

子も確認できた。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 ~  $4.8 \times 10^3$  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、2 CFU/g および 20 CFU/g と少なかった。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。

### 3. 接種試験に供した試料の理化学的性状

「蒸かし黒豆」の水分活性は 0.97 で pH は 6.6 ~ 6.7、「切り餅」の水分活性は 0.98 で pH は 5.4 であった。

### 4. ELISA の検討結果

精製 A 型および B 型ボツリヌス神経毒素 (大阪府立大学から分与) を用いて作成した検量線を図 5 に示した。定量下限を毒素濃度が 0 ng/ml の吸光度の 2 倍と定めた場合、A 型および B 型ボツリヌス神経毒素の検出感度はそれぞれ 0.2 ~ 0.5 ng/ml、0.1 ~ 0.3 ng/ml であった。A 型毒素の測定系で濃度が 25 ng/ml の精製 B 型神経毒素、B 型毒素の測定系で濃度が 25 ng/ml の精製 A 型神経毒素は、交差反応を示さなかった。菌を接種していない「蒸かし黒豆」は試料原液の 4 倍希釈液をサンプルとした場合でも非特異反応は認められなかった。

### 5. チャレンジテストの結果

#### 1) 「蒸かし黒豆」(賞味期限 2005 年 3 月 12 日): 2 月 2 日から実験開始

保存 0 日の 3 検体の陰性対照は、一般生菌数およびクロストリジア数は 10 CFU/g 未満であり、いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった (表 4)。保存陰性対照である開封および未開封検体それぞれ 3 検体は、保存 49 日目でも容器の膨張はなく、一般生菌数およびクロストリジア数は 10 CFU/g 未満であり、いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった。

ボツリヌス菌芽胞を  $10^3 \sim 10^4$  CFU/g のオーダーで接種した 30 検体のうち、保存 12 日目では 2 検体の

みで容器の明確な膨張が観察された。保存 34 日目でも他の 28 検体には明瞭な容器の膨張は観察できなかった。容器の膨張がなかった検体から無作為に抽出して検査した 3 検体でも、容器の膨張した検体と同様に pH が上昇する傾向にあった。毒素も容器の膨張とは無関係に産生され、その毒力は  $10^4 \sim 10^5$  マウス ipLD<sub>50</sub>/g であった。検出した毒素は B 型単独が 1 検体で、残りの 4 検体は A 型+B 型であった。

5 検体ともボツリヌス菌数は  $10^7 \sim 10^8$  CFU/g まで増加した (表 4)。一般生菌数は 10 CFU/g 未満であった。A 型および B 型 7S 毒素を使用した ELISA 法の標準曲線 (図 5) から、「蒸かし黒豆」中に産生された毒素量と、その比率を計算した。全検体で B 型の毒素が多く検出され、しかも A 型と B 型の毒素比は 1 : 1.3 ~ 1 : 121 の範囲で大きく異なった (表 5)。なおボツリヌス菌を接種した残りの 25 検体は、保存した 70 日目でも容器の膨張は観察されなかった。

#### 2) 「切り餅」(賞味期限 2005 年 4 月 27 日): 2 月 8 日から実験開始

保存 0 日の 3 検体の陰性対照は、一般生菌数およびクロストリジア数は 10 CFU/g 未満であり、いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった (表 6)。保存陰性対照である開封および未開封それぞれ 3 検体は保存 68 日目までは、いずれも容器の膨張は観察されなかった。

ボツリヌス菌芽胞を  $10^3$  CFU/g のオーダーで接種した 30 検体は、保存 68 日目でも明瞭な容器の膨張は観察されなかった。保存 28 日目に無作為に抽出して検査した 5 検体の一般生菌数は 10 CFU/g 未満であった。クロストリジア数は  $10^4$  CFU/g オーダーと顕著な増殖は認められず、ボツリヌス毒素も検出されなかった。「切り餅」の pH は、約 0.2 低下した 1 検体を除いて変化はなかった。保存期間の中間点でも (68 日目) 容器の膨張、毒素の産生、クロストリジアの増殖は認められなかった。なお保存期間の中間点と最終保存期間との中間点 (100 日目)、

および最終保存期間（135 日目）での検査は継続中である。

#### D. 考察

香辛料（スパイスとハーブ）は約 350 種類あると言われており、80%以上が食品工業用として種々の製品に広く使用されている。香辛料の多くは発展途上国で生産されるため、現地での収穫、乾燥、貯蔵、輸送などの過程で、ボツリヌス菌を含む種々の微生物に汚染される可能性が高い。このため、香辛料は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のための重要なターゲットであると考えられる。香辛料の微生物汚染実態を正確に把握するための検査法を確立することは、リスク評価の精度を高めるために重要である。前年度の結果から以下のような検査法上の問題点が明らかになった。

(1) 香辛料の形態（粉末の粒子の大きさ等）は多様である。(2) 香辛料にはボツリヌス菌の発育を抑制する成分を含有することが知られている。(3) 平成 15 年度に実施した香辛料のボツリヌス菌検査で、粉末や吸水性の高い香辛料から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った。特にガラクトマンナンを高濃度に含有するフェヌグreek は吸水性が高く、液層を得るためには大量の蒸留水を加える必要があった。このような検体では、遠心操作が煩雑になるばかりでなく、ボツリヌス菌芽胞の回収率が低下することは避けられない。

多種多様な香辛料から効率良くボツリヌス菌芽胞を検出できる検査法の改良を今年度の最初の目標とした。従来法からの大きな改良点は、抽出液として滅菌蒸留水の代わりに 50%エタノールを使用したこと、ストマフィルターを通過する微細な香辛料を除去するために 500 メッシュのステンレス製フィルターを使用したことであった。50%エタノール法は、蒸留水法に比べて少量でも液層を効率良く回収することが可能であった。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ので、ボツリヌス菌芽胞は 50%エタノールに長時間（1 時間以上）曝露されても、その発育性に大きな影響は受けなかったと考えられる。これら以外にも 50%エタノール法には以下のような利点があると考えられる。(1) 香辛料に含まれる細菌発育抑制物質（ガーリックのアリシン、タイムのチモール、マスタード・ワサビのアリルイソチアネート、バニラのバリニン、クローブ・オールスパイスのオイゲノール等）の多くは脂溶性であるため、エタノール処理により低減・除去できる。(2) 溶液の比重が低下するので、低速遠心でも芽胞が沈殿しやすくなる。(3) 香辛料では効果がないかも知れないが、夾雑する栄養型の菌を殺菌できる。

平成 16 年度の結果および平成 15 年度の大阪府立公衆衛生研究所と東京都健康安全センターの検査結果から、未殺菌の香辛料はボツリヌス菌芽胞に高率に汚染されていることが明らかとなった（99 検体中 5 検体陽性：汚染率 5%）。平成 16 年度に得られた結果の中で特筆されるのは、ヒトの食中毒の原因となる I 群の B 型菌が分離されたことである。著者らはすでに、昭和 59 年に熊本県で発生したカラシレンコンによるボツリヌス中毒事件の際、3 ロットのカラシ粉のうちカラシレンコンに使用されたものとは異なる 1 ロットから II 群の B 型菌を分離した経験がある。なお検査に使用した検体量は 50 g であった。香辛料は食文化に欠かすことのできない食材であるが、これが容器包装詰低酸性食品に使用され、不適切な加工や保存が行われれば、ボツリヌス中毒に対してリスクの高い食材の一つになると結論された。

香辛料加工工場を視察した結果、現在の日本の香辛料の殺菌方法（気流式過熱蒸気殺菌法が主流）では、香辛料に汚染したボツリヌス菌を含むクロストリジアを完全に死滅させるのは困難であると考えられた。香辛料の殺菌方法として、すでに諸外国で実

施されている放射線の利用も考えざるを得ないかも知れない。放射線殺菌の有用性等について《参考》として本文の最後に記載した。

平成 14 年度にボツリヌス菌のチャレンジテストを実施した不活性ガス充填容器包装詰加圧加熱殺菌食品以外にも、多種多様なレトルト類似食品、あるいは常温保存が可能（冷暗所も含む）であると称される容器包装詰低酸性食品が市場に流通している。今年度はこれらの食品の中から「蒸かし黒豆」と「切り餅」を選択し、ボツリヌス菌芽胞のチャレンジテストを実施した。いずれの食品も水分活性が 0.94 を越え、かつ pH が 4.6 を超える容器包装詰低酸性食品であった。実験に使用した賞味期限が 90 日の「切り餅」は、ボツリヌス菌芽胞接種後に 30℃で 68 日間保存したが、今のところ容器の膨張、菌の増殖、毒素の産生は認められなかった。最終的な安全確認のため、さらに保存試験を継続中である。

「蒸かし黒豆」は保存 12 日目では 2 検体のみで容器の明確な膨張が観察されたが、保存 34 日目でも他の 28 検体には明瞭な容器の膨張は観察できなかった。しかし、無作為に抽出した容器の膨張がなかった 3 検体（34 日間保存）からも、明瞭に容器の膨張した 2 検体（26 日間保存）と同程度の毒素を検出した。容器の膨張の有無とボツリヌス菌の菌数や総毒素量とは無関係であった。A 型毒素が比較的多く検出された検体（No. 8 と No. 28）でのみ容器の明瞭な膨張が観察されたのが特徴的であった。

「蒸かし黒豆」での A 型毒素産生量、すなわち A 型菌の発育性とガス産生による容器の膨張には何らかの関連があると推察された。いずれにしても、容器の膨張の有無がボツリヌス毒素産生の指標とはならないという事実は、たとえ容器の膨張がなくても食品の必要保存期間内の一定の時期に一度は毒素検査等が必要であることをチャレンジテストのプロトコールに付け加える必要があることを示している。ボツリヌス菌を接種した「蒸かし黒豆」から、比較的

早期に  $10^4 \sim 10^5$  マウス ipLD<sub>50</sub>/g の毒素を検出した。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中毒に対するリスクは低いと考えられるが、「蒸かし黒豆」は原材料が何らかの原因でボツリヌス菌芽胞による汚染を受け、その芽胞が製造工程中の加熱不足等の原因で生残すれば、食中毒の原因となる可能性があることを実証した。

## 《参考》

### 1. 香辛料の殺菌の必要性

香辛料は熱帯、亜熱帯地域に産する植物を乾燥することによって調製されるため、その過程において土壌由来の微生物、害虫汚染は避けられない。カビ毒による被害も無視できない。香辛料の汚染微生物のうち、耐熱性有芽胞細菌による汚染が著しい ( $10^5 \sim 10^8$  CFU/g) ので、香辛料を多用するハム、ソーセージなどの食肉加工においては食中毒防止のため香辛料の殺菌は不可欠である。

香辛料の加熱殺菌は熱による香味・色調の劣化のため好ましくない。以前は非加熱殺菌法としてエチレンオキシドガスが利用されていたが、その毒性・発ガン性のため現在では利用が禁止されている。このため現状では、品質劣化を容認した上で気流式過熱蒸気殺菌法が用いられている。

### 2. 冷殺菌法としての放射線照射の有効性

γ線、電子線、エックス線などを農産物や食品に照射すると、腐敗や食中毒の原因となる食品に付着した微生物（細菌、酵母、カビなど）が死滅する。野菜、生鮮果実に照射した場合には成熟、発芽、老化等の生物的变化が抑制される。これらの照射効果を利用した放射線照射技術、いわゆる”食品照射”は、先進諸国を含め世界中で猛威を振るっている食中毒菌に対し、残留性のある薬剤に代わる防除法として、あるいは農作物の防疫に広く用いられてきたオゾン層破壊原因物質である臭化メチルの代替法としての期待が高まっている。1999 年度においてはすでに世界中で 257,000 トンの食品が照射されて

おり、そのうち香辛料の照射は 100,000 トン (39%) を占めている。

$\gamma$ 線、電子線を香辛料に照射した場合、温度を上げることなく効果的な殺菌が可能であり、有芽胞菌に対しては 7~10 kGy の照射により食品衛生法で要求されている 1g 当たり  $10^3$  個以下の菌数が容易に達成できる。またアフラトキシンなどのカビ毒を産生する糸状菌、および大腸菌群に対しては 4 kGy 程度の照射で十分殺菌可能である。香辛料の放射線殺菌は 2002 年 8 月現在、世界中で米国、EU 諸国を含む 45 ヶ国においてすでに許可されており、我が国においても全日本スパイス協会がすでに厚生労働省に要望中である。

### 3. 放射線殺菌された香辛料の品質特性

先にも述べたように加熱殺菌は、過熱水蒸気によるごく短時間の処理であっても香辛料の香味の劣化は避けられない。一方、冷殺菌法として一時香辛料に使われていたエチレンオキサイドガス処理においても顕著な成分劣化が報告されている。筆者らは、わが国で最も流通量の多い黒コショウに  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線を照射し、菌数変化や代表的な香味成分の変動について分析し、無処理および気流式過熱蒸気殺菌法との比較を実施した。食品照射などの放射線利用についての知識普及を目的として毎年夏休みに大手百貨店で開催されている「みんなのくらしと放射線展」の来場者や専門家による官能試験を行った。

微生物検査の結果、 $\gamma$ 線 10kGy 処理は気流式過熱蒸気殺菌処理以上の殺菌効果を示した。専門家による官能試験の結果は 14 名中 8 名 (57%) が  $\gamma$ 線処理品の香味を第 1 位に挙げた。「みんなのくらしと放射線展」の来場者による官能試験評価では、 $\gamma$ 線照射された黒コショウの香味を第 1 位に挙げた回答者が全体の約 54%を占め、専門家パネルによる評価値と相関性のある結果となった。香味成分の GC/MS のパターンには、上記 3 種処理によって大きな差は見られなかったが、香味成分の総量は無処理に比べて

$\gamma$ 線および加熱処理は同程度減少する傾向が見られた。また、黒コショウの香気の主成分である sabinene、vanilin の含有率は無処理  $>$   $\gamma$ 線  $>$  加熱処理の順に減少する傾向があった。以上の結果は香辛料の放射線殺菌の有効性を示す好例であるとともに一般の消費者にとっても十分に効果を体感できることを強く示唆するものであった。

### E. 結論

1. 粉末や高い吸水性を有する香辛料からボツリヌス菌芽胞を効率よく抽出するには、蒸留水よりも 50%エタノールが適していた。香辛料のストマフィルターを通過する微細な残渣を除去する方法として、500 メッシュフィルターによる濾過法が有効であった。本法はボツリヌス菌芽胞の回収率が良く簡便であり、実用性が高いと考えられる。
2. 検査した未殺菌の香辛料 36 検体のうち、中国産ジンジャー (スライス) から I 群の B 型ボツリヌス菌、インド産ジンジャー (原型) 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%)。ボツリヌス菌汚染とクロストリジア数との間に相関はなかった。香辛料は食文化に欠かすことのできない食材であるが、容器包装詰低酸性食品の不適切な加工や保存が行われれば、ボツリヌス中毒に対してリスクの高い食材の一つであると結論された。
3. ボツリヌス菌芽胞のチャレンジテストにより、容器包装詰低酸性食品である「蒸かし黒豆」は、容器の膨張の有無とは無関係に毒素が産生された。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中毒に対するリスクは低いと考えられるが、「蒸かし黒豆」は原材料が何らかの原因でボツリヌス菌芽胞による汚染を受け、その芽胞が製造工程中の加熱不足等の原因で生残すれば、ボツリヌス中毒の原因となる可能性があることを実証した。

F. 健康危機情報

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 ポツリヌス毒素の中和試験法

群	検体量 (ml)	処理法	
1	1	無処理	
2	1	100°Cで10分間加熱	
3	1	抗毒素A (10 IU/ml)	0.25 ml
4	1	抗毒素B (10 IU/ml)	0.25 ml
5	1	抗毒素A (20 IU/ml)	0.125 ml
		抗毒素B (20 IU/ml)	0.125 ml

37°Cで30分間反応後、各2匹のマウスの腹腔内に0.5 ml注射する。

A型およびB型の抗毒素血清1Uの毒素中和能力(約 $5 \times 10^4$ マウス ipLD<sub>50</sub>)を超えない毒素量になるように検体を希釈した。

表2-1 香辛料の検体明細と検査結果

番号	品名	殺菌	形状	クロストリジア/g	ポツリヌス菌(毒素)/45g
Y1	ブラックペッパー マレーシア産	無	原型	$4.8 \times 10^2$	(-)
Y2	ブラックペッパー インド産	無	原型	34	(-)
Y3	コリアンダー モロッコ産	無	原型	$1.4 \times 10^2$	(-)
Y4	ジンジャー 中国産	無	スライス	2	(+) B型
Y5	ジンジャー インド産	無	原型	20	(+) C/D型
Y6	ホワイトペッパー マレーシア産	無	原型	8	(-)
Y7	クミン インド産	無	原型	1	(-)
Y8	ナツメグ インドネシア産	無	原型	1未満	(-)
Y9	パプリカ チリ産	無	パウダー	1未満	(-)
Y10	レッドベルペッパー チリ産	無	フレーク	2	(-)

番号	品名	殺菌	抽出液量 (ml)	回収液量 (ml)	メッシュ濾過の効果
Y1	ブラックペッパー マレーシア産	無	100	90	
Y2	ブラックペッパー インド産	無	100	90	
Y3	コリアンダー モロッコ産	無	100	70	無し
Y4	ジンジャー 中国産	無	200	135	有り
Y5	ジンジャー インド産	無	100	75	無し
Y6	ホワイトペッパー マレーシア産	無	100	90	
Y7	クミン インド産	無	100	75	有り
Y8	ナツメグ インドネシア産	無	100	100	
Y9	パプリカ チリ産	無	200	140	有り
Y10	レッドベルペッパー チリ産	無	200	135	

サンプル使用量50 g

表2-2 香辛料の検体明細と検査結果

番号	品名	殺菌	形状	クロストリジア/g	ポツリヌス菌(毒素)/45g
Y11	ブラックペッパー ブラジル産	無	原形	1	(-)
Y12	ブラックペッパー インドマラバル産	有	原形	1未満	(-)
Y13	ホワイトペッパー インドネシア産	無	原形	24	(-)
Y14	ターメリックパウダー	無	パウダー	1	(-)
Y15	パセリフレーク アメリカ産	無	フレーク	1未満	(-)
Y16	タイム モロッコ産	無	原形	4	(-)
Y17	バジル エジプト産	無	カット	3.4 × 10 <sup>2</sup>	(-)
Y18	クローブ タンザニア産	無	原形	2	(-)
Y19	カルダモン インド産	無	原形	6	(-)
Y20	ガーリックミンス アメリカ産	無	ミンス	1	(-)

番号	品名	殺菌	抽出液量 (ml)	回収液量 (ml)	メッシュ濾過の効果
Y11	ブラックペッパー ブラジル産	無	100	85	
Y12	ブラックペッパー インドマラバル産	有	100	90	
Y13	ホワイトペッパー インドネシア産	無	100	90	
Y14	ターメリックパウダー	無	200	100	有り
Y15	パセリフレーク アメリカ産	無	400	200	有り
Y16	タイム モロッコ産	無	200	120	有り
Y17	バジル エジプト産	無	300	150	有り
Y18	クローブ タンザニア産	無	100	80	
Y19	カルダモン インド産	無	100	50	有り
Y20	ガーリックミンス アメリカ産	無	150	75	無し

サンプル使用量50 g

表2-3 香辛料の検体明細と検査結果

番号	品名	殺菌	形状	クロストリジア/g	ポツリヌス菌(毒素)/45g
Y21	オールスパイス ジャマイカ産	無	原形	46	(-)
Y22	フェネル 中国産	無	原形	3	(-)
Y23	唐辛子 中国産	無	原形	1未満	(-)
Y24	ブラックペッパー マレーシア産 殺菌品	有	原形	1未満	(-)
Y25	ジンジャー 中国産	無	スライス	2	(-)
Y26	ジンジャー荒挽き 中国産	無	荒挽き	3	(-)
Y27	ジンジャー荒挽き殺菌品 中国産	有	荒挽き	1未満	(-)
Y28	バジル	無	カット	19	(-)
Y29	メース インドネシア産	無	荒挽き	4	(-)

番号	品名	殺菌	抽出液量 (ml)	回収液量 (ml)	メッシュ濾過の効果
Y21	オールスパイス ジャマイカ産	無	100	90	
Y22	フェネル 中国産	無	100	60	
Y23	唐辛子 中国産	無	150	100	
Y24	ブラックペッパー マレーシア産 殺菌品	有	100	90	
Y25	ジンジャー 中国産	無	150	100	有り
Y26	ジンジャー荒挽き 中国産	無	200	70	有り
Y27	ジンジャー荒挽き殺菌品 中国産	有	200	75	有り
Y28	バジル	無	300	170	有り
Y29	メース インドネシア産	無	200	120	

サンプル使用量50 g

表2-4 香辛料の検体明細と検査結果

番号	品名	殺菌	形状	クロストリジア/g	ボツリヌス菌(毒素)/45g
Y30	バジル アメリカ産	無	カット	2	(-)
Y31	ガーリックフレーク 中国産	無	フレーク	5	(-)
Y32	ガーリック アメリカ産	無	グランド	1	(-)
Y33	オニオンミンス アメリカ産	無	ミンス	1	(-)
Y34	オニオンチョップ アメリカ産	無	チョップ	2	(-)
Y35	マスタード カナダ産	無	原形	4	(-)
Y36	シナモン ベトナム産	無	フレーク	5	(-)
Y37	ブラックペッパー マレーシア産	無	原形	9	(-)
Y38	オレガノ トルコ産	無	原形	8	(-)
Y39	コリアンダー モロッコ産	無	原形	64	(-)

番号	品名	殺菌	抽出液量 (ml)	回収液量 (ml)	メッシュ濾過の効果
Y30	バジル アメリカ産	無	350	200	有り
Y31	ガーリックフレーク 中国産	無	200	50	無し
Y32	ガーリック アメリカ産	無	100	50	無し
Y33	オニオンミンス アメリカ産	無	150	50	
Y34	オニオンチョップ アメリカ産	無	200	100	
Y35	マスタード カナダ産	無	100	90	
Y36	シナモン ベトナム産	無	100	75	
Y37	ブラックペッパー マレーシア産	無	100	90	
Y38	オレガノ トルコ産	無	300	150	無し
Y39	コリアンダー モロッコ産	無	100	70	

サンプル使用量50 g

表3 香辛料へのボツリヌス菌添加回収試験

香辛料	測定菌数(CFU/ml)	回収菌量/4 ml	回収率(%)
セロリ	$2.2 \times 10^3$	$8.8 \times 10^3$	44
タイム	$2.7 \times 10^3$	$1.1 \times 10^4$	55
フェヌグリーク	$2.5 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	50

添加菌量 ;  $2.0 \times 10^4$ CFU/25 g



表4 蒸かし黒豆へのボツリヌス菌芽胞接種試験結果

検体処理内訳				理化学・細菌・毒素検査結果								
区分	処理内容	袋数	No.	試験項目	培養日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC (CFU/g)	Clt (CFU/g)	毒素型	備考 (毒素価/g)
	無処理	3	46	理化学試験	0	NT	6.6	0.97	NT	NT	NT	
			47				6.7	0.97				
			48				6.7	0.97				
A	無処理	3	40	細菌・毒素試験 (陰性確認)	0	NT	NT	NT	10未満	10未満	ND	
			41						10未満	10未満	ND	
			42						10未満	10未満	ND	
B	無処理	3	43	保存試験 (未開封)	49	無	6.7	NT	10未満	10未満	ND	
			44			無	6.6		10未満	10未満	ND	
			45			無	6.6		10未満	10未満	ND	
C	芽胞非接種	3	34	細菌試験 (開封操作確認)	0	NT	NT	NT	10未満	10未満	NT	
			35						10未満	10未満		
			36						10未満	10未満		
D	芽胞非接種	3	37	保存試験 (開封)	49	無	6.4	NT	10未満	10未満	ND	
			38			無	6.5		10未満	10未満	ND	
			39			無	6.5		10未満	10未満	ND	
E	芽胞接種	3	31	細菌試験 (接種菌数確認)	0	NT	NT	NT	10未満	9.6 × 10 <sup>4</sup>	NT	
			32						10未満	1.1 × 10 <sup>4</sup>		
			33						10未満	1.3 × 10 <sup>4</sup>		
F	芽胞接種	30*	8	細菌・毒素試験	26	有	6.9	NT	10未満	9.6 × 10 <sup>7</sup>	A+B	1.2 × 10 <sup>4</sup>
			9		34	無	7.0		10未満	2.4 × 10 <sup>7</sup>	A+B	6.0 × 10 <sup>4</sup>
			16		34	無	6.8		10未満	5.2 × 10 <sup>8</sup>	A+B	4.0 × 10 <sup>4</sup>
			28		26 (12)	有	6.9		10未満	5.8 × 10 <sup>7</sup>	A+B	8.8 × 10 <sup>4</sup>
			29		34	無	6.8		10未満	1.1 × 10 <sup>7</sup>	B	1.9 × 10 <sup>4</sup>

ND: not detected, NT: not tested, Aw:水分活性, SPC:一般生菌数, Clt:クロストリジア

\*: 30検体中5件体を無作為に抽出して検査

表5 蒸かし黒豆中に産生されたボツリヌス毒素

検体 番号	保存 日数	容器の 膨張	毒素型	マウス法	ELISA (ng/ml)		
				ipLD <sub>50</sub> /ml	A型	B型	毒素比
8	26 (12)	有	A+B	6.0 × 10 <sup>4</sup>	248	319	1:1.3
9	34	無	A+B	3.0 × 10 <sup>4</sup>	55	394	1:7.2
16	34	無	A+B	2.0 × 10 <sup>5</sup>	28	3,400	1:121
28	26 (12)	有	A+B	4.4 × 10 <sup>4</sup>	196	327	1:1.7
29	34	無	B	1.0 × 10 <sup>4</sup>	15	173	1:12

( ) 内は膨張が確認された日数

表6 切り餅へのボツリヌス菌芽胞接種試験結果

区分	検体処理内訳				理化学・細菌・毒素検査結果								
	処理内容	袋数	No.	試験項目	培養日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC (CFU/g)	Cit (CFU/g)	毒素型	備考 (毒素価/g)	
	無処理	3	46	理化学試験	0	NT	5.4	0.98	NT	NT	NT		
			47				5.4						
			48				5.4						
A	無処理	3	40	細菌・毒素試験 (陰性確認)	0	NT	NT	NT	10未満	10未満	ND		
			41						10未満	10未満			
			42						10未満	10未満			
B	無処理	3	43	保存試験 (未開封)	135	無 無 無		NT	10未満	10未満	ND		
			44						10未満	10未満			
			45						10未満	10未満			
C	芽胞非接種	3	34	細菌試験 (開封操作確認)	0	NT	5.5	NT	10未満	10未満	NT		
			35				5.5		10未満	10未満			
			36				5.5		10未満	10未満			
D	芽胞非接種	3	37	保存試験 (開封)	135	無 無 無		NT	10未満	10未満	NT		
			38						10未満	10未満			
			39						10未満	10未満			
E	芽胞接種	3	31	細菌試験 (接種菌数確認)	0	NT	5.5	NT	10未満	5.5 × 10 <sup>3</sup>	NT		
			32				5.5		10未満	7.1 × 10 <sup>3</sup>			
			33				5.5		10未満	6.4 × 10 <sup>3</sup>			
F	芽胞接種	3	1	細菌・毒素試験	28	無 無 無 無 無		NT	10未満	1.8 × 10 <sup>4</sup>	ND		
			2						5.4	10未満			2.8 × 10 <sup>4</sup>
			3						5.2	10未満			1.9 × 10 <sup>4</sup>
			4						5.4	10未満			1.6 × 10 <sup>4</sup>
			5						5.4	10未満			2.1 × 10 <sup>4</sup>
	芽胞接種	30	6	細菌・毒素試験	68	無 無 無 無 無 無 無		NT	10未満	2.3 × 10 <sup>4</sup>	ND		
			7						5.1	10未満			2.7 × 10 <sup>4</sup>
			8						5.2	10未満			1.7 × 10 <sup>4</sup>
			9						5.0	10未満			1.3 × 10 <sup>4</sup>
			10						5.2	10未満			3.4 × 10 <sup>4</sup>
			11						5.1	10未満			1.9 × 10 <sup>4</sup>
			12						5.0	10未満			2.3 × 10 <sup>4</sup>
			13						5.1	10未満			2.1 × 10 <sup>4</sup>
	芽胞接種	30	14	細菌・毒素試験	100				NT				
			15										
16													
17													
18													
19													
20													
芽胞接種	30	22	細菌・毒素試験	135				NT					
		23											
		24											
		25											
		26											
		27											
		28											
		29											
		30											

ND: not detected, NT: not tested, Aw:水分活性、SPC:一般生菌数、Cit: クロストリジア  
100日および135日保存は続行中

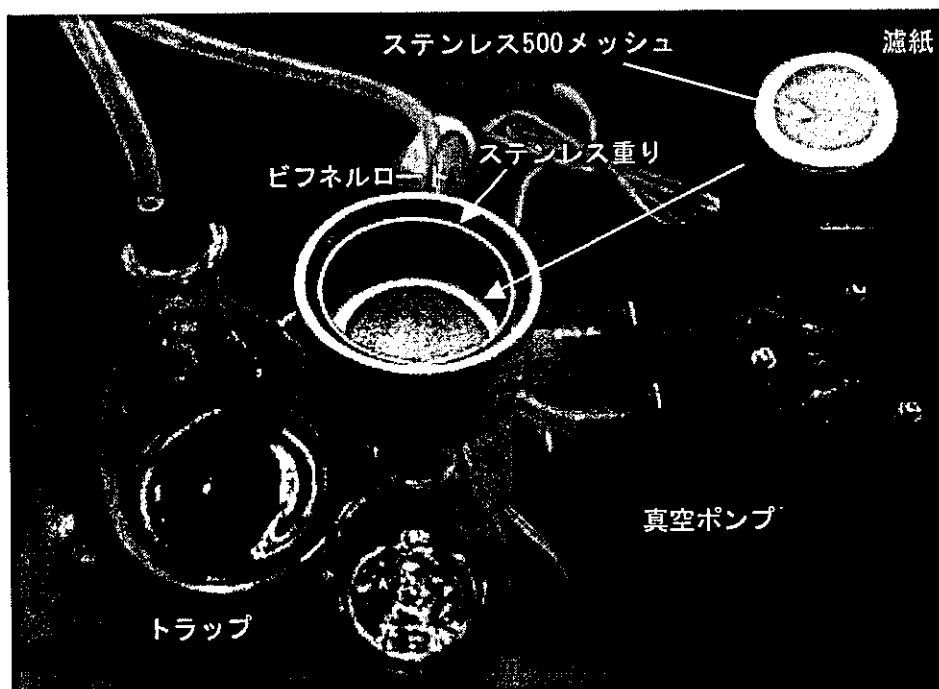


図1 濾過装置の組み立て写真

1. ステンレス製500メッシュフィルターをビフネルロー트에合わせてハサミで切断する。
2. ワットマン5Aの濾紙を輪状に切断し、メッシュフィルターを挟み込む。
3. ビフネルロー트에装着後、ロー트에フィルターを密着させるために、ステンレス製の重しを載せる。
4. 真空ポンプへの水分の吸入を防止するためにトラップを装着する。
5. 試料をロートの中へ入れた後、軽く真空ポンプで吸引する。

\*濾過操作は安全キャビネットかクリーンベンチ内で行う。

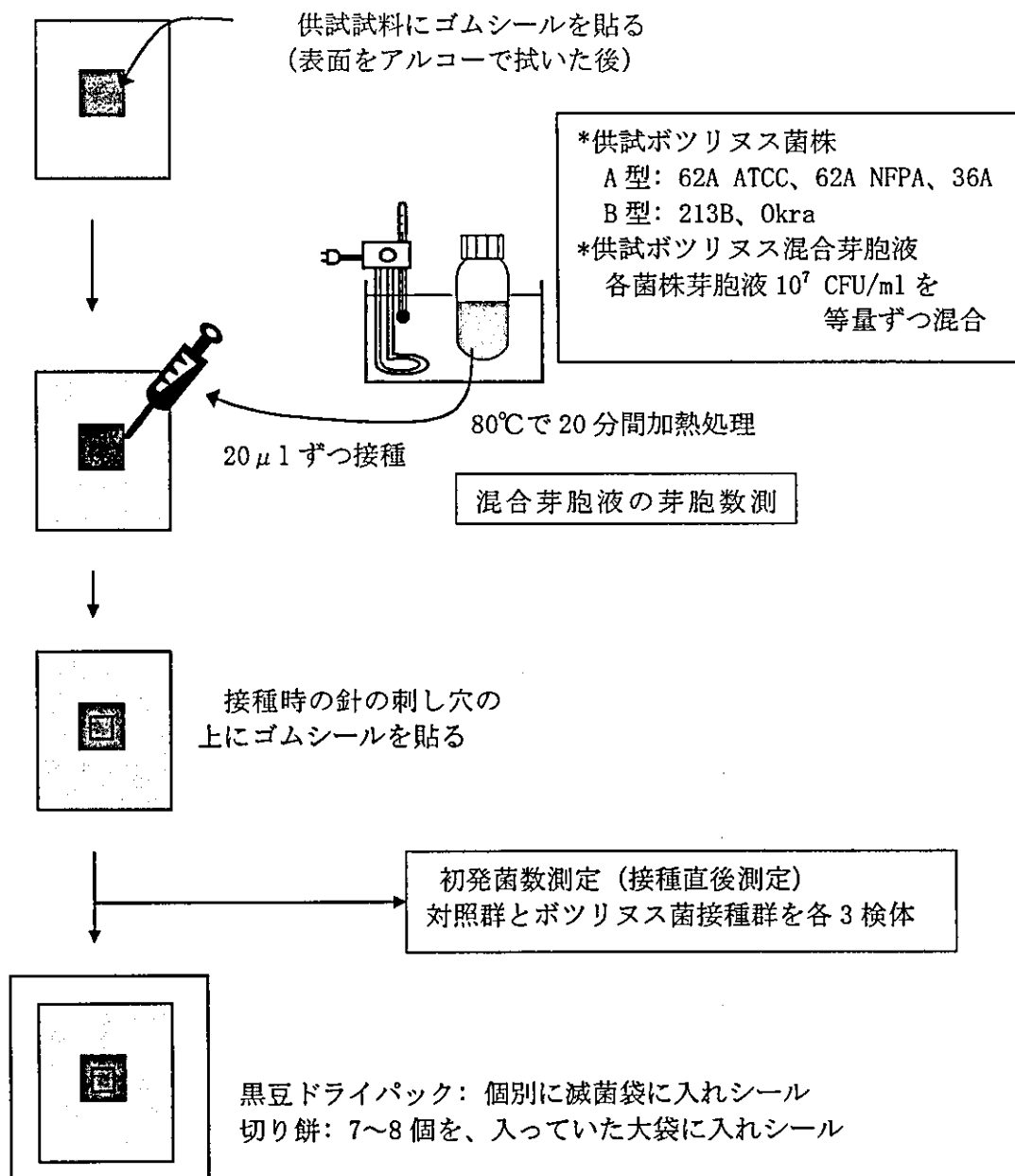
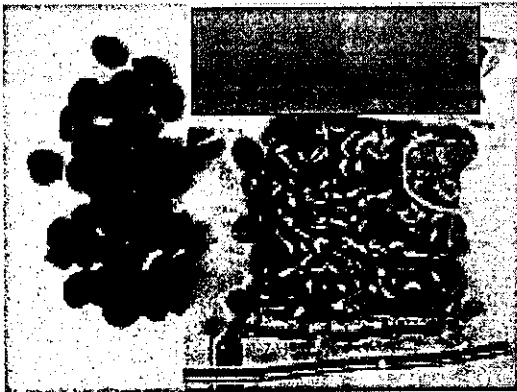


図2 ボツリヌス菌接種作業の概要

陰性対照

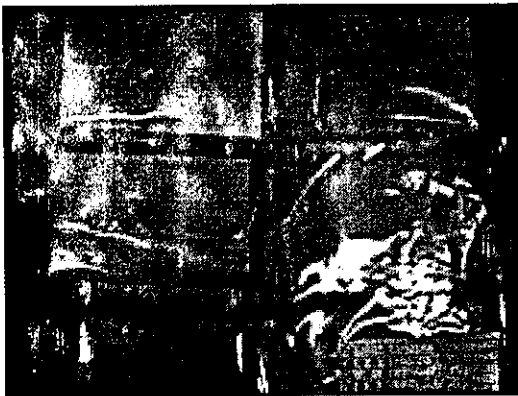


ボツリヌス菌接種

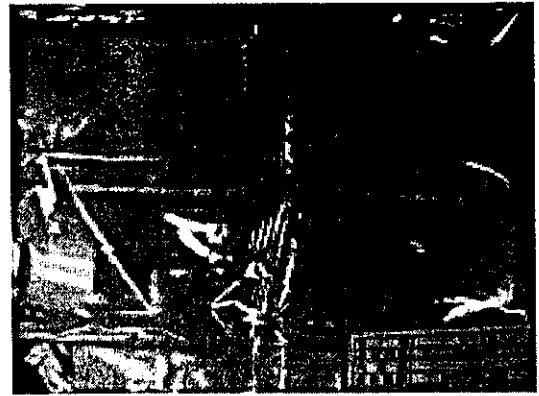


3-1 蒸かし黒豆の保存

陰性対照



ボツリヌス菌接種



3-2 切り餅の保存

図3 ボツリヌス菌を接種した容器包装詰低酸性食品の保存



I 群の B 型菌、クロストリジア : 2 CFU/g

4-1 中国産ジンジャー (スライス、未殺菌)



C/D 型 (キメラ型) 菌、クロストリジア : 20 CFU/g

4-2 インド産ジンジャー (原型、未殺菌)

図 4 ポツリヌス菌が検出された香辛料

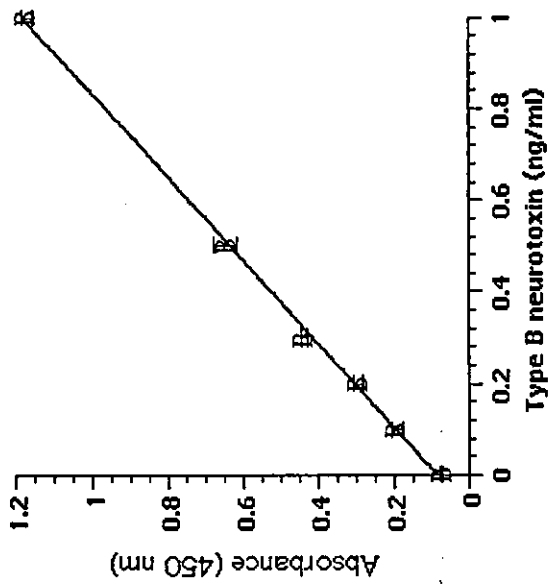
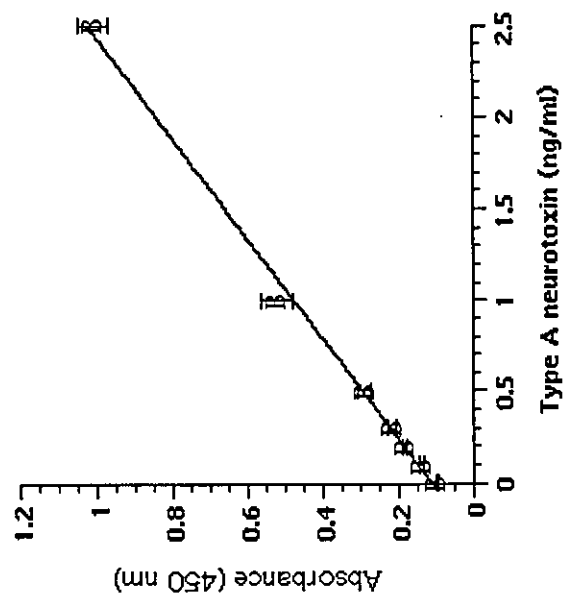


図5 ポツリヌス毒素測定のためのELISAの標準曲線

## 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

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

分担研究者	甲斐明美	東京都健康安全研究センター・微生物部
研究協力者	門間千枝	東京都健康安全研究センター・微生物部
	柴田幹良	東京都健康安全研究センター・微生物部
	矢野一好	東京都健康安全研究センター・微生物部

### 研究要旨

人の移動、流通・包装技術の進歩に伴い、これまで市場で見ることの少なかった多種多様の輸入容器包装詰低酸性食品が増加している。特に近年、食の多様化に伴いブームとなっているエスニック食品、アジアンテースト食品は、昨年度の本研究班の調査でボツリヌス菌汚染の危険性が指摘された香辛料を多量に用い製造されているため、ボツリヌス菌の汚染が危惧される。そこで、エスニック食品を中心に輸入容器包装詰低酸性食品 90 検体について、ボツリヌス菌を中心に汚染実態調査を行った結果、ボツリヌス毒素およびボツリヌス菌が検出された検体はなかった。しかし、pH および水分活性(Aw)の値から、ボツリヌス I 群菌が毒素を産生できる範囲内にある検体が 60 検体 (66.7%) 認められた。また、クロストリジア陽性 (1.0cfu/g 以上) は 10 検体 (11.1%)、好気性芽胞菌陽性 (1.0cfu/g 以上) は 31 検体 (34.4%) であった。汚染率は食品群により偏りが認められた。腐乳（豆腐の発酵食品）や多数の香辛料を使用した調味料等の芽胞汚染率が高かった。以上の成績は、これらの輸入容器包装詰低酸性食品にはボツリヌス菌芽胞が生残する可能性があり、もし生残した場合、ボツリヌス毒素産生の可能性、あるいはボツリヌス食中毒の危険性のあることを示唆している。

次に、切り餅のボツリヌス菌芽胞接種実験を行った結果、42 日経過した時点ではボツリヌス毒素の産生は認められなかった。接種実験の期間は賞味期限の 1.5 倍とされているので、現在、まだ実験継続中である。

### A. 研究目的

東京都内で流通し室温で販売されていた容器包装詰低酸性食品の内、主に「エスニック食品」、「アジアンテースト食品」を対象に、ボツリヌス菌をはじめとした芽胞形成菌等の汚染実態調査を行った。さらに、常温保存可能な容器包装詰低酸性食品の内、「切り餅」を対象にボツリヌス菌芽胞接種試験を行い、常温放置した場合のボツリヌス毒素の産生性を調べ、「切り餅」のボツリヌス菌に対するリスク評価を行うための基礎資料を得ることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 供試試料

1) 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

東京都内の小売店で常温で販売されていたエスニック食品等の輸入容器包装詰低酸性食品 (120℃, 4 分間の加熱殺菌処理がなされていない製品) 90 検体を購入し、供試した (表 1)。

2) 「切り餅」を対象としたボツリヌス芽胞添加試験

室温保存の容器包装詰低酸性食品である市販の「切り餅」1 品目 (個別包装の餅 46 個) をボツリヌス芽胞添加試験に供試した。

#### 2. 培地および試薬等

##### 1) 標準寒天培地

市販の標準寒天培地(栄研化学)を用いた。

##### 2) 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)を用



いた。

### 3) CW 寒天培地

市販の CW 寒天培地(カナマイシン含有および不含, 日水製薬)を用いた。

### 4) MYP 寒天培地

市販の MYP 寒天培地(日水製薬)を用いた。

### 5) クックドミート培地

市販のクックドミート培地 (Difco)に 0.2%ブドウ糖と 0.3%可溶性でんぷんを添加したものをを用いた。

### 6) ゼラチン緩衝液

リン酸 1 水素ナトリウム 4g を精製水 1,000ml に溶解し, pH6.2 に調整後, ゼラチン 2g を加え, 121℃, 15 分滅菌したものをを用いた。

### 7) ボツリヌス毒素抗血清

ボツリヌス毒素抗血清は千葉県血清研究所から購入したものをを用いた。

### 8) マウス

ddy 系マウス (雌) 約 20g をを用いた。

## 3. 容器包装詰低酸性食品のボツリヌス汚染実態調査

エスニック食品等の輸入容器包装詰低酸性食品について, 食品の種類, 容器, 原産国等を調べた。さらに衛生学的検査として, 容器の異常(膨張, 液漏れ等)の有無, pH, Aw, 生菌数, クロストリジア数, 好気性芽胞菌数, *Bacillus cereus* (*B. cereus*), ウエルシュ菌数, ボツリヌス毒素, ボツリヌス菌の検査を行った。

### 1) 理化学試験

#### (1) 水分活性の測定

水分活性は水分活性測定装置 デカゴン アクアラブ CX-3 を用いて測定した。

#### (2) pH 測定

pH は, 試料に等量の蒸留水を加え十分に攪拌後, pH メーター(東亜電波工業製・HM-50V)を用いて測定した。

### 2) 生菌数

前述の試験原液に滅菌リン酸緩衝ペプトン水を, 10 倍希釈液になるように加えよく混和した。さらに, これを元に滅菌リン酸緩衝ペプトンで 10 倍段階希釈し, 各希釈試料液を調製した。これらの各 1m を 2 枚のシャーレにとり, 標準寒天培地 15~20ml 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, 固化後, 37℃, 48 時間培養し, 出現した集落数を計数し生菌数を算出した。

### 3) クロストリジア数

生菌数の測定時に調製した試料液を用いて, クロストリジア数を測定した。すなわち, 滅菌アナエロビック・パウチ袋に, 加熱溶解し 55℃に保温したクロストリジア寒天培地 15ml をとり, 試料 10ml を加え, よく混和した後, 平板に固化した。各希釈段階に 2 枚のアナエロビック・パウチ袋を用い, 37℃, 1~7 日間培養し, 出現した黒色集落をクロストリジアとして計測した。

増菌培養は, クックドミート培地(中試験管に 10mL 分注)で行った。クックドミート培地 4 本に試験原液各 1mL を入れ, 2 本は 65℃20 分加熱後冷却, 残り 2 本は加熱処理を行わずに 30℃で 1 週間嫌気培養した。培養後, 12,000rpm 10 分間冷却遠心後, 沈渣を CW 寒天培地に分離し, 2~3 日培養した。培養後出現した集落の内, 嫌气的条件での発育(+), 好气的条件での発育(-) および芽胞形成の確認を行い, クロストリジアと判定した。

更に詳細な同定は, 「嫌気性菌の分離と同定法」(日本細菌学会教育委員会編, 菜根出版)に従い, 運動性, インドール産生, 硝酸塩還元, レシチナーゼ産生, リパーゼ産生, ゼラチン液化, 肉片の消化, 牛乳の凝固・消化, 糖発酵(果糖, ブドウ糖, 乳糖, マルトース, マンニット), エスクリン加水分解等を調べて行った。

### 4) 好気性芽胞菌数

生菌数の測定時に調製した試料液を 65℃20 分加熱後冷却して供試した。これらの各 1ml を 2 枚のシャーレにとり, 標準寒天培地 15~20ml 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, 固化後, 37℃, 48 時間培養し, 出現した集落数を計数し好気性芽胞菌数を算出した。

### 5) *B. cereus* 菌数

生菌数の測定時に調製した試料液を MYP 寒天培地に 0.1ml 塗抹し, 37℃, 24 時間培養後, 出現した *B. cereus* 菌数を測定した。

### 6) ウエルシュ菌数

生菌数の測定時に調製した試料液を CW 寒天培地に 0.1ml 塗抹し, 37℃, 24 時間嫌気培養後, 出現したウエルシュ菌数を測定した。

## 7) ボツリヌス毒素の検出および増菌培養によるボツリヌス菌検査

### (1) 食品中の毒素検出試験

試料原液を 12,000rpm, 10 分間冷却遠心分離後, 上清をゼラチン緩衝液で 2 倍希釈したものを試料とし, その 0.5mL をマウス (1 群 2 匹) に腹腔内接種した. マウスの生死は 7 日間観察した.

### (2) 増菌培養によるボツリヌス菌検査

試験原液各 0.5mL をクックドミート培地 (中試験管に 10mL 分注) 2 本に接種した. その内 1 本は未処理のまま, もう 1 本は 65°C20 分の加熱処理後, 30°C で 1 週間嫌気培養した. 培養後, 上清を 12,000rpm 4°C で 10 分間遠心分離し, 上清をゼラチン緩衝液で 2 倍希釈して, 0.5ml ずつ 2 匹のマウス腹腔内に接種した. マウスの生死は 7 日間観察した.

### (3) ボツリヌス毒素の確認と型別試験

ボツリヌス毒素試験の結果, ボツリヌス特有の症状を示してマウスが死亡した場合は, 抗 A, B, C1, D, E, F, G 型の各抗毒素を用いて中和試験を行い毒素型の確認を行った. 同時に, 加熱処理 (100°C10 分) によるボツリヌス毒素の失活を確認した. なお, 試料はゼラチン緩衝液で, 血清は滅菌生理食塩水で 2 単位になるように希釈して用いた.

## 4. 「切り餅」を対象としたボツリヌス芽胞添加試験

「切り餅」1 品目 (個別包装した 46 個) を用いて, ボツリヌス芽胞添加試験を行った. ボツリヌス毒素産生性の有無の最終確認は, 賞味期限 (10 ヶ月) の 1.5 倍の日数経過後とした.

### 1) ボツリヌス芽胞接種試験用試料の調製

1 個ずつ個別包装された切り餅について, あらかじめ調整し 80°C20 分加熱処理した芽胞混合液 (ボツリヌス A 型菌 3 株: 62A ATCC 株, 62A NFPA 株, 36A 株, B 型菌 2 株: 213B 株, Okra 株の混合液) を 20 $\mu$ L/個 (1 袋) 接種した検体 (33 個), および滅菌蒸留水を接種した検体 (1 個) を作成した. ボツリヌス菌芽胞の接種は缶詰協会で行った (図 1). この他, 開封・未接種群, および未開封・未接種群を用意した. 用意した検体は以下のとおりである.

開封・接種群 : 33 個  
(30 個は培養用, 3 個は接種確認用)

開封・滅菌蒸留水接種群 : 1 個  
開封・未接種群 : 2 個  
未開封・未接種群 : 10 個

(5 個は対照として培養, 5 個は初期菌数確認用)

### 2) ボツリヌス芽胞接種試験

開封・接種群 3 個, 開封・滅菌蒸留水接種群 1 個, 開封・未接種群 2 個について, 菌接種後のボツリヌス芽胞接種試験初発菌数測定を行った. また, 未開封・未接種群 5 個については, 供試した検体の実験開始時の菌数を求めた.

開封・接種群の内 30 個, 及び未開封・未接種群の 5 個 (対照) を 30°C で培養し, 経時的に容器の異常 (膨張, 液漏れ等) の有無, pH, Aw, 生菌数, クロストリジウム数, 好気性芽胞菌数, *Bacillus cereus* (*B. cereus*), ウエルシュ菌数, ボツリヌス毒素, ボツリヌス菌の検査を行った.

検体は, 餅 1 個 (1 袋) の全量を無菌的に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, 栄研器材,) にとり, 等量の滅菌蒸留水を加え, ストマッカーで混和し, これを試験原液 (検体の 2 倍希釈液) として, 前述の方法に従って検査した.

## 5. 倫理面への配慮・試験操作上の留意点

使用したマウスには, できる限り苦痛を与えぬよう配慮し, 実験を行った. ボツリヌス菌の取り扱い, 移動, 試験操作および保管等は, 東京都健康安全研究センター安全管理規程に基づいて, 専用の実験室で実施した. 使用した実験器具は, 実験後速やかにオートクレーブ (121°C, 20 分間) した後, 廃棄した.

## C. 結果

### 1. 輸入容器包装詰低酸性食品 (主としてエスニック食品) のボツリヌス汚染調査成績

#### 1) 流通実態調査

小売店で購入し, 試験に供試した 90 検体を表 1, 図 2-1, 2-2, 2-3, 2-4 に示した. 内訳は, 魚加工食品 (スッポンのスープ 1 検体を含む) 22 検体, 肉加工食品 (肉のスープ 10 検体を含む) 19 検体, 腐乳 (豆腐の発酵食品) 13 検体, 野菜加工品 11 検体, 貝類の加工食品 5 検体, 調味料 (ペースト 5 検体を含む) 7 検体, 豆類加工食品 (豆類のスープ 1 検体

を含み、発酵食品を除く) 4 検体, ザーサイ 3 検体, 粥 4 検体, 蚕加工食品 2 検体である。

輸入国としては中国が一番多く 38 検体, ついで韓国 26 検体, 台湾 8 検体, タイ 7 検体, 日本 4 検体, モロッコとインドが各 2 検体, スペイン, パキスタン, トルコが各 1 検体であった。

容器包装形態については, 缶詰 52 検体, 瓶詰め 19 検体, プラスチックバック, アルミバック等のパウチ 19 検体であった。また, 90 検体中 27 検体 (30.0%) の食品には日本語の表示はなかった。

## 2) 容器の異常

腐乳の購入は 4 店舗で行ったが, どの店の腐乳もその多くに液漏れが認められ, 液漏れの部分に真菌が発育している商品も認められた。今回, 購入時には液漏れ等の異常が認められないものを購入したが, 試験開始時には 13 検体中 2 検体に液漏れが認められた (図 3)。他の食品では, 液漏れ, 膨張等の異常は認められなかった。

## 3) pH および Aw

検査結果を表 2-1~2-5 に示した。食品の種類 (食品群) ごとに違いが認められた。

魚加工食品 (スポンのスープ含む) : 22 検体のすべてが pH4.6 以上であり, Aw0.94 以上のものが 15 検体 (68.2%) あった。Aw が低い食品は, 油で十分に漬けてある食品が多かった。

食肉加工食品 (肉を使ったスープを含む) : 19 検体のすべてが pH4.6 以上であり, Aw0.94 以上であった。

腐乳 : 13 検体のすべてが pH4.6 以上であり, Aw0.94 (Aw0.98 以上) が 4 検体 (30.8%), Aw0.94 以下 (Aw0.83~0.91) が 9 検体 (69.2%) であった。

野菜加工品 : 11 検体 3 件 (27.3%) のみが pH4.6 以上であり, Aw0.94 以上は 8 検体 (72.7%) であった。また pH4.6 以上, Aw0.94 以上の検体は 2 件 (18.2%) であった。

調味料 (ペーストを含む) : 8 検体 7 検体 (87.5%) が pH4.6 以上であり, Aw0.94 以上は 2 検体 (25.0%) であった。また pH4.6 以上でありかつ, Aw0.94 以上の検体は 1 件 (12.5%) であった。

貝類の加工食品 : 5 検体すべて pH4.6 以上でありかつ, Aw0.94 以上であった。

豆類加工食品 (豆類のスープを含む) : 4 検体すべてが pH4.6 以上であった。Aw0.94 以上は 3 検体,

Aw0.46 の食品は, 落花生等をつけた調味油であった。

ザーサイ : 3 検体中 1 検体 (33.3%) は pH4.6 以上であり, Aw0.94 以上は 1 検体 (33.3%) であった。また pH4.6 以上でありかつ, Aw0.94 以上の検体は無かった。

蚕加工食品 : 2 検体共に pH4.6 以上, Aw0.94 以上であった。

## 4) 生菌数

食品群ごとに違いが認められた (表 2-1~2-5)。

魚加工食品 (スポン魚類のスープ含む) : 22 検体中 3 検体が  $1.0 \times 10^1$  cfu/g 以上であった。多い検体でも  $10^3$  cfu/g であった。

食肉加工食品 (肉を使ったスープを含む) : 日本産 3 検体をのぞいて  $1.0 \times 10^1$  cfu/g 未満であった。日本産の食肉加工品 3 件検体は  $6.4 \times 10^8 \sim 7.3 \times 10^8$  cfu/g であった。

腐乳 : 13 検体の細菌数は  $1.2 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^7$  cfu/g であった。

調味料 (ペーストを含む), 豆類加工品 (豆類のスープを含む), ザーサイ : それぞれ, 7 検体, 4 検体, 3 検体は, いずれも 10 未満  $\sim 6.4 \times 10^4$  cfu/g であった。

野菜加工品, 貝類の加工食品, 粥, 蚕加工品 : それぞれ, 11 検体, 5 検体, 4 検体, 2 検体は, すべて  $10^1$  cfu/g 以下であった。

## 5) クロストリジヤ数

クロストリジヤが検出された検体は腐乳に多く, 13 検体中 8 検体 (61.5%) で,  $2.0 \times 10^2 \sim 2.7 \times 10^7$  cfu/g であった。その他の食品では, ピクルドグラミーフィッシュ, レッドカレーペースト, にらの花みそ, ザーサイ (ホール) の 4 件からそれぞれ  $4.0 \times 10^5$ ,  $1.3 \times 10^2$ ,  $2.0 \times 10^1$ ,  $3.0 \times 10^1$  cfu/g 検出された (表 2-1~2-5)。

## 6) 好気性芽胞菌

食品群ごとに違いが認められた (表 2-1~2-5)。検出された好気性芽胞菌数は, 生菌数と同様の傾向を示した。

魚加工食品 (魚類のスープ含む) : 22 検体中 3 検体は  $1.1 \times 10^1$  cfu/g  $\sim 10^3$  cfu/g であった。

食肉加工食品 : 日本産の 4 検体を除いて  $1.0 \times 10^1$  cfu/g 未満であった。日本産の食肉加工品 4 件は  $1.7 \sim 7.0 \times 10^2$  cfu/g であった。肉のスープでは, 1 件

( $1.1 \times 10^1$  cfu/g) を除いて、 $1.0 \times 10^1$  cfu/g 未満であった。

腐乳：13 検体すべてが、 $1.9 \times 10^3 \sim 2.7 \times 10^6$  cfu/g であった。

調味料（ペーストを含む）：7 検体中 5 検体は、 $4.4 \times 10^1 \sim 6.4 \times 10^4$  cfu/g であった。

豆類加工品（豆類のスープを含む）：4 検体中 1 検体は  $4.4 \times 10^1 \sim 6.4 \times 10^4$  cfu/g であった。

ザーサイ：3 検体 1 検体が、 $4.4 \times 10^1 \sim 6.4 \times 10^4$  cfu/g であった。

その他：野菜加工品 11 検体、貝類加工食品 5 検体、粥 4 検体、蚕加工品 2 検体では、すべて  $10^1$  cfu/g 未満であった。

#### 7) *B. cereus*

*B. cereus* が  $1.0 \times 10^2$  cfu/g 以上認められた検体も、腐乳に多く、腐乳 13 検体中 12 検体 (92.3%) であった。また、ペースト状調味料 5 検体中 3 検体からも  $6.0 \times 10^1 \sim 7.0 \times 10^1$  cfu/g の *B. cereus* が検出された。その他の食品では、ピクルドグラミーフィッシュから  $9.0 \times 10^1$  cfu/g 検出された (表 2-1~2-5)。

#### 8) ボツリヌス毒素およびボツリヌス菌

検体中のボツリヌス毒素は全て陰性であった。また、全ての検体からボツリヌス菌は検出されなかった。

## 2. 容器包装詰低酸性食品のボツリヌス芽胞添加試験

### 1) 試験開始時の試験結果

保存してあったボツリヌス菌混合芽胞液（保存前の菌数は  $2.4 \times 10^7$  cfu/mL）の  $20 \mu\text{L}$ （餅 1 個当たりの接種量）中の接種時の芽胞数は、 $5.2 \sim 6.5 \times 10^5$  cfu/個であった (表 3-1)。実験開始前の餅の生菌数は、10 未満 cfu/g、クロストリジア数は 1 未満であった (表 3-2)。ボツリヌス芽胞接種試験初発時の菌数測定では、生菌数は 10 未満 cfu/g、未接種群のクロストリジア数は 10 未満 cfu/g、接種群では  $2.2 \sim 2.4 \times 10^4$  cfu/g であった (表 3-3)。

### 2) 42 日後の試験結果

接種後培養 42 日目で、対照群も含めて全ての検体で袋の膨張が認められた。生菌数は 10 未満 cfu/g、クロストリジア数は  $1.0 \sim 2.2 \times 10^4$  cfu/g であった (表 3-4)。ボツリヌス毒素の産生は確認されなかった。

## D. 考察

最近、ライフスタイルや食生活が多様化する一方、製造・流通技術や容器包装技術の進歩により常温で長期間保存が可能な容器包装詰低酸性食品が増加し、多く利用されるようになってきている。一方で、室温で流通する気密性を有する容器包装詰低酸性食品によるボツリヌス食中毒の発生防止対策が重要な課題となっている。昨年度の本研究班の成績からボツリヌス芽胞の汚染が危惧されている香辛料を多量に使用したエスニック料理、アジアンテーストの料理の製品や半製品が多数流通し利用されている。しかし、これらの食品に対する実態調査、衛生学的汚染調査はほとんどなされていない。今年度は、東京都内に流通している輸入容器包装詰低酸性食品、特にいわゆるエスニック食品、アジアンテースト食品について、ボツリヌス菌を中心に汚染実態調査を行った。

小売店で購入した供試食品 90 検体には、日本で通常流通していない食品もみられた。たとえば、種々の腐乳をはじめ、蚕の煮物、バナナのつぼみの水煮等の野菜類、中国産の魚加工食品に多くみられた淡水魚を油で揚げた缶詰等である。その 30.0% の食品には日本語の表示がなかった。また、販売されていた腐乳の多くに液漏れが認められ、液漏れの部分に真菌が発育している商品も認められた。

細菌学的検査結果については食品群によって大きな差が認められた。

細菌学的（芽胞菌）汚染が最も認められたのは「腐乳」であった。細菌数は  $1.2 \times 10^3 \sim 1.7 \times 10^7$  cfu/g、クロストリジア数は、8 検体 (61.5%) が  $2.0 \times 10^2 \sim 2.7 \times 10^7$  cfu/g であった。*B. cereus* も 12 検体 (92.3%) に  $1.0 \times 10^1$  cfu/g 以上認められた。しかも、4 検体 (30.8%) は pH4.6 以上、 $A_w 0.98$  以上であり、ボツリヌス芽胞が存在した場合、菌が発育し毒素を産生する条件であった。

腐乳は、一般的に中国で粥等に混ぜて喫食されている。中国では 1958 年~1983 年の 25 年間に 986 例のボツリヌス食中毒が発生し、その 90% は北部の新疆ウイグル自治区で、74% は臭豆腐（腐乳の一種）等の発酵豆製品が原因食品であると報告されている (Ying, S., and Shuyan, C.; Botulism in China. Rev. Infect. Dis. 8.984, 1986)。

今回の検査では腐乳からボツリヌス菌は検出されなかったが、クロストリジア、好気性芽胞菌とも高