いずしと E 型ボツリヌス中毒

阪 口 玄 二

(日本食品分析センター大阪支所)

“Izushi” and Type E Botulism

Genji SAKAGUCHI

(Japan Food Research Laboratories, Osaka Branch,
3-1 Toyotsu-cho, Suita, Osaka 564)

Key words: いずし, E 型ボツリヌス中毒, 抗毒素血清, スターター, 血出し

我が国最初のボツリヌス中毒事例は, 1951 年北海道岩内郡島野村で起こったニシンのいずしによる E 型中毒で, 患者 14 名, 死者 4 名を数えた. この岩内の事例以前に世界中で報告された E 型中毒は 5 事例 (米国本土で 3 事例, アラスカ州で 1 事例, カナダで 1 事例) のみであった. 我が国では現在までにボツリヌス中毒 109 事例, 患者数 511 名, 死者数 113 名が報告されている. A 型中毒は 5 事例, B 型中毒は 2 事例, 毒素型不明は 1 事例あり, 残りの 101 事例はすべて E 型中毒である (表 1). 我が国は世界一の E 型ボツリヌス中毒多発国であり, その原因食品のほとんどがいずしであるのが特徴である.

すし (鮓, 鮓, 寿司) の歴史は古く, 延喜式 (947 年) によればすしは塩漬けた魚介類を発酵させた保存食であった. 慶長年間 (1596~1615) に発酵を早めるため米飯を加えた馴れずしが現れた. 米飯に酢を加えさらに早くすしを作る方法が考案され, 早ずし, 一夜ずしと呼ばれる押しずしができ, 米飯と一緒に食べるようになった. 早ずしよりさらに早くできる現在の握りずしが考案されたのは江戸時代後期で, 発酵させたり, 押ししたりする必要がない握りずしがすしの主流となった. 握り寿司, 巻きずし, 押しずし, 散らしずし, 蒸しずし, 稲荷ずしなどが早ずしに属し, フナずし, ハスずし, いずし (いずしとは飯ずしのことである), アユずし, かぶらずしなどは馴れずしに属する. 米飯に酢を加え, 発酵時間を短縮した柿の葉ずし, 朴葉ずし, マスずしなどは中間型と分類される (表 2). 現在, 握りずしがすしの主流であるが, 馴れずしの愛好家も多く, 珍重されており, 今日でも自家製いずしでまれに E 型ボツリヌス中毒が発生している.

今回は, E 型ボツリヌス菌, 毒素, 中毒の基礎的知見を見直し, いずし製法各段階における問題点を分析し, これを制御する方法を作り, いずしの安全性を保証する

製法 (HACCP) の私案を紹介してみたい.

ボツリヌス菌の性状を表 3 に示す. E 型ボツリヌス菌はグラム陽性, 嫌気性桿菌で, 芽胞を形成し, 特異的神経症状を起こす蛋白毒素を産生する. 菌体周囲に多数の鞭毛を持ち活発に運動する. グルコース, フラクトース, マルトース, スクロース, ソルビット, マンノースを分解し, 酸とガスを産生する. ラクトース, ラフィノース, マンニット, ラムノース, ガラクトース, ツルチットは分解しない. 蛋白分解性はなく, ゼラチンも液化しない. A 型菌, B 型菌と異なる点は毒素の抗原性以外に, スクロース, マンノースを分解することと, ゼラチンを液化しないことである. E 型菌は低温嗜好性があり, 至適増殖温度は 20~30℃ で, 6℃ 以下でも増殖し毒素を産生する. E 型芽胞を接種したビーフシチューを 3.3℃ で保存した時, 31~45 日目に毒素が検出された. E 型菌の芽

表 1 我が国におけるボツリヌス中毒の発生 (1951-1995)

	事例数	患者数	死者数	致死率 (%)	毒素型*	発生地
1951-1975	75	414	99	33.1	B(1)	宮崎
1976	2	5	1	20.0	A(1)	東京
1977	5	6	1	16.7		
1978	4	6	0			
1980	1	1	0			
1981	1	2	0			
1982	2	3	0			
1983	1	1	0			
1984	4	44	11	25.0	A(1)B(1)	14 都府県, 栃木
1985	1	1	1	100		
1988	2	4	0		A(1)	岡山
1989	3	6	0			
1991	3	3	0		A(1)	広島
1993	2	5	0		A(1)	秋田
1995	3	10	0			
合計	109	511	113	22.1		

* 記載事例以外は E 型

表2 すしの諸形態

分 類	製 法	品 名
馴れずし	魚+塩（発酵長時間） 魚+米飯+塩（発酵数週間） 魚+米飯+塩+麴+野菜（発酵数週間）	平安時代の鮓 フナずし、ハスずし、アユずし いずし、切り込み、カブラずし
中間型	酢+米飯+魚（発酵短時間）	押しずし、箱ずし、柿の葉ずし、 姿ずし、朴葉ずし、マスずし
早ずし、一夜ずし	酢+米飯+魚（発酵なし）	押しずし、箱ずし、さば姿ずし いなりずし 巻きずし ちらしずし 蒸しずし 握りずし

表3 ボツリヌス菌の生物性状による群分け

性 状	I 群	II 群	III 群	IV 群
毒素型	A, B, F	B, E, F	C, D	G
イノシット	—	—	+	—
マンノース	—	+	+	—
スクロース	—	+	—	—
タンパク分解能	+	—	—	+
ゼラチン分解能	+	—	+	+
芽胞の耐熱性	120°C 4 min	80°C 30 min	100°C 30 min	
至適増殖温度	37–39°C	28–32°C	40–42°C	
最低増殖温度	10°C	3.3°C	15°C	
毒素の活性化	—	+	—	+

表4 E型菌（天王株）の増殖と毒素産生に及ぼす pH の影響（BHI ブイヨン，30°C 46 hr 培養）

pH	増殖 (μ g 蛋白 / ml)	毒素 (MLD/ml)		
		遠心上清		遠心沈殿 活性化
		未処理	活性化	
5.53	0	0	0	0
5.89	430	16	4,100	4,100
6.09	535	32	8,200	16,000
6.58	599	130	16,000	16,000
6.93	631	1,000	16,000	4,100
7.38	603	4	1,000	8,200
7.76	535	4	260	130
8.13	469	2	64	260
8.57	453	0	0	130
8.85	0	0	0	0

胞の熱抵抗は低い。菌株により差はあるが、 D_{80} 値（80°C での加熱で 90% 死滅するのに要する時間）は 0.3～1.25 分である。多くの場合、 10^7 個の芽胞は 80°C 6 分の加熱で検出できなくなる。E 型芽胞を接種したニンシンを酢漬け（pH 4.0～4.8）にした場合に数週間後に毒素が検出されたという報告があるが、増殖できる pH 域は 5.9～8.6 の範囲内であり、pH 5.5 以下、8.9 以上では増殖できない（表 4）。これに対し、A 型、B 型菌は pH 4.6 でも増殖できる。

肝臓ブイヨンで 37°C で培養した時 A 型菌は食塩 7.3%、B 型菌は 6.3% 存在しても増殖できるが、E 型菌は 30°C で食塩 3.9% 存在下では増殖するが、4.1%では

表5 E型菌の食塩耐性*

食塩 %	<10°C	15.5–29.5°C	36.6°C
3.5	+	+	+
4.0	+	+	—
4.5	—	+	—
5.0	—	—	—

* TPG 培地，pH 7.0. E 型菌 4 株の結果 (Segner, 1964)

増殖できない。また 10°C では、食塩 4.0% 存在下で増殖するが、4.5%では増殖できず、15.5～29.5°C では、食塩 4.5% 存在下で増殖するが、5% では増殖できない。36.6°C では 3.5% では増殖するが、4.0% では増殖できない（表 5）。

E 型菌の毒素産生は著しく低く、A 型、B 型菌の培養液は 10^6 LD₅₀/ml（1 ml にマウス腹腔注射による 50% 致死量の 100 万倍が含まれる毒力）に達するが、E 型菌はその 1/200 の 5×10^3 LD₅₀/ml を超えることはまれである。いずしから分離した嫌気性の雑菌を E 型菌と混合培養すると E 型菌の毒力が著しく増加することが分かり（図 1）、毒力の低い E 型毒素（毒素前駆体）が雑菌の蛋白分解酵素の作用で著しく増加する（活性化）ことを報告したのは 1955 年であった。翌 1956 年には消化酵素のトリプシンが E 型毒素を活性化することが明らかにされた。E 型毒素の活性化は試験管内だけでなく、消化管内でも起こることが証明され、毒力の低い E 型毒素による中毒でも、発病率、致死率は A 型、B 型中毒と差がないことが説明された。

E 型毒素（分子量 30 万）は他の型の毒素同様、毒性成分（分子量 15 万）1 分子と無毒成分（分子量 15 万）1 分子の複合体（M 毒素）（分子量 30 万の毒素を M 毒素、50 万の毒素を L 毒素、90 万の毒素を LL 毒素と名付けた。なお分子量 15 万の遊離毒性成分は S 毒素とも呼ばれる）で、A 型、B 型毒素のような分子量 90 万の LL 毒素や 50 万の L 毒素は見られない。無毒成分の結合によって、ペプシン感受性の毒性成分をペプシン耐性にし保護する。遊離の毒性成分は経口毒となり得ないが、複合毒素のみが経口的に中毒を起こすことができる。いずし中に産生された E 型毒素は分子量 30 万の複合型であ

図1 E型ボツリヌス菌(天王株)と雑菌(#13株)の混合培養によるE型毒素の増強

図2 E型ボツリヌス毒素活性化に伴う分子構造の変化

ることも証明されている(図2)。

ボツリヌス中毒の潜伏期は通常8~36時間と云われる。E型中毒の場合はこれより短いことが多い。表6に示したように、症状は他の型の中毒と同じで、視力障害、複視、羞明、瞳孔散大、眼瞼下垂、喉・口・舌の乾き、嚥下困難、全身倦怠感、発声困難、目まい、腹痛・腹部膨満感、呼吸困難、筋弛緩などである。呼吸麻痺により死亡する。最期まで意識障害は見られない。

ボツリヌス毒素が患者の血中から証明されることが米国での燻製魚によるE型中毒の際、初めて報告された(1964)。現在、ボツリヌス中毒の診断は患者の血清と大便および食べ残しの食品抽出液をマウスの腹腔に注射し毒素を検出し、型特異抗毒素血清を用いる中和反応で型

別して行われる。

1961年北海道庁の委託で、予研において治療用ウマ抗毒素血清を製造し、同年12月完成した。1962年6月、北海道天塩郡豊富町で喫食者110名、患者55名、死者1名という当時世界最大規模のE型中毒が発生した。原因食品は1業者の製造したニシンの切り込みであった。1名は抗毒素血清の注射前に死亡したが、重症者15名、中等症者26名が抗毒素(2,600~8,000国際単位)(E型抗毒素1国際単位は約5,000LD₅₀を、他の型の抗毒素1単位は約50,000LD₅₀の毒素を中和する)の注射を受け全員治癒した。これ以後、いずし中毒には抗毒素が注射されるようになり、約30%であった致命率は3%以下に低下した(表7)。抗毒素の治療効果、特

表6 ポツリヌス中毒の症状と徴候

毒素型	A	B	E	F	不明	計	%
事例数	34	15	10	1	44	104	100.0
患者数	97	46	36	3	90	272	100.0
症状							
1. 弱視, 複視, 羞明	31	13	9	1	40	94	90.4
2. 嚥下困難	27	14	3		35	79	76.0
3. 脱力感	22	12	4		22	60	57.7
4. 嘔気, 嘔吐	15	13	10	1	19	58	55.8
5. 発声困難	25	8	5		19	57	54.8
6. 目まい	8	4	5		15	32	30.8
7. 腹痛	5	6	3		7	21	20.2
8. 下痢	5	6		5		16	15.4
9. 尿閉	2	2	1		2	7	6.7
10. 咽頭痛	4	2	1			7	6.7
11. 便秘		2		1	3	6	5.8
12. 知覚異常	1					1	1.0
徴候							
1. 呼吸困難	32	7	7		30	76	73.1
2. 筋弛緩	23	9	3		13	48	46.2
3. 眼瞼下垂	16	9	3	1	17	46	44.2
4. 口渴	7	6	2		7	22	21.2
5. 瞳孔散大	3	4	2		8	16	15.4
6. 運動失調	3	1		1	4	9	8.7
7. 血圧低下			1		2	3	2.9
8. 眼球振盪	1		1		1	3	2.9
9. 傾眠			1			1	1.0

CDC, 1974

表7 E型中毒における血清療法の効果(北海道)

	摂食者	患者	死者	発症率 (%)	致死率 (%)
血清を使用しない例	282	137	39	48.5	28.5
血清を使用した例	221	111	9*	50.2	8.0

*うち5名は血清使用前に死亡

飯田広夫, 1971

に発症後の治療効果は当初は外国では全く信用されなかったが, 1963年米国テネシー, ケンタッキー, アラバマ州で起こった燻製魚によるE型中毒(患者17名, 死者5名)の際に効果が証明され, 現在では諸外国でも受け入れられている。

我が国ではE型中毒は, 1951年から1995年までに北海道(57事例, 患者316名, 死者53名), 青森(22事例, 患者43名, 死者10名), 秋田(14事例, 患者63名, 死者24名), 岩手(2事例, 患者8名, 死者5名),

表8 県別E型ポツリヌス中毒の発生状況(1951-1995)

都道府県	事例数	患者数	死者数	致死率	原因食品
北海道	57	316	53	16.8	いずし, 切り込み等
青森	22	43	10	23.3	いずし, サバ缶詰
秋田	14	63	24	38.1	いずし
岩手	2	8	5	62.5	いずし
山形	1	3	3	100	いずし, サバ缶詰
福島	3	5	1	20.0	いずし
滋賀	2	6	2	33.3	ハスずし
計	101	441	98	22.2	

山形(1事例, 患者3名, 死者3名), 福島(3事例, 患者5名, 死者1名), 滋賀(2事例, 患者6名, 死者2名)の7道・県で合計101事例が報告されている(表8)。E型中毒101事例の原因食品は, 88事例がいずし, 7事例が切り込み, 2事例がハスずし, 2事例がサバ缶詰, 1事例がすじこ, 1事例が燻製魚である(表9)。

いずしは生魚, 米飯, 麴, 野菜を容器に層になるように漬け込んで自然発酵させた馴れずしの一種である。いずし製造には種々の魚が用いられる(表10)。切り込みはいずしから米飯を除いたようなもので, 同様に自然発酵させたものである。ハスずしは材料の魚が琵琶湖産のハスで, 野菜は入れないが, 原理はいずしと同じ馴れずしで自然発酵させたものである。つまり, 合計101事例の内97事例は馴れずし類によるもの, 4事例はすし以外の魚, 魚卵加工品によるものであるといえる。水産物以外の食品によるE型中毒は報告がない。海外でのE型中毒の原因食品も殆ど魚, 魚卵, 海棲動物で, 例外は, 缶詰マッシュルーム・ソース(1941, 米国)と酢漬けハム, 酢漬け赤ピーツ(1961, ソ連)のみである。芽胞の易熱性のため缶詰によるE型中毒は極めてまれであるが, 米国で3事例, カナダで1事例, 我が国で2事例, ポーランドで4事例が報告されている。日本産マグロの缶詰による米国での中毒事例(1963)では, 缶の巻き締め不良による冷却水からの汚染が指摘された。

いずし, ハスずし, 切り込みの製造法は地域によりやや異なるが, (1)原料魚の調理(頭, 内臓の除去, ハスずし, フナずしでは塩漬け), (2)血出し(ハスずし, フナずしでは塩出し)(1~7日), (3)漬け込み(飯漬け)(魚, 米飯, 麴, 野菜, 塩), (4)熟成(発酵)(3~7週間)という4段階に分けられる。図3にいずし製造のフローチャー

表9 我が国のE型ポツリヌス中毒の原因食品(1951-1995)

	北海道	青森県	秋田県	岩手県	山形県	福島県	滋賀県	計
いずし*	48	21	14	2	0	3	0	88
切り込み*	7	0	0	0	0	0	0	7
ハスずし*	0	0	0	0	0	0	2	2
すじこ	1	0	0	0	0	0	0	1
魚燻製	1	0	0	0	0	0	0	1
魚缶詰	0	1	0	0	1	0	0	2
計	57	22	14	2	1	3	2	101

* 馴れずし類

表 10 E 型ボツリヌス中毒原因いずしのネタ

事例数	魚 種
17	カレイ
10	ハタハタ
3	サバ, サンマ, アジ
2	ニシン, イワシ
1	ウグイ, マス, サケ, ヤマメ, カワダイ, カナギ, タラ, スケソウダラ, ゴリ, メヌケ, アブラコ, コイ, ハゼ, ホッケ, オオナゴ

児玉栄一郎, 1996

図 3 いずし製造のフローチャート

死後における筋肉成分と肉の硬直度的変化

図 4 死後筋肉成分と肉の硬直度的変化 (CP: クレアチンリン酸, Δ7P: 1 N 塩酸中で 100℃ 7 min 加熱で遊離する高エネルギーリン酸化合物量)

トを示す。この4段の中で毒素産生が起こる可能性のあるのは(1), (2), (4)の3段階である。魚は淡水魚であれ、海水魚であれ消化管内にE型芽胞が存在する可能性は極めて高い。すべての魚はE型芽胞で汚染されていると

考えるべきである。原料の魚は新鮮なものを用いるのは当然であるが、内臓の除去は注意深く行い、肉の汚染を防ぐことが重要である。また、魚を長時間常温で放置して、血出し（または塩漬け）以前にE型毒素を産生する機会をつくってはならない。生存時の魚肉のpHは7.4付近にあるが、死直後から筋肉の解糖が始まり乳酸が産生されるのでpHが低下する。4時間後にはpH 6.3、6時間後にはpH 5.7、10時間後にはpH 5.4に下がる。pH 6.3になる時期と死後硬直の開始とほぼ一致する（図4）。すなわち硬直状態の魚ではE型ボツリヌス菌の増殖の可能性はほとんどないが、硬直が溶けpHが上昇する時に長時間常温で放置するとE型菌が増殖して毒素産生が起こる可能性がある。

(2)の血出しは、硬直が溶け、魚肉は柔らかくなり始め、pHも徐々に上昇していく時期で、pHが6を越え、常温で長時間血出しを行うとE型菌の増殖が起こる。したがってこの血出しの段階ではpHの調整も重要であるが、温度が増殖を決定する重要な要因となる。血出しを10℃以下で行うなら、例え魚肉のpHが6以上でも、7日以内に毒素が産生されることはないものと考えられる。いずし製造におけるE型毒素産生は魚の血出しの期間に起こるという北海道衛研の報告があるが、7日以内に毒素産生が起こるには、pH 6以上、温度は15℃以上が必要であろう。

毒素産生が起こりうる次の段階は(4)の熟成（発酵）の段階である。いずしの発酵は乳酸発酵であり、米飯中の糖の発酵が十分起これば、pHは4.0～4.5まで下がり、ボツリヌス菌は増殖できない。もし発酵が遅れ、pH 6以上、温度15℃以上が7日以上続けばE型菌の増殖と毒素産生も起こりうる。この段階では乳酸菌の増殖とボツリヌス菌の増殖との競争である。乳酸菌がボツリヌス菌を圧倒するには、ボツリヌス菌より大量の乳酸菌をスターターとして添加すればよいのである。昔からヨーグルト、チーズ、発酵ソーセージなどの製造には各種乳酸菌がスターターとして用いられている。北海道衛研の飯田 広、神沢謙三、唐島田 隆らは、いずしの乳酸発酵に関与する乳酸菌として *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus* などを同定し、これらの菌をスターターとして加えることを推奨した。いずし製造時に *S. lactis* を添加した場合、1日後にpH 6.0以下、3日目にはpH 5.0以下

表 11 熟成中のいずしの pH の変化

添加乳酸菌	pH		
	1 日目	3 日目	3 週間目
<i>Thermobacterium vulgare</i>	5.6	4.8	4.4
<i>Streptococcus lactis</i>	5.8	4.6	4.6
<i>Streptococcus cremoris</i>	6.0	4.8	4.8
3 種混合	5.6	4.8	5.0

カレイ 3.75 kg, ニンジン 375 g, 米 1.8 l, 麴 375 g, 食塩 550 g; 血出し 2 日, 20℃ 7 日—氷室, 神沢謙三, 飯田広夫, 1957

表 12 HACCP マスターシート
いずし

CCP	危害要因	予防法の 限界	測 定				修正法	記 録	確 認
			項 目	方 法	頻 度	測定者			
CCP1 原料魚	E 型ボツリ ヌス菌増殖	< pH 5.5	pH 外観	pH 計	すべての 個体	責任者	> pH 5.5 は 用いない	受け入れ記 録	監督者が毎 日
調理									
CCP2 血出し	E 型ボツリ ヌス菌増殖	< 10℃ pH < 6 < 3 日	温度 pH 日数	温度計 pH 計 日記	毎日 2 回 毎日 2 回	責任者	流水にする 酢酸を加え る	血出し記録	監督者が毎 日
飯漬け	E 型ボツリ ヌス菌増殖	< pH 6 食塩 > 4% 乳酸菌	pH 食塩 乳酸菌	pH 計 食塩 > 4% 米飯, 麴増量 乳酸菌添加	容器毎	責任者	酢酸 食塩 米飯, 麴 乳酸菌	飯漬け記録	監督者が毎 日
CCP3 発酵	E 型ボツリ ヌス菌増殖	pH < 6 < 20℃ < 3 週間	pH 温度 日数	pH 計 温度 日記	毎日 1 回 毎日 1 回	責任者	3 日目に > pH 5.5 は廃棄	製造記録	監督者が毎 日
包装									

下になることが証明されている (表 11)。

以上の考察から、いずし製造に HACCP system (一般には‘危害分析重要管理点方式’と訳されているが、著者は‘危害予測と不可欠制御項目方式’と訳している) (表 12) を導入し、(1) 材料の魚の調理、(3) 血出し、(4) 発酵 (熟成) の 3 段階を CCP (critical control point, 不可欠制御項目) とし、制御の限界として段階 (1) では原料魚は pH 5.5 以下のものを用い、(3) では血出しに用いる水の温度を 10℃ 以下、pH を 5.5 以下に保ち (温度、pH の測定は 1 日 2 回)、期間を 3 日以内とする。段階 (4) では *S. lactis* の培養をスターターとして添加、2 日以内に pH が 5.5 以下に下がることを確認する (pH の測定は 1 日 1 回)。限界から逸脱した場合の修正法を整備することにより、いずしの安全性を保証することができるものと考えられる。

さらに、私は段階 (3) の血出しは本当に必要であるのかどうか疑問に思っている。聞いたところでは、魚の生臭さを除くために必須であるそうである。もしそうな

ら、握りずしのネタも血出しが必要ではないのではないのか? しかし握りずしのネタの血出し (水さらし) は聞いたことがない。原料魚が新鮮でない時、腐敗臭を除くため昔の人の知恵で血出しをしたのではないだろうか? そうして、言い伝えによって今でも血出しを実施しているように思えてならない。ハスずし、フナずしのように魚を塩漬けにする場合には塩出しのため水に浸漬するが、血出しという段階はない。これが、古い伝統のあるフナずしによるボツリヌス中毒がない理由ではないだろうか? ハスずしも同様に安全と思われるが、滋賀県では 7 月末の夏祭りのために製造されるので、塩漬け前、あるいは塩抜き時に温度、時間、食塩濃度など毒素産生に必要な条件がたまたま満たされ、2 回の E 型ボツリヌス中毒が発生したものと考えられる。

もし段階 (3) の血出しが省略できるならば、我が国のいずしによる E 型ボツリヌス中毒の防止は容易に達成されるであろう。