

200401154B

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

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

平成14～16年度 総合研究報告書

主任研究者 小熊恵二

平成17（2005）年3月

様式B (7)

厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書

厚生労働省 発食安 第 1220003 号
平成 17 年 3 月 31 日

厚生労働大臣 尾辻 秀久 殿

所在地 〒701-0211 岡山市東畦82-45
フリガナ オヤマダカクインシカクシヨクウケンキョウカ
法人名 岡山大学大学院医歯学総合研究科
フリガナ オクマ ケイジ
代表者名(職名) 小熊 惠二 (教授) 職印

平成 14 年度から実施した厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）に係る研究事業を完了したので、次のとおり報告する。

研究課題名（課題番号）：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
（H-14-食品・化学-004）

国庫補助金精算所要額：金 130,520,000 円也（※研究期間の総額を記載すること。）
（うち間接経費 20,520,000 円）

1. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書表紙（別添1のとおり）
2. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書目次（別添2のとおり）
3. 厚生労働科学研究費補助金総合研究報告書（別添3のとおり）
4. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添4のとおり）
5. 研究成果による特許権等の知的財産権の出願・登録状況（総合研究報告書の中に書式に従って記入すること。）

目次

I. 総合研究報告書

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
小熊 恵二：岡山大学大学院医歯学総合研究科・病原細菌学

II. 分担研究報告

1. 林 賢一：滋賀県立衛生環境センター
2. 堀川 和美：福岡県保健環境研究所
3. 浅尾 努：大阪府立公衆衛生研究所
4. 甲斐 明美：東京都健康安全研究センター・微生物部
5. 石村 勝之：広島市衛生研究所・生物科学部
6. 小崎 俊司：大阪府立大学大学院農学生命科学研究科
7. 駒木 勝：（社）日本缶詰協会
8. 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
9. 中野 宏幸：広島大学大学院生物圏科学研究科
10. 春日 文子：国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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 惠二 岡山大学大学院医歯学総合研究科・教授

研究要旨

容器包装詰低酸性食品のボツリヌス食中毒に対するリスク評価を行うため、初年度はガス置換後、比較的十分な（100℃以上の）加熱処理をされた食品を、次年度以降は、加熱不十分な食品や、東南アジアから輸入されている香辛料や調味料の調査を行った。食品に関しては、全国的に販売されているものと、各地域で特産品として販売されているものを用いた。各食品の一般細菌やボツリヌス菌による汚染を調べると共に、 A_w が0.94、pHが4.6以上の食品については、ボツリヌスA型およびB型芽胞の混合液を接種し添加実験を行った。一般細菌やセレウス菌、ウェルシュ菌などに汚染されている食品の他、牛舌や馬刺のくん製、帆立の時雨煮、それに香辛料の一部ではボツリヌス菌により汚染されていた。栄養価の高いと思われる食品においては、接種した芽胞は発芽・増殖し、高力価の毒素の産生が認められた。気体透過性の異なる容器中に異なる食品を入れ添加実験を試みたところ、透過性のある容器でも食品の種類により発芽・増殖が認められた。以上のことより、容器包装詰低酸性食品では、高度にボツリヌス菌芽胞に汚染された場合は危険であることが確認された。この他、添加実験に使用できる分与可能なA型、B型菌株の選定、微量のA、B、E型毒素を簡単に検出できるイムノクロマト法の開発、発芽や毒性を抑制（中和）する植物抽出液の開発を行った。また、リスクアセスメントのために必要な情報を整理することを目的に、これらの食品を対象としたリスクプロファイルを作成した。

分担研究者

小崎俊司（大阪府立大学大学院農学生命科学研究科・教授）、中野宏幸（広島大学大学院生物圏科学研究科・教授）、春日文子（国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部第3室・室長）、武士甲一（帯広畜産大学畜産学部獣医学科・教授）、甲斐明美（東京都健康安

全研究センター・副参事）、林 賢一（滋賀県立衛生環境センター・次長）、堀川和美（福岡県保健環境研究所保健科学部病理細菌課・専門研究員）、浅尾 努（大阪府立公衆衛生研究所感染症部細菌課・主任研究員）、石村勝之（広島市衛生研究所生物科学部・主任技師）、駒木 勝（（社）日本缶詰協会研究所・次長）

A. 研究目的

近年の食品嗜好の多様化、生活様式の変遷、原材料を含む食品の輸入の拡大などにより、多種・多様の製品が製造・販売されている。その中には、製造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食品が増加しているが、気密性を有する容器包装詰形態で、その pH が 4.6 を超え、かつ、水分活性が 0.94 を超える（これらを低酸性食品という）、ボツリヌス菌の増殖が可能と考えられる食品が多数含まれている。

平成11年には千葉県内でボツリヌス食中毒が発生し、その原因食品として気密性を有する容器包装詰めの要冷蔵品（いわゆるレトルト類似食品）が疑われたため、厚生労働省は、関連する当該要冷蔵食品の衛生管理の徹底を通知した（平成11年8月30日、衛食第120号）。

このような状況から、市販されている各種の容器包装詰食品についてボツリヌス食中毒に対するリスク評価を行うことは、我が国の食品衛生の確保、向上の観点から重要な課題となっている。このようなことから、

比較的十分な（100℃以上の）加熱処理をされた食品や、あまり加熱されていない容器包装詰食品、および東南アジアから輸入した香辛料や調味料を選定し、その汚染の調査を行うと共に、ボツリヌスA型、B型芽胞の添加実験を行い、その危険度を検討した。今回添加実験に用いた菌株は分与不可能であるため、実験に適した分与可能な菌株の選定も行った。また、食品中の毒素を簡便に検出できるイムノクロマト法の開発や、発芽・増殖を抑制する、あるいは、毒性を中和する安全な植物抽出液の検索を行った。

B. 研究方法

1. 試料

市販の、あるいは、業者より直接購入した、業者より無償で提供していただいた商品を用いた。

2. 汚染調査

汚染調査は主にH15年度に行った。各検体のpH、水分活性を測定した後、図1に示したような方法で一般細菌、好気性有芽胞菌、*Clostridia*による汚染を調査した。*Clostridia*の場合はボツリヌス菌かどうかをマウス

を用いた毒性試験と中和試験により決定した。また、各検体が少量のボツリヌス菌に汚染されている場合を考慮し、検体をCooked Meat培地で培養し、トリプシン処理した後、上記毒性試験を行う系も検討した。

3. 添加実験

3-1. 菌株

添加実験は主にH14年度とH16年度に行った。前者では「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（いわゆる新含気食品）」を、後者では菓子類や漬物、佃煮、米飯などを中心に行った。

H14年度はA型4株；62A(ATCC79481)、62A(NFPA)、90A、BIG4、とB型1株；213Bを、H15、16年度はA型3株；62A(ATCC79481)、2A(NFPA)、36A；とB型2株；213B、Okra、を用いた。なお、これらの菌株の一部は分与不可能ということで、分離可能なA型6株；62A(大阪府立大)、Renkon、33A、36A、97A、CB21、およびB型5株；Okra、67B、407、Ginger、326の性状を検討した。

3-2. 芽胞液の作製

各芽胞液は以下のようにして作製した。供試5株を各々TP培地（5% Trypticase peptone, 5% Bacto peptone, pH 7.0）に接種し、37℃で一夜培養した。培養後、その1 mlずつを各々滅菌小試験管に採取し、これを80℃で20分間加熱処理した後、再度TP培地10 mlに接種して一夜培養した。この操作を3回繰り返して、培養液を顕微鏡下で観察して芽胞形成を確認した後、各培養液1 mlを加熱処理し、各々を1,000 mlのTP培地に接種して培養した。経時的に各培養液を顕微鏡下で観察し、芽胞形成が十分に認められた培養液を出発材料とした。各培養液を遠心（6,000回転15分間）して芽胞の濃厚浮遊液とし、-30℃で保存した。

芽胞数の測定は以下の方法で行った。芽胞液0.5mlを滅菌0.1%ペプトン水4.5mlに接種し、これを80℃、20分加熱処理した。この液をさらに同ペプトン水（9ml入り）で10倍段階希釈した。滅菌アナエロビック・パウチ2枚のそれぞれに、加熱溶解し55℃に保温しておいたCCA 10mlを加え、次いで各希釈段階液1mlずつを加え、よく混和した後、平板に固化した。これらは30℃、7日間培養し、黒色集落を数え、初発芽胞数とした。作製した芽胞液は小分けし、-30℃に保存した。

供試試料への接種用芽胞液は各菌株の芽胞液を混合し用いた。すなわち、各芽胞液の芽胞数が、約 $2\sim 3 \times 10^7$ CFU/mlになるよう希釈し、この希釈液を等量ずつ混合し添加用芽胞液とした。添加実験時にはこの混合液20 μ l（各芽胞約 1×10^5 CFUを含む）を接種した。

3-3. 芽胞接種

芽胞添加およびそのコントロール実験の方法を図2に示した。A～Eの実験は各品種3袋（検体）を、Fは5袋を用いて行った。まず、購入した品を直ちに開封したもの[A]、および30℃で数日培養（保存）した後開封したもの[B]の汚染の有無を検査した。開封した

後シールし、80℃、20分処理したものと[C]、培養（保存）した後のもの[D]の汚染も検査した。開封後、芽胞を添加し、シール、加熱処理後[E]および培養（保存）後のもの[F]のクロストリジウム属の菌の数と毒素産生の有無、および一般細菌数を測定した。30℃で保存期間中に容器がガス発生により膨張した試料は、直ちにあるいは4℃の冷蔵庫に保管した後、検査に供した。

芽胞液の接種（20 μ l）は、試料袋の外側をアルコールでよく拭き、シール部（食品製造者側）を切り取り、この部分から滅菌済注射器（テルモ製、ツベルクリン用、1ml、針を長さ150mmのものに交換）を装着した分注器（Indicon社、TRIDAK Division製、STEPPER）を用いて行った。接種後直ちにシーラー（卓上型ノズル式脱気シーラー、富士インパルス製、V-400NTW）でシールした。加熱処理は、低温殺菌機（石田式）を用いて、温水中で80℃、20分加熱処理した。なお、供試試料の熱伝達を考慮し、加熱時間には供試試料の中心が80℃に達するまでの時間を加えた。なお、上記の方法はH14～15年度で採用し、H16年度の実験では、中心温度を測定しなかったこともあり、80℃、20分処理した芽胞液を食品に添加し、接種後の加熱処理は省略する方法を用いた。

3-4. 菌数測定

試料の全量を無菌的にストマッカー用滅菌ポリエチレン袋（栄研器材製、ストマフィルターSタイプ）にとり、等重量の滅菌蒸留水を加え、ストマッカーで混和し、これを検液（検体の2倍希釈液）とした。

1) 一般生菌数の測定

上記検液2mlを滅菌脱イオン水8mlに加え、よく混和した（検体の10倍希釈液）。この液1mlずつを2枚のペトリ皿にとり、SA適量を加え、よく混和後、平板に固化した。さらに同培地を重層し、固化、乾燥後、35℃、48時間培養した。

2) ボツリヌス菌数の測定

上記検液2mlを滅菌脱イオン水8mlに加えよく混和した（検体の10倍希釈液）。さらに、滅菌0.1%ペプトン水（9ml入り）を用いて10倍段階希釈した後、各液1mlを、加熱溶解し55℃に保温しておいたCCA 10mlに加えよく混和し、その後、滅菌アナエロビック・パウチに流し平板に固化した。各希釈段階につき2枚のアナエロビック・パウチを用いた。これらを30℃、7日間培養した後、黒色集落を数え、結果を“CFU/g”で示した。なお、一部のクロストリジアの同定は、16 SrRNAの配列を決定により行った。

3-5. 毒素の定性試験と毒素型の決定

試料原液は毒素試験に供するまで、-30℃で保存した。解凍後、3000 rpm、4℃で20分間遠心分離し、上清を必要に応じて10倍段階希釈した。各希釈液0.5 mlずつを2匹のマウスの腹腔内に接種し、マウスの生死を5日間観察した。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、 $10^3 \sim 10^4$ MLDの毒素と、等量の8Uの抗A型毒素および抗B型毒素抗体を反応させた中和試験により毒素型の確認を行った。試料はゼラチン緩衝液で、血清は滅菌生理食塩水で希釈した。

4. 包装容器の影響の検討

1) 完全密封、遮光性の不透明パウチ、2) 気体透過性の低い透明パウチ、3) 気体透過性の高い透明パウチの3種類を用いて、包装容器のボツリヌス芽胞の発芽・増殖性に及ぼす影響を検討した。市販の玄米かゆ(H15年度)、およびマグロ水煮缶詰、スイートコーン水煮缶詰、カレーパウチ詰(H16年度)を購入し、これら内容物を上記3種類の容器に無菌的に移した。これら試料に、ボツリヌスあるいはスポロゲネス菌の芽胞を接種後、80°C、20分加熱し、30°Cで保存した。保存中にガス産生により膨張したものはその時点で、しなかったものは(30、60)、90日目に菌の増殖の有無を検査した。

5. イムノクロマト法の開発

H15年度には小熊らの作製した抗B型神経毒素家兔血清を用いて、関東化学(KK)と共同でイムノクロマト法を開発した。同様にH16年度には、まず、A、B、E型毒素の神経毒素の重鎖部分(C端側約10万)を大腸菌を用いてリコンビナントタンパク質として合成し、家兔を免疫し、高力価の抗体を作製した。E型では充分な力価の抗体が得られたので、これと、米国製のA、B型抗毒素家兔血清を用いて、イムノクロマトシステムを開発した。

6. 植物抽出液の検討

6-1) 抗菌活性および発芽・増殖の抑制活性

計50種類のハーブ、市販香辛料、漢方薬などの植物をエタノールあるいは熱水で処理し、そのエキスを抽出した。これらをA型(62A, Kyoto)、B菌(Okra)、F型(Langeland)とスポロゲネス(PA3679)の栄養細胞、および芽胞に対する効果を検討した。

6-2) 抗毒素活性

緑茶より精製したエヒガロカテキンおよび7種類の漢方薬の成分を用い、A~E型 progenitor toxinおよび神経毒素に対する中和活性を検討した。

(倫理面への配慮)

使用したマウスには、できる限り苦痛を与えない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、各施設の病原体等安全管理規程に基づいて、専用の実験室で実施した。芽胞摂取後膨張した試料の開封は安全キャビネット内で行い、使用した実験器具は、実験後すみやかに121°Cで30分間オートクレーブにより処理した。

C. 研究結果

1. 汚染調査

これまでに700以上の検体を調査している。当然な

がら、加熱の程度と汚染の程度は関連しており、漬け物などからは多数の菌が分離された。菌数は少ないが、一部の製品は好気性芽胞菌やクロストリジウムに汚染されていた。特筆すべきことは、通常汚染の認められなかった新含気食品の中で、「馬刺くん製」、「牛舌くん製」の一部の検体は、*B. cereus*や*B. subtilis*を含む一般細菌に、さらに、ボツリヌスA型やB型菌により汚染されていたことである(武士、甲斐)。

また、ボツリヌス菌による汚染が危惧される、東南アジア等から輸入されている香辛料や食品(野菜エキスやその他のエスニック食品)も調べた(浅尾、甲斐、林)。その結果、野菜エキス(18品目60検体)やエスニック食品(90検体)の一部ではボツリヌス菌は分離されなかったものの、通常の一般細菌の他、前者では嫌気性菌により、後者では好気性芽胞菌やクロストリジウムにより汚染されていた。香辛料では、139検体中5検体よりボツリヌス菌が分離された(2検体からはD型、各1検体からそれぞれB、C(C/Dキメラ)、F型)。

2. 添加実験

H14年度に行った「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」27品目では、22品目で発芽・増殖、毒素産生が認められた。1品目「炒めの素」では、一旦増殖が認められ毒素も産生されたが、死滅し、最終的な生菌数は接種時と類似していた(石村)。4品目では増殖が認められなかった(表1)。H15~16年度に行った菓子類などの12品目では、逆に3品目でのみ増殖が認められた。

3. 菌の性状検査

ボツリヌス菌および芽胞、毒素の性状は、同じ“型”であっても同一ではない。これらのことから、また、今回添加実験に用いたA-62AやB-213Bは分与出来ないことから、分与可能な菌株の選定も兼ね、各菌株の異なるpH(特に4.4~7.0)やAw下での増殖性と毒素産生性、芽胞の耐熱性(80~115°C、特に105°CでのD値など)などについて検討した。A型では、97A株の芽胞の耐熱性は低かったが、他の5株では各種の性状が類似していた(駒木、小崎)。また、B型5株も類似していた。スポロゲネス菌(PA3679)は、中性域の培地や米飯(pH6.9)では良く増殖したが、pH5.2以下の培地では増殖が認められなかった(武士、小崎)。

4. 異なる包装容器での増殖性

気体透過性の異なる3種の容器に異なる食材を入れ、ボツリヌス菌(A型、B型)あるいはスポロゲネス菌(PA3679)の芽胞液を添加し、それらの増殖性を検討した。いずれの食材でも両芽胞液の増殖性は同じ結果となった。気体透過性が $0 \sim 0.5 \text{ ml/m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{atm}$ (at 22°C、60%RH)の時はいずれの食材でも増殖したが、 $54 \text{ ml/m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{atm}$ の時は食材により増殖性は異なり、スイートコーン水煮では増殖したが、マグロ水煮とカレーでは増殖しなかった。玄米かゆを透過度の高い容

器 (95ml/m² · day · atm) に入れた場合は、増殖しなかった (駒木)。他方、市販の米飯にボツリヌス菌とスポロゲネス菌の芽胞 (10²と10⁴個/g) をそれぞれ添加した時は、ボツリヌス芽胞は10⁴個/gの時のみ増殖したが、スポロゲネス菌では10²個/gでも増殖した (武士)。

5. イムノクロマト法の開発

A、B、E型毒素を20分以内に検出できる、金コロイド標識抗体を用いたイムノクロマト法を開発した。特異性も高く、A型、B型、E型の検出感度もそれぞれ2μg/ml(10MLD/ml)、2.5μg/ml(25MLD/ml)、20μg/ml(200MLD/ml)であった (武士、小熊)。

6. 植物抽出エキスによる中毒の予防

セントジョーンズワート (SJW)、カレーブランツ (CP) のエタノール抽出液、および、ユーカリと黄連の熱水抽出液は、0.1~0.5%の濃度で芽胞の発芽・増殖を阻止した。また、SJWとCPは亜硝酸ナトリウムと併用効果を示した。他方、カテキン>ダイオウ≧ケイヒ、マオウは、この順で、A~F型の神経毒素やprogenitor toxin (12S, 16S, 19S毒素)を不活化することを認めた (中野、小熊)。

7. リスクプロファイルの作成

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、レトルト類似食品を対象としたリスクプロファイル作成を行なった (春日)。

D. 考察

3年間で700以上の検体の汚染調査や、計39の商品 (品目) を用いて添加実験を行った。加熱処理の低い商品や香辛料や野菜エキスでは、一般細菌の他、好気性や嫌気性の芽胞形成菌により比較的高率に汚染されていた。特に香辛料5検体からはボツリヌス菌が分離されたため、これらの香辛料を用いた食品については、適切な加熱殺菌等を行う必要があることが確認された。H14年度に行った、100℃以上に (加圧) 加熱されている「新含気商品」の調査では、「馬刺くん製」および「牛舌くん製」を除いて、汚染は認められなかった。しかし、これらの商品では、一部の商品を除いて添加実験では陽性となった。他方、H15~16年度に行った菓子類での添加実験では多くの商品が陰性であった。pH4.6、Aw0.94以上の商品への添加実験で陰性になる理由は不明であるが、栄養や酸化還元電位 (Eh) の他、添加物 (例えばグリシンなど) の影響なども推察された。豚肉を主とした食品である「炒めの素」では、一旦増殖した菌が保存中に死滅し、最終的には接種時の数となった。類似の結果が生菌を接種しても得られたが、この理由も不明である。芽胞あるいは生菌接種の両方のケースにおいて十分な毒素が産生されていた。このような特殊な例もあることから、やはりそれぞれの食品群で、毒素産生の有無まで調べた添加実験を行

うことは重要であると思われた。米飯では10²個/g接種では増殖が認められなかったが、10⁴個/gでは増殖した。

今回はA型3 (又は4) 株、B型2 (又は1) 株の混合芽胞液を接種したが、米国では各5株接種することを推奨している。今後、接種菌数や菌株数などの詳細の検討も必要と思われた。

「新含気製品」というのは、食品の形や風味を向上させるため、レトルト食品のように121℃、4分の加熱処理をしなくても、異なった特殊な2個の釜を用い、前処理 (蒸す・焼く・煮る) と熱水による後処理を行うことにより殺菌する方法である。後処理では、前処理した食品をバリア性のある袋に詰め、不活化ガスで置換し包装した後、釜の両サイドに設置した多数のノズルより熱水を噴射する。個々の食材に応じ、前・後処理を上手に行うことにより、上記の目的を達成できるとの事である。この方法により、ボツリヌス芽胞を死滅させられるかは不明である (商品製造現場でそのようなチェックは出来ないと推察される。この意味からも、I群菌の代わりに使用できるスポロゲネス菌を選出することは意味があると思われる)。上述のように多くのものでは汚染が認められなかったが、「馬刺くん製」と「牛舌くん製」ではボツリヌス菌も検出された。両製品は同一の業者により製造されていた。この工場の衛生状態は不良であり、馬肉や牛舌を保存してある「たれ」に数週間塩漬した後、くん蒸し、最後に加圧加熱 (70℃~80℃、20~25分間) していた。私たちは何度も使用している「たれ」が重要な汚染源で、前処理の代用である「くん蒸」では、汚染したボツリヌス菌を始め芽胞形成菌を死滅させることは出来なかったと推察した。本例は、中毒を予防するためには「製造方法」のみならず、それを使用する「業者」に対する指導が重要であることを改めて示していると思われた。なお、本件については、平成15年6月30日に課長通知「容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について」 (食基発第0630002号/食監発第0630004号) が発出され、関係業者の指導等が図られているところである。

H16年度には分与可能な添加実験に使用できるI群のA型、B型菌の選定を行ったところ、A型、B型各5株の芽胞の性状は多少の差は認められたが、いずれも添加実験には使用可能であることが判明した。次いで、スポロゲネス菌 (PA3679) がI群菌の代用に使用できるかを検討した。スポロゲネス菌は中性域の培地や米飯 (pH6.9)、異なる容器包装の実験時に用いた玄米かゆ、マグロ水煮、スイートコーン水煮、カレーでは、I群菌と同等~それ以上に増殖したが、pH5.2以下の培地では増殖しなかった。従って本菌はこの点に問題があることが判明したので、今後、異なるスポロゲネス菌の性状を検討する予定である。

包装容器の違いによる芽胞の発芽・増殖への影響を検討したところ、気体透過性のある容器で、食品の種

類により増殖性の有無が別れた。従って、嫌気度と共にその他の因子も重要であることが判明した。微量の毒素を簡単に検出するイムノクロマト法の開発、さらには、芽胞の発芽・増殖を抑制する、あるいは、毒素の中和効果を示す安全な植物抽出液の開発に成功したので、今後、これらを用いて中毒の診断、予防、治療への応用を試みる予定である。

その他、リスクプロファイルとして、本研究班の成果以外の科学的知見も含めて整理したことにより、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リスク評価を依頼する場合の質問事項及び解析を希望する事項を明確にした。

E. 結論

1. 容器包装詰低酸性食品の多くのは、ボツリヌス菌が増殖できるpHとAwを示した。I群菌を用いて添加実験を行うと、発芽・増殖、毒素産生が認められた食品群が確認された。中毒予防のためには、業者への衛生指導が重要である例が認められた。
2. 加熱を十分にされていない食品では、比較的高率に*Bacillus*や*Clostridium*にも汚染されていた。
3. 調味料や香辛料は高度に汚染されており、香辛料からはボツリヌス菌も分離されたため、これらの香辛料を用いた食品については、適切な加熱殺菌等を行う必要があることが確認された。
4. 添加実験に使用でき、かつ、分与可能なA型、B型各5株を選定した。
6. *C. sporogenes* PA3679は、中性域では良い増殖性を示したが、pH5.2以下では増殖せず、I群菌の代用としては問題があることが判明した。
7. 遮閉された容器包装のみならず、気体透過性のある容器でも、食材によっては、ボツリヌス芽胞は発芽・増殖することが認められた。
8. 微量のA、B、E型毒素を簡単に、感度および特異性高く検査できるイムノクロマト法を開発した。
9. 芽胞の発芽・増殖を抑制、あるいは、毒性を中和する幾つかの「植物エキス」を発見した。
10. 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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mahmut N, Inoue K, Fujinaga Y, Hughes L, Arimitsu H, Sakaguchi Y, Ohtsuka A, Murakami T, Yokota K, and Oguma K. Characterisation of monoclonal antibodies against haemagglutinin associated with *Clostridium botulinum* type C neurotoxin. *J. Med. Microbiol.* 51: 286-294, 2002.
- 2) Sagane Y, Watanabe T, Kouguchi H, Sunagawa H, Obata S, Oguma K, and Ohshima T. Spontaneous nicking in the nontoxic-nonhemagglutinin component of the *Clostridium botulinum* toxin complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 292: 434-440, 2002.
- 3) Mahmut N, Inoue K, Fujinaga Y, Arimitsu H, Sakaguchi Y, Hughes L, Hirst R, Murphy T, Tsuji T, Watanabe T, Ohshima T, Karasawa T, Nakamura S, Yokota K, and Oguma K. Mucosal immunisation with *Clostridium botulinum* type C 16S toxin and its non-toxic component. *J. Med. Microbiol.* 51: 813-820, 2002.
- 4) Sagane Y, Hasegawa K, Mutoh S, Kouguchi H, Suzuki T, Sunagawa H, Nakagawa T, Kamaguchi A, Okasaki S, Nakayama K, Watanabe T, Oguma K, and Ohshima T. Molecular characterization of GroES and GroEL homologues from *Clostridium botulinum*. *J. Protein. Chem.* 22: 99-108, 2003.
- 5) Furuse T, Hasebe S, Ohtsuki H, and Oguma K. Passive length-tensile properties of extraocular muscles under botulinum toxin type C. *Jpn. J. Ophthalmol.* 47: 145-150, 2003.
- 6) Arimitsu H, Inoue K, Sakaguchi Y, Lee J, Fujinaga Y, Watanabe T, Ohshima T, Hirst R, and Oguma K. Purification of fully activated *Clostridium botulinum* serotype B toxin for treatment of patients with Dystonia. *Infect Immun.* 71: 1599-1603, 2003.
- 7) Woodward L. A, Arimitsu H, Hirst R, and Oguma K. Expression of Hc subunits from *Clostridium botulinum* types C and D and their evaluation as candidate vaccine antigens in mice. *Infect Immun.* 71: 2941-2944, 2003.
- 8) Inoue K, Sobhany M, Transue TR, Oguma K, Pedersen LC, and Negishi M. Structural analysis by X-ray crystallography and calorimetry of a hemagglutinin component (HA1) of the progenitor toxin from *Clostridium botulinum*. *Microbiol.* 149: 3361-70, 2003.
- 9) Fujinaga Y, Inoue K, Watarai S, Sakaguchi Y, Arimitsu H, Lee J, Jin Y, Matsumura T, Kabumoto Y, Watanabe T, Ohshima T, Nishikawa A, and Oguma K. Molecular characterization of binding subcomponents of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin for intestinal epithelial cells and erythrocytes. *Microbiol.* 150: 1529-1538, 2004.
- 10) Arimitsu H, Lee J, Sakaguchi Y, Hayakawa Y, Hayashi M, Nakaura M, Takai H, Lin SN, Mukamoto M, Murphy T, and Oguma K. Vaccination with recombinant whole heavy chain fragments of *Clostridium botulinum* type C and D neurotoxins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11: 496-502, 2004.
- 11) Nishikawa A, Uotsu N, Miura Y, Arimitsu H, Lee J, Fujinaga Y, Nakada H, Ohshima T, Sakano Y, and Oguma K. The receptor and transporter for internalization of *Clostridium botulinum* type C progenitor toxin into HT-29 cells. *Biochem. Biophys.*

ysic Res. Communi. 319: 327-333, 2004.

- 12) Hasegawa K, Watanabe T, Sato H, Sagane Y, Mutoh S, Suzuki T, Yamano A, Kouguchi H, Takeshi K, Kamaguchi A, Fujinaga Y, Oguma K, and Ohyama T. Characterization of toxin complex produced by a unique strain of *Clostridium botulinum* serotype D 4947. Protein J. 23: 371-8, 2004.
- ## 2. 学会発表
- 1) Oguma K, Arimitsu H, Sakaguchi Y, Lin S, N, Inoue K, Fujinaga Y, Yokota, K, Nagamachi E. An easy procedure for purifying fully activated *Clostridium botulinum* type B neurotoxin. Xth International Congress of Bacteriology & Applied Microbiology (IUMS). Paris. (2002. 7. 27-8. 1).
 - 2) 有満秀幸、井上薫、阪口義彦、ナズラマホモテ、藤永由佳子、小熊恵二：ラクトースゲルを用いたボツリヌスB型Progenitor toxin及び神経毒素の分離・精製法 第75回総会 横浜 (2002)
 - 3) 阪口義彦、林哲也、藤永由佳子、大西真、井上薫、村田敬寛、中山恵介、ナズラマホモテ、有満秀幸、小熊恵二：C型ボツリヌス毒素変換ファージのゲノム解析 第75回総会 横浜 (2002)
 - 4) ナズラマホモテ、有満秀幸、阪口義彦、藤永由佳子、井上薫、辻孝雄、小熊恵二：C型・D型ボツリヌス中毒の予防 第75回総会 横浜 (2002)
 - 5) 鈴木智典、渡部俊弘、相根義昌、孝口裕一、武藤信吾、長谷川仁子、小熊恵二、大山徹：ボツリヌスC型菌無毒変異株N71の産生する無毒成分複合体 (NTNHA/HAs) の分子構造 第75回総会 横浜 (2002)
 - 6) 小熊恵二：ボツリヌス毒素：日本細菌学会特別シンポジウム (2002)
 - 7) 藤永由佳子、有満秀幸、阪口義彦、李在哲、太田圭、井上薫、小熊恵二：細菌毒素の腸管上皮細胞への結合と細胞内輸送 第55回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2002)
 - 8) 阪口義彦、林哲也、藤永由佳子、大西真、黒川頭、井上薫、村田敬寛、中山恵介、有満秀幸、小熊恵二：C型ボツリヌス毒素返還ファージのゲノム解析 第55回日本細菌学会中国・四国支部総会 (2002)
 - 9) 有満秀幸、井上薫、阪口義彦、ナズラマホモテ、藤永由佳子、小熊恵二：ラクトースゲルを用いたボツリヌスB型Progenitor toxin及び神経毒素の分離・精製法 第49回毒素シンポジウム 下呂温泉 (2002)
 - 10) K. Oguma, H. Arimitsu, K. Inoue, Y. Sakaguchi, J. Lee, Y. Fujinaga. Establishment of a new procedure for purifying fully activated *Clostridium botulinum* type B neurotoxin. Clostridia 03 Pathogenesis. Woods Hole. (2003. 4. 26-4. 30)
 - 11) K. Oguma, Y. Sakaguchi, H. Arimitsu, Y. Fujinaga, T. Hayashi. Genome analysis of a *Clostridium botulinum* type C toxin-transducing phage. Clostridia 03 Pathogenesis. Woods Hole. (2003. 4. 26-4. 30)
 - 12) K. Inoue, M. Sobhany, K. Oguma and L. C. Pedersen and M. Negishi. Crystal structure of hemagglutinin (HA1) in *C. botulinum* type C 16S toxin and its binding to sugar. Clostridia 03 Pathogenesis. Woods Hole. (2003. 4. 26-4. 30)
 - 13) Y. Fujinaga, H. Arimitsu, Y. Sakaguchi, J. Lee, K. Inoue, W. I. Lencer, and K. Oguma. Identification of functional subunits of *C. botulinum* type C 16S toxin involved in binding to intestinal epithelial cells and erythrocytes. Clostridia 03 Pathogenesis. Woods Hole. (2003. 4. 26-4. 30)
 - 14) K. Oguma, K. Takeshi, C. Monma. Risk of botulism in low-acid food products and a botulism case caused by one of them. 38th Toxic Microorganisms Joint Panel Meeting. UNITED STATE-JAPAN COOPERATIVE PROGRAM ON DEVELOPMENT & UTILIZATION OF NATURAL RESOURCES. Tokyo. (2003. 11. 11 -12)
 - 15) 小熊恵二：ボツリヌス毒素およびボツリヌス中毒について、第24回日本食品微生物学会学術総会 (特別講演) 岡山 (2003. 10. 2~3)
 - 16) 長谷川仁子、武藤信吾、鈴木智典、相根義昌、孝口裕一、渡部俊弘、砂川紘之、小熊恵二、大山徹：ボツリヌスD型菌4947株のGroESおよびGroEL様タンパク質の分子特性および遺伝子のプロモーター解析 第76回総会、熊本、(2003)
 - 17) 萩山桐子、永浜政博、山口明雄、小林敬子、阪口義彦、小熊恵二、櫻井純：ボツリヌス菌C2毒素Component IIの細胞への結合、第76回総会、熊本、(2003)
 - 18) 有満秀幸、阪口義彦、李在哲、林松男、関鋭、藤永由佳子、小熊恵二：リコンビナント神経毒素重鎖 (Hc) を用いたボツリヌスワクチンの効果について、第76回総会、熊本、(2003)
 - 19) 藤永由佳子、有満秀幸、阪口義彦、李在哲、小熊恵二：コレラ毒素やボツリヌス毒素の宿主腸上皮細胞内輸送、第76回総会、熊本、(2003)
 - 20) 藤永由佳子、Anne Wolf, Chiara Rodighiero, Wayne Lencer, 有満秀幸、李在哲、阪口義彦、

小熊恵二：コレラ毒素やボツリヌス毒素の宿主腸上皮細胞内輸送について，第50回毒素シンポジウム 白浜温泉（和歌山）（2003.7.9～11）。

- 21) 株本祐子、藤永由佳子、金英姫、松村拓大、李在哲、阪口義彦、小熊恵二：ボツリヌスB型神経毒素複合体の腸管上皮細胞バリア通過機構の解析，第56回日本細菌学会中国・四国支部総会 徳島（2003）
- 22) 小林敬子、萩山桐子、永浜政博、阪口義彦、小熊恵二、櫻井純。ボツリヌス菌C2毒素の細胞に対する結合と作用 第77回総会，大阪，（2004）
- 23) 藤永由佳子、株本祐子、金英姫、松村拓大、李在哲、阪口義彦、小熊恵二。ボツリヌスB型神経毒素複合体の腸管上皮細胞バリア通過機構について第77回総会，大阪，（2004）
- 24) 松村拓大、藤永由佳子、株本祐子、金英姫、李在哲、阪口義彦、小熊恵二。ボツリヌスB型神経毒素複合体の腸管上皮細胞結合に対する分泌型IgA(SIgA)の阻害作用 第77回総会，大阪，（2004）
- 25) 李在哲、横田憲治、崔錦花、有満秀幸、阪口義彦、藤永由佳子、金英姫、松村拓大、株本祐子、小熊恵二。ボツリヌスB型神経毒素に結合している無毒成分の免疫増強作用について 第77回総会，大阪，（2004）
- 26) 小熊恵二、藤永由佳子、李在哲、有満秀幸、西

河淳、松村拓大、金英姫、阪口義彦、株本祐子、崔錦花。ボツリヌス菌の産生するprogenitor toxinの構造と機能 第51回毒素シンポジウム ハウステンボス（長崎）（2004.7.7.～9）

- 27) 李在哲、横田憲治、黄賢正、阪口義彦、藤永由佳子、崔錦花、金英姫、松村拓大、株本祐子、小熊恵二。ボツリヌスB型神経毒素に結合している無毒成分の免疫増強作用について 第57回日本細菌学会中国・四国支部総会 広島（2004）

B. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 神経毒素や神経毒素・無毒成分複合体を精製する簡単な方法，およびその保存方法を開発した（*Infect. Immun.* 71:1599-1603, 2003）。この毒素の精製方法に関しては米国の特許を取得した（特開2003-9897）。
- 2) 植物抽出液の抗菌活性に関して日本の特許を申請中。

2. 実用新案登録

3. その他

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

容器包装詰食品へのボツリヌス菌芽胞の接種試験成績ならびに
市販食品および関連食材のボツリヌス菌の汚染調査

分担研究者 林 賢一 滋賀県立衛生環境センター 次長
研究協力者 井上朋宏 滋賀県立衛生環境センター 微生物担当
研究協力者 石川和彦 滋賀県立衛生環境センター 微生物担当
研究協力者 古田世子 滋賀県立衛生環境センター 微生物担当
研究協力者 辻 朋子 滋賀県彦根保健所 生活衛生課（現）
研究協力者 岡田敦史 滋賀県健康福祉部 健康対策課（現）
研究協力者 川端彰範 滋賀県立衛生環境センター 微生物担当

研究要旨

最近のボツリヌス食中毒の発生状況から、気密性を有する容器包装詰食品等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。容器包装詰食品のうち、不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品3品目（「あさり生姜」、「豆腐のスクランブル」および「肉じゃが」）および菓子類1品目に、ボツリヌス菌芽胞（A型およびB型ボツリヌス菌芽胞混合液は食品1gあたり $10^3\sim 10^4/g$ ）を添加し、30℃で保存培養後、ボツリヌス菌の増殖および毒素産生性について評価を行った。その結果、いずれの食品も水分活性、pHはボツリヌス菌が十分発育できる値であった。「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」3品目ではいずれも密封された状態においてボツリヌス毒素が産生されたが、菓子類ではボツリヌス毒素は産生されなかった。したがって、不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品の製造過程においてボツリヌス菌芽胞が生残した場合、ボツリヌス毒素が産生され、ボツリヌス食中毒の発生につながる可能性が示唆された。

一方、市販されている容器包装詰低酸性食品3品目25ロット115検体および調味料素材である野菜エキス18品目60検体についてボツリヌス菌等の汚染調査を行った。その結果、すべての検体からボツリヌス菌は検出されなかったが、野菜エキスには品目にかかわらず多くに細菌汚染があることがわかった。これらの中には嫌気性菌の汚染も見られたことから、これらの調味料素材を使用する場合にはボツリヌス食中毒予防対策を含めた対応が必要であると考えられた。

A. 研究目的

食品嗜好性の多様化、生活様式の変化、輸入食品の拡大などにより、多種多様の食品が製造販売されている。その中には製造技術や容器包装技術の向上により、常温で長期間保存が可能とする容器包装詰食品も増加してきている。

これらの容器包装詰食品についてボツリヌス食中毒のリスク評価を行うため、市販されている「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品（いわゆるレトル

ト類似食品）」を対象に、ボツリヌス菌芽胞を添加し、その増殖性および毒素産生性について評価することとした。また、容器包装詰食品としては菓子類も重要であることから、常温で流通している「水ようかん」についてもボツリヌス菌芽胞を添加し、その増殖性および毒素産生性について調べた。

一方、容器包装詰食品について、ボツリヌス食中毒のリスク評価を行うためにはこれらの食品に

おけるボツリヌス菌等の細菌汚染状況を把握することも重要である。これらの食品の中から常温で流通している低酸性食品を抽出し、ボツリヌス菌等の細菌汚染調査を行うこととした。また、加工食品の風味付けに利用されている調味料素材である野菜エキスについても同様の調査を行うこととした。

B. 研究方法

1. 供試食品

(1)ボツリヌス菌添加試験

1)不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品

製造業者から購入した「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」3品目、すなわち「あさり生姜（食品 O）」、「豆腐のスクランブル（食品 P）」および「肉じゃが（食品 Q）」を供試食品とし、各 40 検体ずつ計 120 検体を用いた（写真 1）。

2)水ようかん

A 社から提供を受けた常温流通している「水ようかん」（写真 2）48 検体を供試品とした。

(2)ボツリヌス菌汚染調査材料

1)容器包装詰低酸性食品

（社）日本缶詰協会および全国調理食品工業協同組合に、全国流通している容器包装詰低酸性食品の抽出を依頼した。調査対象とした食品は、8カ所（OA、FA、NA、NB、NC、ND、NE および NF）のメーカーで製造された 3 品目とした。供試検体については、1 ロット 5 検体を原則としたが、5 検体の中に賞味期限の時期が異なるものも見られたので、この場合には別ロットとして計上した。すなわち 3 品目 25 ロット 115 検体（写真 3～8）で、これらについて理化学試験とともに、一般生菌数、好気性芽胞菌数、嫌気性菌数、ボツリヌス菌およびボツリヌス毒素（一部の製品について直接製品中の毒素を検査）について調べた。

2)野菜エキス

加工食品の風味付け調味料素材である野菜エキスについては、B 社あるいは日本エキス調味料協会から提供を受けた 18 品目 58 ロット 60 検体を供試した（写真 9）。これらについて、一般生菌

数、好気性芽胞菌数、嫌気性菌数およびボツリヌス菌について調べた。

2. 試験方法

(1)ボツリヌス菌添加試験

1)水分活性および pH

①水分活性

水分活性（Aw）は、水分活性測定装置（ロトロニック製 HYGRO-LAB）を用いて測定した。

②pH

pH は、試料に等量の蒸留水を加え、十分に混釈した後、pH メーター（東亜電波工業製、HM-50V あるいは HORIBA 製、EX20）を用いて測定した。

2)培地および試薬

①嫌気性菌数測定用培地

市販のクロストリジア測定用培地（日水製薬製）を用いた。ただし、濃度は 1,000ml あたり 46.9g（常法の 2/3 量）とした。

②標準寒天培地

市販の標準寒天培地（日水製）を用いた。

③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製造品である A 型～F 型を用いた。

④マウス

ボツリヌス毒素の検出には、ddY 系マウス（雄、体重 約 20 g）を用いた。

3)ボツリヌス菌芽胞液および芽胞添加食品

①供試菌株

「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」には *Clostridium botulinum* A 型株 4 株；62A（ATCC7948）、62A（NFPA、米国食品製造業者協会）、90A、B1G4）および B 型 1 株（213B）の計 5 株を、「水ようかん」には A 型株 3 株；62A（ATCC7948）、62A（NFPA）および 36A ならびに B 型 2 株；213B および B-Okra の計 5 株を用いた。

②芽胞液の調整

芽胞液は、北海道衛生研究所武士甲一博士より提供された。接種用芽胞液は各供試菌株の芽胞液を混合して用いた。すなわち、芽胞液の芽胞数が 約 $2\sim 3 \times 10^7$ CFU/ml になるよう希釈し、この希

积液を等量ずつ混合して添加用芽胞液として用いた。

③供試食品へのボツリヌス菌芽胞の接種および対照試料の作製ならびに加熱処理

a) 不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品：1 品目あたり検体 14 袋の外側をアルコールでよく拭き、そのうち 8 袋に芽胞液 20 μ l を接種し、直ちにシーラー(卓上型ノズル式脱気シーラー、富士インパルス製、V-400NTW)でシールした。また、無接種対照として 6 袋は接種せずにそのままシールした。これらの接種およびシール操作は、缶詰協会研究所で行った。その後、各食品の無接種対照群 6 検体および接種群 8 検体を、低温殺菌機(石田式)を用いて温水中で 80 $^{\circ}$ C、20 分加熱処理した。なお、加熱時間はあらかじめ供試試料の熱伝達時間を測定し、加熱時間には供試試料の中心が 80 $^{\circ}$ C に達するまでの時間を加えて加熱処理した。これらの加熱処理は缶詰協会研究所で行い、直ちに滋賀県立衛生環境センターに搬送した。

b) 水ようかん：検体 33 個の外側をアルコールでよく拭き、ゴムシート((株)サン科学製)を貼った。その上から芽胞液 20 μ l を注射器で接種し、接種後直ちに同じゴムシートを貼った。芽胞液は接種前に 80 $^{\circ}$ C、20 分間加熱した。また、陰性対照として検体 6 個に同様の方法で滅菌蒸留水を接種した。別の 3 袋はそのまま保存試験に供試した。以上の接種操作については、(社)日本缶詰協会研究所で行い、接種後直ちに滋賀県立衛生環境センターに持ち帰り保存試験を行った。

4) 保存試験

保存試験開始時に非加熱処理の未開封試料各 3 検体を、以下の方法により嫌気性菌数、一般生菌数およびマウスに対する毒性を調べた。他の保存試験用試料は、ガス膨張破裂による汚染を防止するため、個別に二重にビニール袋に入れ、30 $^{\circ}$ C のふ卵器内で培養(保存)した。保存期間中に容器がガス発生により膨張した試料は、4 $^{\circ}$ C の冷蔵庫に保管後、検査に供した。

①試料原液の作製

試料の全量を無菌的にストマッカー用滅菌ポリ

エチレン袋(栄研器材製、ストマフィルターSタイプ)にとり、等重量の滅菌精製水を加え、ストマッカーで混和し、これを試料原液(検体の 2 倍希釈液)とした。

②一般生菌数の測定

上記試料原液 20ml を滅菌ペプトン加生理食塩水 80ml に加え 10 倍希釈液を作製した後、滅菌ペプトン加生理食塩水 9ml で 10 倍段階希釈液を作製した。これらの希釈液 1ml ずつを 2 枚の滅菌ポリシャーレにとり、標準寒天培地 15ml を加えよく混和し、培地を固化させた。さらに同培地 10ml を重層し、固化・乾燥後、37 $^{\circ}$ C で 48 \pm 3 時間培養後、コロニー数を計数し 1g あたりの生菌数を算出した。陰性対照として、検体の希釈に用いた精製水、ペプトン加生理食塩水 1ml ずつを各々 2 枚の滅菌ポリシャーレに入れ、試料の場合と同様に培養した。また、培地の陰性対照も同様に作製した。

③嫌気性菌数の測定

一般生菌数の測定時に作成した試料希釈液を使用した。滅菌パウチ(酒見医科機械製)に、加熱溶解し、50 $^{\circ}$ C に保温しておいたクロストリジア寒天培地 15ml と試料希釈液 1ml を加えてよく混和した後、冷却・固化させた。各希釈段階に 2 枚のパウチを用いた。これらは 37 $^{\circ}$ C で 1~5 日間培養し、黒色集落を計測し、1g あたりの嫌気性菌数を算出した。なお、嫌気性菌数の測定値をボツリヌス菌数とした。

④ボツリヌス毒素の検出

a) マウス毒性試験：試料原液はマウス毒性試験に供するまで、-20 $^{\circ}$ C で保存した。冷凍した試料は解凍後、4 $^{\circ}$ C 下で 3,000rpm 20 分間遠心分離し、上清 0.5ml ずつを 2 匹のマウスの腹腔内に接種した。マウスの生死は 5 日間観察し、ボツリヌス特有の症状を示してマウスが死亡するか否かを観察した。マウスが死亡した場合、マウス毒性陽性として、ボツリヌス毒素の確認試験を行った。

b) ボツリヌス毒素の確認試験：マウス毒性試験の結果、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 A 型ボツリヌス抗毒素および B 型ボ

ツリヌス抗毒素を用いて中和試験を行い毒素型の確認を行った。中和試験は、試料原液と4～8IUに滅菌生理食塩水で希釈したボツリヌス毒素抗血清を等量混合し、37℃で30分間恒温後、その0.5mlずつを2匹のマウスに注射した（抗血清はマウスあたり1～2IU）。同時に、試料原液を100℃10分加熱し、0.5mlずつを2匹のマウスに注射した。加熱処理によりマウスに対する毒性が失活し、かつA型あるいはB型、または両方の抗毒素血清によって中和された場合、ボツリヌス毒素陽性とした。

c)ボツリヌス毒素の定量試験

ボツリヌス毒素の定量試験は、マウス静脈内注射による定量法によって1gあたりのマウスipLD₅₀を算出した。

(2)ボツリヌス菌汚染調査

1)試料原液の作成

①容器包装詰低酸性食品

検体を開封後、容器の中でよく混合し、各々100gを検体として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）に入れ、等量の滅菌精製水を加え、1分間ストマッキングし、試料原液（2倍希釈液）を作製した。

②野菜エキス

サンプル容器入り野菜エキスの全量を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）に入れ、等量～2倍量の滅菌精製水を加え、1分間ストマッキングした。次に、試料原液（2～3倍希釈液）を作製した。

2)理化学試験

①Awの測定

容器包装詰低酸性食品および一部の野菜エキスについて水分活性（Aw）を測定した。

供試食品を開封後、検体の一部（約5g）をそのまま試料として、直ちに水分活性測定器（DECAGON社製、アクアラブCX-3TE）を用いてAwを測定した。

②pHの測定

容器包装詰低酸性食品および一部の野菜エキスについてpHを測定した。

試料原液を用いて、pHメーター（HORIBA製、EX20）により測定した。

3)培地および試薬

①一般生菌数および好気性芽胞菌数測定用培地

市販の標準寒天培地（日水製）を用いた。

②嫌気性菌数測定用培地

市販のクロストリジア測定用培地（日水製）を用いた。10倍希釈液10mlを用いた場合には定法の分量（70.3g）を溶解し、10倍希釈液を1mlを用いた場合には1,000mlあたり46.9g（常法の2/3量）の濃度に調整した。

③ボツリヌス毒素抗血清

ボツリヌス毒素抗血清はA～F型抗血清（千葉県血清研究所製）を用いた。

④マウス

マウス毒性試験およびボツリヌス毒素の検出には、ddY系マウス（雄、体重約20g）を用いた。

⑤ゼラチン緩衝液（pH6.2）

リン酸一水素ナトリウム（4g）を精製水（1,000ml）に溶解し、塩酸でpH6.2に調整した。この溶液にゼラチンを2%加え、121℃で15分間滅菌したものをを用いた。

4)細菌試験

①一般生菌数の測定

a)容器包装詰低酸性食品

試料原液に5倍量の滅菌0.1%ペプトン加生理食塩水を加え10倍希釈液を作製した。10倍希釈液1mlずつを2枚の滅菌ポリシャーレに入れ、滅菌した標準寒天培地を加えて混釈後寒天を固め、同培地を重層し寒天を固めた後、35℃で48時間培養後、菌数を測定した。なお、発育菌については、基本性状を調べたのちAPI50CHB/E（Biomerieux製）等のキットを用いて同定した。

b)野菜エキス

試料原液1mlに適量の滅菌精製水を加えて10倍希釈液および1,000倍希釈液を作製し、容器包装詰低酸性食品と同様の方法で培養し、菌数を測定した。

②好気性芽胞菌数の測定

a)容器包装詰低酸性食品

10 倍希釈液を 65℃で 20 分間加熱し、標準寒天培地を用いて混釈後寒天を固め、同培地を重層し寒天を固めた後、35℃で 48 時間培養後に菌数を測定した。なお、発育菌の同定については、基本性状を調べたのち、API50CHB/E (Biomerieux 製) 等の同定キットを用いて同定した。

b)野菜エキス

試料原液 1ml に適量の滅菌精製水を加えて 10 倍希釈液および 1,000 倍希釈液を作製し、容器包装詰低酸性食品と同様の方法で加熱後培養し、菌数を測定した。

③嫌気性菌数の測定

a)容器包装詰低酸性食品

10 倍段階希釈液 10ml を 65℃で 20 分間加熱し、加熱試料とともにクロストリジア培地をパウチに入れ混釈し、同培地を固めた後、35℃で 1~5 日間培養後に菌数を測定した。

b)野菜エキス

試料原液 1ml に適量の滅菌精製水を加えて 10 倍希釈液および 1,000 倍希釈液を作製し、容器包装詰低酸性食品と同様の方法で培養し、菌数を測定した。

④ボツリヌス菌の検出用増菌培養

a)容器包装詰低酸性食品

試料原液 (2 倍希釈液) 5ml を滅菌した試験管に入れ、65℃で 20 分間加熱した試料と非加熱の試料 1ml をつくり、それぞれ 2 本の 0.3%ブドウ糖および 0.2%可溶性澱粉を加えたクックドミート培地 (Difco 製、12ml) に入れ、30℃で 7 日間、ガスパックシステムにより嫌気培養した。

培養後、各々試験管ごとの培養液あるいは同一検体の 4 本の培養液を混合した試料を、4℃下で 3,000 rpm で 20 分間遠心分離した。その上清に等量の 0.2%トリプシン (Difco 製) 加ゼラチン緩衝液 (pH6.2) を加えよく混合した後、37℃で 30 分間処理し、その 0.5ml ずつを 2 匹のマウスの腹腔内に接種した。接種後 5 日間マウスの生死を観察した。マウス毒性試験によりボツリヌス毒素の存在が疑われた場合には、ボツリヌス毒素抗血清を用いて中和後、マウス試験により A~F 型のうち

1 種類の特異なタイプの抗毒素血清を接種したマウスが生存し、かつ 100℃10 分間加熱試料を接種したマウスが生存した場合、培養液のボツリヌス毒素陽性とし、検体中にボツリヌス菌が存在したものと判断した。また、ボツリヌス毒素陽性の場合には、各試験管ごとにボツリヌス毒素陽性試験管を特定するとともに、ボツリヌス菌の分離を行うこととした。

b)野菜エキス

試料原液を遠心管に入れ 3,000rpm で 30 分間遠心分離し、沈渣に滅菌した 0.1%ペプトン加生理食塩水 50ml を加え、同様に遠心分離した。同様の操作を 2 回繰り返して行い、沈渣に含まれている可能性のあるボツリヌス菌発育阻止物質の除去を目的とした洗浄を行った。一部については、試料原液全量を遠沈管に移し、1,500rpm で 5 分間遠心分離した。その上清を別の遠沈管に移し、10,000rpm で 30 分間遠心分離した。

次に、沈渣に滅菌した 0.1%ペプトン加生理食塩水 4ml を加え、沈渣を再浮遊させ、その 1ml ずつを 2 本の 0.3%ブドウ糖および 0.2%可溶性澱粉を加えたクックドミート培地 (12ml) に接種した。残りの 2ml については 60℃で 20 分間加熱後、1ml ずつ 2 本の 0.3%ブドウ糖および 0.2%可溶性澱粉を加えたクックドミート培地 (12ml) に接種し、いずれも 30℃で 7 日間、ガスパックシステムを用いて嫌気培養した。ボツリヌス菌の検出方法は、容器包装詰低酸性食品の場合と同様に行った。

(3)倫理面への配慮と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、滋賀県立衛生環境センター病原体等安全管理規程に基づいて、専用の実験室で実施した。芽胞接種後膨張した試料の開封は安全キャビネット内で行い、使用した実験器具は、実験後すみやかに 121℃で 30 分間オートクレーブにより処理した。

C. 研究結果

1.ボツリヌス菌添加試験

(1)不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品

1)供試食品の Aw および pH

保存培養試験を行う前の Aw および pH の測定結果については、食品 O(「あさり生姜」)では Aw0.97~0.98 以上、pH6.1~6.2、食品 P(豆腐のスクランブル)では Aw0.98 以上、pH5.6 および食品 Q(肉じゃが)では Aw0.98 以上、pH5.4~5.5 であった(表 1~3)。

2)加熱処理後保存試験直前の検査成績

加熱処理後(開封群)で保存試験直前の芽胞接種検体および無接種検体各 3 検体ずつの検査結果を、表 1~3 に示す。

一般生菌数は、いずれの検体からも検出されなかった(10CFU 未満/g)。また、嫌気性菌(ボツリヌス菌)は開封ボツリヌス菌芽胞非接種群(区分 C)からは検出されなかったが、開封ボツリヌス菌芽胞接種群(区分 E)からは、食品 O(「あさり生姜」)では $2.4 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^4$ CFU/g、食品 P(豆腐のスクランブル)では $2.4 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^4$ CFU/g および食品 Q(肉じゃが)では $1.4 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^4$ CFU/g 検出された。

3)保存後の検査成績

①「あさり生姜」(食品 O)

食品 O の検査結果を表 1 に示す。保存培養開始時の陰性確認試験では、一般生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10CFU 未満/g であった。開封芽胞接種群では、保存 4 日目に供試した 5 検体すべてにガス発生による袋の膨張が認められた。膨張した検体の一般生菌数はすべて 10CFU 未満/g であったが、ボツリヌス菌数は $6.3 \times 10^7 \sim 9.8 \times 10^7$ CFU/g を示し、増殖が認められた。マウス毒性試験では、5 検体すべて A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。その毒素量は $5.4 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ マウス ipLD₅₀/g であった。

培養後の pH は 6.2~6.5 であり、培養していない開封芽胞接種群や開封芽胞未接種群の 6.2~6.3 と比べて若干高くなっていた。

対照として行った芽胞未接種検体(開封品および未開封品)では 90 日後まで膨張が認められなかった。その一般生菌数およびボツリヌス菌数は

10CFU 未満/g で、ボツリヌス毒素の産生は認められなかった。

②豆腐のスクランブル(食品 P)

食品 P の検査結果を表 2 に示す。保存培養開始時の陰性確認試験では、一般生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10CFU 未満/g であった。開封芽胞接種群では、保存 4 日目に供試した 5 検体すべてにガス発生による袋の膨張が認められた。膨張検体の一般生菌数はすべて 10CFU 未満/g であったが、ボツリヌス菌数は $2.0 \times 10^7 \sim 3.6 \times 10^7$ CFU/g を示し、増殖が認められた。マウス毒性試験では、5 検体すべて A 型と B 型のボツリヌス毒素の産生が認められた。その毒素量は $1.4 \times 10^5 \sim 6.7 \times 10^5$ マウス ipLD₅₀/g であった。

培養後の pH は 5.8 であり、培養していない開封芽胞接種群や開封芽胞未接種群の 5.6~5.7 と比べて若干高くなっていた。

対照として行った芽胞未接種検体(開封品および未開封品)では 90 日後まで膨張が認められなかった。その一般生菌数およびボツリヌス菌数は 10CFU 未満/g で、ボツリヌス毒素の産生は認められなかった。

③肉じゃが(食品 Q)

食品 Q の検査結果を表 3 に示す。保存培養開始時の陰性確認試験では、一般生菌数およびボツリヌス菌数ともに 10CFU 未満/g であった。開封芽胞接種群では、保存 4 日目に供試した 5 検体すべてにガス発生による袋の膨張が認められた。膨張した検体の一般生菌数はすべて 10CFU 未満/g であったが、ボツリヌス菌数は $4.0 \times 10^7 \sim 3.2 \times 10^8$ CFU/g を示し、増殖が認められた。マウス毒性試験では、5 検体すべて A 型ボツリヌス毒素の産生が認められた。その毒素量は $3.0 \times 10^5 \sim 3.7 \times 10^5$ マウス ipLD₅₀/g であった。

培養後の pH は 5.7~5.8 であり、培養していない開封芽胞接種群や開封芽胞未接種群の 5.6~5.7 と比べて若干高くなっていた。

対照として行った芽胞未接種検体(開封品および未開封品)では 90 日後まで膨張が認められなかった。その一般生菌数およびボツリヌス菌数は

10CFU 未満/g で、ボツリヌス毒素の産生は認められなかった。

(2)水ようかん

水ようかんへのボツリヌス菌の添加試験成績をまとめて表 4 に示す。

1)供試品の成分

製造メーカーから提供された情報によると、原料として、小豆、グラニュー糖、粉末寒天のほか、グリシン (COOH-CH₂NH₂) も使用されていた。また、加熱殺菌工程としては各成分を溶解するための加熱のほか、包装チューブに充填後、90℃で 20 分間加熱されていた。

2)保存試験開始直後の性状

①pH および Aw

供試品 3 検体 (M-46~48) について pH および Aw を調べた結果、pH は 6.4~6.5、Aw は 0.98 以上であった。pH はボツリヌス菌芽胞添加群 (M-31~33) および陰性対照群 (M-34~36) でも同様の性状であった。

②細菌試験

未処理群 (M-40~42)、陰性対照群 (M-34~36)、ボツリヌス菌芽胞接種群 (M-31~33) にかかわらず、一般生菌数はすべて 10CFU/g 未満であった。なお、ボツリヌス菌芽胞接種群のボツリヌス菌数は $4.1 \times 10^4 \sim 4.9 \times 10^4$ CFU/g であった。

③保存試験成績

90 日間の保存期間中に、ボツリヌス菌芽胞添加群 30 検体、陰性対照群 3 検体および未開封群 3 検体ともガス発生等による膨張は認められず、ボツリヌス毒素はいずれの検体からも検出されなかった。ボツリヌス菌数を調べたところ、ボツリヌス菌芽胞接種群からは $3.3 \times 10^4 \sim 6.4 \times 10^4$ CFU/g の菌数で、ほぼ接種菌量相当が検出された。しかし、陰性対照群および未開封群からは検出されなかった。なお、一般生菌数はすべての群で 10CFU 未満/g、pH は 6.3~6.5 であった。

2.ボツリヌス菌汚染調査

(1)容器包装詰低酸性食品

3 品目 25 ロット 115 検体について、理化学試験

(pH および Aw) ならびに細菌試験 (一般生菌数、好気性芽胞菌数、嫌気性菌数およびボツリヌス菌) について調査した。供試食品の結果の総括を表 5 に、個別成績を表 6~10 に示す。

供試食品の包装形態としては、1 品目 3 ロット (A-1~A-3) 15 検体がビニールパウチ入り、その他の品目 100 検体はすべて瓶入りであった。また、保管に関する表示 (一部未確認) としては、常温あるいは開封後要冷蔵であり、すべての供試検体が開封するまで常温保管される品目であった。

これらの 115 検体について理化試験を行った結果、pH、Aw とともに同じ品目でも性状が大きく異なっていたが、ロット別ではほぼ同様の性状を示していた。項目別の結果としては、pH は 4.6~5.5、Aw は 0.94~0.98 以上で、ロットの違いにより大きな差異が認められた。

細菌試験の結果では、25 ロット 115 検体中 1 ロット 5 検体のうち 1 検体 (検体 No.28) に細菌汚染が認められた。その一般生菌数は 1g あたり 1.6×10^4 CFU、好気性芽胞菌数は 1g あたり 1.6×10^3 CFU であった。しかし、嫌気性菌数は検出限界未満 (1g あたり 1CFU 未満) であった。一般生菌数の培地に発育した 10 集落および好気性芽胞菌数の培地に発育した 5 集落、計 15 株について性状を調べた結果、すべて *Bacillus coagulans* と同定された。

その他の検体では、一般生菌数 (検出限界は 10CFU 未満/g)、好気性芽胞菌数 (検出限界は 10CFU 未満/g) および嫌気性菌数 (検出限界は 1CFU 未満/g) も検出限界未満であった。

また、すべての検体からボツリヌス菌は検出されず、そのうち 20 検体について食品から直接ボツリヌス毒素の検索も行ったが、どの検体からも検出されなかった。さらに、供試検体すべてについて異臭、気泡の産生等の肉眼的異常について調べたが、すべて異常は認められなかった。

(2)野菜エキス

1) 供試品の概要

供試した 18 品目 58 ロット 60 検体の概要を概要 I として表 11 に、概要 II として表 12 に示す。

供試した原料の原産地は中国 41 検体、日本 15

検体、フランス 2 検体およびチリ 2 検体であった。このうち、2 検体（表 12：No.51 および 52）についてはそれぞれ No.34 と No.35 と同一ロット品であり、再送付品として供試した。なお、日本エキス調味料協会によると概要Ⅱ（表 12）の供試品の製造所は、二次加工品も含めて国内であるという。

加工工程は多くの検体は減圧濃縮であり、加熱工程は 135℃6 秒間、95℃15 分間など様々であったが、すべての検体で加熱処理されていた。52 検体（表 12）の保管条件としては粉末状ではすべて常温保管とされ、液状では冷蔵保管品と冷凍保管品、ペースト状では常温のほか、冷蔵、冷凍品とされていた。なお、1 検体（表 12：No.9）のみ供試時に賞味期限が切れていた。

2) 細菌試験成績

60 検体について、一般生菌数、好気性芽胞菌数、嫌気性菌数およびボツリヌス菌の検索を行った成績を表 13 および表 14 に示す。

その結果、60 検体すべてからボツリヌス菌は検出されなかった。しかし、60 検体中 40 検体（67%）に細菌汚染が認められた。項目別でみると、一般生菌数はペースト状では 32 検体中 27 検体（78%）に $1.0 \times 10^1 \sim 2.6 \times 10^5$ CFU/g の菌数で検出された。これらの一般生菌数の菌数はほとんどの検体で好気性芽胞菌数と同様であったが、両者の菌数に大きな違いのある検体（No.35）も認められた。これらのうち再送付品 2 検体（No.51 および 52）では、一般生菌数は No.51 で約 20 倍弱、No.52 で約 2,000 倍強少なくなっていた。

粉末状では 19 検体中 11 検体（58%）から一般生菌数が $2.0 \times 10^1 \sim 1.3 \times 10^3$ CFU/g 検出された。また、液状では 9 検体中 2 検体（22%）から一般生菌数が $1.0 \times 10^1 \sim 3.0 \times 10^1$ CFU/g 検出された。なお、嫌気性菌は殆どがペースト状の供試品から検出され、検出率は 60 検体中 7 検体（12%）、菌数は $1.0 \times 10^1 \sim 1.3 \times 10^3$ CFU/g であった。

3) pH および Aw

60 検体のうち 52 検体について pH および Aw を調べた（表 14）。ペースト状（32 検体）では pH は 4.0～6.1、水分活性は 0.69～0.93、粉状（11

検体）では pH は 4.3～5.9、水分活性は 0.25～0.32、および液状（9 検体）では pH は 2.7～6.1、水分活性は 0.83～0.95 であった。再供試品の 2 検体（No. 51 および 52）はそれぞれ pH も水分活性もロットごとに同じ成績であった。

D. 考察

わが国のボツリヌス食中毒は、従来その 90%以上を占めていた E 型食中毒（北海道、東北地方では主として「いずし」、滋賀県では「はずし」が原因食品）に代わり、瓶詰、缶詰あるいは気密性のある容器包装食品等を原因とした A 型、B 型による食中毒が多く認められるようになってきた。平成 10 年 8 月にはイタリア産グリーンオリーブの塩漬け（瓶詰）を原因食品とする B 型食中毒事例（東京都で患者 18 名）、平成 11 年 8 月にはハヤシライスの具（レトルト類似食品）を原因食品とする A 型食中毒事例（千葉県で患者 1 名）が発生している。

これらの事例では、調理された食品が気密性を有する容器包装に充填された後、加熱殺菌が不十分のまま常温放置された結果、ボツリヌス菌が増殖し、毒素を産生したため食中毒に至ったと推定された。特にハヤシライスの具（レトルト類似食品）の事例では、原因食品は「要冷蔵食品」であったが、外観上はレトルト食品（121℃、4 分相当の加熱加圧殺菌処理が製造基準で定められている）と類似していたことなどにより常温放置されていたことが、ボツリヌス食中毒の発生につながったと考えられている。E 型以外の事例では、これらのほかに平成 11 年に大阪府と東京都でいずれも A 型食中毒事例が発生しており、原因食品は不明となっている。

このように、最近、A 型や B 型ボツリヌス食中毒が続けて発生していること、多種多様な輸入食品等が流通していること、製造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食品の販売が増加傾向にあることなどから、ボツリヌス食中毒発生の危惧は常に存在している。しかし、わが国では、ボツリヌス食中毒に対するリスク評

価は十分には行われていなかった。とりわけ、常温流通する容器包装詰された低酸性食品におけるリスク評価は、容器包装詰加圧加熱殺菌食品と違い食品衛生法の規制を全く受けていないこと、さらに本食中毒の重篤性からも急務のことであった。

製造基準の規制のない容器包装詰食品のうち、食品の食味・風味・食感、色調を損なわない工業的調理法として需要が拡大している「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」3品種および常温流通している菓子類の中から「水ようかん」をリスク評価の対象とした。ボツリヌス菌接種試験の方法としては、できる限り製造品に近いかたちで評価を行うため、製造所から買い上げた製品にボツリヌス菌芽胞液を接種し、再密封した製品試料を用いた。また、接種したボツリヌス菌の増殖性と毒素産生性をより確実に評価するため、複数の異なる菌株からなる混合芽胞(A型菌およびB型菌)を用い、比較的多量の芽胞濃度 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g を接種し、30°Cで培養(保存)し、評価を行った。

「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」では、「あさり生姜」、「豆腐のスクランブル」および「肉じゃが」の品目を問わず、ボツリヌス菌芽胞を接種後培養した群では供試した5検体すべてに短期間(培養後4日目)でボツリヌス菌の増殖とボツリヌス毒素の産生が認められた。しかも産生された毒素量は、1gあたり $10^4 \sim 10^5$ マウス ipLD₅₀ という極めて高い値であり、食中毒の発生に必要な十分な毒素量と考えられた。これらの食品のpHが5.4~6.2であったこと、Awが0.97以上であったこと、さらにボツリヌス菌の発育に影響する可能性のある雑菌(一般生菌数)が検出されなかったことを考えると、当然のことと考えられた。

また、ボツリヌス毒素型は、「あさり生姜」と「肉じゃが」では供試した5検体ともすべてA型毒素のみが産生されたが、「豆腐のスクランブル」では供試した5検体ともA型毒素とB型毒素の両方が産生され、B型毒素の産生性に違いが認められた。その理由としては、「あさり生姜」や「肉じゃが」にB型菌芽胞が発芽・増殖を阻害する物質が含まれていた可能性などが考えられるが、

今回の成績だけでは明確に説明できないと考える。

別に、容器包装詰食品で常温保管として市販されている菓子類のうち「水ようかん」についてもボツリヌス菌芽胞添加試験を行ったが、ボツリヌス菌は発芽・増殖せず、ボツリヌス毒素は検出されなかった。この製品のpHは6.3~6.5を示していたこと、水分活性も0.98以上を示しており、これらの理化学的性状はボツリヌス菌芽胞が発育するためには十分である。しかし、製品中には食品成分のほかに、グリシンも添加されており、グリシンがボツリヌス菌芽胞の発芽・増殖に影響した可能性もある。食品衛生法ではグリシンは強化剤あるいは調味料として使用可能であるが、使用量の基準はない。一方、グリシンは別名アミノ酢酸、グリココールともいわれ、核酸系調味料、グルタミン酸ソーダ、有機酸、食品などとの併用による呈味増強効果、pHの変化などを緩和する緩衝効果などの効能のほか、抗菌効果もあるといわれている。また、ボツリヌス菌の発育に対しては、A型、B型ボツリヌス菌を用いた発育試験において、菌株によっては発育が阻害されたという(Hutanen, C.M., 1979)。ボツリヌス菌の発育にはpH、水分活性、添加物のほかに、酸化還元電位等も影響するので、一概にはいえないがグリシンによる影響も否定はできないと考える。

以上のように、「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」では、供試した3品目すべての食品中でボツリヌス菌芽胞は発芽・増殖し、いずれも密封された状態においてボツリヌス毒素が産生された。したがって、これら食品の製造過程においてボツリヌス菌芽胞が生残した場合、流通や保存の条件によってはボツリヌス毒素の産生が起こることが示唆された。したがって、今後、加熱殺菌条件の評価や保存・流通条件(例えば「冷蔵保存食品」等)について検討する必要がある。

一方、食品衛生法により食品・添加物の規格基準が定められている容器包装詰加圧加熱殺菌食品(120°C、4分以上の加熱を必要とする)のほかに、十分な加熱処理がされていないにもかかわらず、常温で販売されている容器包装詰食品が多く製

造・販売されている。そこで、原則 100℃以上の加熱がされていない容器包装詰低酸性食品で全国的に流通している食品を選別し、理化学試験（pH および Aw）のほか、一般生菌数、好気性芽胞菌数、嫌気性菌数およびボツリヌス菌の汚染調査を行うこととした。また、

その結果、理化学試験の結果からは、ボツリヌス菌の汚染があった場合、ボツリヌス食中毒を引き起こす可能性のある、pH4.6 を越え、かつ Aw が 0.94 を越える食品が多く含まれていた。しかし、細菌試験の結果では、供試した 115 検体中 1 検体のみに細菌汚染が見られたのみで、これらの細菌はすべて *Bacillus coagulans*（好気性芽胞菌）であった。Bergey 's manual(1986)によると、*Bacillus* 属の生息地は土壌で多くが発酵に関係しており、*B.coagulans* の語源は「凝固する」、発育最適 pH は 6 と低く菌株によって異なるが発育最低 pH は 4.0~5.0 であり、酸性食品でも増殖するという。事実、*B.coagulans* はかまぼこの変敗品から検出されている（茂木ら、1970）。また、米国食品医薬品局・食品安全・応用栄養センター（US・FDA・CFSAN）編「食中毒に係わる病原微生物および自然毒ハンドブック」によると、同属の *Bacillus cereus* は Aw は 0.95 以上、pH は 4.9~9.3、温度は 10~49℃で発育すると記載されている。*B.coagulans* が検出された食品は pH5.4、Aw0.96 であったことから、当該食品中でも発育した可能性はあるものの、食品中で増殖するためには食塩濃度などのその他の要因も関係することから、検出菌数が 1g あたり 10^4 であったことを考え合わせると、当該食品中で増えたのかどうかについては推測することはできなかった。また、同じロットの他の 4 検体からは検出されなかったことから、なぜ当該検体にのみ検出されたのかについても不明であり、原因の解明が必要と考えている。

なお、供試食品中のボツリヌス菌やボツリヌス毒素について調べたが、すべて不検出であったこと、嫌気性菌は検出されなかったことから、供試食品がボツリヌス食中毒を起こす可能性について

はいずれもリスクの低い品目であると推測される。しかし、pH や Aw の性状から考えるとボツリヌス食中毒の危険性のある食品群であり、ボツリヌス菌による汚染が起こりうる可能性があるかどうかについては更なる検討が必要である。

一方、食品の風味付けに用いられている野菜エキスについても 2 年度にわたり 18 品目 60 検体についてボツリヌス菌をはじめ、同様の細菌汚染調査を行った。供試品はその形状から、ペースト状、粉末状および液状に別けられたがボツリヌス菌は形状を問わずすべての検体から検出されなかった。しかし、好気性芽胞菌などの細菌汚染は多くの検体に認められ、加工工程中の加熱条件では死滅されない細菌が残存していることが明らかになった。

52 件について行った理化学試験の結果をみると、pH は食品素材によって大きく異なっていたが、水分活性は粉末では 0.25~0.32 であり、細菌のみならず真菌の発育も困難である。しかし、ペースト状や液状では水分活性は 0.69~0.95 であった検体も見られ、保管の状態によっては細菌の増殖も可能となるので、その取扱いには慎重を期す必要があると考える。また、ボツリヌス菌は元来土壌由来菌であり、中国、日本を含む世界中に分布していること、今回の調査によって好気性芽胞菌以外にも嫌気性菌が検出された検体もあることから、野菜エキスを加工食品に使用する場合には、ボツリヌス菌汚染の可能性を考慮した対応が必要であると考える。

E. 結論

- 1.容器包装詰のうち、「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」3 品目（あさり生姜、豆腐のスクランブルおよび肉じゃが）に、ボツリヌス菌芽胞（A 型および B 型）を添加し、30℃で保存したところ、すべてにボツリヌス毒素が産生された。したがって、これらの食品の製造過程においてボツリヌス菌芽胞が生存した場合、ボツリヌス食中毒の発生につながる可能性があることが示唆された。
- 2.容器包装詰菓子類である「水ようかん」につい