

200401154A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小熊惠二

平成17（2005）年3月

様式B (5)

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

厚生労働省 発食安 第 122003 号

平成 17 年 3 月 31 日

厚生労働大臣 尾辻 秀久 殿

所在地 〒701-0211 岡山市東区82-45

フリガナ オヤマダ イカダ イカクイン インカクソゴウケンキョカ

法人名 岡山大学大学院医歯学総合研究科

フリガナ オグマ ケイジ

代表者名(職名) 小熊 惠二 (教授)

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金 (食品の安全性高度化推進研究事業) に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名 (課題番号) : 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
(H-14-食品・化学-004)

国庫補助金精算所要額 : 金 36,920,000 円也 (うち間接経費 4,920,000 円)

1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙 (別添1のとおり)
2. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次 (別添2のとおり)
3. 厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書 (別添3のとおり)
4. 厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (別添4のとおり)
5. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添5のとおり)
6. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況
(総括研究報告書、分担研究報告書の中に、書式に従って記入すること。)
7. 健康危険情報

目 次

I. 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
小熊 恵二

II. 分担研究報告

1. 林 賢一：菓子類へのボツリヌス菌芽胞添加試験並びに
野菜エキスの理化学的・細菌学的性状およびボツリヌス菌汚染調査
2. 堀川 和美：「ういろう」, 「くず餅」, 「きんつば」のボツリヌス菌芽胞添加実験
3. 浅尾 努：1. 香辛料のボツリヌス菌検査法の検討および汚染実態調査
2. 市販食品へのボツリヌス菌芽胞の接種試験
4. 甲斐 明美：輸入容器包装詰低酸性食品のボツリヌス菌汚染実態調査とボツリヌス芽胞接種試験
5. 石村 勝之：漬け物（古漬類）および生菓子（ゼリー）の理化学的・微生物学的試験
および接種培養試験
6. 小崎 俊司：ボツリヌス菌の性状の検討
7. 駒木 勝：ボツリヌス菌芽胞の性状の検討：培地および異なる容器包装詰食品における
発芽・増殖性について
8. 武士 甲一：スポロゲネス菌芽胞の性状の解析と毒素検出用イムノクロマト法の開発
9. 中野 宏幸：植物抽出液によるボツリヌス菌の増殖抑制試験および麺類等の接種培養実験
10. 春日 文子：いわゆるレトルト類似食品のボツリヌス食中毒に関するリスクプロファイル作成
ならびにその他の容器包装詰低酸性食品によるボツリヌス食中毒のリスク評価に
関する考え方

*追加試験報告書

駒木 勝、武士 甲一、林 賢一：無菌化包装米飯へのボツリヌス菌接種実験

III. インド出張報告・旅行記録書（詳細）

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

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のボツリヌス中毒に対するリスク評価を行うため、本年度は菓子類（水ようかん、ういろう、ゼリー菓子など）、漬け物、佃煮、煮豆、米飯など、および香辛料や調味料の一般細菌やボツリヌス菌による汚染状況の検査を行った。また必要に応じ、これら食品に対しボツリヌスI型菌（A型3株、B型2株）芽胞の添加実験を行った。その他、この芽胞添加実験用の菌株の再検討や、*C. sporogenes* PA3679がボツリヌス菌芽胞に代わって実験に使用できるか、容器包装材の違いがボツリヌス菌芽胞の増殖に影響を及ぼすかなどの検討も行った。これまでにボツリヌス菌により汚染されていたのは香辛料で、139検体中5検体より分離された（2検体からはD型菌が、各1検体からはそれぞれB, C, F型菌が分離された）。添加実験では、「プリン」や「蒸かし黒豆」では発芽・増殖が起き、高い毒素価が認められた。菌の性状の検討では、A型およびB型各5株は添加試験に使用可能と結論された。*C. sporogenes*については、芽胞の耐熱性や、「米飯」での添加実験での増殖性は良かったが、pH5.2で発育しなかったので問題があることが判明した。3種の食品について、3種の包装容器（アルミ容器、半透過性容器および透過性容器）を用いてボツリヌス菌芽胞の添加試験を行ったところ、容器包装の形態にはあまり関係なく、食品の種類によってボツリヌス菌の発育が起こることが推察された。さらに、簡便で迅速なボツリヌスA, B, E型毒素の検出法としてイムノクロマト法を開発した。発芽や毒素の安全な抑制（中和）物質の開発も行ったが、植物抽出液に該当するものが発見された。最後に、リスクアセスメントのために必要な情報を整理することを目的にレトルト類似食品を対象としたリスクプロファイルを作成した。

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）、中野宏幸（広島大学大学院生物圏科学研究科・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第三室長）、武士甲一（帯広畜産大学畜産学部獣医学科・教授）、甲斐明美（東京都健康安全センター・副参事）、林 賢一（滋賀県立衛生環境センター・次長）、堀川和美（福岡県保健環境研究所保健科学部病理細菌課・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）、駒木 勝（（社）日本缶詰協会研究所・次長）

A. 研究目的

私たちの班では、初年度は容器包装詰低酸性食品のうち、ガス置換後、100℃以上の加熱処理を行ったものを、昨年は100℃以下の加熱処理製品を中心に調査を行った。本年度は菓子類、漬け物、佃煮、煮豆、切り餅、米飯、および、香辛料や調味料の一般細菌やボツリヌス菌による汚染状況を検査した。また、食品のpHや水分活性（ A_w ）がそれぞれ4.6および0.94以上の時には、A型3株およびB型2株の計5株の芽胞を添加し、その発芽・増殖、毒素産生を検討した。この添加実験

には米国の方法に準じ、上記5株の中にはA-62A、B-213Bを加えたが、これらの菌は日本缶詰協会所有のものであり、再分与はできない。このようなこともあり、大阪府立大学などが所有する分与可能な菌の性状を調べ、添加実験に使用可能かを検討した。また、*C. sporogenes* PA3679がI群菌の代用になるかも検討した。

包装容器の菌増殖への影響をみるため、3種類の食品を気体透過性の異なる3種類の容器に入れ、添加実験を行った。

食品中の微量のA、B、E型の各毒素を短時間で感度および特異性ともに良い状態で検出できる方法として、イムノクロマト法を開発した。さらには、芽胞の発芽・増殖を抑制する、あるいは、毒素を不活化する安全な植物抽出液の開発を試みた。

B. 研究方法

1. 菌株

添加実験には昨年と同様にI群（group I）に属するA型3株；62A（ATCC7948）、62A（NFPA）、36A、B型2株；213B、Okra,を用いた。将来、分与可能な菌で、添加実験に使用できる菌の選定ということで、A型5株；62A（大阪府立大）、Renkon、33A、36A、CB21, およびB型5株；Okra、67B、407、Ging

er, 326, の芽胞の耐熱性、異なるpHやAwでの発芽・増殖性や毒素産生を検討した。

2. 検体

市販の「ういろう」19品目と「漬け物」59品目を購入し、pHやAwおよび細菌による汚染を調査した（その他、「ゼリー」25品目のpHとAwを測定）。また、業者より直接購入あるいは無償で提供していただいた商品を用い、芽胞の添加実験を行った（表1）。さらには業者や日本エキス調味料協会より頂いた139検体の香辛料や52検体の野菜エキスの汚染調査を行った。

3. 検査項目

各商品のpH、Awをそれぞれのメーターを用いて測定した。一般細菌による汚染は、標準寒天培地を用いて好気性培養法により、クロストリジアによる汚染は、クロストリジア測定用培地を用いてパウチ法で測定した。一部のクロストリジアの菌種の同定を、キットを用いた16SrRNA配列の決定により行った。ボツリヌス毒素産生の有無は、検体の遠心上清をマウスに接種することにより、また、毒素の型およびその価（タイター）の決定は、抗毒素抗体を用いた中和試験とELISA法などにより行った。芽胞の添加実験は以下のように行った。日本缶詰協会で、上述のA型3株、B型2株の混合液を80℃、20分加熱後、長い注射針を用いて各検体に接種した。シール後、これら検体を各施設で30℃で培養し、ガス膨張が認められたものはその時点で菌と毒素の検査を、認められなかったものは数十日間培養した後、同様の検査を行った。

4. 包装容器の影響の検討

1) 完全密封、遮光性の不透明パウチ、2) 気体透過性の低い透明パウチ、3) 気体透過性の高い透明パウチの3種類を用いて、包装容器のボツリヌス芽胞の発芽・増殖性に及ぼす影響を検討した。市販のマグロ水煮缶詰、スイートコーン水煮缶詰、およびカレーパウチ詰を購入し、これら内容物を上記3種類の容器に無菌的に移した。これら試料に、ボツリヌスあるいはスポロゲネス菌の芽胞を接種後、80℃、20分加熱し、30℃で保存した。保存中にガス産生により膨張したものはその時点で、しなかったものは30、60、90日目に菌の増殖の有無を検査した。

5. イムノクロマト法の開発

A、B、E型毒素の神経毒素の重鎖部分（C端側約10万）を大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質として合成し、家兎を免疫し、高力価の抗体を作製した。E型では充分な力価の抗体が得られたので、これと、米国製のA、B型抗毒素家兎血清を用いて、イムノクロマトシステムを開発した。

（倫理面への配慮）

使用したマウスには、できる限り苦痛を与えない

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、各施設の病原体等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121℃で30分間オートクレーブにより処理した。

C. 研究結果

1. 汚染調査

市販の「ういろう」と漬け物の細菌汚染調査をしたところ、両者とも一部の商品は一般細菌に、また、前者は好気性芽胞菌に、後者は菌数は非常に少ないが各種のクロストリジウムに汚染されていた。野菜エキスと香辛料も汚染が認められた。特に後者では嫌気性芽胞菌のみならず、139検体中5検体ではボツリヌス菌により汚染されていた（D型2検体、B、C、F型が各1検体）。前者では、嫌気性菌や好気性芽胞形成菌が認められた。

2. 添加実験

pHが4.6、Awが0.94以上の商品を用い芽胞の添加実験を行ったところ、表1に示したように、「蒸かし黒豆」と「カスタードプディング（プリン）」でボツリヌス芽胞の発芽・増殖が認められた。

表1 添加実験；芽胞の発芽・増殖の有無

有	無
蒸かし黒豆	ういろう、くず餅、蒸しきんづば、切り餅、しょうゆ漬物、コーヒーゼリー、ゆで日本そば、水ようかん
カスタードプディング	

3. 菌の性状検査

A型5株、B型5株を用いて、芽胞の耐熱性、異なるpHやAwでの発芽・増殖性や毒素産生性を検討したところ、多少の差はあるがいずれの株もI型菌としての特徴を持ち、添加実験に使用できるものであることが判明した。同様にスポロゲネス菌も調査したところ、pH6.0では良い増殖を示したが、pH5.2以下ではあまり増殖しなかった。他方、米飯にボツリヌス菌とスポロゲネス菌の芽胞（ 10^2 と 10^4 個/g）をそれぞれ添加した時は、ボツリヌス芽胞は 10^4 個/gの時のみ増殖したが、スポロゲネス菌では 10^2 個/gでも増殖した。

4. 異なる包装容器での増殖性

3種の包装容器（A、アルミ容器；B、半透過性容器；C、透過性容器）と、市販のマグロ水煮缶、スイートコーン水煮缶、カレーパウチ詰を用いて、ボツリヌス菌とスポロゲネス菌芽胞の増殖性を検討したところ、表2のような結果を得た。

表2 供試試料中におけるボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の恒温放置中での発育状況*

供試食品	接種菌	パウチの種類		
		A	B	C
マグロ水煮	ボツリヌス菌	+	+	+
	スポロゲネス菌	+	+	+
スイートコーン水煮	ボツリヌス菌	+	+	-*
	スポロゲネス菌	+	+	-
カレー	ボツリヌス菌	+	+	+
	スポロゲネス菌	+	+	+

*+, 発育陽性; -, 発育陰性 (30℃で最長90日間放置)

5. イムノクロマト法の開発

A、B、E型毒素を20分以内に検出できる、金コロイド標識抗体を用いたイムノクロマト法を開発した。特異性も高く、A型、B型、E型の検出感度もそれぞれ2μg/ml(10MLD/ml)、2.5μg/ml(25MLD/ml)、20μg/ml(200MLD/ml)であった。

6. 植物抽出エキスによる中毒の予防

セントジョーンズワート (SJW)、カレープランツ (CP) のエタノール抽出液、および、ユーカリと黄連の熱水抽出液は、0.1~0.5%の濃度で芽胞の発芽・増殖を阻止した。また、SJWとCPは亜硝酸ナトリウムと併用効果を示した。他方、カテキン>ダイオウ≧ケイヒ、マオウは、この順で、A~F型の神経毒素やprogenitor toxin (12S, 16S, 19S毒素)を不活化することを認めた。

7. リスクプロファイルの作成

近い将来、食品安全委員会に対し、容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に関する健康影響評価を諮問することを想定し、厚生労働省が準備すべき科学的資料として、レトルト類似食品を対象としたリスクプロファイル作成を行なった。

D. 考察

今回は菓子類や漬物、佃煮、煮豆、切り餅、米飯などの食品、および香辛料と野菜エキスを調査した。加熱のあまりされていない漬物や「ういろう」、それに野菜エキスや香辛料は細菌汚染が認められたが、漬物からは細菌が分離されて当然であると思われる。特に香辛料からはボツリヌス菌芽胞が検出され、その危険性が確認された。芽胞添加実験では、「カスタードプディング」と「蒸かし黒豆」のみで発芽・増殖が起きたが、他の食品では陰性であった。これは、栄養や物理的条件の他、食品中の添加物質(例えばグリシン)の影響なども考えられた。「カスタードプディング」と「蒸かし黒豆」については、汚染実態調査ではボツリヌス菌は陰性であるので、現時点でのリスクは低いと考えられる。A型、B型各5株の芽胞の性状を調べたところ、多少の差は認められたが、いずれも添加実験には使用可能であることが判明した。

スポロゲネス菌がI型菌の代用になるかを検討したところ、米飯の添加 (pH 6.9) ではボツリヌス菌

以上に増殖したが、pH5.2以下の培地では増殖しなかった。通常、I群菌はpH4.6以上で増殖するので、本菌を代替株として利用するには問題があることが判明した。この点に関し、今後、他のスポロゲネス菌を用いて検討する予定である。包装容器の異なりによる芽胞の発芽・増殖への影響を検討したところ、空気透過性のある容器で、食品の種類により増殖性の有無が別れた。従って、嫌気度と伴にその他の因子も重要であることが判明した。微量の毒素を簡単に検出するイムノクロマト法の開発に成功し、さらには、芽胞の発芽・増殖を抑制する、あるいは、毒素の中和効果を示す安全な植物抽出液を発見したので、これらを用いて中毒の診断、予防、治療への応用を試みる予定である。

その他、リスクプロファイルとして、本研究班の成果以外の科学的知見も含めて整理したことにより、健康影響評価の目的と範囲、対象食品、現時点のマネジメント体制、そして食品安全委員会に回答を求める質問事項及び解析を希望する事項を明確にした。

E. 結論

- 菓子類、漬物、佃煮、煮豆、米飯、餅、日本そばなどで添加実験をしたところ、「蒸かし黒豆」と「カスタードプディング」のみで発芽・増殖が認められた。
- 香辛料139検体中5検体からボツリヌス菌が分離された。
- A型、B型各5株の芽胞の性状を調べたところ、いずれもI型菌の性状を示し、添加実験には使用可能であった。
- C. sporogenes* PA3679がI群菌の代替えに使用できるかを検討したところ、pH5.2以下で増殖しなかったため、この点が問題であることが判明した。
- 遮閉された容器包装のみならず、気体透過性のある容器でも、食材によっては、ボツリヌス芽胞は発芽・増殖することが認められた。
- 微量のA、B、E型毒素を簡単に、感度および特異性高く検査できるイムノクロマト法を開発した。
- 芽胞の発芽・増殖を抑制、あるいは、毒性を中和する幾つかの「植物エキス」を発見した。
- レトルト類似食品を対象としたリスクプロファイルを作成した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Fujinaga Y, Inoue K, Watarai S, Sakaguchi Y, Arimitsu H, Lee J, Jin Y,

- Matsumura T, Kabumoto Y, Watana be T, Ohyama T, Nishikawa A, and Oguma K. Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. Microbiol. 150: 1529-1538, 2004.
- 2) Arimitsu H, Lee J, Sakaguchi Y, Hayakawa Y, Hayashi M, Nakaura M, Takai H, Lin SN, Mukamoto M, Murphy T, and Oguma K. Vaccination with recombinant whole heavy chain fragments of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11: 496-502, 2004.
 - 3) Nishikawa A, Uotsu N, Miura Y, Arimitsu H, Lee J, Fujinaga Y, Nakada H, Ohyama T, Sakano Y, and Oguma K. The receptor and transporter for internalization of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin into HT-29 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 319: 327-333, 2004.
 - 4) Hasegawa K, Watanabe T, Sato H, Sagane Y, Mutoh S, Suzuki T, Yamano A, Kouguchi H, Takeshi K, Kamaguchi A, Fujinaga Y, Oguma K, and Ohyama T. Characterization of toxin complex produced by a unique strain of *Clostridium botulinum* serotype D 4947. Protein J. 23: 371-8, 2004.

2. 学会発表

- 1) 小林敬子、萩山桐子、永浜政博、阪口義彦、小熊恵二、櫻井純. ボツリヌス菌C2毒素の細胞に対する結合と作用 第77回総会, 大阪, 日本細菌学雑誌, 59 (1) (2004)
- 2) 藤永由佳子、株本祐子、金英姫、松村拓大、李在哲、阪口義彦、小熊恵二. ボツリヌスB型神経毒素複合体の腸管上皮細胞バリア通過機構について 第77回総会, 大阪, 日本細菌学雑誌, 59 (1) (2004)
- 3) 松村拓大、藤永由佳子、株本祐子、金英姫、李在哲、阪口義彦、小熊恵二. ボツリヌスB型神経毒素複合体の腸管上皮細胞結合に対する分泌型IgA(SIgA)の阻害作用 第77回総会, 大阪, 日本細菌学雑誌, 59 (1) (2004)
- 4) 李在哲、横田憲治、崔錦花、有満秀幸、阪口義彦、藤永由佳子、金英姫、松村拓大、株本祐子、小熊恵二. ボツリ

ヌスB型神経毒素に結合している無毒成分の免疫増強作用について 第77回総会, 大阪, 日本細菌学雑誌, 59 (1) (2004)

- 5) 小熊恵二、藤永由佳子、李在哲、有満秀幸、西河淳、松村拓大、金英姫、阪口義彦、株本祐子、崔錦花. ボツリヌス菌の産生するprogenitor toxinの構造と機能 第51回毒素シンポジウムハウステンボス(長崎) (2004.7.7.~9)
- 6) 李在哲、横田憲治、黄賢正、阪口義彦、藤永由佳子、崔錦花、金英姫、松村拓大、株本祐子、小熊恵二. ボツリヌスB型神経毒素に結合している無毒成分の免疫増強作用について 第57回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2004) 広島

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

*植物抽出液の抗菌活性に関して日本の特許を申請中。

2. 実用新案登録

3. その他

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

菓子類へのボツリヌス菌芽胞添加試験並びに

野菜エキスの理化学的・細菌学的性状およびボツリヌス菌汚染調査

分担研究者	林 賢一	滋賀県立衛生環境センター	次長
研究協力者	井上朋宏	滋賀県立衛生環境センター	微生物担当
研究協力者	石川和彦	滋賀県立衛生環境センター	微生物担当
研究協力者	古田世子	滋賀県立衛生環境センター	微生物担当
研究協力者	川端彰範	滋賀県立衛生環境センター	微生物担当

研究要旨

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の対象品として、常温流通品の菓子類（水ようかん）についてボツリヌス菌の添加試験を行った。その結果、90 日間の保管期間中に容器の膨張はみられず、接種したボツリヌス菌もほぼ接種菌量の状態で検出され、すべてのボツリヌス菌接種群においてボツリヌス毒素の産生は認められなかった。一方、昨年度に引き続き、野菜エキス 52 件（形状別では、ペースト状 32 件、粉末 11 件および液状 9 件）について一般性状とともにボツリヌス菌の汚染について調べた。pH は 2.7（液状）～6.2（ペースト状）、水分活性は 0.25（粉末）～0.95（液状）と幅広い性状を示した。また、ボツリヌス菌は検出されなかったが、嫌気性菌の検出例は 5 件あり、一般生菌数および好気性芽胞菌も多くの検体に認められ、野菜エキスの形状を問わず細菌汚染を受けていることがわかった。

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を行うにあたり、容器包装詰食品のうち常温流通している菓子類についてボツリヌス食中毒のリスク評価を行うことは重要であるので、市販されている水ようかんについてボツリヌス菌の接種試験を行うこととした。また、ボツリヌス食中毒予防のために、種々の食品に使用されている野菜エキスについて一般性状を調べるとともにボツリヌス菌の汚染調査を行うこととした。

B. 研究方法

1. ボツリヌス菌芽胞添加試験

(1) 供試品

A 社から提供を受けた常温流通している水ようかん（写真 1）を供試品とした。

(2) 試験方法

1) 理化学的試験

①水分活性：水分活性 (A_w) は、水分活性測定装置（ロトロニック製 HYGRO-LAB）を用いて測定した。

②pH：pH は、試料に等量の精製水を加え、十分に混釈した後、pH メーター（HORIBA 製、EX20）を用いて測定した。

2) 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（日水製薬製）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（日水製）を用いた。

③ボツリヌス毒素抗血清：ボツリヌス毒素抗血清は千葉葉血清研究所製造品の A 型および B 型を用いた。

④マウス：ボツリヌス毒素の検出には、ddY 系マウス（雄、体重 約 20g）を用いた。

3) ボツリヌス菌芽胞液および芽胞添加食品の調整

①供試菌株：Clostridium botulinum A 型株 3 株；62A

(ATCC7948)、62A (NFPA) および 36A 並びに B 型 2 株 ; 213B および B-Okra の計 5 株を用いた。

②芽胞液の調整：芽胞液は、北海道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て用いた。すなわち、混合芽胞液を 9.0×10^7 CFU/ml に希釈し、その 20 μ l を接種菌液として使用した。

③供試食品へのポツリヌス菌芽胞の接種および対照試料の作製 (写真 2)：検体 33 個の外側をアルコールでよく拭き、ゴムシート ((株) サン科学製) を貼った。その上から芽胞液 20 μ l を注射器で接種し、接種後直ちに同じゴムシートを貼った。芽胞液は接種前に 80℃ 20 分間加熱した。また、陰性対照として検体 6 個に同様の方法で滅菌蒸留水を接種した。別の 3 袋はそのまま保存試験に供試した。以上の接種操作については、

(社) 日本缶詰協会研究所で行い、接種後直ちに滋賀県立衛生環境センターに持ち帰り保存試験を行った。

4) 保存試験

保存試験には、ポツリヌス菌芽胞および滅菌蒸留水を接種した検体とともに、未処理の試料 3 検体についても行った。保存試験については 30℃の孵卵器内で行い、保存後毎日ポツリヌス菌等の発育によるガス発生 (容器の膨張) の有無を観察した。保存期間中に膨張が認められた検体については直ちに 4℃で保存後、以下の方法により嫌気性菌数、一般生菌数およびマウスに対する毒性を調べた。なお、保存期間としてはメーカー賞味期限の 1.5 倍にあたる 90 日間と設定し、保存試験終了後すべての検体について同様の方法により調べた。①試料原液の作製：試料の全量を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、等重量の滅菌精製水を加え、ストマッカーで混和し、これを試料原液(検体の 2 倍希釈液)とした。

②一般生菌数の測定：上記試料原液 4ml を滅菌ペプトン加生理食塩水 16ml に加え 10 倍希釈液を作製した後、滅菌ペプトン加生理食塩水 9ml で 10 倍段階希釈液を作製した。これらの希釈液 1ml ずつを 2 枚の滅菌ポリシャーレにとり、標準寒天培地 15ml を加えよく混和し、培地を固化させた。さらに同培地 10ml を重層し、固化・乾燥後、36℃で 48 \pm 3 時間培養後、コロニー数を計数し 1g あたりの生菌数を算出した。陰性対照として、検体の希釈に用いた精製水、ペプトン加生理食塩水 1ml ずつを各々 2 枚の滅菌ポリシャーレ

に入れ、試料の場合と同様に培養した。また、培地の陰性対照も同様に作製した。

③嫌気生菌数の測定：一般生菌数の測定時に作成した試料希釈液を使用した。滅菌パウチ (酒見医科機械製) に、加熱溶解し、50℃に保温しておいたクロストリジア寒天培地 15ml と試料希釈液 1ml を加えてよく混和した後、冷却・固化させた。各希釈段階に 2 枚のパウチを用いた。これらは 37℃で 1~5 日間培養し、黒色集落を計測し、1g あたりの嫌気性菌数を算出した。なお、嫌気性菌数の測定値をポツリヌス菌数とした。

④ポツリヌス毒素の検出

a. マウス毒性試験：試料原液はマウス毒性試験に供するまで、-20℃で保存した。冷凍した試料は解凍後、4℃下で 3,000rpm 20 分間遠心分離し、上清 0.5ml ずつを 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、ポ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。マウスが死亡した場合、マウス毒性陽性として、ポツリヌス毒素の確認試験を行った。

b. ポツリヌス毒素の確認試験：マウス毒性試験の結果、ポツリヌス特有の症状を示してマウスが死亡した場合は A 型ポツリヌス抗毒素および B 型ポツリヌス抗毒素を用いて中和試験を行い毒素型の確認を行った。中和試験は、試料原液と 4 IU に滅菌生理食塩水で希釈したポツリヌス毒素抗血清を等量混合し、37℃で 30 分間恒温後、その 0.5ml ずつを 2 匹のマウスに注射した (抗血清はマウスあたり 1~2IU)。同時に、試料原液を 100℃10 分加熱し、0.5ml ずつを 2 匹のマウスに注射した。加熱処理によりマウスに対する毒性が失活し、かつ A 型あるいは B 型、または両方の抗毒素血清によって中和された場合、ポツリヌス毒素陽性とした。

5) 倫理面への配慮と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ないよう配慮し実験を行った。ポツリヌス菌の取り扱い、移動、試験操作および保管等は、滋賀県立衛生環境センター病原体等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 121℃で 30 分間オートクレーブにより処理した。

2 野菜エキスのポツリヌス菌汚染調査

(1) 供試品

日本エキス調味料協会から提供された 52 検体（ペースト状 32 検体、粉末状 11 検体および液状 9 検体）を用いた（写真 3）。品目別では 16 品目（52 検体）で、オニオン（9）、キャロット（7）、シイタケ（6）、ガーリック（5）、キャベツ（5）、ハクサイ（4）、ネギ（3）、セロリ（2）、マッシュルーム（2）、ジンジャー（2）、トマト（2）、サンザシ（1）、パセリ（1）、パンプキン（1）、ゴボウ（1）およびヤサイブイヨン（1）で、供試するまでメーカーで通常行っている方法により保管した。

(2) 試験方法

試験手順の概要を図 1 に示し、以下に詳細について記載した。

1) 理化学的試験

①水分活性：1(2)1)①と同じ方法によって行った。

②pH：1(2)1)②と同じ方法により行った。

2) 培地および試薬

①クロストリジア測定用培地：1(2)2)①と同じ製品を用いた。

②標準寒天培地：1(2)2)②と同じ製品を用いた。

③ボツリヌス毒素抗血清：1(2)2)③と同じ製品で、A～F 型のボツリヌス抗毒素を用いた。

④マウス：1(2)2)④と同じマウスを用いた。

3) 試料原液の作製

ストマフィルターに供試品 50 g と等量の滅菌精製水を加え、1 分間ストマッキングし、試料原液（2 倍希釈液）を作製した。なお、供試品が 50g に満たない場合には全量を供試した。

4) 細菌学的試験

①一般生菌数の測定：試料原液を滅菌 0.1%ペプトン加生理食塩水を用いて 10 倍段階希釈液を作製し、滅菌した標準寒天培地（日水製）を用いて混釈し、同培地を重層し固めた後、36℃で 48 時間培養後に菌数を測定した。

②好気性芽胞菌数の測定：10 倍段階希釈液を 65℃で 20 分間加熱し、標準寒天培地（日水製）を用いて混釈し、同培地を重層し固めた後、36℃で 48 時間培養後に菌数を測定した。

③嫌気性菌数の測定：10 倍段階希釈液を 65℃で 20 分間加熱し、加熱試料とともにクロストリジウム培地（日水製）をパウチに入れ混釈し、同培地を固めた後、36℃で 2～5 日間培養後に菌数を測定した。

5) ボツリヌス菌の検出

以下の方法により、供試品の抽出液を増菌培養し、培養上清からのボツリヌス毒素を検索し、ボツリヌス毒素が検出された場合、ボツリヌス菌陽性とした。

①増菌培養：試料原液（2 倍希釈液）を遠心管に入れ 3,000rpm で 30 分間遠心分離し、沈渣に滅菌した 0.1%ペプトン加生理食塩水 50ml を加え、同様に遠心分離した。同様の操作を 2 回繰り返す行い、沈渣に含まれている可能性のあるボツリヌス菌発育阻止物質の除去を目的とした洗浄を行った。その後、沈渣に滅菌した 0.1%ペプトン加生理食塩水を加えて浮遊させ、全量が 4ml になるように調整した。その 2ml を試験管にとり 65℃で 20 分間加熱し、非加熱の浮遊液とも各々 1ml ずつ 0.3%ブドウ糖・0.2%可溶性澱粉を加えたクックドミート培地（Difco 製、12ml）に入れ、30℃で 7 日間嫌気培養した。

②マウス毒性試験：試験管ごとの培養液を、4℃下で 3,000 rpm で 20 分間遠心分離した。その上清に等量の 0.2%トリプシン（Difco 製）加ゼラチン緩衝液（pH6.2）を加えよく混合した後、37℃で 30 分間処理し、その 0.5ml ずつを 2 匹のマウスの腹腔内に接種した。接種後 5 日間マウスの生死を観察した。

③ボツリヌス毒素の確認試験：マウスがボツリヌス毒素による特有の症状を呈し死亡した場合、1(2)4)④b の方法によりボツリヌス毒素であることの確認を行った。なお、ボツリヌス抗毒素血清については A～F 型までを使用した。

6) 倫理面への配慮と試験操作上の留意点

1(2)5)と同様により行った。

C. 研究結果

1. 水ようかんへのボツリヌス菌添加試験成績

水ようかんへのボツリヌス菌の添加試験成績をまとめて表 1 に示す。

(1) 供試品の成分

製造メーカーから提供された情報によると、原料として、小豆、グラニュー糖、粉末寒天のほかにグリシン（ $\text{COOH-CH}_2\text{NH}_2$ ）も使用していた。また、加熱殺菌工程としては各成分を溶解するための加熱のほか、包装チューブに充填後に、90℃で 20 分間加熱されていた。

(2) 保存試験開始直後の性状

1) pH および水分活性

供試品 3 検体 (M-46~48) について pH および水分活性を調べた結果、pH は 6.4~6.5、水分活性は 0.98 以上であった。pH はポツリヌス菌芽胞添加群 (M-31~33) および陰性対照群 (M-34~36) でも同様の性状であった。

2) 細菌試験

未処理群 (M-40~42)、陰性対照群 (M-34~36) およ、ポツリヌス菌芽胞接種群 (M-31~33) にかかわらず、一般生菌数はすべて 10CFU/g 未満であった。なお、ポツリヌス菌芽胞接種群のポツリヌス菌数は $4.1 \times 10^4 \sim 4.9 \times 10^4$ CFU/g であった。

(3) 保存試験成績

90 日間の保存期間中に、ポツリヌス菌芽胞添加群 30 検体、陰性対照群 3 検体および未開封群 3 検体ともガス発生等による膨張は認められず、ポツリヌス毒素はいずれの検体からも検出されなかった。ポツリヌス菌数を調べたところ、ポツリヌス菌芽胞接種群からは $3.3 \times 10^4 \sim 6.4 \times 10^4$ CFU/g の菌数で、ほぼ接種菌量相当が検出された。しかし、陰性対照群および未開封群からは検出されなかった。なお、一般生菌数はすべての群で 10CFU 未満/g、pH は 6.3~6.5 であった。

2. 野菜エキスのポツリヌス菌汚染調査成績

供試品の概要を表 2 に、試験成績を表 3 に示す。

(1) 供試品の概況

供試した 52 検体 (16 品目 50 ロット) の原産地は中国 37 検体、日本 13 検体およびチリ 2 検体であった。このうち、2 検体 (No.51 および 52) についてはそれぞれ No.34 と No.35 と同一ロット品であり、再送付品として供試した。なお、製品の製造所については、日本エキス調味料協会によると二次加工品も含めて国内であるという。

加工工程は多くの検体は減圧濃縮であり、加熱工程は 90°C20 分間など様々であったが、すべての検体で加熱処理されていた。保管条検体は粉末状ではすべて常温保管とされ、液状では冷蔵保管品と冷凍保管品、ペースト状では常温のほか、冷蔵、冷凍品とされていた。なお、1 検体 (No.9) のみ供試時に賞味期限が切れていた検体があった。保管方法の指示については、ペースト状では冷蔵あるいは冷暗所保管を指示している検体は 19 検体、冷凍保管は 9 検体および常温保管は 4 検体であった。粉末状ではすべて常温保管、液状

では冷蔵 6 検体および冷凍は 3 検体であった。

(2) pH および水分活性

供試食品 52 検体の pH および水分活性は、ペースト状 (32 検体) では pH は 4.0~6.1、水分活性は 0.69~0.93、粉状 (11 検体) では pH は 4.3~5.9、水分活性は 0.25~0.32、および液状 (9 検体) では pH は 2.7~6.1、水分活性は 0.83~0.95 であった。再供試品の 2 検体 (No.51 および 52) はそれぞれ pH も水分活性もロットごとに同じ成績であった。

(3) 一般生菌数、好気性芽胞菌数、嫌気性菌数およびポツリヌス菌の検索

供試食品 52 検体すべてからポツリヌス菌は検出されなかった。しかし、52 検体中 34 検体 (65%) に細菌汚染が認められた。項目別でみると、一般生菌数はペースト状では 32 検体中 27 検体 (78%) に $1.0 \times 10^1 \sim 2.6 \times 10^5$ CFU/g の菌数で検出された。これらの一般生菌数の菌数はほとんどの検体で好気性芽胞菌数と同様であったが、両者の菌数に大きな違いのある検体 (No.35) も認められた。これらのうち再送付品 2 検体 (No.51 および 52) では、一般生菌数は No.51 で約 20 倍弱、No.52 で約 2,000 倍強少なくなっていた。

粉末状では 11 検体中 5 (45%) 検体から一般生菌数が $2.0 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^2$ CFU/g 検出された。また、液状では 9 検体中 2 検体 (22%) から一般生菌数が $1.0 \times 10^1 \sim 3.0 \times 10^1$ CFU/g 検出された。なお、嫌気生菌は殆どがペースト状の供試品から検出され、検出率は 52 検体中 5 検体 (10%)、菌数は $1.0 \times 10^1 \sim 1.3 \times 10^3$ CFU/g であった。

D. 考察

食品・添加物の規格基準が定められている容器包装詰加圧加熱殺菌食品 (120°C、4 分以上の加熱を必要とする) のほかに、十分な加熱処理がされていないにもかかわらず、食品衛生法の規制を受けずに常温で販売されている容器包装詰食品が多く製造・販売されている。菓子類にも同様の食品が製造されていることから、今回は市販の水ようかんについてポツリヌス菌の添加試験を行った。

その結果、ポツリヌス菌芽胞接種群のほか、陰性対照および未開封群ともにポツリヌス毒素は検出されず、ポツリヌス菌芽胞を添加した 30 検体では添加相当菌数が残存していた。したがって、この供試品中ではポツリヌス菌芽胞は発芽・増殖は起こらなかったことと

考える。この製品のpHは6.3~6.5を示していたこと、水分活性も0.98以上を示しており、これらの理化学的性状はボツリヌス菌芽胞が発育するためには十分である。しかし、製品中には食品成分のほか、グリシンも添加されており、グリシンがボツリヌス菌芽胞の発芽・増殖に影響した可能性もある。食品衛生法ではグリシンは強化剤あるいは調味料として使用可能であるが、使用量の基準はない。一方、グリシンは別名アミノ酢酸、グリココールともいわれ、核酸系調味料、グルタミン酸ソーダ、有機酸、食品などとの併用による呈味増強効果、pHの変化などを緩和する緩衝効果などの効能のほか、抗菌効果もあるといわれている。また、ボツリヌス菌の発育に対しては、A型、B型ボツリヌス菌を用いた発育試験において、菌株によっては発育が阻害されたという(Hutanen, C.M., 1979)。ボツリヌス菌の発育にはpH、水分活性、添加物のほか、酸化還元電位等も影響するので、一概にはいえないがグリシンによる影響も否定はできないと考える。

ボツリヌス菌芽胞添加試験とは別に、昨年度に引き続き、各加工食品に広く使用されている調味料素材である野菜エキスのボツリヌス菌汚染について追加して調査した。

供試品はその形状から、ペースト状、粉末状および液状に別けられ、それぞれ32検体、11検体および9検体、計52検体供試した。

ボツリヌス菌は形状を問わずすべての検体から検出されなかった。しかし、好気性芽胞菌などの細菌汚染は多くの検体に認められ、加工工程中の加熱条件では死滅されない細菌が残存していることが明らかになった。

理化学試験の結果をみると、pHは食品素材によって大きく異なっていたが、水分活性は粉末では0.25~0.32であり、細菌のみならず真菌の発育も困難である。しかし、ペースト状や液状では水分活性は0.69~0.95であった検体も見られ、保管の状態によっては細菌の増殖も可能となるので、その取扱いには慎重を期す必要があると考える。また、ボツリヌス菌は元来土壌由来菌であり、中国、日本を含む世界中に分布していること、今回の調査によって好気性芽胞菌以外にも嫌気性菌が検出された検体もあることから、野菜エキスを加工食品に使用する場合には、ボツリヌス菌汚染の可能性を考慮した対応が必要であると考えられる。

E. 結論

1. 容器包装詰菓子類である水ようかんについてボツリヌス菌芽胞の添加試験を行ったところ、ボツリヌス菌芽胞添加群30検体中でボツリヌス菌の発芽・増殖は起こらず、ボツリヌス毒素は産生されなかった。食品の原料として小豆、寒天、グラニュー糖のほかグリシンも使用されていたことから、グリシンによるボツリヌス菌芽胞の発芽・増殖の阻害があった可能性も考えられた。

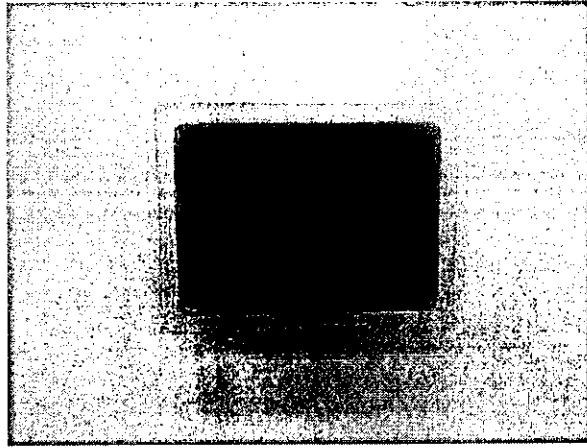
2. 野菜エキス16品目50ロット52検体について、ボツリヌス菌のほか、pH、水分活性、一般生菌数、好気性芽胞菌数および嫌気性菌数について調べた。その結果、52検体中34検体(65%)に細菌汚染が認められ、5検体(10%)では嫌気性菌も検出された。嫌気性菌が検出されたことは、ボツリヌス菌の汚染が危惧され、これらの製品については今後も広い加工食品に利用されていく可能性があることから、食品素材として使用する場合にはボツリヌス菌汚染の可能性を考慮した対応が必要であると考えられた。

F. 研究発表

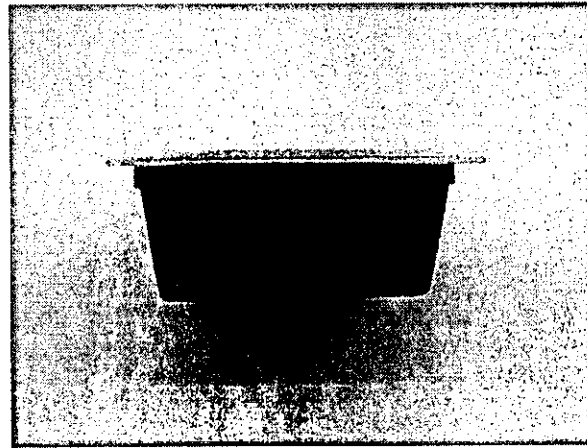
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

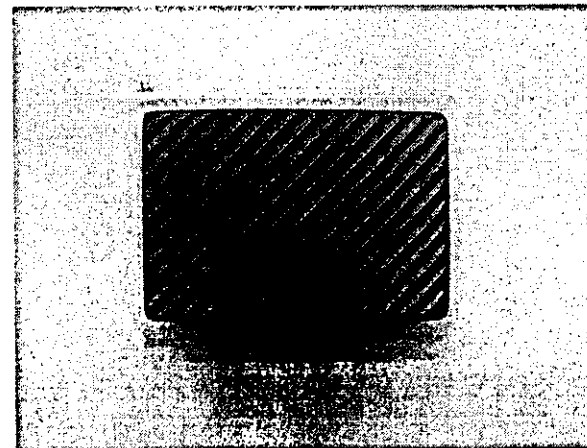
なし



上部

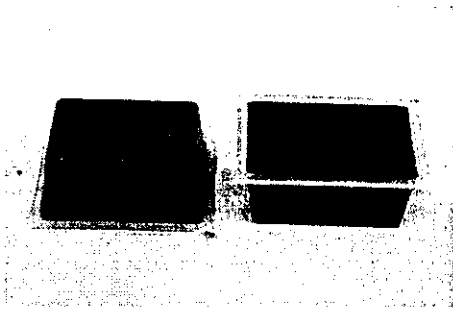


側面

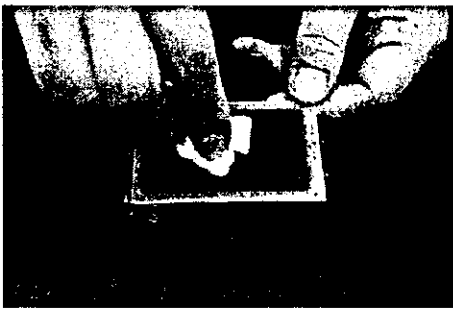


裏面

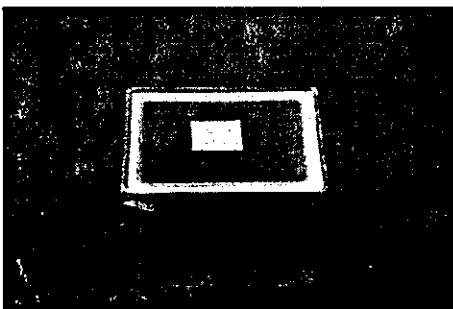
写真1 水ようかん



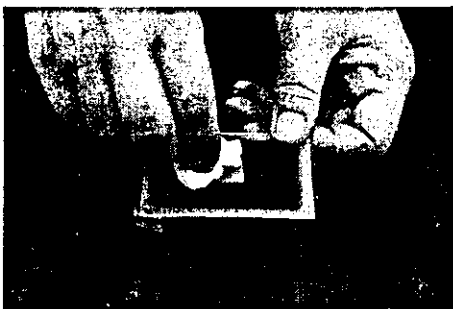
①供試品 (水ようかん)



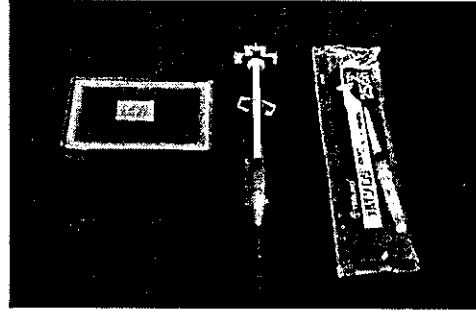
②アルコール綿で消毒



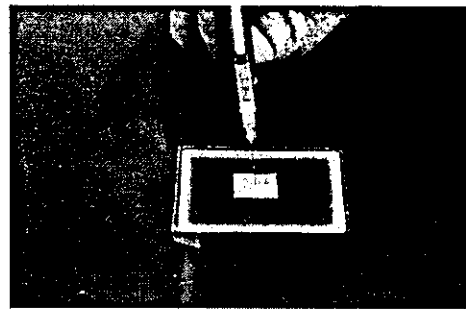
③ゴムシート貼付



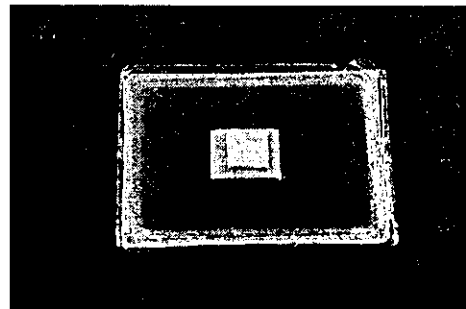
④アルコール綿で消毒



⑤接種試験の準備

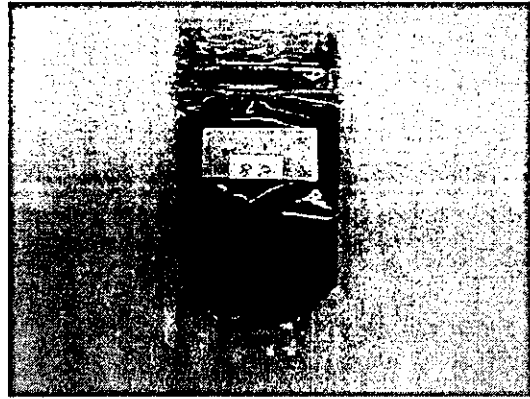
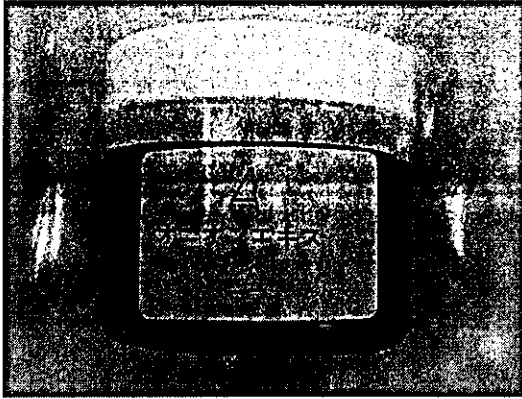


⑥ボツリヌス菌芽胞の接種

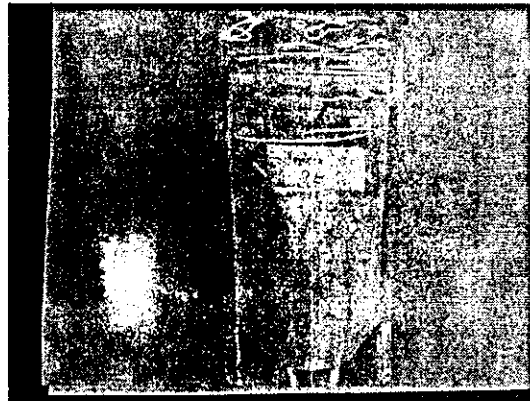
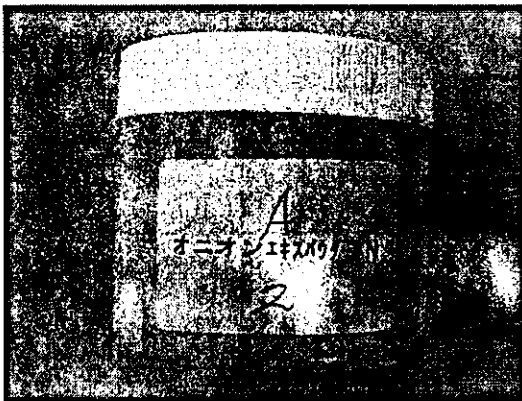


⑦接種部位にゴムシートを貼付

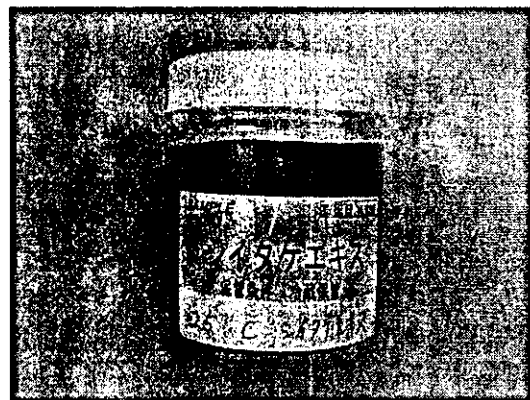
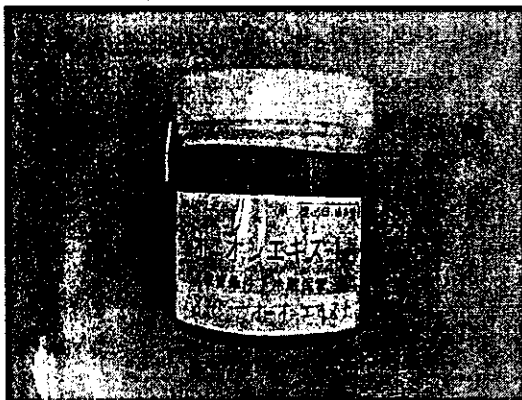
写真2 ボツリヌス菌芽胞の接種方法



ペースト状



粉末状



液状

写真3 野菜エキス供試品の形状

No	サンプル名	原料産地	加熱条件	加工工程	溶解性	製造年月日	賞味期間	形状	検量日	検量値 (g)	pH	水分活性	SPC(cfu/g)	標準 (cfu/g)	CLT(cfu/g)	水ツリヌス菌
1	A-オニオンH	中国	約95℃、30分	減圧乾燥	水溶性	2004.3	常温、1ヶ月	ペースト	9.14	126.3	4.57	0.80	960	540	10未満	-
2	A-オニオンエキスパウダー-N	中国	約95℃、30分	噴霧乾燥	水溶性	2004.3	常温、1ヶ月	粉末	9.14	62.4	4.75	0.31	30	10未満	10未満	-
3	A-ガーリックエキス	中国	約95℃、30分	減圧乾燥	水溶性	2004.3	常温、1ヶ月	ペースト	10.13	127.5	4.81	0.87	10未満	10未満	10未満	-
4	A-ジンジャーエキス	中国	約95℃、30分	減圧乾燥	水溶性	2004.3	常温、1ヶ月	ペースト	10.13	122.2	4.83	0.84	10未満	10未満	10未満	-
5	A-キャベツエキスパウダー	日本	約95℃、30分	噴霧乾燥	水溶性	2004.3	常温、1ヶ月	粉末	10.13	65.0	4.73	0.31	10未満	10未満	10未満	-
6	A-キャロットエキス	中国	約95℃、30分	減圧乾燥	水溶性	2004.3	常温、1ヶ月	エキス	10.13	127.5	4.85	0.80	10未満	10未満	10未満	-
7	A-人参エキスパウダー	中国	約95℃、30分	噴霧乾燥	水溶性	2004.3	常温、1ヶ月	粉末	10.13	67.5	4.79	0.32	10未満	10未満	10未満	-
8	B-オニオン-1	中国	105℃、90秒	減圧乾燥	水溶性	2003.12	冷凍、4年	ペースト		105.8						
9	B-オニオン-2	中国	105℃、90秒	噴霧乾燥	水溶性	2002.6	常温、1年	粉末	10.13	110.6	4.92	0.25	150	10未満	10未満	-
10	B-ガーリック	中国	105℃、90秒	減圧乾燥	水溶性	2003.12	冷凍、4年	ペースト		91.0						
11	B-キャロット	中国	105℃、90秒	減圧乾燥	水溶性	2003.12	冷凍、4年	ペースト		102.5						
12	B-ジンジャー	中国	105℃、90秒	減圧乾燥	水溶性	2003.12	冷凍、4年	ペースト		103.5						
13	B-キャベツ-1	中国	105℃、90秒	減圧乾燥	水溶性	2003.12	冷凍、4年	ペースト		101.2						
14	B-キャベツ-2	中国	105℃、90秒	噴霧乾燥	水溶性	2004.6	常温、1年	粉末	10.13	116.6	5.28	0.28	10未満	10未満	10未満	-
15	B-ハウスライ-1	中国	105℃、90秒	減圧乾燥	水溶性	2003.12	冷凍、4年	ペースト		113.5						
16	B-ハウスライ-2	中国	105℃、90秒	噴霧乾燥	水溶性	2004.6	常温、1年	粉末	10.13	117.5	4.60	0.28	10未満	10未満	10未満	-
17	B-セロリ	中国	105℃、90秒	噴霧乾燥	水溶性	2004.6	常温、1年	粉末		108.9						
18	C-オニオンエキス-1	中国	90℃、20分	減圧乾燥	水溶性	2004.7	要冷蔵、1年	液状	9.14	139.4	4.57	0.86	10	10未満	10未満	-
19	C-オニオンエキス-2	中国	90℃、20分	減圧乾燥	水溶性	2004.7	要冷蔵、1年	液状	10.19	135.9	3.56	0.88	10未満	10未満	10未満	-
20	C-ハウスライエキス	中国	90℃、20分	減圧乾燥	水溶性	2004.6	要冷蔵、1年	液状	10.19	138.3	4.74	0.92	10未満	10未満	10未満	-
21	C-ニンジンエキス	中国	90℃、20分	減圧乾燥	水溶性	2004.4	要冷蔵、1年	液状	10.19	134.7	6.10	0.95	10未満	10未満	10未満	-
22	C-キャベツエキス	中国	90℃、20分	減圧乾燥	水溶性	2004.6	要冷蔵、1年	液状	10.19	152.1	4.40	0.83	10未満	10未満	10未満	-
23	C-オニオンエキス	中国	90℃、20分	減圧乾燥	水溶性	2004.6	要冷蔵、1年	ペースト	10.19	137.0	4.97	0.77	50	100	10未満	-
24	C-サンザシ濃縮果汁	中国	90℃、20分	減圧乾燥	水溶性	2004.2	要冷蔵、2年	液状		142.4						
25	C-シイタケエキス	中国	60℃、30分	減圧乾燥	水溶性	2004.4	要冷蔵、1年	液状	10.19	152.6	5.28	0.88	10未満	10未満	10未満	-
26	C-セロリジュース-1	中国	90℃、20分	減圧乾燥	水溶性	2003.7	要冷蔵、2年	液状		208.2						
27	C-パセリジュース-1	中国	90℃、20分	減圧乾燥	水溶性	2003.7	要冷蔵、2年	液状		195.4						

野菜エキス分析サンプル関連情報

No	サンプル名	原料産地	加温条件	加工工程	溶解性	製造年月日	賞味期限	形状	検査日	総重量 (g)	供試量 (g)	pH	水分活性	SPC(ctu/g)	芽芽 (ctu/g)	CLT(ctu/g)	ホフリヌス量
28	D-オニオンエキス	日本	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫所, 240日	ペースト	10.19	94.0	50.0	4.32	0.77	40	20	10未満	-
29	D-ガーリックエキス	中国	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫所, 240日	ペースト	10.19	98.5	50.0	5.63	0.87	930	1,100	10	-
30	D-キャロットエキス	日本	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫所, 240日	ペースト	10.26	118.5	50.0	4.84	0.76	20	10未満	10未満	-
31	D-ハクサイエキス	日本	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫所, 240日	ペースト	10.26	106.3	50.0	4.67	0.87	700	910	10未満	-
32	D-キャベツエキス	日本	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫所, 240日	ペースト	10.26	173.4	50.0	4.57	0.69	10	10	10未満	-
33	D-ネギエキス	日本	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫所, 240日	ペースト	10.26	107.1	50.0	4.13	0.72	60	60	10未満	-
34	D-シイタケエキス	日本	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫, 240日	ペースト	10.26	159.5	50.0	5.43	0.91	16,000	16,000	1,300	-
35	D-マッシュルームエキス	中国	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫, 240日	ペースト	10.26	172.1	50.0	6.05	0.90	260,000	6,000	20	-
36	D-パンパキアエキス	日本	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫, 240日	ペースト	10.26	106.1	50.0	5.20	0.88	60	20	10未満	-
37	D-トマトエキス	チリ	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫所, 240日	ペースト	10.26	176.2	50.0	3.98	0.89	10	10	10未満	-
38	E-オネキスパウダー	中国	90℃, 20分	凍圧凍結	水溶性	2004.7	凍庫, 6ヶ月										
39	E-人參ジュースパウダー	中国	90℃, 20分	凍圧凍結	水溶性	2004.7	凍庫, 6ヶ月										
40	E-ガーリックエキスパウダー	中国	90℃, 20分	凍圧凍結	水溶性	2004.5	凍庫, 6ヶ月										
41	E-キャサバイオパンパウダー	中国	90℃, 20分	凍圧凍結	水溶性	2004.8	凍庫, 6ヶ月										
42	F-ネギエキス	中国	105℃, 90秒	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫, 4年										
43	F-ゴボウエキス	中国	105℃, 90秒	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫, 4年										
44	F-シイタケエキス	中国	105℃, 90秒	凍圧凍結	水溶性	2004.4	凍庫, 4年										
45	G-オニオンエキス	日本	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫所, 240日										
46	G-ガーリックエキス	中国	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫所, 240日										
47	G-キャロットエキス	日本	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫所, 240日										
48	G-トマトエキス	チリ	95℃, 30分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫所, 240日										
49	H-シイタケ-1	日本	93℃, 10分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫, 6ヶ月										
50	H-シイタケ-2	日本	95℃, 40分	凍圧凍結	水溶性	2004.6	凍庫, 6ヶ月										

表1 水ようかんに対するボツリヌス菌芽胞添加試験成績

番号	検体の処理	検査時期	恒温開始日	芽胞の膨化	恒温日数	総重量 (/g)	内容量 (/g)	検査項目				
								SPC (cfu/g)	CLC (cfu/g)	菌糸試験	pH	Aw
M-1	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.6	89.7	10未満	33,000	-	6.4	-
M-2	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.4	89.7	10未満	46,000	-	6.4	-
M-3	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.2	89.4	10未満	51,000	-	6.4	-
M-4	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.4	89.4	10未満	43,000	-	6.3	-
M-5	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.9	90.1	10未満	45,000	-	6.3	-
M-6	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.0	89.1	10未満	40,000	-	6.3	-
M-7	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.5	89.6	10未満	45,000	-	6.4	-
M-8	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.9	89.2	10未満	53,000	-	6.3	-
M-9	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.1	89.2	10未満	55,000	-	6.3	-
M-10	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.1	89.4	10未満	55,000	-	6.4	-
M-11	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	95.8	89.0	10未満	47,000	-	6.4	-
M-12	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	95.9	89.1	10未満	50,000	-	6.4	-
M-13	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.7	89.7	10未満	46,000	-	6.4	-
M-14	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	97.2	90.4	10未満	50,000	-	6.3	-
M-15	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	95.7	88.7	10未満	45,000	-	6.3	-
M-16	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.3	89.5	10未満	49,000	-	6.3	-
M-17	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.9	90.2	10未満	54,000	-	6.3	-
M-18	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.7	89.3	10未満	56,000	-	6.5	-
M-19	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.2	90.0	10未満	64,000	-	6.3	-
M-20	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.2	89.5	10未満	51,000	-	6.4	-
M-21	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	97.1	90.3	10未満	55,000	-	6.4	-
M-22	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.8	90.0	10未満	44,000	-	6.4	-
M-23	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	95.6	88.7	10未満	49,000	-	6.4	-
M-24	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.5	89.7	10未満	47,000	-	6.5	-
M-25	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	95.8	89.1	10未満	44,000	-	6.4	-
M-26	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.5	89.7	10未満	49,000	-	6.4	-
M-27	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	95.6	88.7	10未満	45,000	-	6.4	-
M-28	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.1	89.1	10未満	46,000	-	6.4	-
M-29	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.4	89.4	10未満	50,000	-	6.4	-
M-30	芽胞接種群 膨化時	8月3日	8月3日	-	90日間	96.3	89.6	10未満	51,000	-	6.4	-
M-31	芽胞接種群 接種直後	.	8月3日	-	.	96.6	.	10未満	49,000	.	6.4	.
M-32	芽胞接種群 接種直後	.	8月3日	-	.	96.0	.	10未満	41,000	.	6.5	.
M-33	芽胞接種群 接種直後	.	8月3日	-	.	96.7	.	10未満	44,000	.	6.4	.
M-34	密封操作のみ 接種直後	.	8月3日	-	.	96.3	.	10未満	10未満	.	6.4	.
M-35	(熱性処理) 接種直後	.	8月3日	-	.	95.6	.	10未満	10未満	.	6.4	.
M-36	80℃、20分 接種直後	.	8月3日	-	.	96.9	.	10未満	10未満	.	6.4	.
M-37	密封操作のみ 90日後	.	8月3日	-	90日間	96.4	89.2	10未満	10未満	-	6.4	-
M-38	(熱性処理) 90日後	.	8月3日	-	90日間	96.1	89.5	10未満	10未満	-	6.4	-
M-39	80℃、20分 90日後	.	8月3日	-	90日間	96.3	89.4	10未満	10未満	-	6.4	-
M-40	未処理 開始直後	.	8月3日	-	.	95.8	.	10未満	10未満	-	6.4	-
M-41	未処理 90日後	.	8月3日	-	.	97.0	.	10未満	10未満	-	6.4	-
M-42	未処理 90日後	.	8月3日	-	90日間	96.8	88.9	10未満	10未満	-	6.4	-
M-43	未処理 90日後	.	8月3日	-	90日間	96.6	89.5	10未満	10未満	-	6.4	-
M-44	未処理 90日後	.	8月3日	-	90日間	96.7	89.4	10未満	10未満	-	6.4	-
M-45	未処理 90日後	.	8月3日	-	90日間	96.5	89.2	10未満	10未満	.	6.4	0.98以上
M-46	未処理 90日後	.	8月3日	-	90日間	96.4	89.1	10未満	10未満	.	6.5	0.98以上
M-47	未処理 90日後	.	8月3日	-	90日間	96.7	90.1	10未満	10未満	.	6.5	0.98以上
M-48	未処理 90日後	.	8月3日	-	90日間	96.7	90.1	10未満	10未満	.	6.5	0.98以上

* SPC : 一般生菌数、CLC: 嫌気性菌数

表 2-1 ポツリノス添加実験結果総括：豆腐のスクランブル（亀井ランチ, 65 g)

番号	検体の処理	検査時期	検査施設	恒温開始日	膨化日	膨化後冷蔵	検査実施日	検査項目						その他
								一般生菌数	嫌気性菌数	毒素試験	産生毒素型	毒力 (LD50/g)	pH	
P-1				12月6日	12月10日	12月10日	12月18日	<10	36,000,000	+	A+B	150,000	5.8	.
P-2				12月6日	12月10日	12月10日	12月18日	<10	20,000,000	+	A+B	140,000	5.8	.
P-3	芽胞接種	膨化時	衛研	12月6日	12月10日	12月10日	12月18日	<10	20,000,000	+	A+B	670,000	5.8	.
P-4	80℃、20分	(30℃)		12月6日	12月10日	12月10日	12月18日	<10	36,000,000	+	A+B	350,000	5.8	.
P-5				12月6日	12月10日	12月10日	12月18日	<10	23,000,000	+	A+B	180,000	5.8	.
P-6								<10	36,000	.	.	.	5.7	.
P-7	芽胞接種	接種直後	缶詰協会					<10	24,000	.	.	.	5.7	.
P-8	80℃、20分							<10	29,000	.	.	.	5.6	.
P-9	開封操作のみ	接種直後	缶詰協会					<10	<1	.	.	.	5.6	.
P-10	(陰性対照)							<10	<1	.	.	.	5.6	.
P-11	80℃、20分							<10	<1	.	.	.	5.6	.
P-12	開封操作のみ	90日後	衛研	12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.6	.
P-13	(陰性対照)			12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.5	.
P-14	80℃、20分			12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.5	.
P-15	未処理	開始直後	衛研					<10	<1	-	.	.	5.6	.
P-16								<10	<1	-	.	.	5.6	.
P-17								<10	<1	-	.	.	5.5	.
P-18				12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.5	.
P-19	未処理	90日後	衛研	12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.5	.
P-20				12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.5	.
P-21								5.6	0.99
P-22	未処理	開始直後	缶詰協会					5.6	0.99
P-23								5.6	0.99

表 2-2 ポツリノス毒素確認試験結果

番号	接種原液	未処理	加熱処理 100℃10分	中和試験 (抗毒素1-2IU/マウス)			毒素型
				抗A毒素	抗B毒素	抗A+B毒素	
P-1	50%上清	D (2/2)	S (2/2)	D (2/2)	D (2/2)	S (2/2)	A+B
P-2	50%上清	D (2/2)	S (2/2)	D (2/2)	D (2/2)	S (2/2)	A+B
P-3	50%上清	D (2/2)	S (2/2)	D (2/2)	D (2/2)	S (2/2)	A+B
P-4	50%上清	D (2/2)	S (2/2)	D (2/2)	D (2/2)	S (2/2)	A+B
P-5	50%上清	D (2/2)	S (2/2)	D (2/2)	D (2/2)	S (2/2)	A+B

表3-1 ポツリノス添加実験結果総括：肉じゃが（フーズサブライダイソー、120g）

番号	検体の処理	検査時期	検査施設	恒温開始日	膨化日	膨化後冷蔵	検査実施日	検査項目						その他
								一般生菌数	嫌気性菌数	芽胞菌株	産生毒素型	毒力 (LD50/g)	pH	
Q-1				12月6日	12月8日	12月10日	12月24日	<10	270,000,000	+	A	370,000	5.8	.
Q-2				12月6日	12月8日	12月10日	12月24日	<10	290,000,000	+	A	320,000	5.8	.
Q-3	芽胞接種	膨化時 (30℃)	衛研	12月6日	12月8日	12月10日	12月24日	<10	150,000,000	+	A	370,000	5.8	.
Q-4				12月6日	12月8日	12月10日	12月24日	<10	320,000,000	+	A	320,000	5.8	.
Q-5				12月6日	12月8日	12月10日	12月24日	<10	40,000,000	+	A	300,000	5.7	.
Q-6								<10	14,000	.	.	.	5.7	.
Q-7	芽胞接種	接種直後	缶詰協会					<10	14,000	.	.	.	5.6	.
Q-8								<10	16,000	.	.	.	5.6	.
Q-9	開封操作のみ	接種直後	缶詰協会					<10	<1	.	.	.	5.6	.
Q-10	(陰性対照)							<10	<1	.	.	.	5.7	.
Q-11								<10	<1	.	.	.	5.6	.
Q-12	開封操作のみ	90日後	衛研	12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.5	.
Q-13	(陰性対照)			12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.4	.
Q-14				12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.3	.
Q-15								<10	<1	-	.	.	5.5	.
Q-16	未処理	開始直後	衛研					<10	<1	-	.	.	5.5	.
Q-17								<10	<1	-	.	.	5.5	.
Q-18				12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.4	.
Q-19	未処理	90日後	衛研	12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.4	.
Q-20				12月6日		3月6日		<10	<1	-	.	.	5.3	.
Q-21								5.5	0.98
Q-22	未処理	開始直後	缶詰協会					5.5	0.99
Q-23								5.4	0.98

表3-2 ポツリノス毒素確認試験結果

番号	接種原液	未処理	加熱処理 100℃10分	中和試験 (抗毒素1-2IU/マウス)			毒素型
				抗A毒素	抗B毒素	抗A+B毒素	
Q-1	50%上清	D (2/2)	S (2/2)	S (2/2)	D (2/2)	S (2/2)	A
Q-2	10%上清	D (2/2)	S (2/2)	S (2/2)	D (2/2)	S (2/2)	A
Q-3	10%上清	D (2/2)	S (2/2)	S (2/2)	D (2/2)	S (2/2)	A
Q-4	10%上清	D (2/2)	S (2/2)	S (2/2)	D (2/2)	S (2/2)	A
Q-5	10%上清	D (2/2)	S (2/2)	S (2/2)	D (2/2)	S (2/2)	A