調 査 ・ 資 料

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

谷 口 忠 敬*

Sensitivity of *Clostridium perfringens* Hobbs' Type Strains
to Furfurylformamide, Tetracycline and Tylosin

Tadataka TANIGUTI

(Faculty of Fisheries, Nagasaki University: Bunkyo-machi, Nagasaki)

まえがき

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) 食中毒は、主として Hobbs 型菌株によっておこり¹⁾²⁾、わが国では鳥獣肉やその加工食品の外に魚貝類の調理・加工食品による場合が比較的に多い^{3)~5)}。

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について防腐剤の効果を試験した例はないように思われるので、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、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ので、合わせて報告する。

実験材料および方法

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: Hobbs 博士から分与されたもので、8359 (1 型), 8238 (2 型), 8239 (3 型), 8247 (4 型), 8678 (5 型), 8679 (6 型), 8449 (7 型), 8235 (8 型), 8798 (9 型), 8799 (10 型), 9851 (11 型), 10239 (12 型) および 10240 (13 型) の計 13 菌株。

魚貝類分離株: 著者ら⁶⁾ 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。

* 長崎大学水産学部: 長崎市文教町

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 と略記)……上野製薬製。

テトラサイクリン (TC と略記)……日本レダリー社製。

タイロシン酒石酸塩 (TT と略記)……イーライ・リリー社製。

上記の防腐剤は 100 ppm 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、ミリポアフィルター (0.3 μ) でろ過滅菌したものを試験用培地に添加した。

3. 発育に対する最小阻止濃度 (MIC) の測定

供試菌はクックドミート培地で 37°, 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 製) に接種し、37° で 24 時間前培養した。その前培養液の 0.3 ml ずつを、防腐剤を種々の濃度に添加した試験培地 10 ml に接種した。MIC の決定は 37° で 48 時間培養後に発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、イシモチ) 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 分間煮沸後にろ過し、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°, 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。

実験結果および考察

1. Hobbs 型標準株および魚貝類分離同型株の発育に対する、FF, TC および TT の MIC

a. 試験培地の検討

Table 1. Comparison of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Furfylfuranamide, Tetracycline and Tylosin for the Growth of a Hobbs' Type Strain*¹ of *Clostridium perfringens* 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....furfylfuranamide [2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide], TC....tetracycline, TT....tylosin tartarate

Table 2. MIC of FF, TC and TT for the Growth of *Clostridium perfringens* Hobbs' Standard Strains and of *Cl. perfringens* Hobbs' Type Isolates from Fishes

Drugs	Groups of strains* ¹	MIC* ² (ppm)	Numbers of strains				
			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

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。牛肉浸出液、魚肉浸出液(サバ……赤身魚肉、イシモチ……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ros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 1 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。したがって、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rosを用いて MIC を測定した。

b. 標準株および魚貝類分離株の発育に対する、FF、TC および TT の MIC

Hobbs 型標準株および魚貝類分離同型株の発育に対する FF、TC および TT の MIC を Table 2 に示す。

FF について見ると、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 の法定濃度との関係を見ると、魚肉ねり製品に対する許可濃度 2.5 ppm では、標準株の 92% および分離株の 72% がそれぞれ発育を阻止された。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% が発育を阻止され、発育したのは分離株の 6% (MIC 7.5 ppm, 平均 2 株) にすぎなかった。

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⁷⁾。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、供試菌株の耐熱性胞子の発芽・増殖に対する FF の阻止効果はあまり期待できないかもしれない。

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⁸⁾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⁹⁾と見込んでも、供試菌株に対する発育阻止効果は期待できるのであ

う。

TC について見ると、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。

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高い標準株 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

供試菌株の発育は 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された (Table 3)。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 4 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 1/2~1/3 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発育が抑制されるためであらう。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 4 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発育がおう盛になり、また発

Table 3. Effect of Sodium Chloride Concentration on the Growth of Hobbs' Type Strains of *Cl. perfringens*

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

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

Table 4. Changes in the MIC of FF, TC and TT for the Growth of Hobbs' Type Strains of *Cl. perfringens* 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: heat infusion broth....*1 with 0.2% glucose, *2 with 0.5% NaCl

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¹⁰⁾ためであらう。

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発育がおう盛になり、また供試菌株が FF を分解する¹¹⁾ためかも知れない。残りの 1 菌株(919)ではグルコース添加による MIC の増加は見られなかった。

TC の MIC はグルコースの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¹¹⁾と同様である。

ま と め

Hobbs 型ウェルシュ菌 45 菌株(標準 13 株, 魚貝類分離 32 株)の発育に対する、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) の最少阻止濃度 (MIC) を測定し、次の結果を得た。

1) 0.2% グルコース加ハートインフュージョンブロスにおける MIC は FF 7.5 ppm 以下, TC 2.5 ppm 以下および TT 1.0 ppm 以下であった。

2) FF, TC および TT 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。

3) 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。

稿を終るに当たり、菌株を分与して下さった Hobbs 博士ならびにご指導を頂いた長崎大学水産学部銭谷武平教授、九州大学農学部豊水正道教授、北御門学助教授に深謝の意を表します。

文 献

- 1) B.C. Hobbs, M.E. Smith, C.L. Oakley, G.H. Warrack, J.C. Cruickshank: J. Hyg. **51**, 75 (1953).
- 2) 善養寺 浩: 食衛誌. **6**, 133 (1965).
- 3) 山県 宏: メディヤ・サークル No. 29, 19(1962).
- 4) 久保田憲太郎: 同上 No. 29, 1 (1962).
- 5) 善養寺 浩: 食品衛生研究 **19**(6), 14 (1969).
- 6) 谷口忠敬, 銭谷武平: 食衛誌. **10**, 376 (1969).
- 7) 小島 渥, 松田敏生: 日水誌. **31**, 214 (1965).
- 8) 松田敏生, 小島 渥: 同上. **31**, 365 (1965).
- 9) 小島 渥, 松田敏生: 同上. **31**, 459 (1965).
- 10) 河端俊治, 渋谷公代, 鈴木 健: 同上. **31**, 357 (1965).
- 11) 河端俊治, 植松智之, 古庄一夫: 同上. **32**, 892 (1966).