

表2 供試品(野菜エキス)の概要

No	サンプル名	原料原産地	加熱条件	加工工程	溶解性	製造年月日	賞味期限	形状
1	A-オニオンエキス	中国	約95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.3	常温、1ケ年	ペースト
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ケ年	粉末
3	A-ガーリックエキス	中国	約95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.3	常温、1ケ年	ペースト
4	A-ジンジャーエキス	中国	約95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.3	常温、1ケ年	ペースト
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ケ年	粉末
6	A-キャロットエキス	中国	約95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.3	常温、1ケ年	ペースト
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ケ年	粉末
8	B-オニオン-1	中国	105℃、90秒	減圧濃縮	水溶性	2003.12	冷凍、4年	ペースト
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	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
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
12	B-ジンジャー	中国	105℃、90秒	減圧濃縮	水溶性	2003.12	冷凍、4年	ペースト
13	B-キャベツ-1	中国	105℃、90秒	減圧濃縮	水溶性	2003.12	冷凍、4年	ペースト
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
15	B-ハクサイ-1	中国	105℃、90秒	減圧乾燥	水溶性	2003.12	冷凍、4年	ペースト
16	B-ハクサイ-2	中国	105℃、90秒	噴霧乾燥	水溶性	2004.6	常温、1年	粉末
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
18	C-オニオンエキス-1	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2004.7	要冷蔵、1年	液状
19	C-オニオンエキス-2	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2004.7	要冷蔵、1年	液状
20	C-ハクサイエキス	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	要冷蔵、1年	液状
21	C-ニンジンエキス	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2004.4	要冷蔵、1年	液状
22	C-キャベツエキス	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	要冷蔵、1年	液状
23	C-ネギエキス	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	要冷蔵、1年	ペースト
24	C-サンザシ濃縮果汁	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2004.2	要冷凍、2年	液状
25	C-シイタケエキス	中国	60℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.4	要冷蔵、1年	液状
26	C-セロリジュース-1	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2003.7	要冷凍、2年	液状
27	C-パセリジュース-1	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2003.7	要冷凍、2年	液状
28	D-オニオンエキス	日本	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷暗所、240日	ペースト
29	D-ガーリックエキス	中国	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷暗所、240日	ペースト
30	D-キャロットエキス	日本	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷暗所、240日	ペースト
31	D-ハクサイエキス	日本	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷蔵、240日	ペースト
32	D-キャベツエキス	日本	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷暗所、240日	ペースト
33	D-ネギエキス	日本	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷暗所、240日	ペースト
34	D-シイタケエキス	日本	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷蔵、240日	ペースト
35	D-マッシュルームエキス	中国	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷蔵、240日	ペースト
36	D-パンプキンエキス	日本	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷蔵、240日	ペースト
37	D-トマトエキス	チリ	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷暗所、240日	ペースト
38	E-オニオンエキスパウダー	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2004.7	常温、6ケ月	粉末
39	E-人参ジュースパウダー	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2004.7	常温、6ケ月	粉末
40	E-ガーリックエキスパウダー	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2004.5	常温、6ケ月	粉末
41	E-ヤサイブイヨンパウダー	中国	90℃、20分	減圧濃縮	水溶性	2004.8	常温、6ケ月	粉末
42	F-ネギエキス	中国	105℃、90秒	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷凍、4年	ペースト
43	F-ゴボウエキス	中国	105℃、90秒	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷凍、4年	ペースト
44	F-シイタケエキス	中国	105℃、90秒	減圧濃縮	水溶性	2004.4	冷凍、4年	ペースト
45	G-オニオンエキス	日本	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷暗所、240日	ペースト
46	G-ガーリックエキス	中国	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷暗所、240日	ペースト
47	G-キャロットエキス	日本	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷暗所、240日	ペースト
48	G-トマトエキス	チリ	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷暗所、240日	ペースト
49	H-シイタケ-1	日本	93℃、10分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷蔵、6ケ月	ペースト
50	H-シイタケ-2	日本	95℃、40分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷蔵、6ケ月	ペースト
51	D-シイタケエキス(再送付品)	日本	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷蔵、240日	ペースト
52	D-マッシュルームエキス(再送付品)	中国	95℃、30分	減圧濃縮	水溶性	2004.6	冷蔵、240日	ペースト

表3 野菜エキス調査成績

No	サンプル名	総重量 (g)	供試量 (g)	pH	水分活性	SPC(cfu/g) ¹⁾	好芽 (cfu/g) ²⁾	CLT(cfu/g) ³⁾	ボツリヌス菌 ⁴⁾
1	A-オニオンエキス	126.3	50.0	4.6	0.80	960	540	10未満	-
2	A-オニオンエキスパウダー-N	62.4	40.0	4.8	0.31	30	10未満	10未満	-
3	A-ガーリックエキス	127.5	50.0	4.8	0.87	10未満	10未満	10未満	-
4	A-ジンジャーエキス	122.2	50.0	4.8	0.84	10未満	10未満	10未満	-
5	A-キャベツエキスパウダー	65.0	45.0	4.7	0.31	10未満	10未満	10未満	-
6	A-キャロットエキス	127.5	50.0	4.9	0.80	10未満	10未満	10未満	-
7	A-人参エキスパウダー	67.5	45.0	4.8	0.32	10未満	10未満	10未満	-
8	B-オニオン-1	105.8	50.0	4.9	0.78	150	90	10未満	-
9	B-オニオン-2	110.6	50.0	4.9	0.25	150	10未満	10未満	-
10	B-ガーリック	91.0	50.0	6.0	0.90	30	10	10未満	-
11	B-キャロット	102.5	50.0	5.6	0.76	20	10	10未満	-
12	B-ジュンジャー	103.5	50.0	5.8	0.90	10	10	10未満	-
13	B-キャベツ-1	101.2	50.0	5.2	0.75	10	10未満	10未満	-
14	B-キャベツ-2	116.6	50.0	5.3	0.28	10未満	10未満	10未満	-
15	B-ハクサイ-1	113.5	50.0	5.1	0.73	80	80	10	-
16	B-ハクサイ-2	117.5	50.0	4.6	0.28	10未満	10未満	10未満	-
17	B-セロリ	108.9	50.0	4.3	0.26	10未満	10未満	10未満	-
18	C-オニオンエキス-1	139.4	50.0	4.6	0.86	10	10未満	10未満	-
19	C-オニオンエキス-2	135.9	50.0	3.6	0.88	10未満	10未満	10未満	-
20	C-ハクサイエキス	138.3	50.0	4.7	0.92	10未満	10未満	10未満	-
21	C-ニンジンエキス	134.7	50.0	6.1	0.95	10未満	10未満	10未満	-
22	C-キャベツエキス	152.1	50.0	4.4	0.83	10未満	10未満	10未満	-
23	C-ネギエキス	137.0	50.0	5.0	0.77	50	100	10未満	-
24	C-サンザシ濃縮果汁	142.4	50.0	2.7	0.89	10未満	10未満	10未満	-
25	C-シイタケエキス	152.6	50.0	5.3	0.88	10未満	10未満	10未満	-
26	C-セロリジュース-1	208.2	50.0	5.1	0.89	10未満	10未満	10未満	-
27	C-パセリジュース-1	195.4	50.0	5.5	0.95	30	10	10未満	-
28	D-オニオンエキス	94.0	50.0	4.3	0.77	40	20	10未満	-
29	D-ガーリックエキス	98.5	50.0	5.6	0.87	930	1,100	10	-
30	D-キャロットエキス	118.5	50.0	4.8	0.76	20	10未満	10未満	-
31	D-ハクサイエキス	106.3	50.0	4.7	0.87	700	910	10未満	-
32	D-キャベツエキス	173.4	50.0	4.6	0.69	10	10	10未満	-
33	D-ネギエキス	107.1	50.0	4.1	0.72	60	60	10未満	-
34	D-シイタケエキス	159.5	50.0	5.4	0.91	16,000	16,000	1,300	-
35	D-マッシュルームエキス	172.1	50.0	6.1	0.90	260,000	6,000	20	-
36	D-パンプキンエキス	106.1	50.0	5.2	0.88	60	20	10未満	-
37	D-トマトエキス	176.2	50.0	4.0	0.89	10	10	10未満	-
38	E-オニオンエキスパウダー	113.5	50.0	4.4	0.31	10未満	10未満	10未満	-
39	E-人参ジュースパウダー	111.9	50.0	5.8	0.32	90	110	10	-
40	E-ガーリックエキスパウダー	111.4	50.0	5.9	0.31	20	10	10未満	-
41	E-ヤサイブイヨンパウダー	111.2	50.0	4.6	0.27	20	20	10未満	-
42	F-ネギエキス	104.4	50.0	5.2	0.84	1,000	500	10未満	-
43	F-ゴボウエキス	102.9	50.0	5.9	0.93	330	240	10未満	-
44	F-シイタケエキス	105.2	50.0	5.8	0.89	100	30	10未満	-
45	G-オニオンエキス	122.3	50.0	4.5	0.78	10	10	10未満	-
46	G-ガーリックエキス	94.2	50.0	6.2	0.88	10未満	10未満	10未満	-
47	G-キャロットエキス	121.6	50.0	5.3	0.79	10未満	10未満	10未満	-
48	G-トマトエキス	112.5	50.0	4.1	0.89	260	350	10未満	-
49	H-シイタケ-1	42.5	20.0	5.3	0.85	80	20	10未満	-
50	H-シイタケ-2	108.8	50.0	4.9	0.72	10	10	10未満	-
51	D-シイタケエキス (再送付品)	127.8	49.8	5.4	0.91	850	650	10未満	-
52	D-マッシュルームエキス (再送付品)	131.8	43.3	6.1	0.89	110	70	10未満	-

1) SPC (一般生菌数) : 計測値が1gあたり10cfuに満たない場合「10未満」と記載

2) 好芽 (好気性芽胞菌数) : 計測値が1gあたり10cfuに満たない場合「10未満」と記載

3) CLT (腐敗性菌数) : 計測値が1gあたり1cfuに満たない場合「1未満」と記載

4) ボツリヌス菌 : 増菌培養液中のボツリヌス菌の検査結果

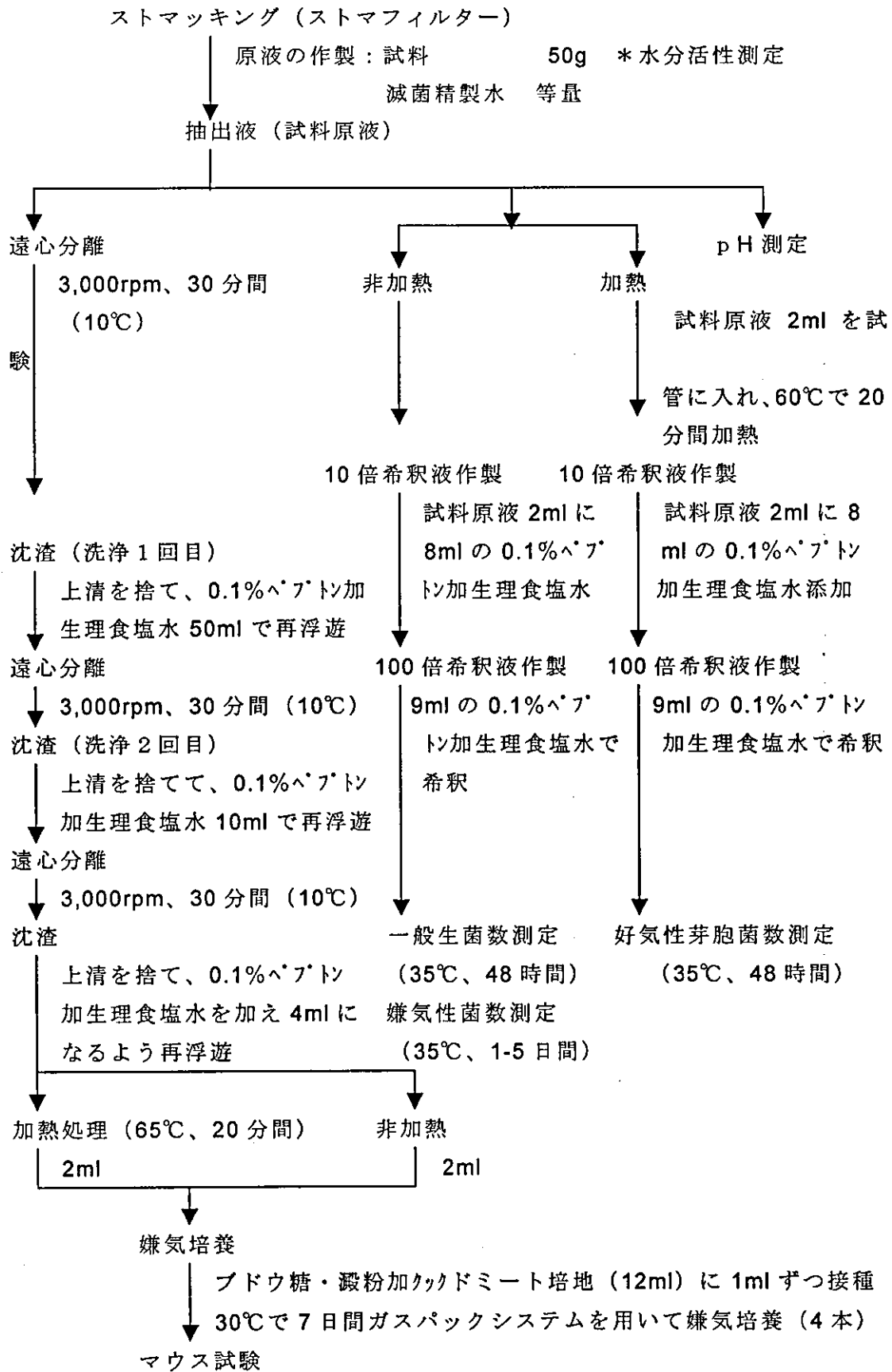


図1 野菜エキスの検査手順

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

— 「ういろう」, 「くず餅」, 「きんつば」のボツリヌス菌芽胞添加実験—

分担研究者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所

研究協力者 村上光一, 野田多美枝, 濱崎光宏, 竹中重幸, 石黒靖尚 (福岡県保健環境研究所)

駒木 勝 (社)日本缶詰協会研究所

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を行うため、「ういろう」2品目、「くず餅」および「蒸しきんつば」の計4品目について各30サンプルを使用し、ボツリヌス菌芽胞を添加し保存性試験を行った。その結果、サンプルは、保存試験終了後いずれも膨化しなかった。保存試験終了のクロストリジア菌数は、ボツリヌス菌芽胞添加直後の菌数とほぼ同じでクロストリジア菌数の変化はなかった。また、対照サンプルは、保存性試験前および終了後ともにクロストリジアは検出されなかった。本研究の結果から、「ういろう」2品目、「くず餅」および「きんつば」は、ボツリヌス食中毒の危険性が極めて低い食品であることが分かった。

A. 研究目的

食品衛生法では、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、「容器包装詰加圧加熱食品」（食品中清涼飲料水、食肉製品、魚肉練り製品は除く）という分類でひとまとめに扱っている。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。②水素イオン濃度(pH)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、ほとんど分からないのが現状である。特に当該食品のpHや水分活性値の表示はなされておらず、外観での判断は困難である。

そこで、平成16年度は、気密性容器に包装詰されpHが4.6を超え、かつA_wが0.94を超える菓子類を対象に、ボツリヌス食中毒に対するリスク評価を行った。本研究では、「ういろう」2品目、「くず餅」および「蒸しきんつば」の計4品目について、ボツリヌス菌芽胞添加実験を行なった。

B. 研究方法

予備実験

市販「ういろう」の調査とボツリヌス菌芽胞添加実験対象製品の選定

供試した「ういろう」は、4社19品種である。4社が製品に記載した原材料を表1に示した。また、今回購入した4社の「ういろう」の包装形態は、表2のとおりであった。これら19品種について、pH、A_w、一般細菌数、65℃20分加熱後の一般細菌数及びクロストリジア数について検査し

た。

その結果は下記のとおりであった（表3）。

- ①4社19品目いずれも pH4.6 以上及び Aw0.94 以上であった。
- ②4社19品目いずれもクロストリジアは検出されなかった。
- ③D社は一般細菌及び耐熱性好気性菌が検出された。その数値は、3品目ともに一般細菌がグラムあたり 10^5 以上、耐熱性好気性菌がグラムあたり 10^3 以上であった。
- ④B社はいずれの品目においても一般細菌及び耐熱性好気性菌は検出されなかった。
- ⑤A社はいずれの品目においても一般細菌は検出されたが、耐熱性好気性菌は品目により検出の有無が異なった。
- ⑥C社6品目中4品目は一般細菌及び耐熱性好気性菌は検出されなかったが、2品目は一般細菌が検出された。またその2品目中1品目からは耐熱性好気性菌が検出された。

以上の結果から、製造ライン上で直ちに耐熱性フィルムに装填した製品が細菌学的に良好であり、賞味期限が長いことから、耐熱性フィルムに装填した製品についてポツリヌス菌添加実験を実施することにした。

ポツリヌス菌芽胞添加実験

1. 供試試料

「ういろう」2品目、「くず餅」および「蒸しきんつば」の計4品目を、ポツリヌス菌添加実験に使用した。これらの4品目の重量および包装に用いられた容器の素材を表4に示した。また、これら4品目の原材料は、表5のとおりであった。実験に使用した被検材料の検体番号は、図1に示した。

2. 試料の Aw および pH 測定

Aw はデカゴン社製アクアクラブ、pH は東亜ディーケ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 の測定は、細

切した検体を使用した。pH 測定には、試料 3 倍希釈液を用いた。測定は 1 検体につき 2 回実施し、平均を測定値とした。また、菌添加品を計測した電極は、直ちにオートクレーブで滅菌（121℃、60 分）後、廃棄した。

3. ポツリヌス菌芽胞添加実験

被検食品へのポツリヌス菌芽胞の添加は、日本缶詰協会研究所で実施した。当所対象品の接種用芽胞混合液の初発芽胞数は、「ういろう」2品目分は 9.5×10^7 cfu/ml、「くず餅」および「蒸しきんつば」分は 1.7×10^8 cfu/ml であった（表6）。

4. 保存試験

各試験品検体番号 43-45 は、無処理のまま保存し試験品の無菌性を確認した。検体番号 37-39 は、開封し芽胞は接種せず熱処理を行い開封操作の無菌性を確認した。検体番号 1-30 は、開封後芽胞を接種し、検体の膨化の有無について観察した。

いずれも保存性試験は、各検体別にポリシール袋で密封シールし、30℃のインキュベータ（三洋電機、MIR553）で保存し、毎日観察した。容器が膨張した時点で、直ちに4℃の冷蔵庫に保存し、検査に供することとした。

5. 菌数測定

5-1 試料原液の調整

各試験品は全量が無菌的にストマッカー用袋（栄研器材製、ストマフィルターS）にとり、2倍量の滅菌蒸留水を加え、ストマッカーで2分間混和した。この3倍希釈液を試料原液とした。試料原液は一般細菌数、クロストリジア属菌数、pH 測定および毒素試験に使用した。毒素試験用試料原液は、-20℃の冷凍庫で保存した。

5-2 一般細菌数測定

3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℃、20分滅菌後50℃に保温した標準寒天約20mlを加え混和・固化後、35℃、48±3時間培養した。

5-3 クロストリジア属菌数

クロストリジア属菌数測定には 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、50°C に保温したクロストリジア測定用培地（日水）10 ml を加え、混和・固化後 35±1°C で 24±2 時間培養した。

6. 毒素の定性試験

6-1 毒素試験用試料の作製

各試料原液（3 倍）約 7ml を 15ml 滅菌プラスチック遠心管に分注し、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。濾液を滅菌小試験管に 1.5 ml ずつ 2 本に分注し、1 本はそのまま（非加熱）、もう一方は 100°C で 30 分加熱処理（加熱処理）した。また、陰性コントロール試験には、滅菌蒸留水を用い同様の操作を行った。

6-2 毒素の定性試験

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 0.5 ml ずつマウス腹腔内に接種した。マウスの観察は、接種後 4 日間実施した。

C. 研究結果

1. 試料の Aw および pH

各試験品の Aw および pH を表 7 に示した。いずれの試験品も Aw が 0.94 以上で pH は 4.6 を超えていた。

2. 実験開始時の試験品検査結果

2-1 実験区分 A (43-45) : 無処理

試験品が製造過程で適切に加熱処理が行われているかを確認するため実験開始時の細菌およびボツリヌス毒素の検査を行った。試験品 4 種ともに一般細菌数およびクロストリジア属菌数は 10 cfu/g 未満であった。またボツリヌス毒素も検出されなかった（表 8-11）。

2-2 実験区分 C (34-36) : 開封芽胞非接種

開封操作が無菌的に行われたことを確認するために行った。試験品 4 種ともに一般細菌数およ

びクロストリジア属菌数は 10 cfu/g 未満であった。またボツリヌス毒素も検出されなかった（表 8-11）。

2-3 実験区分 E (31-33) : 接種菌数確認

芽胞接種・熱処理直後の芽胞数を確認するために行った。計算値では A および O はグラムあたりそれぞれ 1.4×10^4 cfu および 1.2×10^4 cfu, K および M はグラムあたり 1.6×10^3 cfu であった。実測値の平均値は A が 3.1×10^4 cfu/g, O が 1.7×10^4 cfu/g, K が 6.8×10^3 cfu/g および M が 3.3×10^3 cfu/g であった。一般細菌数はいずれも 10 cfu/g 未満であった（表 8-11）。

3. 保存性試験

3-1 実験区分 B (43-45) : 未開封

試験品を保存（30°C）する過程において、細菌が増殖していないことを確認するため、袋の膨張の有無、細菌およびボツリヌス毒素の検査を行った。試験品 4 品目ともに観察終了後まで、袋の膨張はみられなかった。また、一般細菌数およびクロストリジア属菌数は 10 cfu/g 未満であった。ボツリヌス毒素も検出されなかった（表 8-11）。

3-2 実験区分 D (37-39) : 開封芽胞非接種

開封操作が無菌的に行われ、保存（30°C）過程で細菌が増殖していないことを確認するため、袋の膨張の有無、細菌およびボツリヌス毒素の検査を行った。試験品 4 品目ともに観察終了後まで、袋の膨張はみられなかった。また、K-38 以外は、一般細菌数およびクロストリジア属菌数は 10 cfu/g 未満であった。K-38 は、一般細菌数が 4.0×10^4 cfu/g であった。しかし、ボツリヌス毒素は、いずれからも検出されなかった（表 8-11）。

4. 芽胞添加実験結果 : 実験区分 F (1-30)

4-1 食品 A (ういろう, 表 8)

4-1-1 保存性試験

試験品の膨化は、観察終了後まで観察されなかった。

4-1-2 細菌検査

一般細菌数は試験品 30 検体共に 10 cfu/g 未満であった。クロストリジア菌数は、 $1.4 \times 10^4 - 2.8 \times 10^4$ cfu/g あった。

4-1-3 ボツリヌス毒素試験

3 倍希釈試料液をマウス腹腔内に接種し、4 日間観察を行ったが、加熱処理および未処理群ともに生残した。

4-2 食品 O (ういろう白, 表 9)

4-2-1 保存性試験

試験品の膨化は、観察終了後まで観察されなかった。

4-2-2 細菌検査

一般細菌数は、試験品 28 検体は 10 cfu/g 未満であったが、O-20 が 4.7×10^3 cfu/g および O-27 が 7.8×10^3 cfu/g であった。クロストリジア菌数は、 $9.3 \times 10^3 - 3.0 \times 10^4$ cfu/g であった。

4-2-3 ボツリヌス毒素試験

3 倍希釈試料液をマウス腹腔内に接種し、4 日間観察を行ったが、加熱処理および未処理群ともに生残した。

4-3 食品 K (くず餅, 表 10)

4-3-1 保存性試験

試験品の膨化は、観察終了後まで観察されなかった。

4-3-2 細菌検査

一般細菌数は、試験品 24 検体は 10 cfu/g 未満であったが、K-3, 14, 19, 27, 28 および 29 が $7.4 \times 10^2 - 7.5 \times 10^4$ cfu/g であった。クロストリジア菌数は、 $2.9 \times 10^3 - 5.5 \times 10^3$ cfu/g であった。

4-3-3 ボツリヌス毒素試験

3 倍希釈試料液をマウス腹腔内に接種し、4 日間観察を行ったが、加熱処理および未処理群ともに生残した。

4-4 食品 M (蒸しきんつば, 表 11)

4-4-1 保存性試験

試験品の膨化は、観察終了後まで観察されなかった。

4-4-2 細菌検査

一般細菌数は、試験品 29 検体はいずれも 10 cfu/g 未満であった。クロストリジア菌数は、10 未満 $- 2.6 \times 10^3$ cfu/g であった。

接種菌数確認試験品 (M-31-M-33) および保存試験品 (M-1-M-30) から接種菌量が回収できなかった。M は気密性容器包装フィルムの下にさらに薄いフィルムがあった。また、M 本体も他の試験品に比べ堅かった。そこで、M-1, M-2 および M-3 を「蒸しきんつば」本体と包装フィルムと分けてクロストリジア数を測定した。その結果、M-1: 本体と包装フィルム両方から検出、M-2: 両方から検出されず、M-3: 包装フィルムから多く検出と 3 検体それぞれのクロストリジア数が異なっていた。これらの結果から M 本体が堅いために芽胞液が全くあるいは一部注入できなかった場合や芽胞液が一部あるいはすべて包装フィルムと内側のフィルムの間に漏れた場合等があることが推察された (表 12)。

4-4-3 ボツリヌス毒素試験

3 倍希釈試料液をマウス腹腔内に接種し、4 日間観察を行ったが、加熱処理および未処理群ともに生残した。

D. 考察

容器包装詰食品でのボツリヌス食中毒事例¹⁾を踏まえ、厚生労働省では水分活性が 0.94 以上でかつ pH が 4.6 を超える常温販売の容器包装詰食品は、中心部を 80℃で 20 分間の熱を加え、10℃以下で保存することを指導している²⁾。また、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、容器包装後 120℃、4 分以上の加熱を義務づけている³⁾。また、容器包装後 120℃、4 分以上の加熱がなされない場合は、ボツリヌス菌が生育しないことを添加実験によって証明するよう指導している⁴⁾。近年食品業界における方向性は常温・長期保存性食品の生産に向いており、食品が「容器包装詰」されているケースが多い。中にはロングライフ (LL) 牛乳のように、殺菌時

間と温度について、食味を損なわず且つ安全性が確保できる殺菌温度が確立されているものもあるが、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食品が多く販売され、その安全性確保のための殺菌条件等は法的に規定されていない場合が多い。

そこで、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必要がある。今回当所で試験品 4 品目の菓子について検討した。これら 4 品目の菓子は、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 以上で且つ pH が 4.6 を超える性状を有していた。4 品目の菓子は、いずれも 45 日または 90 日の保存性試験では一般細菌、クロストリジア属菌は検出されず、ボツリヌス毒素も検出されなかった。完全な保存性試験に供した検体数がいずれも 3 検体ではあるが、これらの食品については現行の加熱方法で比較的安全であることが分かった。一方、不慮の事故あるいは殺菌不良を想定した添加実験では、いずれの試験品もボツリヌス菌は増殖せず、ボツリヌス毒素も産生されないことを確認した。このことは、2 品目の「ういろう」、「くず餅」および「蒸しきんつば」は、ボツリヌスによる食中毒の危険性は極めて低いことを示唆している。一方、ボツリヌス菌添加実験に使用した 3 種類のボツリヌス A 型菌および 2 種類のボツリヌス B 型菌が、2 品目の「ういろう」、「くず餅」および「蒸しきんつば」中で増殖しなかった理由は不明であるが、ボツリヌス菌は栄養要求性が強い菌であり例えばアミノ酸などのような栄養素が十分でないために発育できないものと考えられる。

E. 結論

1. 4 品目の菓子の保存性試験 (45 日, 90 日間)

ついて

いずれも 30°C, 90 日間の保存試験では一般細菌、クロストリジア属菌およびボツリヌス毒素は検出されなかった。

2. 4 品目の菓子のボツリヌス菌芽胞添加実験について

①4 品目の菓子中では、A 型毒素産生および B 型産生ボツリヌス菌のいずれも増殖せず、ボツリヌス毒素を産生しないことが分かった。

②4 品目の菓子は、いずれもボツリヌス食中毒の発生の危険性は極めて低いことが分かった。

参考文献

- 1) 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 編集・発行：ボツリヌス症の手引き・資料集 (2001).
- 2) 厚生省衛生局食品保健課長通知：気密性のある容器包装詰め要冷蔵食品に係る取扱いについて、平成 11 年 8 月 30 日、衛食第 120 号 (1999).
- 3) 厚生省生活衛生局：食品、添加物等の規格基準、昭和 34 年 12 月 28 日、厚生省告示 370 号 (1962).
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長、監視安全課長通知：容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について、平成 15 年 6 月 30 日、食基発第 0630002 号/食監発第 0630004 号 (2003).

表1. 「ういろう」の原材料

メーカー	原材料(製品に記載された内容)
1	小麦粉など
2	米粉、小麦澱粉、砂糖、イソマルトオリゴ糖、調味料(アミノ酸):こしあん、抹茶、着色料
3	小麦、砂糖、でんぷん:白豆、小豆、桜葉、栗、リンゴ、抹茶
4	米粉、砂糖、水飴:日向夏みかん

表2. 「ういろう」の包装形態

メーカー	包装形態
1	紙で包んだのみ
2	耐熱性フィルムに充填
3	紙で包装したものをフィルムで気密包装
4	耐熱性フィルムで包装

表3. 市販「ういろう」におけるボツリヌス菌添加実験対象製品の選定

メーカー	no.	名称	pH	Aw	一般細菌数 cfu/g	耐熱性好気性菌 cfu/g	クロストリジア cfu/g	賞味期間 製造日~
1	1	小倉ういろう	6.25	0.974	1.3×10^3	3.3×10	10未満	3日
	2	抹茶ういろう	5.75	0.975	3.8×10^4	10未満	10未満	
	3	栗ういろう	5.79	0.968	4.8×10^2	5.4×10	10未満	
	4	こしあんういろう	6.10	0.969	1.1×10^3	5.6×10	10未満	
	5	白ういろう	5.74	0.971	3.1×10^2	10未満	10未満	
2	6	しろういろう	4.79	0.967	10未満	10未満	10未満	1ヶ月
	7	抹茶ういろう	5.01	0.969	10未満	10未満	10未満	
	8	上がりういろう	5.16	0.961	10未満	10未満	10未満	
	9	くろういろう	5.14	0.964	10未満	10未満	10未満	
	10	さくらういろう	4.93	0.967	10未満	10未満	10未満	
3	11	一口外郎小豆	6.34	0.965	2.0×10^4	1.8×10	10未満	3週間
	12	一口外郎抹茶	6.28	0.979	2.4×10^3	10未満	10未満	
	13	一口外郎柚子	6.15	0.981	10未満	10未満	10未満	
	14	一口外郎りんご	5.53	0.985	10未満	10未満	10未満	
	15	一口外郎さくら	6.09	0.984	10未満	10未満	10未満	
	16	一口外郎栗	6.21	0.984	10未満	10未満	10未満	
4	17	黒	5.72	0.978	1.6×10^6	6.1×10^3	10未満	1週間
	18	白	6.36	0.984	6.2×10^5	6.3×10^3	10未満	
	19	日向夏	6.13	0.983	6.8×10^5	2.8×10^3	10未満	

表4. 供試試料の総重量と包装素材

食品 記号	製品	総重量, g	容器
A	ういろう	170	塩化ビニリデン
O	ういろう白	160	フィルム
K	くず餅	350	ポリエチレン, ポリアミノ
M	蒸しきんつば	350	バリアナイロン

表5. 供試試料の原材料

品目	一般名	原材料(製品に記載された内容)
A	ういろう	米粉、小麦澱粉、砂糖、イソマルトオリゴ糖、こしあん、調味料*(アミノ酸等) *グリシン, フマル酸ナトリウム, コハク酸
O	ういろう白	米粉、砂糖、葛粉、メタリン酸ナトリウム
K	くず餅	小麦澱粉, グリシン
M	蒸しきんつば	小豆, 砂糖, 小麦粉, 塩

表6. 接種用ボツリヌス菌芽胞液の芽胞数

食品 記号	芽胞混合液の cfu/ml	添加中に3回計測した芽胞数		
		CFU/20 μ l		
A, O	9.5×10^7	1.9×10^6	2.7×10^6	2.2×10^6
K, M	1.7×10^7	4.9×10^5	5.9×10^5	5.7×10^5

表7. 供試試料のAwおよびpH

食品 記号	検体 no.	Aw	pH
A	46	0.96	5.1
	47	0.96	5.1
	48	0.96	5.1
O	46	0.96	4.9
	47	0.96	4.8
	48	0.97	4.8
K	46	0.98以上	5.4
	47	0.98以上	5.4
	48	0.98以上	5.4
M	46	0.96	7.0
	47	0.96	7.0
	48	0.97	7.0

表8. 食品A[いろいろ]の検査結果概要

区分	検体処理内訳				理化学・細菌試験結果						
	処理内容	袋数	No.	試験項目	保存日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC, cfu/g	Clt. cfu/g	毒素型
	無処理	3	46	理化学試験	0日	NT	5.1	0.96	NT	NT	NT
			47				5.1	0.96			
			48				5.1	0.96			
A	無処理	3	40 41 42	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	陰性 陰性 陰性
B	無処理	3	43 44 45	保存試験 (未開封)	45日	無し 無し 無し	5.2 5.3 5.2	NT	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	陰性 陰性 陰性
C	開封芽胞非接種	3	34 35 36	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	5.2 5.3 5.2	NT	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	NT
D	開封芽胞非接種	3	37 38 39	保存試験 (開封)	45日	無し 無し 無し	5.2 5.2 5.2	NT	10未満 10未満 10未満	10未満 10未満 10未満	陰性 陰性 陰性
E	開封芽胞接種	3	31 32 33	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	5.3 5.3 5.2	NT	10未満 10未満 10未満	3.2×10^3 3.3×10^4 2.5×10^5	NT
F	開封芽胞接種	30	1	細菌試験	45日	無し	5.3	NT	10未満	1.6×10^3	陰性
			2				5.2			1.8×10^3	陰性
			3				5.2			1.9×10^3	陰性
			4				5.2			1.9×10^3	陰性
			5				5.2			2.3×10^3	陰性
			6				5.2			2.7×10^3	陰性
			7				5.2			2.1×10^3	陰性
			8				5.2			2.0×10^3	陰性
			9				5.2			1.4×10^3	陰性
			10				5.2			1.5×10^3	陰性
			11				5.2			2.5×10^3	陰性
			12				5.2			2.8×10^3	陰性
			13				5.2			2.3×10^3	陰性
			14				5.2			2.5×10^3	陰性
			15				5.2			2.4×10^3	陰性
			16				5.2			2.5×10^3	陰性
			17				5.3			2.0×10^3	陰性
			18				5.3			2.4×10^3	陰性
			19				5.3			2.8×10^3	陰性
			20				5.2			2.4×10^3	陰性
			21				5.2			2.0×10^3	陰性
			22				5.2			2.0×10^3	陰性
			23				5.2			1.7×10^3	陰性
			24				5.2			2.6×10^3	陰性
			25				5.2			2.5×10^3	陰性
			26				5.2			1.6×10^3	陰性
			27				5.2			2.5×10^3	陰性
			28				5.2			2.6×10^3	陰性
			29				5.2			2.6×10^3	陰性
			30				5.2			1.8×10^3	陰性

表9 食品O[うしろ白]の検査結果概要

検体処理内訳					理化学・細菌試験結果						
区分	処理内容	袋数	No.	試験項目	保存日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC, cfu/g	Clt. cfu/g	毒素型
	無処理	3	46	理化学試験	0日	NT	4.9	0.96	NT	NT	NT
			47				4.8	0.96			
			48				4.8	0.97			
A	無処理	3	40	細菌試験	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			41						10未満	10未満	陰性
			42						10未満	10未満	陰性
B	無処理	3	43	保存試験	45日	無し	4.9	NT	10未満	10未満	陰性
			44				4.9		10未満	10未満	陰性
			45				4.8		10未満	10未満	陰性
C	開封芽胞非接種	3	34	細菌試験	0日	NT	5.0	NT	10未満	10未満	NT
			35				5.0		10未満	10未満	
			36				5.0		10未満	10未満	
D	開封芽胞非接種	3	37	保存試験	45日	無し	4.9	NT	10未満	10未満	陰性
			38				4.9		10未満	10未満	陰性
			39				4.8		10未満	10未満	陰性
E	開封芽胞接種	3	31	細菌試験	0日	NT	5.0	NT	10未満	1.5 × 10 ⁴	NT
			32				5.0		10未満	2.8 × 10 ⁴	
			33				4.9		10未満	9.1 × 10 ⁴	
F	開封芽胞接種	30	1	細菌試験	45日	無し	4.9	NT	10未満	2.3 × 10 ⁴	陰性
			2				4.9		10未満	2.1 × 10 ⁴	陰性
			3				4.9		10未満	1.8 × 10 ⁴	陰性
			4				4.9		10未満	2.3 × 10 ⁴	陰性
			5				4.9		10未満	2.6 × 10 ⁴	陰性
			6				4.9		10未満	2.9 × 10 ⁴	陰性
			7				4.9		10未満	2.4 × 10 ⁴	陰性
			8				4.9		10未満	1.9 × 10 ⁴	陰性
			9				4.9		10未満	2.2 × 10 ⁴	陰性
			10				4.9		10未満	2.2 × 10 ⁴	陰性
			11				4.9		10未満	2.4 × 10 ⁴	陰性
			12				4.9		10未満	2.2 × 10 ⁴	陰性
			13				4.9		10未満	2.2 × 10 ⁴	陰性
			14				4.9		10未満	1.9 × 10 ⁴	陰性
			15				4.9		10未満	1.9 × 10 ⁴	陰性
			16				4.9		10未満	2.5 × 10 ⁴	陰性
			17				4.9		10未満	2.4 × 10 ⁴	陰性
			18				4.9		10未満	2.8 × 10 ⁴	陰性
			19				4.9		10未満	1.7 × 10 ⁴	陰性
			20				4.9		4.7 × 10 ⁴	2.3 × 10 ⁴	陰性
21	4.8	10未満	2.6 × 10 ⁴	陰性							
22	4.8	10未満	1.6 × 10 ⁴	陰性							
23	4.8	10未満	9.3 × 10 ³	陰性							
24	4.9	10未満	2.2 × 10 ⁴	陰性							
25	4.8	10未満	2.1 × 10 ⁴	陰性							
26	4.8	10未満	3.0 × 10 ⁴	陰性							
27	4.8	7.8 × 10 ⁴	2.2 × 10 ⁴	陰性							
28	4.8	10未満	2.8 × 10 ⁴	陰性							
29	4.8	10未満	2.7 × 10 ⁴	陰性							
30	4.8	10未満	1.6 × 10 ⁴	陰性							

表10. 食品K[くず餅]の検査結果概要

検体処理内訳						理化学・細菌試験結果						
区分	処理内容	袋数	No.	試験項目	保存日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC, cfu/g	Clt, cfu/g	毒素型	
	無処理	3	46	理化学試験	0日	NT	5.4	0.98以上	NT	NT	NT	
			47				5.4	0.98以上				
			48				5.4	0.98以上				
A	無処理	3	40	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性	
			41						10未満	10未満	陰性	
			42						10未満	10未満	陰性	
B	無処理	3	43	保存試験 (未開封)	90日	無し	5.3	NT	10未満	10未満	陰性	
			44		90日	無し	5.3		10未満	10未満	陰性	
			45		90日	無し	5.2		10未満	10未満	陰性	
C	開封芽胞非接種	3	34	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	5.4	NT	10未満	10未満	NT	
			35						5.3	10未満		10未満
			36						5.3	10未満		10未満
D	開封芽胞非接種	3	37	保存試験 (開封)	90日	無し	5.5	NT	10未満	10未満	陰性	
			38		90日	無し	5.4		4.0 × 10 ⁴	10未満	陰性	
			39		90日	無し	5.3		10未満	10未満	陰性	
E	開封芽胞接種	3	31	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	5.3	NT	10未満	8.5 × 10 ⁴	NT	
			32						10未満	5.3 × 10 ⁴		
			33						10未満	6.5 × 10 ⁴		
F	開封芽胞接種	30	1	添加保存試験	30日	無し	5.7	NT	10未満	5.0 × 10 ⁴	陰性	
			2		30日	無し	5.4		10未満	5.4 × 10 ⁴	陰性	
			3		30日	無し	5.4		2.5 × 10 ⁴	4.0 × 10 ⁴	陰性	
			4		30日	無し	5.5		10未満	3.7 × 10 ⁴	陰性	
			5		30日	無し	5.4		10未満	4.9 × 10 ⁴	陰性	
			6		30日	無し	5.4		10未満	4.5 × 10 ⁴	陰性	
			7		30日	無し	5.3		10未満	4.3 × 10 ⁴	陰性	
			8		30日	無し	5.3		10未満	5.1 × 10 ⁴	陰性	
			9		30日	無し	5.4		10未満	2.9 × 10 ⁴	陰性	
			10		30日	無し	5.3		10未満	3.1 × 10 ⁴	陰性	
			11		30日	無し	5.3		10未満	2.9 × 10 ⁴	陰性	
			12		30日	無し	5.3		10未満	4.4 × 10 ⁴	陰性	
			13		30日	無し	5.3		10未満	4.3 × 10 ⁴	陰性	
			14		30日	無し	5.3		4.5 × 10 ⁴	3.9 × 10 ⁴	陰性	
			15		30日	無し	5.3		10未満	5.1 × 10 ⁴	陰性	
			16		30日	無し	5.3		10未満	3.5 × 10 ⁴	陰性	
			17		30日	無し	5.3		10未満	3.3 × 10 ⁴	陰性	
			18		30日	無し	5.3		10未満	4.3 × 10 ⁴	陰性	
			19		30日	無し	5.3		2.9 × 10 ⁴	4.4 × 10 ⁴	陰性	
			20		30日	無し	5.3		10未満	5.5 × 10 ⁴	陰性	
21	30日	無し	5.3	10未満	5.0 × 10 ⁴	陰性						
22	30日	無し	5.3	10未満	4.3 × 10 ⁴	陰性						
23	30日	無し	5.3	10未満	4.2 × 10 ⁴	陰性						
24	30日	無し	5.3	10未満	3.7 × 10 ⁴	陰性						
25	90日	無し	5.4	10未満	3.5 × 10 ⁴	陰性						
26	90日	無し	5.3	10未満	5.3 × 10 ⁴	陰性						
27	90日	無し	5.2	7.5 × 10 ⁴	2.9 × 10 ⁴	陰性						
28	90日	無し	5.2	7.4 × 10 ⁴	4.0 × 10 ⁴	陰性						
29	90日	無し	5.2	2.5 × 10 ⁴	3.7 × 10 ⁴	陰性						
30	24日	無し	5.2	10未満	3.0 × 10 ⁴	陰性						

表 11. 食品M[蒸し金つば]の検査結果概要

検体処理内訳				理化学・細菌試験結果							
区分	処理内容	袋数	No.	試験項目	保存 日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC, cfu/g	Clt, cfu/g (実数)	毒素型
	無処理	3	46	理化学試験	0日	NT	7.0	0.96	NT	NT	NT
			47								
			48								
A	無処理	3	40	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	10未満	陰性
			41						10未満	10未満	陰性
			42						10未満	10未満	陰性
B	無処理	3	43	保存試験 (未開封)	90日	無し	6.8	NT	10未満	10未満	陰性
			44		90日	無し	6.8		10未満	10未満	陰性
			45		90日	無し	6.8		10未満	10未満	陰性
C	開封芽胞非接種	3	34	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	6.9	NT	10未満	10未満	NT
			35						10未満	10未満	
			36						10未満	10未満	
D	開封芽胞非接種	3	37	保存試験 (開封)	90日	無し	6.7	NT	10未満	10未満	陰性
			38		90日	無し	6.8		10未満	10未満	陰性
			39		90日	無し	6.8		10未満	10未満	陰性
E	開封芽胞接種	3	31	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	6.9	NT	10未満	4.5 × 10 ⁶	NT
			32						10未満	2.0 × 10 ⁶	
			33						10未満	10未満	
F	開封芽胞接種	30	1	添加保存試験	28日	無し	7.0	NT	10未満	7.8 × 10 ⁶	陰性
			2		28日	無し	6.9		10未満	10未満	陰性
			3		28日	無し	7.0		10未満	10未満(1)	陰性
			4		35日	無し	6.9		10未満	10未満(1)	陰性
			5		35日	無し	6.9		10未満	5.3 × 10 ⁶	陰性
			6		35日	無し	6.9		10未満	10未満(1)	陰性
			7		35日	無し	6.9		10未満	8.8 × 10 ⁶	陰性
			8		35日	無し	6.9		10未満	10未満	陰性
			9		35日	無し	6.9		10未満	5.5 × 10 ⁶	陰性
			10		35日	無し	6.9		10未満	10未満	陰性
			11		35日	無し	6.9		10未満	2.0 × 10 ⁶	陰性
			12		35日	無し	6.9		10未満	2.8 × 10 ⁶	陰性
			13		35日	無し	6.9		10未満	4.6 × 10 ⁶	陰性
			14		35日	無し	6.9		10未満	2.0 × 10 ⁶	陰性
			15		35日	無し	6.9		10未満	10未満(1)	陰性
			16		35日	無し	6.9		10未満	10未満(3)	陰性
			17		35日	無し	6.9		10未満	1.1 × 10 ⁶	陰性
			18		35日	無し	6.9		10未満	1.8 × 10 ⁶	陰性
			19		35日	無し	6.9		10未満	10未満(9)	陰性
			20		35日	無し	6.9		10未満	10未満	陰性
			21		35日	無し	6.9		10未満	10未満(1)	陰性
			22		35日	無し	7.0		10未満	2.4 × 10 ⁶	陰性
			23		35日	無し	6.9		10未満	10未満	陰性
			24		90日	無し	6.7		10未満	10未満	陰性
			25		90日	無し	6.8		10未満	10未満(3)	陰性
			26		90日	無し	6.8		10未満	10未満(1)	陰性
			27		90日	無し	6.8		10未満	3.6 × 10 ⁶	陰性
			28		90日	無し	6.7		10未満	10未満(7)	陰性
	欠番										
			30		21日	無し	6.9		10未満	10未満	陰性

表12. 接種用ボツリヌス菌芽胞液の芽胞数

食品記号	2回を平均したクロストリジヤ数, CFU			
	× 3	× 30	× 300	× 3000
M-1 本体	∞	80	5	検査せず
M-1 容器	∞	∞	91	10
M-2 本体	0	0	0	検査せず
M-2 容器	0	0	0	0
M-3 本体	1	0	0	検査せず
M-3 容器	∞	37	7	0

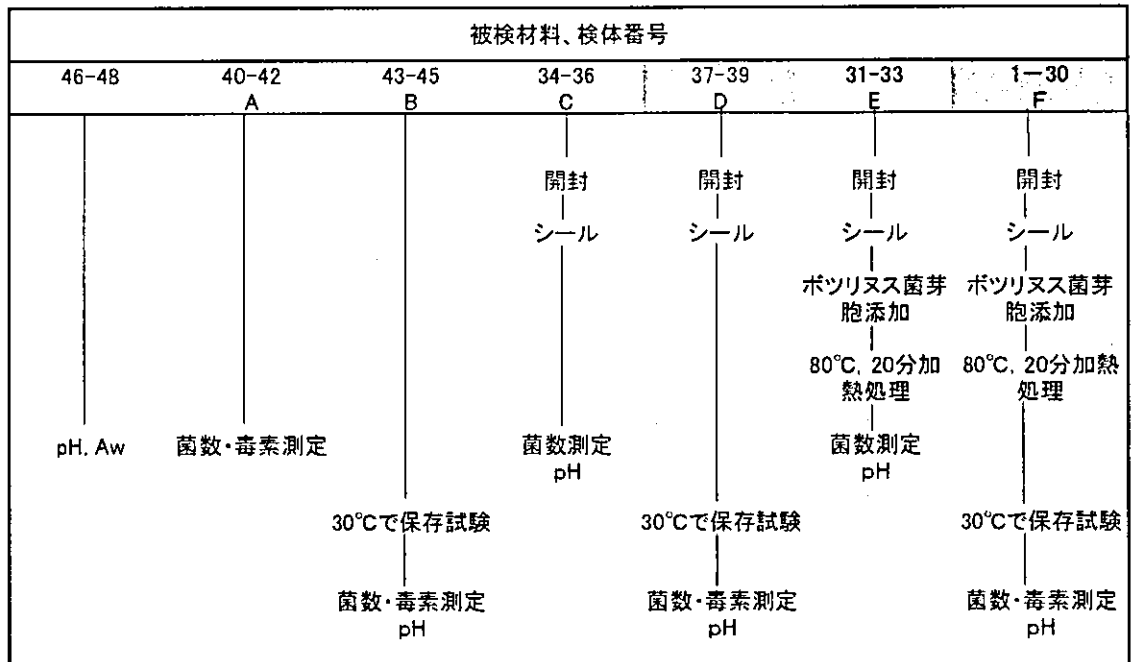


図1 被検材料の検体番号と実験過程

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

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

分担研究者	浅尾 努	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	久米田裕子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	河合高生	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	古田雅一	大阪府立大学先端科学研究所

研究要旨

ボツリヌス菌汚染の可能性が危惧される香辛料は、容器包装詰低酸性食品にも広く使用されており、当該食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価の重要なターゲットの一つである。香辛料のボツリヌス菌汚染実態を正確に把握するためにはその検査法の確立が必須である。多種多様な形態を有する香辛料からボツリヌス菌を効率良く検出するため、抽出液には蒸留水の代わりに 50%エタノールを、残渣除去のためにはストマフィルターに加えて 500 メッシュフィルター濾過を行った。セロリ、タイム、フェヌグreekの殺菌粉末へのボツリヌス菌芽胞の添加回収試験で約 50%の回収率が得られた。この改良検査法により、未殺菌香辛料 36 検体のうち、中国産ジンジャーから I 群の B 型ボツリヌス菌、インド産ジンジャーから C/D 型（キメラ型）ボツリヌス菌を分離した（汚染率 5.6%）。クロストリジアの汚染は高率（32/36、89%）であったが、汚染菌数は 1 CFU/g~ 4.8×10^3 CFU/g と少なかった。ボツリヌス菌汚染があったジンジャーのクロストリジア数は、それぞれ 2 CFU/g および 20 CFU/g であった。殺菌香辛料 3 検体からはボツリヌス菌は検出されず、クロストリジアも 1 CFU/g 未満であった。

容器包装詰低酸性食品へのボツリヌス菌芽胞の接種試験を実施した。実験に供した「蒸かし黒豆」はボツリヌス菌の増殖が可能な理化学的性状（水分活性 0.97、pH 6.7）を有していた。ボツリヌス菌を接種した 30 検体中 2 検体で、保存 12 日目にガス発生のために容器の膨張が観察された。膨張しなかった残りの 28 検体から無作為に抽出した 3 検体も、膨張した検体と同様にボツリヌス菌の増殖および毒素産生が起こった。容器の膨張とは無関係に、いずれの食品もボツリヌス菌数は $10^7 \sim 10^8$ CFU/g オーダーに達した。検出した毒素は B 型単独の 1 検体を除いて、他の 4 検体はすべて A 型+B 型であり、その毒力は約 $10^4 \sim 10^5$ マウス iPLD₅₀/g であった。酵素抗体法で毒素量を測定した結果、5 検体とも B 型毒素の方が多く検出され、A 型と B 型の毒素比は 1 : 1.3~1 : 121 と大きく異なった。しかし、汚染実態調査の結果はボツリヌス菌陰性であり、現時点でのボツリヌス食中毒に対するリスクは低いと考えられる。「切り餅」もボツリヌス菌の増殖が可能な理化学的性状（水分活性 0.98、pH 5.4）を有していたが、保存 68 日目まではボツリヌス菌の増殖および毒素産生は認められなかった。

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実施するためには、市販製品だけではなくその原材料の汚染実態を把握することも重要である。平成 15 年度の調査結果から、食品の原材料として広く使用されている香辛料のうち、特に未殺菌の香辛料は高率にボツリヌス菌芽胞等に汚染されていることが明らかとなった。今年度は、香辛料中のボツリヌス菌芽胞の抽出法の改良を行い、当該菌の汚染実態調査をさらに推進することを目的とした。

容器包装詰低酸性食品に該当する「切り餅」と「蒸かし黒豆」の安全性を確認する目的で、ボツリヌス菌の接種試験（チャレンジテスト）を実施した。食品中に産生されたボツリヌス毒素を定量する目的で酵素抗体法を検討した。

B. 研究方法

1. 供試検体

実験に供した香辛料 39 検体は香辛料加工メーカーから無償提供を受けた。香辛料の種類は 22 品目で、その原産地は 14 ヶ国であり、未殺菌の香辛料は 36 検体であった。香辛料中のボツリヌス菌の有無およびクロストジア数の測定を実施した。培養上清中のボツリヌス毒素を確認した検体からは、PCR による培養液中の毒素遺伝子の確認と菌の分離も実施した。

ボツリヌス菌のチャレンジテストに使用した「切り餅」と「蒸かし黒豆」は、厚生労働省を通じて業者から購入した。「切り餅」は 2005 年 1 月 28 日製造で、賞味期限は 2005 年 4 月 27 日（90 日間）であった。「蒸かし黒豆」の賞味期限は 2005 年 3 月 12 日で、これは製造後 90 日目に該当する（厚生労働省の調査）。

1. 試薬および培地等

1) ペプトン加生理食塩水

ペプトン(BACTO Peptone, DIFCO) 1.0 g および

塩化ナトリウム 8.5 g を精製水 1,000 ml に溶解後に、121℃で 15 分間オートクレーブした（pH は 7.0 ± 0.1）。

2) 標準寒天培地（栄研）

培地粉末 23.5 g を蒸留水 1,000 ml に加温溶解し、121℃で 15 分間オートクレーブした。

3) クロストリジア培地（ニッスイ）

(A) 培地粉末 70.3 g を蒸留水 1,000 ml に加温溶解し、121℃で 15 分間オートクレーブした。これを約 55℃に保ち、あらかじめ検体 10 ml を分注した滅菌パウチに 15 ml 注入し、検体と混合した後、気泡を取り除いて首部をシーラーで溶封した（香辛料中の菌数測定用）。

(B) 培地粉末 42.2 g を蒸留水 1,000 ml に加温溶解し、121℃で 15 分間オートクレーブした。これを約 55℃に保ち、あらかじめ検体 1 ml を分注した滅菌パウチに 20 ml 注入し、検体と混合した後、気泡を取り除いて首部をシーラーで溶封した（添加実験での菌数測定用）。

(C) 缶詰協会の検査（初発菌数等の測定用）では、培地粉末 46.9 g を蒸留水 1,000 ml に加温溶解し（定法の 2/3 の量）、121℃で 15 分間オートクレーブした。

4) クロストリジア測定用滅菌パウチ

大阪府立公衆衛生研究所での検査には P. T. パウチ（酒見医療器具）を、缶詰協会での検査にはアネロビックパウチを使用した。

5) クックドミート培地

クックドミート培地 (DIFCO) は 0.3% ブドウ糖および 0.2% 可溶性澱粉を加え、121℃で 15 分間オートクレーブした。

6) ゼラチン緩衝液

ゼラチン (2.0 g) と $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (4.0 g) を蒸留水 900 ml に溶解し、1N の塩酸で pH を 6.2 に調整した後、蒸留水を加えて 1,000 ml にした。121℃で 15 分間オートクレーブして冷蔵庫で保管した。

必要に応じてペニシリン 300 U/ml やストレプトマイシン 0.5 mg/ml を加えた。

7) 診断用抗毒素血清

ボツリヌス毒素の型別用抗毒素血清 A 型～G 型 (千葉県血清研究所) を使用した。

8) マウス

ddY (クリーン、日本 SLC)、約 20 g (4～5 週齢) の雄を使用した。

9) pH メーター

HORIBA 製の F-12 を使用した。pH を測定するための電極は専用とし、実験途中はアルコール等で消毒した。電極は少なくとも 2 本用意し、使用した電極は実験終了時にオートクレーブ (121℃、30 分間) した後に廃棄した。

10) 水分活性測定装置

ロトロニック製の HYGRO-LAB を使用した。

11) ステンレス・フィルター金網

500 メッシュフィルター (T500: オープニング 25 μ m、八尾金網製作所) をピフネルロートに装着した後、121℃で 15 分間オートクレーブした。

12) ストマッカー用滅菌ポリエチレン袋

ストマフィルターS タイプ (フィルターのポアサイズ 40 μ m、栄研器材) を使用した。

3. 香辛料中のボツリヌス菌検査法

ボツリヌス菌抽出法の検討: 以下の方法で回収試験を実施した。

(A) セロリ、タイム、フェヌグリーク (殺菌粉末) 25 g をストマフィルターに秤量した。

(B) ボツリヌス菌芽胞 (62A: NFPA、 2.0×10^9 /ml) を希釈し、その 0.1ml を添加 (2.0×10^4) した。

(C) 50%エタノール 100 ml を加え 2 分間ストマッキングした。

(D) シーラーで溶封した後、1 時間の間に数回激しく混合した。

(E) ストマフィルターの濾過液をピフネルロートに装着した 500 メッシュフィルターで濾過した (図 1)。

(F) 遠心管 (50 ml) に濾過液を採取し、3,000 回転、20 分間、20℃で遠心した。

(G) 上清をデカントで捨て、40 ml/遠心管の滅菌蒸留水で洗浄した。

(H) 3,000 回転、20 分間、20℃で遠心した。

(I) 上清をデカントで捨て、蒸留水 4 ml で懸濁した。

(J) ボツリヌス菌数を、上記のクロストリジア培地によるパウチ法で測定し、回収率を算定した。

2) 抽出液の培養法

上記の方法で得られた抽出液約 1 ml ずつを 4 本のクックドミート培地に接種し、2 本はそのまま、残りの 2 本は 70℃で 10 分間加熱処理した。30℃で 7 日間嫌気培養後、培養液を 15,000 回転、10 分間、4℃で遠心した。遠心上清をゼラチン緩衝液で 5 倍希釈後に、トリプシンで活性化処理してマウス腹腔内に接種した。マウスは 4 日間観察し、毒素が検出されなかった検体はボツリヌス菌陰性とした。

マウス法で毒素陽性となったクックドミート培養液中のボツリヌス菌の存在を確認するために、PCR を実施した。クックドミート培養液 1 ml を 12,000 回転で 5 分間遠心、沈渣を滅菌生理食塩水で洗浄した。沈渣を 50 μ l の 0.1% Tween20-TE に懸濁、100℃で 10 分間加熱後、その遠心上清を DNA テンプレートとした。プライマーは武士らが報告したものを、Taq DNA ポリメラーゼは Z-Taq (タカラ) を使用した。反応条件は初期変性 94℃、5 分間で、(98℃、5 秒; 55℃、5 秒; 72℃、10 秒) で 30 サイクル、最後に 72℃、5 分間の伸長反応であった。PCR 産物は 2%アガロースで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色した。

4. 市販食品へのボツリヌス菌芽胞チャレンジテスト

1) 供試菌株

A 型: 62A (ATCC7948)、62A (NFPA、米国缶詰協会)、

36A

B 型 : 213B、Okura

2) 芽胞液の調製

本研究班の分担研究者が所属する帯広畜産大学で作製した。

3) 芽胞液の菌数測定

供試菌株の芽胞液 0.5 ml に滅菌ペプトン加生理食塩水 4.5 ml を加え、80℃で 20 分間加熱処理した。この液をさらに同加生理食塩水 (9 ml 入り) で 10 倍階段希釈した。滅菌アネロビックパウチ 2 枚のそれぞれに、55℃に保温しておいたクロストリジア測定用培地 15 ml を分注した後、各希釈液 1 ml ずつを加え、よく混和した後に固化した。パウチは 35℃で 24 時間培養後に発生した黒色集落を算定した。

4) 接種用芽胞液の調製

芽胞数が約 10^7 CFU/ml になるよう希釈した芽胞液を等量ずつ混合した。芽胞液は接種直前に 80℃で 20 分間加熱処理した。

5) 接種方法 (図 2)

(A) 供試試料の表面をアルコールで消毒し、ゴムシール (サン科学) を貼った。

(B) 貼り付けたゴムシール表面をアルコールで消毒した後、芽胞液を $20\mu\text{l}$ ずつ接種した。

(C) 接種面をアルコールで消毒し、接種部位に生じた針穴の上にゴムシールを貼った。

6. 食品の保存と試験法

ボツリヌス菌の取り扱い、移動、保管等は大阪府立公衆衛生研究所の安全管理規定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った。使用したピペット等の実験器具は 0.1%次亜塩素酸ナトリウムに浸漬し、実験後に速やかに 121℃で 30 分間オートクレーブした。

1) 食品の保存

芽胞を接種した「蒸し黒豆」は破裂による汚染防止のため、個別に滅菌ストマッカー袋に入れ (図 3-1)、シールした。「切り餅」は個包装切り餅が入っていた大袋に入れシールした (図 3-2)。これを

滅菌可能なステンレス製の缶に入れて、30℃に温度設定した全温度培養器 (ESPEC、LNL-121) で保存した。保存期間中にガス発生により容器がじゅうぶんに膨張した後に 4℃の冷蔵庫に移した。

2) 一般生菌数の測定

食品の全量が無菌的にストマフィルターにとり、等重量の滅菌蒸留水を加え、ストマッカー処理したものを試料原液 (検体の 2 倍希釈液) とした。pH 測定用として 20 ml、毒素試験用として 10 ml を滅菌試験管に採取した。毒素試験用試料は実験に供するまで -20℃で冷凍保存した。試料原液 20 ml にペプトン加生理食塩水を 80 ml 加え 10 倍希釈液を作製した後、ペプトン加生理食塩水で 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 で混和した。培地が固化した後、同培地を重層して乾燥させ、 $35\pm 1.0^\circ\text{C}$ で 48 ± 3 時間培養した。陰性対照として、検体の希釈に用いたペプトン加生理食塩水 1 ml を培地に混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養した。

3) クロストリジア数の測定

一般生菌数の測定時に作製した 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、55℃で保持したクリストリジア寒天培地 (A ; 試薬および培地参照) 約 15 ml をこれに加え、よく混合し、熱シールした後、冷却固化させる。 $35\pm 1.0^\circ\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養した。最終的には 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ペプトン加生理食塩水 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。ま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、55℃で保持したクリストリジア寒天培地 (B ; 試薬および培地参照) 約 20 ml をこれに加え、上記の方法で培養した。(大阪府立公衆衛生研究所)。

4) pH 測定

同一試料を 3 回ずつ測定し、その平均値を算出し

た。

5) 毒素の中和試験

試料原液は毒素試験に供するまで、 -20°C で保存する。解凍後に 3,000 rpm、 4°C で 10 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 4 日間観察した。ボツリヌス毒素に特有の症状を示してマウスが死亡した場合は表 1 の方法に従って中和試験を行った。試料はゼラチン緩衝液で、抗毒素血清は滅菌生理食塩水で希釈した。

6) マウス法による毒素の定量試験

試料 0.1 ml をマウス尾静脈内に注射し、死亡するまでの時間を測定することにより、換算式から $\text{ipLD}_{50}/\text{ml}$ を算出した。

7) 酵素抗体法 (ELISA) による毒素の定量試験

抗体の作製：トキシノイド化した A 型および B 型ボツリヌス神経毒素をそれぞれウサギに免疫し、protein G カラム (Amersham Biosciences Corp.) を用いて各抗血清から IgG 画分を精製した (ウサギ抗 A 型 BoNT IgG、ウサギ抗 B 型 BoNT IgG)。EZ-Link NHS-PEO₄-Biotin (Pierce) を用いて IgG 画分をビオチン標識した。診断用ボツリヌスウマ抗毒素 (A 型) を、protein G カラム (Amersham Biosciences Corp.) で精製した (ウマ抗 A 型 BoNT IgG)。

ELISA のシステム：ELISA 用のプレートには TopYield ストリップ (Nalge Nunc International) を使用した。洗浄には 0.05% Tween20-5 mM EDTA 加 TBS (50 mM、pH 7.6) 緩衝液を使用した。炭酸ナトリウム緩衝液 (50 mM、pH 9.6) で希釈したウマ抗 A 型 BoNT IgG ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) あるいはウサギ抗 B 型 BoNT IgG ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) を $30\mu\text{l}$ ずつ加え、 4°C で一晩静置することによりプレートに固相化した。プレートを 3 回洗浄し、洗浄液で 5 倍希釈したブロックケース (大日本製薬) $200\mu\text{l}$ を各ウェルに加え、 37°C で 1 時間静置することによりブロッキングした。3 回洗浄した後、被検液を $30\mu\text{l}$ ずつ加えて 37°C で 1 時間静置した。再び 3 回洗浄した後、ビオチン標

識ウサギ抗 A 型 BoNT IgG あるいはビオチン標識ウサギ抗 B 型 BoNT IgG を各ウェルに $30\mu\text{l}$ ずつ加えて 37°C で 1 時間静置した。洗浄液で 3 回洗浄し、1 万倍希釈した NeutrAvidin Horseradish Peroxidase Conjugated (Pierce) を各ウェルに $30\mu\text{l}$ ずつ加えて 37°C で 30 分間静置した。洗浄液で 3 回洗浄し、酵素基質溶液 (TMBZ) を各ウェルに $50\mu\text{l}$ ずつ加えて室温で 30 分間静置した。1 M リン酸を $50\mu\text{l}$ ずつ加えて反応を停止した後、マイクロプレートリーダーで吸光度 (波長 450 nm) を測定した。

G. 研究結果

1. 香辛料中のボツリヌス菌検査法の改良

平成 15 年度の結果から、吸水性の高い香辛料は少量の蒸留水でボツリヌス菌芽胞を抽出するのは困難であることがわかった。特にフェヌグリークでは 25 g に 100 ml の蒸留水を加えても、液層はほとんど回収できなかった。蒸留水の代わりに 50%エタノールを使用すると約 70 ml の液層が得られた。この方法により、今年度検査した香辛料 39 検体 (22 品目) での液層の回収率は、少なくとも 50%以上であった (表 2-1~表 2-4)。またセロリ、タイム、フェヌグリークの殺菌粉末を用いたボツリヌス菌芽胞の添加回収試験で約 50%の回収率が得られた (表 3)。香辛料の多くの残渣がストマフィルターを通過したために、肉眼的に 500 メッシュフィルター濾過が必要と認められたのは 39 検体中 15 検体であった。このうち 9 検体で 500 メッシュフィルター濾過が有効であった。

2. 香辛料のボツリヌス菌およびクロストリジアの汚染状況 (表 2-1~表 2-4)

検査した未殺菌香辛料 36 検体のうち、中国産ジンジャー・スライス (図 4-1) から I 群の B 型菌、インド産ジンジャー・原型 (図 4-2) から C/D 型 (キメラ型) 菌を分離した (汚染率 5.6%)。毒素が検出された増菌培地中からは、PCR 法により毒素遺伝