食品防腐剤に関する研究—II.

ある種の防腐剤および抗生物質の *Proteus morganii* に
対する発育阻止およびヒスタミン産生能におよぼす影響

興 津 知 明

(1960 年 6 月 29 日受理)

STUDIES ON FOOD PRESERVATIVES—II.

A POSSIBILITY TO PREVENT THE ALLERGY-LIKE FOOD POISONING
BY THE AID OF FOOD PRESERVATIVES OR ANTIBIOTICS

Tomoaki OKITSU*

Inhibitory action of some food preservatives and antibiotics, nitroflazone (NFS), nitro-furyl-acrylic amide (NFA), chlortetracycline (CTC) and oxytetracycline (OTC), on the growth and histamine formation of *Proteus morganii*, the causative organism of allergy-like food poisoning, has been studied.

Results obtained may be summarized as follows:

1. The growth of seven strains of the organisms occurred with essentially the same concentration of either NFS, NFA or CTC in nutrient broth. A single strain showed a fairly high resistance in respect to OTC.
2. The minimal growth inhibitory concentration tested in the flat-fish infusion and in the mackerel infusion were approximately the same.
3. Effect of NFS, NFA, CTC or OTC in the broth upon the formation of histamine by *Proteus morganii* was in parallel with that upon the growth.
4. The formation of histamine in the raw mackerel flesh suspension was inhibited by CTC, OTC or NFA in much low concentration as compared with the minimal growth inhibitory concentration of each drug.

The possible replacement in microbial flora in raw flesh suspension with resistant organisms has been discussed.

ま え が き

著者は先に第 I 報¹⁾において、現在日本において法的に使用を許可されている食品防腐剤 13 種ならびに CTC, OTC 等の抗生物質について、細菌約 10 種に対する最小発育阻止濃度を検討し、さらに培養温度、pH の変化および糖の添加が最小発育阻止濃度におよぼす影響につき検討を行つた。その結果食品防腐剤の中最も効果のあるのはニトロフルルアクリル酸アミド、ニトロフラゾンであり、パラオキシ安息香酸ブチルエステル、メチルナフトキノン等がこれについだ。また以西トロール、以西機船底曳および母船式さけ・ます漁業等において薬品氷として使用許可されているクロルテトラサイクリン*および未だ許可はされていないがオキシテトラサイクリンは、ともに相当低濃度において供試細菌の発育を阻止した。

一方水産食品でしばしば起るアレルギー様食中毒について、その原因細菌は *Proteus morganii* とされている。この菌についてはすでに種々の検討がなされ、ヒスチジン脱炭酸酵素については河端・鈴木^{2),3)}に

* 埼玉県衛生研究所 (Saitama Pref. Hyg. Lab., Omiya, Saitama Pref., Japan).

** 昭和 35 年 5 月 10 日厚生省告示第 128 号により一部改正。 (印刷費負担)

より検討が行われている。前報で記載したように、許可防腐剤中 *in vitro* において *Proteus morganii* の発育を法定濃度以下で阻止できたのはニトロフルリルアクリル酸アミドのみであつた。元来細菌性食中毒の防止は、食品の取扱いを清潔にしあるいは低温にて菌の増殖を防ぐことを主眼とすべきであつて、薬物の使用はあくまで補助的なものではあるが、現在のように各種の防腐剤の使用が認められているからには実際に使用されうる食品防腐剤等の存在下で *Proteus morganii* がいかに発育を阻止されるかを観察し、アレルギー様食中毒防止の可能性を検討することは食品衛生上充分意義を有すると考えて本研究を行つた。

実 験

実験 1. *Proteus morganii* の菌株による最小発育阻止濃度の差

1. 基礎培地

マサバの肉エキス（河端・鈴木の報告²⁾）と同様の方法で作成）。最終 pH 6.12

2. 供試菌株

<i>Proteus morganii</i> ,	TU-2 ²⁾
"	" TU-6 ³⁾
"	" Okoshi-33 ₁ ²⁾
"	" S-1 ¹⁾
"	" S-14 ¹⁾
"	" # 71 ²⁾
"	" No. 325 (北里研究所から分譲)。

3. 供試防腐剤および抗生物質

NFS (nitrofurazone)
NFA (5-nitro-2-furfarylacrylic amide)
CTC (chlortetracycline)
OTC (oxytetracycline)

4. 実験方法

基礎培地が異なる他はほぼ第 I 報・実験 1 に準じて行つた。培養温度は河端・鈴木の報告³⁾による *Proteus morganii* のヒスナジン脱炭酸酵素形成至適温度である 25°C を用いた。

5. 実験結果

NFS, NFA では 72 時間、CTC, OTC では 24 時間培養後における最小発育阻止濃度で示した結果は Table 1 に示す通りである。OTC における No. 325 株を除いては供試 4 種の薬剤の最小発育阻止濃度は菌株間に大きな差異は認められず、殊に NFA はほとんどの菌につき同一濃度で発育を阻止した。

Table 1. Variation in the Minimal Growth Inhibitory Concentration of NFS, NFA, CTC and OTC by Various Strains of *Proteus morganii*.

Bact.	Drugs	NFS	NFA	CTC	OTC
		M	M	ppm	ppm
<i>Proteus morganii</i> , TU-6		2.5×10^{-4}	3.1×10^{-5}	1.3	1.3
" " TU-2		2.5×10^{-4}	3.1×10^{-5}	1.3	1.3
" " Okoshi-33 ₁		1.3×10^{-4}	3.1×10^{-5}	2.5	1.3
" " S-1		2.5×10^{-4}	3.1×10^{-5}	2.5	1.3
" " S-14		5.0×10^{-4}	3.1×10^{-5}	2.5	1.3
" " # 71		2.5×10^{-4}	6.2×10^{-5}	2.5	1.3
" " No. 325		1.3×10^{-4}	3.1×10^{-5}	5.0	20

実験 2. 基礎培地に用いる魚種が *Proteus morganii* の最小発育阻止濃度におよぼす影響

1. 基礎培地

- (1) マサバ肉エキス: 実験 1 に同じ。
 (2) マガレイ肉エキス: マサバ肉エキスと全く同様の方法により作成。最終 pH 6.20

2. 供試菌株

Proteus morganii, Okoshi-33₁

" " S-1

" " No. 325

3. 供試防腐剤および抗生物質

実験 1 に同じ。

4. 実験方法

実験 1 に同じ。

5. 実験結果

結果は Table 2 に示すごとくであり、全体として培地による差はほとんどないといえよう。

Table 2. Comparison of the Minimal Growth Inhibitory Concentrations in Mackerel Infusion to those in Flat-fish Infusion.

Bact.	Drugs	NFS	NFA	CTC	OTC
	Species of fish	M	M	ppm	ppm
<i>Proteus morganii</i> Okoshi-33 ₁	Mackerel (<i>Scomber japonicus</i>)	1.3×10^{-4}	3.1×10^{-5}	2.5	0.62
	Flat-fish (<i>Limanda angustirostris</i>)	1.3×10^{-4}	3.1×10^{-5}	2.5	0.31
" " S-1	Mackerel	2.5×10^{-4}	3.1×10^{-5}	2.5	1.3
	Flat-fish	2.5×10^{-4}	3.1×10^{-5}	5.0	1.3
" " No. 325	Mackerel	1.3×10^{-4}	3.1×10^{-5}	5.0	20
	Flat-fish	5.0×10^{-4}	3.1×10^{-5}	10	20

実験 3. サバ肉エキス中における *Proteus morganii* のヒスタミン産生能におよぼす防腐剤等の影響

1. 供試菌株

Proteus morganii, S-1

2. 供試防腐剤および抗生物質

実験 1 に同じ。

3. 実験方法

実験 1 と同様に作成したサバ肉エキスに防腐剤等を添加したもの各 100cc に、別にサバ肉エキスに 25°C で 3 日間継代培養した菌液 (18 ないし 20 時間培養のもの) を生理的食塩水を用いて 1 万倍に希釈し (菌数 $79 \times 10^3/\text{cc}$)、その 1cc を移植して 25°C に放置し、一定時間毎に混濁の有無を観察するとともに 10cc ずつ採取し、河端⁴⁾の方法によりヒスタミンを測定した。

4. 実験結果

ヒスタミン量は原料魚肉に対する mg% に換算した。結果は Fig. 1 に示す通りである。また混濁の程度は静置培養のため比濁計によらず肉眼的に観察したが、± の程度でヒスタミン 1~10mg, + で 10~100mg%, ++ で 100mg% 以上であり、菌の発育とヒスタミンの産生は平行的であつた。

Fig. 1. Effect of Addition of Some Food Preservatives or Antibiotics upon the Rate of Formation of Histamine in the Fish Infusion Medium.

Note:

NFS ●—● Control
 ●---● Permis. conc.
 x—x $6.3 \times 10^{-5} M$
 x---x $1.3 \times 10^{-4} M$

NFA ●—● Control
 ○—○ $1.9 \times 10^{-6} M$
 ○---○ $3.9 \times 10^{-6} M$
 x—x $7.8 \times 10^{-6} M$
 x---x $1.5 \times 10^{-6} M$

CTC ●—● Control
 ●---● 2.5 ppm
 ○—○ 5.0 ppm
 ○---○ 10 ppm
 x—x 20 ppm
 x---x 40 ppm

OTC ●—● Control
 ●---● 0.31 ppm
 ○—○ 0.62 ppm
 ○---○ 1.3 ppm
 x—x 2.5 ppm
 x---x 5.0 ppm

Fig. 2. Effect of Some Food Preservatives or Antibiotics added to Fish Suspension upon the Rate of Formation of Histamine.

Note:

NFS ●—● Inoculated control
○—○ Non-inoculated control
●---● Permis. conc.
x—x 6.3×10^{-5} M
x---x 1.3×10^{-4} M

NFA ●—● Inoculated control
○—○ Non-inoculated control
●---● Permis conc.
○---○ 1.5×10^{-5} M
x—x 3.1×10^{-5} M
x---x 6.2×10^{-5} M

CTC ●—● Inoculated control
○—○ Non-inoculated control
●---● 0.15 ppm
○---○ 0.31 ppm
x—x 0.62 ppm
x---x 1.3 ppm
△—△ 2.5 ppm
OTC ●—● Inoculated control
○—○ Non-inoculated control
●---● 0.15 ppm
○---○ 0.31 ppm
x—x 0.62 ppm
x---x 1.3 ppm

Fig. 3. Effect of Food Preservatives or Antibiotics added to Fish Suspension upon the Formation of Volatile Basic-N.

Note:

NFS ●—● Non-inoc. control
○—○ Inoc. control
●---● Permis. conc.
x—x $1.3 \times 10^{-4} M$

NFA ●—● Non-inoc. control
○—○ Inoc. control
●---● Permis. conc.
x—x $6.2 \times 10^{-5} M$

CTC ●—● Non-inoc. control
○—○ Inoc. control
x—x 2.5 ppm

OTC ●—● Non-inoc. control
○—○ Inoc. control
x—x 1.3 ppm

実験 4. 魚肉懸濁液における *Proteus morganii* のヒスタミン産生能におよぼす防腐剤等の影響

1. 供試菌株

Proteus morganii, # 71

2. 供試防腐剤および抗生物質

実験 1 に同じ。

3. 実験方法

市販のマサバを購入し、肉部をできるだけ無菌的に採取した後細砕したものより各 20g を取り、これに 4 倍量の滅菌蒸留水を加え振盪して懸濁液を作成し（一般細菌数 $98 \times 10^2/\text{cc}$ ），これに防腐剤等を加えたものを試料とし、別に実験 3 と同様に培養した *Proteus morganii* 培養液を生理的食塩水で 100 倍稀釈したもの（菌数 $50 \times 10^5/\text{cc}$ ）1cc を加えて 25°C に放置し、一定時毎に試料を採取して実験 3 と同じ法によりヒスタミンを測定し、また微量拡散法により揮発性塩基窒素を測定した。

4. 実験結果

ヒスタミン量および揮発性塩基窒素量はともに原料魚肉に対する mg% に換算した。

ヒスタミンの測定結果は Fig. 2 に示す通りであり、一般に実験 3 より低い濃度でヒスタミンの産生が抑制された。また揮発性塩基窒素の測定結果は Fig. 3 のごとくであつて、使用した薬剤の濃度では腐敗はごく一部しか抑制されないことを示している。

考 察

1. *Proteus morganii* はその一般性状は同一であつても細部に検討した場合差異があり、たとえばそのヒスチジン脱炭酸能においても相当の差異が認められている²⁾。防腐剤に対する感受性にもある程度の差があるものと考えられるが、Table 1 に示したように NFA においてはほとんど差がなかつた。NFS, CTC においてはやや差があるように見えるが、他の菌種における差から比べると顕著な差であるとはいえない。No. 325 株が OTC に特に高い値を示したのは注目すべきことで、この菌は CTC でも比較的高い値を示している。恐らくこの菌株は、獲得して耐性が向上したのではなく自然耐性株であろうが、NFS, NFA のような化学的薬剤に対しては耐性はないように思われる。大腸菌においては CTC および OTC に対し交叉耐性を示す例が報告⁶⁾されているので、この No. 325 株の菌株特異性は興味ある事実と考えられる。

また培養基の pH は 6.12 であつたので、CTC においては pH 7.0 におけるより低い濃度で細菌を抑制するはずであるが、前報と比較した場合特に低い値を示していない。このことは前報は nutrient broth で行い、本報はサバ肉エキスで行つているので、pH 値は低くとも後者の方が細菌の発育に好適な培養基であるためと思われる。

2. *Proteus morganii* はヒスチジンを脱炭酸してヒスタミンを産生する。ヒスチジンは本菌の生育には必須アミノ酸ではないが、その存在は窒素源として多少本菌の生育を促進する⁶⁾ので、ヒスチジンの含量が最小発育阻止濃度におよぼす影響について検討を行つた。ヒスチジンを比較的多量に含む赤身の魚肉（マサバ）とほとんど含まない白身の魚肉（マガレイ）を用い、同一条件で肉エキスを作り実験 2 を行つたのであるが、一部を除いてほとんど差は認められなかつた。また培養基の pH はマサバ 6.12、マガレイ 6.20 で大きな差はない。

3. サバ肉エキス中における防腐剤等の、*Proteus morganii* のヒスタミン産生に対する抑制は、肉眼的に観察した菌の生育抑制と平行的であつた。この事実は、これら薬剤は供試濃度においてはヒスチジン脱炭酸酵素阻害を行わないことを示すものである。NFA は法定濃度 ($1.1 \times 10^{-4}\text{M}$) で完全にヒスタミン産生の抑制を行うが、NFS は法定濃度 ($2.5 \times 10^{-5}\text{M}$) での抑制は不完全である。何れの場合も細菌の発育阻止における誘導期延長型と同じ傾向を示し、殺菌的に作用するのではなく菌の増殖を遅延せしめている現象と考えられる。

4. 滅菌してない魚肉懸濁液に *Proteus morganii* 接種を行つた時に防腐剤等を添加した場合の様相は、

Fig. 2 に示したように滅菌サバエキス培地における *Proteus morganii* 単独の場合と異ってくる。すなわち実験 1 で最小発育阻止濃度を測定した場合に比し、NFS で 4 分の 1、CTC で 8 分の 1 以下、OTC で 4 分の 1 以上の濃度でもヒスタミン産生の抑制が行われる。NFA のみはこのような現象は見られなかった。ヒスタミンが 3 日目位で最高値に達し、以下減少するのは、*Proteus morganii* 以外の菌のヒスタミンナーゼによるものと考えられる。肉エキスと肉懸濁液では、成分的にみて菌の生育を著しく左右する因子は考えられないので、上記の結果は主として魚肉中に存在していた細菌によるものであろう。肉懸濁液における一般細菌数は $98 \times 10^2/\text{cc}$ 、*Proteus morganii* の菌数は $50 \times 10^8/\text{cc}$ である。魚肉中の腐敗細菌の増殖が使用濃度ではほとんど抑制されていないことは、官能的にもまた Fig. 3 に示される揮発性塩基窒素の増加からも明らかである。すなわち上記のような比較的低い防腐剤濃度でヒスタミンの産生が抑制されていることは、細菌学的検索を行っていないので直接の証明はできないが、感受性の高い *Proteus morganii* の増殖がやや遅延されている期間に、防腐剤に抵抗性の強い他の菌が増殖して predominant となり、*Proteus morganii* の増殖が拮抗的に抑制されるのではないかと考えられる。NFA の場合は、*Proteus morganii* とその他の菌との間に比較的感受性の差が少かつたことによるのではなかろうか。

Proteus morganii はアンモニアを産生しない⁷⁾ので、揮発性塩基窒素の結果から観察してみると、その増加は魚肉中の腐敗細菌によることは明らかで、防腐剤の添加によつて腐敗細菌の発育防止効果と平行する。しかしながら実験は細菌の発育至適条件で行つたため、Fig. 3 に示したように、供試濃度ではほとんどみるべき抑制効果はなかつた。

上に記載したように滅菌した培地中での成績と、他の菌の共存する魚肉懸濁液中での結果では著しい差があるため、防腐剤の効力判定に当つては特に実験条件の吟味が必要である。

総 括

防腐剤 (NFS, NFA), 抗生物質 (CTC, OTC) について、アレルギー様食中毒防止の可能性を検討するための基礎的研究を行つた。得られた結果を要約するとつぎのごとくである。

1. *Proteus morganii* 7 株につきサバ肉エキス中における供試薬剤の最小発育阻止濃度を調べた結果、OTC における 1 株を除く他、NFS, NFA, CTC では特に顕著な差はなかつた。
2. 赤身および自身の魚肉のエキスを基礎培地とした場合、*Proteus morganii* の最小発育阻止濃度はほとんど差がない。
3. *Proteus morganii* のヒスタミン産成に対する NFS, NFA, CTC, OTC の効果は、菌の生育抑制と平行することが判つた。
4. 腐敗細菌の存在する肉懸濁液中では CTC, OTC, NFS は、滅菌魚肉エキス中で測定した最小発育阻止濃度にくらべ相当低い濃度で *Proteus morganii* のヒスタミン産生を抑制した。

本研究を遂行するに当り終始熱心に御指導、御鞭撻を得た国立予防衛生研究所食品衛生部河端俊治先生に厚く御礼を申し上げます。本実験を行うに当り、実験材料を提供された日本レダリー株式会社に謝意を表わす。

文 献

- 1) 興津知明: 本誌, 26, 797 (1960).
- 2) 河端俊治・鈴木 茂: 本誌, 25, 473 (1959).
- 3) 河端俊治・鈴木 茂: 本誌, 25, 481 (1959).
- 4) 河端俊治・内田 大・赤野多恵子: 本誌印刷中.
- 5) 秋葉朝一郎・横田 健: 未発表.
- 6) 塚本信之: 日細菌, 12, 443 (1957).
- 7) 河端俊治・石坂公成・三浦利之・佐々木忠尚: 本誌, 22, 41 (1956).