

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  
分担研究項目 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	石村 勝之	広島市衛生研究所	主任技師
研究協力者	萱島 隆之	広島市衛生研究所	主任

研究要旨

最近のボツリヌス食中毒事例の発生形態から、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の構築が重要な課題となっている。今年度は、容器包装詰食品3品目（食品L、M、N）について、ボツリヌス菌芽胞接種による発芽・増殖性および毒素産生性の評価を分担した。1品目あたり5試料にA型およびB型ボツリヌス菌芽胞混合液を $10^4$ /gレベルで接種・再密封し、30℃で培養した結果、食品L（pH6.0, 水分活性(Aw) 0.97）は、約10日で5試料ともガス膨張を認めた。ボツリヌス菌数は $10^7 \sim 10^8$ CFU/gを示し、A・B型両毒素の産生が認められた。食品M（pH6.1, Aw0.98以上）は、24日後（1試料）、約60日後（2試料）にガス膨張がみられ、ボツリヌス菌数は $10^7 \sim 10^8$ CFU/g、A型毒素の産生も認められたが、他の2試料は90日後もガス膨張、ボツリヌス菌の増殖等の変化は認められなかった。一方、食品N（pH5.5, Aw0.96）は、11日後（1試料）および18～20日後（4試料）にガス膨張が認められた。11日後の膨張品は、ボツリヌス菌数 $10^8$ /gを示し、A型毒素の産生が認められた。一方、18～20日後膨張品もA型あるいはA・B型毒素が認められたが、それらのボツリヌス菌数は $10^4$ CFU/gであった。

以上の結果、今回分担検討した3品目は、ガス膨張に必要とする日数、ボツリヌス菌数、ならびに毒素産生性および産生毒素型に差がみられたが、いずれも芽胞が残存し、増殖可能温度に保存された場合、ボツリヌス毒素の産生が可能な食品と考えられた。

A. 研究目的

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とされる食品製造が増加している。そのなかには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、ボ

ツリヌス菌芽胞の汚染があった場合、その増殖が可能な食品が多数流通していると推察される。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い適切な措置を施すことは、我が国の食

品衛生の確保上、極めて重要な課題である。

今年度、研究班では、容器包装内をガス置換後、加熱処理を行う容器包装詰食品を主対象に検討を行うこととし、本研究では分担した食品3品目についてボツリヌス菌芽胞の接種による増殖性および毒素産生性を検討、評価することを目的とし試験を行った。

## 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3品目（L（魚照焼）、M（汁の具）、N（炒めの素）：各40検体計120検体）を用いた（表1）。各検体には食品品目ごとにNo.1～No.40まで番号を付し、後述の試験に供した。

### 2. 試料の水分活性(Aw)およびpH測定

食品L、M、N各3試料の未開封・非加熱検体について、AwおよびpHを測定した。

Awは水分活性測定装置（ロトロニック製HYGRO-LAB）、pHはpHメーター（東亜電波工業製、HM-50V）を用い測定した。ただし、pHの測定は、液汁のある食品〔食品M、N〕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。

### 3. ボツリヌス菌芽胞添加試料の作製および分析

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

#### 3.2. 培地の調製

##### 3.2.1 クロストリジア測定用培地の調製

市販のクロストリジア測定用培地（日本

製薬製、以下CCAと略す）を用いた。ただし、調製濃度は1000mlあたり46.9g（常法の2/3量）とした。

##### 3.2.2 標準寒天培地の調製

市販されている標準寒天培地（日本製薬製、以下SAと略す）を用いた。

### 3.3. 芽胞液の調製

#### 3.3.1. 芽胞液の初発芽胞数測定

供試菌株の芽胞液は北海道立衛生研究所より提供された。各芽胞液の芽胞数の測定を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CCA10mlをとり、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。

#### 3.3.2. 接種用芽胞液の調製

供試試料への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 $2\sim 3 \times 10^6$  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。

### 4. 保存試験

ボツリヌス芽胞接種試料および未接種試料の保存試験方法を図1のフローに示した。詳細は下記の方法で行った。

#### 4.1. 接種試料および対照試料の作製

1品目あたり試料14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、この部分から接種芽胞液20μlを8袋に接種し、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。接種には、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) を用いた。

試料への接種時には接種用芽胞液 20  $\mu$ l 中の初発芽胞数を以下のように測定した。すなわち、試料 (2~4 品目毎 (他の分担研究者と同時接種のため), 16~32 検体) への接種中に無作為に 3 回、それぞれ滅菌蒸留水 10ml 入りの試験管に 20  $\mu$ l 接種した。これを 80°C, 20 分加熱処理後、以後の 10 倍段階希釈による測定は、上記 3.3.1. 芽胞液の初発芽胞数測定と同様に行った。

#### 4.2. 加熱処理

食品品目ごとに無接種対照試料 6 検体および接種試料 8 検体を、低温殺菌機 (石田式) を用いて、温水中で 80°C, 20 分加熱処理した。なお、あらかじめ供試試料の熱伝達を測定 (測定法の詳細は総合研究報告書参照) し、加熱時間には供試試料の中心が 80°C に達するまでの時間を加えて加熱処理した。加熱処理済み試料 24 検体 (1 品目あたり無接種対照試料 3 検体および接種試料 5 検体計 8 検体) は、直ちに広島市衛生研究所に搬送した。

#### 4.3. 加熱処理直後の試料分析

##### 4.3.1. 検液の調製

加熱処理済み試料の全量は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。

##### 4.3.2. 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°C, 48 時間培養した。

##### 4.3.3. 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 倍段階希釈し、滅菌アナエロビック・パウチのそれぞれに、加熱溶解し、55°C に保温しておいた CCA 10ml 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 枚のアナエロビック・パウチを用いた。これらは 30°C, 7 日間培養し、黒色集落を数え、結果を “CFU/g” で示した。

##### 4.3.4. pH 測定

検液の pH は、pH メーター (東亜電工業製, HM-50V) を用い測定した。

#### 4.4. ボツリヌス菌芽胞接種試料の保存試験

##### 4.4.1. 保存試験試料

缶詰協会研究所から搬送した加熱処理済試料 24 検体 (食品 L, M, N 各 8 検体 (No.1~No.8)) および非加熱処理検体 18 検体 (1 品目各 6 検体 (No.12~No.14, No.18~No.20)) を供試した。

##### 4.4.2. 保存培養方法

保存試験開始時に非加熱処理の未開封試料 9 検体 (1 品目各 3 検体 (No.6~No.8)) を下記方法によりボツリヌス菌数、一般生菌数、およびマウス毒性の検査項目で試験に供した。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

滅菌ストマッカー袋に入れ、シール後、30℃の孵卵器（冷凍機付インキュベータ（サンヨー、MIR553）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℃の冷蔵庫に保管し、検査に供した。

#### 4.4.3. 芽胞非接種試料の試験法

##### 4.4.3.1. 一般生菌数の測定

食品全量をストマフィルターに入れ、滅菌蒸留水で2倍に希釈し、1分間ストマッキングしたものを試料原液とした。試料原液20 ml にペプトン加食塩水を80 ml 加え10倍希釈液を作成した後、ペプトン加食塩水9 ml で10倍階段希釈した。希釈した試料液各1 ml を2枚の滅菌シャーレに入れ、標準寒天培地15 ml で混釈し、培地が固化した後、同培地を重層して乾燥させ、35±1.0℃で48±3時間培養した後、コロニー数を計数し生菌数を算出した。陰性対照として、検体の希釈に用いた精製水、ペプトン加食塩水1 ml ずつを2枚ずつの滅菌シャーレに培地に混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養した。培地の陰性対照も同様に作製した。

##### 4.4.3.2. ボツリヌス菌数の測定

一般生菌数の測定時に作成した10倍希釈の試料液を使用した。10倍希釈液10 ml を2枚の滅菌パウチに正確に採り、あらかじめ加温溶解し50℃の温度に保持したクロストリジア寒天培地（日水製薬製）約15 ml をこれに加え、よく混合し、熱シールした後、冷却固化させた。35±1.0℃で24±2時間培養した。必要があれば、30℃で5日後まで観察した。陰性対照として、検体の希釈に用いた精製水、ペプトン加食塩水10 ml を培地に混合し、試料の場合と同様に操

作して培養した。培地対照も作製した。

##### 4.4.3.3. pH測定

pHメーター（HORIBA、F-23）を用い測定した。

pHの測定は、4.4.3.1.生菌数で作製した試料原液を用いた。

##### 4.4.3.4. 毒素の定性試験

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0.5 ml ずつ2匹のマウスの腹腔内に接種した。マウスの生死は5日間観察した。

#### 4.4.4. 芽胞接種試料の試験法

##### 4.4.4.1. 一般生菌数の測定

食品No.1～No.5のうち、ガス膨張した食品および90日間外観変化の認められなかった食品は、無菌的に開封し、各試料全量をストマフィルターに移し変えた。それを滅菌蒸留水で2倍に希釈し、1分間ストマッキングしたものを試料原液とした。試料原液20 ml にペプトン加食塩水を80 ml 加え10倍希釈液を作成した後、ペプトン加食塩水9 ml で10倍階段希釈した。希釈した試料液各1 ml を2枚の滅菌シャーレに入れ、標準寒天培地15 ml で混釈した。培地が固化した後、同培地を重層して乾燥させ、35±1.0℃で48±3時間培養した後、コロニー数を計数し生菌数を算出した。陰性対照として、検体の希釈に用いた精製水、ペプトン加食塩水1 ml ずつを2枚のシャーレに分注し、15 ml ずつの培地と混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養した。培地対照も作製した。

##### 4.4.4.2. ボツリヌス菌数の測定

一般生菌数の測定時に作成した10倍階段希釈した試料液を使用した。適宜希釈した

試料液各 1 ml を 2 枚の滅菌パウチに正確に採り、あらかじめ加温溶解し 50°C の温度に保持したクロストリジア寒天培地(日水製薬製)約 20 ml をこれに加え、よく混合し、熱シールした後、固化させた。培地が凝固した後、35±1.0°C で 24±2 時間培養した。必要があれば、30°C で 5 日後まで観察した。陰性対照として、検体の希釈に用いた精製水、ペプトン加食塩水 1 ml ずつを 2 枚のパウチに入れ、培地に混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養した。培地対照も作製した。

#### 4. 4. 4. 3. pH 測定

pH の測定は 4. 4. 4. 1. 一般生菌数で作製した試料原液を用いた。

#### 4. 4. 4. 4. ボツリヌス毒素・毒素型の定性試験

試料原液は毒素試験に供するまで、-20°C で保存した。解凍後、3000 rpm、4°C で 20 分間遠心分離し、上清を 0.5 ml ずつ 2 匹のマウスの腹腔内に注射した。マウスは 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。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。

5. 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、広島市衛生研究所安全管理規程に基づいて実施した。芽胞接種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、0.1%次亜塩素酸ナトリウムに浸漬し、実験後すみやかにオートクレーブ(121°C、30 分間)した後、廃棄

した。

## C. 結 果

### 1. 供試試料の Aw および pH

結果を表 3 に示した。食品 L (魚照焼) は Aw 0.97, pH 6.0、食品 M (汁の具) は Aw 0.98 以上, pH 6.1~6.2、食品 N (炒めの素) は Aw 0.96, pH 5.4~5.5 であった。

### 2. 調製芽胞液の菌数

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、2~3×10<sup>7</sup> CFU/ml になるように 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 μl あたりの計算上の値は 4~6×10<sup>5</sup> CFU であった。接種用芽胞液の芽胞数は 7.3×~9.4×10<sup>5</sup> CFU/20 μl で、この計算値とほぼ一致した。

### 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 2 および 3 に示した。測定結果より、加熱処理時間は 80°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、食品 L (魚照焼) は 57 分、食品 M (汁の具) は 25 分、食品 N (炒めの素) は 32 分とした。

### 4. 加熱処理直後試料の分析結果

加熱処理後の芽胞接種試料および無接種試料各 3 検体ずつの分析結果を表 7、表 8 および表 9 の区分 C および E に示した。好気性の一般生菌数(細菌数)はいずれの試料からも検出されなかった。また、*Clostridium* 属細菌は無接種対照試料から

は検出されなかったが、接種試料からは食品 L (魚照焼) が  $3.0\sim 3.6\times 10^4$  CFU/g、食品 M (汁の具) が  $1.3\sim 1.4\times 10^4$  CFU/g、食品 N (炒めの素) が  $1.1\sim 1.3\times 10^4$  CFU/g 検出された。よって、これら検出された *Clostridium* 属細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。

## 5. 保存試験結果

### 5.1. 食品 L (魚照焼) の分析結果 (表 7)

食品 L (魚照焼) の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 CFU/g 未満であった (表 7, 区分 A)。芽胞接種試料は、培養 10 日および 11 日後に 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 CFU/g 未満であったが、ボツリヌス菌数は  $10^7$  から  $10^8$  CFU/g オーダーを示し、増殖が認められた。マウス毒性試験では、5 試料すべて A・B 型両毒素の産生が認められた。培養後の pH は 6.1~6.3 であった (表 7, 区分 F)。対照として行った芽胞未接種試料 (開封品および未開封品) は 90 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 CFU/g 未満で、ボツリヌス毒素の産生は認められなかった (表 7, 区分 B,D)。

### 食品 M (汁の具) の分析結果 (表 8)

食品 M (汁の具) の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 CFU/g 未満であった (表 8, 区分 A)。芽胞接種試料では、培養 24 日後に 1 検体に膨張が認められた。この試料は生菌数 10 CFU/g 未満、ボツリヌス菌数  $5.8\times 10^7$  CFU/g を示し、A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。その後、61 日および

63 日後に 2 検体が膨張し、生菌数 10 CFU/g 未満、ボツリヌス菌数  $10^8$  CFU/g、A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。残りの接種試料 2 検体は 90 日後まで膨張が認められず、生菌数 10 CFU/g 未満、ボツリヌス菌数  $10^4$  CFU/g、ボツリヌス毒素不検出であった (表 8, 区分 F)。対照品は 90 日後においても、生菌数、ボツリヌス菌数ともに 10 CFU/g 未満、ボツリヌス毒素不検出であった (表 8, 区分 B,D)。

### 5.3. 食品 N (炒めの素) の分析結果 (表 9)

食品 N の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 CFU/g 未満であった (表 9, 区分 A)。芽胞接種試料では、培養 11 日後に 1 検体膨張が認められた。この試料は、生菌数 10 CFU/g 未満、ボツリヌス菌数  $10^8$  CFU/g を示し、A 型毒素の産生が認められた。一方、他の 4 検体は 18 日および 20 日後に膨張が認められ、A 型毒素 (3 試料) または A・B 型毒素 (1 試料) の産生が認められたが、これらの検体のボツリヌス菌数は  $10^4$  CFU/g を示し、最初の接種芽胞数と差異が認められなかった (表 9, 区分 F)。対照品については 90 日後まですべて膨張が認められず、生菌数、ボツリヌス菌数ともに 10 CFU/g 未満、ボツリヌス毒素不検出であった (表 9, 区分 B,D)。

## 食品 L, M, および N 中におけるボツリヌス菌の発育状況

表 10 に食品 L, M, および N の芽胞接種試料中でのボツリヌス菌発育状況を示した。

3 食品品目とも、ガス膨張、ボツリヌス菌の増殖およびボツリヌス毒素が検出されたが、膨張までの日数、膨張試料数、膨張試料中のボツリヌス菌数、および産生毒素

型に差異が認められた。ガス膨張品の pH は、3 品目とも加熱処理直後の試料より 0.2 前後高くなる傾向がみられた。

#### D. 考 察

近年のわが国のボツリヌス関連事件および食中毒の発生をみると、平成 9 年 7 月に輸入オイスターソースからボツリヌス A 型菌が検出され、全国的なリコールが行われた事例、平成 10 年 8 月にはイタリア産オリブ塩水漬けが原因食品と推定されたボツリヌス B 型菌による食中毒事例、そして平成 11 年 8 月にはハヤシライス（ルー）を推定原因食品とするボツリヌス A 型菌食中毒の発生などが発生している。これらは気密性を有する容器包装に充填され、その後の加熱殺菌が不十分なために残存した芽胞が常温に置かれた間に増殖したためと考えられる食中毒事例やボツリヌス食中毒の発生を誘発する危険性のある流通食品の探知事例であった。このような状況下、わが国では、多種多様な輸入食品や国内製造食品が流通しているものの、それらの食品の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こなかった。とりわけ、先の事例などから常温流通されている容器包装詰低酸性食品のリスク評価は、本菌食中毒の重篤性から考えて急務である。

リスク評価が必要な食品のうち、今回検討した食品は、食味・風味・食感、色調を損なわない調理法としてその応用が拡大しつつあるガス充填後加熱調理法により製造された食品群である。

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、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、接種芽胞濃度  $10^4/g$ 、培養温度  $30^{\circ}C$  で評価を行った。その結果、芽胞接種した 5 試料すべてが比較的短い日数（約 10 日）でボツリヌス菌の増殖と毒素産生が認められた食品 L（魚照焼）と、増殖までの期間に差がみられた食品 M（汁の具）、食品 N（炒めの素）に分けられた。

食品 L（魚照焼）は魚肉（切り身）を照焼した後、加熱調理処理したものである。毒素型から考えて接種した A 型および B 型両菌とも増殖・毒素産生が速やかになされたと考えられ、本品はボツリヌス菌増殖に適した食品（環境にある）と考えられた。一方、食品 M（汁の具）は、野菜を主にした汁の素であるが、ボツリヌス菌の増殖を認めるまでに 1 ヶ月および 2 ヶ月を要した試料と試験期間である 3 カ月後も増殖がみられない試料があり、増殖が認められた試料も A 型毒素のみが検出されるなど、接種試料間で芽胞の発芽・増殖、産生される毒素型の挙動に差異が認められた。この食品は pH6.1、Aw0.98 以上であり、これらのパラメーターではボツリヌス菌の増殖は十分可能な値を示していることから、食品中の成分あるいは物理的要因が発芽・増殖および毒素型ごとの発芽・増殖の差にも影響しているものと考えられる。しかし、その詳細は今回不明である。

食品 N（炒めの素）は、豚肉を主とした試料であり、5 試料とも毒素の産生が確認されたが、11 日後にガス膨張した 1 試料のボツリヌス菌数が  $10^8 CFU/g$  を示したのに

対し、18日および20日後に膨張が認められた4試料は、接種菌量と同等の $10^4$ CFU/gであった。また、産生毒素型もA型が主体であったが、1検体はA・B型であった。ただし、この後者の食品N4検体はガス膨張確認後、8日および10日間冷蔵保存した後に検査に供す条件となったため、培養中における増殖後の菌数減少の可能性と冷蔵保存中に菌数低下を起こした可能性を考える必要があり、この結果の解釈については今後の課題、反省としたい。

以上の結果から、今回検討した食品3品目は、接種芽胞の発芽・増殖にいたる期間および頻度、さらに産生毒素型がそれぞれ異なるものの、いずれも密封された状態においてボツリヌス毒素の産生が可能であったことから、食品製造過程においてボツリヌス菌芽胞が残存した場合、保存流通条件によっては毒素産生が起りうると考えられた。

従って、今後、加熱殺菌条件や保存・流通条件の妥当性を評価・検討する必要があると考えられる。一方、今回の試験において増殖にばらつきがみられたことは、安全性評価の一環として実施する芽胞接種試験において必要となる試験品数や試験方法に関する課題として検討が必要な点と考えられた。

なお、現在、中国・四国地域における容器包装詰低酸性食品の製造実態調査を各県衛生研究所を通じ、各県へ依頼調査中であるので、その調査結果は来年度の研究に資する予定である。



表 1 供試試料

食品 記号	製 品	容 器	総重量 (g)
L	魚照焼	透明パウチ(平袋)	117~141
M	汁の具	アルミパウチ(平袋)	42~46
N	炒めの素	アルミパウチ(平袋)	108~116

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	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 Association (米国食品製造業者協会)

表 3 供試試料の Aw および pH

食品 記号	検体 No.	Aw	pH	
			測定方法	測定値
L	21	0.97	50%DW 加	6.0
	22	0.97		6.0
	23	0.97		6.0
M	21	1.00	直 接	6.1
	22	1.00		6.1
	23	1.00		6.2
N	21	0.96	直 接	5.5
	22	0.96		5.5
	23	0.96		5.4

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	$4.6 \times 10^8$
5102		$3.0 \times 10^8$
5105		$4.2 \times 10^8$
5108		$6.4 \times 10^8$
5106	B	$6.0 \times 10^8$

表 5 接種用芽胞液の初発芽胞数

測定値 (CFU/20 $\mu$ l)	平均 (CFU/20 $\mu$ l)
$7.3 \times 10^5$	
$7.0 \times 10^5$	$7.9 \times 10^5$
$9.4 \times 10^5$	

表 6 熱伝達測定結果および加熱処理時間

食品 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	
L	36.0	37.0	57
M	4.5	5.0	25
N	11.5	12.0	32

\*, 80°C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

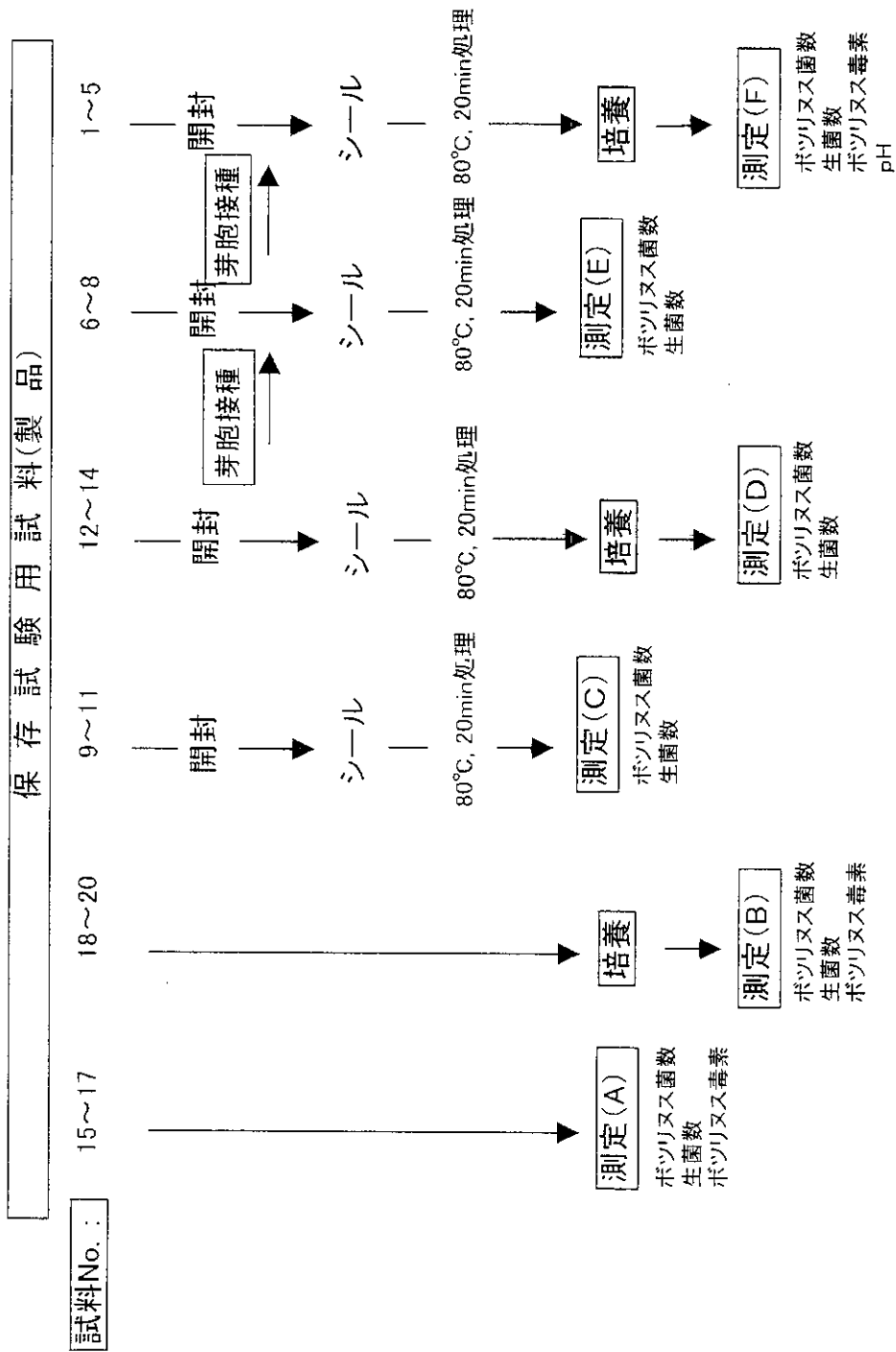


図1 接種保存試験フロー

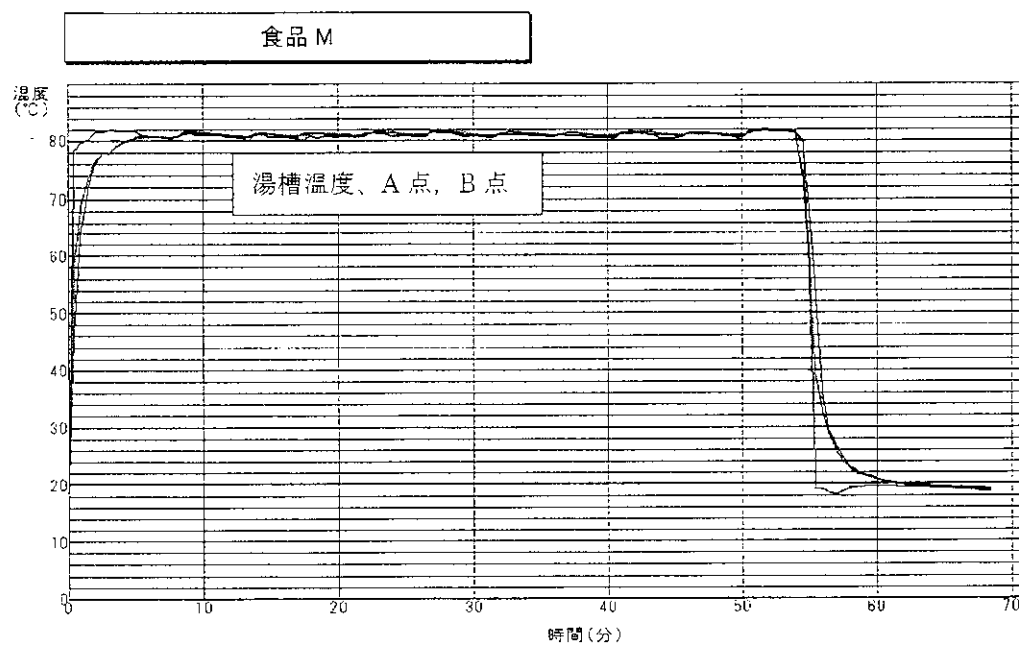
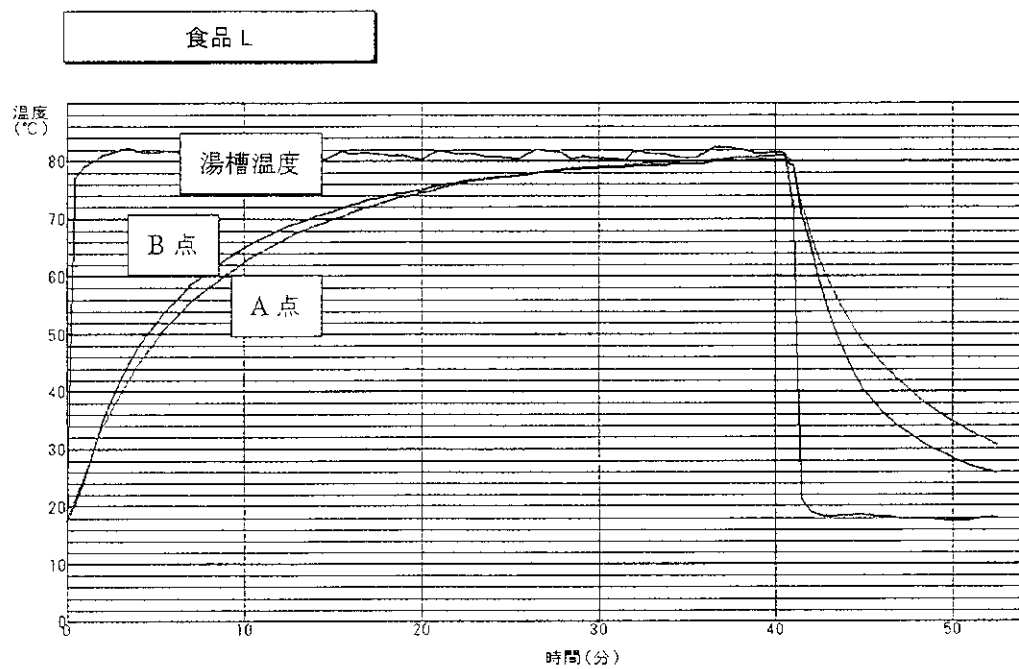


図 2 供試試料 (食品 L, M) の温度履歴曲線

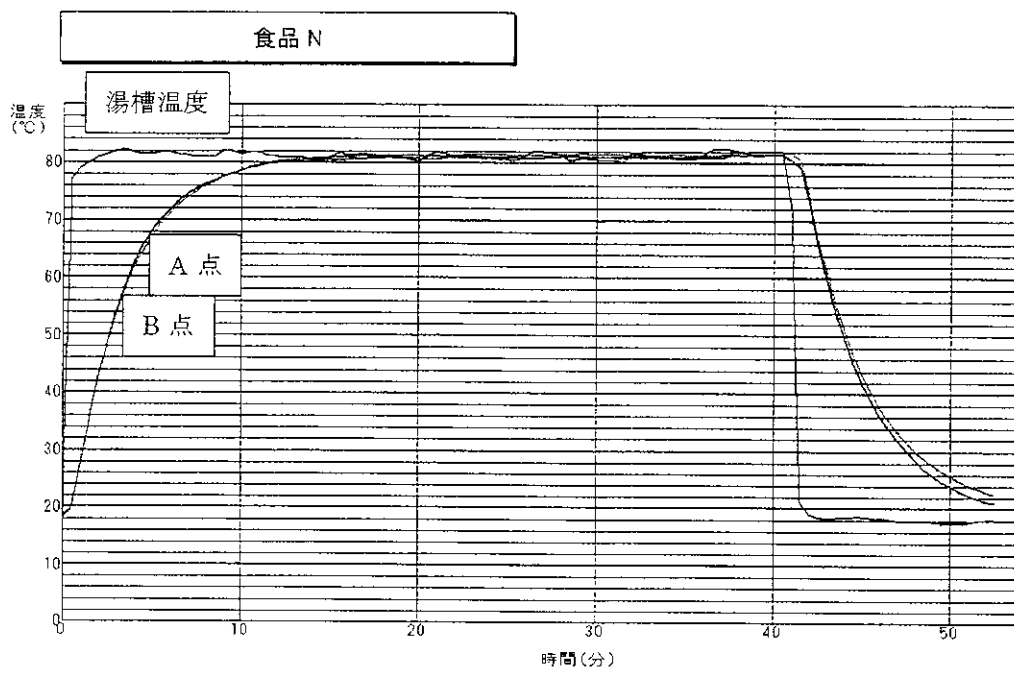


図3 供試試料（食品 N）の温度履歴曲線

表7 食品L(魚照焼)のボツリヌス芽胞接種試験結果

検体名 :食品L(魚照焼)  
 担当 :広島市衛生研究所  
 試験開始日: 2002年 12月 9日

区分	処理内容	検体処理内訳		試験項目	培養日数	袋の膨張	理化学・細菌試験結果			毒素型	
		袋数	No.				pH	Aw	SPC (cfu/g)		Cit(cfu/g)
A	無処理	3	21	理化学試験	0日	NT	6.0	0.97	NT	NT	NT
			22				6.0	0.97			
			23				6.0	0.97			
B	無処理	3	15	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			16						10未満	10未満	陰性
			17						10未満	10未満	陰性
			18						10未満	10未満	陰性
C	開封芽胞非接種	3	19	保存試験 (未開封)	90日	NT	NT	10未満	10未満	陰性	
			20					10未満	10未満	陰性	
D	開封芽胞非接種	3	9	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	NT	10未満	10未満	NT	
			10					10未満	10未満	NT	
			11					10未満	10未満	NT	
			12					10未満	10未満	NT	
E	開封芽胞接種	3	13	保存試験 (開封)	90日	無	NT	10未満	10未満	NT	
			14					10未満	10未満	NT	
F	開封芽胞接種	5	6	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	NT	10未満	10未満	3.0×10 <sup>4</sup>	
			7					10未満	10未満	3.6×10 <sup>4</sup>	
			8					10未満	10未満	3.5×10 <sup>4</sup>	
			1					有	6.2	2.3×10 <sup>8</sup>	AB
			2					有	6.2	2.5×10 <sup>8</sup>	AB
F	開封芽胞接種	5	3	細菌試験	10日	有	NT	10未満	10未満	1.3×10 <sup>8</sup>	
			4					10未満	10未満	1.4×10 <sup>7</sup>	
			5					10未満	10未満	1.2×10 <sup>7</sup>	

SPC(一般生菌数), Cit(クロストリジア菌数), NT(実施せず)

表8 食品M(汁の具)のボツリヌス芽胞接種試験結果

検体名 : 食品M(汁の具)  
 担当 : 広島市衛生研究所  
 試験開始日: 2002年 12月 9日

区分	検体処理内訳		培養日数	袋の膨張	理化学・細菌試験結果			毒素型			
	処理内容	袋数No.			試験項目	pH	Aw		SPC(cfu/g)	Clt(cfu/g)	
	無処理	21	理化学試験	NT	6.1	0.98以上	NT	NT			
		22			6.1	0.98以上					
		23			6.2	0.98以上					
A	無処理	15	細菌試験 (陰性確認)	NT	NT	NT	10未満	陰性			
		16					10未満		陰性		
		17					10未満			陰性	
		18					10未満				陰性
		19					10未満				
20	10未満	陰性									
B	無処理		9	保存試験 (未開封)	NT	NT	10未満	陰性			
			10				10未満		陰性		
			11				10未満			陰性	
			12				10未満				陰性
		13	10未満				陰性				
14	10未満	陰性									
C	開封芽胞非接種		9	細菌試験 (開封操作確認)	NT	NT		10未満	NT		
			10					10未満		NT	
			11					10未満			NT
			12				10未満	NT			
		13	10未満				NT				
14	10未満	NT									
D	開封芽胞非接種		6	保存試験 (開封)	無	NT			10未満	1.3×10 <sup>4</sup>	
			7						10未満		無
			8					10未満	無		
			1				10未満	1.4×10 <sup>4</sup>			
		2	10未満				1.3×10 <sup>4</sup>				
3	10未満	7.0×10 <sup>8</sup>									
E	開封芽胞接種		1	細菌試験 (接種菌数確認)	有	NT				10未満	A
			2						10未満	A	
			3					10未満	陰性		
			4				10未満	A			
		5	10未満				陰性				
6	10未満	陰性									
F	開封芽胞接種		63日	細菌試験	有	NT				10未満	1.5×10 <sup>3</sup>
			61日						10未満	陰性	
			90日					10未満	A		
			24日				10未満	陰性			
		90日	10未満				陰性				
90日	10未満	陰性									

SPC(一般生菌数), Clt(クロストリジア菌数), NT(実施せず)

表9 食品N(炒めの素)のボツリヌス芽胞接種試験結果

検体名 : 食品N(炒めの素)  
 担当 : 広島市衛生研究所  
 試験開始日 : 2002年 12月 9日

区分	処理内容	検体処理内訳		試験項目	培養日数	袋の膨張	理化学・細菌試験結果			毒素型	
		袋数	No.				pH	Aw	SPC(cfu/g)		Cit(cfu/g)
	無処理	3	21	理化学試験	0日	NT	5.5	0.96	NT	NT	NT
			22				5.5	0.96			
			23				5.4	0.96			
A	無処理	3	15	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			16				NT	NT	10未満	10未満	陰性
			17				NT	NT	10未満	10未満	陰性
B	無処理	3	18	保存試験 (未開封)	90日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			19				NT	NT	10未満	10未満	陰性
			20				NT	NT	10未満	10未満	陰性
C	開封芽胞非接種	3	9	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	NT
			10				NT	NT	10未満	10未満	NT
			11				無	無	10未満	10未満	NT
D	開封芽胞非接種	3	12	保存試験 (開封)	90日	無	NT	NT	10未満	10未満	NT
			13				無	無	10未満	10未満	NT
			14				無	無	10未満	10未満	NT
E	開封芽胞接種	3	6	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	1.1×10 <sup>4</sup>	NT
			7				NT	NT	10未満	1.3×10 <sup>4</sup>	
			8				NT	NT	10未満	1.3×10 <sup>4</sup>	
F	開封芽胞接種	5	1	細菌試験	20日	有	5.7	NT	10未満	2.3×10 <sup>4</sup>	A
			2				5.8	NT	10未満	4.3×10 <sup>4</sup>	A
			3				5.7	NT	10未満	2.4×10 <sup>4</sup>	A
			4				5.8	NT	10未満	2.4×10 <sup>5</sup>	A
			5				5.7	NT	10未満	2.5×10 <sup>4</sup>	AB

SPC(一般生菌数), Cit(クロストリジウム菌数), NT(実施せず)



表 10 供試食品 L, M および N 中におけるボツリヌス菌の発育状況

食品 記号	供 試 検体数	膨脹した 検体数	膨脹まで の日数	pH (加熱処理直後)	ボツリヌス菌数 (CFU/g)	毒素 産生	毒素型
L	5	5	10~11	6.1~6.3 (6.0)	$1.2 \times 10^7 \sim 2.5 \times 10^8$	+(5/5)	A+B
M	5	3	24~63	5.8~6.4 (6.1~6.2)	$5.8 \times 10^7 \sim 7.0 \times 10^8$	+(3/3)	A
N	5	5	11~20	5.7~5.8 (5.4~5.5)	$2.3 \times 10^4 \sim 2.4 \times 10^8$	+(5/5)	A, A+B

研究成果（☆印）および関連する研究の刊行に関する一覧表

雑誌

	発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
	Furuse T, Hasebe S, Ohtsuki H, Oguma K	Passive length-tensile properties of extraocular muscles under botulinum toxin type C.	Jpn. J. Ophthalmol.			In press
☆	L. A. Woodward, Arimitsu H, Hirst R, Oguma K	Expression of Hc subunit from <i>Clostridium botulinum</i> types C and D their evaluation as candidate vaccine antigens.	Infect. Immun.	71	2941-2944	2003
☆	Arimitsu H, Inoue K, Sakaguchi Y, Lee J, Fujinaga Y, Watanabe T, Ohyama T, Hirst R, and Oguma K	Purification of fully activated <i>Clostridium botulinum</i> serotype B toxin for treatment of patients with Dystonia.	Infect Immun	71	1599-1603.	2003
	Sagane Y, Hasegawa K, Mutoh S, Kouguchi H, Suzuki T, Sunagawa H, Nakagawa T, Kamaguchi A, Okasaki S, Nakayama K, Watanabe T, Oguma K and Ohyama T.	Molecular characterization of GroES and GroEL homologues from <i>Clostridium botulinum</i> .	J. Prot. Chem.	22	99-108	2003
	Nazira M, Inoue K, Fujinaga Y, Hughes L, Arimitsu H, Sakaguchi Y, Ohtsuka A, Murakami T, Yokota K, Oguma k.	Characterization of monoclonal antibodies against haemagglutinin associated with <i>Clostridium botulinum</i> type C neurotoxin.	J. Med. Microbiol	51	286-294.	2002
	Sagane Y, Watanabe T, Kouguchi H, Sunagawa H, Obata S, Oguma K and Ohyama T.	Spontaneous nicking in the nontoxic-nonhemagglutinin component of the <i>Clostridium botulinum</i> toxin complex.	Biochem. Biophysic Res. Communi.	292	434-440.	2002
	Nazira M, Inoue K, Fujinaga Y, Arimitsu H, Sakaguchi Y, Hughes L, Hirst R, Murphy T, Tsuji T, Watanabe T, Ohyama T, Karasawa T, Nakamura S, Yokota K and Oguma K.	Mucosal immunisation with <i>Clostridium botulinum</i> type C 16S toxoid and its non-toxic component.	J. Med. Microbiol.	51	813-820.	2002

小態惠二	細菌の蛋白およびDNAの分泌・注入様式について；タイプI～IVシステム	トピック総説	4	36-40	2002
小態惠二	ボツリヌス菌.	化学療法 の領域	18	323-327	2002
小態惠二	ボツリヌス毒素	化学療法 の領域	18	347-352	2002
小態惠二	「特集2」ボツリヌス療法の現状と将来の展望 ボツリヌス毒素の基礎知識.	脳 21	5	53-60	2002
Tsukamoto K, Mukamoto M, Kohda T, Ihara H, Wang X, Maegawa T, Nakamura S, Karasawa T and Kozaki S	Characterization of <i>Clostridium butyricum</i> neurotoxin associated with food-borne botulism,	Microb. Path.	33	177-184	2002
春日文字	微生物学的リスクアセスメントーその現状とマネージメントにおける役割	獣医公衆 衛生研究	5	4-7	2002
春日文字	海外におけるリスクアセスメントの実例紹介ーカキにおける腸炎ビブリオのリスクアセスメント：FDA	獣医疫学 会誌	6	65-66	2002
武士甲一、熊田 洋行、小村哲生、 木村稔	ホタテ加工場における 危害分析及び衛生管理 に関する調査研究	北海道立 衛生研究 所報	52	37-44	2002
笹川伸之、梅津 淳一、武士甲一、 長野秀樹、久保 亮一、牧野壯 二、五十君静信、 清水篠簃、小態 惠二、田村正秀	食品細菌の自動検査装 置「バクテクター」開 発、45、1-10、2002.	食品工業、	45	1-10	2002
小林一寛、勢戸 和子、八柳潤、 斎藤志保子、寺 尾通徳、金子通 治、芹川俊彦、 倉本早苗、藤沢 倫彦、鈴木理恵 子、山崎貢、林 賢一、松根涉、 安岡富久、堀川 和美、村上光一、 河野喜美子、山 田亨、伊藤健一 郎	下痢原性大腸菌におけ る付着因子保有状況と それに基づく大腸菌検 査法の一考察	感染症学 雑誌	76	911-920	2002
堀川和美、八柳 潤、内村真佐子、 斎藤眞、小林一 寛、田中博、森 良一	牛挽肉、ポテトサラダ および野菜のドレッシ ング和えからの腸管出 血性大腸菌 O157 の検 出における培養法、免 疫磁気ビーズ、イムノ クロマト系簡易キット の有用性の検討	日本食品 微生物学 会雑誌	19	187-194	2002
Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H and Kozaki S	An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk.	Epidemiol Infect.	130	33-40	2003

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>小熊惠二</u> <u>武士甲一</u>	ボツリヌス菌	松本慶蔵	病原菌の今日的意味	医学ジャーナル社	大阪	2003	289-305
<u>小熊惠二</u>	乳児ボツリヌス症	別所文雄 山下直哉、 小島好文、 水口雅	小児科臨床	日本小児医事出版社	東京	2002	1291-1300
<u>小熊惠二</u>	概説Ⅲ 細菌毒素の応用	櫻井純、 本田武司、 小熊惠二	細菌毒素ハンドブック	サイエンスフォーラム	東京	2002	17-22
<u>小崎俊司</u> 、 <u>幸田知子</u> 、 <u>小熊惠二</u>	ボツリヌス毒素	櫻井純、 本田武司、 小熊惠二	細菌毒素ハンドブック	サイエンスフォーラム	東京	2002	86-94
<u>首藤文榮</u> 、 <u>小熊惠二</u>	C <sub>3</sub> 酵素.	櫻井純、 本田武司、 小熊惠二	細菌毒素ハンドブック	サイエンスフォーラム	東京	2002	105-112
<u>武士甲一</u>	乳児ボツリヌス症	松浦三男	総合臨床 (感染症診療・投薬ガイド)	永井書店	大阪	2003	476-481