イワシミリン乾食中毒に関する研究

Studies on the Foodpoisoning Caused by Iwashi-Mirinboshi (Japanese)

千葉大学腐敗研究所腐敗研究部

柳 沢 文 徳 林 充 豊 浦 秀 世

宮 林 晃 木 村 康 正

Fumiyoshi Yanagisawa Makoto Hayashi Hideyo Toyoura

Akira Miyabayashi Yasumasa Kimura

Institute of Food Microbiology, Chiba University

緒 言

所謂腐敗中毒あるいはアレルギー様食中毒と称される食中毒の研究は、サンマ桜乾食中毒の研究に始まったのであるが、本中毒の主働原因物質はヒスタミンであることを、宮木教授等¹⁾²⁾³⁾が指摘された。同教授のこの種の中毒の発症原因についての見解は、異常に蓄積されたヒスタミンと他のアミンの協働作用によって惹起するものであるとされている。腐敗研究部においては、中毒検体から分離した *Proteus morganii* が、ヒスタミン異常蓄積を起す原因細菌であることを確認し、また一方本菌の処理をもつて製造したサンマ桜乾により、中毒の復元に成功した。

サンマ桜乾以外の食品に基くアレルギー様食中毒例は、昭和28年7月、熊本市内におけるサバ煮付缶詰肉による85名、昭和29年8月19日のソウダガツオ煮付（川崎市）による11名の中毒例が確認されているにすぎない。この種の中毒の原因食となる魚類は、報告された魚類のみでなく、赤味、青色の魚類においても発生する可能性が考えられるのであるが、サンマ桜乾を除くとその中毒例は少ないようである。

昭和31年たまたま、東京都内においてイワシミリン乾によるアレルギー様中毒が発生した。かかる原因食の事例は従来確認されておらず、即ち魚類別にみて、本邦で初めての中毒例であるとともに、本中毒について種々の検索を試みたところ、そのヒスタミン生成の原因細菌が今まで判明している *Proteus morganii* に基く中毒でないであろうという興味ある知見も得られたので、本中毒を中心として検討を重ねた研究成績の概略を報告して御批判を仰ぐ次第である。

実験成績

1. イワシミリン乾中毒例

昭和31年3月25日東京都内某所において、昼食にイワシミリン乾を摂取（摂取量は判然としないが、大体1枚程度）した一家4名（夫婦及び子供2名）が全員において、摂取後約30～50分後より、全身発赤、僅かな蕁麻疹（主に顔面）を主症状として他に軽度の頭痛、酩酊感を生じたが、大体2～4時間後には、上記の症状は消褪するという中毒が発生した。本中毒症状は、サンマ桜乾にみられるいわゆるアレルギー様中毒と全くその様相が一致していた。この一家以外においても同様な発症があつたものと推定されるが、しかし発生地が商店街であつたことと、中毒の確認が遅れたためにその発生状況は不明な点が多い。

中毒発生者が購入したイワシミリン乾の残品は入手できなかつたが、患者の購入先の食品販売店にある残品4枚（1枚25～35g、イワシ16匹をもつて1枚となつている）を入手することができた。東京都市場検査場の調査によれば、この製品は千葉県片貝にて昭和31年3月4日製造した製品であつた。

2. 検体に関する検査成績

入手した4枚のイワシミリン乾について従来のサンマ桜乾中毒例の研究経験に基き、アレルギー様食中毒であるという見解のもとに各種の検索を試みた（検体を1枚ごとにA、B、C、Dなる符号をつけて、その個々について検討を実施した）。

検体は官能検査成績ではなんら異常を認めることができず、やや乾燥すぎという程度であつた。細菌数（1%

第1表 中毒検体の生菌数、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 量
及びヒスタミン量

検体別 検査項目	A	B	C	D
細菌数 (g)	532 万			
$\text{NH}_3\text{-N}$ 量 (mg%)	37.5			
ヒスタミン量 (mg/g)	4.8	4.8	1.6	3.2

葡萄糖加普通寒天使用), 細菌分布 (山羊血液平板寒天使用) 及び塩基性アンモニア窒素量 ($\text{NH}_3\text{-N}$ 量) は, 4 検体より約 5 g ずつとり, その混和したものについて検査した。更にヒスタミンの定量は, 各サンプルにつき宮木教授等のルッター法により測定した。官能検査ではほとんど異常は認められないが, $\text{NH}_3\text{-N}$ 量からみた鮮度の判定によると, 37.5mg% であることより不良品とはいえないが, 細菌数は 532 万/g でやや多いといえる (第1表)。なお pH は 6.6 ~ 6.8 の範囲にあつた。また血液寒天平板上における出現細菌の分布は, 第2表に示すごとくで, 特殊な細菌叢は見出しえなかつた。ヒスタミン量は検体により異なり, 最高 4.8mg/g より最低 1.6mg/g の範囲にあつた (第1表)。なお検体中に存在するアミノ酸, アミン類を検討する意味でペーパークロマトグラフィーによる検索を実施した。即ち塩酸メタノール抽出物質について, ペーパークロマトグラムによる分析を試みたのであるが, その検索されたスポットは第1図のごとくであり, その中に顕著にヒスタミンの存在を認められるほか, いくつかのスポットを認めた (濾紙は東洋濾紙

第1図 ペーパークロマトグラムによる分析

No. 50, ブタノール 酢酸 (ブタノール 4, 酢酸 1, 水 2), フェノール (80% フェノール) による二次展開後にニンヒドリン試薬で発色)。

大体サンマ桜乾中毒の検体, あるいは実験的に製造したサンマ桜乾では, 3.2 mg/g 以上のヒスタミン量が存在しているときに, 25~35 g 程度の摂取で発症するという経験から, C 検体を除き, 大体ヒスタミン量より推定すると, 入手したイワシミリン乾は, 発症原因食品となりうると考えられる。

3. 検査検体が中毒原因検体であるかの確認

入手したイワシミリン乾が中毒検体であるか否かについて検討する意味で一応 B 検体を用いて動物実験を実施した。即ち, 塩酸メタノールで抽出した浸出液を蒸発皿で濃縮乾固した後に, 溜水で抽出し, エーテルで脱脂した粗毒についてモルモットの皮下注射による毒性試験を試みた (粗毒液の材料 g 当りに対しての毒性を示す)。

検体量に換算して 1.0 g, 0.3 g をモルモット 3 匹ずつに皮下注射の結果, 1.0 g 注射群はいずれも注射直後より不安状態になり, 四肢麻痺が起り, 呼吸困難状態で 5~7 分で斃死した。0.3 g 注射は排尿, 排便をして, 興奮状態を起し, やはり 15 分後で斃死した。この所見はサンマ桜乾中毒の場合と同様であつた。

更に A 及び B 検体の 25 g を 28 才男子に米飯とともに摂取せしめたところ, 10 分後に顔面の発赤紅潮, 軽度の頭痛をきたし, 顔面の発赤は全身に及ぶも蕁麻疹は認めなかつた。症状は 30 分後から漸次消褪し, 90 分後にはほとんど自覚症状がなくなり, 恢復した。以上 1 例であるが貴重な摂食試験成績と動物実験より, 検討を重ねている検体は明らかに中毒を発症せしめた検体であるということを確認した。

4. ヒスタミン生成菌について

本検体にヒスタミンが異常に蓄積していることが確認されたので, このヒスタミンを生成する微生物に関し検討した。

4 枚のサンプルの混合物を滅菌食塩水にいれ, よく振盪し, その 1 白金耳を山羊血液寒天平板にコンラジー棒で塗布して好氣的培養 (27°C), 嫌氣的培養 (37°C) を実施した。培養平板より出現した集落を釣菌した後, 生物性状の検査を実施して Bergey's manual (1948) の分類に従つて分類を試みたうえ, 菌の分布を求めた。好気培養平板の分離菌株の分布は第2表に示すごとく主要細菌は Micrococcus 属, Enterococcus 属及び酵母であつた。嫌氣的培養からは, 偏性嫌気性細菌として球菌を 1 株分

第2表 細菌分布(山羊血液平板による)

菌種	分離菌株数及びヒスタミン生成有無	株数(%)	ヒスタミン生成有無
<i>Streptococcus faecalis</i>		6(14.6)	—
<i>Micrococcus epidermidis</i>		8(19.5)	—
<i>Micrococcus auranticus</i>		10(24.4)	—
<i>Micrococcus citreus</i>		2(4.9)	—
<i>Micrococcus candidus</i>		4(9.8)	—
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>albus</i>		1(2.4)	—
<i>Aerobacter</i>		2(4.9)	—
<i>Hefe</i>		8(19.5)	—

離した。

分離菌41株についてヒスタミン生成の有無を検討したが、1株もヒスタジンよりヒスタミンを生成する菌株を認めることができなかった。

著者等がサンマ桜乾中毒(浜松市の事例)の原因菌であった *Proteus morganii* を分離した経験においても、普通平板分離法により原因菌を分離することは極めて困難であった。即ち製造後日数を経た材料の場合にはヒスタミン生成菌の付着菌量が極めて少ないといえる。本検体の場合も *Proteus morganii* が付着してヒスタミンが生成されたものと想定して、S. S.-broth に検体 2.0～3.0 g を入れて、増菌法を実施した後、S. S.-agar, E. M. B.-agar にて分離して、ヒスタミン生成菌の分離を試みた。その時の検体別にみた出現菌の状況は第3表に示すごとくであった。即ち *Proteus* 属, *Escherichia* 属, *Aerobacter* 属, *Acromobacter* 属であった。

本分離菌株におけるヒスタミン生成菌は、*Escherichia* 属に含まれるもののみで、検体Bを除く3検体より4株(No. 3 A, No. 8 A, No. 4 C, No. 2 D)を分離することができた。*Proteus* 属も分離できたが、菌種は、*Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* で、*Proteus morganii* は検出されなかった。ヒスタミン生成の *Escherichia* 属はいずれも同一生物性状を示し、第4表

第3表 細菌分布(S.S.-broth 増菌更に S.S.-agar 分離)

菌 株	検 体			
	A	B	C	D
<i>Proteus vulgaris</i>	3	3	4	4
<i>Proteus mirabilis</i>	4	1	5	3
<i>Escherichia</i>	2	0	1	1
<i>Aerobacter</i>	2	2	1	1
<i>Achromobacter</i>	1	0	0	0

第4表 No. 3 A 株の生物性状

一 般 性 状			
形 態	桿菌(0.5×1.0～1.5)	硫 化 水 素	—
グ ラ ム 染 色	陰 性	グ ル コーゼ	⊕
運 動 性	+(周毛)	ラ ク トーゼ	⊕
V. P. 反 応	—	マ ル トーゼ	⊕
M. R. 試 験	+	キ シ ローゼ	⊕
チトラート培地	+	ア ラ ビ ノーゼ	⊕
インドール試験	—	サ ッ カ ローゼ	—
硝 酸 塩 還 元	+	グ リ セ リ ン	—
リトマス牛乳	酸 性	ア ド ニ ッ トー ル	—
ゼラチン液化	—		

(代表菌として No. 3 A の性状) に示すごとくであつて、この性状より *Escherichia intermedium* と同定した。

本菌株 No. 3 A, No. 8 A, No. 4 C, No. 2 D についてそのヒスタジン脱炭酸酵素能の活性について検討を試みた。ヒスタジンを添加した一定培養基に増菌した4株の洗滌湿菌を、ヒスタジンを添加したフタル酸カリ緩衝液に作用せしめた際には、ルッター法でいずれもヒスタミン陽性の成績を得ることに成功した。上記ヒスタミン生成に関する実験法ではヒスタジン脱炭酸酵素能を有する菌株は自然界に多く存在するが、しかし、サンマエキス中でヒスタミンを生成する菌株は少ないことから、各菌株を魚肉エキスに接種して、ヒスタミンの生成を検討した。

生イワシの細かく切った 500 g に対し溜水 500 cc をもつて、肉汁をつくる場合と同様な処置により、イワシ浸出液をつくり、それに葡萄糖を1%添加して培養基とした。それらイワシ浸出液に No. 3 A, No. 8 A, No. 4 C, No. 2 D を植えてヒスタミンの定量を試みたところ、No. 2 D を除き原液で顕著にヒスタミンの存在を認めたが、No. 2 D はそれよりもややスポットが小さかった。以後 No. 3 A について主に実験を重ねた。イワシ浸出液中における No. 3 A のヒスタミン生成状況を *Proteus morganii* A Y を対照として検討した成績1例は第2図のごとくであった。即ち対照の *Proteus morganii* A Y 株では著明なヒスタミン産生が認められるが、No. 3 A ではしかし、1,200 r/cc (原液の12倍稀釈において、ルッター法でヒスタミンを検出し、24倍ではヒスタミンを認めなかった) までルッター法で認められた。即ち No. 3 A について数回同様な実験を重ねたが、1,200 r/cc まで検出した例は第2図に示す場合のみで、以後の実験

第2図 イワシ浸出液中におけるAY株、
No. 3 A株のヒスタミン生成量とpHの消長

成績では 400 ~ 200 r/cc の範囲で、回を重ねるに従いそのヒスタミン量は低下し、ある場合には 100 r/cc ということもあった。

また No. 3 A 株のヒスチジン以外のアミノ酸脱炭酸酵素作用について グルタミン酸、アルギニン、オルニチン、リジン、チロジン等を検討した結果、アルギニン、 γ -アミノ酢酸のみを生成することを認めた。

またヒスチジン脱炭酸酵素の湿菌の活性を検討するため、Warburg 検圧計によって実験した。この場合も前記実験と同様に *Proteus morganii* AY 株を対照として行つた。その成績は第3図のごとくである(菌量は *Proteus morganii* と同量)。即ち No. 3 A は AY 株に比してその活性は遙に弱いものであることを知つたが、この場合の同一培養菌のイワシ浸出液中の最高ヒスタミン生成量は 400 r/cc であった。

第3図 Warburg 検圧計による実験

No. 3 A 株を用い中毒復元検体を製造することは、上記のヒスタミン生成力が弱いことから不可能であると想像されるが、一応念のため、No. 3 A 付着のイワシミリン乾を製造したところ、ヒスタミン量は僅かに 100 ~ 200 r/g 程度であつた。しかしこの際の付着菌の消長を検討したところ、製造後においては本菌株は多数分離できたが、20°C 保存にて日数を経るに従い本菌の出現率は低下し、20 日後においては普通平板分離法では本菌の存在が認められぬ状態にあつた。3 A 株を用いたイワシミリン乾の製造後の No. 3 A の検体中における菌量は日を経るに従い減少していくことがみられたのであるが、このことは、著者等が検体より本菌を容易に分離することができなかった一つの裏付けになるものと考えられる。

5. イワシミリン乾とアレルギー様食中毒との関連

著者が分離したヒスタミン生成菌 *Escherichia intermedium* が本中毒の原因菌であるか否かの問題は別に検討することにして、ミリン乾となる魚類は、サンマ、イワシ、アジ等が主であるので、サンマの場合は解決されている関係上検討の必要はないが、イワシ、アジにおいてサンマ桜乾の原因菌 *P. morganii* AY 株によつてヒスタミン異常蓄積の加工品ができるか否かの検討を試みた。ミリン乾の製法は豊浦(秀世)が別に詳報するので省略するが、脊開きにしたイワシ(セグロイワシ)、アジを個々に AY 株を添加した調味液に 27°C で 24 時間浸漬した後、20 ~ 30°C で乾燥(2 日間)して、充分乾燥後アラビアゴムを塗布して製品とした。数回の実験成績の

第4図 実験的中毒イワシ、アジミリン乾
(*P. morganii*) の細菌数の消長

第5図 実験的中毒イワシ、アジミリン乾
(*P. morganii*)の $\text{NH}_3\text{-N}$ 量の消長

第6図 実験的中毒イワシ、アジミリン乾
(*P. morganii*)の pH, ヒスタミンの消長

うち1例における細菌数、pH、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 量及びヒスタミン量の状況を第4図、第5図、第6図として示した。細菌数はイワシ、アジともに浸漬中、乾燥中において増殖して、10億/g以上になるが、しかし $\text{NH}_3\text{-N}$ 量及びヒスタミン量はいずれもアジの場合はイワシの場合より下廻った状況にあった。大体サンマ桜乾の実験的中毒例の場合はヒスタミン量が3.2mg/g以上の存在がないところから考えると、アジのミリン乾では、イワシの場合よりヒスタミンを中心としたアレルギー様食中毒は起き難いといえるであろう。アジの場合においては、ヒスタミン量が2.0mg/g以上に認められる場合は、私共の実験ではなかった。イワシはサンマと同様に、*P. morganii*のような強力なヒスタミン生成菌が製造時付着すれば、アレルギー様食中毒の原因製品となりうる可能が大である。なお目下林(充)は各種魚類につき、*P. morganii*を用いて、そのヒスタミンの状況を検討しているが、アジ浸

出エキス中でもヒスタミン産生が低いことを認めている。

考 按

本邦で初めて中毒症例として認められた東京都のイワシミリン乾食中毒は、私共の調査及び実験成績によれば、明らかにいわゆるアレルギー様食中毒であることが確認された。アレルギー様食中毒の主働原因物質である異常なヒスタミンを産生する菌が *P. morganii* であるということは当研究所の研究で初めて明らかにされたものである。しかしヒスチジンよりヒスタミンを生成するアミノ酸脱炭酸酵素を有する菌種の分布は極めて広いことが判明しているため、ヒスタミンの異常生成が必ずしも *P. morganii* のみによると限定しうる現況には至っていない。相磯教授等によつて、*Escherichia* 属で、*P. morganii* と劣らぬ強い脱炭酸酵素作用を有する菌株が分離されていることからいえるのである。本中毒検体からはヒスタミン生成作用が強くかつ安定な *P. morganii* のごとき菌を検出することはできなかったが、4検体のうち3検体よりヒスタミン生成菌である *Escherichia intermedium* 4株を分離することができた。しかし、この分離した菌株はヒスタミンを生成するが、各種の実験より中毒検体に認められるほどのヒスタミン量を生成することのないことは明らかであり、また中毒復元試験もできなかったため、本菌株が主働原因物質ヒスタミンを異常に生成する原因細菌と断定することはできない。しかしこの点につき更に考察を試みてみる。*P. morganii* のヒスチジン脱炭酸酵素能が強力であり、かつその作用が極めて安定で、累代培養によつてもほとんどその酵素活性を低下せしめないことは著者等は経験しているところであり、また相磯教授等の実験成績もある⁶⁾⁷⁾。しかしその反面、ヒスチジン脱炭酸酵素作用を有する *Escherichia coli*, *Micrococcus* 等が分離当初はその活性が強くても累代培養を重ねると、その活性が甚しく低下することも相磯教授等が指摘しているところである。

これらの点を考慮すれば、私共の分離した *E. intermedium* もこの中毒検体の製造時に付着したときはヒスチジン脱炭酸酵素作用が強く、中毒検体となりうるまでのヒスタミン生成作用を有しており、分離後、累代培養も実施していることから、ヒスチジン脱炭酸酵素の活性が実験時には低下したためにかかる弱い作用の状態に陥つたのではないかという考慮もできうる。事実、実験を重ねるに従い、分離当初より現在では更に活性が低下

し、4株中のNo. 2 Dはヒスタミンの生成を認められなくなっている。また分離後最初のヒスタミン生成能の実験でも4株の分離菌株の間にヒスタミンの生成の程度の差異が認められた。なお一般好気性腐敗細菌でのヒスタミン生成株の分布は広く、ヒスチジン酵母エキス培地に増殖させて脱炭酸酵素を産生させた洗滌湿菌を、ヒスチジン、フタル酸カリ緩衝液に浮遊させて作用せしめた場合のヒスタミン検出率は高いが、しかしその陽性菌株も、サンマエキスでのヒスタミンの生成はほとんど *P. morganii* に限定されていることを、豊浦(秀世)が指摘している。このことから考えると、分離ヒスタミン生成株はそれらの菌株より一応ヒスタミン生成作用が強い菌で、特に好条件下でヒスタミンを1,200 7/ccまで生成している点を併せ考えると、比較的特殊な菌株といえるものとも考えられる。更に先に述べたごとく相磯教授が *Escherichia* 属の1菌株に *P. morganii* と同様に強力なヒスタミン生成を認めた事実も考慮のうちにに入れてもよい。

また本菌株が4検体のうち3検体から分離しえたことも本中毒との関連が考慮される。以上のことから本中毒におけるヒスタミンの異常蓄積の原因細菌は *Escherichia intermedium* No. 3 A等ではないかと推定する次第である。

なおイワシミリン乾がヒスタミンに基くアレルギー様食中毒を起しうるものであるか否かを *P. morganii* をもって実験した成績によると、サンマ桜乾と同様な条件で充分中毒原因検体となりうる製品ができることも明らかにした。しかしアジのミリン乾では比較的ヒスタミンの生成が減少していることより、特殊な場合を除けば、アレルギー様食中毒は起り難いであろうということも明らかにした。

総 括

昭和31年3月東京都下でイワシミリン乾(千葉県片貝町製品)によるいわゆるアレルギー様食中毒の発生があり、その検体と推定される残品につき、そのヒスタミン

及びその生成菌に関して検討を実施した成績を要約する。

1) 実験に供したイワシミリン乾は中毒発症検体であることを、人の摂食試験と、動物実験で確認した。本中毒の発症状況は全くいわゆるサンマ桜乾中毒と同様であった。

2) 検体は官能検査成績及び塩基性アンモニア窒素量から考慮して、腐敗したものとはいえないものであった。この検体には、ヒスタミンが4.8~1.6mg/gの範囲に存在していた。

3) 検体より増菌法によりヒスタミン生成菌4株を分離したが、分離菌株はいずれも同一菌種で *Escherichia intermedium* であった。しかしそのヒスチジン脱炭酸酵素の活性は、サンマ桜乾中毒検体より分離した *P. morganii* より弱く、かつ安定性がなかった。

4) 本中毒検体のヒスタミン異常生成の原因菌は分離菌 *Escherichia intermedium* と推定されるが、しかし累代培養によりヒスタミン生成能が低下するために確認はできなかった。

5) *P. morganii* を用いてイワシミリン乾を実験的に製造したところ、その製品はアレルギー様食中毒の検体となりうることができた。

本研究は昭和31年度文部省科学研究費(試験研究)によつて実施された。なお本中毒検体の入手及び疫学的調査に関しては東京都立市場検査所の協力を得た。同検査所に対し感謝の意を表する。

主 要 文 献

- 1) 宮木、林他：腐敗研究所年報。6, 90(1954)。
- 2) 宮木、林他：薬学雑誌。74, 1145(1954)。
- 3) 林：薬学雑誌。74, 1148(1954)。
- 4) 相磯、柳沢：日本医事新報。10, 1015(1955)。
- 5) 柳沢等：腐敗研究所報告。6, 55(1953)。
- 6) 相磯等：細菌学雑誌。10, 1015(1955)。
- 7) 相磯等：細菌学雑誌。11, 517(1956)。

(受付：1956年11月12日)