カキ油漬膨脹罐詰より分離した 嫌氣性細菌に就て (第 1 報)*

天 野 慶 之

(水 産 試 験 場)

An Strict Anaerobe Isolated from Swelled Canned Oysters. (I)

K. AMANO

SYNOPSIS

An strict anaerobic organism, possibly related to *Clostridium fissum* (Debono) Bergey et al, was isolated from swelled cans of Oyster (*Ostrea gigans* Thunberg) in vegetable oil.

* These samples swelled in 2 or 14 days after processed at 110°C for 90 minutes in author's laboratory. (about 70% of 225 cooked samples swelled.)

The heat tolerance tests indicate that spores of the organism survive 108°C for 30 minutes.

It was also found another strain closely related to the swelled cans type in digestive tracts of fresh oysters.

水産試験場に於て試製¹⁾されたマガキ油漬罐詰が 110°C (約 7 封度) 90 分の殺菌加熱を経て著しく膨脹を呈した例があり、この時の罐型はペースト型 1 號罐で内容量約 70 瓦であつて熱傳導は不良とは認められず、又カキ肉が完全に溶解する (2 週間以内に) 程度に激しいもので、變敗原因が特異の細菌と推定されたので、罐内容と製造原料について細菌學的検査を行ひ、膨脹罐詰及び生ガキから強い熱抵抗を有する *Clostridium* 屬の嫌氣性細菌 1 種を分離し得た。膨脹罐詰に關する細菌學的研究は極めて多く、幾多の微生物が分離報告されてゐるが、製造工程中導入せられた菌群が偶發的に起した變敗が大部分であつて、その防止方法としては製造中の汚染を可及的に無くする事が結論されてゐるのであるが本報告では、たまたま原料カキの中に含まれてゐた細菌が變敗原因となつた例であり、又カキの腸内菌叢に就ては Hunter 及 Linden (1925)²⁾、Eliot (1926)³⁾、秋葉 (1928)⁴⁾ 等の記載にも、嫌氣性菌群の常在する場合が述べられてゐるのでその菌種の持つ加熱に對する抵抗力如何によつては變敗を避ける事が困難となる恐れがあり他面殺菌溫度を一定の限度以上に維持する必要も生ずる譯なのである。將來牡蠣罐詰がその滋味を保存するため、低い殺菌溫度の採られる事も想像されるので、茲に分離菌株の性状を記録して加工上の參考に資する次第である。

I. 試 料

A. 膨脹罐詰はペースト型 1 號罐で、カキ剝身を稀薄食鹽水で洗滌、水切後、棉實油で油燻し配合

* 水産試験場業績第 33 號 (1946—47) 昭和 21 年 4 月小湊に於ける日本水産學會年會にて講演。

1) 水産試験場調査試料、第 2 號、5、昭和 10 年 3 月。

2) A. C. Hunter & B. A. Linden: Journ. Agr. Res. (U. S.) 30, 971—976, 1925.

3) C. Eliot: Amer. Hyg. 6, 755—776, 1928.

4) 秋葉朝一郎: 衛生學傳染病雜誌 24, 436, 1928.

材料*(昆布)と共に肉詰し棉實油を注入し 110°C 90 分の殺菌を行つたもので、製了後 2 日乃至 2 週間室温(20°C 前後)及び 37°C に於て膨脹を示した 20 罐である。個々の罐詰に就き、巻締状態の不備、ピンホール¹の存在等は認められず、製了後の汚染に依る膨脹でない事は確かめ得た。開罐するとカキ肉は著しく分解し液状となり、糞臭に酷似した刺激的な悪臭を呈した。注入油を遠心分離して除き液汁について水素イオン濃度を測定したところ 6.6~7.6 で中性附近のものが多かった(板野式 pH 測定器による)。

B. 生牡蠣は深川區越中島の竹内カキ店から昭和 9 年 3 月~4 月を通じて購入されたもので、既に剥身となつてゐるので、生存時以後の汚染が充分考えられるので、體の表面に就て、滅菌蒸留水でよく洗つた後體の内部主として腸管部からと分離を試み、腸管部に定常的に該細菌の所在することを確認し得た。

II. 細菌分離方法

膨脹罐の場合は、表面を約 60% 酒精を脱脂綿に浸して拭ひ、之を燃焼せしめて滅菌する事 3 回反覆し直ちに無菌シャーレンを表面に覆ひ、滅菌罐切を用ゐて、開罐し(この際内壓のため液汁の噴出するのを例とした)次に滅菌ピペットを用ゐる内容液を吸取り、之を普通ブイオン、葡萄糖ブイオン、普通寒天、葡萄糖寒天培養基に注入し、寒天培養では平板培養、振盪培養を行ひ、各培養基は好氣的培養、嫌氣的培養に分ち夫々 37°C の恒溫に放置した。ブイオン培養の嫌氣的條件は滅菌ワゼリンを上層して行つた。

生カキの場合は體表面をその儘白金耳で掻き粘液を生理的食鹽水中に稀釋して培養を試みたが、腸管の場合は滅菌蒸留水でよくカキを洗滌した後、大型の滅菌ペトリ皿に收め、酒精及火焰中で滅菌した解剖鉗、解剖刀、ピンセットを用ゐる外套膜を切り、腸を露出せしめて、一端をキャピラリーに引伸した滅菌ピペットを腸の切口より内部に挿入し、内容物を吸取り(但し内容物は極く微量附着する程度である)これを生理的食鹽水に稀釋して、100°C 10 分間加熱したのち、その 1 cc を上記の如く培養基に移した。

III. 發育の經過

嫌氣的培養を行つたものは、すべて 24 時間後**には旺盛な發育を示した。即ち振盪培養のものは瓦斯を發生し寒天に龜裂をつくり、ブイオン培養のものは溷濁して、瓦斯の產生を伴ひワゼリン層を試験管の上部へ押しあげた。但し、嫌氣的平板培養のものは、40 時間後に肉眼可視程度の集落を發生し、85 時間後には最盛に達した。而して、ブイオン、寒天ともに葡萄糖添加のものが良好な發育を示した。好氣的培養ではブイオンには全く發育せず振盪培養では瓦斯を產生し底部に龜裂を生じたが輕度の發育であつた。集落は寒天深部では小粒狀であり、表面ではアミーバ狀***若くは菊花狀に擴散し、この各々から純粹分離を反覆しても、兩型を生ずるので、1 種と見做して一般の性質を檢した。

IV. 分離した嫌氣性細菌の性状

A. 形 態 細長桿形。多く單在、連鎖することもあり。1.3 × 0.2 ミクロン乃至 4.4 × 0.5 ミクロン、多く 2.0 × 0.3 ミクロン、端部類圓、芽胞を有し橢圓形。0.3 × 0.8 乃至 0.5 × 1.3 ミクロン。端部に生じその際菌體はラケット形に膨脹する。運動性あり、カプセルなし。グラム染色陽性。

B. 培養の性質 好氣的に發育不能であるので、すべて嫌氣裝置を用ゐる培養した。固體培養は、斜

* 牡蠣以外に内容物となつた昆布、棉實油、オリーブ油等についても檢したが、嫌氣的細菌は見出し得なかつた。棉實油は使用した精製油以外にも原油を入手してしらべたが、陰性であつた。

** 罐詰の内容物の場合も概ね 24 時間後には旺盛な發育を示した。即ち、生カキ中の菌株に比較して特に膨脹罐の菌株が加熱による阻害を受け下ゐるとは認められない。

*** 生カキより分離される菌株は表面發育を稍好む傾向が認められた。

面、平板ともにアルカリ・ピロガロール法に従ひ、液體培養の場合はワゼリン層を以て外氣と遮斷し、必要に應じて 0.5% 硫磺曹達液を添加した。

1) 普通寒天平板——灰白色小粒狀集落、深部に發育（但し顯微鏡下に 500 倍程度に廓大するに小粒狀は叢毛狀の塊である）周縁粗糙、表面に發育するものはアミーバ狀或は菊花狀に擴る。甚しき腐敗臭。2) 普通寒天斜面——表面發育不良。斜面深部に發育して瓦斯產生、龜裂、龜裂面に沿うて灰色小粒狀集落散在。凝結水濁濁、皮膜なし、腐敗臭。3) 葡萄糖寒天平板——普通のものと同様、深部に小龜裂を生ずることあり。4) 葡萄糖寒天斜面——普通寒天斜面と同様、瓦斯生産旺盛。5) 膠質穿刺——液化せず、表面に灰白色粘稠質に發育するも 1 ヶ月を要す（25°C 前後）。6) 膠質平板——發育せず。7) 普通ブイオン——濁濁、瓦斯產生、腐敗臭。漸次沈澱を生じ數週間後には全く沈澱のみとなり上部透明となる。8) 葡萄糖ブイオン——濁濁、瓦斯生産旺盛。腐敗臭。9) 馬鈴薯斜面——發育不良、凝結水稍濁。10) 牛乳——1 週間後凝固、後ペプトン化。11) Harrass 腦液培地——發育するも黒變化せず。12) Boudeime 膽汁ペプトン——瓦斯產生。沈澱生ず。13) カキエキス寒天斜面——不規則な小粒狀灰白色集落、腐敗臭。14) カキブイオン*——濁濁、瓦斯產生。腐敗臭（葡萄糖添加のものも同様）。

C. 生理的性質

1) 發育適温——普通寒天斜面に接種し、田内式連續恒温槽を用ひ 1 週間觀察した。最適 37°C 前後。最高 48°C、最低 23°C。2) 乾燥に耐える性質——普通寒天斜面培養のもの——白金耳を滅菌試験管の内壁に塗抹し、五酸化磷デシケーターに收め、減壓乾燥せしめ一定時日毎に葡萄糖ブイオンを注入して發育の有無を調べ 1 ヶ月の乾燥に耐え發育する事を認めた。3) 食鹽に耐える性質——30% 食鹽水中に 3 週間懸濁せしめても良好に發育した。4) インドール——2 週間後陽性。5) 硫化水素——Witte ペプトン培地 24 時間後陽性。6) 硝酸鹽還元——陰性。7) 炭水化物醱酵力——(i) 瓦斯と酸生成を行ふもの glucose, fructose, maltose, (ii) 瓦斯生産のみを行ふもの, galactose, lactose, xylose, arabinose, rhamnose, dextrin, starch, dulcitol. (iii) 酸生成のみを行ふもの sucrose, mannose. (iv) 瓦斯、酸ともに生産せざるもの raffinose, glycogen, mannitol (使用培地は 1% Witte ペプトン水に各 1% の炭水化物を加ふ)。8) 酸素に対する關係——好氣的條件下には全く發育しない**、嫌氣的培養に於ても固體培地では好んで深部集落を形成する傾向があり、偏性嫌氣性と云ひ得る。9) 加熱による死滅温度——加熱媒質により、死滅の温度時間は異り、2% 寒天培養基中では 108°C 60 分生存、90 分死滅。109°C 40 分生存、50 分死滅。110°C 10 分生存、20~30 分死滅。生理的食鹽水では 108°C 30 分生存、40 分死滅。110°C 10 分生存、20 分死滅。磷酸鹽緩衝液 (pH 7.0) 108°C 30 分生存、40 分死滅。110°C 20 分生存、30 分死滅。10) マウスに対する病原性——葡萄糖肉汁培地 48 時間培養のものを、菌塊（遠心分離のち生理的食鹽水にて洗滌したもの）と培養濾液とにわけ菌塊は 1 白金耳を 10 cc 生理的食鹽水に浮遊せしめたもの、濾液は原液そのまま各 0.2 cc を 10 g 前後のマウスに腹腔内注射を行ひ、病原性の發現を認めなかつた。

V. 嫌氣性細菌の分類學上の位置

比較的近縁と認められるのは *Clostridium fissum* (Debono 1912) Bergey et al. であらう。

Bergey 記載との相違點

Cl. fissum

本 菌 株

* 牡蠣の新鮮品に倍量の水を加へ 100°C 30 分間蒸氣釜中に加熱し、その濾液を採り、中和後、再び加熱、濾過し常法の如く試験管に分注したものである。

** 好氣的培養を葡萄糖寒天斜面を用ひて 20~30 回繰返す事によつて、表面發育を僅か行ふ程度に馴致し得た。

インドール產生せず
lactose, sucrose より
瓦斯, 酸を產生

約 2 週間後に產生する
lactose は瓦斯のみ, sucrose
は酸のみを產生

Cl. sphenoides, *Cl. bifermentans* 等も類似點があるが芽胞の位置集落の形状その他に相違がある。

VI. 考 察

本菌株は偏性嫌氣的であるのと、加熱に抵抗力を有するのが著しい特徴であると考えられる。硫化水素も容易に生産する。腦筋は黒變させないがカキ肉をそのまま試験管中に滅菌したものへ接種した場合 1 ケ月程経て黒綠色を呈した。糞臭に似た腐敗臭を呈し蛋白分解的ではあるが炭水化物もよく醗酵せしめる。特に methyl 基のある Rhamnose を醗酵せしめ得るのは稀であり、既往の記載では *Cl. acetobutylicum* を除いては見當らないから、特異であると云へる。發育適温が 37°C で高温である點、カキの體内に常在するものとすれば、不合理と思はれ、寧ろ汚染海水を通じて一時的に體内に導入されたものと解す可きか、更に廣範圍の試料について調べる必要があると考える。加熱に對する抵抗力はかなり強く 108°C 30 分に耐え Meyer & Esty⁵⁾ の報告した耐熱細菌 *Cl. botulinum*, *Cl. sporogenes* の抵抗力に匹敵する。従つて本菌株の如き細菌を含む原料の場合、これに相當する加熱處理が罐詰製造上必要となる。假にこの種の菌株が常在しないとしても、アサリ⁶⁾ についても同様な例を認めてゐるので、貝類の罐詰操作には、原料中の細菌の検査を一應行う必要があるのではないと筆者は考える。

VII. 要 約

水産試験場で試製したカキ油漬罐詰の膨脹罐より變敗原因と推定する 1 種の加熱に強い抵抗力を有する嫌氣性細菌を分離し、同時に原料生カキの腸内から分離された菌株が近縁である事を確め、分離菌株の性状を述べた。

5) K. F. Meyer & J. R. Esty: J. Infect. Dis. 31, 6, 650—663, 1922.

6) 天野慶之: 日本水産學會誌, 13, 2, 39—41, 1947.