆汁末を添加した牛・豚の肝臓培地では、過剰濃度の胆汁酸が栄養細胞を損傷し孢子形成能力を低下させたと考えられるが、鶏肝臓培地では胆汁末添加培地で無添加培地よりも孢子形成能力が高かった事から、肝臓中の胆汁酸以外の成分の影響も推測される。一方、鯨赤肉培地では、他の被験培地の場合とは異なり、発育した栄養細胞が添加された胆汁末に十分に耐えることができずに孢子形成能力が低下したと推測される。

赤身魚のサバ、イワシ、マグロ、アジ、カツオ；白身魚のカレイ、サメ、エソ；貝・エビ類のアサリ、小エビ、サザエ；食肉の牛肩、牛リブ、豚モモ、豚心臓、豚バラ、鶏肝臓、鶏胸培地において胆汁末添加の時に無添加の時よりも孢子形成能力が高かったことから、これらの魚介肉・食肉は本菌食中毒の危

険性が他よりも高いと考えられる。

要 約

胆汁末を1～5%添加した29種類の肉培地で培養したウェルシュ菌 (NCTC 8798) の、孢子形成能力を胆汁末無添加の場合と比較検討した。

1) 魚介類肉培地の場合、胆汁末無添加の孢子形成能力に対する胆汁末添加の能力の比は、赤身魚ではサバで1.6～1.9、イワシで1.5～1.8、マグロで1.3～1.6、アジで1.2～1.5、カツオで1.4～1.5と高かった。白身魚では、カレイで1.7～1.9、サメで1.3～1.8、エソで1.3～1.6と高かったのを除いて、ベラで1.2～1.3、グチで1.1～1.4、キスで1.0～1.2、タイで1.1～1.2、エイで1.0～1.2と赤身魚に比べて低い傾向を示した。貝・エビ類では、アサリで1.8～1.9、小エビで1.2～1.7、サザエで1.3～1.6と高く、カキで0.8～1.3であった。

2) 食肉類肉培地の場合、胆汁末無添加の孢子形成能力に対する胆汁末添加の能力の比は、クックドミート培地で1.4～1.8、牛肩で1.1～1.9、牛リブで1.0～1.8、豚モモで1.5～1.9、豚心臓で1.3～1.9、豚バラで1.3～1.9、鶏肝臓で1.5～1.9、鶏胸で1.4～1.6と高く、鶏ササミで0.9～1.4と大差なく、牛肝臓で0.8～1.0、豚肝臓で0.6～0.7、鯨赤肉で0.3～0.9と低かった。

文 献

- 1) Duncan, C. L., and Strong, D. H. (1969). *J. Bacteriol.*, **100**, 86-94.
- 2) Duncan, C. L., Sugiyama, H., and Strong, D. H. (1968). *J. Bacteriol.*, **95**, 1560-1566.
- 3) Hauschild, A. H. W., Niilo, L., and Dorward, W. J. (1971). *Can. J. Microbiol.*, **17**, 987-991.
- 4) Hauschild, A. H. W. (1973). *Canadian Institute Food Science and Technology Journal*, **6**, 106-110.
- 5) 谷口忠敬 (1971). 長崎大学水産学部研究報告, No. 31, 1-67.
- 6) Hobbs, B. C., Smith, M. E., Oakley, C. L., War-rack, G. H., and Cruickshank, J. C. (1953). *J. Hyg.*, **51**, 75-101.
- 7) 坂崎利一 編 (1983). 食中毒 II, 中央法規出版, 東京, 296-299.

- 8) 豊川行平, 宮木高明, 辺野喜正夫 編 (1972). 新編食品衛生学, 朝倉書店, 東京, 54.
- 9) 医学大辞典 (1971). 南山堂, 東京, 981.
- 10) 坪井 実, 実河三太, 井川幸雄, 松田 誠 (1981). 生理学, 講談社, 東京, 251-277.
- 11) 牧野 勲, 中川昌一 (1980). 胆汁酸, 中外医学社, 東京, 58-59.
- 12) Hickey, C. S., and Johnson, M. G. (1981). *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 124-129.
- 13) 赤枝 宏, 谷口忠敬 (1986). 長崎大学水産学部研究報告, No. **60**, 71-76.
- 14) Murrell, W. G. (1967). *Advances in Microbial Physiology*, Vol. 1, ed. by Rose, A. H. and Wilkinson, J. E., Academic Press Inc., New York, 135-136.
- 15) 谷口忠敬, 橋 勝康 (1980). 長崎大学水産学部研究報告, No. **48**, 35-39.
- 16) Duncan, C. L., and Strong, D. H. (1968). *Appl. Microbiol.*, **16**, 82-89.
- 17) 香川 綾監修 (1983). 四訂食品成分表, 女子栄養大学出版部, 東京.
- 18) Flock, M. H., Binder, H. S., Filburn, B., and Gershengoren, W. (1972). *Am. J. Clin. Nutr.*, **25**, 1418-1426.
- 19) 穂下剛彦 (1973). 代謝, Vol. **10**, No. 9, 1070-1079.