

## ガスクロマトグラフによる分析

### 1. ヘッドスペースガス分析

#### 【方法】

加熱処理直後および恒温放置後の無接種対照試料各 3 検体について、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。試料からのガス採取方法を図 1 に示した。

#### 【結果】

総ガス量が多いにもかかわらず、貯蔵開始直後より酸素や二酸化炭素は検出されず、90 日貯蔵後についても組成の変化はみられなかった。この結果は供試試料が 90 日間の貯蔵においても容器の密封性、品質の顕著な劣化などに関して問題がないことを示唆している。

表 3 供試米飯のヘッドスペースガス分析結果

恒温放置期間 (日)	総ガス量 (ml)	酸素 (%)	窒素 (%)	水素 (%)	二酸化炭素 (%)	初期封入空気 (ml)
0	180.0	0	99.9	0.1	0	230.2
90	174.7	0	99.9	0.1	0	223.5

3 検体の平均値

(この表は先にお送りした報告書に記載済)

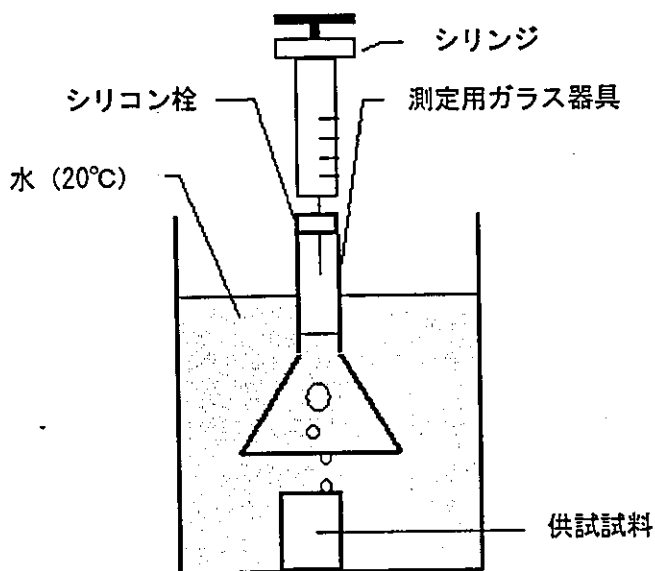


図 1 ヘッドスペースガスの測定

# 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 —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 の接種培養試験—

分担研究者 中野宏幸（広島大学大学院生物圏科学研究科）

研究協力者 崔海英（広島大学大学院生物圏科学研究科）

## 研究要旨

容器包装詰低酸性食品におけるボツリヌス食中毒予防の観点から、植物抽出液のボツリヌス菌発芽および増殖阻止効果について検討した。その結果、セントジョーンズワート（SJW）およびカレープランツ（CP）のエタノール抽出液に高い抗菌活性が認められ、供試したすべての菌株に対する最小発育阻止濃度（MIC）は 0.1-0.2% であった。また、本菌に対する抑制効果がすでに知られている香辛料のメース、ナツメグ、セージ、ベイリース、セージのエタノール抽出液は 0.2% 濃度で増殖阻止効果を示した。全般にエタノール抽出液は熱水抽出液より効果が高かったが、ユーカリおよび漢方薬の黄連（オウレン）熱水抽出液の MIC は 0.2-0.5% と効果がみられた。試験した 50 種類の植物のうち、約半数の 26 検体（52%）がボツリヌス菌に対する増殖抑制作用を示した。これらの抗菌性を弱酸性の pH6.0 あるいは 5.5 の条件で試験すると MIC は大きく低下し、SJW および CP の MIC は 0.02%（pH5.5）になった。これに対し、試験培地の NaCl 濃度を 2% まで上げて一部香辛料を除いて影響はみられなかった。亜硝酸ナトリウムと植物抽出液の併用効果について CMM（クックトミート培地）（pH6.0 & 2%NaCl）で検討した結果、SJW、CP、ナツメグ等に相乗効果が認められた。例えば、0.01% の添加で亜硝酸塩の MIC を 60ppm から 8-15ppm に低下させた。

次に、ボツリヌス菌芽胞の接種培養試験（30℃）において、「ゆで日本そば」（pH5.0, Aw1.00）は 90 日目まで増殖は認められなかったが、「カスタードプディング」（pH6.7, Aw0.99）は保存 5 日目から一部の検体で増殖の兆候が認められ、12 日目には全検体が発芽・増殖して膨化・破裂し、高い毒性が認められた。

## 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が本研究班によってすすめられている。食中毒予防の観点から、当該製品の製造・常温流通の可否、原材料の厳選、製造・処理法や容器包装の改良などの検討に加えて、ボツリヌス菌の発芽や増殖を阻害する抗菌物質の利用は重要な手段となる。近年、消費者の健康志向から一般的に食品添加物や塩分が敬遠され、食の低塩化がすすんでいる。例えば、食肉製品に発色剤として添加されている亜硝酸ナトリウムは同時にボツリヌス菌に対する抑制作用を有しているため、このような低塩化は本菌に

よる食中毒発生の危険性をむしろ高めている。

ところで、本菌の食品中での増殖を抑制する目的で、亜硝酸塩以外にソルビン酸、マレイン酸、各種有機酸などの化学物質、乳酸菌やその代謝産物のバクテリオシンや香辛料抽出液の効果が報告されている。食品の微生物制御における保存料として、従来の化学合成物質から天然物由来の抗菌成分の利用に関心が高まっている。本分担研究においては、ハーブ類など植物抽出液の抗菌性を応用して本食中毒予防を目指した。ボツリヌス菌に対して高い静菌作用を有するものを探索した後、pH や食塩の影響や亜硝酸塩との相乗効果についても検討した。

またこれとは別に、容器包装詰低酸性食品のリスク評価の中で、「カスタードプディング」と「ゆで日本そば」の2品目の接種保存試験を分担し、これらについて評価を行なった。

## B. 研究方法

### 1. 植物抽出液のボツリヌス菌増殖抑制試験

#### (1) 植物抽出液の調製

表1に示す合計50種類のハーブ、市販香辛料、漢方薬等の植物から2通りの抽出法で検体を自製した。生ハーブの場合は採取・水洗して数時間以内にハサミで細かく切り刻み、粉末の市販品の場合はそのまま、ネジ付ビンに入れて秤量した。重量で9倍量のエタノール(99.5%, ナカライ, 特級)を入れ、室温で2日間振盪抽出した。この液体部分を10,000rpm, 30分遠心分離して得た上清を10%濃度のエタノール抽出液とした。また、エタノールの代わりに精製水(DW)を入れ、100℃の湯浴上で2時間加熱抽出し、遠心上清をメンブレンフィルター(0.22 $\mu$ m)でろ過滅菌したものを10%濃度の熱水抽出液とした。

#### (2) 試験菌株

スクリーニング試験には *Clostridium botulinum* A型菌として62A株, Kyoto株(乳児ボツリヌス症由来), B型菌としてOkra株, F型菌としてLangeland株, さらに *Clostridium sporogenes* PA3679株を用いた。保存株をTPGY broth(tripticase peptone - glucose - yeast extract, pH 7.0)で35℃, 24時間培養し100倍希釈したものを栄養細胞とみなして接種に用いた。62AおよびOkra株については, Schmidt & Nunk(1960)の報告した芽胞作製培地で作製した芽胞懸濁液を約10<sup>6</sup>cfu/mlに希釈したものを接種に用いた。

#### (3) 植物抽出液のMICの測定

上記の抽出液のボツリヌス菌に対する抗菌性を寒天平板希釈法で調べた。DWを所定量より10%減じて作製したTPGY寒天培地を滅菌後50℃に保持し、10%抽出液とDWを加え、EtOH抽出液の場合0.5%および0.2%濃度、熱水抽出液の場合1%および0.5%濃度の平板を作製した。平板を一夜嫌気ジャー(Oxoid, 水素ガス置換)で保存して乾燥した後、平板をいくつかに区分し、試験菌を一白金耳量画線接種した。35℃,

2-3日嫌気培養後、発育状況を観察した。増殖抑制作用のみられたものについてはさらに希釈段階を増やして、MIC(minimal inhibitory concentration, 最小発育阻止濃度)を算出した。なお、コントロールには同じ量のエタノールあるいはDWを加えたものを用いた。実験は3回繰り返して行ない、出現頻度の高かったデータを採用した。

#### (4) 植物抽出液の抗菌性に及ぼすpH, 食塩, 亜硝酸ナトリウムの影響

上記の試験でボツリヌス菌に有効であった抽出液については、基礎培地(TPGY寒天)のpH(7.0, 6.0, 5.5)とNaCl濃度(0%, 1%, 2%)を変えてMICを調べた。

また、CMM(cooked meat medium, Difco)の液体部分をpH6.0に修正し、NaClを2.0%添加した培地に所定量の亜硝酸塩ナトリウムを加えた後で滅菌した基礎培地を用いて、植物抽出液との併用試験を行なった。次に、亜硝酸塩と植物抽出液をそれぞれ単独、あるいは併用した場合の増殖抑制について経時的に菌数を測定して調べた。すなわち、A型62A株の芽胞液を初期菌数が10<sup>3</sup>cfu/mlになるよう接種し、25℃で嫌気培養し、1, 2, 4, 7, 14日目にそれぞれ変法GAM寒天培地を用いた混釈法で菌数測定を行った。

### 2. 「カスタードプディング」および「ゆで日本そば」のボツリヌス菌芽胞接種培養試験

#### (1) 保存検体の作製

「カスタードプディング」と「ゆで日本そば」の2品目を、厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課の依頼により、それぞれ日本菓子協会、全国製麺協同組合連合会より入手した。各33検体について、80℃, 20分間ヒートショックした芽胞液(A; 62AATCC株, 62ANFPA株, 36A株, B型; Okra株, 213B株, 以上5菌株の等量混合液)20 $\mu$ lをゴムシート添付部に注入接種した。対照として同量の滅菌DWを6検体に接種した。これらは、膨張破損した場合の安全を考慮して、さらにPP製の密閉袋にそれぞれ入れた。以上の接種操作、および初期芽胞数の測定は日本缶詰協会研究所に依頼して実施された。

#### (2) pHおよびAwの測定

未接種の検体について、DWを加えて2倍乳剤を作製し、Awを水分活性測定装置(デカゴン,

AQUALAB), pH を pH メーター (東亜電波工業製, HM-50V) で測定した。なお, 芽胞接種培養検体については, 電極を介した汚染の危険を避けるため, pH 試験紙による概略値として測定した。

### (3) 保存条件および保存期間

30℃の専用恒温培養器でコンテナに入れて保存し, 毎日1回, 容器の外観変化の有無を観察した。「カスタードプディング」の場合, 容器の膨化が明らかでなかったため液体漏出がみられるまで培養を続け, その時点で4℃の保冷庫に移した。保存後, 最長3日以内に細菌数等の測定を行なった。

### (4) 生菌数およびクロストリジア数の測定

検体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, ストマフィルターS) に採取し, 秤量した。同重量の滅菌 DW を加え, ストマッカーで約1分間ホモジナイズした (2倍希釈液)。なお, このストマフィルター濾液の一部を15mlのPP試験管に移して-20℃冷凍保存し, まとめて理化学試験およびマウス毒性試験に供試した。

次に2倍希釈液2mlを8mlの0.1%ペプトン加生理食塩水に加え10倍希釈液を作製した後, 順次10倍希釈段階系列を作製した。生菌数の測定のために, これらの希釈液を1mlずつ2枚のシャーレに接種し, 滅菌溶解後50℃に保持した標準寒天培地を15ml加え十分に混和し, 固化させた。さらに同培地10mlを重層, 固化, 乾燥後, 30℃で4日間培養して出現コロニーを計数した。クロストリジア数の測定のためには同じく各希釈液1mlを2枚の滅菌パウチ (酒見医科製) に接種した後, 滅菌溶解して52℃に保持したクロストリジア寒天培地 (ニッスイ, 所定濃度の2/3で作製) を15ml加えて十分に混和, 固化させた後, ヒートシールした。30℃で1日培養し, 黒色コロニーを計数した。なお, コロニー数の少ないものについては5日目まで培養を継続した。

### (5) マウス毒性試験

冷凍保存した検体を解凍後, 卓上遠心機で10,000rpm, 15分間遠心分離し, その上清液を別容器に移した。なお, カスタードプディングの場合, 上部に黄色の脂肪層がみられたため中央部の水層をマイクロピペットで取り出し, 再び遠心分離した上清 (中央の液体部分) を用いた。これら, 0.5mlを各2匹のマウス (♂, 3-4wk,

ddY) 腹腔(ip)に注射し, 4日目まで観察した。腹壁の振動と陥没, 呼吸困難などボツリヌス特有の神経麻痺症状の経過を示して斃死した場合, 本毒素陽性とした。これらについては, 100℃, 10分の加熱処理検体を同じくip注射して毒素の不活化を確認した。ボツリヌス毒素が検出された場合, 2倍希釈液を0.05M酢酸緩衝液(pH6.0)で10倍希釈したものについて, 抗A型毒素血清, 抗B型毒素血清, およびこれら両者を混合したものをを用いて中和試験を行った。なお, 反応は試験管内で行ない, 抗血清 (千葉血清50IU/ml) はマウスあたり1IUになるように調製した。A型抗血清で生存した場合をA型毒素, B型抗血清で生存した場合B型毒素, 両方の血清でのみ中和された場合をA型+B型と判定した。一方, 10倍希釈液0.1mlをマウス尾静脈(iv)に正確に注射し, その死亡時間からKondora (1984) の計算式により毒素の定量 (マウスip LD<sub>50</sub>) を試みた。

## C. 研究結果

### 1. 植物抽出液によるボツリヌス菌の増殖抑制

試験した50種類の植物のうち, 表1に示すように, 半数の25検体 (50%) のEtOH抽出液がボツリヌス菌に対する増殖抑制作用を示した。これらのMICに基づき以下のように大別した。

1) 高い活性 (MIC:0.2%以下): セントジョーンズワート, カレープランツ, ローゼマリー, セージ, メース, ナツメグ, ベイリーブス。

2) 中程度の活性 (MIC:0.5-1.0%): ユーカリ, ミモザ, ラベンダーセージ, カラミンサ, カモマイル (花・葉混合), パプリカ, スペアミント, 食用ゼラニウム [ナツメグゼラニウム, アップルゼラニウム, レモンゼラニウム, パイナップルゼラニウム]。

3) 低い活性 (高濃度でのみ部分的増殖抑制): チェリーセージ, クチナシ, サントリナ, タイム, シソ, 山椒, ペパーミント。

これらのうち, セントジョーンズワートとカレープランツのMICは0.1%で最も高い抗菌活性を示した。これに対して, 熱水抽出液の効果は全般的に低く, 黄連 (MIC:0.2%) とユーカリ (MIC:0.5%) 以外は全く効果がみられないか1%という高濃度でわずかに抑制がみられたのみであった。菌株ではA型 (62A株), B型 (Okra

株), *C. sporogenes* の3者はほぼ同様の挙動を示したが, 乳児ボツリヌス症由来のA型(Kyoto株), あるいはF型(Langeland株)の植物抽出液に対する感受性はやや高かった。また, 芽胞を接種に用いた場合と栄養細胞ではほとんど差がみられず, 液体培地における芽胞接種検体のMIC付近の遠心沈渣を顕微鏡下で観察すると芽胞と栄養細胞がおよそ同数みられた。

## 2. 各種条件下における植物抽出液の抗菌作用

試験培地のpHを下げると, pH5.0では, 植物抽出液を含まないコントロールでも完全に発育阻止された。表2に示すように, セントジョーンズワートの62A株に対するMIC(%)は0.1(pH7.0)から0.02(pH6.0)に低下し, 効果が高まった。カレープランツにも同様の傾向がみられたが, メースやベイリースのようにpH低下の影響を受けにくいものもみられた。また, B型菌Okra株では, 栄養細胞を接種した場合, pH6.0におけるMICは0.1%と変わらなかったが, 芽胞接種の場合, 0.02%と低下し, 発芽の抑制が認められた。NaCl濃度を1%あるいは2%に高めた場合, 表3に示すように植物抽出液の効果はほとんど変わらなかった。但し, pHの影響を受けにくかったベイリースのMICは2%のNaCl添加で0.1%まで低下した。

## 3. 亜硝酸塩と植物抽出液の併用効果

CMM broth (2% NaCl添加, pH 6.0)における亜硝酸ナトリウムのボツリヌス菌に対するMICは60ppmであった。ところが単独使用では効果の全くみられない0.02%濃度のセントジョーンズワート抽出液と併用すると15ppm, 0.05%濃度では8ppm以下にMICが低下した。ナツメグでは0.01%の併用で亜硝酸塩のMICが8ppm以下となった。このような植物抽出液と亜硝酸ナトリウムの相乗効果は, カレープランツ, メース, セージにおいても認められた。

25℃保存における経時的菌数変化でみた場合, 図2に示すように, 亜硝酸塩15ppmのみでは増殖開始時間の延長はみられたものの最終的に最高菌数まで増殖した。また, セントジョーンズワートEtOH抽出液は0.01%という微量では全く抑制効果はみられなかった。しかしながら, これら両者を併用すると2週間まで全く増殖の兆候は認められなかった。亜硝酸塩とナツメグ(図3), 亜硝酸塩とカレープランツ(図4)に

も同様の併用効果が観察された。

## 4. ボツリヌス菌の接種培養試験(表5&6)

カスタードプディング(pH6.7, Aw0.99)に芽胞液を接種し30℃で恒温保存試験を行なった。初期接種菌数は $9.5 \times 10^3 \sim 1.3 \times 10^4$ cfu/g, 標準寒天での生菌数は $< 10$ /gであった。4日目まで容器の外観に変化はなかったが, 5日目に30検体のうち半数の15検体で容器上面にわずかな膨らみが認められた。但し, この膨化状態は容器の特性から肉眼的にはほとんど特定できず, 上面を押してまったく余裕がない張りつめた状態であることから判断した。そのうち2検体(CP-13, CP-14)はシール部分から内容物(液体)が漏出していた。続いて6日目には6検体が, 7日目にはさらに6検体が, 8日目で全接種検体が膨化した。一方, 12日目には全検体で漏出がみられたので恒温保存試験を終了した。この時点でコントロール(DW接種群)は外観の変化はなく, 各細菌数も $< 10$ /gであった。30検体のうち, 最初に漏出陽性となった2検体を含めた10検体のボツリヌス菌数(クロストリジア)は $7.0 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^7$ cfu/g, 標準寒天生菌数は $< 10$ /g, pHは5.7~6.3であった。マウス毒性試験ではすべてボツリヌスに特異的な症状を示して1時間前後で死亡したのに対し, 加熱処理群では生存した。中和試験で抗A型毒素血清, 抗B型毒素血清ではそれぞれマウスは大差なく死亡したが, 両血清投与群では生存したことから, A型, B型の両方の毒素が確認された。また, マウス静脈注射法により毒素を定量したところ, 最高がCP-27における $5.6 \times 10^5$  ip LD<sub>50</sub>/g, 最低がCP-30における $6.4 \times 10^4$  ip LD<sub>50</sub>/gであった。

ゆで日本そば(pH5.0-5.1, Aw1.00)に芽胞液を接種し30℃で恒温保存試験を行なった。初期接種菌数は $6.5 \sim 7.8 \times 10^3$ cfu/g, 標準寒天での生菌数は $< 10$ /gであった。外観の変化は現在(90日目, 2005/5/3)まで全くみられていないが, 保存約1ヶ月目(36日目)に5検体, 保存約2ヶ月目(64日目)に10検体を開封して試験した。これら15検体のボツリヌス菌数(クロストリジア数)は $2.6 \sim 8.5 \times 10^3$ cfu/gと接種時と同じかやや低い菌数で, 増殖は認められなかった。標準寒天生菌数は $< 10$ /g, pHは4.8~5.0であった。マウス毒性試験ではすべて症状はみられず生存した。

#### D. 考察

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒予防の視点から植物抽出液の効果について検討した。一般に植物には外界の病原体からの自己防御手段として微量の抗菌物質が含まれることが多い。また、抗酸化性の機能成分が同時に抗菌作用を有している場合もみられる。一部の香辛料の抗防腐作用は人類の初期の時代から経験的に使われてきた。現在、ワサビやニンニク等の成分が食品保存に有効であることが証明され、一部は実用化している。お茶のポリフェノール成分であるガレートカテキン類やテアフラビンの効果もよく知られている。日持ち向上剤として用いられる天然物の多くは植物由来のものである。これまでに香辛料の食中毒細菌に対する抑制効果が調べられ、とくにグラム陽性菌に有効であることが分かっている。今回の試験で高い抗菌性がみられたメース、ナツメグ、ベイリース等の香辛料エタノール抽出液のボツリヌス菌に対する効果はすでに報告されている。但し、これらの有効濃度での添加は食品の味や風味を損ねる場合が多く、適用可能な食品は限定される欠点がある。これに対し、セントジョーンズワートとカレーブランツはこれまでその抗菌性はほとんど報告されていない日本では珍しい部類のハーブである。香辛料とちがって水分を多く含む生ハーブであることから、MICが0.1%であることはメース、ナツメグ等よりも微量で有効な成分が含まれることが推測された。また、これらは天然物とは言え、安全性の面で今後十分な評価される必要があるが、香辛料のような強い食味はないのでこの点からも有効と思われた。

オトギリソウ科植物の多年生草本であるセントジョーンズワート (*Hypericum perforatum*) は、古くから日本でも搾汁を創傷や打撲傷に、湿布薬として神経痛、リウマチの治療に民間薬として用いられていたとう著述がみられる。原産地はヨーロッパ、アジア、北アフリカで、現在では世界各地で栽培されている。最近では、これの抗うつ作用が注目を浴び、軽いうつ症状に処方される場合もある。これの抗菌性に関して、酢酸エチル、クロロホルムおよびメタノール抽出物の *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus* に対する静菌効果、さらには、これの有効成分

として hypericin が報告されている。

カレーブランツ (*Helichrysum italicum*) は黄色の花をつける低木で、ヨーロッパ、地中海地方に広く分布している。この花の部分は、その抗炎症効果や抗アレルギー性から日焼けや紅紋など皮膚の治療のための化粧品として民間療法に用いられてきた。同時に *Helichrysum* 属の植物は抗菌効果を有することが知られており、最近の研究から、*H. aurenitens* や *H. stoechas* のジクロロメタン抽出物がグラム陽性菌に抗菌効果を示すことが証明されている。このように、薬用ハーブの抗菌効果に関する科学的な報告については断片的なものが少しあるだけで十分ではないので調査の継続が必要である。

実際の食品は pH が低酸性領域で、しかも多少の塩分が含まれるものが多いことから、MIC に及ぼす pH と NaCl の影響を調べた。この結果、NaCl 濃度に関しては、本菌の増殖に影響を与えない 2% 濃度まで MIC に変化はみられなかった。これに対し、多くの植物抽出液では pH を 6.0 あるいは 5.5 に低下させると MIC は低下し、効果が高まった。植物中の有効成分の同定には至っていないが、これまでの多くの報告では、単一の成分での抗菌性は元の植物抽出液の活性と比較して低く、複数の成分が関与していることが推定されている。例えば、セントジョーンズワートの有効成分の 1 つである hypericin はベンゼン環に OH-基や CHO-基を有する物質であるが、これはむしろ酸性条件下では不安定とされている。今回ボツリヌス菌の増殖が阻害されない pH 5.5-6.0 で抗菌性が高くなったのは、菌にとって必ずしも増殖至適条件ではなかったことによるものと思われた。

ところで、植物抽出液の抗菌性はソルビン酸などの化学物質とは異なり、単独で制御因子とするにはかなりの高濃度が必要なため、むしろ別の抑制因子を補充あるいは補強する役割が期待される。今回は、食肉製品で使われる亜硝酸ナトリウムと植物抽出液の併用について検討した。発色剤の亜硝酸ナトリウムは食肉や魚肉などに含まれる二級アミンと酸性条件下で反応しニトロソアミンを形成することから、最大使用基準値の 70ppm よりかなり低い量で使われている。また、無添加であることを全面に強調したで冷蔵流通が必須の製品も増加している。今回

の試験では TPGY 培地ではなく、より食肉製品に近い CMM (クックトミート) 培地で試験した。亜硝酸塩の抗菌性は加熱によって高くなるためオートクレーブ前に添加した。通常の CMM (pH7) で試験すると MIC は 250ppm 以上と高かった。TPGY における MIC は数 ppm であるので、肉成分により亜硝酸塩の効果が激減したと思われた。そこで、より食肉製品に近い pH6.0, 2% NaCl にした CMM で試験を行なった。亜硝酸塩単独での MIC は 60ppm であったが、0.02% という微量のセントジョーンズワート抽出液と併用すると 15ppm, 0.05% 濃度では 8ppm 以下に MIC を低下させることができた。ナツメグでも 0.01% の併用で亜硝酸塩の MIC が 8ppm 以下となった。このような植物抽出液と亜硝酸ナトリウムの相乗効果は他のいくつかの植物抽出液においても認められた。亜硝酸ナトリウムの場合と異なり、食品成分 (肉成分) による植物抽出液の抗菌性の低下はそれほど認められなかったことも考えると、亜硝酸ナトリウムの添加量を抑えた製品の安全性を確保するために植物抽出液の利用は有効と考えられた。亜硝酸ナトリウム以外の阻害要因の補強効果についても検討する価値が高いと思われた。

次に、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において、実際の食品への接種保存試験は重要であるため、2品目を担当して試験した。「カスタードプディング」は pH6.7, Aw0.99 かつ豊富なタンパク含量から、保存料などの添加物が使われていない限り、十分に本菌の発芽、増殖、毒素産生を支持するものと当初考えていたが、予想通り 5 日目で増殖が始まり 12 日目には全検体で容器の破裂および内容物の漏出がみられた。腐敗臭はそれほど強くなく、ヨーグルトあるいはチーズのような発酵臭であった。糖分が豊富なため pH は 6.0 前後まで低下したが、これはまだ十分増殖可能で産生毒素を安定化させる条件であった。毒性試験におけるマウスの神経症状の進行や A 型 19S 毒素から推定した静脈注射法による毒力から培地に匹敵するほど本菌の増殖と毒素産生を支持するものであることがわかった。ボツリヌス菌数はほとんど  $10^6$  cfu/g のオーダーにとどまり、接種菌数の  $10^4$  cfu/g から考えてこれだけ高い毒性は不思議であった。この理由として、

1) 脂肪を多く含む検体中で菌体が塊状に存在し、ストマッカー処理やその後のボルテックス攪拌でも十分に単一の細胞に分離されていなかった、2) 容器から漏出するまで培養を続けたが実際は早い時期に最高菌数に達しており菌数測定時には死滅期に入っていた、あるいは 4℃ で数日保存中に菌数が減少した、3) 毒性試験で大量の脂肪部分を 2 度除いて液体部分を試験したため毒素の濃縮が起きた、などの要因が考えられた。また、DW を接種したコントロールでは、製品の細菌増殖特性に反して、好気性菌数、嫌気性菌数ともに  $<10$ /g であったこと、また消費期限が 10 か月と長期に設定されていることから考えて、製品は当初から完全に滅菌されている可能性が高かった。そこで、これらの製品の製造工程における加熱条件を製造元に問い合わせたところ、115℃、40 分のレトルト釜で加熱されていることが判明した。これは製品中心部の温度ではないことを考慮しても 120℃、4 分相当以上の加熱がなされている製品とみなせる食品と思われた。脂肪や蛋白を多く含む食品であるので、実際に芽胞接種検体の殺菌試験を行って確認する必要があるかもしれないが、現時点ではボツリヌス菌に関するリスクの低い製品と判断した。但し、加熱不十分な場合はボツリヌス菌の増殖を容易に許す製品であるので、完璧な加熱工程の保証が重要であることが再確認された。

「ゆで日本そば」については実験途中で年度末となったが、現在のところボツリヌス菌の増殖、毒素産生はみられていない。本製品の Aw は 1.00 であったが、pH が 5.0 と低くこれがボツリヌス菌芽胞の発芽抑制あるいは増殖抑制に働いているものとみられた。この製品の製造について製造元に問い合わせたところ、「保存性に富むゆで麺の製造方法」として自社特許を得た製法、すなわち食酢、グリシン、クエン酸ナトリウムの混合液に浸漬工程があることから、pH や有機酸などが微生物の増殖抑制要因であることが推定された。加熱工程は 98℃、22 分間であるので、ボツリヌス菌芽胞の汚染があれば残存する製品であった。酸性領域で増殖可能な他の汚染微生物が増殖した場合の影響が無視できるかどうかは不明である。現時点では、ボツリヌス菌に関するリスクはかなり低い品目と判

断した。消費期限が4か月とされているので、残りの15検体については観察を継続し、消費期限の1.5倍の期間である6ヶ月目(2005年8月)には開封検査して安全性を最終確認する予定である。

#### E. 結論

ボツリヌス食中毒予防の観点から植物抽出液の抗菌性の利用は有効と思われた。とくに、セントジョーンズワートやカレブランツのエタノール抽出液はほとんど食味に影響しない0.1%濃度でボツリヌス菌の増殖を完全に阻止し、弱酸性条件ではさらに抗菌性が高まった。さらに、亜硝酸ナトリウムとの相乗効果もみられ、低塩化した食肉製品のリスク低減に役立つと考えられた。また、接種保存試験における容器包装詰低酸性食品のリスク評価において分担した「カスタードプディング」および「ゆで日本そば」の2品目について、前者では増殖・毒素産生がみられたものの、所定の製造工程が確実に実施されておればリスクは非常に低い製品であると判断した。

#### F. 研究発表

特になし

#### G. 知的所有権の取得状況

該当なし



表1 植物抽出液の抗ボツリヌス菌作用

検体(和名)	学名	部位等	EtOH抽出液	熱水抽出液
セントジョーンズワート	<i>Hypericum perforatum</i>	葉	3+	-
カレープランツ	<i>Helichrysum italicum</i>	葉	3+	-
ローズマリー	<i>Rosmarinus officinalis</i>	葉	3+	1+
ユーカリ	<i>Eucalyptus globulus</i>	葉	2+	2+
レモンユーカリ	<i>Eucalyptus gcitriodora</i>	葉	-	-
ミモザ	<i>Acacia baileyana</i>	葉	2+	2+
ナツメグゼラニウム	<i>Pelargonium fragrans</i>	葉	2+	2+
アップルゼラニウム	<i>Pelargonium odoratissimum</i>	葉	2+	1+
レモンゼラニウム	<i>Pelargonium crispum</i>	葉	2+	1+
パイナップルゼラニウム	<i>Pelargonium mollicomum</i>	葉	2+	-
ジンジャーゼラニウム	<i>Pelargonium nervosum torento</i>	葉	-	-
ハーブゼラニウム	<i>Pelargonium graveoklens</i>	葉	-	-
セージ	<i>Salvia officinalis</i>	香辛料	3+	-
チェリーセージ	<i>Salvia microphylla</i>	葉	1+	1+
ラベンダーセージ	<i>Salvia cv. Indigo Spires</i>	葉	2+	-
ゴールデンセージ	<i>Salvia officinalis icterina</i>	葉	-	-
ウッドセージ	<i>Teucrium canadense</i>	葉	-	-
パイナップルセージ	<i>Salvia elegans</i>	葉	-	-
ロシアンセージ	<i>Perovskia atriplicifolia</i>	葉	-	-
カラミンサ	<i>Calamintha grandiflora</i>	葉	2+	-
イブキジャコウソウ	<i>Thymus serpyllum</i>	葉	-	-
カモマイル	<i>Matricaria chamomilla</i>	花&葉	2+	-
クチナシ	<i>Gardenia jasminoides</i>	実	1+	-
サントリナ	<i>Santolina chamaecyparissus</i>	葉	1+	-
ヒソップ	<i>Hyssopus officinalis</i>	葉	-	-
ライムリーフ	<i>Oenothera spesiosa</i>	香辛料	-	ND
タラゴン	<i>Artemisia dracunculul</i>	香辛料	-	ND
フィファチ	<i>Piper retrofractum</i>	香辛料	-	ND
タイム	<i>Thymus vulgaris</i>	香辛料	1+	ND
オレンジタイム	<i>Thymus xcitricodorus</i>	葉	-	-
ステビア	<i>Stevia rebaudiana</i>	葉	-	-
シソ	<i>Perilla frutescens</i>	葉	1+	-
笹の葉	<i>Sasa veitchii</i>	葉	-	-
山椒	<i>Zanthoxylum piperitum</i>	香辛料	1+	-
肉桂	<i>Cinnamomum cassia</i>	香辛料	-	-
八角	<i>Illicium verum</i>	香辛料	-	-
ドクダミ	<i>Houttuynia cordata</i>	葉	-	-
メース	<i>Myristica fragrans (種皮)</i>	香辛料	3+	-
ナツメグ	<i>Myristica fragrans (種子)</i>	香辛料	3+	-
ベイリーブス	<i>Laurus nobilis</i>	香辛料	3+	2+
パプリカ	<i>Capsicum annuum</i>	香辛料	2+	-
アニス	<i>Pimpinella anisum</i>	香辛料	-	-
ペパーミント	<i>Mentha piperita</i>	葉	1+	-
スペアミント	<i>Mentha spicata</i>	葉	2+	-
アップルミント	<i>Mentha suaveolens</i>	葉	-	-
ラベンダー	<i>Lavandula angustifolia</i>	葉	-	-
黄連	<i>Coptis japonica</i>	漢方	-	3+
川棟子	<i>Melia azedarach</i>	漢方	-	-
銀杏	<i>Ginkgo biloba</i>	漢方	-	-
トウガラシ	<i>Capsicum annuum</i>	香辛料	-	-

3+:0.2%以下で完全抑制    2+:0.5-1.0%で完全抑制    1+:部分的増殖抑制    -:効果無し



図1-1 セントジョーンズワート



図1-2 カレーブランツ

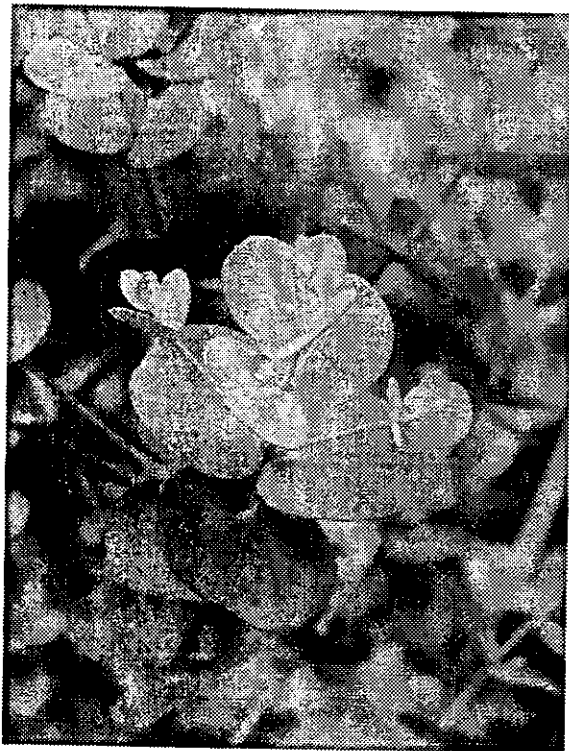


図1-3 ユーカリ

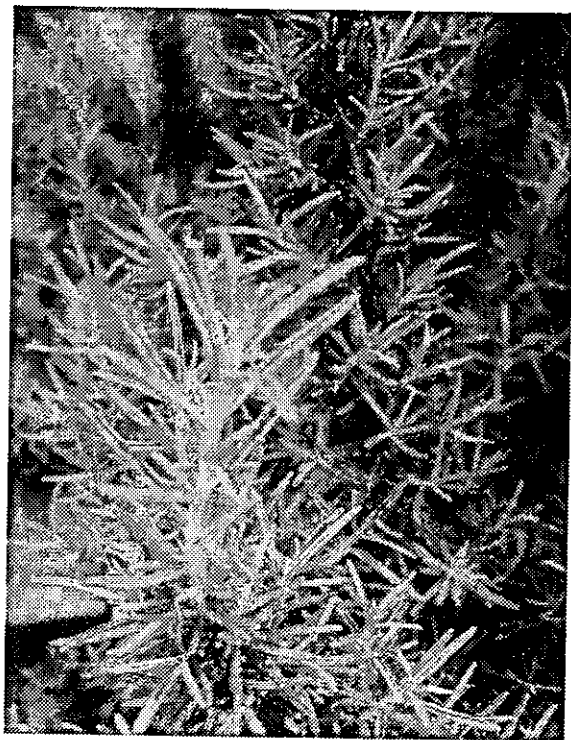


図1-4 ローズマリー

表2 植物抽出液の抗菌性に及ぼすpHの影響

試験培地: TPGY agar (NaCl 0%)

植物名 (エタノール抽出液)	pH	植物抽出液のMIC (%)						
		A	A (s)	A乳児	B	B (s)	F	C.spo
セントジョーンズワート	7	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	6	0.02	0.05	0.02	0.1	0.02	0.05	0.05
	5.5	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
カレーブランツ	7	0.1	0.1	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1
	6	0.05	0.05	0.02	0.02	0.02	0.05	0.05
	5.5	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
メース	7	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2
	6	0.1	0.05	0.1	0.2	0.05	0.2	0.2
	5.5	0.1	0.05	0.1	0.2	0.05	0.2	0.2
セージ	7	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
	6	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
	5.5	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
ナツメグ	7	0.2	0.1	0.2	0.5	0.05	0.5	0.5
	6	0.05	0.02	0.05	0.1	0.02	0.05	0.05
	5.5	0.05	0.02	0.05	0.05	0.02	0.05	0.05
ベイリーブス	7	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	6	0.5	0.2	0.2	0.5	0.2	0.5	0.5
	5.5	0.5	0.2	0.2	0.5	0.2	0.5	0.5
パプリカ	7	1	0.5	0.5	△	0.5	0.5	0.5
	6	1	0.5	0.5	△	0.5	0.5	0.5
	5.5	1	0.5	0.5	△	0.5	0.5	0.5

A: 62A A (s): 62A 芽胞 A乳児: Kyoto B: Okra B (s): Okra 芽胞 F: Langeland  
 C.spo: *C.sporogenes* PA3679 △: 1%で発育抑制あり

表3 植物抽出液の抗菌性に及ぼすNaClの影響

試験培地: TPGY agar (pH 7.0)

植物名 (エタノール抽出液)	NaCl (%)	植物抽出液のMIC (%)						
		A	A (s)	A乳児	B	B (s)	F	C.spo
セントジョーンズワート	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	1	0.1	0.1	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1
	2	0.1	0.1	0.02	0.1	0.1	0.05	0.1
カレーブランツ	0	0.1	0.1	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1
	1	0.1	0.1	0.05	0.1	0.1	0.1	0.1
	2	0.05	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
メース	0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	0.2
	1	0.1	0.02	0.05	0.2	0.02	0.02	0.05
	2	0.05	0.02	0.02	0.05	0.02	0.02	0.02
セージ	0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
	1	0.05	0.05	0.05	0.1	0.05	0.05	0.1
	2	0.05	0.05	0.05	0.1	0.05	0.05	0.05
ナツメグ	0	0.2	0.1	0.2	0.5	0.05	0.5	0.5
	1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.05	0.1	0.1
	2	0.05	0.02	0.05	0.1	0.02	0.05	0.05
ベイリーブス	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	1	0.2	0.2	0.5	0.5	0.2	0.5	0.5
	2	0.1	0.1	0.1	0.5	0.1	0.1	0.1
パプリカ	0	1	0.5	0.5	△	0.5	0.5	0.5
	1	1	0.05	0.5	△	0.05	0.5	0.5
	2	1	0.05	0.1	0.05	0.05	0.05	0.05

A: 62A A (s): 62A 芽胞 A乳児: Kyoto B: Okra B (s): Okra 芽胞 F: Langeland  
 C.spo: *C.sporogenes* PA3679 △: 1%で発育抑制あり

表4 ポツリヌス菌(A型62A株)に対する植物抽出液と亜硝酸塩の併用効果

植物 (エタノール抽出液)	濃度 (%)	亜硝酸塩 (ppm)				
		0	8	15	30	60
セントジョーンズワート	0.005	-	-	-	++	++
	0.01	-	+	+	++	++
	0.02	-	+	++	++	++
	0.05	-	++	++	++	++
	0.1	++	++	++	++	++
ナツメグ	0.002	-	-	-	-	++
	0.005	-	-	-	-	++
	0.01	-	++	++	++	++
	0.02	-	++	++	++	++
	0.05	++	++	++	++	++
カレープランツ	0.005	-	-	-	+	++
	0.01	-	-	+	++	++
	0.02	-	-	++	++	++
	0.05	-	++	++	++	++
	0.1	++	++	++	++	++
メース	0.01	-	-	-	-	++
	0.02	-	-	+	++	++
	0.05	-	+	+	++	++
	0.1	++	++	++	++	++
セージ	0.02	-	-	-	-	++
	0.05	-	-	+	++	++
	0.1	-	++	++	++	++
	0.2	++	++	++	++	++
コントロール (エタノール)	1.0	-	-	-	-	++

(CMM broth, pH 6, NaCl 2%で, 35°C, 2日間嫌気培養)

++:完全発育抑制 +:弱い発育抑制 -:発育抑制なし

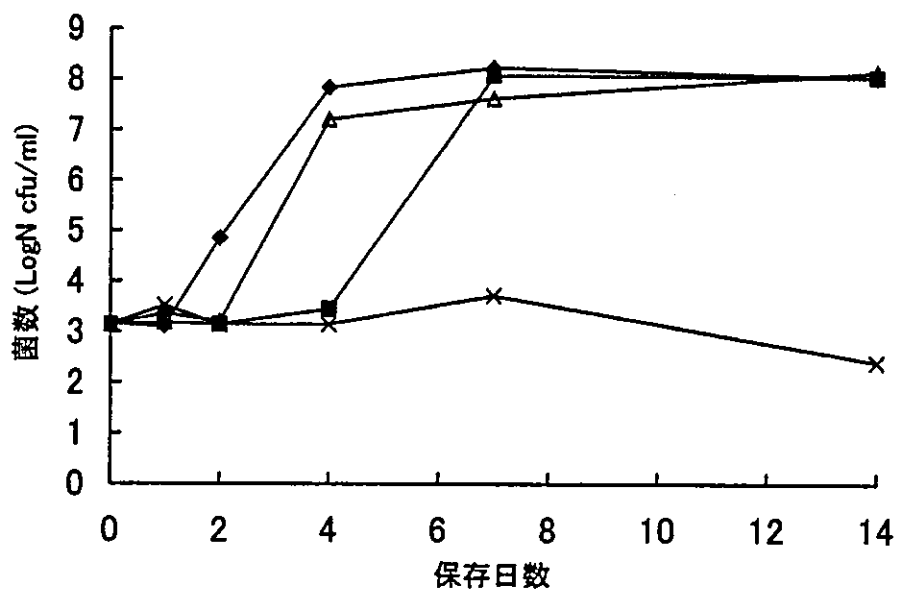


図2 亜硝酸塩と SJW (セントジョーンズワート) の併用効果(62A株)

◆— コントロール  
 ▲— SJW 0.01%  
 ■— 亜硝酸塩 15ppm  
 ×— SJW 0.01% & 亜硝酸塩 15ppm

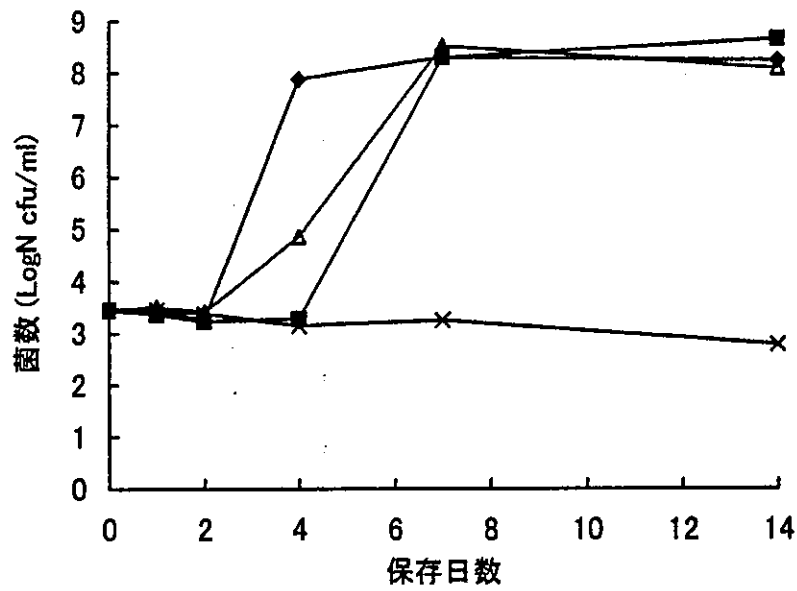


図3 亜硝酸塩とナツメグの併用効果 (62A株)

- ◆ コントロール
- ▲ ナツメグ 0.01%
- 亜硝酸塩 15ppm
- × ナツメグ0.01% & 亜硝酸塩15ppm

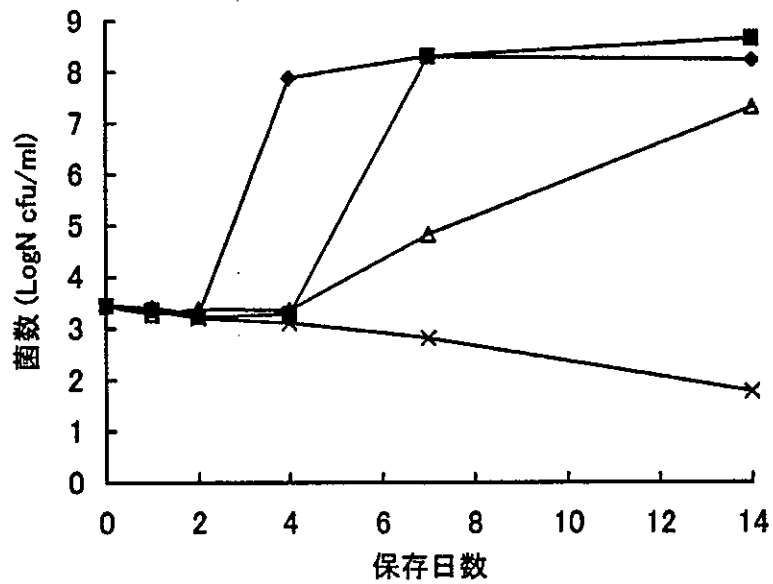


図4 亜硝酸塩とCP (カレープランツ) の併用効果 (62A株)

- ◆ コントロール
- ▲ CP 0.01%
- 亜硝酸塩 15ppm
- × CP0.01% & 亜硝酸塩15ppm

表5 カスタードプディングのボツリヌス菌芽胞接種試験

区分	検体処理内容				理化学・細菌試験						
	処理内容	検体数	番号	保存日数	容器変化(日数)	SPC(cfu/g)	Cit(cfu/g)	毒性試験	pH	Aw	
	無処理	3	CP-46	0日	NT	NT	NT	NT	6.7	0.99	
			CP-47						6.7	0.99	
			CP-48						6.7	0.99	
A	無処理	3	CP-40	0日	NT	<10	<10	陰性	NT	NT	
			CP-41						NT	NT	
			CP-42						NT	NT	
B	無処理	3	CP-43	保存中	無し(87日)	NT	NT	NT	NT	NT	
			CP-44		無し(87日)						
			CP-45		無し(87日)						
C	開封 DW接種	3	CP-34	0日	NT	<10	<10	NT	6.7	NT	
			CP-35						<10	6.7	NT
			CP-36						<10	6.7	NT
D	開封 DW接種	3	CP-37	12日	無し	<10	<10	陰性	6.6	NT	
			CP-38		無し				6.6	NT	
			CP-39		無し				6.6	NT	
E	開封 芽胞接種	3	CP-31	0日	NT	<10	1.3×10 <sup>4</sup>	NT	6.7	NT	
			CP-32				9.5×10 <sup>3</sup>		6.7	NT	
			CP-33				1.2×10 <sup>4</sup>		6.7	NT	
F	開封 芽胞接種	30	CP-1	10日	張(5), 漏(10)	NT	NT	NT	NT	NT	
			CP-2	8日	張(7), 漏(8)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-3	6日	張(5), 漏(6)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-4	7日	張(8), 漏(7)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-5	8日	張(7), 漏(10)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-6	6日	張(5), 漏(6)	<10	7.0×10 <sup>5</sup>	陽性(A+B)	5.9	NT	NT
			CP-7	9日	張(7), 漏(9)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-8	7日	張(5), 漏(7)	<10	3.7×10 <sup>6</sup>	陽性(A+B)	6.3	NT	NT
			CP-9	8日	張(8), 漏(8)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-10	8日	張(6), 漏(8)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-11	12日	張(5), 漏(12)	<10	9.0×10 <sup>6</sup>	陽性(A+B)	5.9	NT	NT
			CP-12	8日	張(8), 漏(8)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-13	5日	漏(5)	<10	3.7×10 <sup>6</sup>	陽性(A+B)	5.9	NT	NT
			CP-14	5日	漏(5)	<10	2.1×10 <sup>6</sup>	陽性(A+B)	5.7	NT	NT
			CP-15	8日	張(5), 漏(8)	<10	4.0×10 <sup>6</sup>	陽性(A+B)	5.9	NT	NT
			CP-16	9日	張(8), 漏(9)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-17	11日	張(8), 漏(11)	<10	1.1×10 <sup>7</sup>	陽性(A+B)	5.9	NT	NT
			CP-18	10日	張(7), 漏(10)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-19	10日	張(8), 漏(10)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-20	6日	張(5), 漏(8)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-21	9日	張(8), 漏(9)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-22	7日	張(5), 漏(7)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-23	11日	張(7), 漏(11)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-24	11日	張(8), 漏(11)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-25	11日	張(7), 漏(11)	<10	4.0×10 <sup>6</sup>	陽性(A+B)	5.9	NT	NT
			CP-26	8日	張(5), 漏(8)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-27	6日	張(5), 漏(6)	<10	1.6×10 <sup>6</sup>	陽性(A+B)	5.9	NT	NT
			CP-28	8日	張(8), 漏(8)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-29	8日	張(5), 漏(8)	NT	NT	NT	NT	NT	NT
			CP-30	6日	張(5), 漏(6)	<10	1.1×10 <sup>6</sup>	陽性(A+B)	5.7	NT	NT

SPC: 一般生菌数

Cit: 嫌気性菌数(クロストリジヤ数)

張: ガス発生により容器上面にわずかな膨らみ

漏: シール部分から液体の漏出

表6 日本ソバのポツリヌス菌芽胞接種試験

区分	検体処理内容				理化学・細菌試験								
	処理内容	検体数	番号	試験項目	保存日数	容器変化	SPC(cfu/g)	Cit(cfu/g)	毒性試験	pH	Aw		
	無処理	3	JS-46	理化学試験	0日	NT	NT	NT	NT	5.0	1.00		
			JS-47							5.0	1.00		
			JS-48							5.0	1.00		
A	無処理	3	JS-40	細菌試験 (陰性確認)	0日	NT	<10	<10	陰性	NT	NT		
			JS-41						<10	<10	陰性	NT	NT
			JS-42						<10	<10	陰性	NT	NT
B	無処理	3	JS-43	保存試験 (未開封)	(90日) 継続中	[無し]					NT		
			JS-44			[無し]					NT		
			JS-45			[無し]					NT		
C	開封 DW接種	3	JS-34	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	<10	<10	NT	5.1	NT		
			JS-35						<10	<10	NT	5.1	NT
			JS-36						<10	<10	NT	5.1	NT
D	開封 DW接種	3	JS-37	保存試験 (開封)	(90日) 継続中	[無し]					NT		
			JS-38			[無し]					NT		
			JS-39			[無し]					NT		
E	開封 芽胞接種	3	JS-31	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	<10	7.8x10 <sup>3</sup>	NT	5.1	NT		
			JS-32					<10	7.3x10 <sup>3</sup>	NT	5.1	NT	
			JS-33					<10	6.5x10 <sup>3</sup>	NT	5.1	NT	
F	開封 芽胞接種		JS-1	細菌試験	36日	無し	<10	2.6x10 <sup>3</sup>	陰性	5.0	NT		
			JS-2		64日	無し	<10	4.8x10 <sup>3</sup>	陰性	5.0	NT		
			JS-3		64日	無し	<10	8.1x10 <sup>3</sup>	陰性	5.0	NT		
			JS-4		(90日)	[無し]					NT		
			JS-5		(90日)	[無し]					NT		
			JS-6		36日	無し	<10	3.1x10 <sup>3</sup>	陰性	5.0	NT		
			JS-7		64日	無し	<10	4.4x10 <sup>3</sup>	陰性	4.8	NT		
			JS-8		64日	無し	<10	8.5x10 <sup>3</sup>	陰性	4.8	NT		
			JS-9		(90日)	[無し]					NT		
			JS-10		(90日)	[無し]					NT		
			JS-11		36日	無し	<10	3.1x10 <sup>3</sup>	陰性	5.0	NT		
			JS-12		64日	無し	<10	5.5x10 <sup>3</sup>	陰性	5.0	NT		
			JS-13		64日	無し	<10	5.8x10 <sup>3</sup>	陰性	4.8	NT		
			JS-14		(90日)	[無し]					NT		
			JS-15		(90日)	[無し]					NT		
			JS-16		36日	無し	<10	5.6x10 <sup>3</sup>	陰性	4.9	NT		
			JS-17		64日	無し	<10	5.4x10 <sup>3</sup>	陰性	5.0	NT		
			JS-18		64日	無し	<10	5.5x10 <sup>3</sup>	陰性	5.0	NT		
			JS-19		(90日)	[無し]					NT		
			JS-20		(90日)	[無し]					NT		
			JS-21		36日	無し	<10	3.8x10 <sup>3</sup>	陰性	4.9	NT		
			JS-22		64日	無し	<10	6.5x10 <sup>3</sup>	陰性	5.0	NT		
			JS-23		64日	無し	<10	3.4x10 <sup>3</sup>	陰性	4.8	NT		
			JS-24		(90日)	[無し]					NT		
			JS-25		(90日)	[無し]					NT		
			JS-26		(90日)	[無し]					NT		
			JS-27		(90日)	[無し]					NT		
			JS-28		(90日)	[無し]					NT		
			JS-29		(90日)	[無し]					NT		
			JS-30		(90日)	[無し]					NT		

SPC: 一般生菌数      Cit: 嫌気性菌数(クロストリジウム数)  
(90日)は保存実験継続中



図5-1  
カスタードプディング  
(検体)



図5-2  
カスタードプディング  
(陽性検体：CP-13&14)  
(保存5日目)  
(破裂および液体漏出)

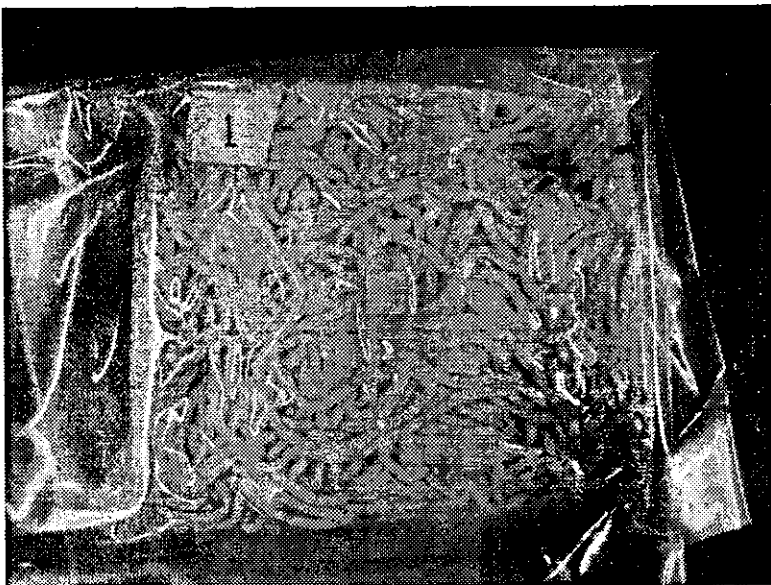


図5-3  
ゆで日本そば  
(検体)



## 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

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

分担研究者 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

### 研究要旨

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にあたり必要な情報を整理するために、当研究班全員の協力により、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。昨年度のリスクプロファイルに追加修正を加え、各項目について内容を記述した。健康影響評価の必要な対象食品、評価の目的を明確にした。さらに、レトルト類似食品以外の容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒のリスク評価について考察した。

### A. 研究目的

微生物学的リスクアセスメントを行なう場合、事前に評価の目的と対象食品や求める結果の範囲を明らかにし、現在知られている知見を系統的に整理する必要がある。食品の微生物学的危害に関するリスクアナリシスの枠組みにおいて、この作業は「リスクプロファイル作成」と位置づけられ、リスク管理機関の責任において行われるべきであると認識されている<sup>1)</sup>。将来、厚生労働省から食品安全委員会に対して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前提に、当分担研究では、容器包装詰低酸性食品のうちレトルト類似食品を対象としたリスクプロファイルの作成を行なった。また、レトルト類似食品以外の容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒のリスク評価のあり方について考察した。

### B. 研究方法

コーデックス食品衛生部会において、現在リスクプロファイルの草案として議論されている項目案を参照し、我が国独自の健康評価に適するよう、またボツリヌスの特徴に合うよう、項目案を検討した。

各項目の内容については、文献や国内外の政府機関のホームページ等から情報を収集し、記載した。

### C. 研究結果

#### リスクプロファイル

付表ならびに別添のように容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に関するリスクプロファイル（平成16年度版）を作成した。なお、リスクプロファイルの作成に当たっては、小熊主任研究者をはじめとする当研究班員のご協力をいただいた。特に別添【菌の性状】の部分は、小崎分担研究者の作成によるものである。

#### レトルト類似食品以外の容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒のリスク評価のあり方についての考察

加工食品は、概ね全体として図1のように整理されると考えられる。すなわち、食品の原材料の組み合わせによって様々な製品としての食品が製造され、それらは冷凍食品、チルド食品、あるいはそのまま食べられる調理済み食品(ready-to-eat foods)として流通する。食品製造過程で加熱加圧が行われさらに容器包装されて流通すると、容器包装詰加圧加熱殺菌食品と称される。調理済み食品以外の多くは、消費者によりさらに調理を受けて消費される。

いかなる食品（群）のリスク評価を行う際も、基本的には上記のフードチェーンの流れに沿って解析

を行う。その際、①原材料の初期汚染頻度と菌数、②製造過程で汚染頻度と菌数に影響を与える要因（温度、pH、水分活性、脂肪やタンパク含量、添加物、競合菌叢など）とその結果としての製品中の汚染頻度と菌数、③流通過程での影響要因と購買時の汚染頻度と菌数、④消費者（調理施設も含む）による調理の温度、時間とその結果としての消費時点での汚染頻度と菌数、などが、入力情報(Inputs)として利用され、結果(Outputs)として示される<sup>2)</sup>。

ボツリヌス食中毒が危惧されるレトルト類似食品以外の容器包装詰低酸性食品は、pHが4.6を超え、かつ水分活性が0.94を超え、容器包装詰で常温流通する食品であり、中心部の温度を120℃で4分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法で加熱加圧していないものである。

このような食品のボツリヌス食中毒についてリスク評価を行う場合は、まず原材料の組み合わせによる製品の類型化を行ない、次に製品の製造（加熱加圧を含む）方法、さらに流通方法による細分類を行うことが必要と考える。それぞれのグループについて、前述のように、ボツリヌスの初期汚染から消費時点での残存までに影響する因子を抽出し、それらの影響度を解析する。求められる期限と利用可能なデータに質・量により、評価のタイプは定性的から確率論的定量的なものの中から選択される。

リスク評価に基づき規格基準を設定する場合は、健康被害の目標値(appropriate level of protection: ALOP)の設定を始点とし、消費時点での当該微生物（あるいは毒素）の存在頻度と濃度(food safety objective: FSO)を求め、フードチェーンでの菌（毒素）の変化を遡りつつ、必要な箇所での規格基準を定めていく<sup>3, 4)</sup>。以下は考え方の例である。

ボツリヌス食中毒は、頻度は少なくとも被害の程度が重篤であるので、

ALOP = "zero" と想定する。

FSO = zero toxin / serving = or < Nc CFU C. botulinum (栄養型) / serving

- ・毒素産生に必要な菌数は？
- ・その食品が一食として消費される重量 (g / serving) → Nc CFU / g

原材料の汚染頻度、菌濃度と製品の pH や水分活性、添加物の有無などから、Nc CFU / g 未満が担保される加熱条件や流通温度と時間を算出する。それぞれの入力情報の変動性と不確実性を考慮し、加熱条件や流通温度と時間の安全値を決定する。

#### D. 考察

わが国においては、食品安全基本法の下に、食品の健康影響評価は内閣府食品安全委員会が行うものと定められた。厚生労働省は、法の定める場合には食品安全委員会に諮問を行なう必要がある。これは、国際的にはコーデックス食品衛生部会と FAO/WHO 合同専門家会議との間で行なわれるリスクアセスメントの要請ならびに実施と同様の関係に位置付けられる。食品の微生物学的リスクアナリシスについては、リスクアセスメントの手法だけでなく、リスクマネジメントとリスクアセスメントとの相互関係についても、そのあり方が国際的にまだ議論されている段階にある<sup>1)</sup>。わが国においては、食品安全委員会発足後、微生物関連案件については、これまでのところ 2 件の諮問があったのみである。リスクマネジメント機関としての厚生労働省と食品安全委員会との間で、諮問と答申のあり方について議論し、互いにモデルケースの提案をすべき時期にあると言える。食品安全委員会の微生物ならびにウイルス専門調査会は、合同で、微生物学的リスク評価のあり方に関するガイドラインを作成するよう、食品安全委員会から求められている。ガイドラインの中では、リスク管理省庁と食品安全委員会との間での諮問と答申のあり方についても盛り込まれることが望ましいが、厚生労働省の研究機関は、その枠組みにおける厚生労働科学研究の意義と責務についても考えるべきであると思われる。

今回、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のリスクプロファイル作成を行なった。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

を明確にしたことは、今後の諮問のあり方の一つのたたき台として位置付けられるものと考え。

レトルト類似食品以外の容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対して考察したリスク評価のあり方は、他の食品群（流通形態）、他の病原体についても応用できると考える。今後、微生物学的リスク評価を検討する際は、図 1 のような全体像を把握した上で、まず評価の必要な対象、規格基準の設定の必要なフードチェーン上の箇所を選択することが必要であろう。

レトルト類似食品以外の容器包装詰低酸性食品について、当研究班で 3 年間に亘る研究を行ってきた結果、ほとんどの該当食品において、原材料におけるボツリヌス菌汚染の可能性を否定すること、仮に加熱後にボツリヌス菌が残存したと考えると現在の流通条件では毒素産生の危険があること、が示された。結果で提示した規格基準設定の流れの例にこれらの結果を適用して推定すると、おそらく結果的には、厳しい管理条件が求められるようになるものと思われる。実際に、カナダでは、現在日本で流通しているような容器包装詰低酸性食品の多くは、自動的に回収の対象となっている状況である。現実的には、中心部の温度を 120℃で 4 分間加熱する方法又はこれと同等以上の効力を有する方法で加熱加圧すること、あるいは冷蔵流通させること、あるいは消費期限を適正に短く設定すること、これらのいずれも満たせない場合にはボツリヌス菌の接種試験を行い、菌の増殖と毒素産生が起こらないことを証明すること、という対策の選択により対処することは可能であると考え。

#### E. 参考文献

1. FAO and WHO: Report of a Joint FAO/WHO Consultation. Principles and guidelines for incorporating microbiological risk assessment in the development of food safety standards, guidelines and related texts, 18 - 22 March 2002, Kiel, Germany (2002)

2. F. Carlin, et al.: Research on factors allowing a risk assessment of spore-forming pathogenic bacteria in cooked chilled foods containing vegetables: a FAIR collaborative project, International Journal of Food Microbiology, 60: 117-135 (2000)

3. 春日文子：食品の微生物学的リスクに基づく規格基準設定のあり方、食品と技術（食品産業センター）、No. 396、1-8 (2004)

4. 春日文子：食中毒菌の微生物学的リスクアセスメントとその周辺 - 最近の国際動向から、ソフト・ドリンク技術資料 2004 年 2 号、15-30 (2004)

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

① Fumiko Kasuga, Masamitsu Hirota, Masamichi Wada, Toshihiko Yunokawa, Hajime Toyofuku, Masayoshi Shibatsuji, Hideshi Michino, Toshiaki Kuwasaki, Shigeki Yamamoto, Susumu Kumagai  
Archiving of Food Samples from Restaurants and Caterers

- Quantitative Profiling of Outbreaks of Foodborne Salmonellosis in Japan  
Journal of Food Protection, 2004, 67 (9): 2024-2032

② T. Matsui, S. Suzuki, H. Takahashi, T. Ohyama, J. Kobayashi, H. Izumiya, H. Watanabe, F. Kasuga, H. Kijima, K. Shibata, and N. Okabe

Salmonella Enteritidis outbreak associated with a school-lunch dessert: cross-contamination and a long incubation period, Japan, 2001  
Epidemiology and Infection, 2004, 132, 873-879

③ Kazuo Abe, Noriyuki Saito, Fumiko Kasuga, Shigeki Yamamoto

Prolonged incubation period of salmonellosis associated with low bacterial doses

Journal of Food Protection, 2004; 67(12): 2735-2740

## 2. 学会発表

①Kunihiro Kubota, Fumiko Kasuga, Kaoru Morikawa

Probabilistic analysis of cross contamination during cooking

International Association for Food Protection 91<sup>th</sup> Annual Meeting, Phoenix, Arizona, August 8-11, 2004

②Fumiko Kasuga, Morris Potter, Jeffery Farber  
Surveillance and trends in food borne diseases; international perspective

The First ICMSFA-China Food Safety International Conference  
Beijing, 21-22 Oct 2004

③春日文子

食品微生物規格基準の科学的背景

第88回日本食品衛生学会シンポジウム、広島市、  
2004年11月11日

④春日文子

食品微生物規格基準設定の国際動向と食品製造への応用

日本食品微生物学会第23回学術セミナー、大津市、  
2005年2月25日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし