

表13 野菜エキスのポツリヌス菌汚染調査成績 I

検体No	供試品名	供試量(g)	水溶性	製造月日	SPC(CFU/g)	CLT(CFU/g)	好芽 (CFU/g)	ポツリヌス菌
1	マッシュルームエキスパウダーA	44	溶解性	不詳	1,300	10未満	1,200	-
2	マッシュルームエキスパウダーB	49	溶解性	不詳	10未満	10未満	10未満	-
3	オニオンエキスパウダーA	47	溶解性	不詳	10未満	10未満	10未満	-
4	オニオンエキスパウダーB	43	溶解性	不詳	110	10未満	100	-
5	オニオンパウダーA	38	難溶性	不詳	7,000	220	5,600	-
6	オニオンパウダーB	58	難溶性	不詳	670	20	850	-
7	メンマパウダー	39	難溶性	不詳	360	10未満	140	-
8	ガーリックパウダー	53	難溶性	不詳	740	10未満	590	-

SPC (一般生菌数) : 計測値が1gあたり10CFUに満たない場合「10未満」と記載

CLT (嫌気性菌数) : 計測値が1gあたり10CFUに満たない場合「10未満」と記載

好芽 (好気性芽胞菌数) : 計測値が1gあたり10CFUに満たない場合「10未満」と記載

ポツリヌス菌 : 増菌培養液中のポツリヌス毒素の検査結果

表14 野菜エキス調査成績Ⅱ

No	サンプル名	総重量 (g)	供試量 (g)	pH	水分活性	SPC(CFU/g)1)	好芽 (CFU/g)2)	CLT(CFU/g)3)	ポツリヌス菌 <sup>4)</sup>
1	A-オニオン1	126.3	50.0	4.6	0.80	960	540	10未満	-
2	A-オニオンエキスパウダーN	62.4	40.0	4.8	0.31	30	10未満	10未満	-
3	A-ガーリックエキス	127.5	50.0	4.8	0.87	10未満	10未満	10未満	-
4	A-ジンジャーエキス	122.2	50.0	4.8	0.84	10未満	10未満	10未満	-
5	A-キャベツエキスパウダー	65.0	45.0	4.7	0.31	10未満	10未満	10未満	-
6	A-キャロットエキス	127.5	50.0	4.9	0.80	10未満	10未満	10未満	-
7	A-人参エキスパウダー	67.5	45.0	4.8	0.32	10未満	10未満	10未満	-
8	B-オニオン-1	105.8	50.0	4.9	0.78	150	90	10未満	-
9	B-オニオン-2	110.6	50.0	4.9	0.25	150	10未満	10未満	-
10	B-ガーリック	91.0	50.0	6.0	0.90	30	10	10未満	-
11	B-キャロット	102.5	50.0	5.6	0.76	20	10	10未満	-
12	B-ジンジャー	103.5	50.0	5.8	0.90	10	10	10未満	-
13	B-キャベツ-1	101.2	50.0	5.2	0.75	10	10未満	10未満	-
14	B-キャベツ-2	116.6	50.0	5.3	0.28	10未満	10未満	10未満	-
15	B-ハクサイ-1	113.5	50.0	5.1	0.73	80	80	10	-
16	B-ハクサイ-2	117.5	50.0	4.6	0.28	10未満	10未満	10未満	-
17	B-セロリ	108.9	50.0	4.3	0.26	10未満	10未満	10未満	-
18	C-オニオンエキス-1	139.4	50.0	4.6	0.86	10	10未満	10未満	-
19	C-オニオンエキス-2	135.9	50.0	3.6	0.88	10未満	10未満	10未満	-
20	C-ハクサイエキス	138.3	50.0	4.7	0.92	10未満	10未満	10未満	-
21	C-ニンジンエキス	134.7	50.0	6.1	0.95	10未満	10未満	10未満	-
22	C-キャベツエキス	152.1	50.0	4.4	0.83	10未満	10未満	10未満	-
23	C-ネギエキス	137.0	50.0	5.0	0.77	50	100	10未満	-
24	C-サンザシ濃縮果汁	142.4	50.0	2.7	0.89	10未満	10未満	10未満	-
25	C-シイタケエキス	152.6	50.0	5.3	0.88	10未満	10未満	10未満	-
26	C-セロリジュース-1	208.2	50.0	5.1	0.89	10未満	10未満	10未満	-
27	C-パセリジュース-1	195.4	50.0	5.5	0.95	30	10	10未満	-
28	D-オニオンエキス	94.0	50.0	4.3	0.77	40	20	10未満	-
29	D-ガーリックエキス	98.5	50.0	5.6	0.87	930	1,100	10	-
30	D-キャロットエキス	118.5	50.0	4.8	0.76	20	10未満	10未満	-
31	D-ハクサイエキス	106.3	50.0	4.7	0.87	700	910	10未満	-
32	D-キャベツエキス	173.4	50.0	4.6	0.69	10	10	10未満	-
33	D-ネギエキス	107.1	50.0	4.1	0.72	60	60	10未満	-
34	D-シイタケエキス	159.5	50.0	5.4	0.91	16,000	16,000	1,300	-
35	D-マッシュルームエキス	172.1	50.0	6.1	0.90	260,000	6,000	20	-
36	D-パンブキンエキス	106.1	50.0	5.2	0.88	60	20	10未満	-
37	D-トマトエキス	176.2	50.0	4.0	0.89	10	10	10未満	-
38	E-オニオンエキスパウダー	113.5	50.0	4.4	0.31	10未満	10未満	10未満	-
39	E-人参ジュースパウダー	111.9	50.0	5.8	0.32	90	110	10	-
40	E-ガーリックエキスパウダー	111.4	50.0	5.9	0.31	20	10	10未満	-
41	E-ヤサイブイオンパウダー	111.2	50.0	4.6	0.27	20	20	10未満	-
42	F-ネギエキス	104.4	50.0	5.2	0.84	1,000	500	10未満	-
43	F-ゴボウエキス	102.9	50.0	5.9	0.93	330	240	10未満	-
44	F-シイタケエキス	105.2	50.0	5.8	0.89	100	30	10未満	-
45	G-オニオンエキス	122.3	50.0	4.5	0.78	10	10	10未満	-
46	G-ガーリックエキス	94.2	50.0	6.2	0.88	10未満	10未満	10未満	-
47	G-キャロットエキス	121.6	50.0	5.3	0.79	10未満	10未満	10未満	-
48	G-トマトエキス	112.5	50.0	4.1	0.89	260	350	10未満	-
49	H-シイタケ-1	42.5	20.0	5.3	0.85	80	20	10未満	-
50	H-シイタケ-2	108.8	50.0	4.9	0.72	10	10	10未満	-
51	D-シイタケエキス (再送付品)	127.8	49.8	5.4	0.91	850	650	10未満	-
52	D-マッシュルームエキス (再送付品)	131.8	43.3	6.1	0.89	110	70	10未満	-

1) SPC (一般細菌数) : 計測値が1gあたり10CFUに満たない場合「10未満」と記載

2) 好芽 (好気性芽胞菌数) : 計測値が1gあたり10CFUに満たない場合「10未満」と記載

3) CLT (嫌気性菌数) : 計測値が1gあたり10CFUに満たない場合「10未満」と記載

4) ポツリヌス菌 : 増菌培養液中のポツリヌス菌の検査結果

## 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

分担研究者 堀川 和美 福岡県保健環境研究所

研究協力者 村上光一, 野田多美枝, 濱崎光宏, 竹中重幸, 石黒靖尚 (福岡県保健環境研究所)

駒木 勝 ((社)日本缶詰協会研究所)

### 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、次の3項目について研究を行なった。①福岡県内において常温で販売されている45品目の容器包装詰食品について、包装形態、表示、水素イオン濃度(pH)および水分活性(Aw)について調査した。②①の調査を基に5品目の容器包装詰食品を選択し、これらのpH, Aw, ボツリヌス菌、一般細菌数およびクロストリジア数について調査した。③「不活化ガス充填加圧加熱殺菌食品」いわゆる新含気食品である「ほたての塩焼」、「きんぴら大根」および「筑前煮」の3品目、気密性容器に包装した菓子「ういろう」2品目、「くず餅」および「きんつば」2品目、計7品目について、ボツリヌス菌芽胞添加実験を行なった。その結果、各項目について次のことが分かった。①調査した容器包装詰食品45品目中18品目がpH4.6を超え且つAw0.94以上で、ボツリヌス菌が増殖可能な理化学性状を有していた。18品目の内訳は、11品目が容器包装詰加圧加熱食品、3品目が新含気食品、3品目が米飯類および1品目が小豆の水煮であった。②福岡県内で生産されている5品目の容器包装詰食品は、4品目がpH4.6を超え且つAw0.94以上で4品目中2品目から一般細菌が検出された。他1品目はpH4.6を超えAwは0.77であったが、一般細菌がすべての検体から検出された。しかし、5品目いずれもボツリヌス菌およびボツリヌス毒素は検出されなかった。③新含気食品3品目はいずれもボツリヌス菌が増加し、ボツリヌス毒素が産生されていた。菓子類4品目はいずれもボツリヌス菌が増加せず、ボツリヌス毒素も産生されなかった。

本研究の結果から、「ほたての塩焼」、「きんぴら大根」および「筑前煮」は、ボツリヌス菌が混入した場合、ボツリヌス食中毒の危険性が高い食品であることが分かった。一方、「ういろう」2品目、「くず餅」および「きんつば」の計4品目の菓子は、ボツリヌス食中毒の危険性が極めて低い食品であることが示唆された。

### A. 研究目的

近年気密性容器に包装された多様な食品が製造・販売されている。しかし、殺菌方法および保存方法について表示されている食品は少ない。

また、食品衛生法ではpHおよびAwの表示義務はない。容器包装詰食品の安全性を担保するためには、個々の食品についてpH, Aw, 一般細菌数, クロストリジア数を測定する必要がある。さらに、

ボツリヌス食中毒に対するリスク評価を行うためには、ボツリヌス菌芽胞の添加・保存実験が必須である。

そこで、本研究では容器包装詰食品の pH と Aw、一般細菌数、クロストリジア数を明らかにするとともに新含気食品や容器包装詰めされた菓子類のボツリヌス食中毒に対するリスク評価を行なうことを目的とした。

## B. 研究方法

### I. 容器包装詰食品の pH および Aw

福岡県内 3 保健福祉環境事務所に設置している食品衛生広域専門監視班により、大規模小売店を中心に 45 品目の食品の買上を行い、pH 及び Aw を測定した。Aw は、細切した検体をデカゴン社製アクアクラブで測定した。pH は、東亜ディーケーケー株式会社製 HM-30G で電極は同社製 GST-5721C を用いて測定した。pH は、液汁のある食品はそのまま、液汁のない食品は等量若しくは 2 倍量の蒸留水を加え、ブレンダーで均一化した後、測定した。測定にあたっては、一品目の食品について 2 検体を測定し平均値を求め、これを元に評価した。なお、食品群の分類については、福岡県における収去検査の際用いる食品分類を使用した。

### II. 成分規格の無い容器包装詰食品調査

#### 1. 供試試料

加圧加熱殺菌が行われていないかあるいは不明な食品 4 品目および加圧加熱食品 1 品目計 5 品目について、各々 3 ロット各 5 個 (表 1) について細菌汚染調査を行った。調査対象食品はいずれも福岡県内で製造されている食品である。

#### 2. 試料の Aw 及び pH 測定

I. 容器包装詰食品の pH および Aw と同様

#### 3. 菌数測定

##### 3-1 試料原液の調整

各試験品は 100g または全量を無菌的にストマ

ッカー袋 (栄研器材製、ストマフィルター S) に無菌的に採取し、等重量の滅菌蒸留水を加えストマッカーで 2 分間混和した。この 2 倍希釈液を試料原液とした。試料原液は非加熱と加熱処理の 2 種について検査を行った。加熱処理は、各試料原液を小試験管に 5ml 分注し、水浴にて 65°C、20 分間加熱した。非加熱試料は一般細菌数、クロストリジア属菌数、ボツリヌス菌検査、及び pH 測定に使用した。加熱試料は好気性有芽胞菌数及びボツリヌス菌検査に使用した。

##### 3-2 一般細菌数測定、好気性芽胞菌数測定

2 倍希釈液を必要に応じて 10 倍階段希釈を行い、各段階希釈液 1ml をシャーレに入れ、50°C に保温した標準寒天約 20ml を加え混和・固化後、35°C、48±3 時間培養し、集落を計数した。

##### 3-3 クロストリジア属菌数

クロストリジア属菌数測定には 17.5×7 cm のパウチ袋を使用した。10 倍階段希釈した試料液 1 ml をパウチ袋に入れ、50°C に保温したクロストリジア寒天培地 10 ml を加え、混和・固化後 35±1°C で 1-5 日間培養し、黒色集落を計数した。

##### 3-4 ボツリヌス菌検査

ブドウ糖を 0.3% 及び可溶性澱粉を 0.2% 添加したクックドミートブイヨン 2 本に非加熱及び加熱処理試料 1ml を接種し、30°C、7 日間培養した。培養液 2ml を 3,000 rpm、20 分間遠心し、上清を 0.45µm のミリポアフィルターで濾過した濾液を毒素試験用試料原液とした。毒素試験は、各試験検体につき 2 匹の ddY 系、雌、4 週齢マウスを用い、試料原液を 0.5ml ずつマウス腹腔内に接種し、4 日間観察した。

##### 3-5 標準寒天培地上に発育した集落の同定

###### 3-5-1 DNA 溶液の調整

標準寒天培地上に発育した集落を釣菌し、普通寒天培地に 35°C、2 日間純粋培養した。培養菌を 1ml の 1/10TE バッファー (pH8.0) に懸濁し、10,000 rpm、10 分間遠心した後、上清を除去した。ペレットに 0.1ml の 1/10TE バッファーを加え、

再懸濁し、100℃、15 分間加熱後、10,000rpm で 10 分間遠心し、上清を DNA 溶液とした。

### 3-5-2 PCR 及び塩基配列の決定

得られた DNA 溶液について 16SrRNA をコードする領域に設定されたユニバーサルプライマーセット 341-357 F および 907-926907R を用いて PCR を行った。PCR 反応液は、DNA 溶液 3 $\mu$ l、各プライマー 0.1 $\mu$ M、10 $\times$ PCR バッファー 5 $\mu$ l、Taq DNA ポリメラーゼ 2.5U (TaKaRa BIO Inc.)、dNTPs 0.2mM 及び滅菌蒸留水を加え全量 50 $\mu$ l とした。95℃、30 秒間熱変成、51℃、30 秒間アニーリング、72℃、30 秒間伸長の各反応を 40 回繰り返した。PCR 産物 10 $\mu$ l を 2%アガロースゲルで電気泳動し、約 560bp の増幅産物の有無を確認した。得られた PCR 産物を Montage PCR centrifugal filter devices (ミリポア社製) で生成し、シーケンス反応の鋳型とした。塩基配列の決定は、DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (アマシャム社) を用いて行った。PCR と同一のプライマーを用いてサイクルシーケンス反応を行い、反応産物をエタノール沈殿後、Centri-sep スピンカラム (Princeton separation, INC.) で精製後、DNA オートシーケンサー (アプライドバイオシステムズ、ABI Prism 377DNA Sequencer) で両方向の塩基配列を解読し、16SrRNA の塩基配列を決定した。

## III. ボツリヌス菌芽胞添加実験

### 1. 供試試料

新含気食品である「ほたての塩焼」、「きんぴら大根」および「筑前煮」3 品目並び気密性容器に包装された菓子「ういろう」2 品目、「くず餅」および「きんつば」2 品目、計 7 品目を、ボツリヌス菌添加実験に使用した (表 2)。

### 2. 試料の Aw および pH 測定

I. 容器包装詰食品の pH および Aw と同様ボツリヌス菌芽胞添加品を測定した電極は、直ちにオートクレーブで滅菌 (121℃、60 分) 後、

廃棄した。

### 3. ボツリヌス菌芽胞添加実験

被検食品へのボツリヌス菌芽胞の添加は、日本缶詰協会研究所で実施した。当所対象品の接種用芽胞混合液の初発芽胞数は、「ういろう」2 品目分は  $9.5 \times 10^7$  CFU/ml、「くず餅」および「蒸しきんつば」分は  $1.7 \times 10^6$  CFU/ml であった (表 3)。

### 4. 保存試験

各試験品検体番号 43-45 は、無処理のまま保存し試験品の無菌性を確認した。検体番号 37-39 は、開封し芽胞は接種せず熱処理を行い開封操作の無菌性を確認した。検体番号 1-30 は、開封後芽胞を接種し、検体の膨化の有無について観察した。

いずれも保存性試験は、各検体別にポリシール袋で密封シールし、30℃のインキュベータ (三洋電機、MIR553) 内で保存し、毎日観察した。容器が膨張した時点で、直ちに 4℃の冷蔵庫に保存し、検査に供することとした。

### 5. 菌数測定

II. 成分規格の無い容器包装詰食品調査と同様

### 6. 毒素の定性試験と毒素型の決定

#### 6-1 毒素試験用試料の作製

各試料 2 倍液を 3,000 rpm、20 分間遠心し、遠心上清を 0.45 $\mu$ m のミリポアフィルターで濾過した。濾過した試験液は、滅菌小試験管に 1.5ml ずつ 2 本に分注し、1 本はそのまま (非加熱)、もう一方は 100℃で 30 分加熱処理 (加熱処理) した。また、陰性コントロール試験には、滅菌蒸留水を用い同様の操作を行った。

#### 6-2 毒素の定性試験

各試験検体につき 2 匹の ddY 系、雌、4 週齢マウスを用い、試料原液を 0.5ml ずつマウス腹腔内に接種し、4 日間観察した。

#### 6-3 毒素型別試験

毒素定性試験におけるマウス斃死時間からおおよその毒素量を推定し、ゼラチン緩衝液で試料原液を希釈した。ボツリヌス毒素 A あるいは B 単

独中和液は、試料液 1 ml に対し 4 IU/ml の A あるいは B 抗毒素液を各々 1 ml 加えた。A および B 中和液は、試料液 1 ml に対し 8 IU/ml の A および B 抗毒素液を各々 0.5 ml 加えた。各中和液 0.5 ml を 2 匹のマウスにそれぞれ腹腔内に接種し、4 日間観察した。

## C. 研究結果

### I. 容器包装詰食品の pH および Aw (表 4, 5)

福岡県内のスーパーにおいて常温で市販されている容器包装詰食品 45 品目について、包装形態、表示などの外観検査並びに pH 及び Aw について調査し、容器包装詰食品の実態について調査した。調査した 45 品目中 15 品目は、pH が 4.6 を超え、且つ Aw が 0.94 を超える食品であった。15 品目中 9 品目は、気密性容器に密封後加圧加熱殺菌されたものであった。3 品目は新含気調理食品、他 3 品目は表示記載がなされていなかった。15 品目の分類内訳は、そうざい 6 品目、野菜類加工品 5 品目、穀類加工品 3 品目および食肉・卵加工品 1 品目であった。pH が 4.6 を超え、且つ Aw が 0.85 以上-0.94 未満の食品は、19 品目であった。19 品目中 10 品目が気密性容器に密封後加圧加熱殺菌されたもので、1 品目が新含気調理食品、1 品目が真空高熱殺菌、1 品目が加熱殺菌、他 6 品目は表示記載がなされていなかった。本調査で包装・加熱等に関する表示では、「気密性容器に密封後加圧加熱殺菌」が 20 品目、「新含気調理食品」が 4 品目、「真空高熱殺菌」が 1 品目、「加熱殺菌」が 1 品目、他 19 品目は表示記載がなされていなかった。

### II. 成分規格の無い容器包装詰食品調査

#### 1. 試料の Aw および pH

Aw が 0.94 未満であった試験品は、5 品目のうちこんにやくの燻製 1 品目のみであった。各試験品 1 ロット 5 サンプルの Aw および pH の平均値を表 6 に示した。Aw および pH のロット間の差

は、こんにやくの燻製以外では、Aw が 0.01 以下、pH が 0.1 以下であった。しかし、こんにやくの燻製の Aw はロット 1 が 0.73、ロット 2 が 0.77 及びロット 3 が 0.88 で、pH はロット 1 が 6.8、ロット 2 が 6.9 及びロット 3 が 7.5 で、ロット間にばらつきがあった。

#### 2. 試験品の細菌検査結果

##### 2-1. 一般細菌数、クロストリジア数他

5 品目の細菌数の結果を表 7 に示した。No.1 平天は、いずれのロットにおいても 100 CFU/g 以下の細菌汚染が認められた。No.2 味付け玉子はいずれのロットも 37°C で細菌は発育しなかった。No.3 味付けなんこつは 3 ロット細菌検査した結果、5 検体中 1 検体に細菌汚染が認められ、2 ロットは  $10^3$  CFU/g 以上の汚染が認められた。No.4 おでんは、3 ロットともに細菌汚染はほとんど認められなかった。No.5 こんにやくの燻製は、3 ロット中 2 ロットがいずれも  $10^3$ - $10^4$  CFU/g オーダーの細菌汚染が認められた。他 1 ロットは 20 CFU/g 以下で、ロットによる汚染の度合いが異なっていた。これら試験品を 65°C で 20 分加熱した場合の菌数は、No.1 平天および No.5 こんにやく燻製では、非加熱の場合の約 80-50% であったが、No.3 味付けなんこつでは検出されなかった。クロストリジウム培地で黒色集落が発育した試験品は No.1 平天のみであり、3 ロット 15 検体中 8 検体から検出された。

##### 2-2 毒性試験

試験品のクックドミート培養液からはいずれもマウスを斃死させる毒性物質は検出されなかった。

##### 2-3 細菌の同定 (表 8)

No.1 平天からは、*Bacillus* 族 4 属、*Staphylococcus* 族 2 属、*Pseudomonas* 属、*Microbacterium* 属、*Kocuria* 属の計 9 属の細菌が検出された。No.3 味付けなんこつおよび No.5 こんにやくの燻製からは、*Bacillus* 属が検出された。

### Ⅲ. ボツリヌス菌芽胞添加実験

#### 1. 試料の Aw, pH および熱伝導性

各試験品の Aw および pH を表 9 に示した。いずれの試験品も Aw が 0.94 以上で pH は 4.6 を超えていた。

#### 2. 実験開始時の試験品検査結果

##### 2-1 実験区分 A：無処理

試験品が製造過程で適切に加熱処理が行われているかを確認するため実験開始時の細菌およびボツリヌス毒素の検査を行った。試験品 7 品目ともに一般細菌数およびクロストリジア属菌数は 10 CFU/g 未満であった。またボツリヌス毒素も検出されなかった。

##### 2-2 実験区分 C：開封芽胞非接種

開封操作が無菌的に行われたことを確認するために行った。試験品 7 品目ともに一般細菌数およびクロストリジア属菌数は 10 CFU/g 未満であった。またボツリヌス毒素も検出されなかった。

##### 2-3 実験区分 E：接種菌数確認

ボツリヌス菌芽胞接種直後の芽胞数を確認するために行った。計算値では R および S はグラムあたり  $1.8 \times 10^4$  CFU, T はグラムあたり  $0.81 \times 10^4$  CFU であった。実測値の平均値は R が  $5.8 \times 10^4$  CFU/g, S が  $3.1 \times 10^4$  CFU/g, T が  $1.2 \times 10^4$  CFU/g であった。A および O の計算値でのグラムあたり芽胞数は, A が  $1.4 \times 10^4$  CFU, O が  $1.4 \times 10^4$  CFU, K および M はグラムあたり  $1.6 \times 10^3$  CFU であった。実測値の平均値は A が  $3.1 \times 10^4$  CFU/g, O が  $1.7 \times 10^4$  CFU/g, K が  $6.8 \times 10^3$  CFU/g および M が  $3.3 \times 10^3$  CFU/g であった。一般細菌数はいずれも 10 CFU/g 未満であった。

#### 3. 保存性試験

##### 3-1 実験区分 B：未開封

試験品が保存 (30℃) の過程で細菌が増殖していないことを確認するため, 袋の膨張の有無, 細菌およびボツリヌス毒素の検査を行った。試験品 7 品目ともに観察期間中, 袋の膨張はみられなかった。また, 一般細菌数およびクロストリジア

属菌数は 10 CFU/g 未満であった。ボツリヌス毒素も検出されなかった。

##### 3-2 実験区分 D：開封芽胞非接種

開封操作が無菌的に行われ保存 (30℃) の過程で細菌が増殖していないことを確認するため, 袋の膨張の有無, 細菌およびボツリヌス毒素の検査を行った。試験品 7 品目ともに観察期中, 袋の膨張はみられなかった。また, 一般細菌数およびクロストリジア属菌数は 10 CFU/g 未満であった。ボツリヌス毒素も検出されなかった。

#### 4. 芽胞添加実験結果

##### 4-1 実験区分 F：食品 R, S, T (1-5, 表 10)

###### 4-1-1 保存性試験

R は, 保存試験開始 12, 14 および 61 日 (2 袋) 後に, 残り 1 袋は 90 日間では膨化しなかった。S は, 保存試験開始 3 日で 4 検体が, 4 日で 1 検体が膨化した。T は, 保存試験開始 5 日で 2 検体が, 9 日で 1 検体が, 10 日で 2 検体が膨化した。

###### 4-1-2 細菌検査

一般細菌数はいずれの検体も 10 CFU/g 未満であった。クロストリジア菌数は, 膨化の見られなかった R-3 は 10 CFU/g 未満で, 他の検体は  $0.7 \times 10^7 - 1.4 \times 10^8$  CFU/g であった。

###### 4-1-3 ボツリヌス毒素試験

膨化の見られなかった R-3 の 2 倍希釈試料液についてマウス腹腔内接種を行い, 4 日間観察を行ったが, 加熱処理および未処理群ともに生残した。しかし, R-3 以外の 14 検体は, 未処理群がいずれも斃死し, 加熱処理群は生残した。ボツリヌス毒素型別を行った結果, B 単独が 1 検体, A 単独が 4 検体および A と B が 9 検体であった。

##### 4-2 食品 A, O, K, M (菓子類, 1-30)

###### 4-2-1 保存性試験

試験品の膨化は, 観察終了後まで観察されなかった。

###### 4-2-2 細菌検査

食品 A, O, K および M の番号 1-30 の中で, 一般細菌数が検出された試験品は, O-20, K-27,

K-3, K-14, K-19, K-27, K-28 および K-29 の計 8 検体であった。検出された一般細菌数は、O-20 が  $4.7 \times 10^3$  CFU/g, O-27 が  $7.8 \times 10^3$  CFU/g, K-3, 14, 19, 27, 28 および 29 が  $7.4 \times 10^2 - 7.5 \times 10^4$  CFU/g であった。他の試験品 111 検体は 10 CFU/g 未満であった。

クロストリジア菌数は、A が  $1.6 \times 10^4 - 2.8 \times 10^4$  CFU/g, O が  $9.3 \times 10^3 - 3.0 \times 10^4$  CFU/g, K が  $3.0 \times 10^3 - 5.4 \times 10^3$  CFU/g および M が 10 未満  $- 2.6 \times 10^3$  CFU/g であった。M の試験品 29 検体は、クロストリジア数にばらつきがあった。

接種菌数確認試験品 (M-31-M-33) および保存試験品 (M-1-M-30) から接種菌量が回収できなかった。そこで、M-1, M-2 および M-3 を「蒸しきんつば」本体と包装フィルムと分けてクロストリジア数を測定した結果、M-1: 本体と包装フィルム両方から検出, M-2: 両方から検出されず, M-3: 包装フィルムから多く検出と 3 検体それぞれのクロストリジア数が異なっていた。これらの結果から、M は気密性容器包装フィルムの下にさらに薄いフィルムがあり、また本体が堅くポツリヌス菌芽胞を添加する際にシリンジが刺し難く、芽胞液が全くあるいは一部注入できなかった場合や芽胞液が一部あるいはすべて包装フィルムと内側のフィルムの間に漏れた場合等があることが推察された (表 11)。

#### D. 考察

容器包装詰食品でのポツリヌス食中毒事例<sup>1)</sup>を踏まえ、厚生労働省では水分活性が 0.94 を超え且つ pH が 4.6 を超える常温販売の容器包装詰食品は、中心部を 80℃で 20 分間の熱を加え、10℃以下で保存することを指導している<sup>2)</sup>。また、有芽胞細菌特にポツリヌス菌による食中毒を防止するために、容器包装後 120℃、4 分以上の加熱を義務づけている<sup>3)</sup>。また、容器包装後 120℃、4 分以上の加熱がなされない場合は、ポツリヌス菌が生育しないことを添加実験によって証明するよ

う指導している<sup>4)</sup>。近年食品業界における方向性は常温・長期保存性食品の生産に向いており、食品が「容器包装詰」されているケースが多い。中にはロングライフ (LL) 牛乳のように、殺菌時間と温度について、食味を損なわず且つ安全性が確保できる殺菌温度が確立されているものもあるが、流通市場では「容器包装詰加圧加熱食品」と見た目には区別できない容器包装詰食品が多く販売され、その安全性確保のための殺菌条件等は法的に規定されていない場合が多い。

本研究で我々は、福岡県内で流通している気密性容器包装詰食品とくに長期保存される食品 45 品目について、pH および Aw を調査した。その結果、pH が 4.6 を超え且つ Aw が 0.94 を超える食品は 15 品目 (33.3%) で、このうち殺菌方法に関する表示のないものが 6 品目 (13.3%) であった。範囲を広げ、米国の FDA で low-acid food 低酸性食品と定義している pH が 4.6 を超え且つ Aw が 0.85 を超える食品に該当するものは、34 品目 (75.5%) であり、このうち殺菌方法に関する表示がないものが 15 品目 (33.3%) であった。従って、これらの食品については、ポツリヌス菌芽胞添加実験を実施し、殺菌方法について再考すべきであると考えられた。

我々は、容器包装詰食品の抽出調査を踏まえ、福岡県内で生産され特に食品衛生監視員が注目する食品 5 品目に関して、pH, Aw および細菌検査を行った。調査した 5 品目は、3 品目 (平天、味付け玉子およびこんにゃくの燻製) が殺菌方法の記載が無く、1 品目 (おでん) が気密性容器包装後加圧加熱食品および 1 品目 (味付けなんこつ) が真空高熱殺菌と記載されていた。5 品目のうち pH が 4.6 を超え且つ Aw が 0.94 を超える食品に該当しない食品は、こんにゃくの燻製 1 品目であった。細菌検査の結果、おでんおよび味付け玉子以外の 3 品目から細菌が検出された。5 品目からはポツリヌス菌およびポツリヌス毒素は検出されなかったが、平天と味付けなんこつについては、



ボツリヌス食中毒の危険性は少なからずあると考えられた。

次に、本研究班ではボツリヌス菌芽胞の殺菌証明のなされていない新含気調理食品 3 品目およびこれまで慣例的にあるいは調理条件等から気密性容器包装後加圧加熱殺菌がなされていなかった菓子類 4 品目について、ボツリヌス菌芽胞添加実験を行なった。新含気食品 3 品目（ほたての塩焼、きんぴら大根、筑前煮）では、ボツリヌス菌が増殖し、ボツリヌス毒素が産生された。これら 3 品目は何らかの要因でボツリヌス菌が混入した場合、ボツリヌス食中毒の危険性があることが示唆された。一方、4 品目の菓子は、 $A_w$  が 0.94 以上で且つ pH が 4.6 を超える性状を有していたが、いずれも 45 日または 90 日の保存性試験では一般細菌、クロストリジア属菌は検出されず、ボツリヌス毒素も検出されなかった。完全な保存性試験に供した検体数がいずれも 3 検体ではあるが、これらの食品については現行の加熱方法で比較的安全であることが分かった。一方、不慮の事故あるいは殺菌不良を想定した添加実験では、いずれの試験品もボツリヌス菌は増殖せず、ボツリヌス毒素も産生されないことを確認した。このことは、2 種類の「ういろう」、「くず餅」および「蒸しきんつば」は、ボツリヌスによる食中毒の危険性は極めて低いことを示唆している。

今後、食品衛生上安全性を確保するためには殺菌条件を何らかの形で行政的に確認し、保存性試験の実施とその結果書の提示を義務づける必要があると考えられる。

## E. 結論

### 1. 気密性容器包装詰食品 45 品目について

pH が 4.6 を超え且つ  $A_w$  が 0.94 を超える食品は、15 品目 (33.3%) で、このうち殺菌方法に関する表示がなされていない食品は 6 品目 (13.3%) であった。

### 2. 福岡県内で生産・販売されている気密性容器

包装詰食品 5 品目について

#### ①5 種食品の化学的性状について

5 種食品中 4 品種が、水分活性値が 0.94 以上でかつ pH が 4.6 を超える性状を有していた。

#### ②5 種食品の細菌汚染について

- ・ 5 種食品中 3 品種から細菌が検出された。2 種はロットを問わず細菌が検出された。他 1 種は 1 ロット 5 検体中各 1 検体から菌が検出された。
- ・ 検出された菌は、9 属の菌種でそのうち 5 菌種が有芽胞菌であった。

### 3. 新含気食品 3 品目のボツリヌス菌芽胞添加実験

- ①保存性試験 (90 日間) では、いずれも一般細菌、クロストリジア属菌およびボツリヌス毒素は検出されなかった。
- ②対象の新含気食品 3 品目では、いずれも A 型毒素産生および B 型産生ボツリヌス菌の発育が可能であり、ボツリヌス毒素を産生することが分かった。

### 4. 菓子 4 品目のボツリヌス菌芽胞添加実験

- ①保存性試験 (45 日, 90 日間) では、一般細菌、クロストリジア属菌およびボツリヌス毒素は検出されなかった。
- ②対象の菓子 4 品目では、A 型毒素産生および B 型産生ボツリヌス菌のいずれも増殖せず、ボツリヌス毒素を産生しないことが分かった。

## F. 謝辞

本調査に際し、御協力を頂きました福岡県各保健福祉環境事務所の臂博美、佐伯法高、居倉修史、清島綾子、岩永芳博、野中寿子、松下隆志、牧草由紀夫、中嶋桂子の各氏及び井上大作氏 (九州厚生局) 並びに貴重なご助言を頂きました福岡県保健福祉部生活衛生課の皆様へ深謝致します。また、本実験にご協力頂きました佐伯かおり氏に感謝致します。

#### 参考文献

- 1) 国立感染症研究所 細菌・血液製剤部 編集・発行, ボツリヌス症の手引き・資料集 (2001).
- 2) 厚生省衛生局食品保健課長通知：気密性のある容器包装詰めの要冷蔵食品に係る取扱いについて, 平成 11 年 8 月 30 日, 衛食第 120 号 (1999).
- 3) 厚生省生活衛生局：食品, 添加物等の規格基準, 昭和 34 年 12 月 28 日, 厚生省告示 370 号 (1962).
- 4) 厚生労働省医薬局食品保健部基準課長, 監視安全課長通知：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, 平成 15 年 6 月 30 日, 食基発第 0630002 号/食監発第 0630004 号 (2003).

表1. 調査対象食品

No.	品名	種別	包装形態	殺菌方法
1	平天	魚肉ねり製品	記載無し(真空包装)	記載なし
2	味付け玉子	そうざい	記載無し(真空包装)	記載なし
3	味付けなんこつ	そうざい	記載無し(真空包装)	真空高熱殺菌
4	おでん	そうざい	容器包装詰加圧加熱食品	気密性容器に包装し、 加圧加熱殺菌
5	こんにゃくの薫製	珍味	記載無し(真空包装)	記載なし

表2. 供試試料の総重量と包装素材

食品 記号	製品	総重量, g	容器
R	ほたての塩焼	55	アルミパウチ
S	きんぴら大根	55	透明パウチ
T	筑前煮	120	透明パウチ
A	ういろう	170	塩化ビニリデン
O	ういろう白	160	フィルム
K	くず餅	350	ポリエチレン, ポリアミノ
M	蒸しきんつば	350	バリアナイロン

表3. 接種用ボツリヌス菌芽胞液の芽胞数

食品 記号	芽胞混合液の cfu/ml	添加中に3回計測した芽胞数 CFU/20 $\mu$ l		
R,S,T	$4.9 \times 10^7$	$1.0 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$	$8.5 \times 10^5$
A, O	$9.5 \times 10^7$	$1.9 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$	$2.2 \times 10^6$
K, M	$1.7 \times 10^7$	$4.9 \times 10^5$	$5.9 \times 10^5$	$5.7 \times 10^5$

表4. 買上食品の分類とpHとAwの測定結果

買上食品の分類	買上品目	pHとAwの測定結果				
		pH:4.6超え, Aw:0.94超え の品目	pH:4.6超え, Aw:0.85超え- 0.94未満 の品目	pH:4.6未満 Aw:0.94超え の品目	pH:4.6超え Aw:0.85未満 の品目	pH:4.6未満 Aw:0.85未満 の品目
野菜類加工品	15	5	8	1		1
穀類加工品	7	3		4		
そうざい	8	6	1			1
魚介類加工品	5		4		1	
食肉・卵加工品	4	1	3			
菓子類	3		2		1	
調味液	2		1		1	
海藻加工品	1				1	
合計	45	15	19	8	1	2

表5. 45品目の容器包装詰食品のpHおよびAw

No.	商品名	pH	Aw		表示
1	鶏ごぼうごはん(米飯類)	6.39	0.947	穀類加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
2	うずら卵水煮	6.75	0.958	食肉・卵加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
3	玉子入りおでん	6.65	0.946	そうざい	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
4	玉子入りおでん(2個束)	6.53	0.946	そうざい	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
5	トマトとアスパラガス...	4.63	0.955	そうざい	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
6	味付...おでん	6.37	0.971	そうざい	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
7	おでん	6.36	0.972	そうざい	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
8	コーンホール	6.48	0.945	野菜加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
9	ヤングコーン	5.03	0.946	野菜加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
10	...風おでん...	6.48	0.971	そうざい	新含気調理食品
11	ゆでピーナッツ	6.58	0.945	野菜加工品	新含気調理食品
12	塩えんどう豆	6.37	0.953	野菜加工品	新含気調理食品
13	加圧釜炊きごはん	7.16	0.950	穀類加工品	記載なし
14	あったかごはん(包装米飯)	7.27	0.960	穀類加工品	記載なし
15	ゆであずき(小豆水煮)	6.60	0.952	野菜加工品	記載なし
16	...大学芋	5.29	0.888	菓子類	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
17	...大学いも(いも菓子)	5.38	0.895	菓子類	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
18	味付ばい貝	6.91	0.913	魚介類加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
19	やわらか煮こみ...豚角煮	5.87	0.922	食肉・卵加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
20	...甘納豆...	6.77	0.896	野菜加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
21	味付シイタケ	5.13	0.922	野菜加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
22	...天津割れむき栗	5.85	0.927	野菜加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
23	直火焼...栗	5.90	0.935	野菜加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
24	...焼き栗	6.13	0.936	野菜加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
25	...辛串こん	6.78	0.937	そうざい	レトルト加熱殺菌
26	...ゆであずき	6.89	0.911	野菜加工品	新含気調理食品
27	...とんそく	6.96	0.929	食肉・卵加工品	真空高熱殺菌
28	...にしん昆布巻	5.81	0.912	魚介類加工品	記載なし
29	さばみそ煮(そうざい)	6.19	0.939	魚介類加工品	記載なし
30	さけフレーク	5.83	0.887	魚介類加工品	加熱殺菌
31	煮込みハンバーグ(そうざい)	5.73	0.928	食肉・卵加工品	記載なし
32	栗甘露煮	5.79	0.896	野菜加工品	記載なし
33	たかな油いため	4.75	0.911	野菜加工品	記載なし
34	金時豆	6.38	0.922	野菜加工品	記載なし
35	焼帆立貝	5.55	0.811	魚介類加工品	記載なし
36	梅がゆ	3.43	0.948	穀類加工品	気密性容器に密封し、加圧加熱殺菌
37	ところてん	3.97	0.946	海藻加工品	記載なし
38	杏仁フルーツ	4.09	0.950	菓子類	記載なし
39	ごはん	4.06	0.952	穀類加工品	記載なし
40	麦ごはん(包装米飯)	4.56	0.960	穀類加工品	記載なし
41	生タイプうどん	4.04	0.960	穀類加工品	記載なし
42	...釜めしの素	4.12	0.956	調味液	記載なし
43	ぜんまい水煮	4.31	0.952	野菜加工品	記載なし
44	味付メンマ	4.37	0.935	そうざい	記載なし
45	...レーズン	3.89	0.504	野菜加工品	記載なし

表6. 対象食品のAwおよびpH

No.	品名	ロット	5サンプル平均値	
			Aw	pH
1	平天	1	0.98以上	6.4
		2	0.98以上	6.4
		3	0.98以上	6.4
2	味付け玉子	1	0.98以上	6.6
		2	0.98以上	6.6
		3	0.98以上	6.6
3	塩味なんこつ	1	0.98以上	6.7
		2	0.98以上	6.7
		3	0.98以上	6.8
4	おでん	1	0.98以上	6.3
		2	0.98以上	6.3
		3	0.98以上	6.3
5	こんにゃくの薫製	1	0.73	6.8
		2	0.77	6.9
		3	0.82	7.5

表7. 対象食品の一般細菌数, クロストリジヤ数

No.	品名	ロット	細菌数		クロストリジヤ数 最小値-最大値、 CFU/g
			最小値-最大値(平均値)、CFU/g		
			非加熱	65°C20分加熱	
1	平天	1	3-38 (15)	0-5 (3)	0-1
		2	6-23 (14)	3-13 (7)	0-1
		3	6-63 (24)	1-19 (9)	0-2
2	味付け玉子	1	0	0	0
		2	0	0	0
		3	0	0	0
3	味付けなんこつ	1	0-1,700 (340)	0	0
		2	0-83 (17)	0	0
		3	0-4,100 (820)	0	0
4	おでん	1	0	0	0
		2	0	0	0
		3	0	0	0
5	こんにゃくの薫製	1	15,000-29,000 (23,000)	12,000-24,000 (19,000)	0
		2	9,700-19,000 (14,000)	4,200-21,000 (10,000)	0
		3	3-33 (14)	3-9 (5)	0

表8. 汚染細菌の種類

name	lot	phylum	class	order	family	genus	species	no. of colonies	blast, %					
1 平天	1	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus licheniformis</i>		1	99					
						<i>Bacillus sonorensis</i>		1	99					
						<i>Bacillus sp.</i>		2	96-97					
						<i>Virgibacillus proomii</i>		2	99					
						<i>Paenibacillus favisporus</i>		1	97					
						<i>Paenibacillus sp.</i>		1	99					
						<i>Pseudomonas fluorescens</i>		2	99					
	Proteobacteria	γproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae										
	2	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus licheniformis</i>		4	99-100					
						<i>Bacillus pumilus</i>		4	99					
						<i>Bacillus sonorensis</i>		1	98					
						<i>Bacillus sp.</i>		1	96					
						<i>Virgibacillus proomii</i>		2	99					
						<i>Paenibacillus chibensis</i>		2	99					
						<i>Brevibacillus sp.</i>		1	99					
							Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus equorum</i>		1	100			
						3	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus licheniformis</i>		3	99
											<i>Bacillus pumilus</i>		1	99
											<i>Bacillus sonorensis</i>		1	99
											<i>Bacillus sp.</i>		1	98
											<i>Brevibacillus sp.</i>		1	99
<i>Virgibacillus proomii</i>												2	99	
<i>Paenibacillus chibensis</i>		2	99											
	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus warneri</i>		1	99									
Proteobacteria	αproteobacteria	Rhizobiales	Methylobacteriaceae											
Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococaceae											
			Microbacteriaceae											
						<i>Microbacterium sp.</i>		1	99					
3 味付けなんこつ	1	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus firmus</i>		6	98-100					
						<i>Bacillus subtilis</i>		3	99-100					
	2	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus firmus</i>		1	99					
						<i>Bacillus subtilis</i>		1	99					
	3	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i>		7	98-100					
	5 ごんにゃくの凍製	1	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus sp.</i>		16	97-100				
							<i>Bacillus simplex</i>		1	99				
							<i>Bacillus sp.</i>		13	97-100				
		2	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus sp.</i>		10	97-100				
<i>Bacillus subtilis</i>								4	99-100					
3		Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus simplex</i>		1	99					

表9. 供試試料のAwおよびpH

食品記号	検体no.	Aw	pH
R	21	0.98以上	6.8
	22	0.98以上	6.9
	23	0.98以上	6.9
S	21	0.98以上	5.7
	22	0.98以上	5.8
	23	0.98以上	5.7
T	21	0.98以上	5.5
	22	0.98以上	5.4
	23	0.98以上	5.5
A	46	0.96	5.1
	47	0.96	5.1
	48	0.96	5.1
O	46	0.96	4.9
	47	0.96	4.8
	48	0.97	4.8
K	46	0.98以上	5.4
	47	0.98以上	5.4
	48	0.98以上	5.4
M	46	0.96	7.0
	47	0.96	7.0
	48	0.97	7.0

表10. 新含気食品3品目におけるボツリヌス菌芽胞添加実験結果

品名	区分	pH	ガス産生	膨化に要した日数	クロストリジア 菌数, CFU/g	毒素型	
R(ほたて塩焼)	F	1	6.9	有	14日	$6.5 \times 10^7$	B
		2	7.1	有	61日	$1.4 \times 10^8$	A + B
		3	6.7	無	(90日膨化せず)	—	陰性
		4	7.1	有	61日	$6.9 \times 10^7$	A + B
		5	6.9	有	12日	$4.6 \times 10^7$	A + B
	E	6	6.8		(90日膨化せず)	$8.3 \times 10^4$	-
		7	6.9	無し	(90日膨化せず)	$4.9 \times 10^4$	-
		8	6.9		(90日膨化せず)	$4.3 \times 10^4$	-
S(きんぴら大根)	F	1	6.0	有	3日	$4.0 \times 10^7$	A
		2	5.9	有	3日	$5.0 \times 10^7$	A
		3	6.0	有	4日	$1.6 \times 10^7$	A
		4	6.0	有	3日	$2.4 \times 10^7$	A + B
		5	6.0	有	3日	$6.0 \times 10^7$	A
	E	6	5.9		(90日膨化せず)	$3.6 \times 10^4$	-
		7	5.8	無し	(90日膨化せず)	$2.7 \times 10^4$	-
		8	5.8		(90日膨化せず)	$3.0 \times 10^4$	-
T(筑前煮)	F	1	5.8	有	5日	$4.2 \times 10^7$	A + B
		2	5.8	有	5日	$4.0 \times 10^7$	A + B
		3	5.7	有	10日	$0.8 \times 10^7$	A + B
		4	5.9	有	9日	$0.7 \times 10^7$	A + B
		5	5.8	有	10日	$3.8 \times 10^7$	A + B
	E	6	5.7		(90日膨化せず)	$1.4 \times 10^4$	-
		7	5.6	無し	(90日膨化せず)	$1.2 \times 10^4$	-
		8	5.5		(90日膨化せず)	$1.1 \times 10^4$	-

表11. 接種用ボツリヌス菌芽胞液の芽胞数

食品記号	2回を平均したクロストリジア数, CFU			
	×3	×30	×300	×3000
M-1 本体	∞	80	5	検査せず
M-1 容器	∞	∞	91	10
M-2 本体	0	0	0	検査せず
M-2 容器	0	0	0	0
M-3 本体	1	0	0	検査せず
M-3 容器	∞	37	7	0

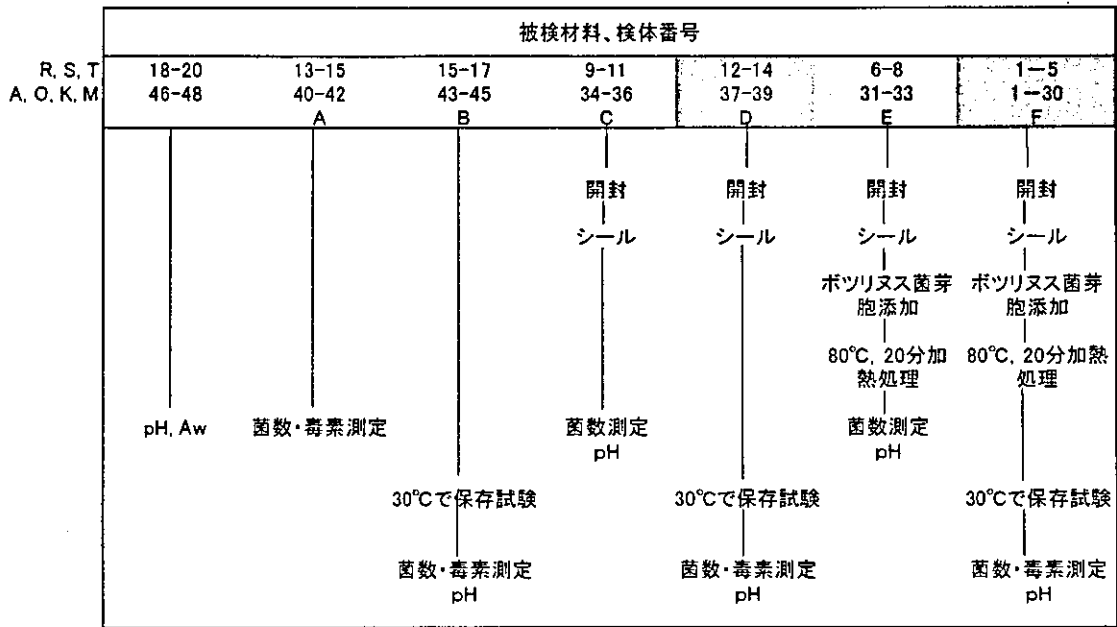


図1 被検材料の検体番号と実験過程



## 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

分担研究者	浅尾 努	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	久米田裕子	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	河合高生	大阪府立公衆衛生研究所
研究協力者	古田雅一	大阪府立大学先端科学研究所

### 研究要旨

平成 14 年度および平成 16 年度は、常温で長期間の流通が可能である容器包装詰低酸性食品へのボツリヌス菌芽胞のチャレンジテストを実施した。不活性ガスを充填し常温で流通している、いわゆる“新含気調理食品”と呼ばれている「豚汁の具」（水分活性：0.99 以上、pH 6.2）と「サバの照り焼き」（水分活性 0.96、pH 6.1）はボツリヌス菌の増殖にともなう容器の膨張や毒素の産生が認められた。その毒力は  $10^4 \sim 10^5$  マウス ipLD<sub>50</sub>/g と極めて強かった。水分活性は 0.99 以上を示したが、pH が 4.5 と低かった「きのこの具」では、ガス発生による容器の膨張、ボツリヌス菌の増殖、毒素の産生は起こらなかった。レトルト食品に類似した「蒸かし黒豆」（水分活性 0.97、pH 6.7）はボツリヌス菌を接種した 30 検体中 2 検体で、保存 12 日目にガス発生のために容器の膨張が観察された。明瞭な膨張が観察されなかった 28 検体から無作為に抽出した 3 検体も、膨張した検体と同様にボツリヌス菌の増殖および毒素産生が起こった。容器の膨張とは無関係に、いずれの食品も保存 26～34 日目にボツリヌス菌数は  $10^7 \sim 10^8$  CFU/g オーダーに達し、産生された毒素の毒力は  $10^4 \sim 10^6$  マウス ipLD<sub>50</sub>/g であった。酵素抗体法で測定した毒素量は、全検体から B 型毒素がより多く検出された。A 型毒素が比較的多く産生された検体にのみ容器の膨張が観察された。なお保存 70 日後でも、残りの検体の容器の膨張は観察されなかった。容器包装詰めされた「切り餅」もボツリヌス菌の増殖が可能な理化学的性状（水分活性 0.98、pH 5.4）を有していたが、保存 68 日目ま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。

平成 15 年度は、市販の容器包装詰低酸性食品のボツリヌス菌等の微生物汚染状況および理化学的性状（水分活性、pH）を検討した。真空ボイル殺菌された「丹波黒豆」と「金時豆」、および加圧加熱殺菌された「丹波黒豆」と「金時豆」を、3 ロット 5 検体ずつ合計 60 検体を実験に供した。いずれの検体からも、ボツリヌス菌、一般生菌、クロストリジア、好気性有芽胞菌は検出されなかった。「ぎんなん水煮の缶詰」（10 ロット、50 検体）からもボツリヌス菌、一般生菌、クロストリジア、好気性有芽胞菌は検出されなかった。

大阪府内で市販されている容器包装詰低酸性食品の販売状況や表示の調査を実施した。多くの食品の保存方法の表示が、“直射日光を避け、涼しい場所”というように具体的ではなかった。スーパーで販売されていた当該食品の可能性のある食品を購入し、pH と水分活性を測定した。野菜の水煮や米飯等をはじめとして、容器包装詰低酸性食品に該当する食品が多く流通していた。

平成 15 年度および平成 16 年度は、ボツリヌス菌汚染の可能性が危惧され、容器包装詰低酸性食品にも広く使用されている香辛料のボツリヌス菌汚染実態を調査した。平成 15 年度の検査で、10ヶ国から輸入された 16 品種、合計 31 検体の香辛料のうち、殺菌処理した香辛料 8 検体からはボツリヌス菌は検出されなかった。しかし未殺菌の香辛料 23 検体のうち、インド産フェヌグリーヌ（原形）1 検体から D 型ボツリヌス菌を検出した。平成 16 年度は、香辛料中のボツリヌス菌を効率良く検出するため、抽出液には蒸留水の代わりに 50%エタノールを、残渣除去のためにはストマフィルターに加えて 500 メッシュフィルター濾過を行った。セロリ、タイム、フェヌグリークの殺菌粉末を用いたボツリヌス菌芽胞の添加回収試験で約 50%の回収率が得られた。検査した未殺菌香辛料 36 検体のうち、中国産ジンジャーから I 群の B 型菌、インド産ジンジャーから C/D 型（キメラ型）菌を分離した（汚染率 5.6%）。クロストリジアの汚染は高率（32/36、89%）であったが、汚染菌数は 1 CFU/g~ $4.8 \times 10^3$  CFU/g と少なかった。ボツリヌス菌汚染があった各ジンジャーのクロストリジア数は、2 CFU/g および 20 CFU/g であった。殺菌香辛料 3 検体からはボツリヌス菌は検出されず、クロストリジアも 1 CFU/g 未満であった。未殺菌香辛料に限定すると、検査した 59 検体のうち 3 検体（5.1%）からボツリヌス菌を分離した。

#### A. 研究目的

近年の食品製造技術の進歩や容器包装材の改良・開発により、容器包装詰加圧加熱殺菌食品（レトルト食品）以外にも常温で長期間保存性を有するとされる容器包装詰食品の流通が増加している。これらの食品のうち、pHが4.6を越え、かつ水分活性が0.94を越える食品である“容器包装詰低酸性食品”は、ボツリヌス菌の増殖に伴い産生される毒素により食中毒を起こす可能性のある食品である。実際に、平成 11 年 8 月千葉県で発生したボツリヌス中毒事件では、原因食品として気密性を有する容器に入れられた要冷蔵食品（いわゆるレトルト類似食品）が疑われた。容器包装詰低酸性食品のボツリヌス中毒に対するリスク評価を行うことは、消費者の健康確保を計る観点から極めて重要かつ緊急の課題であると考えられる。

平成 14 年度は、容器包装詰低酸性食品の中でも、“新含気調理食品”と呼ばれている食品を研究対象とした。新含気調理食品は、国際的には常温流通の低酸性食品のカテゴリーに分類されるが、微生物学的安全性に関するデータが不十分である。そこで当該食品へのボツリヌス菌芽胞のチャレンジテストを

実施し、ボツリヌス菌の増殖性と毒素産生性を評価することを目的とした。

平成 15 年度は、(1) 容器包装詰低酸性食品中のボツリヌス菌等の微生物汚染状況および理化学的性状（水分活性、pH）を把握することを目的とした。

(2) 大阪府内で市販されている該当食品の流通状況や表示の実態を調査する目的で、スーパーで購入した食品の pH と水分活性を測定した。香辛料の多くは発展途上国で生産されるため、現地での収穫、乾燥、貯蔵、輸送などの過程で、ボツリヌス菌を含む種々の微生物に汚染される可能性が高い。(3) 香辛料は容器包装詰低酸性食品のボツリヌス中毒に対するリスク評価のための重要なターゲットであると考え、ボツリヌス菌の汚染実態を調査した。

平成 16 年度は、(1) 香辛料中のボツリヌス菌検査法の種々の問題点の改良を行い、新たに構築した改良検査法により、(2) 香辛料中のボツリヌス菌およびクロストリジアの汚染実態調査をさらに推進することを目的とした。(3) 容器包装詰低酸性食品に該当する「切り餅」と「蒸かし黒豆」の安全性を確認する目的で、ボツリヌス菌芽胞のチャレンジテストを実施した。

(4) 食品中に産生されたボツリヌス毒素を定量する目的で、酵素抗体法を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 供試検体

ボツリヌス菌芽胞チャレンジテスト用の検体として、新含気食品である「サバの照り焼き」、「きのこの具」、「豚汁の具」は厚生労働省の仲介により製造業者から無償提供された。一般的な容器包装詰低酸性食品である「切り餅」と「蒸かし黒豆」は、厚生労働省を通じて業者から購入した。

細菌汚染実態調査検体として、煮豆類と「ぎんなん水煮の缶詰」、合計 110 検体は厚生労働省の仲介により、製造業者から無償提供された。煮豆類として、真空ボイル殺菌された「丹波黒豆」および「金時豆」それぞれ 3 ロット (1 ロットにつき 5 検体)、および加圧加熱殺菌された「丹波黒豆」および「金時豆」それぞれ 3 ロット (1 ロットにつき 5 検体) を使用した。なお製品は、冷所または冷蔵庫に保存するように表示されていた。室温保存製品である、「ぎんなん水煮の缶詰」は 10 種類の製品 (1 製品につき 5 検体) を使用した。これらの食品は図 1 に示す方法に従って、細菌検査や理化学的性状を検査した。

大阪府内のスーパー等で販売されている容器包装詰食品 (低酸性食品) の販売状況を調べた。今回の研究対象に該当する食品を選択するために、購入した食品の水分活性と pH を測定した。

実験に供した香辛料 70 検体のうち 39 検体は香辛料加工メーカーから直接無償提供を受けた。残りの 31 検体は厚生労働省の仲介により、製造業者から無償提供された。

### 1. 試薬および培地等

#### 1) ペプトン加生理食塩水

ペプトン (BACTO Peptone, DIFCO) 1.0 g および塩化ナトリウム 8.5 g を精製水 1,000 ml に溶解後

に、121℃で 15 分間オートクレーブした (pH は 7.0 ± 0.1)。

#### 2) 標準寒天培地 (栄研)

培地粉末 23.5 g を蒸留水 1,000 ml に加温溶解し、121℃で 15 分間オートクレーブした。

#### 3) クロストリジア培地 (ニッスイ)

(A) 培地粉末 70.3 g を蒸留水 1,000 ml に加温溶解し、121℃で 15 分間オートクレーブした。これを約 55℃に保ち、あらかじめ検体 10 ml を分注した滅菌パウチに 15 ml 注入し、検体と混合した後、気泡を取り除いて首部をシーラーで溶封した (香辛料中の菌数測定用)。

(B) 培地粉末 42.2 g を蒸留水 1,000 ml に加温溶解し、121℃で 15 分間オートクレーブした。これを約 55℃に保ち、あらかじめ検体 1 ml を分注した滅菌パウチに 20 ml 注入し、検体と混合した後、気泡を取り除いて首部をシーラーで溶封した (添加実験での菌数測定用)。

(C) 缶詰協会の検査 (初発菌数等の測定用) では、培地粉末 46.9 g を蒸留水 1,000 ml に加温溶解し (定法の 2/3 の量)、121℃で 15 分間オートクレーブした。

#### 4) クロストリジア測定用滅菌パウチ

大阪府立公衆衛生研究所での検査には P. T. パウチ (酒見医療器具) を、缶詰協会での検査にはアネロビックパウチを使用した。

#### 5) クックドミート培地

クックドミート培地 (DIFCO) は 0.3% ブドウ糖 および 0.2% 可溶性澱粉を加え、121℃で 15 分間オートクレーブした。

#### 6) ゼラチン緩衝液

ゼラチン (2.0 g) と  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (4.0 g) を蒸留水 900 ml に溶解し、1N の塩酸で pH を 6.2 に調整した後、蒸留水を加えて 1,000 ml にした。121℃で 15 分間オートクレーブして冷蔵庫で保管した。必要に応じてペニシリン 300 U/ml やストレプトマ

イシン 0.5 mg/ml を加えた。

#### 7) 診断用抗毒素血清

ボツリヌス毒素の型別用抗毒素血清 A 型～G 型 (千葉県血清研究所) を使用した。

#### 8) マウス

ddY (クリーン、日本 SLC)、約 20 g (4～5 週齢) の雄を使用した。

#### 9) pH メーター

HORIBA 製の F-12 を使用した。pH を測定するための電極は専用とし、実験途中はアルコール等で消毒した。電極は少なくとも 2 本用意し、使用した電極は実験終了時にオートクレーブ (121℃、30 分間) した後に廃棄した。

#### 10) 水分活性測定装置

ロトロニック製の HYGRO-LAB を使用した。

#### 11) ステンレス・フィルター金網

500 メッシュフィルター (T500: オープニング 25  $\mu$ m、八尾金網製作所) をピフネルロートに装着した後、121℃で 15 分間オートクレーブした。

#### 12) ストマッカー用滅菌ポリエチレン袋

ストマフィルター S タイプ (フィルターのポアサイズ 40  $\mu$ m、栄研器材) を使用した。

### 3. 香辛料中のボツリヌス菌検査法

ボツリヌス菌抽出法の検討: 以下の方法で回収試験を実施した。

(A) セロリ、タイム、フェヌグリーク (殺菌粉末) 25g をストマフィルターに秤量した。

(B) ボツリヌス菌芽胞 (62A;NFPA、 $2.0 \times 10^9$ /ml) を希釈し、その 0.1ml を添加 ( $2.0 \times 10^4$ ) した。

(C) 50%エタノール 100 ml を加え 2 分間ストマッキングした。

(D) シーラーで溶封した後、1 時間の間に数回激しく混合した。

(E) ストマフィルターの濾過液をピフネルロートに装着した 500 メッシュフィルターで濾過した (図 2)。

(F) 遠心管 (50 ml) に濾過液を採取し、3,000 回

転、20 分間、20℃で遠心した。

(G) 上清をデカントで捨て、40 ml/遠心管の滅菌蒸留水で洗浄した。

(H) 3,000 回転、20 分間、20℃で遠心した。

(I) 上清をデカントで捨て、蒸留水 4 ml で懸濁した。

(J) ボツリヌス菌数を、上記のクロストリジア培地によるパウチ法で測定し、回収率を算定した。

#### 2) 抽出液の培養法

上記の方法で得られた抽出液約 1 ml ずつを 4 本のクックドミート培地に接種し、2 本はそのまま、残りの 2 本は 70℃で 10 分間加熱処理した。30℃で 7 日間嫌気培養後、培養液を 15,000 回転、10 分間、4℃で遠心した。遠心上清をゼラチン緩衝液で 5 倍希釈後に、トリプシンで活性化処理してマウス腹腔内に接種した。マウスは 4 日間観察し、毒素が検出されなかった検体はボツリヌス菌陰性とした。

マウス法で毒素陽性となったクックドミート培養液中のボツリヌス菌の存在を確認するために、PCR を実施した。クックドミート培養液 1 ml を 12,000 回転で 5 分間遠心、沈渣を滅菌生理食塩水で洗浄した。沈渣を 50  $\mu$ l の 0.1% Tween20-TE に懸濁、100℃で 10 分間加熱後、その遠心上清を DNA テンプレートとした。プライマーは武士らが報告したものを、Taq DNA ポリメラーゼは Z-Taq (タカラ) を使用した。反応条件は初期変性 94℃、5 分間で、(98℃、5 秒; 55℃、5 秒; 72℃、10 秒) で 30 サイクル、最後に 72℃、5 分間の伸長反応であった。PCR 産物は 2%アガロースで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色した。

#### 4. 市販食品への芽胞のチャレンジテスト

平成 14 年度は図 3 に示す方法で実施した。平成 16 年度は、あらかじめ 80℃で 20 分間加熱処理した芽胞液を、容器を開封しないで接種した。

##### 1) 供試菌株 (食品接種用)

平成 14 年度