

図3 采養型菌(10<sup>2</sup>/g)接種「炒めの素」中のボツリヌス菌数の経時的挙動  
(本年度購入品, pH 5.5, Aw 0.96)

〇〇県衛生研究所長 様

広島市衛生研究所長  
荻野 武雄

## 容器包装詰低酸性食品に係る調査について（お願い）

新春の候、貴職におかれましては益々ご盛栄のこととお慶び申し上げます。

さて、当所におきましては、平成14年度厚生労働科学研究費補助金による食品化学物質安全総合研究事業「容器包装低酸性食品のボツリヌス中毒に対するリスク評価」（主任研究者 岡山大学大学院医歯学総合研究科教授 小熊恵二）班員として参加しております。

本事業では、容器包装詰低酸性食品の実態調査を実施した後、食品へのボツリヌス菌添加試験等を行ない、容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒発生に関するリスク評価を行う計画となっております。このため、中四国地方の容器包装詰食品の実態調査を当所が担うこととなりました。

つきましては、ご多忙中の折大変恐縮ですが、本研究事業の主旨にご理解を賜り、貴県管内の食品製造業における容器包装詰低酸性食品の調査をお願い申し上げます。

## 記

## 1 調査対象食品及び施設

**対象食品** 常温で3ヶ月以上保存可能な容器包装詰低酸性食品（新含気調理食品を含む）であつて、pH4.6以上、Aw0.94以上のもの。

ただし、缶詰、およびレトルト食品、食肉製品、魚肉ねり製品等規格基準が設定されている食品を除く。

〔調査対象食品の例 米飯、もち、そうざい、煮豆、佃煮、めんつゆ、ういろう 等  
(別添の低酸性食品調査結果一覧を参考にしてください。)〕

**対象施設** 食品製造施設

## 2 調査項目及び回答方法

別紙のとおり

## 3 回答期限

平成15年3月14日（金）までをお願いします。

（お問い合わせ先）  
広島市衛生研究所 石村  
TEL 082 277 6575  
FAX 082 277-0410

(別 紙)

1 調査目的

中国 四国地方における容器包装詰低酸性食品（常温3ヶ月以上保存、pH4.6以上、Aw9.4以上）の製造実態を把握し、今後の研究推進に活用することを目的とする。

2 調査項目

対象食品がある場合、下記の項目の調査をお願いします。

- (1) 品名（食品名称）、内容量、用途など
- (2) 形態（密封容器包装詰食品であるかなど）
- (3) 保存方法（常温保存の可否）
- (4) 保存期間（長期（3ヶ月以上）保存が可能か）
- (5) 殺菌方法（加熱殺菌の有無（温度・時間））
- (6) 無菌充填の有無
- (7) 特性（pH・水分活性（Aw））
- (8) 製造者（氏名・所在地及び連絡先など）
- (9) その他（食品の原材料名、組成、特記事項など）

3 回答方法

上記調査には、同封の調査用紙でお願いいたします。

（水分活性（Aw）等不明の場合、その欄は空欄で結構です。）

記載用紙を、同封の封筒にてご返送下さい。

4 回答送付先及び担当者

広島市衛生研究所 生物科学部

〒733-0833

広島市西区商工センター4-1-2

担当者 主 任 萱島隆之

主任技師 石村勝之

TEL 082-277-6998 (FAX082-277-0410)

E-mail ei\_seibutsu@cityhiroshima.jp

容器包装詰低酸性食品の実態調査

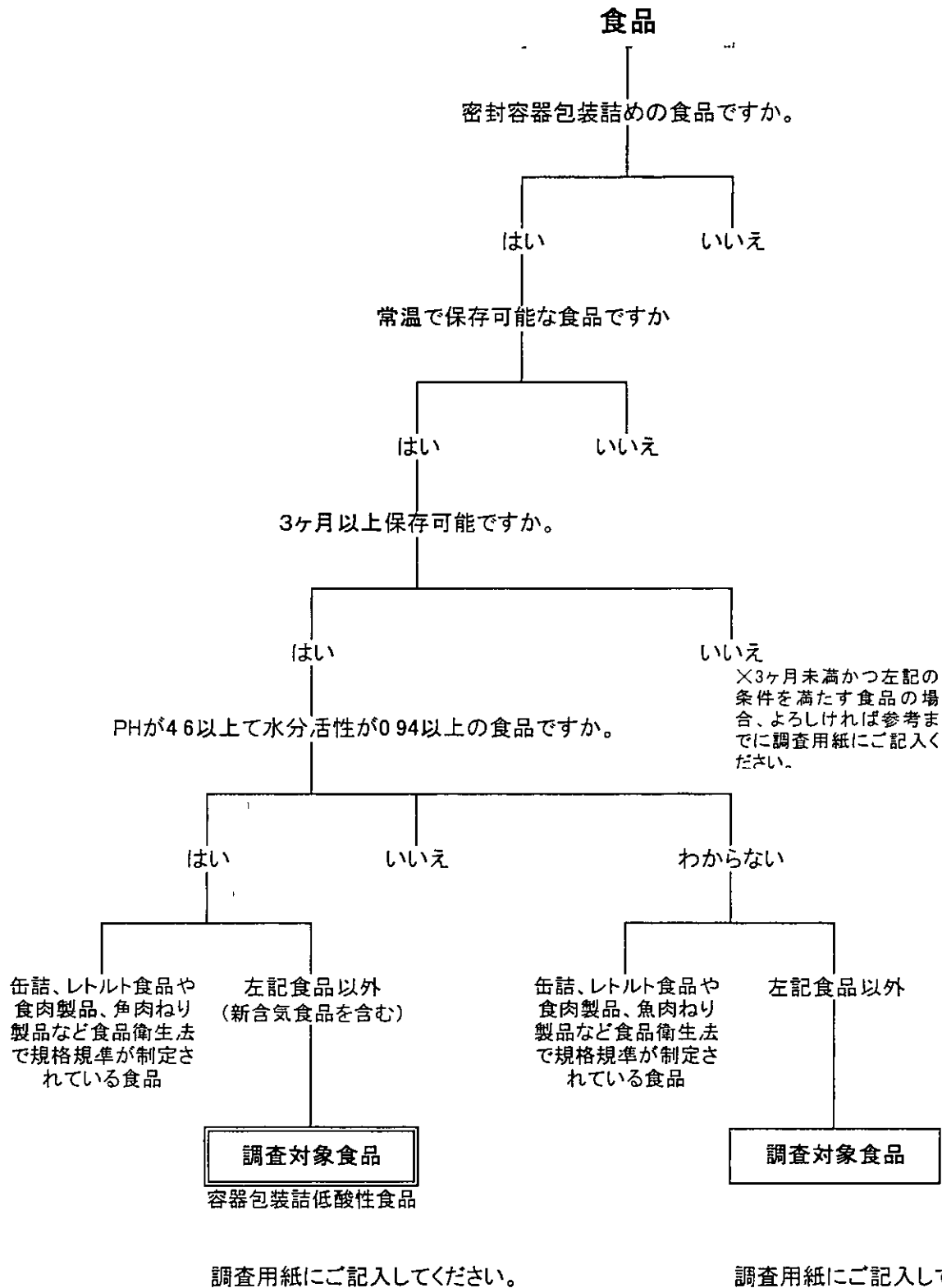
NO

品名	食品名称 <sup>(1)</sup>					
	内容量		用途	□市販 □業務用 □その他( )		
	形態 <sup>(2)</sup>	外観	□袋 [ □アルミ □合成樹脂 □その他( ) ] □ひん □その他( )			
□密封容器包装詰食品 □容器包装入り食品 □新含気調理食品 □その他( )						
保存	保存方法 <sup>(3)</sup>	□要冷蔵 □冷所 □常温 □その他( )				
	保存期間 <sup>(4)</sup>	( )日間 ( )か月				
	□脱酸素剤使用 □ガス充填( ) □食品添加物使用(下記欄に記入)					
殺菌	加熱殺菌 <sup>(5)</sup>	□あり	□包装後加熱 <sup>(6)</sup> □加熱後包装 <sup>(7)</sup>			
			温度	℃	時間	
	□なし					
	無菌充填 <sup>(8)</sup>	□あり □なし				
特性 <sup>(7)</sup>	pH		水分活性(AW)			
製造者 <sup>(8)</sup>	製造者氏名					
	所在地					
	連絡先 電話 担当者					
その他 <sup>(9)</sup>	原材料名					
	食品添加物	(保存料、品質保持剤等)				
	特記事項					

不明の場合は空欄で回答下さい。

調査機関名

# 調査の対象食品



# 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 成分規格及び保存基準が定められていない容器包装詰食品の細菌汚染実態

## － 総菜，珍味など －

分担研究者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所

研究協力者 濱崎 光宏，村上 光一，長野 英俊，石黒 靖尚（福岡県保健環境研究所）  
臂 博美（福岡県田川保健福祉環境事務所）

**研究要旨** 容器包装詰食品のうち加圧加熱殺菌食品及び食肉製品等は，食品衛生法により規格基準が定められている。しかし，その他の容器包装詰食品についてはその実態は不明確であるため，福岡県内で販売されている容器包装詰食品の流通実態を調査した。これらについて水分活性及び pH を測定しボツリヌス食中毒のリスク評価を行った。さらに福岡県内で生産・販売されている容器包装詰食品を調査し，これらの食品群より 5 品目について各々 3 ロット購入し，1 ロット 5 検体について水分活性及び pH 測定並びに細菌検査を行った。5 品目中 4 品目は pH が 4.6 を超え且つ水分活性が 0.94 以上の食品であった。4 品目中 1 品目はすべての検体から一般細菌並びに好気性芽胞菌が検出され，8 検体からクロストリジアが検出された。他 1 品目は 1 ロット 5 検体中 1-2 検体から一般細菌が検出された。5 品目中 1 品目は 15 検体ともに水分活性値が 0.85 以下であったが，いずれの検体からも一般細菌並びに好気性芽胞菌が検出された。標準寒天培地に発育した細菌の 16S rDNA 塩基配列に基づく相同性検索の結果，発育した菌は好気性内生孢子形成細菌 4 種 (*Bacillus*, *Paenibacillus*, *Virgibacillus*, *Brevibacillus*) 及び *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Methylobacterium*, *Microbacterium* の計 9 属であった。

### A 研究目的

容器包装詰食品のうち容器包装詰加圧加熱殺菌食品，食肉製品（加熱殺菌後容器包装及び容器包装後加熱食品）及び清涼飲料水等は，食品衛生法により規格基準が定められている。食品衛生法でいう容器包装詰加圧加熱殺菌食品は，清涼飲料水，食肉製品，鯨肉製品及び魚肉練り製品を除く缶，ビン，レトルトパウチ，プラスチック容器などに密封して加圧加熱した食品をひとまとめにして扱っている。食品衛生法で定められている「容器包

装詰加圧加熱食品」の殺菌方法は，①食品中に存在し，かつ発育する可能性のある微生物を死滅させること ②pH が 4.6 を超え，かつ水分活性 ( $A_w$ ) が 0.94 を超える食品については，ボツリヌス菌を死滅させるために，「食品中心部まで 120℃，4 分加熱または同等以上の殺菌をすること」と規定されている。しかし，近年多用な食品が製造・販売され，どの製品が「容器包装詰加圧加熱食品」に該当するかは，表示を注視しなければ，単なる容器包装詰食品と区別出来ない。

平成 15 年度は、福岡県内で容器包装詰食品の市場調査を行い、これを基に福岡県内で製造されている 5 種の容器包装詰食品について細菌汚染の実態を調査した

## B 研究方法

### I 容器包装詰食品の実態調査

福岡県内 3 保健福祉環境事務所に設置している食品衛生広域専門監視班により、大規模小売店を中心に 48 品目の食品の買上を行い、pH 及び Aw を測定した Aw はロトロニク社製 HYGRO-LAB, pH は東亜デーケー株式会社製 HM-30G で電極は同社製 GST-5721C 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、液汁のない食品は等量若しくは 2 倍量の萃留水を加え、ブレンダーで均一化した後、測定した 測定にあたっては、一品目の食品について 2 検体を測定し平均値を求め、これを元に評価した なお、食品群の分類については、福岡県における取去検査の際用いる食品分類を使用した

### II 成分規格の無い容器包装詰食品調査

#### 1 食品の選定方法

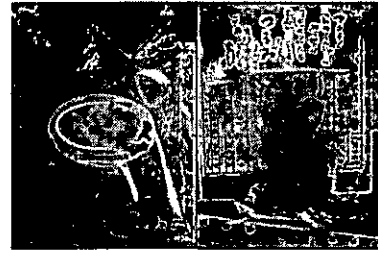
I で調査した容器包装詰食品について、加圧加熱殺菌が行われていないかあるいは不明な食品及び表示のなされていない食品について調査し、5 品目各々 3 ロット各 5 個 (図 1, 表 1) について細菌汚染調査を行った 調査対象食品はいずれも福岡県内で製造されている食品である これらの食品はいずれも法的規制が明確でない食品であり、



No 1

No 2

No 3



No 4

No 5

図 1 供試食品

現在すでに類似食品は多くあり、調査すべき食品かつ包装形態と考えられた

表 1 細菌汚染調査対象食品

N o	商品名	種別
1	平天	魚肉ねり製品
2	味付け王子	総菜
3	塩味なんこつ	総菜若しくは食肉製品
4	おでん	総菜
5	こんにゃくの薫製	珍味?

#### 2 試料の Aw 及び pH 測定

Aw はデカゴン社製アククラブ, pH は東亜デーケー株式会社製の HM-30G で電極は同社製 GST-5721C を用いた Aw は液体がある場合は液体を固形のみの場合は固形そのものを使用し, pH は試料 2 倍希釈液を測定に供した 両測定は 1 検体につき 2 度実施し、平均値を測定値とした

#### 3 菌数測定

##### 3-1 試料原液の調整

各試験品は 100g または全量が無菌的にストマノカー袋 (栄研器材製, ストマフィルター S) に無菌的に採取し、等重量の滅菌蒸留水を加えストマノカーで 2 分間混和した この 2 倍希釈液を試料原液とした 試料原液は非加熱と加熱処理の 2 種について検査を行った 加熱処理は、各試料原液を小試験管に 5ml 分注し、水浴にて 65°C, 20 分間加熱した 非加熱試料は一般細菌数, クロストリジウム属菌数, ボツリヌス菌検査, 及び pH 測定に使用した 加熱試料は好気性有芽胞菌数及びボツリヌス菌検査に使用した

### 3-2 一般細菌数測定, 好気性芽胞菌数測定

2 倍希釈液を必要に応じて 10 倍階段希釈を行い, 各段階希釈液 1ml に 120°C, 20 分滅菌後 50°C に保温した標準寒天約 20ml を加え混和・固化後, 35°C, 48±3 時間培養した

### 3-3 クロストリノア属菌数

クロストリノア属菌数測定には 17.5×7 cm のパウチ袋を使用した 10 倍段階希釈した試料液 1 ml をパウチ袋に入れ, 121°C 15 分間滅菌後 50°C に保温したクロストリノア寒天培地 10 ml を加え, 混和 固化後 35±1°C で 2-5 日間培養した

### 3-4 ボツリヌス菌検査

非加熱及び加熱処理試料 1ml を 2 本のクノクドミートブイオンに接種し, 30°C, 7 日間培養した 本実験に使用したクノクドミートブイオンにはブドウ糖を 0.3% 及び可溶性澱粉を 0.2% 添加した 培養後 7 日目後のクノクドミートブイオンは, 非加熱及び加熱処理材料を 2ml づつ 15ml 滅菌プラスチック遠心管に 1 検体分毎に集め, これを 3,000 rpm, 20 分間遠心した 遠心上清を 0.45µm のミリポアフィルターで濾過した 毒素試験は, いずれも ddY 系, 雌, 4 週齢マウスを用い, 各試験検体につき 2 匹を使用した 各毒素試験用試料原液を 0.5ml づつマウス腹腔内接種した マウスの観察は, 接種後 4 日間実施した

### 3-5 標準寒天培地上に発育したコロニーの同定

#### 3-5-1 DNA の調整

標準寒天培地上に発育したコロニーを釣菌し, 普通寒天培地に 35°C, 2 日間純粋培養した 培養菌を 1/10TE バンファア (1mM Tris-HCl(pH8.0), 0.1mMEDTA(pH8.0)) 1ml に懸濁し, 10000 rpm, 10 分間遠心した後, 上清を除去した ペレントに 0.1ml の 1/10TE バンファアを加え, 再懸濁した 100°C, 15 分間加熱後, 10000rpm で 10 分間遠心し, 上清を DNA 溶液とした

#### 3-5-2 PCR 及び塩基配列の決定

得られた DNA 溶液について 16SrRNA をコードする領域に設定されたユニバーサルプライマー

セント [フォワード] 大腸菌の 341-357 F (5'-GCCCTACGGGAGGCAGCAG-3'), [リバース] 全生物 907-926907R (5'-CCGTC AATTCCTTT(A/G)AGTTT-3') を用いて PCR を行った PCR 反応液は, DNA 溶液 3µl, 各プライマー 0.1µM, 10×PCR バンファア 5µl, Taq DNA ポリメラーゼ 2.5U (TaKaRa BIO Inc), dNPTs 0.2mM 及び滅菌蒸留水を加え全量 50µl とした サーマルサーキュラー (宝酒造株式会社, TaKaRa PCR Thermal Cycler SP TP400) を用い, 95°C, 30 秒間熱変成, 51°C, 30 秒間アニーリング, 72°C, 30 秒間伸長の各反応を 40 回繰り返した PCR 産物 10µl を 2% アガロースゲルで電気泳動し, 約 560bp の増幅産物の有無を確認した 得られた PCR 産物を Montage PCR centrifugal filter devices (ミリポア社) で生成し, シークエンス反応の鑄型とした 塩基配列の決定は, DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (アマナム社) を用いて行った PCR と同一のプライマーを用いてサイクルシークエンス反応を行い, 反応産物をエタノール沈殿後, Centri-sep スピノカラム (Princeton separation, INC) で精製後, DNA オートシークエンサー (アプライドバイオシステムズ, ABI Prism 377DNA Sequencer) で両方向の塩基配列を解読し, 16SrRNA の塩基配列決定した

## C 研究結果

### I 容器包装詰食品の実態調査

福岡県内のスーパーにおいて常温で市販されている容器包装詰食品 45 品目について, 包装形態, 表示などの外観検査並びに pH 及び Aw について調査し, 容器包装詰食品の実態について調査した 調査した 45 品目中 18 品目が pH4.6 を超え, 且つ Aw0.94 以上であった (表 2) 18 品目中 11 品目は, 気密性容器に密封後加圧加熱殺菌されたものであった 残り 7 品目中 3 品目は新含気調理食品, 他 4 品目は表示記載がなされていなかった 18



品目の分類内訳は、おでん類 6 品目、ごはん類 4 品目、豆類 3 品目、野菜の水煮 2 品目、うずらの水煮、焼き栗及び調理食品各 1 品目であった  
pH4.6 を超え、且つ Aw0.94 以下に該当しない 27  
品目の食品中 9 品目が気密性容器に密封後加圧加

熱殺菌されていた 他 18 品目の表示内訳は、真空高熱殺菌、加熱食品、新含気調理食品が各 1、表示記載がなされていないものが 15 であった  
また、27 品目中 2 品目のみが pH4.6 以下、Aw0.94 以下であった（表 3）

表2 pH4.6を超え且つ水分活性が0.96を超える容器包装詰食品

No	商品名	pH	水分活性値	表示
26	玉九 うずら卵水煮	6.7	0.96	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
18	王子入りおでん	6.6	0.95	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
8	玉子入りおでん (2個束)	6.5	0.95	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
6	サラダクラブ コーンホール	6.5	0.94	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
43	鶏ごぼうごはん (米飯類)	6.4	0.95	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
15	味付博多おでん	6.4	0.97	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
42	おでん	6.4	0.97	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
5	サラダクラブ ヤングコーン	5.0	0.95	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
3	完熟トマトとアスパラガスのリゾント	4.6	0.96	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
38	熟甘焼き栗	6.1	0.94	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
11	日光ピリ辛串ごん	6.8	0.94	レトルト加熱殺菌
30	塩えんとう豆	6.4	0.95	新含気調理食品
14	出雲風おでん2人前	6.5	0.97	新含気調理食品
29	ゆでピーナツ	6.6	0.95	新含気調理食品
36	麦ごはん (包装米飯)	4.6	0.96	記載なし
39	ゆであずき (小豆水煮)	6.6	0.95	記載なし
4	加圧釜炊きごはん	7.2	0.95	記載なし
35	あったかごはん (包装米飯)	7.3	0.96	記載なし

表3 市販容器包装詰食品の pH 及び Aw

No	商品名	pH	Aw	表示
19	味付ばい貝	6.9	0.91	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
27	甘すぎないあっさり甘納豆 花かのこ	6.8	0.90	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
13	直火焼 笑い栗	5.9	0.93	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
2	伊藤ハム やわらか煮こみ亭 豚角煮	5.9	0.92	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
1	MCお徳用天串割れむき栗	5.9	0.93	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
45	逆大学いも (いも菓子)	5.4	0.89	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
17	逆大学芋	5.3	0.89	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
23	味付シイタケ	5.1	0.92	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
33	梅がゆ	3.4	0.95	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
16	味付とんそく	7.0	0.93	真空加熱殺菌
28	そのまま食べる ゆであずき	6.9	0.91	新含気調理食品
20	さけフレーク	5.8	0.89	加熱殺菌
10	金時豆	6.4	0.92	記載なし
41	さばみそ煮 (そうざい)	6.2	0.94	記載なし
9	海の幸 にしん昆布巻	5.8	0.91	記載なし
24	栗甘露煮	5.8	0.90	記載なし
40	煮込みハンバーグ (そうざい)	5.7	0.93	記載なし
21	焼帆立貝	5.6	0.81	記載なし
25	たかな油いため	4.8	0.91	記載なし
32	ぜんまい水煮	4.3	0.95	記載なし
7	菜の花釜めしの素	4.1	0.96	記載なし
12	杏仁フルーン	4.1	0.95	記載なし
34	ごはん	4.1	0.95	記載なし
37	生たい うどん	4.0	0.96	記載なし
22	ところてん	4.0	0.95	記載なし
31	カリファルニアレズン	3.9	0.50	記載なし
44	味付メンマ	4.4	0.93	記載なし

## II 成分規格の無い容器包装詰食品調査

### 1 試料の Aw 及び pH

Aw が 0.94 未満であった試験品は、5 品目のうちこんにゃくの燻製 1 品目のみであった。各試験品 1 ロット 5 サンプルの Aw の平均値を表 4 に示した。各試験品のロット間の差はこんにゃくの燻製以外 0.01 以下であった。しかし、こんにゃくの燻製はロット 1 が 0.73、ロット 2 が 0.77 及びロット 3 が 0.88 であった。各試験品 1 ロット 5 サンプルの pH の平均値を表 5 に示した。いずれの試験品も pH は 4.6 を超えていた。表 6 に試験品 15 検体の平均値と標準偏差値を示した。

表 4 試験品ロット毎の Aw の平均値

No	商品名	ロット	5サンプル
			平均値
1	平天	1	0.98
		2	0.98
		3	0.98
2	味付け王子	1	0.99
		2	0.99
		3	0.99
3	塩味なんこつ	1	0.98
		2	0.98
		3	0.97
4	おでん	1	0.99以上
		2	0.99以上
		3	0.99以上
5	こんにゃくの燻製	1	0.73
		2	0.77
		3	0.82

表 5 試験品ロット毎の pH の平均値

No	商品名	ロット	5サンプル
			平均値
1	平天	1	6.41
		2	6.43
		3	6.42
2	味付け王子	1	6.57
		2	6.61
		3	6.58
3	塩味なんこつ	1	6.70
		2	6.67
		3	6.75
4	おでん	1	6.26
		2	6.34
		3	6.30
5	こんにゃくの燻製	1	6.82
		2	6.90
		3	7.51

表 6 5 種試験品の Aw 及び pH の平均値と標準偏差値

No	商品名	AV±SD	
		Aw	pH
1	平天	0.979±0.0009	6.42±0.0235
2	味付け王子	0.989±0.0023	6.59±0.0295
3	塩味なんこつ	0.979±0.0042	6.71±0.0407
4	おでん	0.996±0.0012	6.30±0.0336
5	こんにゃくの燻製	0.772±0.0434	7.08±0.3226

### 2 試験品の細菌検査結果

#### 2-1 一般細菌数、クロストリジウム数他

5 品目の一般細菌数の結果を表 7 に示した。No 1 平天は、いずれのロットにおいても 100 CFU/g 以下の細菌汚染が認められた。No 2 味付け王子は、いずれのロットも 37℃では発育しなかった。No 3 塩味なんこつは 3 ロット細菌検査した結果、5 検体中 2-4 検体に細菌汚染が認められ、汚染の程度もレパートリーが広く、3 ロット中 2 ロットは、5 検体中 1 検体が 10<sup>3</sup> CFU/g オーダーの汚染が認められ、同一ロットであっても細菌汚染がかなり異なっていた。No 4 おでんは、3 ロットともに細菌汚染はほとんど認められなかった。No 5 こんにゃくの燻製は、3 ロット中 2 ロットがいずれも 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> CFU/g オーダーの細菌汚染が認められた。他 1 ロットは 20 CFU/g 以下で、ロットによる汚染の度合いが異なっていた。表 8 に試験品毎の 15 検体の平均値と標準偏差値を示した。

表 7 試験品の一般細菌数及びクロストリノア数等のロット別平均値

No	商品名	ロット	一般細菌数	パウチ法	
				クロストリノア数	白コロニー数
1	平天	1	14.8	0.6	0.8
		2	13.8	0.6	6.4
		3	24.2	0.6	2.0
2	味付け玉子	1	0.0	0.0	0.0
		2	0.0	0.0	0.0
		3	0.0	0.0	0.0
3	塩味なんこつ	1	340.4	0.0	0.0
		2	17.2	0.0	0.0
		3	82.1	0.0	0.0
4	おでん	1	0.0	0.0	0.0
		2	0.0	0.0	0.0
		3	0.0	0.0	0.0
5	こんにゃくの薫製	1	23200	0.0	5.4
		2	13980	0.0	2.6
		3	13.5	0.0	0.0

表 8 一般細菌数の平均値と標準偏差値

No	商品名	AV±SD
		一般細菌数
1	平天	17.6±15.7
2	味付け玉子	0.0±0.0
3	塩味なんこつ	393±111.4
4	おでん	0.2±0.414
5	こんにゃくの薫製	12397±1054.8

試験品をクロストリノウム培地でパウチ法により培養し、黒色コロニーをクロストリノウムとして測定した。また、本培地に発育する白色コロニーも同時に計測した(表 7)。黒色コロニーが発育した試験品は No1 平天のみであった。3 ロット 15 検体中 8 検体から検出された。白色コロニーは 10 検体から検出された。一方、No5 こんにゃくの薫製は、ロット 1 及び 2 のみ全検体から白色コロニーが検出された。黒色コロニーについては現在同定中である。

### 2-3 好気性芽胞菌数

試験品のロット別及び 15 検体の平均値とその標準偏差値を表 9 に示した。好気性芽胞菌数の牽動は、No1 平天及び No5 こんにゃく薫製の一般細菌数とほぼ同じであった。2 種試験品での加熱検体の細菌数は、非加熱検体の約 80-50%であった。No3 塩味なんこつは、一般細菌数が多い

検体の特異的に認められたが、好気性芽胞菌は殆ど認められなかった。

表 9 試験品の好気性芽胞菌数

No	商品名	ロット	ロット平均	全体平均±標準偏差
1	平天	1	2.7	6.03±4.84
		2	6.8	
		3	8.6	
2	味付け玉子	1	0	0.0±0.0
		2	0	
		3	0	
3	塩味なんこつ	1	0.4	0.2±0.414
		2	0	
		3	0.2	
4	おでん	1	0	0.0±0.0
		2	0.2	
		3	0	
5	こんにゃくの薫製	1	19400	9815±920
		2	10040	
		3	5.1	

### 2-3 毒性試験

試験品のクノドミート培養液からはいずれもマウスを斃死させる毒性物質は検出されなかった。

### 2-4 標準寒天培地発育細菌の同定

標準寒天培地を用いて好気培養後菌が発育した食品は、No1 平天、No3 塩味なんこつ、No4 おでん及び No5 こんにゃくの薫製であった(表 7-10, 図 1)。No1 平天を汚染していた菌の種類は、*Bacillus* 属など 9 属であった。*Staphylococcus* 属、*Microbacterium* 属、*Kocuria* 属及び *Pseudomonas* 属は、加熱処理したものからは検出されなかったが、他の 5 属は非加熱及び加熱材料のいずれからも検出された(表 11)。No3 塩味なんこつは 1 ロット 5 検体のうち各 1 検体の非加熱材料から *Bacillus subtilis* 及び *Bacillus firmus* の 2 菌種が検出された(表 12)。No4 については菌数が極めて少なかったため今回は菌の同定は行なわなかった。No5 こんにゃくの薫製は、ロット 1 及び 2 は *Bacillus simplex* と種の特定されない *Bacillus* 属が殆どであったが、ロット 3 は種の特定されない *Bacillus* 属に加え *Bacillus subtilis* 及び *Bacillus simplex* であった(表 13)。

表 10 標準寒天培地中で発育した細菌遺伝子の  
相同性検索件数

属	株数		
	全体	非加熱	加熱
<i>Bacillus</i>	83	48	35
<i>Paenibacillus</i>	7	3	4
<i>Virgibacillus</i>	6	2	4
<i>Pseudomonas</i>	2	2	0
<i>Brevibacillus</i>	2	2	0
<i>Staphylococcus</i>	2	1	0
<i>Kocuria</i>	1	1	0
<i>Methylobacterium</i>	1	0	1
<i>Microbacterium</i>	1	1	0
unidentify	1	1	0
合計	106	61	44

#### D 考察

食品衛生法で規定されている「容器包装詰加圧加熱食品」は、食品を気密性のある容器包装に入れ、密封した後、加圧加熱殺菌したもので、市場で常温 長期流通される食品をさしている。食品衛生法では有芽胞細菌特にボツリヌス菌による食中毒を防止するために、これらの食品群のうち、水分活性値が 0.94 以上、かつ、pH が 4.6 を越えるものについては、容器包装後 120℃、4 分以上の加熱を義務づけている。現在流通市場では「容器包装詰加圧加熱食品」と見た目には区別できない“容器包装詰低酸性食品”が販売されているが、その安全性は法的に担保されていない。乳業業界等では以前から殺菌時間と温度について検討がなされ、食味を損なわない殺菌温度が確立している。しかも、流通温度についても厳重な規定がなされている。一方、複合調理食品は微生物コントロール面だけでも容易ではない。しかし、食品業界での方向性は常温 長期保存性食品の生産に向いている。特に近年では“容器包装詰食品”の糖尿病、高血圧などの治療目的や離乳食、病院食などの易感染性の人に対する食材の提供が広範に行われつつある。これらの食品は、「そうざい」、「野菜類加工品」、「穀類加工品」等多種多岐にわたっている。

本研究ではこれらの食品が細菌学的に「常温・

長期流通」することの安全性、特にボツリヌス食中毒のリスクについて評価することにある。今回食品 5 品目について、細菌汚染の実態について調査した。これら 5 種食品中 4 種は食品衛生法で規定されている「容器包装詰加圧加熱食品」の化学的性状と同等の水分活性値が 0.94 以上でかつ pH が 4.6 を超える性状を有していた。この 4 種の食品のうち 1 種は、ロットを問わずいずれの検体の非加熱及び加熱材料から細菌が検出された。検出された菌は、9 属に分類され多岐にわたる汚染が認められ、しかも有芽胞菌以外の菌も検出され、製品加熱処理後の汚染が推定された。菌が検出された他の 1 種は各ロット 5 検体中 1 検体の非加熱材料から *Bacillus subtilis* 及び *Bacillus firmus* の 2 菌種が検出された。しかし、加熱処理材料からは殆ど菌が検出されておらず、今後検出された 2 菌種の熱に対する感受性について検討する必要があると考えられた。一方、水分活性が 0.94 以下のこんにゃくの燻製は、3 ロットいずれからも菌が検出された。また、ロットによって菌数が異なっていた。

今回検討した「容器包装詰食品」は、ボツリヌス菌の汚染は認められなかったが、細菌汚染の顕著な食品も含まれていた。また、これらの食品には殺菌条件は表示されておらず不明な点が多い。ボツリヌス菌食品衛生上安全性を確保するためには殺菌条件を何らかの形で行政的に確認する必要があると考えられる。一方では「容器包装詰加圧加熱食品」類似食品の範疇をどこまでとするかなどのルールづくりが急務であると考えられる。また、これらの内容が一般の消費者に確認しやすい表示方法についても検討すべきである。

#### E 結論

##### 1 5 種食品の化学的性状について

5 種食品中 4 品種が、水分活性値が 0.94 以上でかつ pH が 4.6 を超える性状を有していた。

##### 2 5 種食品の細菌汚染について

①5 種食品中 3 品種から細菌が検出された  
2 種はロートを問わず細菌が検出された  
他 1 種は 1 ロート 5 検体中各 1 検体から  
菌が検出された

②検出された菌は、9 属の菌種で有芽胞菌が  
5 種認められた

### 3 細菌汚染実態について

容器包装詰食品中ある種のもの、高頻度に  
細菌汚染が認められることが分かった

## F 研究発表

### 1 論文発表

堀川和美, 村上光一, 長野英俊, 濱崎光宏, 石黒  
靖尚, 荒川英二, 渡邊治雄, 近藤正治, 森田  
繁, 原 一美, 江崎泰之, Vibrio cholerae O8感  
染事例—福岡県, 病原微生物検出情報, 2004,  
1(287), 25

堀川和美, 殺菌効力試験用検査材料として提出さ  
れた消毒薬に混入していたセラチア菌, 2003,  
日本防菌防黴学会誌, 31, 39-40

### 2 学会等発表

堀川和美 他, 2 検体の食品残品から O157 が  
分離された食中毒事例について, 第 8 回腸管  
出血性大腸菌シンポジウム, 東京都, 2004

3 5



表 11 No 1 平天の標準寒天培地で発育した細菌の相同性検索結果

食品名	ロット	検査番号	処理	コロニー	菌種	スコア	%
平天	1	51	加熱	31	<i>Bacillus licheniformis</i>	1053	99
平天	2	61	非加熱	12	<i>Bacillus licheniformis</i>	1039	99 AY479984
平天	2	64	加熱	48	<i>Bacillus licheniformis</i>	1114	100
平天	2	65	加熱	49	<i>Bacillus licheniformis</i>	1090	99
平天	2	65	加熱	50	<i>Bacillus licheniformis</i>	948	99
平天	3	68	加熱	55	<i>Bacillus licheniformis</i>	898	99
平天	3	69	非加熱	28	<i>Bacillus licheniformis</i>	1061	99 AY479984
平天	3	69	加熱	57	<i>Bacillus licheniformis</i>	1112	99
平天	2	61	加熱	41	<i>Bacillus pumilus</i>	1090	99
平天	2	61	加熱	42	<i>Bacillus pumilus</i>	1070	99
平天	2	63	加熱	46	<i>Bacillus pumilus</i>	1063	99
平天	2	64	非加熱	18	<i>Bacillus pumilus</i>	1076	99 AY167884
平天	3	67	加熱	53	<i>Bacillus pumilus</i>	1088	99 AY112667
平天	1	52	加熱	33	<i>Bacillus sonorensis</i>	1092	99
平天	2	64	加熱	47	<i>Bacillus sonorensis</i>	944	98
平天	3	67	非加熱	24	<i>Bacillus sonorensis</i>	1001	99 AF302124
平天	1	53	非加熱	5	<i>Bacillus sp</i>	1017	97 X60621
平天	1	54	加熱	38	<i>Bacillus sp</i>	944	96
平天	2	65	非加熱	20	<i>Bacillus sp</i>	946	96
平天	3	70	加熱	59	<i>Bacillus sp</i>	987	98 AY376876
平天	2	61	非加熱	11	<i>Brevibacillus sp</i>	1106	99 AJ313027
平天	3	68	非加熱	25	<i>Brevibacillus sp</i>	1080	99 AJ438305
平天	3	69	非加熱	27	<i>Kocuria rhizophila</i>	1065	99 Y16264
平天	3	70	加熱	60	<i>Methylobacterium extorquens</i>	1063	100 AF531770
平天	3	66	非加熱	22	<i>Microbacterium sp</i>	1011	99 AF260714
平天	1	52	非加熱	3	<i>Paenibacillus favisporus</i>	977	97 AY208751
平天	2	63	加熱	45	<i>Paenibacillus chibensis</i>	1080	99
平天	2	65	非加熱	19	<i>Paenibacillus chibensis</i>	1074	99 AB073194
平天	3	66	加熱	52	<i>Paenibacillus chibensis</i>	1076	99
平天	3	69	加熱	58	<i>Paenibacillus chibensis</i>	1086	99
平天	1	51	加熱	32	<i>Paenibacillus sp</i>	1094	99 AB110989
平天	3	68	非加熱	26	<i>Paenibacillus sp</i>	1045	98 AY266990
平天	1	54	非加熱	9	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1100	99 AY092072
平天	1	54	非加熱	10	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1068	99
平天	2	62	非加熱	14	<i>Staphylococcus equorum</i>	1112	100 AF527483
平天	3	67	非加熱	23	<i>Staphylococcus warneri</i>	955	99 L37603
平天	1	53	非加熱	6	unidentify		
平天	1	51	非加熱	1	<i>Virgibacillus proomii</i>	1070	99
平天	1	52	加熱	34	<i>Virgibacillus proomii</i>	1007	99
平天	2	62	加熱	44	<i>Virgibacillus proomii</i>	1072	99 AJ012667
平天	2	63	非加熱	16	<i>Virgibacillus proomii</i>	1094	99
平天	3	67	加熱	54	<i>Virgibacillus proomii</i>	1084	99
平天	3	68	加熱	56	<i>Virgibacillus proomii</i>	1084	99 AJ012667



表 12 No3 塩味なんこつの標準寒天培地で発育した細菌の相同性検索結果

食品名	ロット	検査番号	処理	コロニー	菌種	スコア	%
塩味なんこつ	1	1	非加熱	1-1	<i>Bacillus firmus</i>	1088	99
塩味なんこつ	1	1	非加熱	1-2	<i>Bacillus firmus</i>	1029	98
塩味なんこつ	1	1	非加熱	1-3	<i>Bacillus firmus</i>	1065	99
塩味なんこつ	1	1	非加熱	1-4	<i>Bacillus firmus</i>	979	98
塩味なんこつ	1	1	非加熱	1-5	<i>Bacillus firmus</i>	1029	99
塩味なんこつ	1	1	非加熱	1-7	<i>Bacillus firmus</i>	1106	100
塩味なんこつ	1	1	非加熱	1-8	<i>Bacillus subtilis</i>	1072	99
塩味なんこつ	1	1	非加熱	1-9	<i>Bacillus subtilis</i>	1061	99
塩味なんこつ	1	1	非加熱	1-10	<i>Bacillus subtilis</i>	1059	100
塩味なんこつ	2	30	非加熱	30-3	<i>Bacillus firmus</i>	1033	99
塩味なんこつ	2	30	非加熱	30-5	<i>Bacillus subtilis</i>	1029	99
塩味なんこつ	3	35	非加熱	35-1	<i>Bacillus subtilis</i>	999	98
塩味なんこつ	3	35	非加熱	35-2	<i>Bacillus subtilis</i>	1059	99
塩味なんこつ	3	35	非加熱	35-3	<i>Bacillus subtilis</i>	1082	100 <u>Z99108</u>
塩味なんこつ	3	35	非加熱	35-5	<i>Bacillus subtilis</i>	1045	99
塩味なんこつ	3	35	非加熱	35-7	<i>Bacillus subtilis</i>	989	99
塩味なんこつ	3	35	非加熱	35-8	<i>Bacillus subtilis</i>	1023	99
塩味なんこつ	3	35	非加熱	35-10	<i>Bacillus subtilis</i>	1053	100

表 13 No 5 こんにやくの燻製の標準寒天培地で発育した細菌の相同性検索結果

食品名	ロット	検査番号	処理	コロニー	菌種	スコア	%
こんにやくの燻製	1	16	非加熱	61	<i>Bacillus sp</i>	1092	99
こんにやくの燻製	1	16	非加熱	62	<i>Bacillus sp</i>	1078	100
こんにやくの燻製	1	16	加熱	92	<i>Bacillus sp</i>	1094	99
こんにやくの燻製	1	17	非加熱	63	<i>Bacillus sp</i>	1082	99
こんにやくの燻製	1	17	非加熱	64	<i>Bacillus sp</i>	1100	99
こんにやくの燻製	1	17	加熱	93	<i>Bacillus sp</i>	1088	99
こんにやくの燻製	1	18	非加熱	65	<i>Bacillus sp</i>	1094	100
こんにやくの燻製	1	18	非加熱	66	<i>Bacillus sp</i>	977	97
こんにやくの燻製	1	18	加熱	95	<i>Bacillus sp</i>	1086	99
こんにやくの燻製	1	18	加熱	96	<i>Bacillus simplex</i>	1035	99
こんにやくの燻製	1	19	非加熱	67	<i>Bacillus sp</i>	1055	99
こんにやくの燻製	1	19	非加熱	68	<i>Bacillus sp</i>	979	99
こんにやくの燻製	1	19	加熱	97	<i>Bacillus sp</i>	1082	99
こんにやくの燻製	1	19	加熱	98	<i>Bacillus sp</i>	1059	99
こんにやくの燻製	1	20	非加熱	69	<i>Bacillus sp</i>	1015	99
こんにやくの燻製	1	20	加熱	99	<i>Bacillus sp</i>	1078	99
こんにやくの燻製	1	20	加熱	100	<i>Bacillus sp</i>	1086	99
こんにやくの燻製	2	56	非加熱	71	<i>Bacillus sp</i>	1080	99
こんにやくの燻製	2	56	加熱	101	<i>Bacillus sp</i>	1080	99
こんにやくの燻製	2	56	加熱	102	<i>Bacillus sp</i>	1076	99
こんにやくの燻製	2	57	非加熱	74	<i>Bacillus sp</i>	894	97
こんにやくの燻製	2	57	加熱	103	<i>Bacillus sp</i>	981	98
こんにやくの燻製	2	57	加熱	104	<i>Bacillus sp</i>	1104	100
こんにやくの燻製	2	58	非加熱	75	<i>Bacillus sp</i>	1041	99
こんにやくの燻製	2	58	加熱	105	<i>Bacillus sp</i>	1074	99
こんにやくの燻製	2	59	非加熱	78	<i>Bacillus sp</i>	1080	99
こんにやくの燻製	2	59	加熱	108	<i>Bacillus sp</i>	1094	99
こんにやくの燻製	2	60	非加熱	79	<i>Bacillus sp</i>	995	99
こんにやくの燻製	2	60	非加熱	80	<i>Bacillus sp</i>	1084	99
こんにやくの燻製	2	60	加熱	110	<i>Bacillus sp</i>	926	98
こんにやくの燻製	3	71	非加熱	82	<i>Bacillus sp</i>	1098	99
こんにやくの燻製	3	71	加熱	112	<i>Bacillus sp</i>	1106	100
こんにやくの燻製	3	72	非加熱	83	<i>Bacillus sp</i>	1084	99
こんにやくの燻製	3	72	非加熱	84	<i>Bacillus sp</i>	1049	99
こんにやくの燻製	3	72	加熱	114	<i>Bacillus sp</i>	1114	100
こんにやくの燻製	3	73	非加熱	85	<i>Bacillus sp</i>	1067	99
こんにやくの燻製	3	73	非加熱	86	<i>Bacillus simplex</i>	1023	99 D78478
こんにやくの燻製	3	73	加熱	115	<i>Bacillus subtilis</i>	1068	99 AY114158
こんにやくの燻製	3	73	加熱	116	<i>Bacillus subtilis</i>	1098	99
こんにやくの燻製	3	74	非加熱	87	<i>Bacillus sp</i>	1086	99
こんにやくの燻製	3	74	非加熱	88	<i>Bacillus sp</i>	1037	99
こんにやくの燻製	3	74	加熱	118	<i>Bacillus subtilis</i>	1108	100
こんにやくの燻製	3	75	非加熱	89	<i>Bacillus sp</i>	1100	99
こんにやくの燻製	3	75	非加熱	90	<i>Bacillus sp</i>	1084	99
こんにやくの燻製	3	75	加熱	119	<i>Bacillus subtilis</i>	1118	100

## 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 ボツリヌス菌接種実験に使用する標準菌の性状

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新含気食品におけるボツリヌス中毒に対するリスク評価を行うためには、対象食品に直接芽胞を接種し、食品内における芽胞の発芽、および菌の増殖性と毒素産生性を調べるのが望ましい。しかし、ボツリヌス菌の性状は菌種により芽胞耐熱性、菌の増殖性、および毒素産生性等の点で異なり、ボツリヌス菌の接種実験には複数の菌を同時に用いることが推奨されている。わが国でも容器包装詰食品に対するボツリヌス中毒対策として同様の通知が厚生労働省から出されている。一般に同一株であっても保存状態により性状が幾分異なることは芽胞の耐熱性試験等で指摘されている。そのため、新たに接種実験を始める場合には、使用菌の性状を知ることがリスク評価を行うために必須の条件となる。本研究では供試菌の候補として選別した A、B 型菌の芽胞産生性、栄養型細胞の増殖および毒素産生性を種々の条件で検討し、これらの性状を明らかにすることを目的とした。その結果、わが国の A 型菌の標準毒素および抗毒素の作製に使用されている 97A 株の産生する芽胞は他の A 型菌 Renkon 株、62A 株、33A 株と比べて易熱性であることがわかった。B 型菌として使用した 213B 株と Okra 株の芽胞は同程度の耐熱性を示したが、Okra 株の方が毒素産生能は高かった。ボツリヌス菌の使用が困難な実験環境での接種実験に代用菌として考えられる *Clostridium sporogenes* PA3679 株は最も高い耐熱性を示すことを確認した。

### 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。しかし、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。今回はこれら食品への接種実験に使用するボツリヌス菌株として考えられている A、B 型菌の芽胞の熱耐熱性、増殖および毒素産生能を種々の条件下で調べた。

## B 研究方法

### 1 使用菌株

*Clostridium botulinum* A 型菌 4 株, 62A、97A、Renkon、33A、B 型菌 2 株, Okra、213B および *C. sporogenes* PA3679 を用いた。97A 株はわが国の A 型毒素の標準品およびウマ抗毒素血清の作製に使用され、Renkon 株は辛子レンコン中毒事例からの分離菌である。

### 2 芽胞の調製

各菌株をクノクドミート培地で一晚培養後、卵黄加 GAM 寒天培地に塗布し形成された 10 株以上のコロニーから毒素産生能が最も高い株を選別した。分離菌を再度クノクドミート培地で一晚培養し、芽胞調製用培地 (5% Trypticase、0.5% Bacto peptone、0.1% N-thioglycolate、pH 7.0) に接種し、30℃7 日間培養した。培養液を遠心して芽胞を集め滅菌蒸留水に懸濁し、バスタイプソニケーター中で 30 秒 2 回処理した。さらに懸濁した芽胞を遠心操作により 10 回滅菌蒸留水で洗浄後、芽胞の形状を顕微鏡で観察後、-30 度で保存した。芽胞数の測定は卵黄加 GAM 寒天培地を使用し、滅菌パウチを用いて行った。

### 3 増殖および毒素産生能

各菌株の増殖、毒素産生性を調べるために PYG 培地 (2% Proteose peptone、0.5% 酵母エキス、0.5% ブドウ糖、0.025% N-thioglycolate) を使用し pH 5~7 に調製した。各菌株の芽胞懸濁液を滅菌蒸留水で  $10^5$ /ml に希釈し、その 0.1 ml を PYG 培地 10 ml に接種し 30℃で培養し、適当な間隔で培養液の pH の変化、菌の増殖および毒素産生量

を調べた。増殖の程度は培養液を 600 nm で測定することにより増殖の程度を調べた。毒素産生量はマウス尾静脈法によりマウスの致死時間から腹腔内 (ip)  $LD_{50}$ /ml を算出した。B 型菌では培養液をトリプソノ処理し活性化毒素量として表した。

### 4 芽胞の耐熱性

保存している芽胞を  $10^4 \sim 10^5$  になるように 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.0 で希釈し、その懸濁液を耐熱耐圧試験管に分注した。これらの試験管をオイルバス (80 あるいは 100℃) に侵漬した。一定時間処理した後、急冷し残存する芽胞数をパウチ法で測定した。各菌株の芽胞耐熱性は D 値 (初発の芽胞数が 1/10 になるまでの時間) で表した。

## C 研究結果

### 1 供試菌の芽胞形成能

使用した A 型菌 3 株 (62A、Renkon、33A)、B 型菌 2 株 (Okra、213B) は芽胞調製用培地 400 ml で  $10^9 \sim 10^{10}$  個の芽胞が得られた。また 80℃10 分間処理前後で芽胞数に大きな変化がなかったことから、これらの菌株では耐熱性芽胞を産生することが確認された。97A 株および *C. sporogenes* は芽胞の産生性が悪く  $10^8$  程度であった。加熱処理により 97A 株の芽胞数は極端に低下したことから他の菌株と比べて易熱性芽胞を形成すると考えられた (表 1)。

### 2 各菌株の増殖および毒素産生性

A 型菌 3 株 (62A、Renkon、33A) における pH 7.0 および 6.0 での増殖、毒素産生量には大差がなかった。33A 株の毒素産生量は他の 2 株と比べて約半分であった (図 1)。

B 型菌 2 株 (Okra、213B) においては、Okra 株は pH 7.0 の方が pH 6.0 より菌増殖、毒素産生量が高かった。213B 株は pH 6.0 の方が pH 7.0 より高い毒素産生性を示した。2 株間