

表 9：馬刺くん製の細菌試験結果(1) (買い上げ分)

(1) 非保存試験検体 (ロット A 及び B)

#	直接塗抹培養試験 (cfu/g)			増菌培養試験		
	<i>Bacillus</i>	<i>Clostridium</i>	マウス毒性	<i>Bacillus</i>	<i>Clostridium</i>	マウス毒性
A1	250	—	—		—	—
A2	3,780	—	—		—	—
A3	—	—	—	+	—	—
A4	—	—	—	+	—	—
A5	—	—	—	—	—	—
A6	—	—	—	+	—	—
A7	—	—	—	—	—	—
A8	10	—	—		—	—
A9	20	—	—		—	—
B1	10	—	—		—	—
B2	10	—	—		—	—
B3	—	—	—	+	—	—
B4	10	—	—		—	—
B5	—	—	—	+	—	—
B6	10	—	—		—	—
B7	10	—	—		—	—
B8	—	—	—	+	—	—
B9	10	—	—		—	—
B10	—	—	—	—	—	—
B11	1,730	—	—		—	—
B12	660	—	—		—	—
B13	—	—	—	+	—	—
B14	20	—	—		—	—
B15	—	—	—	+	—	—
B16	10	—	—		—	—

(2) 30°C, 14 日間の保存後の試験検体 (ロット A 及び B)

#	直接塗抹培養試験 (cfu/g)			増菌培養試験		
	<i>Bacillus</i>	<i>Clostridium</i>	マウス毒性	<i>Bacillus</i>	<i>Clostridium</i>	マウス毒性
A10	2,560	—	—		—	—
A11	220	—	—		—	—
A12	10	—	—		—	—
A13	—	—	—	—	—	—
A14	—	—	—	—	—	—
A15	—	—	—	—	—	—
A16	20	—	—		—	—
A17	1,170	—	—		—	—
A18	20	—	—		—	—
B17	—	—	—		—	—
B18	260	—	—		—	—
B19	90	—	—		—	—
B20	20	—	—		—	—
B21	10	—	—		—	—
B22	9,880	—	—		—	—
B23	20	—	—		—	—
B24	9,230	—	—		—	—
B25	8,990	—	—		—	—
B26	—	—	—	—	—	—
B27	300	—	—		—	—
B28	10	—	—		—	—
B29	—	—	—	+	—	—
B30	1,480	—	—		—	—
B31	—	—	—	+	—	—
B32	10	—	—		—	—

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に関する研究

分担研究者 田村 正秀 北海道立衛生研究所所長

研究要旨

不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（容器包装詰低酸性食品）を対象にボツリヌス菌芽胞の添加試験を行った。供試 2 製品については、芽胞添加後の保存試験において芽胞の発芽・増殖及び毒素産生が確認された。2 製品の理化学的性状は、pH 5.5～6.4、水分活性（Aw）0.96～0.98 の範囲で、いずれもボツリヌス菌の増殖可能範囲であった。これらの結果から、当該製品の取り扱いに関する指導を行う場合には欧米先進国に習い、製品の冷蔵保存が必要と考えられた。

A. 研究目的

平成 14 年度においては、容器包装詰低酸性食品のうち、不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品を対象として、その理化学的性状及びボツリヌス菌芽胞添加後の発芽・増殖ならびに毒素の産生を確認することによって、当該食品におけるボツリヌス菌による危害発生の可能性を評価することを目的として実験を行った。

B. 研究方法

1. 供試検体

市販の不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品を用いた。その内訳を表 1 に示す。

2. 検体の Aw, pH

Aw の測定については水分活性測定装置（ロトロニック、HYGRO-LAB）、pH の測定については pH メーター（東亜電波工業、HM-50V）を用い、液汁を含む製品については無処理のままを、また、液汁を含まない製品については、検体に蒸留水を加えて 2 倍乳剤とした試料を測定した。

3. 供試菌株

Clostridium botulinum type A 及び type B

を用いた。その内訳を表 2 に示す。

4. 芽胞の調製

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、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。

5. 接種用芽胞液の調製及び食品への接種

凍結保存された芽胞液を融解した後、各芽胞液を約 $2\sim 3 \times 10^7$ cfu/ml になるように希釈し、各希釈液を頭領ずつ混合して接種用芽胞液とした。

各供試製品 14 袋の表面を消毒用アルコールで十分に消毒した。開封部位を火炎で消毒したメスを用いて開封し、芽胞液 20 μ l を 8 袋に接種し、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、V-400NTW）でシールした。このとき、別の 6 袋については開封後、芽胞を接種せずにシールし、芽胞非接種の対照とした。接種には滅菌注射器（テルモ、ツベルクリン用、針長 15 mm）を装着した分注器（Indicon, TRIDAK Division, STEPPER）を用いた。

6. 加熱処理

芽胞非接種の対照 6 検体と芽胞接種の 8 検体を低温殺菌機（石田式）を用い、80°C で 20 分間加熱した。加熱時間については、予め検体の熱伝導を測定し、検体の中心が 80°C に達するまでの時間（カムアップタイム、図 1~2）を加算した。

7. 加熱処理後の検体の分析

検体の内容全量を無菌的にストマフィルターに秤量し、これに等量の滅菌蒸留水を加えて 2 倍乳剤とした試料を分析用の出発材料とした。これをさらに 5 倍希釈して 10 倍乳剤を調製し、その 1 ml ずつを 2 枚の滅菌シャーレ及び 2 枚のアネロービック・パウチに各々接種し、各々標準寒天培地及びクロストリディア寒天培地を接種して混釈固化した。これを標準寒天については 37°C で 48 時間、クロストリディア培地については 37°C で 7 日間培養した。なお、2 倍乳剤については、pH も測定した。

芽胞を接種した 8 検体については、3 検体を初発芽胞数の測定に供し、残り 5 検体については保存試験（30°C で 90 日間）に供した。保存試験については、一般生菌数及びクロストリジウム数の測定の他に、ボツリヌス菌の測定を行い、ボツリヌス毒素の検出については、マウスを用いた毒性試験とその中和試験により行った。なお、マウスを用いた毒性試験とその中和試験については、毒素試料を濾過滅菌して飼育施設におけるボツリヌス菌汚染を防止し、ま

た、毒素試料注射後、生残したマウスについては動物愛護の観点から、炭酸ガスによって速やかに安楽死させた。

C. 研究結果

5 製品の不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品総計 200 検体について行ったボツリヌス菌芽胞添加試験及び理化学試験の結果を表 3~4 に示す。

サバの味噌煮の理化学的性状は pH 6.0~6.4, Aw 0.94 で、ボツリヌス菌が増殖可能な性状であった。初発芽胞数（区分 E）は $6.5 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^4$ cfu/g の範囲であった。いずれの検体においてもボツリヌス菌の増殖ならびに A 型毒素と B 毒素の両方の産生が確認された。

鶏肉とごぼうの理化学的性状は pH 5.5~5.7, Aw 0.97~0.98 の範囲で、ボツリヌス菌が増殖可能な性状であった。その初発芽胞数（区分 E）は $4.0 \sim 4.5 \times 10^4$ cfu/g の範囲であった。芽胞を接種して保存試験を行った 5 検体（区分 F）については、いずれの検体においてもボツリヌス菌と A 型毒素が検出された。

D. 考察

試験に供した不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品の理化学的性状は、いずれもボツリヌス菌の増殖可能な範囲で、芽胞の添加試験においてもボツリヌス菌の増殖と毒素の産生が確認された。

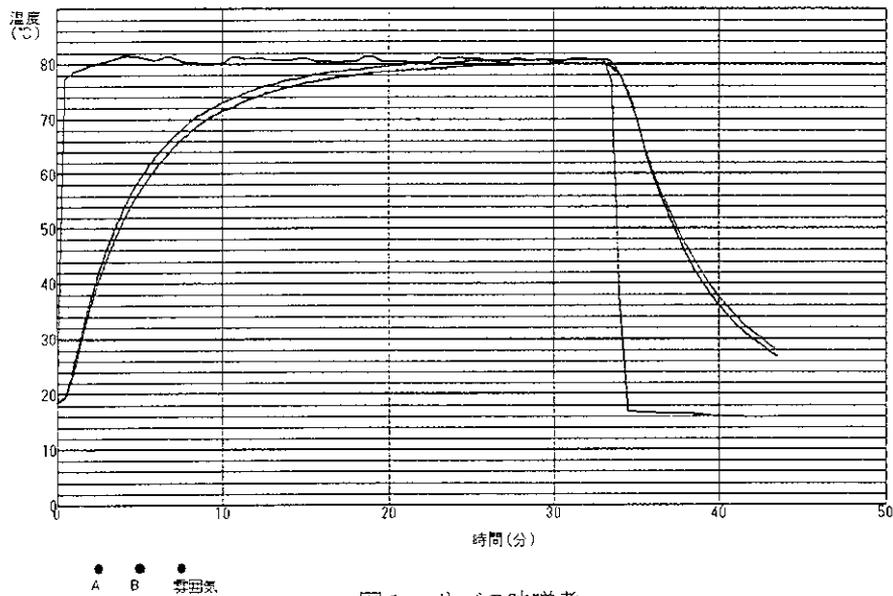
サバの味噌煮については、タンパク質成分が豊富であり、かつ容器包装内は多量の空気を含まず、また、液汁も存在することから、芽胞の発芽が比較的短時間内に起こり、毒素が産生されたと考えられた。鶏肉とごぼうについては、ボツリヌス菌の増殖と毒素産生が確認されるまでに 75 日を要した。本製品は容器包装内に多量の空気が含まれ、かつ液汁はほとんど含まない状態であったため、芽胞の発芽・増殖と毒素産生が容易には起こりにくい食品と考えられるが、鶏肉からの滲出液が食品全体に水分を与え、また、緩衝作用を示すことによって芽胞が発芽し易くなったと考えられた。

E. 結論

2 種類の不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品について理化学的性状を調べた後、ボツリヌス菌芽胞の添加試験を行った。いずれの製品も理化学的性状はボツリヌス菌の増殖可能範囲で、芽胞添加後の保存試験において芽胞の発芽・増殖と毒素の産生が確認された。今後製造基準や製品の冷蔵保存等、当該食品の取り扱いに関する指導を行う場合には、原材料の把握、容器包装内の空気の度合い、理化学的性状、加熱殺菌温度と

暴露時間、保存料の使用の有無などを考慮する必要がある。

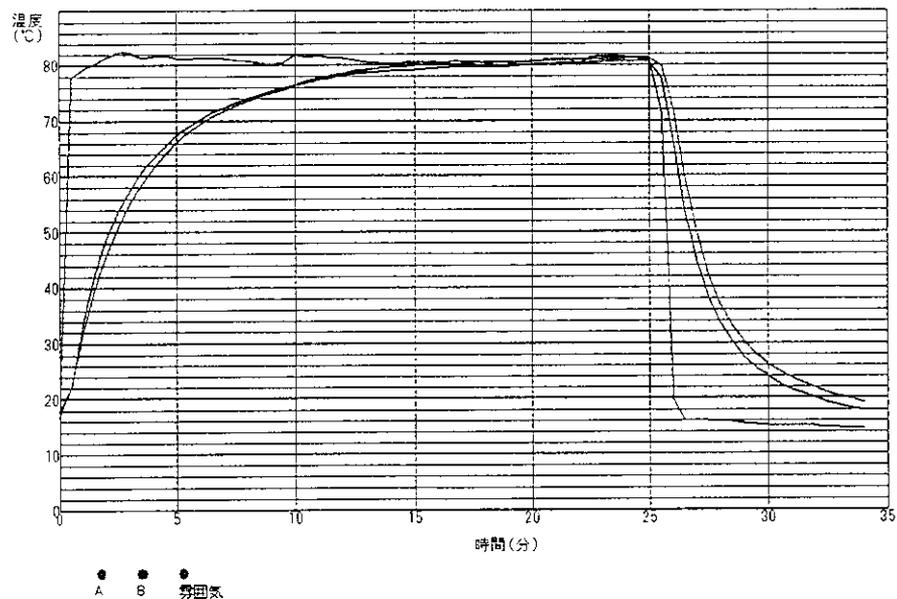
温度履歴曲線



● A ● B ● 蒸気

図1：サバの味噌煮

温度履歴曲線



● A ● B ● 蒸気

図2：鶏肉とごぼう

表 1：供試検体の内訳

品目記号	製品名	容器	総重量 (g)
A	サバのみそ煮 (2 切 入)	透明パウチ (平袋)	152~168
D	鶏肉とごぼう (70g)	透明パウチ (平袋)	106~108

表 2：菌株の血清型及び由来

菌株番号	血清型	由来
5101	A(62A)	ATCC 7984
5102	A(90A)	東海区水産研究所
5105	A(B1G4)	東海区水産研究所
5108	A(62A)	National Food Processors Association, U.S.A.
5106	B(213B)	東海区水産研究所

表3：容器包装詰低酸性食品のポツリヌス菌芽胞添加試験結果

担当：北海道衛研
試験開始日：2002年12月5日

区分	検体処理内訳			理化・細菌試験結果								
	処理内容	袋数	No.	試験項目	培養日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC(cfu/g)	Clt (cfu/g)	菌索型	備考 (菌索価等)
	無処理	3	21 22 23	理化学試験	0日	/	6.0 6.1 6.1	0.96 0.96 0.96	/	/	/	
A	無処理	3	15 16 17	細菌試験 (陰性確認)	0日	無			10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満		
B	無処理	3	18 19 20	保存試験 (未開封)	90日	無	6.2 6.1 6.2		10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満		
C	開封芽胞非接種	3	9 10 11	細菌試験 (開封操作確認)	0日	無			10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満		
D	開封芽胞非接種	3	12 13 14	保存試験 (開封)	90日	無	6.2 6.1 6.1		10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満		
E	開封芽胞接種	3	6 7 8	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	無	6.2 6.1 6.2		10未満 10未満 10未満	6.5 x 10 ³ 9.8 x 10 ³ 2.5 x 10 ⁴		
F	開封芽胞接種	5	1 2 3 4 5	細菌試験	14日 14日 14日 14日 14日	有 有 有 有 有	6.3 6.3 6.2 6.3 6.4		10未満 10未満 10未満 10未満 10未満	3.8 x 10 ⁷ 5.3 x 10 ⁷ 3.7 x 10 ⁷ 6.3 x 10 ⁷ 5.6 x 10 ⁷	A,B A,B A,B A,B A,B	8 x 10 ³ MLD/g 8 x 10 ³ MLD/g 4 x 10 ³ MLD/g 8 x 10 ³ MLD/g 4 x 10 ³ MLD/g

表 4：容器包装詰低酸性食品のポツリヌス菌芽胞添加試験結果

検体名：[D]鶏肉とごぼう
 担当：北海道衛研
 試験開始日：2002年12月5日

区分	後体処理内訳			理化学・細菌試験結果									
	処理内容	袋数	No.	試験項目	培養日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC(cfu/g)	菌素型	備考(菌素価等)		
A	無処理	3	21	理化学試験	0日	無	5.5	0.98	10未満	/			
			22				5.5	0.97				10未満	
			23				5.6	0.97				10未満	
B	無処理	3	15	細菌試験 (糖性確認)	0日	無	5.5		10未満	/			
			16						10未満				
			17						10未満				
			18						10未満				
			19						10未満				
C	開封芽胞非接種	3	20	保存試験 (未開封)	90日	無	5.6		10未満	/			
			9						10未満				
			10						10未満				
D	開封芽胞非接種	3	11	細菌試験 (開封操作確認)	0日	無	5.5		10未満	/			
			12						10未満				
			13						10未満				
E	開封芽胞接種	3	14	保存試験 (開封)	90日	無	5.6		10未満	/			
			6						4.0 x 10 ⁴				
			7						4.5 x 10 ⁴				
F	開封芽胞接種	5	8	細菌試験 (糖性確認)	0日	無	5.5		10未満	/			
			1						5.1 x 10 ⁶				
			2						5.6 x 10 ⁶				
			3						4.9 x 10 ⁶				
			4						7.3 x 10 ⁶				
5	5.5 x 10 ⁶												

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)
平成 14 年度 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：
容器包装詰低酸性食品へのボツリヌス菌芽胞接種試験

分担研究者 甲斐明美 東京都立衛生研究所・微生物部
研究協力者 門間千枝 東京都立衛生研究所・微生物部

研究要旨：気密性を有する容器包装詰の低酸性食品によるボツリヌス食中毒の発生防止対策が重要な課題となっている。今年度は、容器包装詰食品のうち、「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」4 品目、すなわち「さばの塩焼き」、「甘栗」、「牛タン・くん製」、「豚生姜煮」について、ボツリヌス菌芽胞（A 型および B 型ボツリヌス菌芽胞混合液を $10^3 \sim 10^4/g$ ）を接種後、30℃で保存培養して、ボツリヌス菌の増殖および毒素産生性の評価を行った。

その結果、いずれの食品も水分活性、pH はボツリヌス菌が十分発育できる値であった。また、食品 4 品目中 3 品目は、いずれも密封された状態においてボツリヌス毒素が産生された。食品の製造過程においてボツリヌス菌芽胞が生残した場合、ボツリヌス毒素が産生され、ボツリヌス食中毒につながる可能性が示唆された。今後、さらに多くの食品についても調査し、加熱殺菌条件の妥当性の評価や保存・流通条件（例えば「冷蔵保存食品」等）を検討する必要がある。

A. 研究目的

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において、「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」4 品目を対象に、細菌汚染を検査し、同時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した。

体には食品品目ごとに No. 1~No.30 まで番号を付し、後述の試験に供した。

さらに、追加試験として、「牛タン・くん製」30 検体（A：20 検体、B：10 検体）および前述した供試試料「牛タン・くん製（G）」30 検体の内予備の 4 検体（No.26~No.30）計 34 検体を供試した。

B. 研究方法

1. 供試食品

製造業者より購入した「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」4 品目、「さばの塩焼き（E）」、「甘栗（F）」、「牛タン・くん製（G）」、「豚生姜煮（H）」の各 30 検体計 120 検体を用いた(表 1)。各検

2. 水分活性、pH および 熱伝達の測定

1) 水分活性

水分活性は、水分活性測定装置 デカゴン・アクアラブ CX-3、または ロトロニック製 HYGRO-LAB で測定した。

2) pH

pH は、試料に等量の蒸留水を加え十分に混和した後、pH メーター(東亜電波工業製・HM-50V)で測定した。

3)熱伝達

熱伝達の測定には、一温度測定装置に記録式温度計(エラブ社製,CMC-821 型)を、温度センサーはステンレス保護管付き熱電対(外径 1.2mm)を用い、缶詰協会研究所で測定した。

3. 培地および試薬

1)クロストリジア測定用培地

市販のクロストリジア測定用培地(日水製薬)を用いた。ただし、濃度は1000mlあたり46.9g(常法の2/3量)とした。

2)標準寒天培地

市販の標準寒天培地(栄研化学)を用いた。

3)CW 寒天培地

市販のCW 寒天培地(カナマイシン不含、日水製薬)に、5%卵黄を加えて調製した。

4)MYP 寒天培地

市販のMYP 寒天培地(日水製薬)に、5%卵黄を加えて調製した。

5)DESO 寒天培地

市販のDESO 寒天培地(日水製薬)を用いた。

6)クックドミート培地

市販のクックドミート培地(Difco)に、0.2%ブドウ糖と0.3%可溶性でんぷんを添加したものをを用いた。

7)ゼラチン緩衝液

リン酸1水素ナトリウム4gを精製水1,000mlに溶解し、pH6.2に調整する。この溶液に、ゼラチン2gを加え、121℃、15分滅菌したものをを用いた。

8)でんぷん培地、ルゴール液の調製

普通寒天(日水製薬製)に可溶性でん

ぷんを1%になるように添加した。ルゴール液は、蒸留水300mlにヨード1g、ヨウ化カリウム2gを溶解したものをを使用した。

9)ボツリヌス毒素抗血清

ボツリヌス毒素抗血清は千葉県血清研究所から購入したものをを用いた。

10)マウス

ボツリヌス毒素検出には、ddy系マウス(雌、体重約20g)を用いた。

4. ボツリヌス菌添加食品の調製

4-1. 供試菌の調製

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), 90A, B1G4)およびB型1株(213B)の計5株を用いた(表2)。

2)芽胞液の調整

供試菌株の芽胞液は北海道立衛生研究所 武士甲一博士より提供された。

接種用芽胞液は各供試菌株の芽胞液を混合し用いた。すなわち、供試菌株芽胞液の芽胞数が、約 $2\sim 3 \times 10^7$ 個/mlになるように希釈し、この希釈液を等量混合し、添加用芽胞液とした。

3)芽胞液の芽胞数測定

各芽胞液の芽胞数は以下の方法で測定した。芽胞液0.5mlを滅菌した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倍段階希釈した。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℃に保温しておいたクロストリジア測定用培地10mlとり、各段階希釈液1ml加え、よく混和した後、パウチ内で固化した。これらは30℃、7日間培養し、黒色集落を数え、芽胞数とした。

4.2.食品へのボツリヌス菌の接種および対照試料の作製

1 品目あたり検体 14 袋(No.1-14)の外側をアルコールでよく拭き、その内 8 袋(No.1-8)に、芽胞液 20 μ l を接種し、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。また、無接種対照として 6 袋は接種せずにそのままシールした。これらの接種、シール操作は、缶詰協会研究所で行った。

4.3.加熱処理

各食品の無接種対照群 6 検体、および接種群 8 検体を、低温殺菌機(石田式)を用いて、温水中で 80 $^{\circ}$ C、20 分加熱処理した。なお、加熱時間は、あらかじめ供試試料の熱伝達を測定し、加熱時間には供試試料の中心が 80 $^{\circ}$ C に達するまでの時間を加えて加熱処理した。これらの加熱処理は缶詰協会研究所で行い、直ちに東京都立衛生研究所に搬送した。

5. 保存試験

ボツリヌス芽胞接種食品および未接種食品の保存試験方法を図 1 に示した。

保存試験開始時に非加熱処理の未開封試料各 3 検体(No18-20)を、下記方法によりボツリヌス菌数、一般生菌数、およびマウス毒素を調べた。他の保存試験用試料は、ガス膨張破裂による汚染を防止するため、個別に 2 重にビニール袋に入れ、30 $^{\circ}$ C の孵卵器内で保存培養した。保存期間中に容器がガス発生により膨張した試料は、4 $^{\circ}$ C の冷蔵庫に保管し、検査に供した。

5-1. 試料の調製

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。

5-2. 菌数の測定

1)一般生菌数

上記検液 2ml を滅菌リン酸緩衝ペプトン水 8ml に加え、よく混和した(検体の 10 倍希釈液)。さらに、この 10 倍希釈液とこれを元に滅菌リン酸緩衝ペプトンで 10 倍段階希釈し、試料液を作製した。これらの液 1ml ずつを 2 枚のペトリ皿にとり、標準寒天培地 15~20ml 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、37 $^{\circ}$ C、48 時間培養後、コロニー数を計数し生菌数を算出した。

2)クロストリジア菌数

一般生菌数の測定時に作成した試料液を使用した。滅菌アナエロビク・パウチのそれぞれに、加熱溶解し、55 $^{\circ}$ C に保温しておいたクロストリジア寒天培地 10ml または 25ml をとり、10 倍希釈液 1ml を加え、よく混和した後、平板に固化した。各希釈段階に 2 枚のアナエロビク・パウチを用いた。これらは 37 $^{\circ}$ C、1~7 日間培養し、黒色集落を数えた。

3)ボツリヌス菌数

クロストリジア菌数の測定値をボツリヌス菌数とした。また、さらに、一般生菌数の測定時に作成した試料液を CW 寒天平板培地に 0.1ml 塗布し、37 $^{\circ}$ C、48 時間嫌気培養を行い、ボツリヌス菌数を測定した。

4)セレウス菌数

一般生菌数の測定時に作成した試料液を MYP 寒天平板培地に 0.1ml 塗布し、37 $^{\circ}$ C、24 時間培養し、セレウス菌数を測定した。

セレウスの血清型別試験は、Tailar & Gilbert の血清型、および寺山らの血清型

診断用血清を用いて行った。でんぷん分解能試験は、でんぷん培地に被検菌株を面線培養し、菌の発育後、ルゴール液を滴下して調べた。

5)大腸菌群数

試料液 1ml ずつを 2 枚のペトリ皿にとり、DESO 寒天培地 15~20ml 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、37℃,24 時間培養した。

5-3.ボツリヌス毒素検査

1)定性試験

試料原液は毒素試験に供するまで、4℃または-20℃で保存した。解凍後、12,000rpm,4℃で 10 分間遠心分離し、上清をゼラチン緩衝液で 2 倍希釈し、0.5ml ずつ 2 匹のマウスの腹腔内に接種した。マウスの生死は 7 日間観察し、ボツリヌス特有の症状を示してマウスが死亡するか否かを観察した。

2)毒素型別試験

ボツリヌス毒素の定性試験の結果、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抗 A 型抗毒素および抗 B 型抗毒素を用いて中和試験を行い毒素型の確認を行った。同時に、加熱処理(100℃10 分)によるボツリヌス毒素の失活を確認した。試料はゼラチン緩衝液で、血清は滅菌生理食塩水で 2 単位になるように希釈した。

3)定量試験

ボツリヌス毒素定量試験は、LD₅₀ 法を用いて行った。

5-4. 増菌培養によるボツリヌス菌検査

検体の 2 倍希釈液を 3,000rpm, 20 分遠心分離し、沈渣をクックドミート培地 2 本に接種した。その内 1 本は未処理のまま、もう 1 本は 70℃15 分の加熱処理

を行った後、30℃で 1 週間嫌気培養した。培養後、上清を 12,000rpm,4℃で 10 分間遠心分離し、上清をゼラチン緩衝液で 2 倍希釈し、0.5ml ずつ 2 匹のマウスの腹腔内に接種した。マウスの生死は 7 日間観察し、ボツリヌス特有の症状を示してマウスが死亡するか否かを観察した。

6. 食品 G (牛タン・くん製) の追加試験結果

食品 G (牛タンくん製) 34 件について追加試験を行った。ボツリヌス菌の接種を行わず、30℃での保存試験のみを行い、細菌数、クロストリジウム属菌数、ボツリヌス菌、ボツリヌス毒素、バシラス セレウス、大腸菌群数、水分活性、pH 等を測定した。

7. 倫理面への配慮・試験操作上の留意点

使用したマウスには、できる限り苦痛を与えぬよう配慮し実験を行った。ボツリヌス菌の取り扱い、移動、試験操作、および保管等は、東京都立衛生研究所、安全管理規程に基づいて、専用の実験室で実施した。芽胞摂取後膨張した試料の開封は、安全キャビネット内で行い、使用した実験器具は、実験後すみやかにオートクレーブ(121℃, 20 分間)した後、廃棄した。

C.結果

1. 水分活性および pH

保存培養試験を行う前の水分活性および pH の結果を表 6~9 に示した。食品 E(さばの塩焼き)は水分活性 0.97~0.98 以上、pH6.3、食品 F(甘栗)は水分活性 0.98 以上、pH5.8、食品 G(牛タン・くん製)は水分活性 0.96、pH6.3~6.4、食品 H(豚生姜煮)は水分活性 0.96、pH5.6~5.7 であつた。

2. 熱伝達

供試試料の熱伝達測定結果および加熱処理時間を表 5 に、熱伝達測定チャートを図 2 および図 3 に示した。

加熱処理時間は、80℃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、サバの塩焼きが 59 分、甘栗が 75 分、牛タン・くん製が 32 分、豚生姜煮が 40 分とした。

3. 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 3 に、接種用に調製した混合芽胞液の芽胞数を表 4 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 $4\sim 6 \times 10^5$ 個である。

4. 保存試験

4-1. 食品試料調製直後の成績

加熱処理後（開封群）の芽胞接種検体および無接種検体各 3 検体ずつの分析結果を表 6～9 示した。

一般生菌数(細菌数)は、食品 G(牛タン・くん製)以外の試料からは検出されなかった。牛タン・くん製は、開封芽胞非接種群において 1 検体 1.1×10^2 個/g、開封芽胞接種群において 1 検体 2.5×10^1 個/g であった。

また、*Clostridium* 属菌は無接種対照試料からは検出されなかったが、接種試料では、食品 E(さばの塩焼き)が $1.5 \times 10^3\sim 9.4 \times 10^3$ 個/g、食品 F(甘栗) $2.4 \times 10^4\sim 3.1 \times 10^4$ 個/g、食品 G(牛タン・くん製)が $2.7 \times 10^4\sim 4.4 \times 10^4$ 個/g、食品 H(豚生姜煮)が $1.3 \times 10^4\sim 2.3 \times 10^4$ 個/g、検出され

た。これら検出された *Clostridium* 属菌は接種したボツリヌス菌のコロニーとし、以下ボツリヌス菌数として計数した。

4-2. 保存後の成績

1) さばの塩焼き (E)

食品 E の検査結果を表 6 に示す。保存培養開始時の陰性確認試験結果は、生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10 個未満/g であった。培養 10 日～22 日後に芽胞接種群の 5 検体すべてにガス発生による膨張が認められた。膨張品の生菌数はすべて 10 個未満個/g であったが、ボツリヌス菌数は $3.5 \times 10^6\sim 4.1 \times 10^7$ 個/g を示し、増殖が認められた。マウス毒性試験では、5 検体すべて A 型毒素の産生が認められた。その毒素量は 300、370 と 1630、1850、1900 (I.D.₅₀、1 単位の抗毒素血清を中和するのに必要な試料の希釈倍数で表した値) と大きく 2 つの値に分かれた。

培養後の pH は 6.4～6.5 であり、培養していない開封芽胞接種群や芽胞未接種群の 6.3～6.4 に比較して若干高くなっていた。水分活性値は 5 検体とも 0.96 であり、保存培養前（芽胞未接種検体、開封品および未開封品）0.97～0.98 以上と比較して、若干低くなっていた。

対照として行った芽胞未接種検体(開封品および未開封品)は 86 日後まで膨張が認められなかった。その生菌数およびボツリヌス菌数は 10 個未満/g で、ボツリヌス毒素の産生は認められなかった。

2) 甘栗 (F)

食品 F の検査結果を表 7 に示す。保存培養開始時の陰性確認試験結果は、生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10 個未満/g であった。芽胞接種群においては、培養 86 日経過後も 5 検体すべての袋に膨張が認められなかった。86 日後、5 検

体とも生菌数 10 個未満/g, ボツリヌス菌数 $4.5 \times 10^3 \sim 2.6 \times 10^4$ 個/g を示し, このボツリヌス菌数は, 保存培養試験前の値, $2.4 \times 10^4 \sim 3.1 \times 10^4$ 個/g とほぼ同じであった。また, この 5 検体は, ボツリヌス毒素の産生も認められなかった。

水分活性および pH の値も保存培養試験前とほぼ同じであった。

3)牛タン・くん製 (G)

食品 G の検査結果を表 8 に示す。保存培養試験を行っていない開封芽胞非接種群と開封芽胞接種群の生菌数は, 各 3 検体中 1 検体が 1.1×10^2 個/g, 2.5×10 個/g であった。芽胞接種検体以外の検体のボツリヌス菌数は 10 個未満/g であった。保存培養試験を行った検体すべて(開封, 未開封ともに)において, 標準寒天平板上菌の発育がみられ, 生菌数は $10^2 \sim 10^4$ 個/g であった。開封芽胞接種群においては, 保存培養後 37 日で 5 検体中 2 検体には膨張が認められたが, 他の 3 検体は 71 日まで膨張は認められなかった。この 3 検体は 71 日で検査に供した。ボツリヌス菌数は膨張があった 2 検体が 10 個未満 $\sim 3.2 \times 10^2$ 個/g, 膨張が認められなかった 3 検体は $4.7 \times 10^2 \sim 5.6 \times 10^3$ 個/g であった。しかし, 5 検体ともに A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。その毒素量は 80 ~ 700 (LD₅₀, 1 単位の抗毒素血清を中和するのに必要な試料の希釈倍数で表した値) であった。

培養後の pH は 6.0 ~ 6.2 であり, 培養をしていない開封芽胞接種群や芽胞未接種群の 5.7 ~ 5.9 に比較して若干高くなっていた。水分活性値は保存培養前と, 28 日あるいは 30 日培養後(膨張するまで)も変化はみられなかった。

なお, 開封芽胞非接種群において, 86 日の保存培養試験の検体でセレウス菌が 1.1×10^4 個/g 検出された。分離されたセ

レウス菌は, 血清型 Tailor&Gilbert 1 型, でんぷん分解能陰性であった。

4)豚生姜煮 (H)

食品 H の検査結果を表 9 に示す。保存培養開始時の陰性確認試験結果は, 生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10 個未満/g であった。培養 26 日 ~ 30 日後に芽胞接種群の 5 検体すべてにガス発生による膨張が認められた。膨張品の生菌数はすべて 10 個未満/g であったが, ボツリヌス菌数は $1.2 \times 10^3 \sim 5.2 \times 10^3$ 個/g であった。この値は, 培養前のボツリヌス菌数(開封芽胞接種群) $1.3 \times 10^4 \sim 2.3 \times 10^4$ 個/g に比較して, 減少していた。マウス毒性試験では, 5 検体すべて A 型毒素の産生が認められた。その毒素量は 2300 ~ 6400 (LD₅₀, 1 単位の抗毒素血清を中和するのに必要な試料の希釈倍数で表した値) であった。この毒素量は他の食品の値, すなわち 300 ~ 1900 LD₅₀ (E: サバの塩焼き), 80 ~ 700 LD₅₀ (G: 牛タン・くん製)と比較して高い値であった。

培養後の pH は 6.0 ~ 6.2 であり, 培養をしていない開封芽胞接種群や芽胞未接種群の 5.7 ~ 5.9 に比較して若干高くなっていた。水分活性値は保存培養前と, 28 日あるいは 30 日培養後(膨張)も変化はみられなかった。

対照として行った芽胞未接種群の検体(開封品および未開封品)は, 86 日後まで膨張が認められなかった。その生菌数およびボツリヌス菌数は 10 個未満/g で, ボツリヌス毒素の産生は認められなかった。

5-5. 食品 G (牛タン・くん製) の追加試験

試験結果

表 10 に追加試験結果を示した。7 日 ~ 18 日間培養したが, 供試した 34 検体

はすべて、袋の膨張がみられず、ボツリヌス毒素およびボツリヌス菌は検出されなかった。しかし、追加した「牛タン・くん製」A：20 検体中 2 検体は検査の際開封したところ、外観上「粘り」が発生していた。内容量も他の検体の多くが 36g～40g であったのに対し、13g、14g と少なかった。その内 1 検体は培養 0 日で対象として検査を行ったものであった。この 2 検体の生菌数は 10 未満であったが、A のほとんどの検体および予備の 4 検体（G：No.26～No.30）において、標準寒天で $10^3 \sim 10^6$ 個/g の菌の発育がみられた。A において培養 0 日で対象として検査を行った 2 検体中 1 検体は 2.3×10^2 の生菌数が認められた。

D. 考察

最近のわが国のボツリヌス食中毒は、従来その 90%以上を占めていた E 型食中毒（主に北海道、東北地方で発生し、原因食品はいずし）に代わり、瓶詰め、缶詰、気密性のある容器包装食品等を原因とした A 型、B 型食中毒が主体となってきた。私共も、平成 10 年 8 月、イタリア産グリーンオリーブ塩漬け（瓶詰め）による B 型菌による事例、平成 11 年 8 月、ハヤシライスの具（レトルト類似食品）による A 型菌による事例（患者は千葉県）等を経験している。

これらの事例では、調理された食品が気密性を有する容器包装に充填された後、加熱殺菌が不十分のまま常温放置された結果、ボツリヌス菌が増殖し、毒素を産生したために食中毒に至ったと推定された。特にハヤシライスの具（レトルト類似食品）の事例では、原因食品は「要冷蔵食品」であったにもかかわらず、外観上はレトルト食品（ 121°C 、4 分の加熱加圧殺菌処理がされている）と類似し

ていたため常温放置されていた。

また、ボツリヌス菌の発育は、食品中にボツリヌス芽胞が生残していても、水分活性と pH で制御されている。しかし、グリーンオリーブ塩漬けによる食中毒発生に伴う市販品の検査では、他の多くのオリーブ瓶詰めの pH は、ボツリヌス菌が発育しない 4.6 以下（73 検体中 58 検体、79.5%）であったのに対し、原因食品となったブランドのグリーンオリーブは、pH5.2～6.5（18 検体中 18 検体、100%）とボツリヌス菌が十分に発育できる値であり、pH による発育制御が行われていない成績であった。

このような食中毒の発生や、多種多様な輸入食品等が流通していること、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ことから、ボツリヌス食中毒発生の危険が懸念されていた。しかし、わが国では、ボツリヌス食中毒に対するリスク評価は十分には行われていなかった。とりわけ、常温流通する容器包装詰された低酸性食品におけるリスク評価は、容器包装詰加圧加熱殺菌食品と違い食品衛生法の規制を全く受けていないこと、更に本菌食中毒の重篤性からも急務であった。今回は、食品の食味・風味・食感、色調を損なわない工業的調理法として需要が拡大している「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」を、リスク評価対象とした。接種試験方法は、できる限り製造品に近い状態で評価を行うため、買い上げた製品にボツリヌス菌芽胞液を接種し、再密封した製品試料を用いた。また接種ボツリヌス菌の増殖性と毒素産生性をより確実に評価するため、複数の異なる菌株からなる混合芽胞（A 型菌 4 株と B 型菌 1 株）を用い、比較的多量の芽胞濃度 $10^3 \sim 10^4$ 個/g を接種し、培養温度 30°C で評

価した。

食品 E(さばの塩焼き)と食品 H(豚生姜煮)は接種した 5 検体すべてに袋の膨張と A 型ボツリヌス毒素産生が認められた。しかし、袋の膨張が認められるまでの期間は食品 E(さばの塩焼き)は 10 日～22 日、食品 H(豚生姜煮)は 26 日～30 日と異なっていた。また、食品 E(さばの塩焼き)は、培養後ボツリヌス菌数は $10^6 \sim 10^7$ 個/g を示し、増殖が認められたのに対し、食品 H(豚生姜煮)では培養後の菌数は 10^3 個/g であり、この値は、培養前のボツリヌス菌数 10^4 個/g に比較して、若干減少していた。ボツリヌス菌が増殖した後、死滅した可能性もあると考えられた。

また、食品 G(牛タン・くん製)は、5 検体中 3 検体は袋の膨張が認められなかったが、5 検体すべてに A 型ボツリヌス毒素産生が認められた。牛タンの薄切りを 1 枚ずつ並べた厚みの薄い商品であったため、袋の膨張が判らなかったと考えられる。なお、この食品は 121°C 、4 分加熱済みと袋に明記してあるにも関わらず、保存培養試験を行っていない検体 6 検体中 2 検体において、また、保存培養試験を行った検体すべて(開封、未開封ともに)において、標準寒天平板上菌の発育がみられ、生菌数は $10^2 \sim 10^4$ 個/g であった。さらに、開封芽胞非接種群において、86 日の保存培養試験の検体でセレウス菌が 1.1×10^4 個/g 検出された。これらの成績からこの食品は十分に加熱されていないことが示唆された。さらに、同じ製造会社の別の食品(この実験で他の分担研究者が検査をしたもの)から A 型ボツリヌス菌が検出されたため、34 検体を追加して保存培養試験を行った。

追加試験では、7 日～18 日間培養後、

供試した 34 検体はすべて袋の膨張がみられず、ボツリヌス毒素およびボツリヌス菌、クロストリジウム菌数、セレウス菌は検出されなかった。本品は、生肉の可能性もあったので大腸菌群の検査も行ったが、陰性であった。しかし、「粘り」を発生している検体が 2 検体あったこと、A のほとんどの検体および予備の 4 検体(G, No.26～No.30)では、標準寒天で $10^3 \sim 10^6$ 個/g の菌の発育がみられたこと、しかもこれらの「粘り」や「菌の発育」は培養 0 日で対象として検査を行った検体にも認められたことから、衛生学的に問題のある食品であることが判明した。

一方、食品 F(甘栗)は、培養 86 日経過後も芽胞を接種した 5 検体すべての袋に膨張が認められなかった。ボツリヌス毒素の産生も認められず、ボツリヌス菌数は保存培養試験前の値とほぼ同じであった。ボツリヌス菌の増殖およびボツリヌス毒素が産生されなかった理由として以下の 2 点が考えられる。第 1 に、嫌気状態になっていなかった可能性。すなわち、芽胞を接種した後、ガス交換を行わずにシールしていること、さらに、甘栗は食肉等に豊富に含まれているグルタチオン等の還元物質が少ないので嫌気状態になりにくいこと等である。第 2 は、この包装の中は皮をむいた丸ごとの甘栗のみで水分が少なく、接種した芽胞が甘栗の表面に接していただけで発育できなかった可能性である。

食品 F(甘栗)以外の食品 3 品目にはボツリヌス毒素の産生が認められた。最も産生量の多かったのは、食品 H(豚の生姜煮)で $2300 \sim 6400 \text{ LD}_{50}$ (LD_{50} : 1 単位の抗毒素血清を中和するのに必要な試料の希釈倍数で表した値)、食品 E(さばの塩焼き)は、 $300 \sim 1900 \text{ LD}_{50}$ 、食品 G(牛タンくん製)

は 80～700LD₅₀ (牛タンくん製)であった。
このように産生毒素量は食品によりかなり異なっていた。

以上、今回検討した食品 4 品目中 3 品目は、保存培養期間が異なるものの、いずれも密封された状態においてボツリヌス毒素が産生された。食品の製造過程においてボツリヌス菌芽胞が生残した場合、ボツリヌス毒素の産生、ボツリヌス食中毒が発生する可能性が十分にあるこ

とが示唆された。今後、加熱殺菌条件の妥当性の評価や保存・流通条件（例えば「冷蔵保存食品」等）を検討する必要性が示唆された。

表1 ボツリヌス菌芽胞添加試験用の供試食品

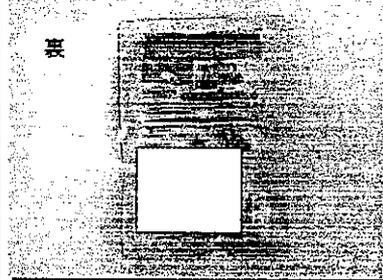
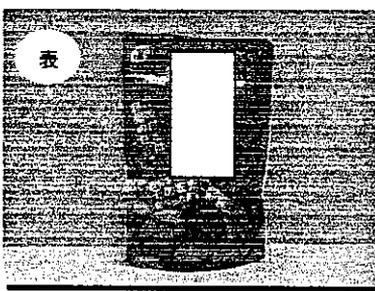
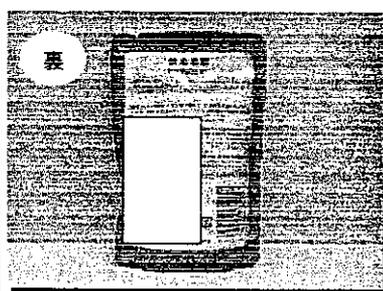
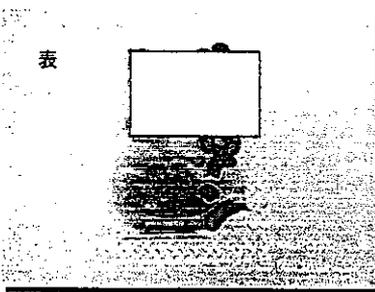
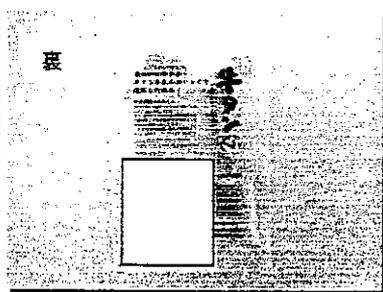
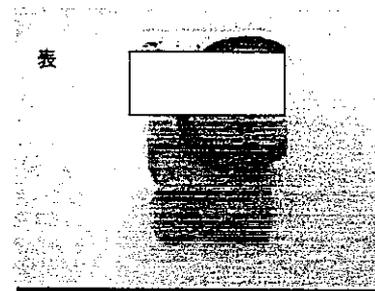
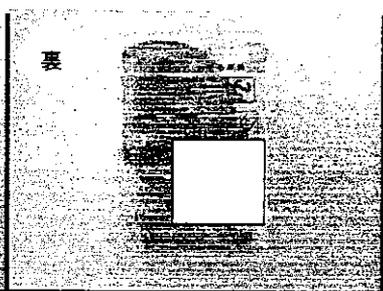
品目記号 E サバの塩焼(2 切入り)			
容器	透明パウチ(平袋)		
容器のサイズ (タテ×ヨコ)	220mm×150mm		
賞味期限	03.02.05		
総重量(g)	111.0~128.7		
pH	6.3		
Aw	0.97~0.98		
品目記号 F 甘栗(50g)			
容器	アルミパウチ(スタンディング)		
容器のサイズ (タテ×ヨコ)	148mm×98mm		
賞味期限	表示なし		
総重量(g)	55.5~58.2		
pH	5.8		
Aw	0.98		
品目記号 G 牛タンくん製(40g, 加熱食肉製品(120°C, 4分))			
容器	不透明パウチ(平袋)		
容器のサイズ (タテ×ヨコ)	240mm×168mm		
賞味期限	表示なし		
総重量(g)	60.4~63.2		
pH	6.3~6.4		
Aw	0.96		
品目記号 H 豚生姜煮(60g)			
容器	透明パウチ(平袋)		
容器のサイズ (タテ×ヨコ)	210mm×138mm		
賞味期限	03.03.21		
総重量(g)	88.3~95.4		
pH	5.6~5.7		
Aw	0.96		

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	ATCC7948
5102	A	90A	東海区水産研究所(横関)
5105	A	B1G4	東海区水産研究所(横関)
5108	A	62A	NFPA ^{a)}
5106	B	213B	東海区水産研究所(横関)

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