

20020924

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小熊 恵二

目次

I. 総括研究報告

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価

小熊 惠二 (岡山大学大学院医歯学総合研究科・病原細菌学) 1

II. 分担研究報告

1. 牧野 壮一 (帯広畜産大学・獣医学科) 10

2. 小崎 俊司 (大阪府立大学大学院農学生命科学研究科) 16

3. 春日 文子 (国立医薬品食品衛生研究所・食品衛生管理部) 22

4. 武士 甲一 (北海道立衛生研究所・微生物部) 27

5. 田村 正秀 (北海道立衛生研究所) 41

6. 甲斐 明美 (東京都立衛生研究所・微生物部) 48

7. 林 賢一 (滋賀県立衛生環境センター) 71

8. 堀川 和美 (福岡県保健環境研究所) 86

臂 博美 (福岡県田川保健福祉環境事務所) 102

9. 浅尾 努 (大阪府立公衆衛生研究所) 106

10. 石村 勝之 (広島市衛生研究所) 119

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 136

IV. 研究成果の刊行物・別刷 139

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
（総括）研究報告書

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価

主任研究者 小熊 恵二 岡山大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

容器包装詰低酸性食品 26 品目を購入し、その汚染状況を調べると共にボツリヌス芽胞の添加実験を行った。A 社製造の牛舌薫製と馬刺薫製の一部は一般細菌 (*B. cereus* や *B. subtilis* を含む) に、また、馬刺薫製の一部では、ボツリヌス菌の A 型や B 型にも汚染されていた。この為 A 社を訪問し製造過程を調査したところ、十分な加熱処理がなされていないことが判明した。A 社の同製品をさらに追加検査したところ、多くのものが一般細菌に汚染されていた。さらには C 社の帆立時雨煮の 1 検体もボツリヌス B 型菌により汚染されていた。ボツリヌス芽胞添加実験では、23 品目で発芽・増殖が認められた。

分担研究者

牧野 壮一（帯広畜産大学畜産学部家畜微生物学講座・教授）、小崎 俊司（大阪府立大学大学院農学生命科学研究科・教授）、春日 文子（国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部・室長）、武士 甲一（北海道立衛生研究所食品科学部・主任研究員）、田村正秀（北海道立衛生研究所・所長）、甲斐 明美（東京都立衛生研究所微生物部細菌第一研究科・専門副参事）、林 賢一（滋賀県立衛生環境センター微生物科・参事）、堀川 和美（福岡県保健環境研究所保健科学部病理細菌科・専門研究員）、浅尾 努（大阪府立公衆衛生研究所感染症部細菌課・主任研究員）、石村 勝之（広島市衛生研究所生物科学部・主任技師）

近年の食品嗜好の多様化、生活様式の変遷、原材料を含む食品の輸入の拡大などにより、多種・多様の製品が製造・販売されている。その中には、製造技術や容器包装技術の進歩により、常温で長期間保存が可能な食品が増加しているが、気密性を有する容器包装詰形態で、その pH が 4.6 を超え、かつ、水分活性が 0.94 を超える、ボツリヌス菌の増殖が可能な食品が多数含まれている。

平成 11 年には千葉県内でボツリヌス中毒が発生し、その原因食品として気密性を有する容器包装詰め要冷蔵食品が疑われたため、厚生労働省は、関連する当該要冷蔵食品の衛生管理の徹底を通知した（衛食第 120 号）。このような状況から、市販されている各種の容器包装詰低酸性食品についてボツリヌス食中毒に対するリスク評価を行うことは、我が

A. 研究目的

国の食品衛生の確保、向上の観点から極めて重要な課題となっている。

今回は、容器包装詰低酸性食品のうち特に容器包装詰食品の製造法として、容器包装内をガス置換後、加熱処理を行い製造された食品（レトルト類似食品。ここでは“不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品”と命名した）を主対象に、ボツリヌス菌芽胞の接種試験により、菌の増殖性および毒素産生性を評価することを目的とし検討を行った。

B. 研究方法

1. 供試試料

製造者より購入した容器包装詰食品 26 品目を選定し、各品目 40 袋ずつを購入した。各検体には食品品目ごとに番号を付し、後述の試験に供した。なお後日追加実験として、馬刺薫製 58 袋と牛舌薫製 34 袋の検査も行った。

2. 試料の水分活性(A_w)、pH および熱伝達性の測定

各食品（未開封・非加熱検体）3袋を用いて A_w と pH を、5袋を用いて熱伝達性を測定した。A_w は水分活性測定装置（ロトロニック製 HYGRO-LAB あるいはデカゴン アクアラグ CX-3）、pH は pH メーターを用いて測定した。pH の測定は、液汁のある食品はそのまま、液汁のない食品（食品 L）は 50%の蒸留水を加え、固形を潰したのち測定した。

熱伝達の測定は、記録式温度計（エラブ社製、CMC-821 型）の付いた温度測定装置と、ステンレス保護管付き熱電対（外径 1.2mm）温度センサーを用い、以下の方法により行った。まず、温度センサーを供試パウチの下側にあけた小孔に固定具を装着し、この孔を通して供試パウチに挿入した。なお、測定中センサー先端部の固定のため図 1(A) のように、センサー先端部より 6~7mm 手前にニードルホ

ルダーを取り付けた。ニードルホルダーの高さはパウチの厚みに応じて 10, 15 および 25mm のものを適宜用いた。また、パウチの厚みが 10mm 以下の試料については図 1(B) のように、センサー先端部手前に厚さ 3 mm のシール付き板ゴムを貼り合わせ、センサー先端部がパウチの厚みの中心にくるよう誘導させた。さらに、固定具とパウチをガムテープで固定し、センサー先端部が動かないようにした（図 1(C)）。センサー先端部の固定位置は内容物の中心とした。温度センサーは 3 本使用し、1 本を湯槽の温度測定に、2 本を供試試料内部(A, B)の温度測定に用いた。

なお、pH は同様の方法で芽胞添加後の検体についても測定した。

3. ボツリヌス菌芽胞添加実験

3-1. 供試菌株

Clostridium botulinum A 型株 4 株；62A (ATCC7948), 62A (NFPA, 米国食品製造業者協会), 東海区水産研究所由来 90A, B1G4 および B 型 1 株 (213B) の計 5 株を用いた。

3-2. 培地

クロストリジウム属菌の測定は市販のクロストリジウム測定用培地（日水製薬製、以下 CCA と略す）を用い嫌気性培養を行った。ただし、培地の濃度は 1000ml あたり 46.9 g（常法の 2/3 量）とした。一般細菌数の測定は市販されている標準寒天培地（日水製薬製、以下 SA と略す）を用い好気性培養を行った。菌数測定の詳細は後述する。

3-3. 芽胞液の調製

各芽胞液は以下のようにして作製した。供試 5 株を各々 TP 培地（5% Trypticase peptone (BBL), 5% Bacto peptone, pH 7.0）に接種し、37℃で一夜培養した。培養後、その 1 ml ずつを各々滅菌小試験管に採取し、

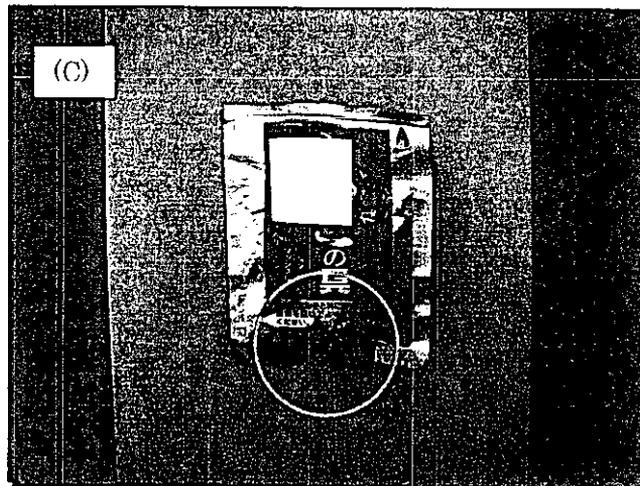
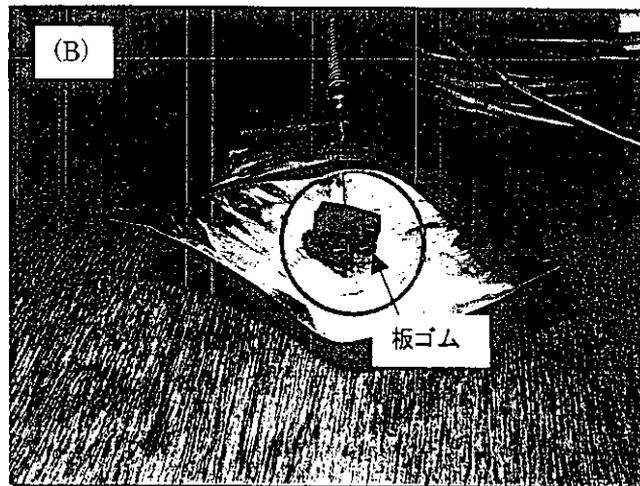
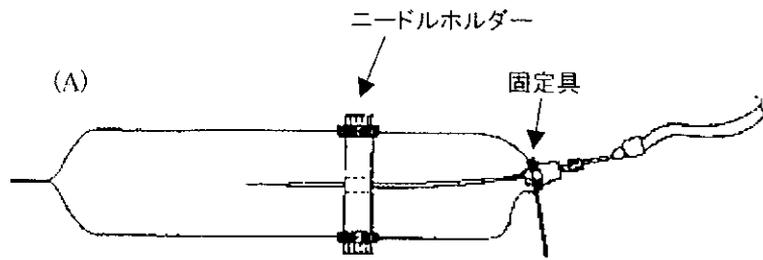
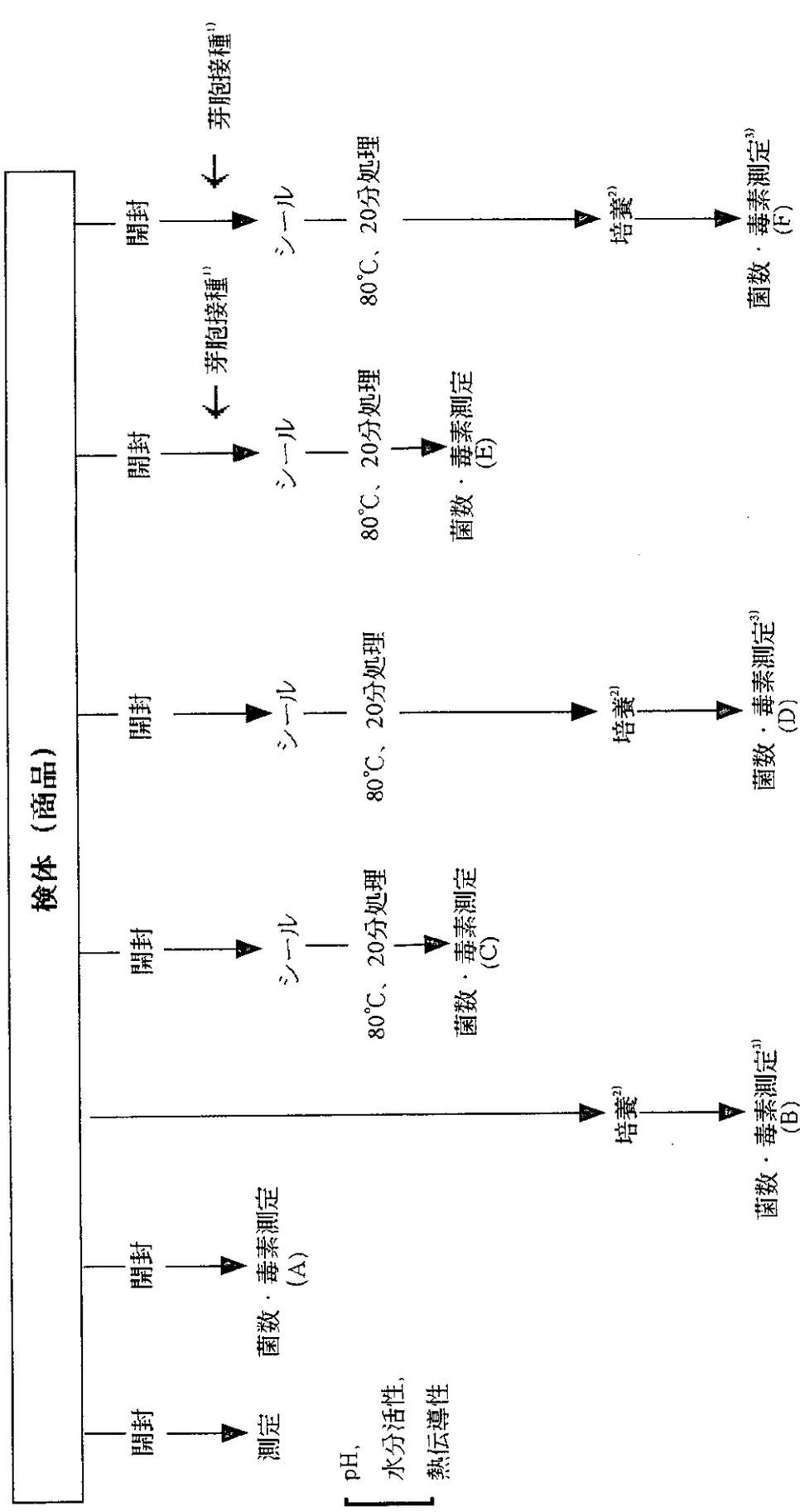


図1 熱伝達測定用検体の準備



1) A型 4株
B型 1株] 各約 1×10^5 CFU/20 μ lを接種

2) 30°C

3) 検体+純水 → (2×) → pH
(10×~) → 菌数測定

[・総菌数：標準寒天培地
・クロストリジウム属菌数：クロストリジア測定用培地/パウチ法

図2：芽胞添加実験

これを 80℃で 20 分間加熱処理した後、再度 TP 培地 10 ml に接種して一夜培養した。この操作を 3 回繰り返す、培養液を顕微鏡下で観察して芽胞形成を確認した後、各培養液 1 ml を加熱処理し、各々を 1,000 ml の TP 培地に接種して培養した。経時的に各培養液を顕微鏡下で観察し、芽胞形成が十分に認められた培養液を出発材料とした。各培養液を遠心 (6,000 回転 15 分間) して芽胞の濃厚浮遊液とし、その芽胞数を測定した後、小分けして使用するまで -30℃で保存した。

芽胞数の測定は以下の方法で行った。芽胞液 0.5ml を滅菌 0.1%ペプトン水 4.5ml に接種し、これを 80℃、20 分加熱処理した。この液をさらに同ペプトン水 (9ml 入り) で 10 段階希釈した。滅菌アナエロビック・パウチ 2 枚のそれぞれに、加熱溶解し 55℃に保温しておいた CCA 10ml を加え、次いで各希釈段階液 1ml ずつを加え、よく混和した後、平板に固化した。これらは 30℃、7 日間培養し、黒色集落を数え、初発芽胞数とした。作製した芽胞液は小分けし、-30℃に保存した。

供試試料への接種用芽胞液は各菌株の芽胞液を混合し用いた。すなわち、各芽胞液の芽胞数が、約 $2\sim 3 \times 10^7$ CFU/ml になるよう希釈し、この希釈液を等量ずつ混合し添加用芽胞液とした。添加実験時にはこの混合液 $20 \mu\text{l}$ (各芽胞約 1×10^5 CFU を含む) を接種した。

3-4. 芽胞接種

芽胞添加およびそのコントロール実験の方法を図 2 に示した。A~E の実験は各品種 3 袋を、F は 5 袋を用いて行った。まず、購入した品を直ちに開封したもの[A]、および 30℃で数日培養 (保存) した後開封したもの[B]の汚染の有無を検査した。開封した後シールし、80℃、20 分処理したものと[C]、培養 (保存) した後のもの[D]の汚染も検査した。開封後、芽胞を添加し、シール、加熱処理後[E]、および培養 (保存) 後のもの[F]のクロスト

リジウム属の菌の数と毒素産生の有無、および一般細菌数を測定した。30℃で保存期間中に容器がガス発生により膨張した試料は、直ちにあるいは 4℃の冷蔵庫に保管した後、検査に供した。

芽胞液の接種 ($20 \mu\text{l}$) は、試料袋の外側をアルコールでよく拭き、シール部 (食品製造者側) を切り取り、この部分から滅菌済注射器 (テルモ製、ツベルクリン用、1ml、針を長さ 150mm のものに交換) を装着した分注器 (Indicon 社、TRIDAK Division 製、STEPPER) を用いて行った。接種後直ちにシーラー (卓上型ノズル式脱気シーラー、富士インパルス製、V-400NTW) でシールした。

加熱処理は、低温殺菌機 (石田式) を用いて、温水中で 80℃、20 分加熱処理した。なお、供試試料の熱伝達を考慮し、加熱時間には供試試料の中心が 80℃に達するまでの時間を加えた。

3-5. 菌数測定

試料の全量が無菌的にストマッカー用滅菌ポリエチレン袋 (栄研器材製、ストマフィルターS タイプ) にとり、等重量の滅菌蒸留水を加え、ストマッカーで混和し、これを検液 (検体の 2 倍希釈液) とした。

1) 一般生菌数の測定

上記検液 2ml を滅菌脱イオン水 8ml に加え、よく混和した (検体の 10 倍希釈液)。この液 1ml ずつを 2 枚のペトリ皿にとり、SA 適量を加え、よく混和後、平板に固化した。さらに同培地を重層し、固化、乾燥後、35℃、48 時間培養した。

2) ボツリヌス菌数の測定

上記検液 2ml を滅菌脱イオン水 8ml に加えよく混和した (検体の 10 倍希釈液)。さらに、滅菌 0.1%ペプトン水 (9ml 入り) を用いて 10 段階希釈した後、各液 1 ml を、加熱溶解し 55℃に保温しておいた CCA 10ml に加えよく混和し、その後、滅菌アナエロビック・パ

ウチに流し平板に固化した。各希釈段階につき 2 枚のアナエロビク・パウチを用いた。これらを 30℃、7 日間培養した後、黒色集落を数え、結果を“CFU/g”で示した。

3-6. 毒素の定性試験と毒素型の決定

試料原液は毒素試験に供するまで、-30℃で保存した。解凍後、3000 rpm、4℃で 20 分間遠心分離し、上清を必要に応じ 10 倍段階希釈した。各希釈液 0.5 ml ずつを 2 匹のマウスの腹腔内に接種し、マウスの生死を 5 日間観察した。ボツリヌス特有の症状を示してマウスが死亡した場合は、 $10^3 \sim 10^4$ MLD の毒素と、等量の 8U の抗 A 型毒素および抗 B 型毒素抗体を反応させた中和試験により毒素型の確認を行った。試料はゼラチン緩衝液で、血清は滅菌生理食塩水で希釈した。

C. 研究結果

I. 汚染調査および芽胞添加実験

I-1. 供試試料の Aw および pH 測定

供試試料 26 品目の水分活性 (Aw) は 0.96 ~ 1.0、pH は 4.8 ~ 7.5 であり、いずれの食品もボツリヌス菌芽胞が発芽・増殖することが可能な条件であった。なお、これらとは別に福岡市内で販売されている類似の食品 48 品目の pH と Aw を測定したところ、15 品目の食品が pH は 4.6、Aw は 0.94 を超える値を示した (詳細は臂 博美の報告書に記載)。

I-2. 熱伝達測定

各食品の中心温度が 80℃に達するまでの時間 (カムアップタイム) は様々であり、4.5 ~ 36 分であった。

I-3. 食品汚染の状況

26 品目の食品を用い、図 2 に示した[A]~

[D]の条件で各 3 袋ずつ菌による汚染を調べたところ、A 社の牛舌薫製と馬刺薫製が高率に汚染されていた。牛舌薫製では加熱せず数日保存したものの[B]の 3 袋が全部 (3/3 袋と記載)、開封後加熱したものの[C]の 1/3 袋、およびその後数日保存したものの[D]の 3/3 袋が一般細菌に汚染されていた。さらに、ボツリヌス芽胞を接種した[E]や[F]でも 5/8 袋において一般細菌が認められた。なお[D]の 1 検体 (袋) の汚染菌は *Bacillus cereus* であった。馬刺薫製では、*B. subtilis* が 2 検体から分離されたのみならず、[A]と[D]の 1/3 袋から (従って計 2 検体から) *Clostridium botulinum* type A and/or B が検出された。さらには C 社の帆立時雨煮の 1 検体もボツリヌス B 型菌により汚染されていた (これらの詳細は武士、および甲斐の報告書に記載)。

I-4. ボツリヌス芽胞添加実験

各 8 袋ずつ 26 品目の食品にボツリヌス芽胞を接種した後、3 袋は加熱した後直ちに[図 2 の E]、5 袋は数日培養保存した後[F]に菌数を調べた。ほとんどの食品では菌が増殖し、ガスも産生された。よく増殖した場合は、菌数は $10^6 \sim 8$ CFU/g であり、毒性を調べたものでは $10^3 \sim 4$ MLD または LD₅₀/ml の毒素 (A 型・B 型単独、あるいは両方) が産生されていた。しかし一部の検体では、菌の増殖が認められなかったり、菌数が低下した。但し、菌数が少なくとも毒素が産生されている場合もあった。5 検体 (袋) とも菌の増殖や毒素産生が認められなかったのは 3 品目 (いそ煮、甘栗、きのこの具) のみであった (従ってこれらの場合には菌は増殖しなかったと推察された。詳細は武士、甲斐、および浅尾らの報告書に記載)。

II. A 社訪問報告と A 社製品に関する追加実験、および B 社よりの情報収集

A 社の製品がボツリヌス菌やバチルス属菌

に汚染されていたので、A社を訪問し製造過程を視察すると共に、同じ品目を購入し追加実験を行った。また、これらの製品はB社の滅菌釜を使用して作製していたので、B社より加熱殺菌システムに情報収集を行った。

II-1 A社訪問と追加実験

A社を訪問し製造過程の説明を聞いた。凍結した牛舌や馬肉の塊を解凍した後、肉エキスや調味料を含む液に数週間塩漬けし、その後、薫蒸する。このため、ここでは後述のB社の説明でいう前処理をしていなかった。その後、肉の塊をスライスし、ガス置換・包装後、B社の釜を用い加熱処理（後述のB社の説明でいう後処理）している。後処理は両製品とも70~80℃、20~25分処理しかしていなかった。その理由は、1) これ以上の高温処理をすると肉汁が湧出する、2) 当初製品の細菌検査をしたところ、この温度でも無菌であったので、との事であった。

このA社より牛舌と馬刺の薫製をさらに30袋と50袋購入し、また予備としてストックしていたそれぞれ4、8袋を加え追加実験を行った。

牛舌薫製ではクロストリジウム属の菌や *B. cereus* は認められなかったが、ほとんどの検体は $10^3 \sim 10^4$ の一般細菌に汚染されていた（詳細は甲斐の報告書に記載）。馬刺薫製では、予備として保存しておいた8袋のうち3袋から各々細菌が検出され、その内訳は、*Clostridium malenominatum* (20 CFU/g), *Clostridium cochlearium* (10 CFU/g), *Candidatus roseomonas massiliae* (10 CFU/g)であった。また、追加試験分として買い上げた50袋からはクロストリジウム属及びボツリヌス毒素は検出されなかったが、多数の *B. subtilis* が検出され（陽性数43/50検体、陽性率86.0%）、その汚染菌数は $10 \sim 10^4$ CFU/gであった（詳細は武士の報告書に記載）。

II-2 B社よりの情報収集

B社では食品の形や風味を向上させるため、レトルト食品のように121℃、4分（中心温度）の加熱処理をしなくても、異なった特殊な2個の釜を用い、前処理（蒸す・焼く・煮る）と熱水による後処理を行うことにより殺菌できる方法を開発した。後処理とは、前処理した食品をバリアー性のある袋に詰め、不活化ガスで置換し包装した後、釜の両サイドに設置した多数のノズルより熱水を噴射することである。個々の食材に応じ、前・後処理を上手に行うことにより、上記の目的を達成できるとの事である。

III. 簡単な毒素検出方法の開発

既に毒素検出用には逆受身ラテックス凝集反応が使用できることを実証済みであるが、このようなシステムを大量に製造することが目的である。このため各型毒素の特異抗体を、トキソイドのみならず神経毒素の標的細胞への結合部分である重鎖部分（分子量約10万）をリコンビナント蛋白質として得、これらを家兎に免疫して作製しようと試みている。

III-1) トキソイドによる抗体の作製

A, B, E, F型神経毒素を精製しトキソイド化した後、アジュバントと混ぜ、各型2羽の家兎を免疫した。数日中に採血する予定である（論文2）。

III-2) 重鎖の作製とその性状の検討

菌体より抽出したA型からF型までのDNAをTemplateとし、各型神経毒素の重鎖領域をコードするプライマーを用いてPCRを行い、増幅させた産物をpGEX-6P-3（アマシャム）にライゲーションしてプラスミドを作製した。次いでこれらのプラスミドをコンピテントセル（BL21; インビトロジェン）にトランスフォームして発現用大腸菌クローンを得た。得られた大腸菌クローンをアンピシリン

および IPTG を添加した培地で培養し菌体を回収した。菌体を超音波処理により破碎し遠心により破碎物を除いた後、上清中の GST 融合蛋白質（重鎖）を Glutathione Sepharose 4B（アマシャム）カラムで精製した。この蛋白質より GST の除去は、GST を PreScission protease（アマシャム）で切断した後、再び Glutathione Sepharose 4B カラムに添加することによって行った。

これまでに C 型と D 型のリコンビナント重鎖が得られたが、これらに免疫原性があり、その抗体は毒素を特異的に中和できるということをもウスの系をもちいて確認した（論文 1）。今後同様のことを他の型でも進め、各型重鎖に対する抗体を家兎を用いて作製する予定である。

IV. 外国での情報収集

田村と武士がフランスとイタリアに出張し、パストール研究所や民間の研究所、容器包装詰低酸性食品を含む調理済み食品（RTEF; ready to eat food）を製造している会社を訪問し、両国におけるボツリヌス芽胞による汚染の現状や、RTEF の製造や販売までの保存方法などに関する規制について情報を収集した。

D. 考察

今回調べた 26 品目は、容器包装詰低酸性食品のうちリスクが高いと思われる「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（レトルト類似食品）」から選定したものである。その pH と Aw を測定したところ、いずれもの食品もボツリヌス菌が発芽・増殖することが可能な条件であった。これら 26 品目の細菌による汚染状況の調査とボツリヌス芽胞添加実験を試みたところ、1) 特定の業者が製造した食品が高度に一般細菌に、さらにはボツリヌス菌により汚染されている、2) 多くの食品ではボツ

リヌス芽胞を接種すると、保存中に菌が増殖し毒素が産生されることが判明した。何故特定の業者が製造した食品のみが汚染されているかを調査したところ、この業者では加熱処理が不十分であることが判明した。

さらに現在市販されている類似の食品（惣菜など）48 品目の pH と Aw を測定したところ、15 品目はボツリヌス菌が増殖可能なものであった。以上のことより、これらの製品の一部のものはボツリヌス菌が増殖可能なものであり、製造過程に欠陥がある場合は頻度高く一般細菌やボツリヌス菌に汚染され得るものであることが判明した。本年度は不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品についてリスク評価を行ったが、次年度は、比較的リスクが高いと思われる惣菜等について評価を行う予定である。

E. 結論

今回検討した不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（レトルト類似食品）26 品目は、ボツリヌス菌が増殖できる pH と Aw を示し、ボツリヌス芽胞の添加実験では、23 品目で菌の増殖が認められた。従って、ボツリヌス芽胞を死滅させるための十分な加熱殺菌が行われていないと、非常に危険であることが判明した。

F. 健康危惧情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Woodward L. A, Arimitsu H, Hirst R, Oguma K. Expression of Hc subunits from *Clostridium botulinum* types C and D and their evaluation as candidate vaccine antigens in mice. *Infect. Immun.* 71: 2941-2944, 2003.
- 2) Arimitsu H, Inoue K, Sakaguchi Y, Lee J, Fujinaga Y, Watanabe T, Ohyama T, Hirst R, and Oguma K. Purification of fully activated *Clostridium botulinum* serotype B toxin for treatment of patients with Dystonia. *Infect Immun.* 71: 1599-1603, 2003.

2. 学会発表

- 1) 小熊恵二：ボツリヌス毒素：日本細菌学会総会特別シンポジウム

なお、本研究の一部は、2003年10月2～3日、岡山で開催される「食品微生物学会」総会で小熊が特別講演で、武士らの分担研究者は一般口演で発表する予定である。

H. 知的財産の出願・登録情報

無し

謝辞

本研究を遂行するにあたり、日本缶詰協会研究所の駒木 勝先生には多大の御助言、御指導を賜りました。深謝致します。

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価

分担研究者 牧野壮一 帯広畜産大学・獣医学科 助教授

研究要旨：近年の食品嗜好の多様化、生活様式の変遷、原材料を含む食品の輸入の拡大などにより、多種・多様の製品が製造・販売されている。その中には、製造技術や容器包装技術の進歩により、常温で長期間保存が可能な食品が増加しているが、気密性を有する容器包装詰形態で、その pH が 4.6 を超え、かつ、水分活性が 0.94 を超える、ボツリヌス菌の増殖が可能な食品が多数含まれている。

このような状況から、市販されている各種の「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（いわゆるレトルト類似食品）」についてボツリヌス食中毒に対するリスク評価を行うことは、我が国の食品衛生の確保、向上の観点から極めて重要な課題となっている。

今回は、容器包装詰食品の製造法として、容器包装内をガス置換後、加熱処理を行い製造された食品を主対象にボツリヌス菌芽胞の接種試験により増殖性および毒素産生性を評価することを目的とし、検討を行った。使用した検体は白花豆、およびこんにゃく白和えで、ボツリヌス菌は検出されなかったが、接種試験ではガス産生およびボツリヌス菌の増殖が確認された。このことは、ボツリヌス菌の汚染が起これば、これらの食品は充分感染源になりうることを示していた。

A. 研究目的

近年の食品嗜好の多様化、生活様式の変遷、原材料を含む食品の輸入の拡大などにより、多種・多様の製品が製造・販売されている。その中には、製造技術や容器包装技術の進歩により、常温で長期間保存が可能な食品が増加しているが、気密性を有する容器包装詰形態で、その pH が 4.6 を超え、かつ、水分活性が 0.94 を超える、ボツリヌス菌の増殖が可能な食品が多数含まれている。

平成 11 年には千葉県内でボツリヌス中毒が発生し、その原因食品として気密性を有する容器包装詰め品の要冷蔵品が疑われたた

め、厚生労働省は、関連する当該要冷蔵食品の衛生管理を徹底を通知した（衛食第 120 号）。

このような状況から、市販されている各種の「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（いわゆるレトルト類似食品）」についてボツリヌス食中毒に対するリスク評価を行うことは、我が国の食品衛生の確保、向上の観点から極めて重要な課題となっている。

今回は、容器包装詰食品の製造法として、容器包装内をガス置換後、加熱処理を行い製造された食品を主対象にボツリヌス菌芽胞の接種試験により増殖性および毒素産生性を評価することを目的とし、検討を行っ

た。

B. 研究方法

研究方法は総括報告書に記載されている。使用検体は市販の白花豆とこんにやく白和えである。

C. 研究結果

1. 供試試料の Aw および pH 測定

結果を表 3 に示した。白花豆は Aw 0.96, pH6.1, こんにやく白和えは Aw 0.98, pH 5.9 ~6.0 であった。

2. 調製した芽胞液

調製した各供試菌株の芽胞液の芽胞数を表 4 に、接種用に調製した混合芽胞液の芽胞数を表 5 に示した。

調製した各供試菌株芽胞液は、 $2\sim 3\times 10^7$ CFU/ml になるよう、5101 株は 20 倍、5102 株は 10 倍、5105, 5108 および 5106 株は 200 倍に希釈し、等量ずつ混合し、接種用芽胞液とした。20 μ lあたりの計算上の値は $4\sim 6\times 10^5$ CFU である。接種用芽胞液の測定値はこの値に一致した。

3. 熱伝達測定

供試試料の熱伝達測定結果および加熱処理時間を表 6 に、熱伝達測定チャートを図 1 に示した。

加熱処理時間は、80 $^{\circ}$ Cに達してから 20 分とするため、測定結果（カムアップタイム）に 20 分加えた時間とし、白花豆が 34 分、こんにやく白和えが 32 分とした。

4. 加熱処理後の分析結果

加熱処理後の無接種対照および接種試料各

3 検体ずつの分析結果を表 7 に示した。

好気性細菌及び *Clostridium* 属細菌はいずれの試料からも検出されなかった。芽胞接種試料からは、白花豆が $8.7\times 10^3\sim 2.8\times 10^4$ CFU/g, こんにやく白和えが $4.0\times 10^4\sim 4.5\times 10^4$ CFU/g 検出された。

芽胞接種後培養した場合は、両品目とも全ての試料（各 5 袋）で菌の増殖および毒素の産生が認められた（表 8, 9 の F）。

D. 考察

今回調べた検体は、明らかに理化学性状はボツリヌス菌の増殖に適しており、実際の接種試験でも増殖が認められ、気密性を有する容器包装詰形態とはいえ、ボツリヌス菌の増殖が可能な食品の一種であると考えられた。しかし、ボツリヌス菌の汚染が無い状況であれば、問題が無い可能性は示唆された。しかし、一度汚染が起これば、事故は起こる危険性が充分考えられ、ボツリヌス菌の汚染が起こらない環境や製造工程、そしてボツリヌス菌が増殖できない保存条件が必要であると考えられた。

E. 結論

今回調べた検体は、明らかに理化学性状はボツリヌス菌の増殖に適しており、実際の接種試験でも増殖が認められ、気密性を有する容器包装詰形態とはいえ、ボツリヌス菌の増殖が可能な食品の一種であると考えられた。

表 1 供試試料の内訳

品目 記号	製 品 名	容 器	総重量 (g)
B	白花豆 (100g)	透明パウチ(平袋)	106~108
X	こんにゃく白和え (80g)	透明パウチ(平袋)	81~105

表 2 供試菌株の血清型および由来

菌株番号	血清型	由	来
5101	A	62A	ATCC 7948
5102		90A	東海区水産研究所 (横関)
5105		B1G4	東海区水産研究所 (横関)
5108		62A	NFPA ^{a)}
5106	B	213B	東海区水産研究所 (横関)

a) National Food Processors Association (米国食品製造業者協会) の略

表 3 供試試料の Aw および pH

品目 記号	検体 No.	Aw	pH	
			測定方法	測定値
B	21	0.96	直 接	6.1
	22	0.96		6.1
	23	0.96		6.1
X	21	0.98	50%DW 加	6.0
	22	0.98		5.9
	23	0.98		6.0

表 4 調製した供試菌株芽胞液の芽胞数

菌株番号	血清型	芽胞数 (CFU/ml)
5101	A	4.6×10^8
5102		3.0×10^8
5105		4.2×10^9
5108		6.4×10^9
5106	B	6.0×10^9

表 5 接種用芽胞液の初発芽胞数

測定値 (CFU/20 μ l)	平均 (CFU/20 μ l)
6.5×10^5	
7.1×10^5	6.4×10^5
5.5×10^5	

表 6 熱伝達測定結果および加熱処理時間

品目 記号	カムアップタイム* (分)		加熱処理時間** (分)
	検体 No.24	検体 No.25	
B	13.0	15.0	34
X	12.0	12.5	32

*, 80℃に達するまでの時間 (測定値)

**, 熱伝達測定結果より決定した時間

表 7 加熱処理直後の試料の分析結果

品目 記号	検体 No.	pH	好気性生菌数 (CFU/g)	<i>Clostridium</i> 属細菌数 (CFU/g)
B	6	6.4	< 10	1.1×10^4
	7	6.3	< 10	8.7×10^3
	8	6.3	< 10	2.8×10^4
	9	6.3	< 10	< 10
	10	6.3	< 10	< 10
	11	6.3	< 10	< 10
X	6	5.9	< 10	2.8×10^4
	7	5.9	< 10	9.7×10^3
	8	5.8	< 10	1.4×10^4
	9	5.9	< 10	< 10
	10	5.9	< 10	< 10
	11	5.9	< 10	< 10

表 8 容器包装詰低酸性食品のボツリヌス菌芽胞添加試験結果

担当者：帯広畜産大学 牧野壮一
 検体名：白花豆（検体記号B）
 試験日：平成 14 年 12 月 4 日

検体処理内訳			理 化 学 ・ 細 菌 試 験 結 果									
区分	処理内容	袋数	試験項目	培養日数	pH	Aw	spc(cfu/g)	clt(cfu/g)	ガス産生	毒素型	毒素価	備 考
A	無処理	3	理化学試験	0d	6.1	0.96						
				0d	6.1	0.96						
				0d	6.1	0.96						
B	無処理	3	細菌試験	0d			300 以下	300 以下				
				0d			300 以下	300 以下				
				0d			300 以下	300 以下				
C	無処理	3	保存試験	90d			300 以下	300 以下				
				90d			300 以下	300 以下				
				90d			300 以下	300 以下				
D	開封芽胞非接種	3	保存試験	90d	6.3		300 以下	300 以下				
				90d	6.3		300 以下	300 以下				
				90d	6.3		300 以下	300 以下				
E	開封芽胞接種	3	細菌試験	0d	6.4		300 以下	1.1×10^4				
				0d	6.3		300 以下	8.7×10^3				
				0d	6.3		300 以下	2.8×10^4				
F	開封芽胞接種	5	細菌試験	49d	6.3		300 以下	3.8×10^7	+	A,B	4×10^4	
				49d	6.4		300 以下	5.2×10^7	+	A,B	8×10^4	
				49d	6.4		300 以下	3.7×10^7	+	A,B	4×10^4	
				49d	6.3		300 以下	6.3×10^7	+	A,B	2×10^5	
				49d	6.4		300 以下	5.6×10^7	+	A,B	8×10^4	

表 9 容器包装詰低酸性食品のボツリヌス菌芽胞添加試験結果

担当者：帯広畜産大学 牧野壮一
 検体名：こんにゃく白和え（検体記号 X）
 試験日：平成 14 年 12 月 4 日

検体処理内訳				理化学・細菌試験結果								
区分	処理内容	袋数	試験項目	培養日数	pH	Aw	spc(cfu/g)	clt(cfu/g)	ガス産生	毒素型	毒素価	備考
A	無処理	3	理化学試験	0d	6.0	0.98						
				0d	5.9	0.98						
				0d	6.0	0.98						
B	無処理	3	細菌試験	0d			300 以下	300 以下				
				0d			300 以下	300 以下				
				0d			300 以下	300 以下				
C	無処理	3	保存試験	90d			300 以下	300 以下				
				90d			300 以下	300 以下				
				90d			300 以下	300 以下				
D	開封芽胞非接種	3	保存試験	90d	5.9		300 以下	300 以下				
				90d	5.9		300 以下	300 以下				
				90d	5.9		300 以下	300 以下				
E	開封芽胞接種	3	細菌試験	0d	5.9		300 以下	2.8×10^4				
				0d	5.9		300 以下	9.7×10^3				
				0d	5.8		300 以下	1.4×10^4				
F	開封芽胞接種	5	細菌試験	26d	6.1		300 以下	2.1×10^7	+	A	8×10^3	
				26d	6.1		300 以下	3.9×10^7	+	A	8×10^3	
				26d	6.2		300 以下	2.4×10^7	+	A	4×10^3	
				26d	6.1		300 以下	4.0×10^7	+	A	8×10^3	
				26d	6.2		300 以下	1.8×10^7	+	A	4×10^3	

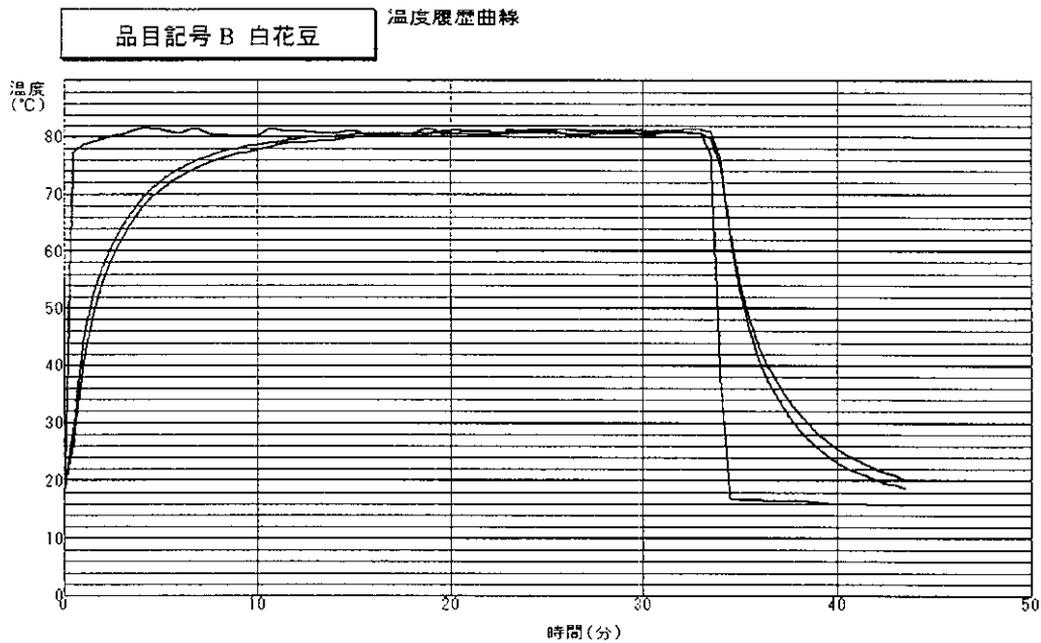


図 1：白花豆の温度履歴曲線

分担研究報告書

研究課題：容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価
不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品への芽胞接種保存実験

分担研究者： 小崎 俊司 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科教授
研究協力者： 幸田 知子 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科助手

研究要旨

不活性ガスを充填し常温流通している不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品2種類におけるボツリヌス菌芽胞の増殖性と毒素産生性を調べた。試供した2種の食品（つぶのやわらか煮、たたきごぼう）にA、B型菌芽胞の混合液を接種し再密封後30℃で保存し、毒素産生の有無を調べた。水分活性は幾分低い

がpHが中性域にある「つぶのやわらか煮」では、培養5日目で毒素産生が認められた。「たたきごぼう」は培養91日目で容器の膨化が確認され、毒素産生が認められた。この製品ではpHが低いことが一つの要因として、毒素産生の確認まで長期間培養が必要であったと考えられる。これらの結果は、ボツリヌス菌中毒の予防対策として気密性を有する包装食品に対しては求められている基準（pHが4.6以下、水分活性が0.94以下）を越えるものは、製造過程中にボツリヌス菌芽胞により汚染を受けた場合には中毒を起こすのに充分量の毒素を産生することを示している。

A. 研究目的

ボツリヌス菌芽胞の地理的分布状況と地域の中毒原因菌との間に関係があると従来は考えられていた。わが国では東北、北海道地方を中心にして魚介類の発酵食品である「いずし」によるE型中毒が多数発生しているが、これら地方の沿岸部の泥は高濃度のE型菌芽胞で汚染されていることがわかっている。最近、わが国ではこれまでほとんど分離されていないA型、B型菌による食中毒事件が発生し、国際的な広範囲

にわたる大量の物流に対応した対策が望まれている。食中毒の原因食品として疑われた密閉された容器包装詰食品は、いわゆる要冷蔵の「レトルト類似食品」として市販されていたが、実際は室温保存されていた。現在、食品製造技術や容器包装材の進歩と多様化する消費者ニーズに呼応した形で、ボツリヌス菌に対する十分な配慮を欠いた真空包装食品あるいは不活化ガス充填加圧加熱食品が常温で流通している。このような状況において、容器包装詰食品のボ

ツリヌス菌のリスク評価は食品衛生上極めて重要な課題と言える。今回はボツリヌス菌の増殖可能な条件を兼ね備えている pH 4.6 以上の低酸性の容器包装詰食品を対象としてボツリヌス菌芽胞の接種実験により、菌の増殖と毒素産生性の評価を行った。

B. 研究方法

1. 供試試料

製造者より購入した容器包装詰食品 2 種（つぶのやわらか煮、たたきごぼう）にボツリヌス菌芽胞（A、B 型菌の混合液）を接種した。これら一連の作業は缶詰協会研究所（横浜）で実施し、翌日から 30℃の保存試験を開始した。

2. 芽胞接種実験

2-1. 使用菌株

Clostridium botulinum A 型菌 4 株；62A(ATCC7948)、62A(NFPA)、90A、BIG4、および B 型菌 1 株(213B)を用いた。

2-2. 培地

クロストリジウム属の菌数測定には市販のクロストリジア培地（ニッスイ）を使用し、滅菌パウチを用いて嫌気培養を行った。一般細菌は標準寒天培地（ニッスイ）を用いて好気培養を行った。

2-3. 芽胞懸濁液の調製

本研究班の分担研究者が所属する北海道衛生研究所で作製した。供試菌株の芽胞液 0.5 ml に滅菌ペプトン水（0.1%）4.5 ml を加え、80℃20 分間加熱処理した。さらにペプトン

水で 10 倍段階希釈を行い、これら 1 ml をそれぞれ 2 枚の滅菌パウチにし、55℃に保温しておいたクロストリジア培地 10 ml を加え、よく混和した。パウチは口をシールした後、30℃7 日間培養後発育した黒色集落を算出し、芽胞数とした。各供試菌株の芽胞数が約 $2\sim 3 \times 10^7$ CFU/ml 煮成るように希釈し、これらの希釈液を等量混合し、接種用芽胞液とした。

2-4. 芽胞の接種方法

1 品目につき 14 袋の外側をアルコールで消毒し、シール部分を切断し接種用芽胞液を 20 μ l を 8 袋に添加し、シーラーで封印した。非接種群として残り 6 袋はそのままシールした。これらの検体全てを、低温滅菌器を用いて中心温度が 80℃で 20 分保持されるように処理した。

2-5. 菌数測定

食品の全量が無菌的にストマッカー用ポリエチレン袋（S タイプ）にとり、等量の滅菌脱イオン水を加えて、ストマッカーで混和したものを原液とした。

3. 毒素の検出

3-1. 定性試験

試料原液は試験に供するまで -20℃で保存した。解凍後、3,000 rpm、4℃10 分間遠心し、その上清を 0.5 ml ずつ 2 匹のマウスの腹腔内に接種し、生死の有無 4 日間観察した。

3-2. 中和試験

マウスがボツリヌス特有の症状を呈した検体について、適宜ゼラチン含有リン酸緩衝液（pH 6.2）で毒素

量が 10^4 LD₅₀/ml 程度になるように 10 倍段階希釈を行い、10 国際単位/ml の A 型および B 型抗毒素単独あるいは混合液と等量混和し、マウス腹腔内注射を行い産生された毒素型の確認を調べた。

4. その他

検体の pH は pH メーター Horiba F22 を用いて測定した。

C. 研究結果

1. 供試食品の理化学的、微生物学的性状

対象とした 2 品目の食品の pH および Aw は、「つぶのやわらか煮」では pH 7.1~7.3、Aw は 0.96 で、「たたきごぼう」では pH 5.6、Aw は 0.98 以上であった。芽胞接種後、加熱処理した食品には、一般生菌は検出されなかった。芽胞接種した検体には、「つぶのやわらか煮」においては $3.9 \sim 4.4 \times 10^4$ CFU/g、「たたきごぼう」では $8.8 \sim 13 \times 10^3$ CFU/g のクロストリジアが検出された。陰性対照として用いた食品からはクロストリジアは検出されなかった。(表 1)。

2. 保存試験

2-1. 「つぶのやわらか煮」の結果

この食品は比較的 pH が高いが一般生菌およびクロストリジアは混入していなかった。培養 5 日目には検体全てが膨張し、接種したボツリヌス菌と推定される菌数は $2.0 \sim 5.2 \times 10^7$ CFU/g に達した。これらの検体から毒素が検出され、3 検体から A 型および B 型毒素が、残りの 2 検体から A 型あるいは B 型毒素が単

独で検出された。同時に測定した pH は若干低下し、6.9 の値を示した。

2-2. 「たたきごぼう」の結果

この食品は Aw とは対照的に低い pH を示した。陰性対照として用いた検体は培養 90 日目でも一般生菌およびクロストリジアは陰性であった。培養 94 日目で 3 検体の袋に膨張が認められた。これらの検体の pH は上昇しており pH 6.2~6.3 であった。膨化が認められなかった 2 検体の pH は 5.3 あるいは 5.4 であった。膨張が認められた検体中のクロストリジアは $4.1 \sim 8.0 \times 10^7$ CFU/g で、2 検体から A 型および B 型毒素が、残り 1 検体から A 型毒素が検出された。非膨張の 2 検体ではクロストリジアの菌数 (1.5×10^4 、 1.7×10^4 CFU/g) には変化がなかった(表 2)。

D. 考察

研究対象とした不活化ガス充填加圧加熱殺菌調理食品は、食材および調味料などを一緒に袋に入れ密封後殺菌調理される。この方法では食品の熱による変性が少ないために、消費者ニーズに添った多様な製品を産み出すことができ、食品製造にとっては非常に魅力のある方法と言える。一方、容器包装詰加圧加熱殺菌食品(いわゆるレトルト食品)では、pH が 4.6 以上、かつ Aw が 0.94 以上の食品は中心温度が 120℃4 分間の加熱または同等の殺菌を行うことが規定されている。従って、上述した不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品はレトルト食品の規格に合致せず、食品