

付表：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)

分担研究者 春日文子
研究協力者 小熊恵二、小崎俊司、
外 小熊班分担研究者全員

1. 問題となる病原微生物・媒介食品の組み合わせについて

- 対象病原微生物：
Clostridium botulinum
- この病原微生物による感染症もしくは食品衛生上の問題（食中毒など）に關与する食品または加工食品についての概略：
pH 4.6 以上かつ水分活性 0.94 以上であり常温流通する容器包装詰低酸性食品であり、若干の気体透過性を有する容器包装に入れ、密封した後に 120℃ 4 分間に満たない条件で加圧加熱殺菌された食品（レトルト類似食品）

2. 公衆衛生上の問題点について

- 当該病原微生物の、公衆衛生上に大きな影響を及ぼし得る鍵となる特性（病原性、毒素の性状、菌の増殖（毒素産生）抑制条件、温度抵抗性、薬剤抵抗性など）について：
別添 1. 菌の性状に要約する
- 引き起こされる疾病の特徴：
 - 感受性人口（疾病に罹る可能性のある人々）
全ての日本人
 - 人における年間罹患率と年齢、性別、地域、季節間における、そのばらつきと違い
我が国の 1955～2004 年の 50 年間に於けるボツリヌス食中毒の発生状況は、発生件数 90 件、患者数 355 人、死者数 68 人である。なお、死者は、1985 年に北海道でイワシいずしによる E 型ボツリヌス中毒により死亡した一人を最後に、以降発生していない。（国立感染症研究所・厚生労働省保健医療局結核感染症課、厚生労働省食品安全部）
 - 病原微生物への暴露による臨床症状、致死率、重症度、長期後遺症の性状と発生頻度
潜伏期間は 8～36 時間であるが、数日後に発症することもある。E 型中毒では初期に嘔吐や下痢が見られることが多く、それがこのタイプの中毒における致死率の低さの原因とも考えられている。主な症状は、弱視、複視、嚥下困難、呼吸困難、発声困難、筋弛緩、眼瞼下垂などである。神経症状は左右対称で、呼吸失調により死亡する。わが国の発生状況から算出すると、致死率は 19.2% である。回復後の後遺症はない。（ICMSFa、阪口玄二、武士甲一）
ヒトにおける A 型毒素の致死量は 0.1 から 1.0 μg (ICMSFa)、経口摂取では E 型毒素で約 63 μg (阪口玄二) とされる。
 - 確立した治療方法およびその実用性
E 型中毒では、発症後も抗毒素が有効である。A 型、B 型中毒では経過が緩慢なため抗毒素の投与が遅れ、投与量が不足するためか、一般に血清療法が有効であった報告は少ない。

(阪口玄二)

しかし、1998年東京都内で発生したグリーンオリーブの塩漬けによるB型ボツリヌス中毒事例では、摂食より12～25日目からの抗毒素血清投与も有効であった。(松村美由紀、岩田誠)

また、人工呼吸器や気管切開などの対症療法も有効である。

○ 年間全症例中の食中毒の割合

ボツリヌス感染症自体は、食餌性ボツリヌス症、乳児ボツリヌス症、創傷性ボツリヌス症、さらに成人の乳児ボツリヌス症に分類される。本リスクプロファイルの対象となるのは、食品中の毒素の摂取により起こる、いわゆる食中毒としての食餌性ボツリヌス症である。

● 食中毒の特徴

○ 食中毒の原因および疫学（加工、保存状況を含めた、原因食品の特徴・特性、調理方法、ハンドリングなど食品を介した伝播に影響を及ぼす事項についての概略）

本菌は、土壌、湖沼や海岸の水底、動物の腸管内など、環境中に広く存在しているため、汚染菌数は少ないものの、野菜も動物性食品も含め、ほとんど全ての食品を汚染しうる菌である。我が国のボツリヌス食中毒の原因となった食品としては、圧倒的に魚介類のいずしが多い。海外の食中毒事例では、魚の燻製や豚肉製品、半発酵や塩漬けの魚料理、ホームメイドの野菜の缶詰などが原因食品として報告されている。(ICMSFa、国立医薬品食品衛生研究所安全情報部、国立感染症研究所・厚生労働省保健医療局結核感染症課)

○ 集団食中毒の発生頻度と特性（孤発性 / 散発性症例の頻度の割合も含む）

殆どが一件一人患者の散発事例であるが、1984年のカラシレンコンによる事例では36名の患者（うち11名が死亡）が、また1998年の瓶詰めオリーブによる事例では18名の患者（死亡例なし）が発生した。

3. 食品製造、加工、流通と摂取

● リスクマネジメントに関与し、影響を与え得る媒介食品の特性

媒介食品の微生物学的安全性に影響を与える要素を含めた、生産から消費に至る連続過程（一次生産過程、加工過程、流通・輸送、貯蔵・保存、調理など）の解説

○ 原材料や食品の汚染実態：食肉、食鳥肉、魚介類、野菜、果実、穀類、その他の原材料と加工食品におけるボツリヌス菌の汚染頻度と菌数について、世界各国における報告がある。

(ICMSFb, Lund and M. W. Peck)

○ 当該食品製品の汚染実態：平成14年度小熊班研究報告書参照

○ 増殖と毒素産生に与える温度の影響：第Ⅰ群菌の増殖至適温度は35～45℃であり、10℃未満での増殖の報告はない。第Ⅱ群菌の増殖至適温度は28～30℃であり、液体培地中では4℃でも20日後、3.3℃でも47～81日後に毒素を産生したという報告もある。しかも、第Ⅱ群菌は増殖しても腐敗臭を発せず、食品の外観にも大きな変化をもたらさないことがある。これらの増殖性は、pHと水分活性によっても影響を受ける。(ICMSFa)

○ 増殖と毒素産生に与えるpHと水分活性の影響：第Ⅰ群菌はpH4.6以上、また水分活性0.94以上で、第Ⅱ群菌はpH5.0を超え、水分活性0.97以上で、増殖し毒素を産生することが報告されている。(ICMSFa)

○ 加熱による死滅：栄養型ボツリヌス菌は熱により容易に死滅する。pHや食品成分に影響さ

れるが、毒素も 74°C 1~3 分の加熱で 10 分の 1 に、1~25 分の加熱で 1000 分の 1 になる。一方、芽胞の耐熱性は高く、特に第Ⅱ群菌の耐熱性は、低酸性缶詰食品のための 12D 死滅過程導入の根拠となった。(ICMSFa)

- 増殖と毒素産生に与える気体透過性の影響：ボツリヌス菌添加後、12°C 以下で魚を保存した場合、真空条件下、および 70% ならびに 100% CO₂ 存在下のいずれにおいても、3~9 日後に毒素産生が認められた (ICMSFa)。ブロッコリーを気体透過性の異なる容器中で保存した結果、[酸素透過率 7,000 cm³/m²/24h, 二酸化炭素透過率 20,500 cm³/m²/24h] の容器では 13°C 21 日後ならびに 21°C 10 日後に、[酸素透過率 16,000 cm³/m²/24h, 二酸化炭素透過率 36,000 cm³/m²/24h] の容器では 21°C 10 日後に、それぞれ毒素産生が認められた (Hao et al.)。すなわち、気体透過性があってもボツリヌス毒素は産生される。
- リスクに関して現在知られていること、例えば媒介食品の生産、加工、流通と消費者のハンドリングに関連してどの様にしてリスクが発生し、誰に影響を及ぼすか
 - 1969 年に宮崎県で起きた B 型ボツリヌス中毒は、ドイツ産キャビアを原因として患者 23 名死者 3 名を出した (国立感染症研究所・厚生労働省保健医療局結核感染症課)。前述の東京都のグリーンオリーブによる食中毒事例は、イタリアから輸入されたビン詰めの塩漬けグリーンオリーブが原因であり、我が国で 3 例目の B 型ボツリヌス毒素による中毒であった (門間千枝ほか)。食品の国際貿易の発達により、外国の土壤に芽胞として存在するボツリヌス菌が、食品や食材に混入して輸入される可能性が危惧される。
 - 1999 年に千葉県で発生した真空パック詰め食品 (本リスクプロファイルの対象食品に該当する) による A 型ボツリヌス中毒事例では、加熱後容器包装された原因食品に冷蔵保存の表示があったにもかかわらず、包装がレトルト食品に類似していたために常温で保存されたことが、中毒の原因であった。患者が喫食した商品と同日に宅配された「ハヤシライス」の具 25 検体のうち 1 検体から A 型ボツリヌス菌ならびに毒素が検出された。(小林博司ほか、内村眞佐子ほか)
- 既存のリスクマネジメントの効果の範囲と有効性についての要約：食品の生産と加工に関する食品衛生規範・基準、教育プログラムやセミナー、介入型公衆衛生プログラム (ワクチンなど)
 - <規格基準>
 - ・ 現在、我が国では容器包装詰加圧加熱殺菌食品 (いわゆるレトルト食品) について、当該食品に含まれる微生物に着目し、病原微生物はもとより腐敗細菌等当該食品中で増殖しうる微生物が存在しない状態、いわゆる商業的無菌状態を達成することにより、当該食品に含まれる微生物に起因した食中毒等食品衛生上の危害の発生を防止するために以下のとおり規格基準を設定している。
 - 食品、添加物等の規格基準 (抜粋)
 - 第 1 食品
 - D 各条
 - 容器包装詰加圧加熱殺菌食品
 - 1 容器包装詰加圧加熱殺菌食品 (食品 (清涼飲料水、食肉製品、鯨肉製品及び魚肉ねり製品を除く。)) を気密性のある容器包装に入れ、密封した後、加圧加熱殺菌したものをいう。以下同じ。) の成分規格
 - 容器包装詰加圧加熱殺菌食品は、当該容器包装詰加圧加熱殺菌食品中で発育し得る微生物

が陰性でなければならない。この場合の微生物の試験法は、次のとおりとする。

試験法（略）

2 容器包装詰加圧加熱殺菌食品の製造基準

- (1) 製造に使用する野菜等の原料は、鮮度その他の品質が良好なものでなければならない。
- (2) 製造に使用する野菜等の原料は、必要に応じ十分に洗浄したものでなければならない。
- (3) 製造に当たっては、保存料又は殺菌料として用いられる化学的合成品たる添加物（次亜塩素酸ナトリウムを除く。）を使用してはならない。
- (4) 缶詰食品又は瓶詰食品以外の容器包装詰加圧加熱殺菌食品の容器包装の封かんは、熱溶解又は巻締めにより行わなければならない。
- (5) 製造の際に行う加圧加熱殺菌は、自記温度計を付けた殺菌器で行い、自記温度計によるその記録は3年間保存しなければならない。
- (6) 製造の際に行う加圧加熱殺菌は、次の二つの条件に適合するように加圧加熱殺菌の方法を定め、その定めた方法により行わなければならない。
 1. 原材料等に由来して当該食品中に存在し、かつ、発育し得る微生物を死滅させるのに十分な効力を有する方法であること。
 2. その pH が 4.6 を超え、かつ、水分活性が 0.94 を超える容器包装詰加圧加熱殺菌食品にあつては、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あること。
- (7) 加圧加熱殺菌後の冷却に水を用いるときは、飲用適の流水で行うか、又は遊離残留塩素を 1.0ppm 以上含む水で絶えず換水をしながらい行わなければならない。
- (8) 製造に使用する器具は、十分に洗浄したうえ殺菌したものでなければならない。

第3 器具及び容器包装

E 器具又は容器包装の用途別規格

- 1 容器包装詰加圧加熱殺菌食品（缶詰食品又は瓶詰食品を除く。以下この項において同じ。）の容器包装

容器包装詰加圧加熱殺菌食品の容器包装にあつては、次に掲げる条件のすべて（封かんが巻締めにより行われた容器包装にあつては(4)の条件を除く。）を満たすものでなければならない。

- (1) 遮光性を有し、かつ、気体透過性のないものであること。ただし、内容物が油脂の変敗による品質の低下のおそれのない場合にあつては、この限りでない。
- (2) 水を満たし密封し、製造における加圧加熱と同一の加圧加熱を行ったとき、破損、変形、着色、変色などを生じないものであること。
- (3) 強度等試験法中の耐圧縮試験を行うとき、内容物又は水の漏れがないこと。
- (4) 強度等試験法中の熱封かん強度試験を行うとき、測定された値が 23N 以上であること。
- (5) 強度等試験法中の落下試験を行うとき、内容物又は水の漏れがないこと。ただし、容器包装が小売のために包装されている場合は、当該小売のための包装の状態のまま試験を行うこと。

○ <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/

各都道府県・各政令市・各特別区衛生主管部(局)長あて 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長・厚生労働省医薬局食品保健部監視安全課長通知 (抜粋)

平成 15 年 6 月 19 日に薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会において、当該食品の取扱いについて審議が行われた結果、

「pH が 4.6 を超え、かつ、水分活性が 0.94 を超える食品を若干の気体透過性を有する容器包装(セラミック又はアルミニウムを蒸着した合成樹脂、エチレンビニルアルコール共重合体樹脂等を用いた合成樹脂製の容器包装)に入れ、密封した後に 120° 4 分間に満たない条件で加圧加熱殺菌する食品については、

① 当該食品は、原材料等がボツリヌス菌に汚染されている場合に食中毒を引き起こす可能性があること、

② ボツリヌス菌による食中毒を未然に防止する観点から、当該食品については、容器包装詰加圧加熱殺菌食品(「食品、添加物の規格基準」(昭和 34 年厚生省告示第 370 号)第 1 食品 D 各条に規定する「容器包装詰加圧加熱殺菌食品」をいう。)に準ずる衛生管理が行われることが望ましいこと、

③ 規格基準の策定については油脂の変敗防止の観点からも検討が必要であることから、追加試験成績の提出を待って検討すること」

とされた。

については、規格基準の策定までの当分の間、下記により衛生管理が行われることが望ましいと考える。

記

食品を若干の気体透過性を有する容器包装(セラミック又はアルミニウムを蒸着した合成樹脂、エチレンビニルアルコール共重合体樹脂等を用いた合成樹脂製の容器包装)に入れ、密封した後に加圧加熱殺菌する食品(清涼飲料水、食肉製品、鯨肉製品及び魚肉練り製品を除く。)であって、pH が 4.6 を超え、かつ、水分活性が 0.94 を超えるものにあつては、中心部の温度を 120° で 4 分間加熱する方法若しくはこれと同等以上の効力を有する方法で加熱殺菌を行う、又は 10° 以下で保存すること

ただし、別添のボツリヌス接種試験によりボツリヌス毒素の産生が認められないものにあつてはこの限りでない。

(別添)

ボツリヌス菌接種試験法 (省略)

○ カナダにおける食品回収方針

カナダでは、加熱後に常温流通している pH 4.6 以上かつ水分活性 0.94 以上の容器包装詰め食品は、ボツリヌス食中毒の原因となる可能性があると判断し、微生物検査なしに食品の回収を行う。最近では、たけのこの水煮やきのこの水煮が回収されている。(国立医薬品食品衛生研究所安全情報部)

○ (ワクチンの現状については他の分担研究報告書参照。)

4. 食品安全委員会への諮問の必要性と諮問内容案

- リスクプロファイルに基づき、微生物学的リスクアセスメントがマネージャー側の必要とする情報の解析を十分に行い、希望する結果・内容の提供要件を満たす手段として適当であるかに対する見解と、計画しているリスクアセスメントによって求めている結果に対して、現況で想定できる提言および、それが実際の施策にどのように反映しえるかについての検討：
 - 食品に新たな規格基準の適用を図る際には、食品安全委員会における食品健康影響評価が必要とされている。(食品安全基本法)
 - 本研究班では、当該食品の多種の検体について、微生物検査ならびにボツリヌス接種試験を行っており、そのデータに基づき、定性的あるいは定量的リスクアセスメントを行うことは可能であると考えられる。
 - 当該食品は、「若干の気体透過性を有する容器包装」を使用している点で、現行の容器包装詰加圧加熱殺菌食品の規格基準の適用から除外されているが、本リスクプロファイルの項目3に述べたように、気体透過性(酸素、二酸化炭素共に)があってもボツリヌス菌の増殖ならびに毒素産生が可能である知見が得られたことから、「気密性のある」容器包装と同様のリスクがあると考えられる。したがって、食品健康影響評価の結果、現行の容器包装詰加圧加熱殺菌食品の規格基準を当該食品にも適用するという提言ならびに施策への反映が可能と考えられる。
- 仮にリスクアセスメントが必要であることが確認されたとして、マネージャー側からアセッサーへ問いかける初期の質問事項及び解析を希望する事項：
 - レトルト類似食品に容器包装詰加圧加熱殺菌食品の規格基準に定められる加熱加圧条件を適用しなかった場合に、推定されるリスクはどのくらいであるか。
 - 容器包装詰低酸性食品のうちレトルト類似食品に対し、容器包装詰加圧加熱殺菌食品の規格基準を適用すべきかどうか(すなわち容器包装詰加圧加熱殺菌食品の定義から、「気密性のある」という部分を削除して適用食品を変更するとともに、規格基準第3のEを修正すべきかどうか)。
 - 容器包装詰低酸性食品のうちレトルト類似食品は、容器包装詰加圧加熱殺菌食品とは別に独立した規格基準を作るべきであるかどうか。
 - その他容器包装詰低酸性食品に対し、新たに規格基準を策定すべきであるかどうか。

5. 現在の入手可能な情報と、不足している知見および情報

- この病原体・媒介食品の組み合わせに対する、既存のリスクアセスメント
 - 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)
 - European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products, *The EFSA Journal* 14: 1-31 (2003)
http://www.efsa.eu.int/pdf/biohazard/opinion_biohaz_04_en.pdf
 - US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition: Processing Parameters Needed to Control Pathogens in Cold Smoked Fish,

<http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift2-toc.html> (2001)

- P.A. Voysey: A microbiological risk assessment for *Clostridium botulinum* in MAP, processed, sliced chicken, *available from the author*
- R.C. Whiting and J.C. Oriente: Time-to-turbidity Model for Non-Proteolytic Type B *Clostridium botulinum*, *International Journal of Food Microbiology* 35: 49-60 (1997)

- リスクアセスメントを実行することも含め、リスクマネジメント活動を促進するその他の関連した科学的知見やデータの存在
平成 14、15、16 年度小熊班研究報告書

- リスクマネジメントを行う上で欠如している情報
該当食品の種類、製造量、流通量、考えられる対策の実行可能性と必要経費（加熱加圧法の変更、冷蔵流通、消費期限の短縮、添加試験の実施を含む）

6. 参考文献

- 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)
- European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products, *The EFSA Journal* 14: 1-31, http://www.efsa.eu.int/pdf/biohazard/opinion_biohaz_04_en.pdf (2003)
- Y.Y. Hao et al.: Microbiological quality and production of botulinum toxin in film-packaged broccoli, carrots, and green beans, *Journal of Food Protection*, 62: 499-508 (1999)
- ICMSFa: *Clostridium botulinum*, In: *Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens*, Blackie Academic & Professional, London, pp. 66-125 (1996)
- ICMSFb: *Microorganisms in Foods 6. Microbial Ecology of Food Commodities*, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg (1998)
- B.M. Lund and M. W. Peck: *Clostridium botulinum*, In: *The Microbiological Safety and Quality of Food*, An Aspen Publication, Gaithersburg, pp. 1057-1109 (2000)
- US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition: Processing Parameters Needed to Control Pathogens in Cold Smoked Fish, <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/ift2-toc.html> (2001)
- R.C. Whiting and J.C. Oriente: Time-to-turbidity Model for Non-Proteolytic Type B *Clostridium botulinum*, *International Journal of Food Microbiology*, 35: 49-60 (1997)
- 内村眞佐子ほか: 千葉県柏市で発生したボツリヌス食中毒事例、病原微生物検出情報、20 (12)、7 (1999)
- 厚生労働省食品安全部: 食中毒・食品監視関連情報
<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/index.html>
- 国立医薬品食品衛生研究所安全情報部: 食品安全情報
<http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/index.html>

- 国立感染症研究所・厚生労働省保健医療局結核感染症課：特集 ボツリヌス症、病原微生物検出情報、21 (3)、1-2 (2000)
- 小林博司ほか：急性弛緩性四肢麻痺を呈したボツリヌス中毒の一例、1999年8月—千葉県柏市、病原微生物検出情報、20 (11)、8 (1999)
- 阪口玄二：ボツリヌス症—病因、病形、発症機構、診断と治療—、病原微生物検出情報、21 (3)、3-4 (2000)
- 武士甲一：ボツリヌス中毒、新訂食水系感染症と細菌性食中毒（編集：坂崎）、中央法規、492-513 (2000)
- 松村美由紀、岩田誠：東京都内で発生したグリーンオリーブの塩漬けによる B 型ボツリヌス食中毒事例（1）—臨床、病原微生物検出情報、21 (3)、4-5 (2000)
- 門間千枝ほか：東京都内で発生したグリーンオリーブの塩漬けによる B 型ボツリヌス食中毒事例（2）—検査結果、病原微生物検出情報、21 (3)、5 (2000)

【菌の性状】

a) 定義・分類

偏性嫌気性グラム陽性の桿菌 (0.8~1.2 x 4~6 μm) で、耐熱性芽胞を形成する。菌は産生する毒素の抗原性の違いによりAからG型の8型に分類されている。古くからC型とD型毒素間交差反応があり、これはC、D各型菌が免疫学的に異なる複数の毒素因子を産生することによると考えられていた。しかし、この交差反応はC、D型毒素間に存在する共通抗原部位に由来することが明らかになっている。同様にE、F型毒素間でも交差反応があることが指摘されている。ほとんどの全ての菌株は1種類の型の毒素を産生する。しかし、土壌、食中毒、乳児ボツリヌス症などの検体から例外的に2種類の毒素を産生する菌が分離されている。

b) 生化学的性状

ボツリヌス菌は生化学的な性状により4群に分類することができるが、毒素型による分類とは一致しない。第I群菌には全てのA型菌とタンパク分解性B、F型菌が属し、最も耐熱性の高い芽胞を形成する。第I群の株と *C. sporogenes* とは毒素産生以外の性状で区別することができない。第II群には全てのE型菌と蛋白非分解性のB、F型菌が属している。発育至適温度は最も低く、形成する芽胞の耐熱性も最も低い。蛋白分解酵素の産生能を欠くため、毒素は毒性の低い、いわゆる「前駆体」の形で産生されるため毒素活性の測定にはトリプシンによる活性化が必要である。第III群菌にはC、D型菌が属している。この群に属する菌の芽胞の耐熱性は第I群菌と第II群菌の中間の値を示す。菌の増殖に対する酸素許容量は低く、他の群の菌と比べて高い嫌気条件を要求する。*C. novyi* が極めて類似した性状を示す。第IV群菌としてG型菌のみが属している。他の群とは異なり糖非分解性でリパーゼを産生しない。第III群菌と同様酸素に対する耐性が低い。G型菌は芽胞形成能が低く、また形成された芽胞の大部分は易熱性で一部の芽胞のみが耐熱性を獲得している。最近G型菌と遺伝学的に相同性のある菌群に対して *C. argentinense* の名称が提案された。この種には *C. subterminale* と *C. hastiforme* の毒素非産生菌が含まれる。欧米で発生した乳児ボツリヌス症から分離された菌の中で、ある種の *C. butyricum*、*C. barati* がそれぞれE、F型と非常に類似した毒素を産生することが明らかになっている。

単に分類学上の視点からでは、ボツリヌス菌の分類は不完全であるが、現在の分類は医学細菌学の研究者の利便や分類学上の混乱を避けるため残されている。

c) 分布・生態

芽胞は土壌、河川、湖沼、海岸地帯の堆積物、泥あるいは動物、鳥類の消化管内や魚類、甲殻類のえらなどから分離される。野生動物や鳥類の死体には通常多数の菌が存在し感染源になっている。温帯地方では時にはこのような死体の中で毒素が産生され、死体を摂取した動物で散発的にボツリヌス症が発生し、また腐肉を食べる習性のある動物では大規模な発生も見られる。

蛋白分解性の第I群菌は比較的雨量の少ない地域から分離される。アメリカではA型菌とB型菌に地理的分布に特徴が見られる。A型菌はロッキー山脈より西側でよく検出され、B型菌はミシシッピー川から東部にかけて分布している。土壌も菌の分布に影響を与え、A型菌は有機物の少ない中性からアルカリ性の土壌から、B型菌は有機物が比較的多い、酸性の土壌からよく分離される。ヨーロッパではA型菌の分布は非常に低い。

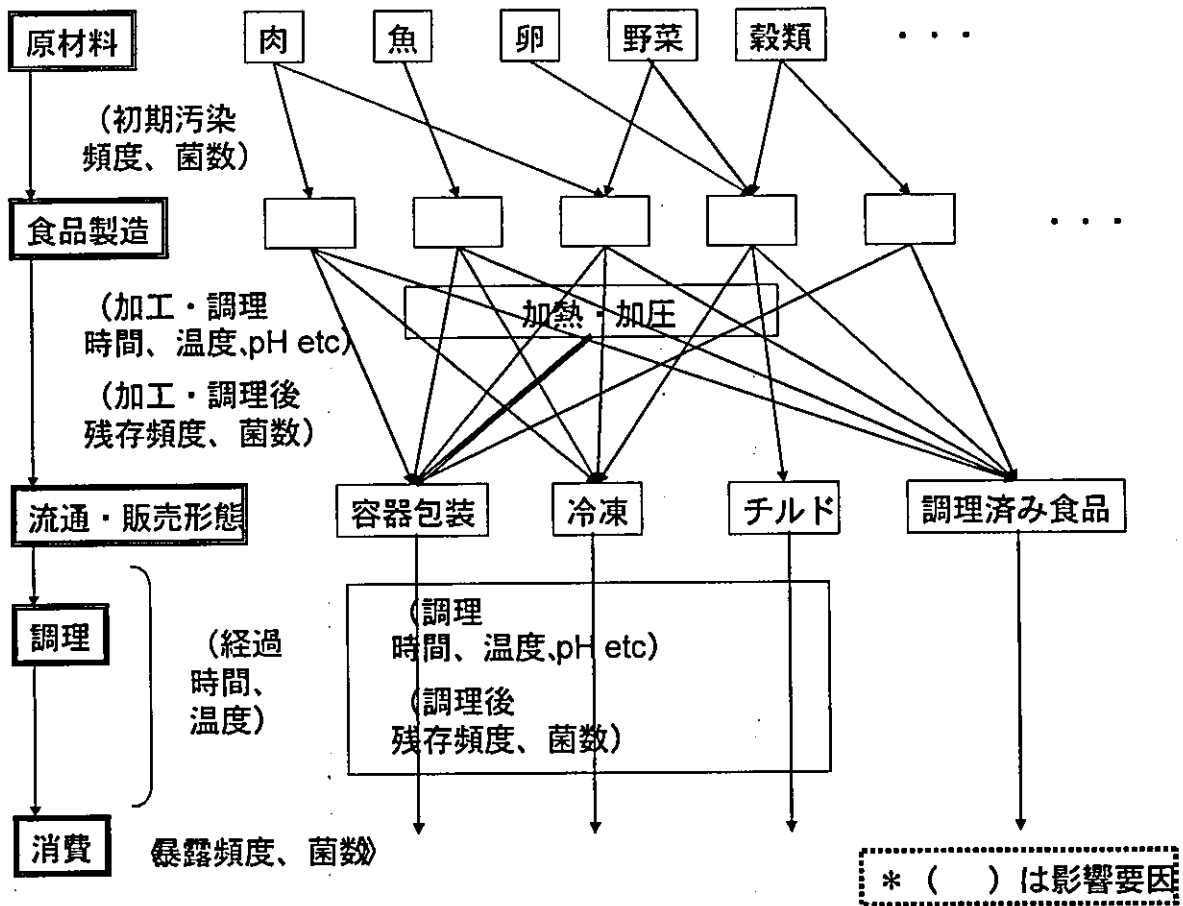
B型菌はスイス、イタリアの土壤に第Ⅱ群菌に属する蛋白非分解性菌と混在しながら分布している。その他、ブラジル、アルゼンチン、ロシア、中国、台湾でA、B型菌、オーストラリア、ケニアでA型菌の存在が確認されている。我が国では秋田県下の土壤調査で低頻度ながらA型菌が検出されている。

第Ⅱ群菌は比較的水分および有機物の多い地域に分布している。最も分布調査が行われているE型菌はアメリカ、ヨーロッパ、ロシアなど北半球各地の海岸、湖沼に存在しているが、南半球のブラジル、アルゼンチン、オーストラリア、ニュージーランドでは検出されていない。我が国では食中毒の発生が多い北海道、東北地方の沿岸、湖沼から高頻度に検出されている。第Ⅱ群菌（B、E型菌）は他の群菌と比べ塩濃度に影響を受けやすく、海水の塩濃度（3.5%）条件下ではほとんど発育しないと思われる。このことは湖沼、河川、汽水域で菌の検出率が高いことを示唆している。

第Ⅲ群菌は淡水中の土壤や堆積物中で増殖すると考えられている。菌は気温の高い地域により分布している傾向がある。アメリカでは検出頻度は低いですが、C型菌が南部の酸性土壤からD型菌が西部のアルカリ性土壤から検出された。オランダでは野生カモのボツリヌス症が発生した貯水池からC型菌が高頻度に検出されている。インドネシア、タイ、台湾、バングラディシュ、ブラジルでC、D型菌の両方、あるいはC型菌が検出されている。第Ⅲ群菌の増殖は他の細菌（*Bacillus* 属菌など）に影響を受けやすく、実際イギリス、フランス、スペインの土壤中にC型菌の芽胞を接種後、検査しても毒素は検出されなかった。我が国では石川県下の湖の調査でC型菌が検出されている。また日本海沿岸、九州北部、瀬戸内海にもC型菌が分布している。

第Ⅳ群菌に属するG型菌はアルゼンチンとスイスの土壤から検出されている。

図1. 加工食品の全体像



追加試験報告書

課無菌化包装米飯へのボツリヌス菌接種試験

主任研究者 小熊恵二 岡山大学大学院医歯学総合研究科 学部長・教授
分担研究者 駒木 勝 (社)日本缶詰協会研究所 所長
分担研究者 武士甲一 帯広畜産大学畜産学部獣医学科 教授
分担研究者 林 賢一 滋賀県衛生科学センター 次長

A. 研究目的

常温で流通する密封容器詰殺菌食品のうち、食品を容器に充填、密封した後に 120°C で 4 分間の加圧加熱殺菌処理されない食品のボツリヌス菌に対するリスクを評価するため、無菌化包装米飯について検討した。すでに当該食品についてはボツリヌス菌接種試験の結果が公表されている（風間ら（1994 年）、葛西ら（2001））。しかし、当該食品のボツリヌス菌に対するリスクを評価する上ではさらにデータの構築が必要であると考えられる。そこで、今回、当該食品中におけるボツリヌス菌の発育に及ぼす接種芽胞数の濃度の影響を調べることを目的として、試作品 1 品目および市販の無菌化包装米飯 2 品目について接種試験を実施した。さらにボツリヌス菌の代替株としてのスポロゲネス菌の発育能についても検討した。

B. 研究方法

1. 供試菌株

C. botulinum A 型 3 株（62AATCC, 62ANFPA および 36A 株）および B 型 2 株（213B および Okra 株）の計 5 株ならびに *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. 供試試料

試作米飯（以下、試料 S とする）については、SB 社と協議の上当該食品（プラスチック成型容器、内容量 160g）を試作して試験に供した。市販の無菌化包装米飯については、いずれもプラスチック成型容器で包装された製品 A（E 製菓製、内容量 160g、品質保持期限 4 ヶ月）と製品 B（S 食品製、内容量 200g、品質保持期限 6 ヶ月）の 2 品目を用いた。

4. 接種芽胞液の調製

接種用のボツリヌス菌芽胞液は各菌株を等量に混合して用いた。また、芽胞数の濃度は 5 種類とした。すなわち、ボツリヌス菌混合接種液は、まず各菌株芽胞液を約 1.8×10^8 cfu/ml（試料 S の接種用）および 2.0×10^5 cfu/ml（製品 A および B の接種用）になるよう希釈し、この希釈液を等量ずつ混合した。さらにこれらの 10^5 , 10^8 cfu/ml の芽胞液を 10 倍段階希釈し、各々 10^3 , 10^6 cfu/ml の混合芽胞液を調製した。これら芽胞数が異なる混合芽胞液は、供試試料への接種直前に 80°C、20 分間加熱処理した。

スポロゲネス菌についても同様に調製して 10^8 cfu/ml の芽胞液を作製し、10 倍段階希釈して 10^6 cfu/ml の芽胞液を調製した。これら接種用芽胞液は試料への接種直前に 80°C、20 分間加熱処理した。

5. 接種方法

当該食品へのボツリヌス菌芽胞の接種試験の概要を図 1 および 2 に示す。試料の蓋部表面をアルコールで拭き、中央部に約 2cm 角のゴムシール（株式会社サン科学製）を貼った。ゴムシール表面をアルコールで拭き、ゴムシールを介して注射針を刺し、米飯表面に混合芽胞液を 20 μ l ずつ接種した。なお、 10^3 cfu/ml の濃度の芽胞液については、1 試料につき同時に 3 方向に 20 μ l ずつ（20 μ l ずつ 3 回）接種した。接種後、ゴム

シールの表面をアルコールで拭き、針穴の上に約 1cm 角の同ゴムシールを貼った。芽胞接種試料を個別に滅菌袋に入れてシールし、保存試験に供した。対照試料として、同様に滅菌蒸留水 20 μ l (以下 DW とする) を接種した。試料への接種時における接種用芽胞液 20 μ l 中の初発芽胞数については、試料への接種中に無作為に 3 回、各々滅菌蒸留水 10ml 入りの試験管に 20 μ l 接種し、常法により芽胞数を測定した。

6. 供試試料の芽胞液接種直後の初発芽胞数の測定

ボツリヌス菌芽胞液を接種した試料および無接種対照試料の各 3 検体について測定した。

1) 検液の調製

検体の全量 (160~200g) 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てストマッカーで十分に混和し、2 倍乳剤としたものを検液とした。

2) 好気性生菌数の測定

1) で調製した検液 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)。これを 10 倍段階希釈し、常法により芽胞数を測定した。

3) *Clostridium* 属生菌数の測定

1) で調製した検液 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、各滅菌アナエロビック・パウチに滅菌後、予め 55 $^{\circ}$ C に保温しておいた CCA10ml および 10 倍希釈液 1ml を各々加え、よく混和した後、平板に固化した。各段階希釈液について 2 枚のアナエロビック・パウチを用いた。30 $^{\circ}$ C、7 日間培養後、黒色集落を数え、結果を “cfu/g” で示した。

4) pH の測定

1) で調製した検液をガラス電極式 pH 計 (東亜電波工業製, HM-50V または HORIBA 製, EX20) で測定した。

7. 恒温放置

無接種対照試料 6 検体とボツリヌス菌芽胞接種試料およびスプロゲネス菌接種試料 (試料 S のみ) 各 30 検体を 30 $^{\circ}$ C、3~9 カ月間恒温放置した。ボツリヌス菌芽胞接種試料の試料 S は 3 ヶ月後に 30 検体を、製品 A および B は 1 ヶ月ごとに 3~5 検体ずつ取り出し、発育の判定試験に供した。なお、無接種対照試料は 3~9 ヶ月間恒温放置後に 3 検体を発育判定試験に、残りの 3 検体をヘッドスペースガス分析に供した。なお、試料 S のスプロゲネス菌接種試料は 0.5、1 および 2 ヶ月後に 3 検体ずつ取り出し、3 ヶ月後に 21 検体を、発育の判定試験に供した。

8. ヘッドスペースガス分析

接種直後および所定の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。

9. 発育の判定

1) 検液の調製

上記 6. 供試試料の接種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毒素試験を行った。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 6. 供試試料の接種直後の初発菌数測定と同様に行なった。

4) pH の測定

上記6. 供試試料の接種直後の初発菌数測定と同様に行なった。

C. 研究結果

1) 接種芽胞液の芽胞数

調製した混合芽胞液の芽胞数測定結果を表 1 に示す。試料 S では、ボツリヌス菌混合芽胞液は $4.0 \times 10^4 \text{cfu}/20 \mu\text{l}$ (10^2 接種区) および $1.8 \times 10^5 \text{cfu}/20 \mu\text{l}$ (10^4 接種区), スポロゲネス菌芽胞液は $1.6 \times 10^4 \text{cfu}/20 \mu\text{l}$ (10^2 接種区) および $1.1 \times 10^5 \text{cfu}/20 \mu\text{l}$ (10^4 接種区) であった。また, 製品 A および B のボツリヌス菌混合芽胞液は $8 \text{cfu}/20 \mu\text{l}$ (10^{-1} 接種区) および $2.9 \times 10^3 \text{cfu}/20 \mu\text{l}$ (10^1 接種区) であった。

2) ボツリヌス菌芽胞液接種直後の試料の試験結果

供試試料に接種した供試芽胞液の接種直後の pH および菌数測定結果を表 2 に示す。試料 S においては, DW 接種区 (対照) の pH は 6.4~6.8, ボツリヌス菌接種の試料の pH は 6.9 で, スポロゲネス菌接種試料の pH は 6.8~6.9 であった。好気性生菌数はいずれも 10cfu/g 未満で, *Clostridium* 属生菌数については, 無接種試料では 10cfu/g 未満, ボツリヌス菌接種試料では $2.9 \sim 7.0 \times 10^2 \text{cfu/g}$ および $1.8 \sim 4.4 \times 10^4 \text{cfu/g}$, スポロゲネス菌接種試料では $1.5 \sim 3.1 \times 10^2 \text{cfu/g}$ および $7.3 \times 10^3 \sim 5.6 \times 10^4 \text{cfu/g}$ であった。

製品 A においては, DW 接種区 (対照) およびボツリヌス菌接種区 (10^3 および 10^5 芽胞液) のいずれの試料も pH 5.1~5.4, 好気性生菌数は 10cfu/g 未満であり, *Clostridium* 属生菌数については, 無接種試料は 10cfu/g 未満, ボツリヌス菌接種試料では 10cfu/g 未満および 10cfu/g 未満~ 30cfu/g であった。製品 B においては, DW 接種区 (対照) およびボツリヌス菌接種区 (10^3 および 10^5 芽胞液) のいずれの試料も pH 7.0~7.1, 好気性生菌数は 10cfu/g 未満で, *Clostridium* 属生菌数については, 無接種試料は 10cfu/g 未満, ボツリヌス菌接種試料では 10cfu/g 未満および $40 \sim 50 \text{cfu/g}$ であった。

供試試料の内容量と接種芽胞液 $20 \mu\text{l}$ 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, 試料 S (内容量 160g) のボツリヌス菌芽胞は $2.5 \times 10^2 \text{cfu/g}$ (10^2 接種区) および $1.1 \times 10^4 \text{cfu/g}$ (10^4 接種区), スポロゲネス菌芽胞は $1.0 \times 10^2 \text{cfu/g}$ (10^2 接種区) および $6.9 \times 10^3 \text{cfu/g}$ (10^4 接種区) となる。また, 製品 A (内容量 160g) のボツリヌス菌芽胞は 0.1cfu/g (10^{-1} 接種区) および 18cfu/g (10^1 接種区), 製品 B (内容量 200g) のボツリヌス菌芽胞は 0.1cfu/g (10^{-1} 接種区) および 15cfu/g (10^1 接種区) となる。無接種対照検体から *Clostridium* 属菌が全く検出されなかったため, 接種試料で検出された *Clostridium* 属生菌数はすべて接種したボツリヌス菌芽胞と考えられる。したがって供試試料のうち, 試料 S には $10^2 \sim 10^4 \text{cfu/g}$ のボツリヌス菌芽胞またはスポロゲネス菌芽胞が, また製品 A および B には $0.1 \sim 10^1 \text{cfu/g}$ のボツリヌス菌芽胞が接種されたことになる。

3) 供試料中におけるボツリヌス菌およびスポロゲネス菌の恒温放置試験結果

試料 S の 30°C , 3 カ月間の恒温試験結果を表 3 に示す。ボツリヌス菌接種のうち 10^2 接種試料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。しかし, 10^4 接種試料では, 容器の膨脹は認められなかったが, *Clostridium* 属生菌数が 10 倍以上に増加し, 毒素産生が認められた。スポロゲネス菌については, 10^2cfu/g および 10^4cfu/g 接種試料のいずれにおいても本菌の増殖が認められた。

ボツリヌス菌芽胞液を接種した製品 A および B の 30°C での恒温試験結果を表 4 に示す。製品 A においては, 1 および 2 カ月目においていずれの試料も容器は膨脹せず, pH は 5.2~5.4 で接種時と同じで, 毒素産生も認められなかった。製品 B においては, 30°C , 1 カ月目にいずれの試料も容器は膨脹せず, pH は 6.8~7.0 で接種時とほぼ同じであり, 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。2 カ月目においても容器は膨脹せず, pH も接種時とほぼ同じであったが, *Clostridium* 属生菌数は, 10^{-1} 接種試料で 3 検体中 1 検体が $6.9 \times 10^2 \text{cfu/g}$, 10^5 芽胞液接種試料で 3 検体中 3 検体とも $2.0 \times 10^4 \sim 6.0 \times 10^4 \text{cfu/g}$ で, 各々接種時よりも 10 倍以上の菌数増加がみられた。しかし, これら菌数の増加がみられた検体からは毒素産生

は認められなかった。

4) ヘッドスペースガス分析結果

ヘッドスペースガス分析結果を表 5 に示す。恒温開始時の酸素量は、試料 S および製品 B は検出されなかったが、製品 A は 17~18%検出された。製品 A および B では未接種のヘッドスペースガスも測定したが、DW 接種とほぼ同じ値であった。試料 S は 30℃、3 カ月間の恒温放置後にも恒温開始時と変わりはなかった。

5) 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に及ぼす接種芽胞数の影響

供試試料中におけるボツリヌス菌またはスポロゲネス菌芽胞の発育状況を表 6 に示す。供試ボツリヌス菌は 10^4 cfu/g の芽胞数を接種した試料 S で増殖および毒素産生がみられた。また、 10^{-1} cfu/g および 10^1 cfu/g 接種した製品 B では 30℃で 2 カ月目に菌数の増加がみられたが毒素の産生はみられなかった。製品 A では接種濃度に関係なく菌数の増加および毒素産生はみられなかった。また、供試スポロゲネス菌は 10^2 cfu/g および 10^4 cfu/g の芽胞数を接種した試料 S で増殖がみられた。

D. 考察

供試菌株の接種芽胞数を一般的なボツリヌス菌接種試験の濃度である 10^3 ~ 10^4 cfu/g と、より低濃度による接種試験を実施した。一般的な接種濃度による発育状況は試料 S で試験し、低濃度による接種試験は市販品の製品 A および B で行なった。また、試料 S ではスポロゲネス菌についても試験した。その結果、試料 S

ではボツリヌス菌芽胞を 10^2 cfu/g 接種した試料では菌の増殖と毒素産生は認められなかったが、 10^4 cfu/g 接種した試料においては菌の増殖と毒素産生が認められた。また、 10^{-1} cfu/g または 10^1 cfu/g のボツリヌス菌芽胞を接種した製品 B において、菌数が増加した試料がみられたが毒素産生は認められなかった。製品 A では製品 B と同じ接種濃度であったが菌数の増加がみられる試料はなかった。これは製品 A の pH が 5.1~5.4 と製品 B (pH7.0~7.1) に比べ低いことと製品 A はヘッドスペースに若干の酸素が存在することが発育を抑制したものと考えられる。

通常、容器包装詰低酸性食品に対するリスク評価は、約 10^4 cfu/g の芽胞数で実施しているの、たとえ、低濃度での接種によりボツリヌス菌の毒素産生がみられなかったとはいえ、無菌化包装米飯は 10^4 cfu/g の芽胞の接種により、ボツリヌス菌の増殖と毒素産生の可能性のある食品であると考えられる。

一方、スポロゲネス菌芽胞を接種した試料においては、 10^2 cfu/g または 10^4 cfu/g 接種したいずれの試料においても菌の増殖が認められた。この結果からすればボツリヌス菌の代替株としてスポロゲネス菌の使用が可能であると考えられた。

供試試料の初期酸素量は、製品 A が 17~18%であったが、この値は通常の脱酸素を行っていない成型容器では通常の値である。製品 B および試料 S は初期封入空気量が多いにもかかわらず、接種直後より酸素は検出されなかった。これは容器内に鉄系の脱酸素剤が封入されており、この効果により製造直後から酸素が検出されなかったものと考えられる。容器内のヘッドスペースガス組成は窒素が大部分を占めており、ボツリヌス菌の増殖に特に影響を与える酸素および二酸化炭素は検出されなかった。また、未接種と DW 接種（対照）ではヘッドスペースガス組成にほとんど違いがみられないことから、注射器による接種はヘッドスペースガス組成に影響はないと考えられた。

E. 結論

市販の無菌化包装米飯にボツリヌス菌芽胞を接種し、そのリスク評価を行った。試料 S の恒温放置 3 カ月後の試験において、 10^2 cfu/g 接種試料ではボツリヌス菌の増殖と毒素産生は認められなかったが、 10^4 cfu/g

接種試料においてその増殖と毒素産生が認められた。試料 B では、30℃、1 カ月後の恒温放置試験において、 10^3 芽胞液接種試料が 0cfu/g、 10^5 芽胞液接種試料が 10~35cfu/g と接種時と同じで、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。2 カ月後においていずれの試料からも毒素産生は認められなかったが、*Clostridium* 属生菌数は各々接種時よりも 10 倍以上の増加が認められた試料があった。これらの結果から、無菌化包装米飯は、潜在的にボツリヌス食中毒の発生の可能性がある食品と考えられた。

試作米飯への芽胞の接種試験において、ボツリヌス菌芽胞およびスポロゲネス菌芽胞を 10^4 cfu/g に接種した試料においては菌の増殖あるいは毒素産生が認められた。このことから接種芽胞数が 10^4 cfu/g 以上ならば、ボツリヌス菌の代替株としてスポロゲネス菌の使用が可能であると考えられた。

当該無菌化包装米飯の容器内のヘッドスペースガス組成は窒素が大部分を占めており、ボツリヌス菌の増殖に特に影響を与える酸素および二酸化炭素は検出されず、また、未接種と DW 接種（対照）ではヘッドスペースガス組成にほとんど違いがみられなかった。その結果、注射器による接種はヘッドスペースガス組成に影響はないと考えられた。

F. 健康危険情報

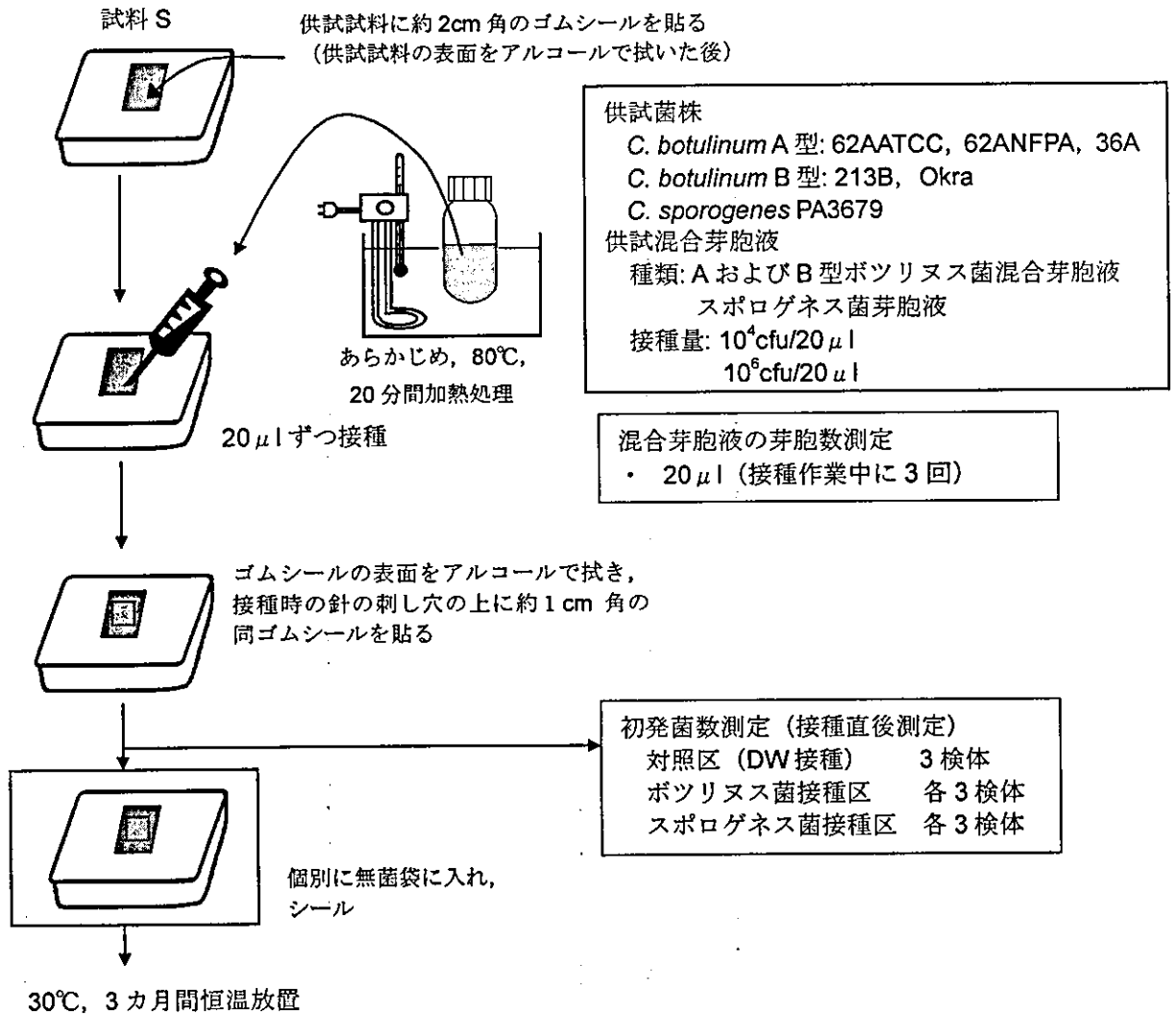
特記事項なし。

G. 研究発表

特記事項なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記事項なし。

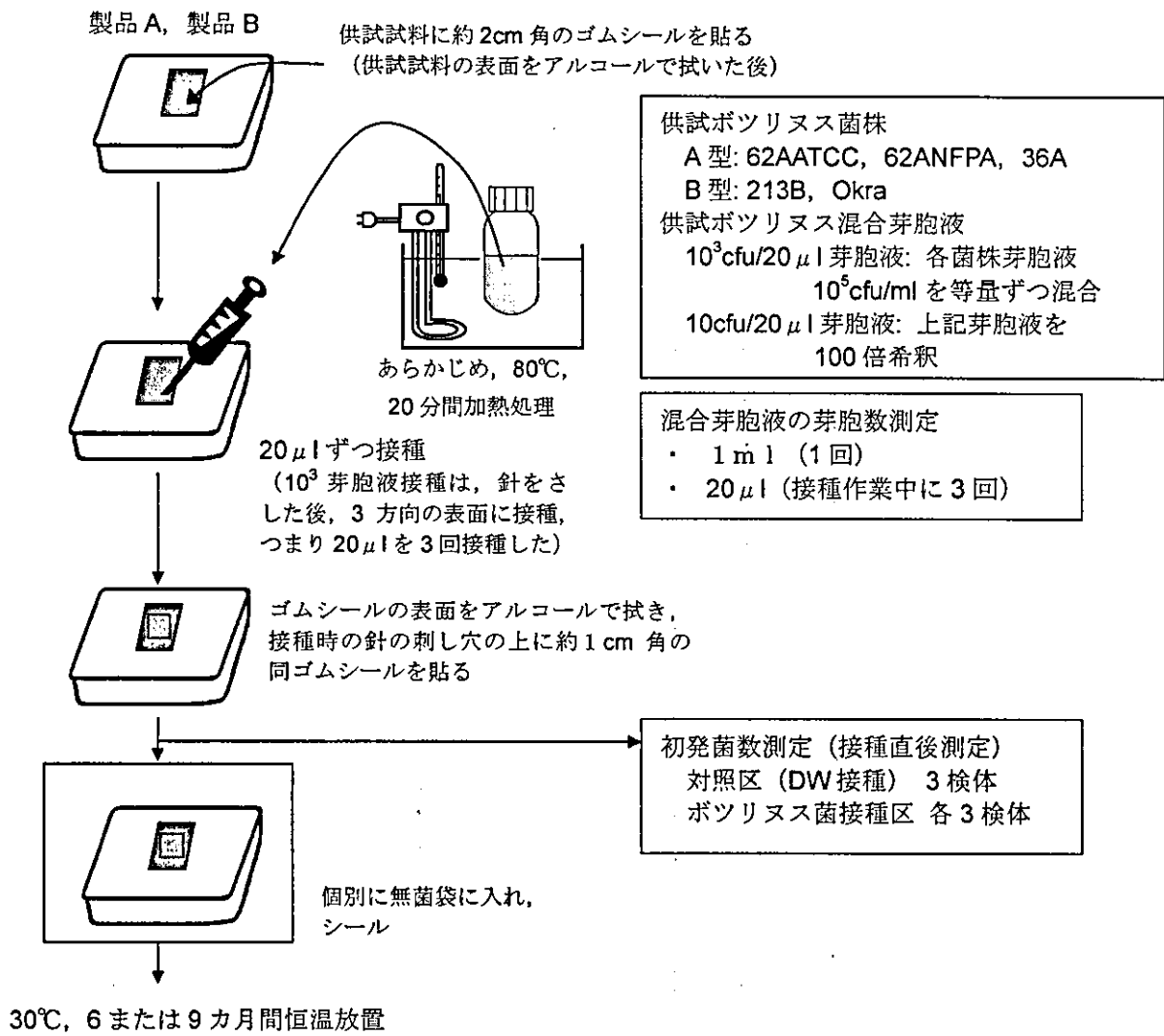


供試試料数 (個/容器/試料)

分析内容	
測定 I	ヘッドスペースガス分析
測定 II	加熱直後の菌数
	pH 測定
	好気性生菌数の測定
	<i>Clostridium</i> 属生菌数の測定
測定 III	恒温放置後の菌数
	容器の膨脹の有無
	pH 測定
	<i>Clostridium</i> 属生菌数の測定
測定 IV	恒温放置後の菌数
	容器の膨脹の有無
	pH 測定
	<i>Clostridium</i> 属生菌数の測定
	毒素の検出

恒温放置 期 間 (月/30°C)	測定 項目	無接種 対照	ボツリヌス菌 接種	スポロゲネス菌 接種
0	I	3	0	0
	II	3	3	3
0.5	III	0	0	3
1	III	0	0	3
2	III	0	0	3
3	I	3	0	0
	III	3	0	21
	IV	0	30	0

図 1 試料 S への芽胞接種試験の研究概要



供試試料数 (個/容器/試料)

分析内容	
測定 I	ヘッドスペースガス分析
測定 II	加熱直後の菌数 pH 測定 好気性生菌数の測定 Clostridium 属生菌数の測定
測定 III	恒温放置後の菌数 容器の膨脹の有無 pH 測定 Clostridium 属生菌数の測定
測定 IV	恒温放置後の菌数 容器の膨脹の有無 pH 測定 Clostridium 属生菌数の測定 毒素の検出

恒温放置 期 間 (月/30°C)	測定 項目	製品 A		製品 B	
		無接種 対照	ボツリヌス 菌接種	無接種 対照	ボツリヌス 菌接種
0	I	3	0	3	0
	II	3	3	3	3
1	IV	0	5	0	3
2	IV	0	5	0	3
3	IV	0	5	0	3
4	IV	0	5	0	3
5	IV	0	5	0	3
6	I	3	0	0	0
	III	3	0	0	0
7	IV	0	5	0	3
	IV	0	5	0	3
9	IV	—	—	0	3
	I	—	—	3	0
	III	—	—	3	0
	IV	—	—	0	6

図 2 製品 A および B へのボツリヌス菌芽胞接種試験の研究概要

表1 接種芽胞液の芽胞数測定^{a)}結果

供試試料	供試芽胞液	設定した芽胞液の濃度 (cfu/ml) ^{b)}	測定値 (cfu/20 μ l)
試料 S	ボツリヌス菌	10 ⁶	4.0 \times 10 ⁴
		10 ⁸	1.8 \times 10 ⁶
	スポロゲネス菌	10 ⁶	1.6 \times 10 ⁴
		10 ⁸	1.1 \times 10 ⁶
製品 A	ボツリヌス菌	10 ³	8
製品 B		10 ⁵	2.9 \times 10 ³

a) 3回の平均値

b) 調製した芽胞液 1mlあたりの芽胞数

表2 供試試料への芽胞液接種直後の pH および菌数測定^{a)}結果

供試試料	接種芽胞液	設定芽胞数 (cfu/g) ^{b)}	pH	好気性生菌数 (cfu/g)	Clostridium 属生菌数 (cfu/g)
試料 S	DW (対照)	—	6.4~6.8	< 10	< 10
	ボツリヌス菌	10 ²	6.9	< 10	2.9 \times 10 ² ~7.0 \times 10 ²
		10 ⁴	6.9	< 10	1.8 \times 10 ⁴ ~4.4 \times 10 ⁴
	スポロゲネス菌	10 ²	6.9	< 10	1.5 \times 10 ² ~3.1 \times 10 ²
		10 ⁴	6.8	< 10	7.3 \times 10 ³ ~5.6 \times 10 ⁴
製品 A	DW (対照)	—	5.2~5.3	< 10	< 10
	ボツリヌス菌	10 ⁻¹	5.2~5.4	< 10	< 10
		10 ¹	5.1~5.4	< 10	< 10~30
製品 B	DW (対照)	—	7.0~7.1	< 10	< 10
	ボツリヌス菌	10 ⁻¹	7.1	< 10	< 10
		10 ¹	7.1	< 10	40~50

a) 3検体ずつ

b) 供試試料 1gあたりの芽胞数

表3 試料 S の 30 $^{\circ}$ C, 3カ月間恒温放置後のボツリヌス菌の発育判定試験結果

接種芽胞液	設定芽胞数 (cfu/g)	恒温放置期間 (月/30 $^{\circ}$ C)	容器の膨脹	pH	Clostridium 属細菌数 (cfu/g)	毒素の産生
ボツリヌス菌	10 ²	3	無	6.7~6.9	65~6.6 \times 10 ²	- ^{a)}
	10 ⁴	3	無	6.3~6.9	4.7 \times 10 ⁵ ~3.9 \times 10 ⁶	+
スポロゲネス菌	10 ²	0.5	無	6.5~6.7	90~2.9 \times 10 ⁴	NT
		1	無	6.8~6.9	4.3 \times 10 ³ ~9.4 \times 10 ⁴	NT
		2	無	6.9	1.2 \times 10 ⁵ ~> 10 ⁶	NT
		3	無	6.8~6.9	8.4 \times 10 ⁵ ~1.9 \times 10 ⁶	NT
	10 ⁴	0.5	無	6.7~6.8	3.4 \times 10 ⁵ ~1.1 \times 10 ⁶	NT
		1	無	6.9	2.4 \times 10 ⁵ ~4.0 \times 10 ⁵	NT
		2	無	6.9~7.0	5.1 \times 10 ⁵ ~3.3 \times 10 ⁶	NT
		3	無	6.8~6.9	3.3 \times 10 ⁵ ~7.1 \times 10 ⁵	NT

a) +: 陽性, -: 陰性, NT: 試験せず

表4 製品AおよびBの30℃、2カ月間恒温放置後のボツリヌス菌の発育判定試験^{a)}結果

供試試料	設定芽胞数 (cfu/g)	恒温放置期間 (月/30℃)	容器の膨脹	pH	<i>Clostridium</i> 属生菌数 (cfu/g)	毒素の産生
製品A	10 ⁻¹	1	無	5.2~5.3	<10	- ^{b)}
		2	無	5.2~5.4	<10	-
	10 ¹	1	無	5.2~5.4	<10	-
		2	無	5.1~5.3	<10	-
製品B	10 ⁻¹	1	無	6.8~7.0	<10	-
		2	無	7.0	<10~6.9×10 ²	-
	10 ¹	1	無	6.9~7.0	10~35	-
		2	無	6.9~7.0	2.0×10 ⁴ ~6.0×10 ⁴	-

a) 製品Aは5検体ずつ、製品Bは3検体ずつ測定

b) +: 陽性, -: 陰性

表5 供試試料のヘッドスペースガス分析結果

供試試料		恒温放置期間 (月/30℃)	総ガス量 (ml)	酸素 (%)	窒素 (%)	水素 (%)	二酸化炭素 (%)	初期封入空気 (ml)
試料S	DW 接種	0	180.0	0	99.9	0.1	0	230.2
		3	174.7	0	99.9	0.1	0	223.5
製品A	未接種	0	98	17.8	82.2	0	0	103.1
		6						
	DW 接種	0	97	17.1	82.9	0	0	103.0
		6						
製品B	未接種	0	128	0	99.7	0.3	0	163.4
		9						
	DW 接種	0	124	0	99.7	0.3	0	158.3
		9						