

の毒素産生量は Okra 株の方が 213B 株より 2～3 倍高い傾向が認められた (図 2)。C sporogenes PA3679 株では pH 7.0 および 6.0 では菌増殖性に変化はなかった (図 3)。

一方、pH 5.0 における菌の増殖は  $10^3$ /ml の芽胞接種では菌の増殖はいずれの株でも認められず、Renkon 株では  $10^5$ /ml、C sporogenes では  $10^5$ /ml の芽胞接種で菌の増殖が 5 あるいは 6 日目に認められた。

### 3 芽胞の耐熱性

芽胞の耐熱性を 100℃ 処理条件下で調べた。A 型菌 3 株の  $D_{100}$  値は異なり Renkon 株が最も高い値を示した (図 4)。易熱性芽胞を産生する 97A 株の耐熱性を 80℃ で調べたところ、その  $D_{80}$  値は 8.8 分であった。同様に B 型菌 2 株の芽胞では  $D_{100}$  値は、共に A 型菌芽胞より高い値を示した。さらに、C sporogenes PA3679 株は 100℃ 処理条件下では直接測定できず、求められた直線からの推定  $D_{100}$  値は 400 分以上で非常に高い耐熱性の性状を持つことが分った (図 5)。

## D 考察

新含気調理食品は、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  $A_w$  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、上述した新含気食品はレトルト食品の規格に合致せず、食品衛生法では「そうざい」として取り扱われている。これらの製品が要冷蔵の表示とおりの取り扱いをされれば問題はないが、外見上常温流通を是とするレ

トルト食品と同等の取り扱いをされる可能性があるためボツリヌス菌中毒のリスク評価を必要とした理由である。

ボツリヌス菌中毒のリスク評価を行うために様々な試みが行われているが、対象食品の成分は多様であり、直接対象とする食品に対して接種実験を行い評価することが最も確実であると考えられる。ボツリヌス菌芽胞は一般的に I 群菌が最も耐熱性が高いが、その性状は多様であり同一菌種であっても耐熱性が異なる。また、ボツリヌス菌 A 型毒素を最初に精製、結晶化するために使用された Hall 株は芽胞をほとんど形成しない変異株であることも知られている。そのため、接種実験には同型の複数の菌株を混合した芽胞液を使用することが推奨されている。今回、接種実験への候補菌株として挙げられている A 型、B 型菌芽胞の性状を再確認するために実験を行った。

通常接種実験では食品 1 g に対して芽胞数が  $10^3$  CFU 程度が望ましいとされている。そのため菌の増殖および毒素産生用培地として使用した PYG 培地に  $10^3$ /ml の芽胞を接種し、各菌株の性状を検討した。いずれの菌株も pH 6.0 以上であれば、増殖し毒素を産生したが、pH 5.0 では  $10^3$ /ml の芽胞数では増殖が認められない株もあることが分り、今後 pH 6 以下の条件で各株の増殖、毒素産生指摘条件を検討する必要がある。

芽胞の耐熱性試験は保存食品等における殺菌基準を知るために行われるため実験は 105℃ 以上での成績が多い。今回、実験成績が少ない 100℃ における芽胞の熱抵抗性を調べた。対象とした A 型菌芽胞では株により異なる  $D_{100}$  値を示し、耐熱性に関して多様な性状を示すことが分った。一方、B 型菌 2 株は同程度の抵抗性を示した。また、接種実験の際にボツリヌス菌の代用となると考えられて

いる PA3679 株は最も高い耐熱性を示したことから、殺菌条件を検討するのに十分な性状を兼ね備えていると考えられた。ボツリヌス菌は他の属菌とは異なり菌の生物学的性状ではなく、産生する毒素の血清型を基準として種が決定されている極めて稀な菌である。I 群菌と同様の生化学的性状を示す非毒素産生株は *C. sporogenes* に同定される。従って、PA3769 株のみを接種実験に用いる場合には、食品内での増殖の有無を確実に判定するためには、菌株に特徴的な遺伝学的マーカーの検索指標にする方法を確立する必要があると思われる。

今回、実施した菌株の性状解析は、密封包装詰食品への接種実験を客観的に評価するために必要な情報を提供すると思われるため、次年度においても引き続いてより詳細な検討を行う予定である。

#### E 結論

密封包装詰食品に対する接種実験に用いるために候補として挙げられているボツリヌス A 型菌は芽胞の耐熱性が菌株により異なっていた。B 型菌では毒素産生性が異なっていた。ボツリヌス菌の代用としての考えられる C

*sporogenes* PA3679 はボツリヌス菌芽胞より高い耐熱性を持つ芽胞を産生することを確認した。菌の増殖性については大差がなかった。しかし、pH 6 以下の条件では菌の増殖性に違いが認められたことから、今後詳細な検討を要すると考えられた。

#### F 健康危険情報

なし

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

Ihara, H, Kohda, T, Morimoto, F, Tsukamoto, K, Karasawa, T, Nakamura, S, Mukamoto, F, and Kozaki, S 2003 Sequence of the gene for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin associated with infant botulism, expression of the C-terminal half of heavy chain and its binding activity *Biochim Biophys Acta*, 1625 19-26

#### H 知的財産権の出願 登録状況

なし

表 1

## ボツリヌス菌芽胞の調製

菌株	加熱処理	芽胞数
62A	—	$8.1 \times 10^9$
	+	$6.2 \times 10^9$
Renkon	—	$9.4 \times 10^8$
	+	$1.5 \times 10^9$
33A	—	$1.9 \times 10^{10}$
	+	$1.4 \times 10^{10}$
97A	—	$6.9 \times 10^8$
	+	not determined
Okra	—	$8.4 \times 10^8$
	+	$1.0 \times 10^9$
213B	—	$1.7 \times 10^{10}$
	+	$1.4 \times 10^{10}$
C sporogenes	—	$8.4 \times 10^7$
	+	$1.1 \times 10^8$

培地400 ml から得られた総芽胞数を示している。

加熱処理は 80℃、10 分間行った。

図1 A型菌の増殖と毒素産生

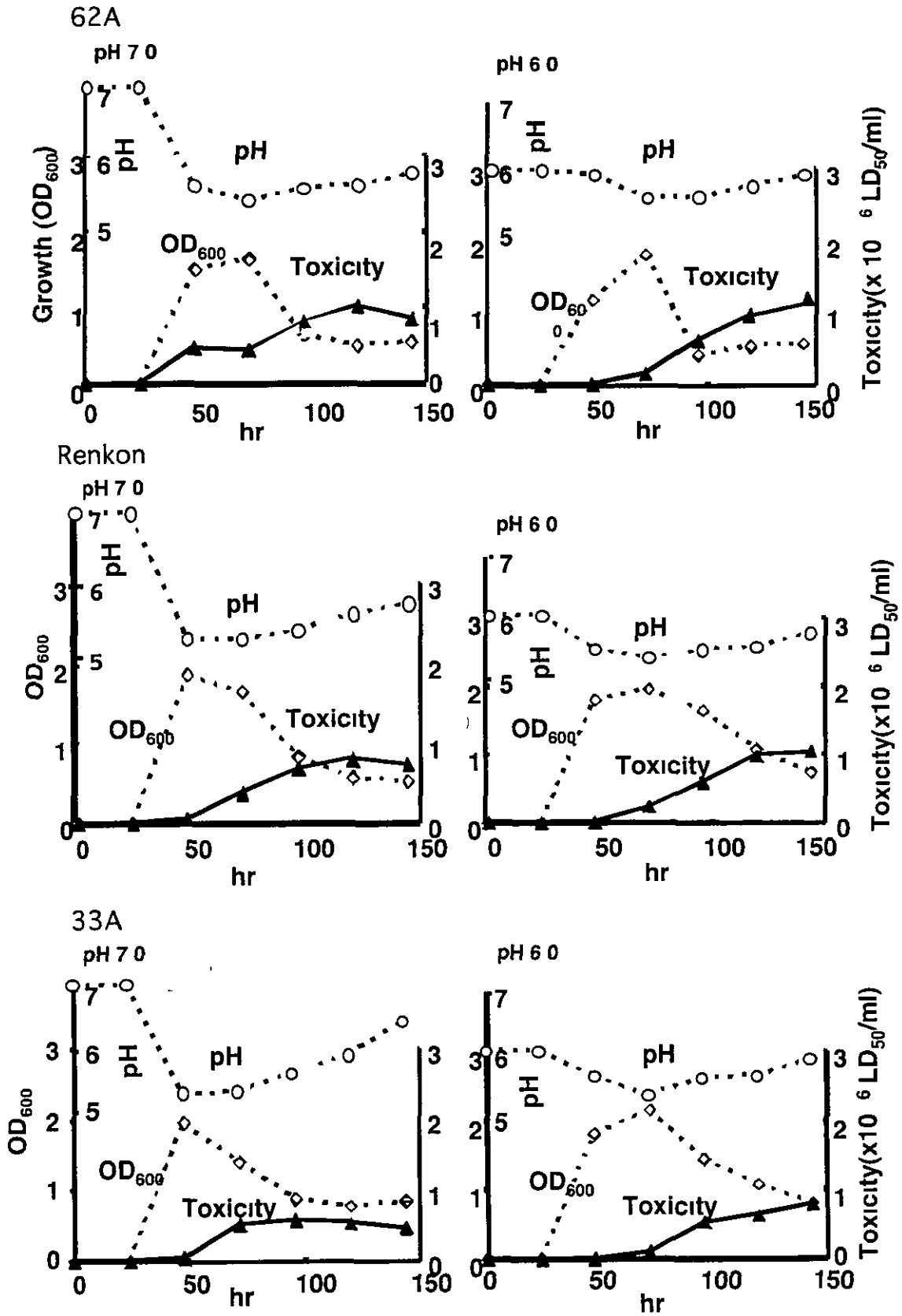


図2 B型菌の増殖と毒素産生

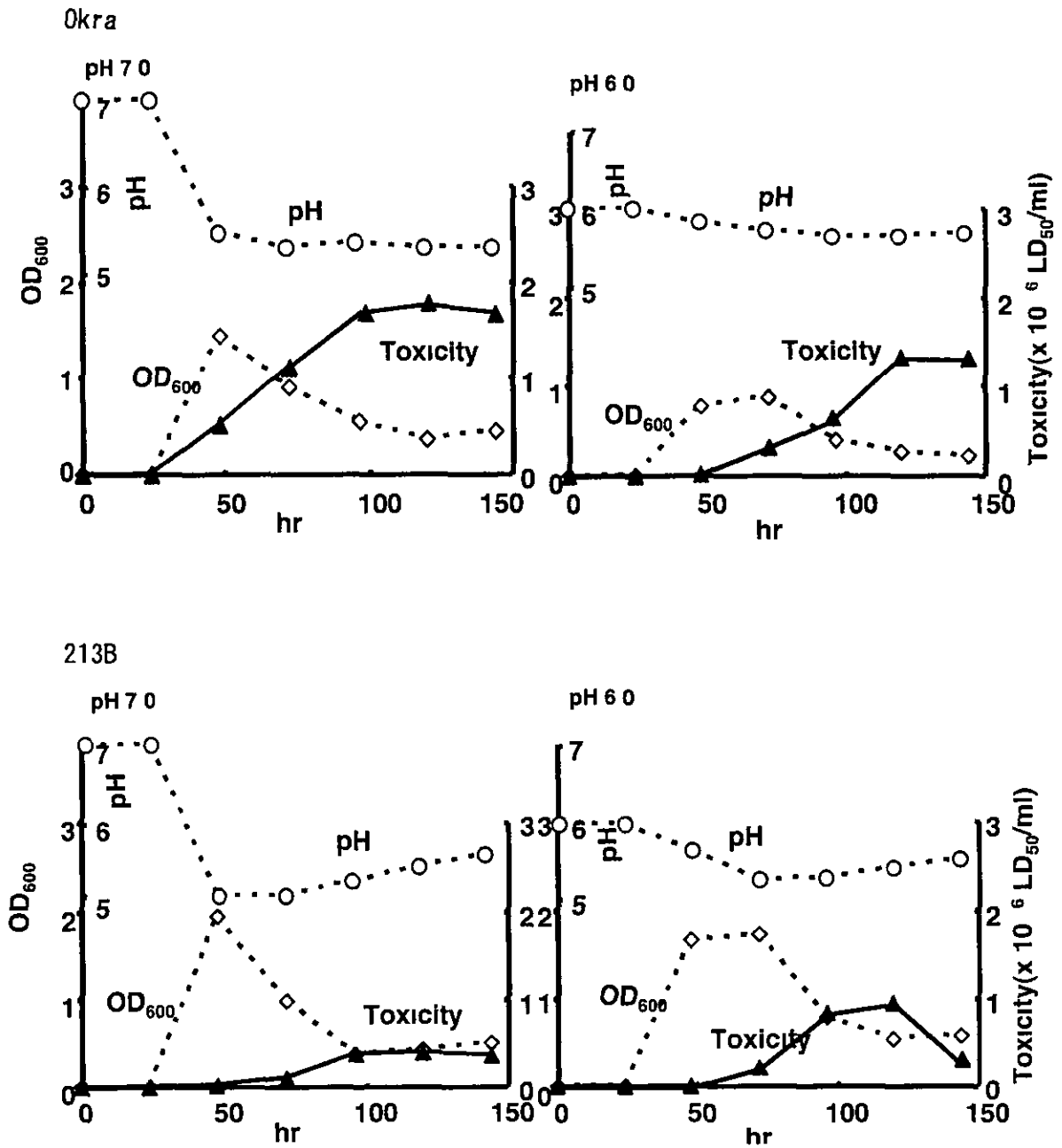


図3 *C. sporogenes* PA3679 の増殖

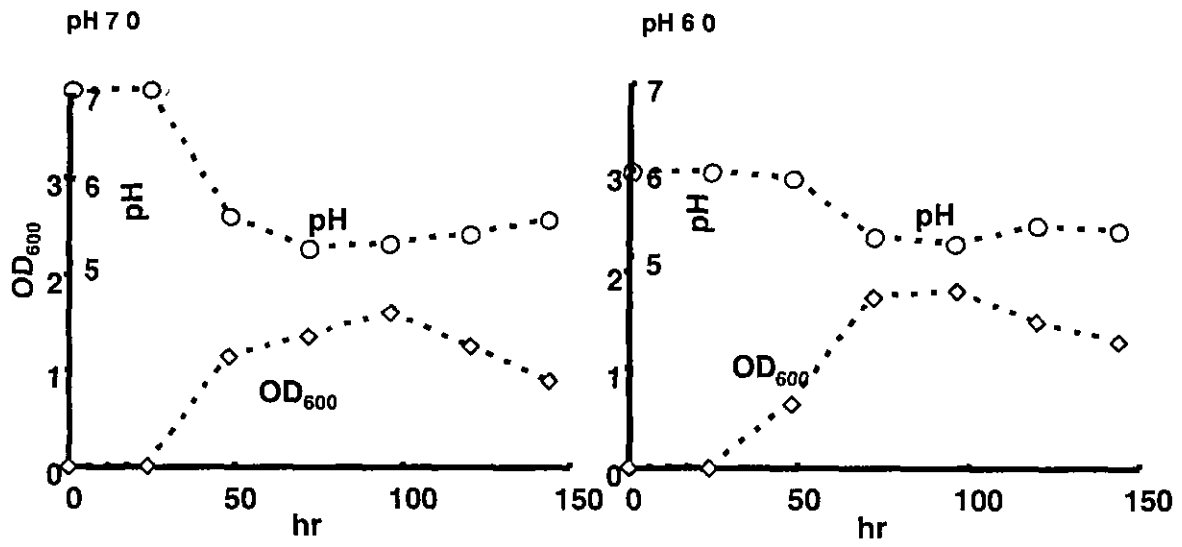
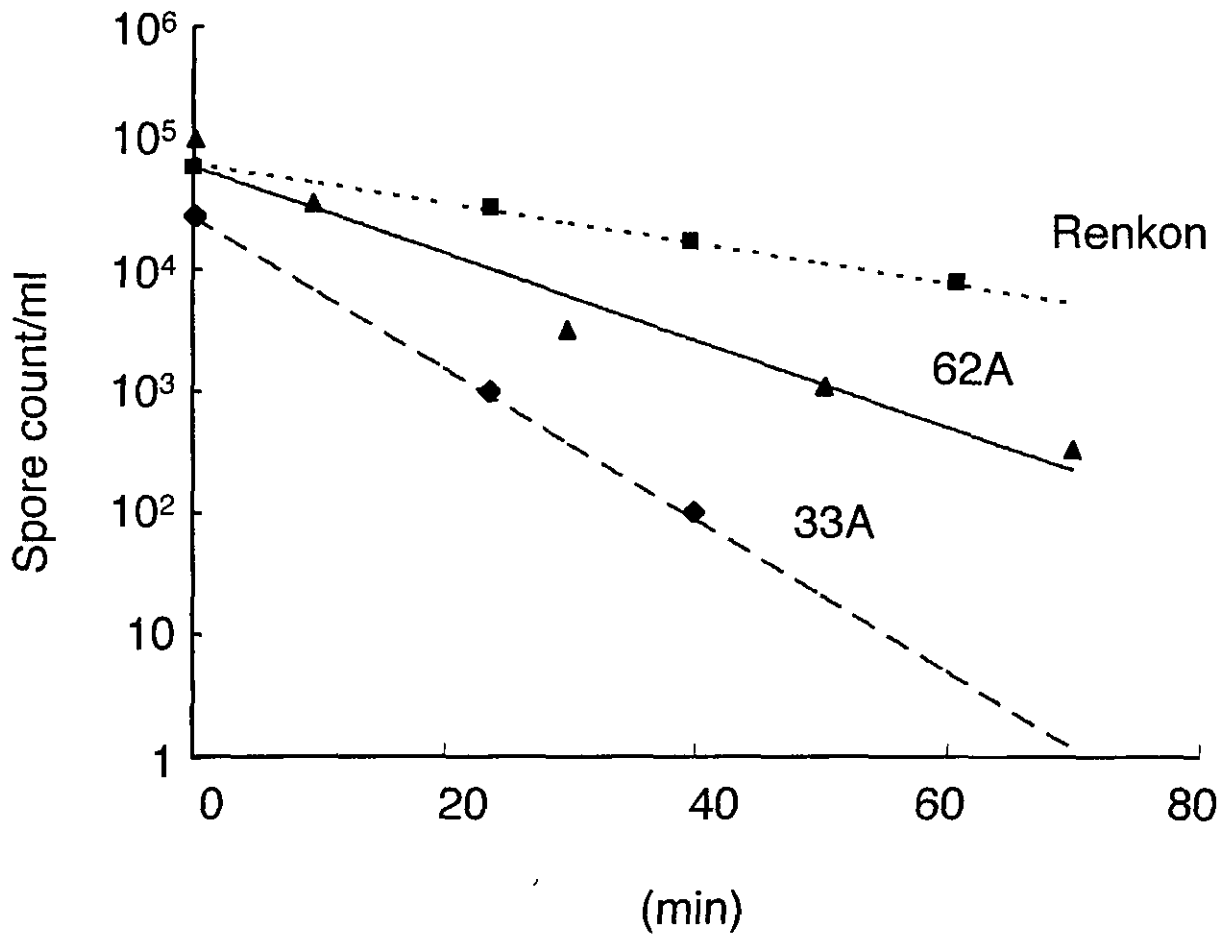
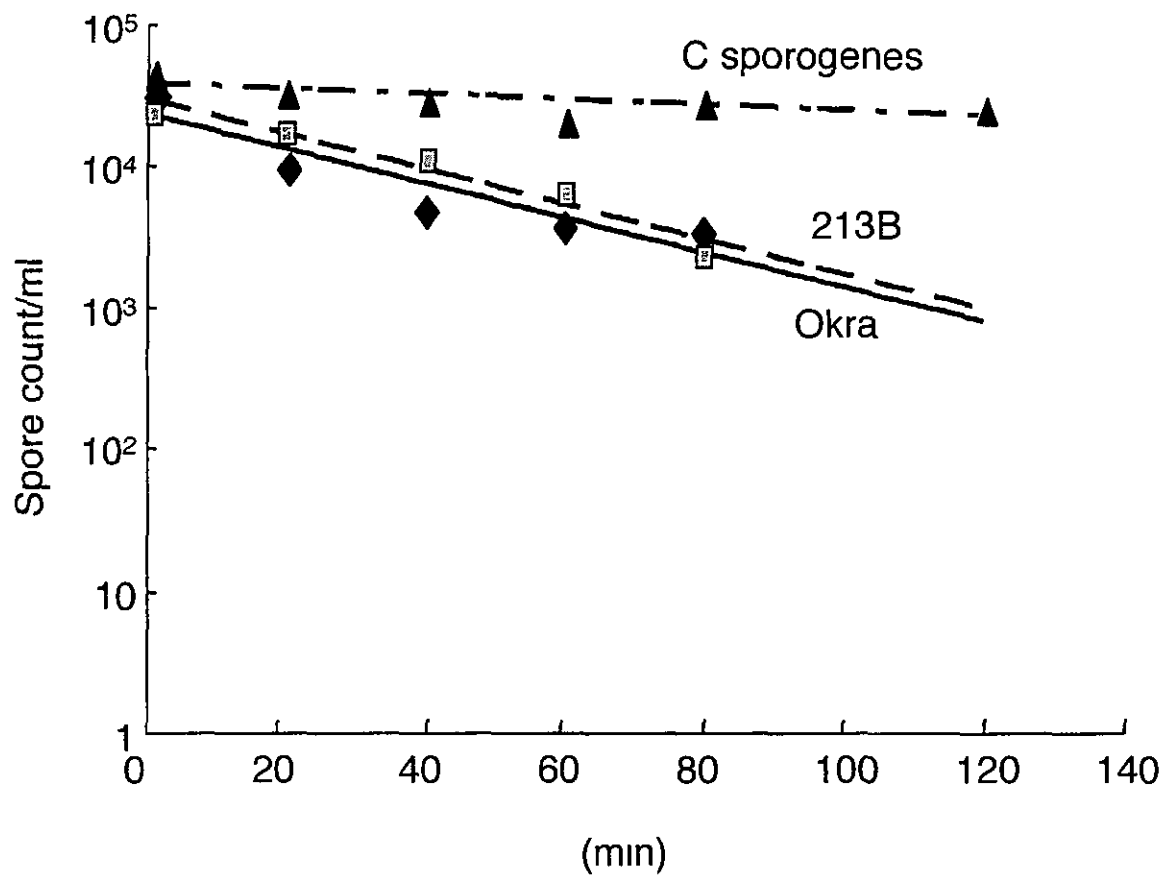


図4 A型菌芽胞の耐熱性



Strain	$D_{100}$ value
Renkon	64.6
62A	27.8
33A	14.3

図5 B型菌および *C. sporogenes* PA3679 の耐熱性



Strain	$D_{100}$ value
Okra	81.1
213B	81.9
<i>C. sporogenes</i>	418.7



## 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 駒木 勝 (社)日本缶詰協会研究所次長  
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  
分担研究者 武士 甲一 北海道立衛生研究所微生物部主任研究員  
研究協力者 武田 淳 (社)日本缶詰協会研究所食品化学研究室室長  
大久保良子 (社)日本缶詰協会研究所食品微生物学研究室主任  
山口 敏季 (社)日本缶詰協会研究所食品微生物学研究室研究員

### 研究要旨

常温で流通、販売される缶、びん詰及びびれトルト食品などの容器包装詰殺菌食品に関する行政上の規格基準としては食品衛生法に記載されている容器包装詰加圧加熱殺菌食品がこれに該当する。本法の規格基準には pH が 4.6 を超え、かつ水分活性が 0.94 を超える容器包装詰殺菌食品はその中心を 120℃、4 分またはそれと同等以上の効力を有する方法で加熱処理することが義務付けられている。この加熱条件 120℃、4 分は、これら容器包装詰殺菌食品で食中毒の原因となるボツリヌス菌芽胞を殺滅するためのものである。しかし本来 pH 値や水分活性値がこの範疇にあるにもかかわらず加圧加熱処理されない食品についてはこの規格基準の適用を受けない。

ボツリヌス菌の増殖及び毒素産生は一般微生物と同様にその環境要因、例えば、栄養成分、pH、水分活性、温度、酸素、酸化還元電位などに影響を受けることは知られている。食品はまた、それぞれ栄養成分的にも種々様々で、食品すべてが必ずしも微生物にとって増殖できる好適な環境ともいえない。しかしながら、pH が 4.6 を超え、かつ水分活性が 0.94 を超える当該食品のうち、加圧加熱を行わず製造されている食品については少なくとも当該食品のボツリヌス菌に対する安全性を評価することが食品衛生上の最重要課題のひとつであると考えられる。そこで、ボツリヌス菌に対する安全性を保証するための試験として考案されているボツリヌス菌接種試験に必要となるボツリヌス菌の菌株の選定を目的として試験を実施した。供試菌株として A 型 3 株及び B 型 2 株と、ボツリヌス菌の代替株としてのスポロゲネス菌 PA3679 株の計 6 菌株を用い、各供試菌株の培地中における最低発育 pH 値と 1/15M リン酸緩衝液(pH7.0)中における 105℃または 115℃の D 値を測定した。その結果、供試菌株は供試したクロストリディア強化培地中で、A 型 3 株は pH5.2~5.3 以上で、B 型 2 株は 5.2~5.9 以上で、PA3679 株は 5.2 以上で発育が認められた。また、耐熱性は A 型 3 株の 105℃における D 値は 5.5~10.5 分、B 型 2 株の 105℃における D 値は 6.1~7.3 分及び PA3679 株の 115℃における D 値は 7.1 分であった。

気密性の容器中におけるボツリヌス菌の増殖及び毒素産生を調べるために、ガスバリアー性(酸素透過性)が異なる 3 種類の容器に詰めた玄米かゆ中で試験した。その結果、アルミパウチ製でボツリヌス菌の毒素産生が認められた。

炊飯直後のごはんに加温したカレーを添加した状態で室温放置した場合のボツリヌス菌の増殖及び毒素産生を調べた。その結果、室温で 7 日間放置した場合にボツリヌス菌の毒素産生が認められた。

### A 研究目的

ボツリヌス菌の増殖及び毒素産生の可能性がある容器包装詰低酸性食品に対するボツリヌス食中毒の

リスク評価を実施するため、今年度においては考案されているボツリヌス菌接種試験に用いる菌株の選定のための最低発育 pH 値と耐熱性 (D 値) 試験を実施した。また、ボツリヌス菌の増殖及び毒素産生

について、ガスバリアー性（酸素透過性）が異なる容器を用いた食品試料中と室温放置した食品試料中で調べた。同時にスポロゲネス菌 PA3679 株がボツリヌス菌の代替株として可能であるかをも検討した。

## B 研究方法

### 1 菌株の検討

接種試験に用いる菌株の性状、とくに最低発育 pH 値と耐熱性（D 値）について検討した。同様にボツリヌス菌の代替株としての *C. sporogenes* PA3679 株についても実施した。

#### (1) 供試菌株

*Clostridium botulinum* type A 及び type B, *C. sporogenes* PA3679 株（以下、PA3679 株とする）を用いた。その内訳を表 1 に示した。

#### (2) 芽胞の調製

ボツリヌス菌については供試 5 株を各々 TP 培地（トリプティケースペプトン（BBL）50g、バクトペプトン 5g、チオグリコール酸ナトリウム 1g を脱イオン水 1,000ml に加熱溶解、pH7.2 に調整）に、PA3679 株については GAM ブイオンに接種し、35°C 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°C で 20 分間加熱処理した後、再度 TP 培地 10 ml に接種（PA3679 株については GAM ブイオン）して一夜培養した。この操作を 3 回繰り返して、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 500 ml の TP 培地（PA3679 株については GAM ブイオン）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°C で保存した。調製した芽胞液の芽胞数を表 2 に示した。

### 1-1 供試菌株の最低発育 pH 値

#### (1) 供試培地の調製

##### クロストリディウム用強化培地

（pH4.8～5.9, 以下 RCM と略す）

バクトペプトン（Difco）10g、肉エキス（Oxoid）10g、酢酸ナトリウム（3 水塩）5g、酵母エキス 15g、可溶性デンプン 1g、ブドウ糖 1g、L-ノステイン塩酸塩 0.5g 及び寒天末 1g を脱イオン水 1,000ml に加熱溶解し、3N HCl または 3N NaOH で pH4.8 と pH7.0 に調整後、この液を適量ずつ混合し、pH が

4.8～5.9 までの培地を調製した。これをマグネチック・スターリング・バー 1 本を投入した培地びんに 20ml ずつ分注し、121°C、20 分間高圧滅菌した。

#### (2) 芽胞液の接種

調製した RCM に 10<sup>5</sup> CFU/ml に希釈した各菌株の芽胞液を 0.5ml ずつ接種し、よく混和後、滅菌硬質ガラス製小試験管（内径 7mm、外径 9mm、長さ 150mm）に 3ml 宛分注し、酸素炎で溶封した。これらは恒温水槽中で 80°C、20 分間加熱処理後、急冷した。1pH 区につき 5 本ずつ供した。

#### (3) 培養

上記(2)で加熱処理した培地を 30°C、3 月間恒温放置した。この間、肉眼による観察を行い、培地の混濁またはガス産生が認められたものを発育陽性とした。

### 1-2 供試菌株の耐熱性

#### (1) 供試培地の調製

##### 酵母エキス半流動培地（以下 YES と略す）

酵母エキス 10g、可溶性デンプン 1g、リン酸 2 カリウム 2g、チオグリコール酸ナトリウム 1g 及び寒天末 15g を脱イオン水 1,000ml に加熱溶解し、pH を 7.2 に調整した。これをマグネチック・スターリング・バー 1 本を投入した培地びんに 40ml ずつ分注し、121°C、20 分間高圧滅菌した。

##### 酵母エキス寒天培地（以下 YEA と略す）

酵母エキス 10g、可溶性デンプン 1g、リン酸 2 カリウム 2g、チオグリコール酸ナトリウム 1g 及び寒天末 20g を脱イオン水 1,000ml に加熱溶解し、pH を 7.2 に調整した。これを 121°C、20 分間高圧滅菌した。

#### (2) 芽胞の加熱処理（予備試験）

供試芽胞液の 10 倍希釈液 1ml を YES 40ml に希釈、混和後、滅菌硬質ガラス製小試験管（内径 7mm、外径 9mm、長さ 150mm、以下 TDT チューブと略す）に 2ml 宛分注し、酸素炎で溶封した。これらを恒温油槽（サーモバス OH-16、タイテック製）中で 100、105、110、115 及び 120°C、それぞれ 10、20 及び 30 分間加熱処理後、急冷し、30°C、14 日間培養した。肉眼により培地に混濁またはガス産生が認められたものを発育陽性とした。

#### (3) 芽胞の加熱処理（本試験）

供試芽胞液の 10 倍希釈液 1ml を滅菌 M/15 リン酸緩衝液（pH7.0）40ml に希釈、混和後、TDT チューブに 2ml 宛分注し、酸素炎で溶封した。これらを

恒温油槽（サーモバス OH-16，タイテノク製）中で、ボツリヌス菌は 105℃，PA3679 株は 115℃で所定時間加熱処理し，以下の生残芽胞数の測定に供した

#### (4) 生残芽胞数の測定

加熱処理済み TDT チューブの芽胞液 1ml を滅菌 0.1%ペプトン水で 10 倍段階希釈した YEA10ml を滅菌アナエロビクパウチ 1 枚にとり，各希釈段階液 1ml を加え，よく混和し，平板に固化した後，30℃で 7~10 日間培養した 1 希釈段階に平板 2 枚を用い 各平板に形成した集落を数え，その平均値を生残芽胞数とした

## 2 包装容器（パウチ）が異なる玄米かゆへのボツリヌス菌および PA3679 株の接種試験

### (1) 供試試料

玄米かゆを材質の異なる 3 種類のパウチに詰め，116℃，30 分間のレトルト殺菌を行い，調製し，供試試料とした

### (2) 供試菌株

上記 1 菌株の検討に同じ

### (3) 芽胞の調製

上記 1 菌株の検討で調製した芽胞液を用いた

### (4) 接種芽胞液の調製

ボツリヌス菌は，供試菌株芽胞液の芽胞数が，約  $1\sim 3\times 10^7$  CFU/ml になるよう希釈し，各供試菌株の芽胞液を等量ずつ血清型ごとに混合し，A 型ボツリヌス菌混合芽胞液及び B 型ボツリヌス菌混合芽胞液とした PA3679 株は調製した芽胞液が  $10^7$  CFU/ml 以下であったため，希釈せずそのまま接種用芽胞液とした

### (5) 供試試料への接種

供試試料 55 袋の外側をアルコール綿でよく拭き，ノール部を切り取り，この部分から A 型ボツリヌス菌混合芽胞液，B 型ボツリヌス菌混合芽胞液及び PA3679 株芽胞液をそれぞれ 13 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 16 袋は接種せずにそのままノールした 接種には，滅菌済注射器（テルモ製，ツヘルクリン用，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

### (6) 加熱処理

無接種対照試料 16 検体及び接種試料 39 検体（A 型ボツリヌス菌接種，B 型ボツリヌス菌接種及び PA3679 株接種各 13 袋）を，低温殺菌機（石田式）

で，80℃，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，加熱処理した

熱伝達の測定には，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）を用い以下の方法によった 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，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さに応じて 10，15 及び 25mm のものを適宜用いた 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 本を供試試料内部の温度測定に用いた

### (7) ヘッドスペースのガス分析

加熱処理直後の無接種対照試料のヘッドスペースのガス分析を行った ヘッドスペースのガス分析はガスクロマトグラフ法により行った ガス採取は目盛付のヘッドスペースガス捕集用ガラス器具を用いた水中置換法で行った 目盛により総ガス量を測定した後，ガスタイトンリンジで 1cc をガスクロマトグラフに導入した ガスクロマトグラフの分析条件等を下記に示す

水素，酸素，二酸化炭素の定量は標準ガスを用い，窒素については水素，酸素，二酸化炭素の各値を減算することにより求めた なお，表中の初期空気封入量は不活性ガスの窒素量（ml）と空気中における窒素の組成比 78.1%から求めた計算値である

#### 《分析条件》

装置 GC-3BT（島津製作所）

検出器 TCD

カラム 活性炭（60-80mesh）1.7m×3mm

温度 カラム 75℃，検出器 110℃

検出器ブリッジ電流 62.5mA

キャリアーガス 窒素 30ml/min

### (8) 恒温放置

加熱処理後の供試試料は，無接種対照試料 3 検体及び芽胞液接種試料各 3 検体を恒温放置開始前の分析に用い，残りの試料は 30℃，90 日間恒温放置した なお，この間に容器の膨脹が認められた試料は取り出し，分析を行うまで冷蔵保存した

### (9) 加熱処理後の検体の分析

#### 9-1) 検液の調製

試料の全量を無菌的にストマノ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，等重量の滅菌脱イオン水を加え，ストマノカーで混和し，これを検液（検体の2倍希釈液）とした

#### 9-2) *Clostridium* 属細菌数の測定

検液 2ml を滅菌脱イオン水 8ml に加え，10倍乳剤とした。さらに滅菌 0.1%ペプトン水（9ml入り）を用いて，10倍段階希釈した。滅菌アナエロビノクパウチ 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，*Clostridium* 属細菌数とした

#### 9-3) 好気性生菌数の測定

加熱処理直後の試料についてのみ測定した

上記 10倍乳剤を 10倍段階希釈し，この希釈液 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

#### 9-4) pH の測定

検液の pH を，pH メーター（東亜電波工業製，HM-50V）を用い，測定した

### 3 ごはんにカレーを添加した試料へのボツリヌス菌の接種試験

#### (1) 供試試料の調製

供試試料は，ステンレスのボールに炊飯（市販精米と家庭用の炊飯器を使用）直後のごはん 25g をとり，これに加熱したカレー25g を添加して調製した。同時にアルミパウチを用い同様に調製した。試料調製時のごはんの温度は 77℃，カレーは 91℃であった

#### (2) 供試芽胞液

上記 1 菌株の検討で調製したボツリヌス菌芽胞液を用いた

#### (3) 接種芽胞液

供試菌株芽胞液の芽胞数が，約  $1\sim 3\times 10^7$  CFU/ml になるよう希釈し，各供試菌株の芽胞液を等量ずつ混合し，A 型及び B 型ボツリヌス菌混合芽胞液とした

#### (4) 培地の調製

クロストリディア測定用培地（以下 CCA と略す）

市販のクロストリディア測定用培地（日水製薬製）を用いた。ただし，1000ml あたり 46.9 g（2/3

の量）とした

#### 標準寒天培地（以下 SA と略す）

市販の標準寒天培地（日水製薬製）を用いた

#### (5) 接種

供試試料のカレーの内部に接種芽胞液 20  $\mu$ l を接種し，ステンレスボール入りは直ちにラップをかけ，パウチ入りは直ちにノーラー（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。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

#### (6) 供試試料の温度測定

供試試料の芽胞液接種直後からの継続的な温度変化について，温度測定装置としてマルチロギングメーター（エーアンドディ製，AD-5312）を，温度センサーにはステンレス保護管付き熱電対（外径 1.2mm）を用い，測定した。ステンレスボール入り試料は内容物の中心に温度センサーを挿し，パウチ入り試料は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

#### (7) 室温（25℃）放置

供試試料は，室温（25℃）で 7日間放置した。なお，ステンレスボール入り試料は，この間の 1，3 及び 7 日目に 3 検体ずつ，パウチ入り試料は 3 及び 7 日目に 1 検体ずつ，試料の分析を行った

#### (8) 試料の分析

包装容器の異なる玄米かゆ中へのボツリヌス菌接種試験と同様に行った

### C 研究結果及び考察

供試菌株の検討結果を表 3~6 及び図 1~6，包装容器の異なる玄米かゆへの接種試験結果を表 7~12 及び図 7，ごはんにカレーを添加した試料へのボツリヌス菌接種試験結果を表 13 及び図 8~10 に示した

#### 1 供試菌株の最低発育 pH 値

供試培地に接種した芽胞液の芽胞数測定結果を表 3 に示した。接種した芽胞数は 0.5ml あたり  $1.1\times 10^4\sim 1.8\times 10^5$  CFU で，供試培地 1ml あたり  $3.7\times 10^3\sim 6.0\times 10^4$  CFU となる。30℃，60日間恒温放置後の発育状況を表 4 に示した。供試菌株の最低発育 pH 値は 62A ATCC 7948 株及び 62A NFPA 株の 2 株が 5.3，36A 株，213B 株及び PA3679 株の 3 株が 5.2，Okra 株が 5.9 であった

## 2 菌株の耐熱性

供試菌株の YES 中における予備試験の結果を表 5 に示した 供試菌株のうち菌株番号 62A ATCC 7948, 36A 及び Okra 株の 3 株はいずれも 100℃, 30 分の加熱処理で生残し, 105℃の加熱処理では菌株番号 62A ATCC 7948 及び Okra 株は 20 分の加熱処理で生残し, 30 分で発育がみられなかった また, 菌株番号 36A 株は 10 分で生残し, 20 分で発育がみられなかった 菌株番号 62A NFPA 及び 213B 株の 2 株は 100 及び 105℃, 30 分の加熱処理で生残し, 110℃の加熱処理では菌株番号 62A NFPA 株は 10 分の加熱処理で生残し, 20 分で発育がみられなかった また, 菌株番号 213B 株は 10 分で発育がみられなかった PA3679 株は 100, 105, 110 及び 115℃, 30 分の加熱処理で生残し, 120℃では 10 分で生残, 20 分で発育がみられなかった この結果から, ボツリヌス菌は 105℃, PA3679 株は 115℃での 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.0) 中における D 値を測定した その結果を表 6 と, 生残曲線を図 1~6 に示した ボツリヌス菌の 105℃での D 値は, 62A ATCC 7948 株が 5.5 分, 62A NFPA 株が 10.5 分, 36A 株が 6.9 分, 213B 株が 7.3 分及び Okra 株が 6.1 分であった また, PA3679 株の 115℃の D 値は 7.1 分であった

## 3 包装容器 (パウチ) の異なる玄米かゆへのボツリヌス菌及び PA3679 株の接種試験

供試試料の種類及び外観を表 7 及び図 7 に示した 接種芽胞液の測定結果, 熱伝導測定結果及びヘノドスペースガス分析結果を表 8~10 に, 供試試料の理化学試験, 一般生菌数及び初発芽胞数の測定結果を表 11 に示した

接種した芽胞液の芽胞数は,  $2.3 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$  CFU/20 $\mu$ l であった 供試玄米かゆ中には  $10^3 \sim 10^4$  CFU/g 接種したことになる 加熱処理時間は, 供試試料の 80℃に達してから 20 分としたため, カムアップタイムに 20 分を加えた時間とした よって, 供試試料の加熱時間は, 試料番号①が 26 分 45 秒, 試料番号②が 25 分, 試料番号③が 26 分 30 秒であった

ヘノドスペースガス分析の結果, 酸素量は試料番号①, 試料番号②, 試料番号③の順に多かったが, 製造直後の値としてはとくに問題ないものと思われた

加熱処理直後の分析の結果, いずれの試料からも好気性細菌数は検出されず, また無接種対照試料では *Clostridium* 属細菌は検出されなかった 接種試

料のうち, 試料番号①の *Clostridium* 属細菌数は, A 型ボツリヌス菌接種区が  $2.8 \times 10^4 \sim 3.7 \times 10^4$  CFU/g, B 型ボツリヌス菌接種区が  $2.8 \times 10^4 \sim 3.2 \times 10^4$  CFU/g 及び PA3679 株接種区が  $3.0 \times 10^3 \sim 3.8 \times 10^3$  CFU/g であった 試料番号②は, A 型ボツリヌス菌接種区が  $2.6 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^4$  CFU/g, B 型ボツリヌス菌接種区が  $2.5 \times 10^4 \sim 2.9 \times 10^4$  CFU/g 及び PA3679 株接種区が  $3.3 \times 10^3 \sim 4.2 \times 10^3$  CFU/g であった また, 試料番号③は, A 型ボツリヌス菌接種区が  $2.4 \times 10^4 \sim 2.9 \times 10^4$  CFU/g, B 型ボツリヌス菌接種区が  $2.3 \times 10^4 \sim 2.6 \times 10^4$  CFU/g 及び PA3679 株接種区が  $3.2 \times 10^3 \sim 3.5 \times 10^3$  CFU/g であった

芽胞接種後の試料については, 30℃で 60 日後に試料番号①では A 型ボツリヌス菌接種区, B 型ボツリヌス菌接種区及び PA3679 株接種区の 1 検体ずつが膨脹した 膨脹した検体の分析結果を表 12 に示した 膨脹した試料はいずれも *Clostridium* 属細菌数が増加し, pH がボツリヌス菌接種試料で 4.9~5.0, PA3679 株接種試料では 6.0 であった ボツリヌス菌 A 型接種試料からは A 型毒素, ボツリヌス菌 B 型接種試料からは B 型毒素が検出された

## 4 ごはんにカレーを添加した試料のボツリヌス菌の接種試験

供試試料の継時的温度変化を図 8 に, 室温放置した試料の分析結果を表 13 に, また室温放置中の試料の外観を図 9 及び 10 に示した

供試試料の温度は, 測定開始時にステンレスボール入り試料で 40℃, 測定開始 5 分後にパウチ入り試料では 60℃であったが, いずれも 30 分後には 27~28℃と室温に近い温度にまで低下した

室温放置 1 日目では好気性及び *Clostridium* 属細菌の増加は認められず, 毒素産生も認められなかった 3 日目には外観に腐敗の兆候が現れ (図 2 参照), ステンレスボール入り試料では 3 検体とも好気性細菌が増加し, 3 検体中 1 検体で *Clostridium* 属細菌の増加が認められ, マウスがへい死したが, ボツリヌス菌毒素の確認はできなかった パウチ入り試料では好気性及び *Clostridium* 属細菌ともに増加し, A 型毒素が検出された 7 日目には完全に腐敗し (図 3 参照), ステンレスボール入り及びパウチ入り試料とも好気性及び *Clostridium* 属細菌ともに増加した ステンレスボール入り試料 3 検体中 1 検体で A 型毒素, パウチ入り試料中で A 及び B 型毒素が確認された

## D 考察

今回、接種試験用の菌株選定のための性状試験を実施した。試験に供したボツリヌス菌 A 型 3 株及び B 型 2 株の計 5 株の培地中における最低発育 pH 値は 5.2～5.9 であった。これまで報告されている耐熱性ボツリヌス菌の最低発育 pH 値は 4.8 とされており、今回の供試菌株の結果とはやや隔たりがみられた。今後、供試する培地の種類や接種する芽胞濃度および培養期間などの検討が必要と思われる。なお、ボツリヌス菌の代替株として PA3679 株の最低発育 pH は 5.2 で供試ボツリヌス菌と同じ発育能を示した。また、供試ボツリヌス 5 菌株の M/15 リン酸緩衝液(pH7.0)中における 105℃の D 値は 5.5～10.5 分であった。食品衛生法の規格基準にある 120℃、4 分は 1922 年に Esty と Meyer が報告したデータが根拠となっている。この報告では約  $10^{11}$  のボツリヌス菌芽胞を殺滅するに必要な加熱殺菌条件が 120℃、4 分であり、105℃では 100 分となっている。仮に、ボツリヌス菌芽胞を約  $10^{11}$ 、殺滅時間 100 分として、およそ 105℃における D 値を算出すると約 9 分となる。今回測定した供試ボツリヌス 5 菌株の 105℃における D 値は 5.5～10.5 分であることから、測定した耐熱性値はほぼ同程度と思われる。また、PA3679 株の 115℃の D 値は 7.1 分であった。米国ではボツリヌス菌の代替株としての PA3679 株の耐熱性については 121.1℃における D 値は 1 分前後が望ましいとされている。z 値を 10℃として算出すると、121.1℃の D 値 1 分は 115℃の D 値 4 分に相当する。今回試験した PA3679 株は約 2 倍の耐熱性値であった。

容器包材が異なる玄米かゆ中における増殖及び毒素産生試験ではアルミパウチ製にのみボツリヌス菌の毒素産生が認められた。今回、食品として玄米かゆを用いたが肉や魚などのタンパク質の多い食品を用いて試験をすべきと思われる。また、炊飯直後のごはんに加温したカレーを添加した状態でボツリヌス菌芽胞を接種し、室温放置した試料中では 7 日にボツリヌス菌毒素の産生が認められた。よって、ごはんにかレーを添加した試料中でボツリヌス菌の増殖及び毒素産生が認められたことからすれば、ボツリヌス菌の発育及び毒素産生は容器のガスバリアー性(酸素透過性)の評価もさることながら食品の成

分により依存するものと推察された。

## E 結論

容器包装詰低酸性食品に対するボツリヌス食中毒のリスク評価を実施するために必要な接種試験用の菌株選定のための性状試験を実施した。試験に供したボツリヌス菌 5 菌株の培地中における最低発育 pH 値は 5.2～5.9 で、M/15 リン酸緩衝液(pH7.0)中における 105℃の D 値は 5.5～10.5 分であった。また、代替株としての PA3679 株の最低発育 pH は 5.2 で、供試ボツリヌス菌と同じ発育能を示し、M/15 リン酸緩衝液(pH7.0)中における耐熱性値は 115℃の D 値が 7.1 分で、供試ボツリヌス菌より強い耐熱性を示した。この結果から接種試験にはボツリヌス菌の代替として PA3679 株を用いることは可能であると考えられた。

包材が異なる容器(パウチ)に玄米かゆを詰めた試料中と室温に放置した炊飯直後のごはんに加温したカレーをかけた試料中でのボツリヌス菌の増殖及び毒素産生を調べた結果、室温放置 7 日にボツリヌス毒素の産生が認められた。この結果からボツリヌス菌の増殖及び毒素産生はより食品成分に依存することが示唆された。よって、気密性のある容器であればボツリヌス菌は増殖する可能性があるものと推察された。

## F 健康危害情報

特記事項なし

## G 研究発表

特記事項なし

## H 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし

表 1 供試菌株

菌 種	菌株番号
<i>C. botulinum</i> type A	62A ATCC 7948
	62A NFPA <sup>a)</sup>
	36A
<i>C. botulinum</i> type B	213B
	Okra
<i>C. sporogenes</i>	PA3679

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

表 2 調製した供試菌株芽胞液の芽胞数

菌 種	菌株番号	芽胞数 (CFU/ml)
<i>C. botulinum</i> type A	62A ATCC 7948	$1.1 \times 10^7$
	62A NFPA	$6.6 \times 10^8$
	36A	$1.4 \times 10^7$
<i>C. botulinum</i> type B	213B	$1.9 \times 10^7$
	Okra	$5.6 \times 10^7$
<i>C. sporogenes</i>	PA3679	$9.8 \times 10^6$

表 3 接種芽胞液の芽胞数

菌 種	菌株番号	芽胞数 (CFU/0.5ml)
<i>C. botulinum</i> type A	62A ATCC 7948	$3.8 \times 10^4$
	62A NFPA	$1.1 \times 10^4$
	36A	$1.1 \times 10^4$
<i>C. botulinum</i> type B	213B	$2.5 \times 10^4$
	Okra	$5.1 \times 10^4$
<i>C. sporogenes</i>	PA3679	$1.8 \times 10^5$

表 4 pH が異なるクロストリディウム強化培地中での供試菌株の発育状況

菌株番号	培地の pH									
	4.8	4.9	5.0	5.1	5.2	5.3	5.5	5.6	5.9	
62A ATCC 7948	a)----	----	----	----	----	+	+++++	+++++	+++++	
62A NFPA	----	----	----	----	----	++	+++++	+++++	+++++	
36A	----	----	----	----	++	++++	+++++	+++++	+++++	
213B	----	----	----	----	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	
Okra	----	----	----	----	----	----	----	----	+++++	
PA3679	----	----	----	----	++++	+++++	+++++	+++++	+++++	

30°C, 60 日間恒温放置

a) + 発育陽性, - 発育陰性



表 5 供試菌株芽胞の YES 中における耐熱性試験<sup>a)</sup> 結果

菌株番号	初発芽胞数 (CFU/ チューブ <sup>a</sup> )	加熱処理条件														
		(分/100℃)			(分/105℃)			(分/110℃)			(分/115℃)			(分/120℃)		
		10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30	10	20	30
62A ATCC 7948	$2.8 \times 10^4$	+ <sup>b)</sup>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62A NFPA	$1.6 \times 10^5$	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
36A	$2.5 \times 10^4$	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
213B	$4.8 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Okra	$1.0 \times 10^5$	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA3679	$2.0 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

a) 培養条件は 35℃, 14 日間

b) + 発育陽性, - 発育陰性

表 6 供試菌株の M/15 リン酸緩衝液(pH7.0)中における耐熱性試験結果

菌 種	菌株番号	D 値 (分)	
		105℃	115℃
<i>C. botulinum</i> type A	62A ATCC 7948	5.5 (4.7~6.7) <sup>a)</sup>	NT <sup>b)</sup>
	62A NFPA	10.5 (9.6~11.7)	NT
	36A	6.9 (5.9~8.3)	NT
<i>C. botulinum</i> type B	213B	7.3 (7.0~7.6)	NT
	Okra	6.1 (5.7~6.6)	NT
<i>C. sporogenes</i>	PA3679	NT	7.1 (6.0~8.8)

a) ( ) 内は 95%信頼限界

b) NT 試験せず

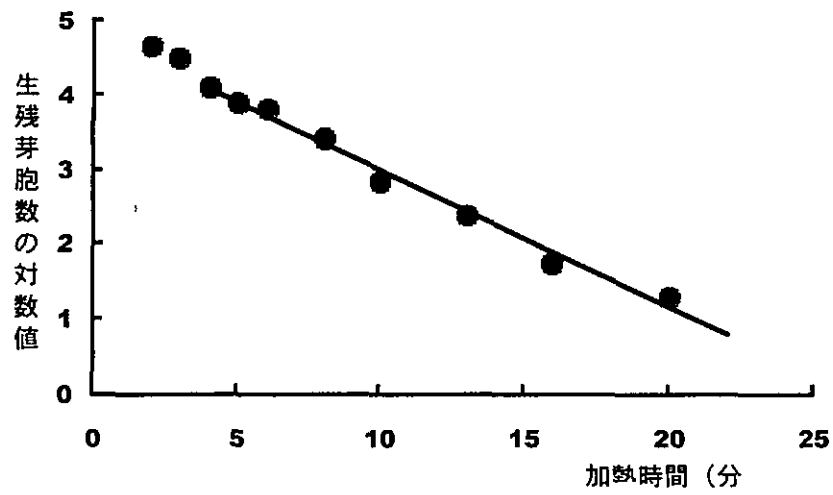


図1 菌株番号 62A ATCC 7948 株芽胞の 105°Cにおける M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 中での生残曲線

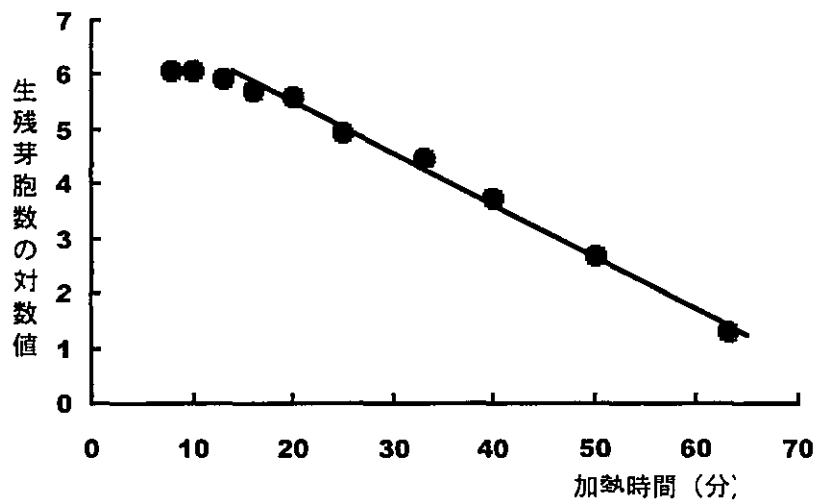


図2 菌株番号 62A NFPA 株芽胞の 105°Cにおける M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 中での生残曲線

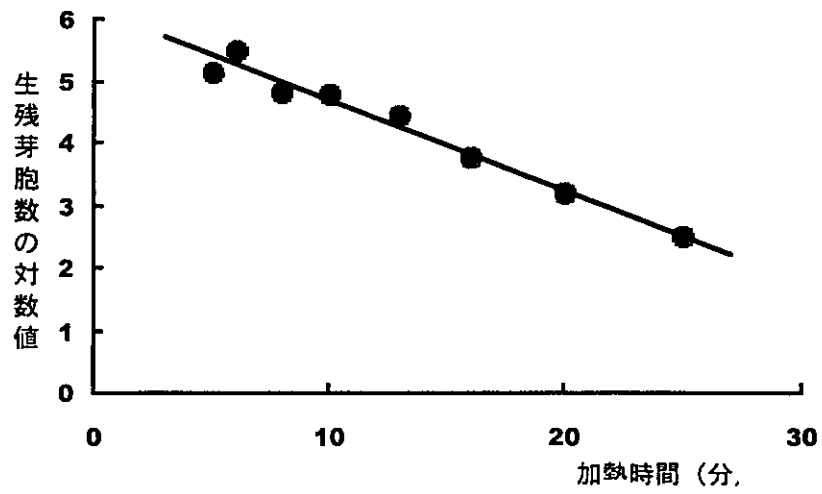


図3 菌株番号 36A 株芽胞の 105°Cにおける  
M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 中での生残曲線

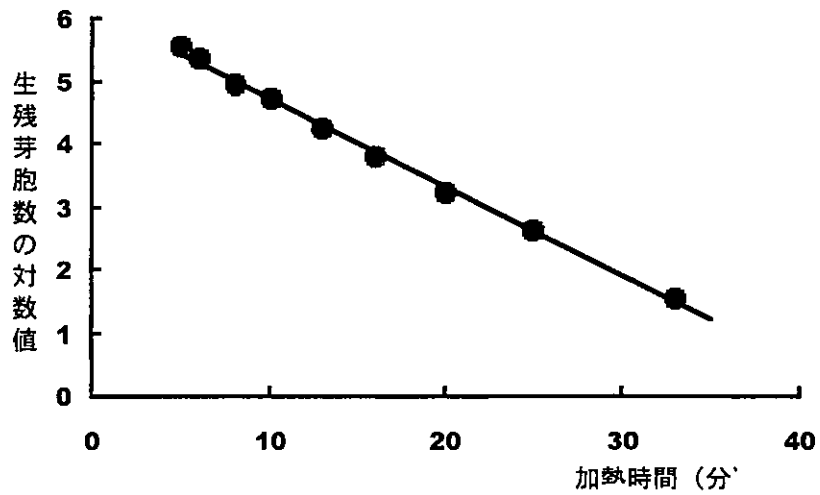


図4 菌株番号 213B 株芽胞の 105°Cにおける  
M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 中での生残曲線

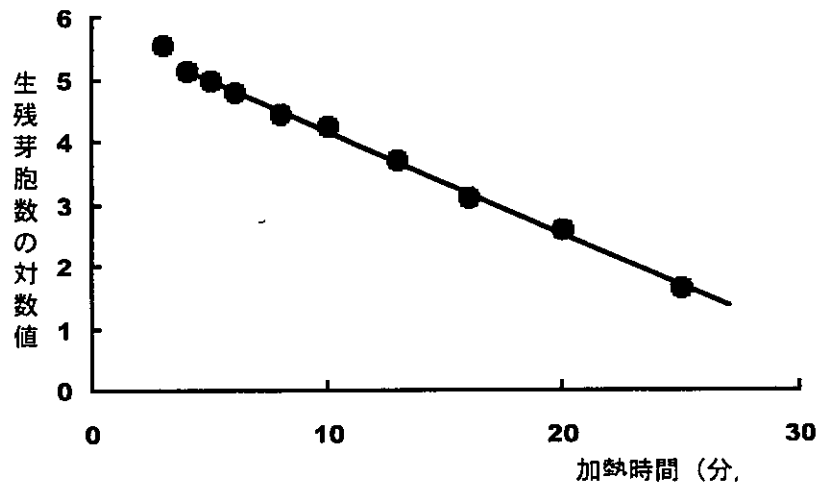


図5 菌株番号 Okra 株芽胞の 105°Cにおける  
M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 中での生残曲線

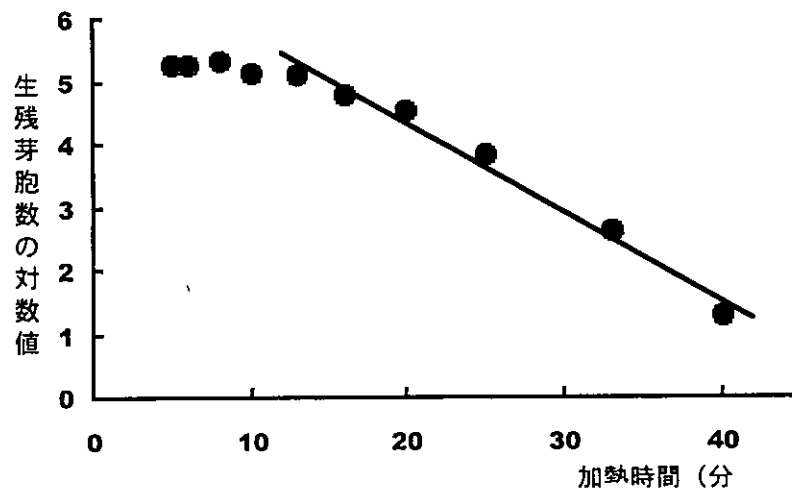


図6 菌株番号 PA3679 株芽胞の 115°Cにおける  
M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 中での生残曲線