かん詰製造用原料食肉の細菌芽胞汚染の 実態と測定法の検討

(昭和 49 年 12 月 7 日受理)

松 田 典 彦* 松 本 直 起*
牛 沢 早 苗* 掛 川 洋 子*

Incidence of Mesophilic Bacterial Spores in Raw Meat Used in Canned Meat Manufacture in Japan, and Comparative Study of Differential Method for *Clostridial* and *Bacillial* Spore Count

Norihiko MATSUDA, Naoki MATSUMOTO, Sanae USHIZAWA
and Yoko KAKEGAWA

(Research Laboratory, The Canner's Association of Japan: 460 Kariba-cho,
Hodogaya-ku, Yokohama)

Mesophilic *Clostridial* and *Bacillial* spores in raw meat obtained from canning plants were quantified. Most of the samples were imported from foreign countries, and some of them were frozen and the others were defrozen to use in manufacture.

Two procedures, the anaerobic pouch method using Modified Angelotti agar (MAA, Bladel, 1965) and the tube method to obtain most probable number using differential reinforced clostridium medium (DRCM, Gibbs and Freams, 1965), were employed for differential count of *Clostridial* spores. The samples indicated very small *Clostridial* count, and none of *Clostridial* spore could be detected in more than a half of samples investigated. The low level of *Clostridial* spores was maintained during and after the defreezing process.

The incidences of *Bacillial* spores in the samples were different between frozen and defrozen meat, and the level of defrozen meat showed ten-fold count of frozen meat. The mean levels of *Bacillial* spores were 10 to 100/g for frozen meat and 100 to 1000/g for defrozen meat.

The reliability concerning with the respective differential reactions, blackening or non-blackening, of the medium employed was discussed by generic discrimination of organisms isolated from the colonies or the tubes those had shown the respective differential characteristics. *Clostridia* occupied in the colonies or the tubes, those had shown blackening or non-blackening, were 65 and 37% in MAA, and 65 and 16% in DRCM, respectively.

None of toxigenic *Clostridia* was detected in the samples.

(Received December 7, 1974)

かん詰食品の加熱殺菌条件が加熱殺菌前の食品に付着する細菌芽胞数によって左右されることはよく知られている。すなわち、加熱殺菌前の食品に付着する細菌芽胞数が多ければ、より高温、長時間の加熱殺菌を施さなければ商業的無菌状態を確保することはできない。このよう

なところから、かん詰食品の製造にはできるだけ細菌芽胞による汚染の少ない原料を用いることが望ましい。

米国における加工用原料食肉の細菌芽胞汚染については Steinkraus ら¹⁾ および Greenberg ら²⁾ の報告があるが、我が国においてはこの種の報告がないため、加工

* 社団法人 日本缶詰協会 研究所：横浜市保土ヶ谷区狩場町 460 番地

用原料食肉の細菌芽胞汚染の実態がはあくされていない。

著者らは、Bladel ら³⁾の Modified Angelotti agar を用いた anaerobic pouch 法および Gibbs ら⁴⁾の differential reinforced clostridium medium を用いた最確数法の両識別測定法により、かん詰製造用原料食肉（主として輸入肉）に付着する *Clostridium* 属および *Bacillus* 属細菌芽胞数を測定したので報告する。

材料および方法

1. 試料

全国10か所のかん詰工場で用いている原料食肉（凍結肉および解凍肉）を採取し、ポリエチレン製袋に収容してドライアイスで冷却して輸送した。これを凍結貯蔵しておき、使用時に流水中で解凍して試験に供した。試料の種類はウシ、ウマ、ヒツジ、ブタなどの生肉で、その産地はオーストラリア、ニュージーランド、アルゼンチン、ブラジル、マダガスカル、米国、中国、台湾および北海道であった。供試試料数は凍結肉19個および解凍肉23個であった。

2. 試料液の調製

試料をチョッパーで細切したのち、この 10 g を滅菌ホモジナイザーカップにとり、滅菌 1 % ペプトン水 90 ml を加えてホモジナイズした。これを滅菌エルレンマイヤーフラスコ (300 ml 容) に収容し、70°の恒温水槽

中で振とうしながら30分間加熱し（内容物は加熱開始より10分間で70°に到達した）、直ちに流水中で振とうしながら冷却しておいた。

3. 細菌芽胞数の測定

a) 好氣的プレートカウント (APC と略す) 法: 試料液を滅菌 1 % ペプトン水で10倍段階稀釈し、試料液およびその稀釈液をそれぞれ滅菌ベトリザラ 2 枚に 1 ml ずつ分注し、あらかじめ加熱溶解して 70° に保温しておいたブドウ糖寒天培地⁵⁾を加えてよく混合した後、固化して平板とした。これを 30° で 7 日間培養した後集落数を数え、*Bacillus* 属細菌芽胞数 (APC-B と略す) とした。

b) Modified Angelotti agar を用いた anaerobic pouch (MAA-AP と略す) 法: ポリエチレン/サラン/ポリエステルのラミネートフィルム (旭ダウ(株)製) で作成した袋 (内径 90 mm) をエチレンオキシド・ガスで滅菌しておいた。この袋 5 枚に試料液 2 ml ずつを分注し、あらかじめ加熱溶解して 70° に保温しておいた Modified Angelotti agar (MAA と略す) 25 ml ずつを加えてよく混合し、5 mm 厚の平板になるように固化した。これを 37° で 3 日間培養した後集落数を数えた。このとき黒変集落数を *Clostridium* 属細菌芽胞数 (MAA-C と略す)、非黒変集落数を *Bacillus* 属細菌芽胞数 (MAA-B と略す) とした。

Scheme 1. Out-line of procedures for counting bacterial spores in raw meat

c) Differential reinforced clostridium medium を用いた最確数 (DRCM-MPN と略す) 法: 試料液を減菌 1%ペプトン水で10倍段階希釈し, 試料液およびその希釈液をそれぞれ減菌中試験管 5 本に 1 ml ずつ分注した後, differential reinforced clostridium medium (DRCM と略す) 10 ml ずつを加えた。これを30°で7日間培養した後, 細菌の発育の有無を肉眼により判定し, 最確数を求めた。このとき, 黒変培地より求めた最確数を *Clostridium* 属細菌芽胞数 (DRC-C と略す), 非黒変培地より求めた最確数を *Bacillus* 属細菌芽胞数 (DRC-B と略す) とした。

細菌芽胞数測定法の概略を Scheme 1 に示した。

4. 培地の調製

a) ブドウ糖寒天培地: 常法⁵⁾により調製した。

b) MAA: Bacto-tryptone 15 g, 酵母エキス 10 g, 粉末寒天 30 g, チオグリコール酸ナトリウム 0.6 g, L-シスチン 0.1 g を脱イオン水 1,000 ml に加熱溶解し, pH 7.2 に調整した後, 121°で20分間高圧滅菌した。使用時にこれを加熱溶解し, ろ過滅菌した 2.5% 亜硫酸ナトリウム溶液および 2.5% 硫酸第一鉄溶液をそれぞれ 10 ml 加え, よく混合した。

c) DRCM: Bacto-peptone 10 g, Lab-Lemco powder (Oxoid) 10 g, 無水酢酸ナトリウム 5 g, 酵母エキス 1.5 g, 粉末寒天 1 g を脱イオン水 800 ml に加熱溶解する。別に, 可溶性デンプン 1 g を脱イオン水 200 ml に加熱溶解して均一にした後, 両者を合わせた。これに, グルコース 1 g, L-シスチン 0.5 g を加え, pH 7.2 に調整した後, 121°で20分間高圧滅菌した。使用時に, ろ過滅菌しておいた 4% 亜硫酸ナトリウム液および 7% クエン酸鉄溶液をそれぞれ 10 ml 加え, よく混合した。

5. 識別測定法の信頼性の検討

MAA-AP 法によって得られた黒変集落および非黒変集落, ならびに DRCM-MPN 法によって得られた黒変培養物および非黒変培養物を無作為に選び, 下記の方法により菌株を分離した。さらに, これら分離菌株の芽胞形成能, カタラーゼ産生能および空气中酸素に対する性質を調べ, *Clostridium* 属, *Bacillus* 属, および無芽胞細菌に分類し, MAA および DRCM 両識別培地の識別反応の信頼性を検討した。

a) 菌株の分離: MAA では, 形成した孤立集落を滅菌駒込ピペット (2 ml) の先端で採取し, GAM 半流動高層培地 (日水製薬(株)製) に接種した後, 37°で培養した。DRCM では, 培養液一白金耳を GAM 寒天培地 (日水製薬(株)製) の平板に塗抹した後, 触媒 Deoxo とともに嫌気ジャー (トミー精工(株)製) に収容し, 内部のガスを水素ガスと置換した後30°で培養した。次に, この平板上に形成した孤立集落を滅菌駒込ピペットの先端で採取して, GAM 半流動高層培地に接種し, 30°で

培養した。

MAA より分離した菌株を37°, DRCM より分離した菌株を 30°で培養したのは, 細菌芽胞数測定時の培養温度がそれぞれ37および30°であったからであるが, その後分離菌株はすべて 35°でよく発育することが分かったので, 以後の実験においてはすべて 35°で培養した。

b) 空气中酸素に対する性質の検討: 供試菌株を GAM 寒天斜面培地 2 本に塗抹し, 1 本を好氣的に, 他方を嫌氣的に 7 日間培養し, 発育の有無を肉眼的に観察した。

c) カタラーゼ産生試験: 上記の GAM 寒天斜面培地上に発育した集落に過酸化水素水を注ぎ, 気泡発生の有無を観察した。

d) 芽胞形成試験: 上記 b) において好氣的条件下に発育した供試菌株は普通寒天斜面培地に塗抹し, 好氣的に 7 日間培養した。次に, 発育した細菌集落一白金耳を普通ブイヨン培地に接種し, 70°で30分間加熱した後, 7 日間培養し, 発育の有無を肉眼的に観察した。

嫌氣的条件下にのみ発育する菌株は GAM 半流動高層培地の深部に接種し, 7 日間培養した。次に, この培養液約 0.5 ml を滅菌駒込ピペットでとり, 同上の培地に接種し, 70°で30分間加熱した後, 7 日間培養し, 発育の有無を肉眼的に観察した。GAM 半流動高層培地中で芽胞の形成が認められない場合には, MY 20 培地⁶⁾, Pea 培地⁶⁾, および potato infusion 培地⁶⁾を用いた。

6. 毒素生成試験

細菌芽胞数の測定において, *Clostridium* 属細菌であろうと推定された MAA の黒変集落および DRCM の黒変培養物のすべてを滅菌駒込ピペットで採取し, 肝片加肝臓ブイヨン培地に接種した後, 滅菌流動パラフィンを重ねし, 35°で 10 日間培養した。この培養液を 5000 rpm で10分間遠心分離した後, 上澄液 1 ml ずつをマウス 2 匹の腹腔内に注射し, その後のマウスの変化を観察した⁷⁾。対照菌株には *Clostridium botulinum* 62A

Fig. 1. Level of *Clostridial* spore count of raw meat used in canned meat manufacture

(ATCC 7948) を用いた。

結果および考察

1. 付着細菌芽胞数

細菌芽胞数の測定に MAA-AP 法, DRCM-MPN 法, および APC 法の 3 方法を用いたのは次のような理由による。

1) 従来著者らは, *Clostridium* 属細菌の芽胞数を測定するためには DRCM-MPN 法 (本法は *Clostridium* 属細菌芽胞の識別測定法として最も優れていると Winterer⁸⁾ が報告している) を, *Bacillus* 属細菌の芽胞数を測定するためには APC 法を用いてきた。

2) 加工用原料食肉の嫌気性タンパク分解細菌芽胞による汚染を調査した Greenberg ら⁹⁾ が, MAA-AP 法を用いて *Clostridium* 属細菌芽胞数を識別測定している。したがって, 著者らの結果を彼らのそれと比較するためには同一条件で実験を行う必要があった。

3) 試料を加熱処理して細菌芽胞数のみを測定する場合には, DRCM 中に発育して黒変を示さないものは *Bacillus* 属細菌であり, また, 食品に付着する *Bacillus* 属細菌芽胞数は *Clostridium* 属細菌芽胞数より圧倒的に多いから, DRCM-MPN 法によれば試料中の両細菌芽胞数を同時に測定できると Gibbs ら⁴⁾ が述べている。同様のことは MAA-AP 法の場合にもいえるであろう。もし, このような単一の識別測定法により, *Clostridium* 属細菌芽胞数とともに正確な *Bacillus* 属細菌芽胞数が同時に測定できるなら非常に便利である。しかしながら, MAA-AP 法および DRCM-MPN 法では, 培地が嫌気の状態にあるため, 好気の状態にある APC 法により測定した *Bacillus* 属細菌芽胞数と前二者により測定したそれとの間には, ある程度の差異を生じるであろうと予想される。そこで, これらの測定方法の違いによる *Bacillus* 属細菌芽胞数の差異を検討したかった。

これらの方法により求めたかん詰製造用原料食肉に付

着する細菌芽胞数と供試々料数との関係を Fig. 1 および 2 に示した。供試々料数が少なかったので, 肉の種類および生産地による細菌芽胞汚染の差異については検討しなかった。

Clostridium 属細菌芽胞数: *Clostridium* 属細菌の芽胞数は, MAA-C と DRC-C に差が認められず, 凍結肉では試料 19 個中の 14~16 個が, 解凍肉では試料 23 個中の 16~17 個が 1 個/g 以下であった。*Clostridium* 属細菌の最大付着芽胞数は MAA-C で 21 個/g, DRC-C で 17 個/g であった。

Greenberg ら⁹⁾ は, 米国およびカナダの食肉加工場で用いている原料食肉に付着する *Clostridium* 属細菌の芽胞数は, 供試々料の 77% が 3 個/g 以下であり, その最大値は 115 個/g であったと報告しているが, 本実験においてもこれとほぼ同様の結果を得た。

また, Steinkraus ら¹⁾ は, 肝片加肝臓ブイヨン培地を用いた最確数法により, 米国で同様の測定を行い, 供試々料の 70% が 1 個/g 以下, 最大値は 51 個/g であったと報告している。

我が国では, 加工用原料食肉を世界各地から輸入しており, 米国のように国内で生産された原料食肉に比較して, 付着する *Clostridium* 属細菌芽胞数が多いのではないかと懸念していたのであるが, 現在我が国のかん詰工場で使用している原料食肉に関しては, 米国やカナダと同程度に清浄であるといえよう。

Bacillus 属細菌芽胞数: *Bacillus* 属細菌の芽胞数は, MAA-B, DRC-B, および APC-B のそれぞれの間に約 10 倍の差異が認められた。このような差異が顕著に認められるのは解凍肉の場合で, 試料数が最も多い付着細菌芽胞数域は, MAA-B では 1~10 個/g, DRC-B では 11~100 個/g, APC-B では 101~1000 個/g であった。このような差異は, MAA-AP 法が完全な嫌気的環境下であるのに対し, DRCM-MPN 法は培地の深部に嫌気的環境を, 表面に好気的環境を有しており, APC 法は

Fig. 2. Level of *Bacillus* spore count of raw meat used in canned meat manufacture

Table 1. Generic Distribution of the Organisms Occurred in Two Differential Media for *Clostridial* Spore Count

Medium and method	Differential characteristics of the colony or the tube	Spore-forming bacteria		Non-sporeforming bacteria
		<i>Clostridia</i>	<i>Bacilli</i>	
Modified Angelotti agar in anaerobic pouches	Black colonies	36*	19	2 (2)**
	Non-black colonies	19	32	7 (4)
DRCM in tubes for MPN	Positive tubes with blackening	30	17	10 (8)
	Positive tubes without blackening	7	38	11 (5)

* Number of strains isolated from the colonies or the tubes those have shown the respective differential characteristics.

** Figures in parentheses represent number of strains of cocci included in non-spore-forming bacteria.

完全な好気的環境下であるなど、空气中酸素に対する関係が異なることによるものであろう。したがって、*Bacillus* 属細菌芽胞数の測定法としては、一般に広く採用されている APC 法が最もよく、MAA-AP 法や DRCM-MPN 法のような識別測定法により *Clostridium* 属細菌芽胞数と同時に *Bacillus* 属細菌芽胞数を測定することは無理である。

凍結肉に比較して、解凍肉の *Bacillus* 属細菌芽胞数は明らかに多かった。すなわち、最も試料数が多い付着細菌芽胞数域は、MAA-B では凍結肉 1 個/g 以下および解凍肉 1~10 個/g、DRC-B では凍結肉 10 個/g 以下および解凍肉 11~100 個/g、APC-B では凍結肉 11~100 個/g および解凍肉 101~1000 個/g であった。

加工用原料食肉に付着する *Bacillus* 属細菌の芽胞数については過去に報告がないため比較する対象がない。*Bacillus* 属細菌では、*Clostridium* 属細菌と異なり、その芽胞数が解凍時に約 10 倍程度増加するので、解凍作業は衛生的かつ迅速に行う必要がある。

2. MAA-AP 法および DRCM-MPN 法による *Clostridium* 属細菌芽胞数識別測定の信頼性の検討

前述の細菌芽胞数測定時に得られた MAA 中の孤立集落および DRCM の培養から菌株を分離して、それぞれの識別反応（黒変および非黒変）の信頼性を検討した結果を Table 1 に示した。分離菌株の中には無芽胞細菌も含まれていたが、これは試料液の加熱処理が不十分であったことによるものであろう。

結果を有芽胞細菌に限って検討すると、MAA 中に形成された黒変集落の中には *Clostridium* 属細菌以外に *Bacillus* 属細菌が含まれていた。同様のことは DRCM にも認められた。MAA の黒変集落中に含まれる有芽胞細菌の中に占める *Clostridium* 属細菌の割合は 36/55 (65%)、DRCM の黒変培養物中のそれは 30/47 (64%) であった。また、MAA の非黒変集落中に含まれる有芽胞

細菌の中に占める *Clostridium* 属細菌の割合は 19/51 (37%)、DRCM のそれは 7/45 (16%) であった。

Clostridium 属細菌の中には硫化水素産生能が比較的弱いものがあるので、還元型硫黄と鉄による培地の黒変反応によって *Clostridium* 属細菌の芽胞数を識別測定する場合、一部に黒変を呈さない *Clostridium* 属細菌があることは Freame ら⁹⁾も指摘しているが、黒変集落の中に *Bacillus* 属細菌が含まれていたのは如何なる理由によるものか分からない。

以上のことから、*Clostridium* 属細菌芽胞の識別測定法として MAA-AP 法および DRCM-MPN 法は、ほぼ同程度の信頼性を有しているといえよう。しかしながら、その信頼度は高くない。

3. 分離菌株の毒素生成

細菌芽胞数測定時に得られた MAA の黒変集落および DRCM の黒変培養物中には *Clostridium botulinum* が含まれている可能性があったので、これらの細菌の毒素生成能を調べた。その結果、分離した 140 株中に毒素を産生するものは認められなかった。

要 約

かん詰製造用原料食肉に付着する *Clostridium* 属および *Bacillus* 属細菌芽胞数を Modified Angelotti agar を用いた anaerobic pouch 法および differential reinforced clostridium medium を用いた最確数法により識別測定した。その結果、これらの原料食肉に付着する *Clostridium* 属細菌芽胞数は非常に少なく、大半の試料が 1 個/g 以下であった。*Bacillus* 属細菌の芽胞数は、測定法により差異があったが、好気的プレートカウント法による場合、凍結肉で 10~100 個/g、解凍肉で 100~1000 個/g であった。

また、両識別測定法の識別反応の信頼性を比較した結果、ほぼ同程度の信頼度であることが分かった。

分離した *Clostridium* 属細菌の中に毒素を生成する

ものは認められなかった。

謝 辞

本研究において *anaerobic pouch* の作成に御援助いただいた旭ダウ(株)斉藤文孝氏および東京セロファン紙(株)高橋儀作博士に深謝する。また、本研究は日本食肉缶詰工業協同組合の委託によるものであるが、公表を許可された同組合および試料を提供された同組合員各位に深謝する。

文 献

- 1) Steinkraus, K. H., Ayres, J. C.: J. Food Sci., **29**, 87 (1964).
- 2) Greenberg, R. A., *et al.*: Appl. Microbiol., **14**, 789 (1966).
- 3) Bladel, B. O., Greenberg, R. A.: *ibid.*, **13**, 281 (1965).
- 4) Gibbs, B. M., Freame, B.: J. appl. Bact., **28**, 95 (1965).
- 5) 厚生省環境衛生局監修: “食品衛生検査指針 I”, p. 93, 160 (1973) 日本食品衛生協会.
- 6) National Canner's Association: “Laboratory Manual for Food Canners and Processors, 3rd ed.”, p. 17, 32 (1968) The Avi Publ. Co., Inc.
- 7) 厚生省監修: “微生物検査必携”, p. 209 (1966) 日本公衆衛生協会.
- 8) Winterer, H.: Öst. Milchw. **26**, 1 (1971).
- 9) Shapton, D. A., *et al.*: “Isolation of Anaerobes”, p. 49 (1971) Academic Press, London.