

表3 Growth of *C. sporogenes* PA 3679 in different pH

pH	Incubation period (h)				
	0	24	48	72	96
6.0	1.09×10^5	1.52×10^6	1.70×10^7	6.00×10^7	1.26×10^7
5.2	1.22×10^5	1.06×10^5	9.10×10^4	9.60×10^4	1.29×10^5
4.8	1.33×10^5	9.80×10^4	6.80×10^4	1.00×10^5	1.63×10^5
4.4	1.28×10^5	6.60×10^4	1.04×10^5	1.34×10^5	1.84×10^5

(Inoculum : 10^5 count/ml)

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課教授
分担研究者	駒木 勝	(社)日本缶詰協会 研究所長
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
	田口真寿美	(社)日本缶詰協会 研究所 食品化学研究室研究員
	山崎 良行	(社)日本缶詰協会 研究所 食品化学研究室研究員
	五味雄一郎	(社)日本缶詰協会 研究所 食品工学研究室研究員
分担研究者	武士 甲一	帯広畜産大学畜産学部獣医学科応用獣医学講座教授
分担研究者	小崎 俊司	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻感染症制御学講座教授

研究要旨

わが国の食品衛生法では、常温で流通する容器包装詰低酸性食品について、加圧加熱殺菌によって製造する場合にはその中心を 120℃で 4 分の加熱処理を施すことが規格基準で定められている。これは当該食品中で食中毒を引き起こすボツリヌス菌を殺滅するために規定されたものである。しかしながら、市場で常温流通する容器包装詰低酸性食品すべてがこの規格基準を遵守しているわけではない。すなわち、容器包装詰低酸性食品のうち加圧加熱殺菌によらない製品についてはとくに規定された規格基準がないため、これらの製品については常にボツリヌス食中毒の危害が払拭できない。ボツリヌス菌の発育は食品の成分、pH、水分活性、酸化還元電位、加熱量、賞味期間や流通温度などが影響するものと考えられる。今回、A および B 型ボツリヌス菌について、気体透過性が異なるパウチ中での発育と容器包装詰低酸食品のボツリヌス菌に対するリスクを評価するための接種試験に用いる菌株の選定のための各種性状試験を行なった。

A. 研究目的

一般に常温で流通する缶、びん詰およびレトルトパウチ食品などのいわゆる容器包装詰殺菌食品の中で、レトルトパウチ食品についてはその容器が完全密封性および完全遮光性の不透明容器（アルミ蒸着）と若干のガス透過性のある透明パウチが用いられている。この透明パウチの使用についてはレトルト殺菌時および殺菌後と常温流通時に内容物の油脂の酸敗による品質劣化がないことが必須条件である。一方、これら容器包装詰殺菌食品で最も重要な微生物危害としては *C. botulinum*（以下、ボツリヌス菌）が挙げられる。ボツリヌス菌は嫌気性細菌であるため一般に酸素の存在下では発育しない。そこで、パウチの気体透過性がボツリヌス菌の発育および毒素産生に及ぼす影響について検討した。同時にボツリヌス菌の代替株としての *C. sporogenes* PA3679（以下、スポロゲネス菌）株の是非についても検討した。

また、厚生労働省が平成 15 年 6 月 30 日付で通知した「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」の中にはボツリヌス菌接種試験法が記載されている。本試験法に関して、供試菌株には A 型は 62A 株を、B 型は 213B 株を用いることが記述されている。米国ではバイオテロの対策として 2002 年にバイオテロリズム法が制定され、国際的にボツリヌス菌の分譲は事実上困難な状況にある。そこで、A 型 62A 株および B 型 213B 株の代替となるような菌株の選別を目的として試験を実施した。今回、国内で保存されている菌株について、耐熱性、発育温度、発育 pH および発育水分活性域を調べた。

B. 研究方法

1. 供試菌株

Clostridium botulinum A 型 7 株 (62AATCC, 62A NFPA, 62A, 33A, 36A, Renkon および CB21 株)

および B 型 6 株 (213B, Okra, 67B, 407, Ginger および 326 株) と *C. sporogenes* PA3679 株を用いた。

2. 芽胞の調製

既報の方法に従って調製した。

3. 気体透過性が異なるパウチ中における発育状況

(1) 供試食品

市販のマグロ水煮缶詰 (フレーク, 内容量 80g), スイートコーン水煮缶詰 (内容量 85g) およびカレーパウチ詰 (内容量 180g) を用いた。

(2) 供試パウチ

完全密封性および完全遮光性の不透明パウチ (アルミ蒸着, 12PET/15ONy/7AL/50CPP, 以下パウチ A とする), 気体透過性の低い透明パウチ (12 蒸着 PET/15ONy/70CPP, 以下パウチ B とする) および気体透過性の高い透明パウチ (15ONy/70CPP, 以下パウチ C とする) の 3 種類のパウチをガス滅菌し, 用いた。供試パウチの酸素透過性を表 1 に示す。

(3) 接種芽胞液の調製

ボツリヌス菌混合接種液は, まず各菌株芽胞液を約 2.0×10^7 CFU/ml になるよう希釈し, この希釈液を等量ずつ混合しボツリヌス菌混合芽胞液とした。スポロゲネス菌芽胞液は調製した芽胞液 (芽胞数 2.8×10^7 CFU/ml) をそのまま用いた。

(4) 供試試料の調製および芽胞液接種

3 種類 (パウチ A, B および C) のパウチに, 無菌的に開缶または開封した供試食品 1 缶または 1 袋の全量を無菌的に投入し, 試料とした。この試料にボツリヌス菌またはスポロゲネス菌の接種芽胞液を $20 \mu\text{l}$ ずつ接種し, 直ちに開口部を熱溶封した。無接種対照試料は接種芽胞液は接種せず開口部を熱溶封した。試料数は接種試料がパウチ 1 種類および供試食品 1 種類につきそれぞれ 33 袋および無接種対照試料がパウチ 1 種類および供試食品 1 種類につきそれぞれ 12 袋とした。

供試試料の外観を図 1 に示す。

試料への接種時には, 接種芽胞液 $20 \mu\text{l}$ 中の初発芽胞数を以下のように測定した。すなわち, 試料への接種中に無作為に 3 回, それぞれ滅菌脱イオン水 10ml 入りの試験管に $20 \mu\text{l}$ 接種した。これを 80°C , 20 分間加熱処理後, 常法により芽胞数を測定した。

(5) 加熱処理

熱溶封した試料は低温殺菌機 (石田製作所製) で

80°C , 20 分間加熱処理した。なお, あらかじめ試料の中心が 80°C に達するまでの時間を測定し, その時間に 20 分を加えた時間を加熱時間とした。供試試料の熱伝達測定結果を表 2 に示す。供試試料の加熱時間はマグロ水煮が 32 分, スイートコーン水煮が 30 分およびカレーが 36 分であった。

(6) 加熱処理直後の初発菌数測定

加熱処理直後の無接種対照試料, ボツリヌス菌接種およびスポロゲネス菌接種試料各 3 袋について以下の試験を行なった。

1) 検液の調製

試料の全量 (約 80~180g) 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, 等重量の滅菌脱イオン水を加えストマッカーで混和し, これを検液 (試料の 2 倍液) とした。

2) 好気性生菌数の測定

上記検液 2ml を滅菌脱イオン水 8ml に加え, よく混和した (試料の 10 倍希釈液)。さらに 10 倍段階希釈し, 常法により測定した。

3) *Clostridium* 属生菌数の測定

上記検液 2ml を滅菌脱イオン水 8ml に加え, よく混和した (試料の 10 倍希釈液)。さらに 10 倍段階希釈し, 常法により測定した。

4) pH の測定

検液を, ガラス電極式 pH 計 (東亜電波工業製, HM-50V) を用い測定した。

(7) 恒温放置

加熱処理した無接種対照試料 6 袋およびボツリヌス菌またはスポロゲネス菌接種試料各 30 袋は, 30°C , 90 日間恒温放置した。この間, 膨脹した試料は取り出し, 発育の判定を行なった。なお, 無接種対照試料は, 6 袋のうち 3 袋は発育の判定, 残り 3 袋はヘッドスペースガス分析に供した。

(8) 供試試料のヘッドスペースガス分析

加熱処理直後および恒温放置後の無接種対照試料各 3 袋について, 水中置換によりガスを採取し, ガスクロマトグラフにより測定した。

(9) 発育の判定

恒温放置中に膨脹したボツリヌス菌接種試料は無作為に 5 袋を, 容器が膨脹しなかった場合には全試料を, 以下の試験に供した。また, スポロゲネス菌接種でも, 容器が膨脹した場合には無作為に 5 袋を, 膨脹しなかった場合は, 30°C 恒温放置期間中の 30 および 60 日目に無作為に 3 袋を, さらに

90 日目に残りの試料を、以下の試験に供した。

1) 検液の調製

上記 8. 加熱処理直後の初発菌数測定と同様に行なった。

2) 毒素の検出

ボツリヌス菌接種試料についてのみ行なった。上記検液 0.4ml ずつをマウス (ddY, クリーンマウス, 4 週齢, オス) 2 匹の腹腔内に注射した。注射後 72 時間以内に 2 匹とも“へい死”したものを毒素陽性, 2 匹とも生残したものを毒素陰性とした。

3) *Clostridium* 属生菌数の測定

上記 8. 加熱処理直後の初発菌数測定と同様に行なった。

4) pH の測定

上記 8. 加熱処理直後の初発菌数測定と同様に行なった。

試験の概要を図 2 に示す。

4. A および B 型ボツリヌス菌の耐熱性, 発育温度, 発育 pH および発育水分活性域試験

(1) 培地の調製

1) 酵母エキス寒天培地 (以下 YEA と略す)

酵母エキス 10g, リン酸 2 カリウム 2g, 可溶性デンプン 1g, チオグリコール酸ナトリウム 1g および寒天末 20g を脱イオン水 1,000ml に加熱溶解した。これを pH7.2 に調整し, 121°C, 20 分間高圧殺菌した。

2) クロストリディウム強化培地 (以下 RCM と略す)

バクトペプトン 10g, ラムレムコパウダー (Oxoid) 10g, 酢酸ナトリウム 5g, 酵母エキス 1.5g, 可溶性デンプン 1g, ブドウ糖 1g, L-システイン塩酸塩 0.5g および寒天末 1g を脱イオン水 1,000ml に加熱溶解し, pH7.0 に調整した。これをマグネチック・スターリング・パー1 本を投入した培地びんに 100ml ずつ分注し, 121°C, 20 分間高圧滅菌した。

3) pH 調整培地 (以下 pH-RCM と略す)

上記 2-2. RCM と同様に加熱溶解まで調製後 2 つに分け, pH を 4.5 と 7.0 に調整した。この pH を調整した 2 種類の培地を適宜混合し pH が 4.7~5.9 になるよう調整し, マグネチック・スターリング・パー1 本を投入した培地びんに 30ml ずつ分注し, 121°C, 20 分間高圧滅菌した。

4) 水分活性調整培地 (以下 Aw-RCM と略す)

上記 2-2. RCM と同様に調製後, 塩化ナトリウム 0~10%w/w を加え溶解後, マグネチック・スターリング・パー1 本を投入した培地びんに 30ml ずつ分注し, 121°C, 20 分間高圧滅菌した。

(2) 耐熱性測定

調製した芽胞液の 10 希釈液 1ml を滅菌 M/15 リン酸緩衝液 (pH7.0) 30ml に加え, よく混和後, 滅菌硬質ガラス管 (内径 7mm, 外径 9mm, 長さ 150mm, 以下チューブと略す) に 2ml ずつ分注し, 開口部を酸素炎で溶封した。これらを恒温油槽 (オイルバス OH-16, タイテック製, オイル: ポリエチレングリコール#400, 日本油脂製) 中で加熱処理した。加熱処理は 99~111°C で, 所定時間行なった。なお, 加熱補正時間は 1.5 分とした。所定時間にチューブを取り出し, 流水中で急冷した。これら加熱処理済チューブの内容液 1ml を滅菌 0.1%ペプトン水で 10 倍段階希釈した。YEA を滅菌アナエロビック・パウチ (日本缶詰協会製) 1 枚にとり, 上記希釈芽胞液 1ml を加え, よく混和し, 平板に固化した後, 30°C で 7 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数の平均値を生芽胞数とした。測定した生芽胞数から, 生残曲線を描き, D 値を求めた。さらに, 各温度の D 値から TDT 曲線を描き, z 値を求めた。

(3) 発育温度域の測定

調製した RCM に 10^3 または 10^5 CFU/ml になるよう各菌株の芽胞液を 0.5ml ずつ接種し, よく混和後, チューブに 1.8ml 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, 温度勾配培養槽 (温度範囲 5~52°C) で 30 日間恒温放置した。各温度にチューブ 1 本を供し, 発育の判定は, 肉眼により培地の混濁が認められたものを発育陽性とした。

(4) 最低発育 pH および水分活性域の測定

調製した pH-RCM および Aw-RCM に 10^5 CFU/ml になるよう各菌株の芽胞液を 0.5ml ずつ接種し, よく混和後, チューブに 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, 30°C, 30 日間恒温放置した。1 試験区につきチューブ 5 本を供し, 発育の判定は, 肉眼により培地の混濁が認められたものを発育陽性とした。

なお, 調製した pH-RCM の pH は, 加熱処理直後および恒温放置後の無接種対照試料 (チューブ 1

本)についてガラス電極式 pH 計 (東亜電波工業製, HM-50V) を用い測定した。Aw-RCM の Aw は加熱処理直後の無接種対照試料 (チューブ 1 本) について水分活性測定装置 (デカゴン社製, アクアラブ) を用い測定した。

C. 研究結果

1. 気体透過性が異なるパウチ中における発育状況

(1) 接種芽胞液の芽胞数

供試試料に接種したボツリヌス菌およびスポロゲネス菌芽胞液 20 μ l 中の芽胞数測定結果を表 3 に示す。ボツリヌス菌接種時の芽胞数測定結果は、マグロ水煮では $8.5\sim 9.6\times 10^5$ (平均 9.2×10^5) CFU/20 μ l, スイートコーン水煮では $8.1\sim 8.8\times 10^5$ (平均 8.5×10^5) CFU/20 μ l およびカレーでは $9.5\times 10^5\sim 1.2\times 10^6$ (平均 1.0×10^5) CFU/20 μ l であった。同様にスポロゲネス菌接種時の芽胞数は、マグロ水煮では $4.7\sim 5.1\times 10^5$ (平均 4.9×10^5) CFU/20 μ l, スイートコーン水煮では $5.5\sim 6.8\times 10^5$ (平均 6.3×10^5) CFU/20 μ l およびカレーでは $5.5\times 10^5\sim 5.6\times 10^5$ (平均 5.6×10^5) CFU/20 μ l であった。

(2) 供試試料の接種直後の細菌試験結果

供試試料の加熱処理直後の細菌試験結果を表 4~6 に示す。マグロ水煮は、無接種、ボツリヌス菌またはスポロゲネス菌接種の試料とも pH5.9, 好気性生菌数は 10CFU/g 未満で、*Clostridium* 属生菌数は、無接種試料が 10CFU/g 未満、ボツリヌス菌接種試料が $3.5\sim 4.7\times 10^4$ CFU/g およびスポロゲネス菌接種試料が $7.3\sim 9.5\times 10^3$ CFU/g であった。スイートコーン水煮では、無接種、ボツリヌス菌またはスポロゲネス菌接種の試料とも pH6.6~6.8, 好気性生菌数は 10CFU/g 未満であり、*Clostridium* 属生菌数は、無接種試料が 10CFU/g 未満、ボツリヌス菌接種試料が $2.6\sim 4.7\times 10^4$ CFU/g およびスポロゲネス菌接種試料が $5.6\sim 8.9\times 10^3$ CFU/g であった。カレーも同様に、無接種、ボツリヌス菌またはスポロゲネス菌接種の試料とも pH5.7, 好気性生菌数は 10CFU/g 未満で、*Clostridium* 属生菌数は、無接種試料が 10CFU/g 未満、ボツリヌス菌接種試料が $2.1\sim 4.0\times 10^4$ CFU/g およびスポロゲネス菌接種試料が $4.4\sim 8.0\times 10^3$ CFU/g であった。供試食品中では、パウチの種類による菌数の差はみられなかった。

供試試料の重量と接種芽胞液 20 μ l の芽胞数測定結果の平均値から供試試料 1g 当たりの接種芽胞数を推定すると、ボツリヌス菌芽胞接種試料はマグロ

水煮が 1.1×10^4 CFU/g, スイートコーン水煮が 1.0×10^4 CFU/g およびカレーが 6.1×10^3 CFU/g で、スポロゲネス菌芽胞接種試料はマグロ水煮が 6.1×10^3 CFU/g, スイートコーン水煮が 7.4×10^3 CFU/g およびカレーが 3.1×10^3 CFU/g となる。

また、無接種対照検体から *Clostridium* 属細菌がまったく検出されなかったことから接種試料で検出された *Clostridium* 属細菌はすべて接種したボツリヌス菌またはスポロゲネス菌芽胞と考えてよい。従って、供試試料にはほぼ予定した芽胞が接種されたことになる。

(3) 供試試料の恒温放置試験結果

供試芽胞液を接種した供試試料の 30 $^{\circ}$ C, 90 日間の恒温試験結果を表 7~11 に示す。マグロ水煮は、ボツリヌス菌またはスポロゲネス菌を接種した供試パウチ A, B および C の 3 種類のパウチでいずれの試料も膨脹した (図 3 参照)。ボツリヌス菌を接種した試料は、pH が 6.3~6.4 で無接種対照試料 (pH は 5.6~5.9) に比べ上昇し、*Clostridium* 属生菌数が $10^6\sim 10^7$ CFU/g と明らかに増加した。さらに毒素産生が認められた。スポロゲネス菌接種試料は、pH が 5.2~5.4 で無接種対照試料 (pH は 5.6~5.9) に比べ低下し、*Clostridium* 属生菌数は $10^6\sim 10^7$ CFU/g と明らかに増加した。

スイートコーン水煮は、ボツリヌス菌またはスポロゲネス菌を接種した供試パウチ A および B の 2 種類のパウチでいずれの試料も膨脹した (図 3 参照)。ボツリヌス菌を接種した試料は、pH が 6.0~6.1 で無接種対照試料 (pH は 6.3~6.4) に比べ低下し、*Clostridium* 属生菌数が 10^6 CFU/g 以上と明らかに増加した。さらに毒素産生が認められた。スポロゲネス菌接種試料は、pH が 5.7~6.0 で無接種対照試料 (pH は 6.3~6.4) に比べ低下し、*Clostridium* 属生菌数は $10^6\sim 10^8$ CFU/g と明らかに増加した。しかし、供試パウチ C ではボツリヌス菌またはスポロゲネス菌を接種した試料は容器が膨脹せず、pH は 6.3~6.4 で無接種対照試料 (pH6.3) とほぼ同じで、*Clostridium* 属生菌数は $80\sim 9.7\times 10^2$ CFU/g (ボツリヌス菌接種) または $55\sim 4.5\times 10^2$ CFU/g (スポロゲネス菌接種) CFU/g で増加せず、毒素産生もみられず、よって発育の兆候はみられなかった。

カレーは、ボツリヌス菌またはスポロゲネス菌を接種した供試パウチ A, B および C の 3 種類のパウチ袋でいずれの試料も膨脹した (図 3 参照)。ボツリヌス菌を接種した試料は、pH が 5.8 で無接種

対照試料(pHは5.5~5.6)に比べ上昇し、*Clostridium* 属生菌数が 10^7 CFU/g 以上と明らかに増加した。さらに毒素産生が認められた。スポロゲネス菌接種試料は、pHが5.5~5.7で無接種対照試料(pHは5.5~5.6)とほぼ同じで、*Clostridium* 属生菌数は 10^6 ~ 10^8 CFU/g と明らかに増加した。

(4) 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発育状況

供試試料におけるボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の発育状況を表12に示す。供試した3種類のパウチに詰めた供試食品のうち、マグロ水煮およびカレーはいずれのパウチ中でボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の発育が認められた。また、スイートコーン水煮を詰めた供試パウチAおよびB中では、マグロ水煮およびカレーと同様にボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の発育が認められた。しかし、パウチCではボツリヌス菌およびスポロゲネス菌とも発育の兆候は認められなかった。

(5) 供試試料の加熱処理直後および30℃、90日間の恒温放置後のヘッドスペースガス分析結果

供試試料のヘッドスペースガス分析結果を表13に示す。供試試料からは加熱処理直後に酸素ガスが検出された。しかし、恒温放置90日後には、パウチAおよびBではいずれの食品からも酸素ガスは検出されなかった。パウチCではいずれの食品においても恒温放置90日後に酸素ガスが検出されたがマグロ水煮においては減少がみられた。供試マグロ水煮の内容物は著しい褐色化がみられていることから、他の内容物より酸素の消費が顕著であるためと考えられた。すなわち、パウチCの供試マグロ水煮においては酸素ガスは内容物の褐変に消費されたため、他の2種類の供試食品よりヘッドスペースガスの検出量が少なかったものと考えられる。

カレーにおいては二酸化炭素ガスが少量検出される特徴がみられたが、製造直後と90日後においてとくに顕著な差はなかった。

2. AおよびB型ボツリヌス菌の耐熱性、発育温度、発育pHおよび発育水分活性域試験

(1) 耐熱性測定

供試菌株芽胞の耐熱性測定結果を表14、15および図4~13に示す。供試菌株の $D_{105^\circ\text{C}}$ 値は4.1~12.4分で、36AおよびGinger株が他の菌株に比べ強かった。また、z値はA型株のみ測定したが、供試5株中4株は約10~11℃で、33A株は8℃であった。

ボツリヌス菌の耐熱性については、EstyとMeyer(1922)が約 10^{11} の生芽胞数をM/15リン酸緩衝液(pH7.0)中で加熱したとき殺滅に必要な加熱時間は105℃で100分、120℃では4分と報告している。わが国の食品衛生法はEstyらの報告が根拠となっている。また、加熱温度105℃における殺滅に必要な加熱時間100分から105℃のD値を算出すると $D_{105^\circ\text{C}}$ 値は9.3分となる。供試菌株の $D_{105^\circ\text{C}}$ 値は4.1~12.4分で、前述のように36AおよびGinger株はEstyらの報告を上回るほど強い耐熱性を示し、62A、Renkon、407および326株の4株もEstyらの報告に匹敵するほどの耐熱性を有していた。また、耐熱性ボツリヌス菌芽胞のz値は10℃とされており、供試菌株A型5株のうち3株(36A、RenkonおよびCB21株)は約10℃であった。

(2) 発育温度域

供試菌株の発育温度域を測定した結果を表16および17に示す。供試菌株の接種芽胞数の濃度は2種類(10^3 および 10^5 CFU/ml)としたが、当初設定した芽胞数よりもA型1株(36A株)およびB型4株(Okra、67B、Gingerおよび362株)で10倍以上の接種芽胞数となった(表16)。

供試菌株はRCM培地(36A株)中では30日後に、A型5株の発育最高温度は接種芽胞数の多少に関わらず43~44.5℃で、発育最低温度は接種芽胞が多いほどより低い温度まで発育がみられ、62Aおよび33A株は12.3℃、36A株は10.4℃、Renkon株は14.1℃およびCB21株は12.3℃であった。B型5株の発育最高温度は接種芽胞が多いほどより高い温度まで発育がみられた菌株が3株(Okra、407およびGinger株)で、41.4~44.5℃、発育最低温度はOkra株を除きその他の4株は接種芽胞が多いほどより低い温度まで発育がみられ、Okra株は14.7℃、67B株は12.3℃、407株は13.5℃、Ginger株は13.0℃および326株は13.5℃であった。

これまで耐熱性AおよびB型ボツリヌス菌の最低発育温度は10℃とされており、供試菌株の中では36A株が10.4℃まで発育したことから36A株は耐低温性の性状を有する株であることがわかった。その他の9菌株の最低発育温度は12.3~14.7℃であった。

(3) 最低発育pHおよび水分活性域

供試菌株の最低発育pHおよび水分活性域を測定した結果を表16および17に示す。

最低発育pH域試験はA型5株についてのみ実施

した。A型5株は接種芽胞数が $10^5 \sim 10^7$ CFU/ml(表16)で、62A、36AおよびRenkon株の3株はpH5.2まで、また33AおよびCB21株の2株はpH5.4まで発育がみられた。これまでボツリヌス菌の最低発育pHは4.8とされており、供試菌株はpH4.8までは発育はみられなかった。今後、供試する調整培地の検討が必要である。

最低発育水分活性域試験は接種芽胞数が $10^5 \sim 10^6$ CFU/ml(表16)で、A型は62AおよびRenkon株の2株が水分活性0.96まで、33A、36AおよびCB21株の3株は水分活性0.97まで発育がみられた。また、B型は67BおよびGinger株の2株が水分活性0.96まで、Okra、407および326株の3株は0.97まで発育がみられた。これまでボツリヌス菌の最低発育水分活性は0.94とされているが、供試菌株は低いところまで発育はみられなかった。pH域試験と同様に調整培地の検討が必要である。

D. 考察

ガス透過性が異なる3種類のパウチを用いて3種類の食品中におけるボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の発育状況を調べた。その結果、ガス透過性が高いパウチでは食品の種類によってはボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の発育がみられなかった。ボツリヌス菌およびスポロゲネス菌は嫌気性細菌であり、通常、酸素が存在する環境下では発育しない。よって、密封容器内においては容器包材のガス透過性がボツリヌス菌の発育に影響することがわかった。しかしながら、食品の種類によっては容器のガス透過性に関係なくボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の発育が認められたことからすれば、ボツリヌス菌およびスポロゲネス菌芽胞の発育は容器のガス透過性よりもむしろ容器に詰められた食品の種類により影響を受けるものと推察される。

また、スポロゲネス菌は供試試料中でボツリヌス菌と同様な発育を示した。よって、食品中におけるボツリヌス菌の発育を調べるための代替株として用いることができるものと思われる。

わが国の食品衛生法では、常温で流通する缶、びん詰およびレトルト食品などのいわゆる容器包装詰殺菌食品のうち、pHが4.6を超えかつ水分活性が0.94を超えるもので加圧加熱殺菌により製造するものには、最終的に容器に充填、密封後、その中心を120℃で4分の加熱殺菌を施すことが規格基準で義務付けられている。しかしながらこの規格基準で

は当該製品のpHまたは水分活性が範囲内であっても加圧加熱殺菌しない方法で製造するものには何ら法的な拘束力はない。一方、これら容器包装詰殺菌食品において細菌性食中毒として最も重要視しなければならない細菌としてボツリヌス菌が挙げられる。今回、食品へのボツリヌス菌接種試験に必要な菌株の選定を行なうため、国内で保存されているAおよびB型ボツリヌス菌について耐熱性、発育温度、発育最低pHおよび発育最低水分活性値を調べた。その結果、耐熱性は報告されている値に匹敵するほどであったがpHおよび水分活性値については報告データと多少隔たりがみられた。今後、供試培地の検討および食品中での発育能を調べる必要がある。

E. 結論

常温で流通する容器包装詰殺菌食品の容器包材の気体透過性がボツリヌス菌の発育に及ぼす影響について検討した。完全遮光性完全密封性の不透明パウチ(アルミ蒸着)では供試した食品すべてにおいてボツリヌス菌の発育がみられた。また、若干の気体透過性がある透明パウチではボツリヌス菌の発育に違いがみられた。すなわち、気体透過性が高い透明パウチでは食品の種類によってはボツリヌス菌の発育がみられず、気体透過性が低いパウチでは不透明パウチと同様にボツリヌス菌の発育がみられた。ボツリヌス菌の発育はパウチの気体透過性もさることながら食品の種類により影響を受けるものと推察された。常温で流通しているレトルトパウチには不透明パウチと透明パウチが用いられおり、透明パウチについては遮光性が不完全なため内容物の油脂の品質劣化が問題となる。資源のリサイクル環境の現状において、不透明パウチから透明パウチへの移行は業界の共通認識であり、加圧加熱殺菌処理可能な透明パウチも場市されている。よって、油脂の品質劣化が阻止可能であれば不透明パウチと同様に用いることが可能である。若干の気体透過性がある容器といえども嫌気性の食中毒細菌であるボツリヌス菌は食品の種類によっては発育するため、この種の食品では最も重要な微生物危害のひとつである。

また、ボツリヌス菌の代替株としてのスポロゲネス菌について食品中での発育能を検討したところ、ボツリヌス菌と同じ発育状況を示したことから、食品中でのボツリヌス菌の安全性を調べる試験においてその代替株として可能であると推察された。

容器包装詰低酸性食品へのボツリヌス菌接種試験

に用いる菌株について、その代表的な菌株 A 型 62A 株および B 型 213B 株に替わるべく国内で保存されている菌株の選別のための各種性状試験を実施した。

A 型 5 株および B 型 5 株について、耐熱性、発育温度域、pH 発育域および水分活性発育域を調べた。供試菌株はこれまでのデータと比べると耐熱性は有していたが、pH および水分活性発育能はやや

隔たりがみられた。

F. 健康危害情報

該当なし

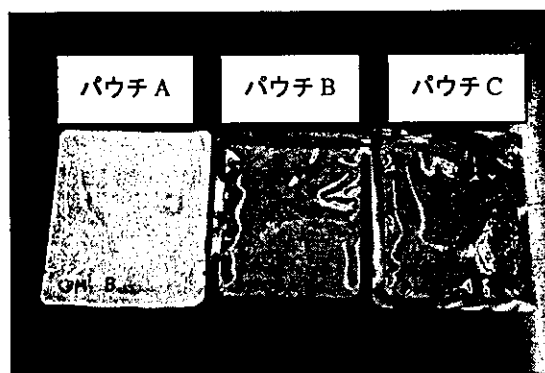
G. 研究発表

該当なし

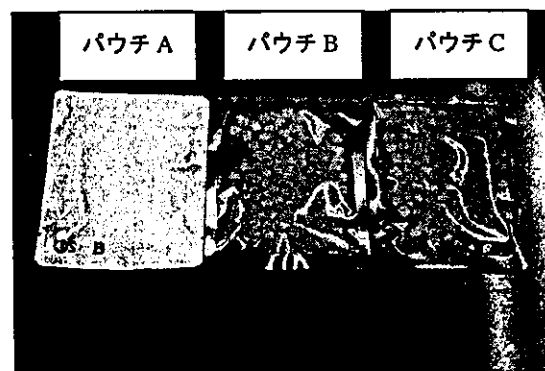
表 1 供試パウチの酸素透過性

パウチの種類	組成	酸素透過性 ($\text{ml}/\text{m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{atm}$ (at 22°C, 60%RH))
A	12PET/15ONy/7AL/50CPP	0
B	12 蒸着 PET/15ONy/70CCP	0.35
C	15ONy/70CCP	54

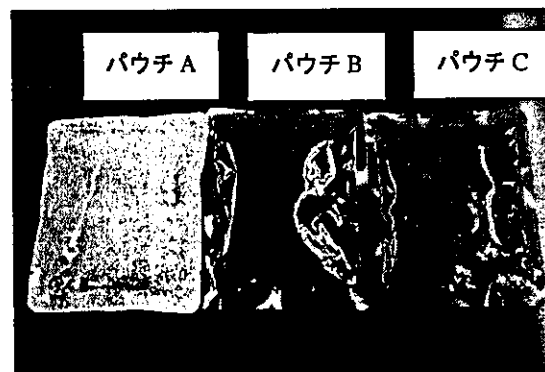
PET: ポリエチレンテレフタレート, ONy: ナイロン, AL: アルミニウム
 CPP: 無延伸ポリプロピレン



マグロ水煮



スイートコーン水煮



カレー

図 1 供試試料の外観

表2 供試試料の熱伝達測定結果

供試食品	パウチの種類	80℃に達するまでの時間(分)
マグロ水煮	A	12
	C	12
スイートコーン水煮	A	10
	C	10
カレー	A	16
	C	16

試料2袋の平均値

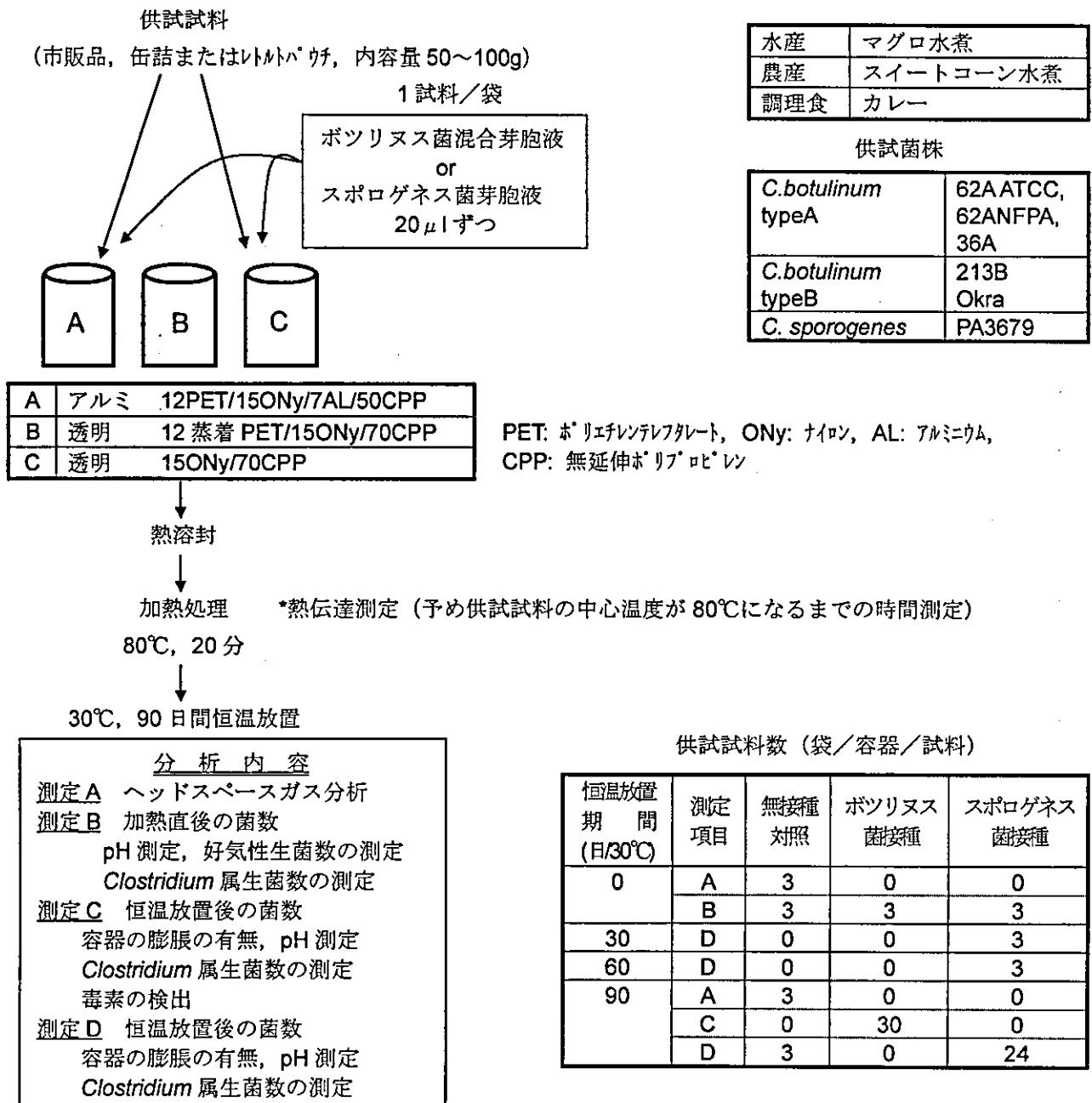


図2 試験の概要

表3 接種したボツリヌス菌混合芽胞液の芽胞数測定結果

供試食品	芽胞数 (CFU/20 μ l)			
	ボツリヌス菌		スポロゲネス菌	
	測定値	平均値	測定値	平均値
マグロ水煮	8.5×10^5	9.2×10^5	5.1×10^5	4.9×10^5
	9.6×10^5		4.7×10^5	
	9.5×10^5		4.9×10^5	
スイートコーン水煮	8.1×10^5	8.5×10^5	5.5×10^5	6.3×10^5
	8.5×10^5		6.8×10^5	
	8.8×10^5		6.6×10^5	
カレー	9.8×10^5	1.2×10^6	5.5×10^5	5.6×10^5
	9.5×10^5		5.6×10^5	
	1.2×10^6		5.6×10^5	

表4 マグロ水煮の加熱処理直後の pH および菌数測定結果

パウチの種類	接種菌	pH	好気性生菌数 (CFU/g)	<i>Clostridium</i> 属生菌数 (CFU/g)	
A	無接種	5.9	< 10	< 10	
		5.9	< 10	< 10	
		5.9	< 10	< 10	
	ボツリヌス菌	5.9	< 10	4.2×10^4	
		5.9	< 10	4.7×10^4	
		5.9	< 10	4.4×10^4	
	スポロゲネス菌	5.9	< 10	8.0×10^3	
		5.9	< 10	9.5×10^3	
		5.9	< 10	9.4×10^3	
	B	無接種	5.9	< 10	< 10
			5.9	< 10	< 10
			5.9	< 10	< 10
ボツリヌス菌		5.9	< 10	3.7×10^4	
		5.9	< 10	4.1×10^4	
		5.9	< 10	3.9×10^4	
スポロゲネス菌		5.9	< 10	8.4×10^3	
		5.9	< 10	9.4×10^3	
		5.9	< 10	8.6×10^3	
C		無接種	5.9	< 10	< 10
			5.9	< 10	< 10
			5.9	< 10	< 10
	ボツリヌス菌	5.9	< 10	3.5×10^4	
		5.9	< 10	3.5×10^4	
		5.9	< 10	3.8×10^4	
	スポロゲネス菌	5.9	< 10	7.7×10^3	
		5.9	< 10	7.3×10^3	
		5.9	< 10	7.9×10^3	

表5 スイートコーン水煮の加熱処理直後の pH および菌数測定結果

パウチの種類	接種菌	pH	好気性生菌数 (CFU/g)	<i>Clostridium</i> 属生菌数 (CFU/g)
A	無接種	6.6	< 10	< 10
		6.6	< 10	< 10
		6.7	< 10	< 10
	ボツリヌス菌	6.7	< 10	4.7×10^4
		6.7	< 10	4.0×10^4
		6.7	< 10	3.9×10^4
	スポロゲネス菌	6.6	< 10	8.8×10^3
		6.6	< 10	8.1×10^3
		6.7	< 10	8.9×10^3
B	無接種	6.7	< 10	< 10
		6.7	< 10	< 10
		6.6	< 10	< 10
	ボツリヌス菌	6.7	< 10	3.3×10^4
		6.7	< 10	3.4×10^4
		6.7	< 10	4.0×10^4
	スポロゲネス菌	6.7	< 10	8.0×10^3
		6.7	< 10	7.0×10^3
		6.7	< 10	7.8×10^3
C	無接種	6.8	< 10	< 10
		6.7	< 10	< 10
		6.7	< 10	< 10
	ボツリヌス菌	6.6	< 10	2.6×10^4
		6.6	< 10	3.9×10^4
		6.7	< 10	3.6×10^4
	スポロゲネス菌	6.7	< 10	7.5×10^3
		6.7	< 10	7.1×10^3
		6.6	< 10	5.6×10^3

表6 カレーの加熱処理直後の pH および菌数測定結果

パウチの種類	接種菌	pH	好気性生菌数 (CFU/g)	<i>Clostridium</i> 属生菌数 (CFU/g)
A	無接種	5.7	< 10	< 10
		5.7	< 10	< 10
		5.7	< 10	< 10
	ボツリヌス菌	5.7	< 10	2.7×10^4
		5.7	< 10	4.0×10^4
		5.7	< 10	2.1×10^4
	スポロゲネス菌	5.7	< 10	8.0×10^3
		5.7	< 10	7.3×10^3
		5.7	< 10	7.0×10^3
B	無接種	5.7	< 10	< 10
		5.7	< 10	< 10
		5.7	< 10	< 10
	ボツリヌス菌	5.7	< 10	3.2×10^4
		5.7	< 10	2.7×10^4
		5.7	< 10	2.5×10^4
	スポロゲネス菌	5.7	< 10	6.3×10^3
		5.7	< 10	6.1×10^3
		5.7	< 10	7.6×10^3
C	無接種	5.7	< 10	< 10
		5.7	< 10	< 10
		5.7	< 10	< 10
	ボツリヌス菌	5.7	< 10	3.0×10^4
		5.7	< 10	2.4×10^4
		5.7	< 10	2.6×10^4
	スポロゲネス菌	5.7	< 10	6.1×10^3
		5.7	< 10	4.4×10^3
		5.7	< 10	4.4×10^3

表7 マグロ水煮の30℃, 90日間恒温放置後のボツリヌス菌または
スプロゲネス菌の発育試験結果

パウチ の種類	接種菌	恒温放置 期間 (日 /30℃)	容器の 膨脹	pH	<i>Clostridium</i> 属 生菌数 (CFU/g)	毒素の 産生	
A	無接種	90	- ^{a)}	5.9	< 10	NT	
		90	-	5.9	< 10	NT	
		90	-	5.9	< 10	NT	
	ボツリヌス菌	4	+	6.4	1.9×10^7	+	
		4	+	6.4	1.0×10^7	+	
		4	+	6.4	2.3×10^7	+	
		4	+	6.4	1.8×10^7	+	
		4	+	6.4	1.2×10^7	+	
	スプロゲネス菌	4	+	5.4	7.8×10^6	NT	
		4	+	5.4	1.8×10^7	NT	
		4	+	5.4	2.1×10^6	NT	
		4	+	5.4	8.8×10^6	NT	
		4	+	5.4	3.4×10^6	NT	
	B	無接種	90	-	5.9	< 10	NT
			90	-	5.9	< 10	NT
90			-	5.9	< 10	NT	
ボツリヌス菌		4	+	6.3	3.5×10^6	+	
		4	+	6.3	7.6×10^6	+	
		4	+	6.3	5.0×10^6	+	
		4	+	6.3	6.8×10^6	+	
		4	+	6.3	4.5×10^6	+	
スプロゲネス菌		4	+	5.2	7.8×10^6	NT	
		4	+	5.2	1.8×10^7	NT	
		4	+	5.2	2.1×10^6	NT	
		4	+	5.2	6.9×10^6	NT	
		4	+	5.2	5.5×10^6	NT	
C		無接種	90	-	5.8	< 10	NT
			90	-	5.8	< 10	NT
	90		-	5.6	< 10	NT	
	ボツリヌス菌	4	+	6.4	5.2×10^6	+	
		4	+	6.4	2.5×10^6	+	
		4	+	6.4	2.9×10^6	+	
		4	+	6.4	3.3×10^6	+	
		4	+	6.4	4.8×10^6	+	
	スプロゲネス菌	4	+	5.4	1.9×10^7	NT	
		4	+	5.4	1.0×10^7	NT	
		4	+	5.4	2.3×10^7	NT	
		4	+	5.4	1.8×10^7	NT	
		4	+	5.4	9.8×10^6	NT	

容器の膨脹が認められたため、試料5袋について菌数およびpH測定を行なった

a) +: 陽性, -: 陰性, NT: 試験せず

表8 スイートコーン水煮の30℃, 90日間恒温放置後のボツリヌス菌または
スプロゲネス菌の発育試験結果

パウチの種類	接種菌	恒温放置期間 (日/30℃)	容器の膨脹	pH	<i>Clostridium</i> 属 生菌数 (CFU/g)	毒素の 産生	
A	無接種	90	- ^{a)}	6.3	< 10	NT	
		90	-	6.4	< 10	NT	
		90	-	6.4	< 10	NT	
	ボツリヌス菌	6	+	6.1	3.0×10^6	+	
		6	+	6.0	2.3×10^6	+	
		6	+	6.0	4.7×10^6	+	
		6	+	6.1	4.0×10^6	+	
		6	+	6.0	2.8×10^6	+	
	スプロゲネス菌	3	+	5.9	2.6×10^8	NT	
		3	+	5.7	7.4×10^7	NT	
		3	+	5.9	1.1×10^8	NT	
		3	+	5.8	8.8×10^7	NT	
		3	+	5.9	1.4×10^8	NT	
	B	無接種	90	-	6.4	< 10	NT
			90	-	6.4	< 10	NT
90			-	6.4	< 10	NT	
ボツリヌス菌		6	+	6.0	1.5×10^6	+	
		6	+	6.0	6.2×10^6	+	
		6	+	6.1	5.0×10^6	+	
		6	+	6.0	2.7×10^6	+	
		6	+	6.0	4.9×10^6	+	
スプロゲネス菌		3	+	6.0	9.2×10^6	NT	
		3	+	5.9	7.9×10^6	NT	
		3	+	5.9	6.4×10^6	NT	
		3	+	5.9	6.9×10^6	NT	
		3	+	5.9	8.8×10^6	NT	

容器の膨脹が認められたため、試料5袋について菌数およびpH測定を行なった

a) +: 陽性, -: 陰性, NT: 試験せず

表9 スイートコーン水煮の30℃, 90日間恒温放置後の
ボツリヌス菌の発育試験結果

パウチ の種類	接種菌	恒温放置 期間 (日 /30℃)	容器の 膨脹	pH	<i>Clostridium</i> 属 生菌数 (CFU/g)	毒素の 産生
C	無接種	90	—	6.3	< 10	NT
		90	—	6.3	< 10	NT
		90	—	6.3	< 10	NT
	ボツリヌス菌	90	—	6.3	7.2×10^2	—
		90	—	6.4	1.2×10^2	—
		90	—	6.4	4.0×10^2	—
		90	—	6.4	80	—
		90	—	6.4	9.3×10^2	—
		90	—	6.3	9.7×10^2	—
		90	—	6.4	2.8×10^2	—
		90	—	6.3	9.5×10^2	—
		90	—	6.4	6.2×10^2	—
		90	—	6.3	5.1×10^2	—
		90	—	6.4	2.2×10^2	—
		90	—	6.4	2.3×10^2	—
		90	—	6.3	5.3×10^2	—
		90	—	6.4	1.8×10^2	—
		90	—	6.4	9.2×10^2	—
		90	—	6.4	8.7×10^2	—
		90	—	6.3	3.5×10^2	—
		90	—	6.3	2.4×10^2	—
		90	—	6.4	1.2×10^2	—
		90	—	6.4	6.7×10^2	—
		90	—	6.4	4.8×10^2	—
		90	—	6.4	7.1×10^2	—
		90	—	6.4	2.4×10^2	—
		90	—	6.3	5.1×10^2	—
		90	—	6.4	5.2×10^2	—
		90	—	6.4	7.6×10^2	—
		90	—	6.3	4.8×10^2	—
90	—	6.4	6.3×10^2	—		
90	—	6.3	8.1×10^2	—		
90	—	6.4	9.2×10^2	—		

容器の膨脹は認められなかったため、全試料について菌数およびpH測定を行なった

a) +: 陽性, -: 陰性, NT: 試験せず

表 10 スイートコーン水煮の 30℃, 90 日間恒温放置後の
スプロゲネス菌の発育試験結果

パウチ の種類	接種菌	恒温放置 期 間 (日 /30℃)	容器の 膨脹	pH	<i>Clostridium</i> 属 生菌数 (CFU/g)	毒素の 産生
C	スプロゲネス菌	30	—	6.5	3.5×10^2	NT
		30	—	6.5	4.4×10^2	NT
		30	—	6.6	2.2×10^3	NT
		60	—	6.5	1.2×10^2	NT
		60	—	6.4	2.2×10^2	NT
		60	—	6.4	3.0×10^2	NT
		90	—	6.4	2.2×10^2	NT
		90	—	6.4	4.5×10^2	NT
		90	—	6.3	2.0×10^2	NT
		90	—	6.4	1.1×10^2	NT
		90	—	6.4	80	NT
		90	—	6.4	2.2×10^2	NT
		90	—	6.4	1.3×10^2	NT
		90	—	6.4	3.1×10^2	NT
		90	—	6.3	95	NT
		90	—	6.3	2.2×10^2	NT
		90	—	6.4	1.7×10^2	NT
		90	—	6.4	1.1×10^2	NT
		90	—	6.4	1.8×10^2	NT
		90	—	6.4	1.0×10^2	NT
		90	—	6.4	60	NT
		90	—	6.3	75	NT
		90	—	6.4	2.5×10^2	NT
		90	—	6.4	1.8×10^2	NT
		90	—	6.3	1.3×10^2	NT
		90	—	6.4	55	NT
		90	—	6.4	1.6×10^2	NT
90	—	6.4	2.2×10^2	NT		
90	—	6.4	1.9×10^2	NT		
90	—	6.4	55	NT		

容器の膨脹は認められなかったため、全試料について菌数および pH 測定を行なった

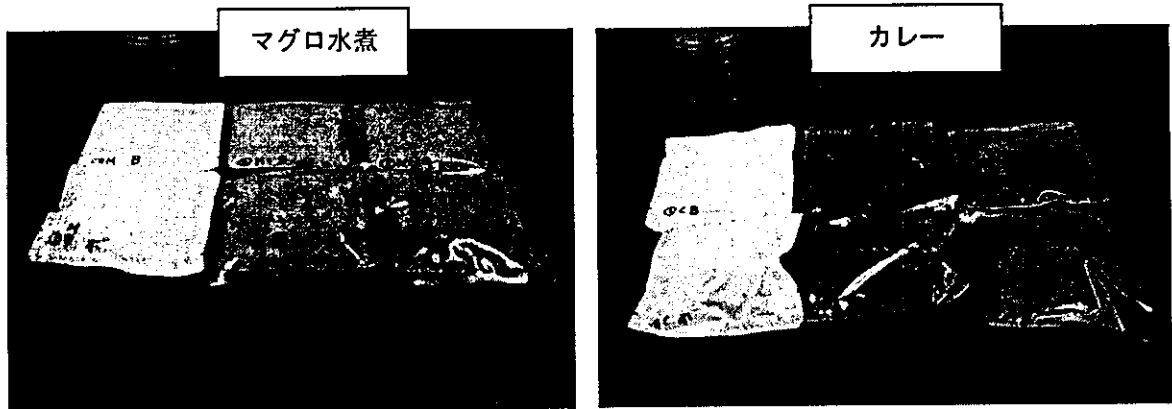
a) +: 陽性, -: 陰性, NT: 試験せず

表 11 カレーの 30℃, 90 日間恒温放置後のボツリヌス菌または
スプロゲネス菌の発育試験結果

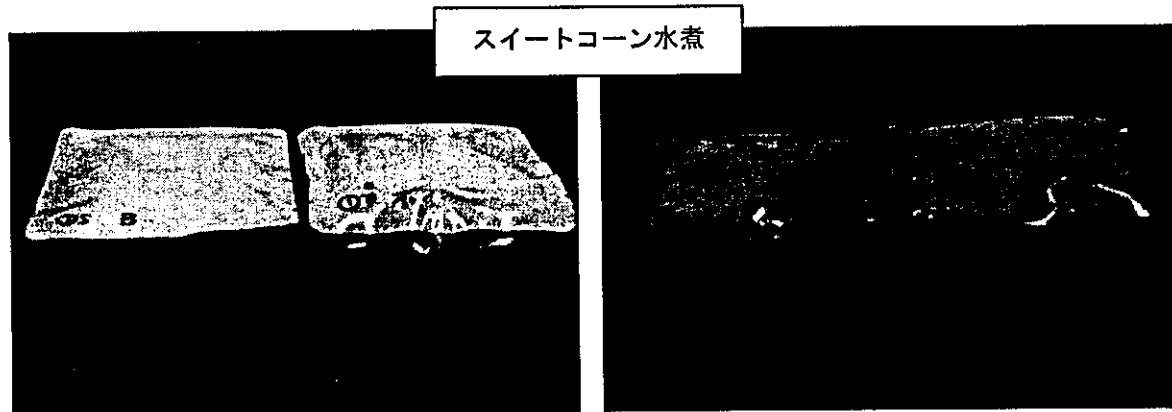
パウチ の種類	接種菌	恒温放置 期間 (日 /30℃)	容器の 膨脹	pH	<i>Clostridium</i> 属 生菌数 (CFU/g)	毒素の 産生	
A	無接種	90	— ^{a)}	5.6	< 10	NT	
		90	—	5.6	< 10	NT	
		90	—	5.6	< 10	NT	
	ボツリヌス菌	3	+	5.8	5.0×10^7	+	
		3	+	5.8	3.6×10^7	+	
		3	+	5.8	8.0×10^7	+	
		3	+	5.8	6.2×10^7	+	
		3	+	5.8	5.5×10^7	+	
	スプロゲネス菌	3	+	5.5	2.3×10^8	NT	
		3	+	5.5	2.7×10^8	NT	
		3	+	5.5	4.2×10^8	NT	
		3	+	5.5	3.1×10^8	NT	
		3	+	5.5	2.6×10^8	NT	
	B	無接種	90	—	5.6	< 10	NT
			90	—	5.6	< 10	NT
90			—	5.6	< 10	NT	
ボツリヌス菌		3	+	5.8	5.1×10^7	+	
		3	+	5.8	7.4×10^7	+	
		3	+	5.8	5.0×10^7	+	
		3	+	5.8	6.2×10^7	+	
		3	+	5.8	5.8×10^7	+	
スプロゲネス菌		3	+	5.5	3.5×10^8	NT	
		3	+	5.5	4.0×10^8	NT	
		3	+	5.5	7.9×10^7	NT	
		3	+	5.5	2.8×10^8	NT	
		3	+	5.5	1.6×10^8	NT	
C		無接種	90	—	5.5	< 10	NT
			90	—	5.5	< 10	NT
	90		—	5.5	< 10	NT	
	ボツリヌス菌	5	+	5.8	6.3×10^7	+	
		5	+	5.8	6.9×10^7	+	
		5	+	5.8	4.7×10^7	+	
		5	+	5.8	5.5×10^7	+	
		5	+	5.8	6.2×10^7	+	
	スプロゲネス菌	4	+	5.6	8.6×10^6	NT	
		4	+	5.7	6.6×10^6	NT	
		4	+	5.7	2.8×10^7	NT	
		4	+	5.6	9.8×10^6	NT	
		4	+	5.7	7.5×10^6	NT	

容器の膨脹が認められたため、試料 5 袋について菌数および pH 測定を行なった

a) +: 陽性, -: 陰性, NT: 試験せず



上段: 無接種対照試料, 下段: ボツリヌス菌接種試料



左側: 無接種対照試料, 右側: ボツリヌス菌接種試料

図3 供試試料の30℃での恒温放置後の外観

表12 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30℃, 90日間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	+ ^{a)}	+	+
	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	+	+	+

a) +: 発育陽性, -: 発育陰性

表 13 供試試料の加熱処理直後および 30℃, 90 日間の恒温放置後の
ヘッドスペースガス分析^{a)} 結果

供試食品	パウチ の種類	恒温放置 期間 (日/30℃)	総ガス量 (ml)	酸素 (%))	窒素 (%))	水素 (%))	二酸化 炭素 (%)	初期封入 空気 (ml)
マグロ水煮	A	0	8.4	7.0	93.0	Tr ^{b)}	0	10.0
		90	14.7	0	99.9	0.1	0	18.8
	B	0	10.7	6.9	93.1	Tr	0	12.8
		90	10.4	0	100	Tr	0	13.3
	C	0	14.5	10.3	89.7	Tr	0	16.7
		90	13.6	0.6	99.1	0	0.3	17.3
スイートコーン 水煮	A	0	11.8	10.6	89.4	Tr	0	13.5
		90	9.1	0	99.9	0.1	0	11.7
	B	0	6.6	10.5	89.5	Tr	0	7.6
		90	4.6	0	100	Tr	0	5.9
	C	0	9.2	12.9	87.1	Tr	0	10.3
		90	9.7	17.6	82.4	0	0	10.2
カレー	A	0	8.5	11.3	88.4	Tr	0.3	9.7
		90	7.1	0	99.3	0.1	0.6	9.1
	B	0	18.7	14.1	85.5	Tr	0.4	20.5
		90	8.3	0	99.3	Tr	0.7	10.5
	C	0	16.3	15.1	84.9	Tr	0	17.7
		90	13.5	13.4	86.6	0	0	14.9

a) 試料 3 袋の平均値, b) Tr: 微量 (0.1 以下)