=調 査=

イカ塩辛における塩分濃度と腸炎ビブリオおよび一般細菌の汚染との関係

中 口 義 次

(京都大学東南アジア研究所)

(受付: 平成23年9月16日)

(受理: 平成24年7月28日)

The relationship between Salt Concentration and Contamination by *Vibrio parahaemolyticus* and Standard Plate Count Bacteria of Fermented Squid

Yoshitsugu NAKAGUCHI

(Division of Human-Nature Dynamics, Center for Southeast Asian Studies, Kyoto University,
Shimoadachi-cho, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501)

緒 言

2007年9月、宮城県の水産食品加工業者が製造したイカ塩辛による大規模な腸炎ビブリオ食中毒が、関東9都県の広範囲にわたって発生し、患者数が620名と報告された³⁾。

腸炎ビブリオは、海洋性で好塩性のグラム陰性細菌で、増殖速度が極めて速く至適条件下では10分以内に分裂し増殖する。また本菌の生育には0.5~8%の塩分が必要であり、その生息域は海水中および汽水域である。その活動は水温が15℃以上で活発になるため、わが国では主に夏に分離され、夏の食中毒原因細菌として知られている。

イカ塩辛とは、加熱処理されていない鮮度の良いイカを使用して、イカの胴肉と肝臓（キモ）、食塩、必要に応じてその他の調味料を加えることにより作り出される伝統食品である¹⁾。古く冷蔵庫のない時代に、魚介類を保存するために考案されたものが塩辛などの塩蔵食品である。伝統的なイカ塩辛は、15%程度の食塩を加えて腐敗を防ぎながら、イカの肝臓に含まれる自己消化酵素の働きにより旨みを醸成させる食品である。10%以上の塩分濃度では腐敗菌や食中毒菌の増殖が抑えられるので、常温保存が可能になる²⁾。しかし近年の減塩志向の影響から、現在ではイカ塩辛として一般的に販売されている商品の多くは、5%前後の低い塩分濃度のものである。

この塩分濃度5%前後のイカ塩辛は塩辛さが減り、口あたりが良く、低年齢層にも受け入れられている。大規模食中毒の原因となったイカ塩辛はこの減塩タイプのイカ塩辛であり、汚染した腸炎ビブリオの増殖に適していたと考えられている。

そこで近年市販されているイカ塩辛と家庭で一般的に作製されている自家製イカ塩辛について、塩分濃度、腸炎ビブリオ汚染および一般細菌数を調査し、またイカ塩辛中での腸炎ビブリオの増殖を検討した。

材料および方法

1. イカ塩辛とその塩分濃度

供試したイカ塩辛のうち、市販品については京都市内のスーパーマーケットで6品を入手した（表1）。自家製のイカ塩辛（低塩分）については、スルメイカを購入し、その胴肉、肝臓および食塩を使用し、保存料、調味料および着色料は添加せずに、調理して作製した^{4,5)}。それぞれのイカ塩辛の塩分濃度については、塩分濃度測定計（C-121, 堀場製作所）により測定した。

2. 腸炎ビブリオ菌株

腸炎ビブリオ菌株には、病原性（耐熱性溶血毒および耐熱性溶血毒類似溶血毒）を有する患者分離菌株（AQ3776, O10:K71血清型）を実験に供した。本菌をL-broth（ナカライテスク）にて37℃で約18時間振とう培養し、その培養液をL-brothを用いて段階希釈を行い、さらにLB寒天培地（ナカライテスク）上に接種して37℃で一晩培養した。そして培地上に生育した集落の数

*1 〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町46

表1. 供試したイカ塩辛

イカ塩辛	製造会社	製造場所	購入場所	原材料	食塩相当量 (g/食品100g)	実測塩分濃度 (%)
商品A	G社	北海道	Lスーパー	いか、いか内臓、食塩、みりん、砂糖、ソルビット、pH調整剤、調味料（アミノ酸等）、着色料（紅麹）、増粘多糖類	4.7	4.7
商品B	H社	北海道	Lスーパー	いか（函館産）、食塩、いかの肝臓、魚醤、酵母エキス、ソルビット、酒精、調味料（アミノ酸）、酸味料、増粘多糖類、着色料（紅麹、パブリカ）	5.0	6.0
商品C	G社	北海道	Mスーパー	いか、いか内臓、食塩、みりん、砂糖、ソルビット、調味料（アミノ酸）、pH調整剤、着色料（紅麹、パブリカ色素）、増粘多糖類、（原材料の一部にゼラチンを含む）	5.2	4.4
商品D	I社	北海道	Nスーパー	いか、食塩、還元水飴、たん白加水分解物、ソルビトール、pH調整剤、調味料（アミノ酸等）、酒精、着色料（紅花黄、カロチノイド、紅麹、ラック）、増粘剤（キサンタン）、（原材料の一部に乳、大豆を含む）	記載なし	3.9
商品E	J社	京都府	Oスーパー	いか、食塩、みりん、ソルビット、調味料（アミノ酸等）、アルコール、pH調整剤、リン酸塩（Na）、増粘剤（キサンタンガム）、着色料（紅麹）、香辛料	記載なし	5.9
商品F	K社	北海道	Pスーパー	いか、食塩、みりん、発酵調味料、調味料（アミノ酸等）、グリセロール、ソルビット、酒精、甘味料（甘草）、安定剤（キサンタン）、酸化防止剤（ビタミンE）	17.3	18.0
自家製	自家製	石川県 （イカ産地）	Oスーパー （イカのみ）	いか、いかの肝臓、食塩（天然塩）	4.2	4.5

から培養液1 mlあたりの菌数を求め、イカ塩辛への腸炎ビブリオの接種実験に用いた。

3. 細菌培養用培地と腸炎ビブリオ選択分離培地

一般細菌数を調べるために標準寒天培地（日水製薬）を使用し、好塩性細菌と一般細菌の菌数を調べるために1%の食塩を加えた1%加NaCl標準寒天培地を使用した。腸炎ビブリオ選択分離培地であるTCBS寒天培地およびCHROMagar Vibrioは、腸炎ビブリオの菌数のみを調べるために使用した。すべての寒天培地は37℃で18時間培養した。

4. イカ塩辛への腸炎ビブリオ接種および菌数測定

腸炎ビブリオ菌株のL-brothを用いた一晚培養液から、1 mlあたり 10^7 の菌数になるように滅菌生理食塩水を用いて調整した。そして表1に示す6品の市販品および1品の自家製のイカ塩辛のそれぞれ100 gにその1 mlを接種して、イカ塩辛1 gあたりの腸炎ビブリオの菌数を 10^5 cfuとした。また同時に腸炎ビブリオを接種しないイカ塩辛を用いて腸炎ビブリオの汚染を調べた。イカ塩辛を冷蔵庫に入れずに室内に放置したままの状態を想定して、イカ塩辛を25℃で培養した。菌数測定のためのサンプリングは、培養開始後、0, 6, 12, 24および48時間目を実施された。サンプリングしたイカ塩辛(10 g)は90 mlの滅菌生理食塩水と混合し、さらに滅菌生理食塩水で段階希釈を行った。そしてその段階希釈溶液を標準寒天培地、1%NaCl加標準寒天培地、CHROMagar Vi-

brioおよびTCBS寒天培地上に直接平板培養法にて100 mlずつ塗抹し、37度で18時間培養して一般細菌数および腸炎ビブリオの菌数を求めた。本実験は同じイカ塩辛製品を供試して3回実施された。

結果および考察

1. 市販品のイカ塩辛の塩分濃度

供試した市販のイカ塩辛6品は、低塩分イカ塩辛といわれる塩分濃度が5%前後のイカ塩辛が5品、伝統的なイカ塩辛といわれる塩分濃度が10%以上のものが1品であった（表1）。どの商品においても、原材料や賞味期限（未開栓）などの基本的な情報は記載されていた。また4品で塩分相当量が記載されていた（表1）。塩分濃度計で実測した値は、記載されている塩分相当量に近いものであった。これらの結果から、現在、流通量の多いイカ塩辛は、塩分濃度が10%以上の伝統的なイカ塩辛ではなく、塩分濃度が5%前後の低塩分のイカ塩辛であった。なお、保存方法には低塩分イカ塩辛では、「要冷蔵」が記載されているのに対し、塩分濃度が10%を超えるイカ塩辛では、「直射日光を避けて保存」と記載されていた。

2. 市販品のイカ塩辛における腸炎ビブリオおよび一般細菌

市販の低塩分および高塩分のイカ塩辛において、腸炎ビブリオおよび一般細菌の汚染状況と腸炎ビブリオ接種

図1. 市販低塩分イカ塩辛中での腸炎ビブリオおよび一般細菌の検出
各時間で検出された菌数を平均値±標準偏差で示す。

図2. 市販高塩分イカ塩辛中での腸炎ビブリオおよび一般細菌の検出
各時間で検出された菌数を平均値±標準偏差で示す。

後のイカ塩辛中での菌数の変化をそれぞれの製品で3回ずつ調べた。表1に挙げた市販品の塩分濃度が5%前後の低塩分イカ塩辛（商品A-E）では、結果の傾向が同じであったため、商品Cを代表として結果を図1に示した。腸炎ビブリオの接種および非接種の両方で、一般細菌数に差は見られなかった（図1AとB）。また培養時間の増加により、腸炎ビブリオの接種および非接種の両方で一般細菌数の増加が見られ、0時間と比べると48時間では、約1,000倍に一般細菌数が増加していた（図1AとB）。一方、腸炎ビブリオ選択培地上では、腸炎ビブリオの接種直後の0時間でのみ、腸炎ビブリオが検出されたが、培養時間が増加すると検出されなくなった（図1CとD）。また腸炎ビブリオ非接種のイカ塩辛では腸炎ビブリオは全く検出されなかったことから、この市販品の低塩分イカ塩辛には腸炎ビブリオの汚染が確認されなかった。

次に、市販品の塩分濃度が約18%の高塩分イカ塩辛（商品F）では、腸炎ビブリオの接種および非接種の両方で、培養時間が増加しても一般細菌数の大きな変化は見られなかった（図2AとB）。一方、腸炎ビブリオ分離選択培地上では、先の低塩分イカ塩辛と同じく腸炎ビブリオの接種後0時間でのみ、腸炎ビブリオが検出された（図2CとD）。また腸炎ビブリオ非接種のサンプル

からは腸炎ビブリオは検出されず、この市販品の高塩分のイカ塩辛でも、腸炎ビブリオの汚染は確認されなかった。

低塩分および高塩分の両方のサンプルを比較すると、培養0時間の一般細菌数で約10倍の差があり、低塩分のイカ塩辛に含まれる一般細菌数が多いことがわかった（図1Aと図2A）。また両タイプの市販品ともに、10⁵の菌数で腸炎ビブリオを接種しても、時間の経過とともに腸炎ビブリオの生存が確認できなくなった。2007年に市販品の低塩分のイカ塩辛を原因食品とした腸炎ビブリオ食中毒が大規模に発生したことを考えると、少なくとも低塩分のイカ塩辛では、腸炎ビブリオがある程度の菌数で維持されるか、もしくは菌数が増加すると考えられたが、今回使用したサンプルではそれらのことは確認されなかった。

3. 自家製低塩分イカ塩辛における腸炎ビブリオおよび一般細菌

原材料としてスルメイカと天然塩のみで作製された自家製のイカ塩辛の塩分濃度は4.5%であった（表1）。このイカ塩辛において、腸炎ビブリオおよび一般細菌の汚染と腸炎ビブリオ接種後の菌数の変化を3回調べた。培養時間の増加にともない一般細菌数が増加し、市販品の低塩分イカ塩辛と同様の傾向が見られた（図3AとB）。

図3. 自家製イカ塩辛中での腸炎ビブリオおよび一般細菌の検出
各時間で検出された菌数を平均値±標準偏差で示す。

また1%NaCl加標準寒天培地上では標準寒天培地と比べて、相対的に高い菌数であった（図3 AとB）。これはスルメイカに付着していた好塩性細菌が、1%NaCl加標準寒天培地上で検出された結果であると考えられた。そして市販品の低塩分および高塩分の両タイプにおいて、このような傾向が見られなかったのは、水産食品加工業者がイカ塩辛を製造するときに、イカに付着している海洋性で好塩性の細菌をイカの洗浄の過程で除去しているためであることが一因として考えられた。腸炎ビブリオ接種のサンプルでは、培養時間が24時間まで腸炎ビブリオを検出することができた（図3 CとD）。培養時間が長くなるに従って腸炎ビブリオの菌数は減少し、48時間後では検出できなくなった。また市販品の両方のタイプでは、培養が6時間で接種した腸炎ビブリオが検出できなくなったが、自家製イカ塩辛ではその減少は緩やかであった。これは腐敗防止や日持ち向上のために、市

販品のイカ塩辛に加えられている食品添加物の影響などの可能性が考えられる。

さらに、大規模食中毒の原因となったイカ塩辛から分離された菌株は血清型がO3:K6で耐熱性溶血毒が陽性であった³⁾。今回の接種実験に使用した腸炎ビブリオ菌株は特徴がよく調べられている菌株であったが、血清型はO3:K6型ではなかった。菌株の血清型などの特性の違いにより、イカ塩辛中での増殖に違いがある可能性も考えられる。

要 約

市販の低塩分および高塩分イカ塩辛および自家製低塩分イカ塩辛において、腸炎ビブリオの汚染と一般細菌数の変化を検討した。いずれのイカ塩辛においても、腸炎ビブリオの汚染は確認されなかった。市販品および自家製の低塩分イカ塩辛を25℃で培養すると一般細菌数が48時間で1,000倍近くまで増加したが、高塩分のイカ塩辛では一般細菌数は一定に維持されていた。それらのイカ塩辛に腸炎ビブリオを接種して、その増殖を検討したが、どのタイプのイカ塩辛においても、腸炎ビブリオの菌数の増加は見られず死滅した。本研究において低塩分のイカ塩辛でも腸炎ビブリオが死滅したことから、その生育および増殖の要因としてイカ塩辛の塩分濃度だけでなく、水分活性や添加物の影響も検討する必要があると考えられた。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、研究助成金を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団（助成番号0919）に深謝いたします。

文 献

- 1) 藤井建夫：塩辛・くさや・かつお節. p.31-52, 恒星社厚生閣, 東京 (1992).
- 2) 藤井建夫：魚の発酵食品. p.16-31, 成山堂書店, 東京 (2000).
- 3) 加藤浩之, 高橋恵美, 佐々木ひとえ, 小林妙子, 菅原優子, 谷津壽郎, 齋藤紀行：イカ塩辛による腸炎ビブリオ食中毒事例. 宮城県保健環境センター年報, 第26号, 48-50 (2008).
- 4) 内山高典, 室橋裕和：手作りの味 塩辛づくり. p.18-42, 雄鶏社, 東京 (2002).
- 5) 臼井一茂：塩辛づくり隠し技. 創森社, p.35-50, 東京 (1996).