

A 型：62A (ATCC7948)、62A (NFPA, 米国食品製造者協会)、BIG4 (東海区水産研究所)
90A (東海区水産研究所)

B 型：213B (東海区水産研究所)

平成 16 年度

A 型：62A (ATCC7948)、

62A (NFPA, 米国缶詰協会)、36A

B 型：213B、Okura

2) 芽胞液の調製

本研究班の分担研究者が所属する北海道立衛生研究所および帯広畜産大学で作製した。

3) 芽胞液の菌数測定

供試菌株の芽胞液 0.5 ml に滅菌ペプトン加生理食塩水 4.5 ml を加え、80℃で 20 分間加熱処理した。

この液をさらに同加生理食塩水 (9 ml 入り) で 10 倍階段希釈した。滅菌アネロビックパウチ 2 枚のそれぞれに、55℃に保温しておいたクロストリジア測定用培地 15 ml を分注した後、各希釈液 1 ml ずつを加え、よく混和した後に固化した。パウチは 35℃で 24 時間培養後に発生した黒色集落を算定した。

4) 接種用芽胞液の調製

芽胞数が約 10^7 CFU/ml になるよう希釈した芽胞液を等量ずつ混合した。芽胞液は接種直前に 80℃で 20 分間加熱処理した。

5) 接種方法と加熱処理

平成 14 年度

(A) 接種方法

食品包装袋 (パウチ) の外側をアルコールで消毒後、切り取ったシール部 (食品製造者側) から 20 μ l の芽胞液を接種し、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。芽胞液接種には滅菌液注射器 (テルモ製、ツベルクリン用、1ml、針を長さ 150 mm のものに交換) を装着した分注器 (Indicon 社、TRIDAK Division 製、STEPPER) を用いた。

(B) 加熱処理

石田式低温殺菌機を用いて、中心温度が 80℃で 20 分保持されるように加熱処理した。試料の中心温度が 80℃に達するまでの時間 (カムアップタイム) は、熱伝達を測定して算出した。熱伝達の測定には、温度測定装置に記録式温度計 (エラブ社製、CMC-821 型) を、温度センサーはステンレス保護管付き熱電対 (外径 1.2 mm) を用いた。温度センサーをパウチの下側にあけた小孔に固定具を装着して挿入した。測定中センサー先端部を固定するために、センサー先端部より 6~7 mm 手前にニードルホルダーを取り付けた (図 4A)。ニードルホルダーの高さはパウチの厚みに応じて 10、15 および 25 mm のものを適宜用いた。パウチの厚みが 10 mm 以下の試料では、センサー先端部手前に厚さ 3 mm のシール付き板ゴムを貼り合わせ、センサー先端部がパウチの厚みの中心になるように誘導した (図 4B)。固定具とパウチをガムテープで固定し、センサー先端部が動かないようにした (図 4C)。センサー先端部の固定位置は内容物の中心とした。温度センサー 1 本を湯槽の温度測定に、他の 2 本を供試試料内部の温度測定に用いた。

平成 16 年度 (図 5)

(A) 供試試料の表面をアルコールで消毒し、ゴムシール (サン科学) を貼った。

(B) 貼り付けたゴムシール表面をアルコールで消毒した後、芽胞液を 20 μ l ずつ接種した。

(C) 接種面をアルコールで消毒し、接種部位に生じた針穴の上にゴムシールを貼った。

5. 食品の保存と試験法

ボツリヌス菌の取り扱い、移動、保管等は大阪府立公衆衛生研究所の安全管理規定に基づいて実施した。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った。使用したピペット等の実験器具は 0.1%次亜塩素酸ナトリウムに浸漬し、実験後に速やかに 121℃で 30 分間オートクレーブした。

1) 食品の保存

芽胞を接種した「豚汁の具」「サバの照り焼き」「きのこの具」「蒸かし黒豆」は破裂による汚染防止のため、個別に滅菌ストマッカー袋に入れシールした。「切り餅」は個包装切り餅が入っていた大袋に入れシールした。これを滅菌可能なステンレス製の缶に入れて、30℃に温度設定した全温度培養器（ESPEC、LNL-121）で保存した。保存期間中にガス発生により容器がじゅうぶんに膨張した後に4℃の冷蔵庫に移した。

2) 一般生菌数の測定

食品の全量が無菌的にストマフィルターにとり、等重量の滅菌蒸留水を加え、ストマッカー処理したものを試料原液（検体の2倍希釈液）とした。pH測定用として20 ml、毒素試験用として10 mlを滅菌試験管に採取した。毒素試験用試料は実験に供するまで-20℃で冷凍保存した。試料原液20 mlにペプトン加生理食塩水を80 ml加え10倍希釈液を作製した後、ペプトン加生理食塩水で10倍階段希釈した。希釈した試料液各1 mlを2枚の滅菌シャーレに入れ、標準寒天培地15 mlで混釈した。培地が固化した後、同培地を重層して乾燥させ、35±1.0℃で48±3時間培養した。陰性対照として、検体の希釈に用いたペプトン加生理食塩水1 mlを培地に混合し、以下試料の場合と同様に操作して培養した。

3) クロストリジア数の測定

一般生菌数の測定時に作製した10倍希釈の試料液を使用した。10倍希釈液10 mlを2枚の滅菌パウチに正確に採り、55℃で保持したクリストリジア寒天培地(A; 試薬および培地参照)約15 mlをこれに加え、よく混合し、熱シールした後、冷却固化させる。35±1.0℃で24±2時間培養した。最終的には5日後まで観察した。陰性対照として、検体の希釈に用いたペプトン加生理食塩水10 mlを培地に混合し、試料の場合と同様に操作して培養した。また適宜希釈した試料液各1 mlを2枚の滅菌パウチに正確に採り、55℃で保持したクリストリジア寒天培

地(B; 試薬および培地参照)約20 mlをこれに加え、上記の方法で培養した。(大阪府立公衆衛生研究所)。

4) pH測定

同一試料を3回ずつ測定し、その平均値を算出した。

5) 毒素の中和試験

試料原液は毒素試験に供するまで、-20℃で保存する。解凍後に3,000 rpm、4℃で10分間遠心分離し、上清を0.5 mlずつ2匹のマウスの腹腔内に注射した。マウスは4日間観察した。ボツリヌス毒素特有の症状を示してマウスが死亡した場合は表1の方法に従って中和試験を行った。試料はゼラチン緩衝液で、抗毒素血清は滅菌生理食塩水で希釈した。

6) マウス法による毒素の定量試験

試料0.1 mlをマウス尾静脈内に注射し、死亡するまでの時間を測定することにより、換算式からipLD₅₀/mlを算出した。

7) 酵素抗体法(ELISA)による毒素の定量試験

抗体の作製：トキシド化したA型およびB型ボツリヌス神経毒素をそれぞれウサギに免疫し、protein Gカラム(Amersham Biosciences Corp.)を用いて各抗血清からIgG画分を精製した(ウサギ抗A型BoNT IgG、ウサギ抗B型BoNT IgG)。EZ-Link NHS-PEO₄-Biotin(Pierce)を用いてIgG画分をビオチン標識した。診断用ボツリヌスウマ抗毒素(A型)を、protein Gカラム(Amersham Biosciences Corp.)で精製した(ウマ抗A型BoNT IgG)。

ELISAのシステム：ELISA用のプレートにはTopYieldストリップ(Nalge Nunc International)を使用した。洗浄には0.05% Tween20-5 mM EDTA加TBS(50 mM、pH 7.6)緩衝液を使用した。炭酸ナトリウム緩衝液(50 mM、pH 9.6)で希釈したウマ抗A型BoNT IgG(5 μg/ml)あるいはウサギ抗B型BoNT IgG(10 μg/ml)を30 μlずつ加え、4℃で一晩静置することによりプレートに固相化した。プ

プレートに 3 回洗浄し、洗浄液で 5 倍希釈したブロックケース（大日本製薬）200 μ l を各ウェルに加え、37°C で 1 時間静置することによりブロッキングした。3 回洗浄した後、被検液を 30 μ l ずつ加えて 37°C で 1 時間静置した。再び 3 回洗浄した後、ビオチン標識ウサギ抗 A 型 BoNT IgG あるいはビオチン標識ウサギ抗 B 型 BoNT IgG を各ウェルに 30 μ l ずつ加えて 37°C で 1 時間静置した。洗浄液で 3 回洗浄し、1 万倍希釈した NeutrAvidin Horseradish Peroxidase Conjugated (Pierce) を各ウェルに 30 μ l ずつ加えて 37°C で 30 分間静置した。洗浄液で 3 回洗浄し、酵素基質溶液 (TMBZ) を各ウェルに 50 μ l ずつ加えて室温で 30 分間静置した。1 M リン酸を 50 μ l ずつ加えて反応を停止した後、マイクロプレートリーダーで吸光度 (波長 450 nm) を測定した。

C. 研究結果

1. 容器包装詰低酸性食品へのボツリヌス菌のチャレンジテスト

1) 食品の理化学的性状

「サバの照焼き」の水分活性は 0.96~0.97 で pH は 6.1~6.2、「きのこの具」は水分活性 0.99 以上で pH は 4.8~4.9、「豚汁の具」の水分活性は 0.99 以上で pH は 6.2~6.3、「蒸かし黒豆」の水分活性は 0.97 で pH は 6.6~6.7、「切り餅」の水分活性は 0.98 で pH は 5.4 であった。

2) 食品の熱伝達の測定結果 (平成 14 年度に実施)

供試試料の熱伝達測定チャートを図 6~図 8 に示した。加熱処理時間は、カムアップタイムに 20 分加えた時間とし、「サバの照焼き」が 45 分、「きのこの具」が 27 分、「豚汁の具」が 28 分とした。

3) 毒素定量のための ELISA の検討結果

精製 A 型および B 型ボツリヌス神経毒素 (大阪府立大学から分与) を用いて作成した検量線を図 9 に示した。定量下限を毒素濃度が 0 ng/ml の吸光度の 2 倍と定めた場合、A 型および B 型ボツリヌス神

経毒素の検出感度はそれぞれ 0.2~0.5 ng/ml、0.1~0.3 ng/ml であった。A 型毒素の測定系で濃度が 25 ng/ml の精製 B 型神経毒素、B 型毒素の測定系で濃度が 25 ng/ml の精製 A 型神経毒素は、交差反応を示さなかった。菌を接種していない「蒸かし黒豆」は試料原液の 4 倍希釈液をサンプルとした場合でも非特異反応は認められなかった。

4) 食品別のチャレンジテストの結果

(A) 「サバの照焼き」

保存 0 日の 3 検体の陰性対照は、一般生菌数がおよびクロストリジア数は 1 CFU/g 未満であり、いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった。保存 90 日間の陰性対照とした、開封および未開封それぞれ 3 検体はいずれも容器の膨張はなく、一般生菌数は 10 CFU/g 未満、クロストリジアは 1 CFU/g 未満であった。いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった。

ボツリヌス菌芽胞を 10^4 CFU/g のオーダーで接種した 5 検体は、保存 14 日目ですべて容器の膨張が観察された。検出した毒素は A 型単独の 1 検体を除いて、他の 4 検体はすべて A 型+B 型であった。5 検体ともボツリヌス菌数は 10^7 CFU/g 前後であり、その毒力は約 10^4 マウス ipLD₅₀/g であった (表 2)。

(B) 「きのこの具」

保存 0 日の 3 検体の陰性対照は、一般生菌数がおよびクロストリジア数は 1 CFU/g 未満であり、いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった。保存 90 日間の陰性対照とした、開封および未開封それぞれ 3 検体はいずれも容器の膨張はなく、一般生菌数は 10 CFU/g 未満、クロストリジアは 1 CFU/g 未満であった。いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった。

ボツリヌス菌芽胞を 10^4 CFU/g のオーダーで接種し、90 日間保存した 5 検体の試料は、いずれも容器の膨張はみられなかった。また、一般生菌数は 10 CFU/g 未満で、クロストリジアは 10^4 CFU/g のオー

ダーのままであり、毒素も検出されなかった。食品の pH は 4.5~4.6 であった (表 3)。

(C) 「豚汁の具」

保存 0 日の 3 検体の陰性対照は、一般生菌数がおよびクロストリジア数は 1 CFU/g 未満であり、いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった。保存 90 日間の陰性対照とした、開封および未開封それぞれ 3 検体はいずれも容器の膨張はなく、一般生菌数は 10 CFU/g 未満、クロストリジアは 1 CFU/g 未満であった。いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった。

ボツリヌス菌芽胞を 10^4 CFU/g のオーダーで接種した 5 検体のうち、3 検体で保存 5~6 日目に容器の膨張が起こった。最終的には保存 13 日目までには残りの 2 検体の容器も膨張した。いずれの食品も、ボツリヌス菌数は 10^7 ~ 10^8 CFU/g オーダーに達した。検出した毒素は A 型+B 型の 1 検体を除いて、他の 4 検体はすべて A 型単独であり、その毒力は約 10^5 マウス $ipLD_{50}/g$ であった (表 4)。

(D) 「蒸かし黒豆」

保存 0 日の 3 検体の陰性対照は、一般生菌数がおよびクロストリジア数は 10 CFU/g 未満であり、いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった (表 6)。保存陰性対照である開封および未開封検体それぞれ 3 検体は、保存 49 日目でも容器の膨張はなく、一般生菌数がおよびクロストリジア数は 10 CFU/g 未満であり、いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった。

ボツリヌス菌芽胞を 10^3 ~ 10^4 CFU/g のオーダーで接種した 30 検体のうち、保存 12 日目では 2 検体のみで容器の明確な膨張が観察された。保存 34 日目でも他の 28 検体には明瞭な容器の膨張は観察できなかった。容器の膨張がなかった検体から無作為に抽出して検査した 3 検体でも、容器の膨張した検体と同様に pH が上昇する傾向にあった。毒素も容器の膨張とは無関係に産生され、その毒力は 10^4 ~ 10^5

マウス $ipLD_{50}/g$ であった。検出した毒素は B 型単独が 1 検体で、残りの 4 検体は A 型+B 型であった。

5 検体ともボツリヌス菌数は 10^7 ~ 10^8 CFU/g まで増加した (表 5)。一般生菌数は 10 CFU/g 未満であった。A 型および B 型 7S 毒素を使用した ELISA 法の標準曲線 (図 9) から、「蒸かし黒豆」中に産生された毒素量と、その比率を計算した。全検体で B 型の毒素が多く検出され、しかも A 型と B 型の毒素比は 1:1.3~1:121 の範囲で大きく異なった (表 6)。なおボツリヌス菌を接種した残りの 25 検体は、保存した 70 日目でも容器の膨張は観察されなかった。

(E) 「切り餅」

保存 0 日の 3 検体の陰性対照は、一般生菌数がおよびクロストリジア数は 10 CFU/g 未満であり、いずれの検体からもボツリヌス毒素は検出されなかった (表 7)。保存陰性対照である開封および未開封それぞれ 3 検体は保存 68 日目までは、いずれも容器の膨張は観察されなかった。

ボツリヌス菌芽胞を 10^3 CFU/g のオーダーで接種した 30 検体は、保存 68 日目でも明瞭な容器の膨張は観察されなかった。保存 28 日目に無作為に抽出して検査した 5 検体の一般生菌数は 10 CFU/g 未満であった。クロストリジア数は 10^4 CFU/g オーダーと顕著な増殖は認められず、ボツリヌス毒素も検出されなかった。「切り餅」の pH は、約 0.2 低下した 1 検体を除いて変化はなかった。保存期間の中間点でも (68 日目) 容器の膨張、毒素の産生、クロストリジアの増殖は認められなかった。なお保存期間の中間点と最終保存期間との中間点 (100 日目)、および最終保存期間 (135 日目) での検査は継続中である。

2. 容器包装詰低酸性食品の細菌汚染実態調査と販売状況

煮豆類とぎんなん水煮缶詰、合計 110 検体の検査結果を表 8-1~表 8-3、表 9 に示した。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。しかし、これらの食品はいずれも pH4.6 を超え、かつ水分活性が 0.94 を超える食品であったため、平成 15 年 6 月 30 日付けで通知された「容器包装詰食品に関するボツリヌス食中毒対策について」に照合すると、ボツリヌス菌接種実験の必要な食品に該当する。

ぎんなん水煮缶詰は水分活性が 0.94 を超え、pH も 4.6 よりも高かったにもかかわらず、120℃、4 分間を超える加熱殺菌条件では処理されていない（日本缶詰協会）。一見、容器包装詰加圧加熱殺菌食品の製造基準に違反していると思えるが、本製品は加熱時に加圧していないので製造違反ではない（日本缶詰協会）とのことである。

大阪府内の大手スーパーの協力を得て、容器包装詰食品の販売状況を調査した。多くの食品では pH4.6 以下あるいは水分活性 0.94 以下の食品が多かった。しかし、「容器包装詰低酸性食品」に合致すると推測される食品も確認できた。例えば米飯類、野菜の水煮、もち等であった。著者が独自に調査した食品でも同様のものが確認できた（表 10）。この中には 14 年度にボツリヌス中毒の危険性があると考えられた新含気食品も含まれていた。

3. 香辛料中のボツリヌス菌検査法の改良

平成 15 年度の結果から、吸水性の高い香辛料は少量の蒸留水でボツリヌス菌芽胞を抽出するのは困難であることがわかった。特にフェヌグリークでは 25 g に 100 ml の蒸留水を加えても、液層はほとんど回収できなかった。蒸留水の代わりに 50%エタノールを使用すると約 70 ml の液層が得られた。この方法により、今年度検査した香辛料 39 検体（22 品目）での液層の回収率は、少なくとも 50%以上であった（表 11-1～11-4）。またセロリ、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（表 12）。香辛料の多くの残渣がストマフィルターを通過したために、肉眼的に 500 メッシュフィルター濾

過が必要と認められたのは 39 検体中 15 検体であった。このうち 9 検体で 500 メッシュフィルター濾過が有効であった。

4. 香辛料のボツリヌス菌およびクロストリジアの汚染状況（表 11-1～11-5）

ボツリヌス菌汚染の可能性が危惧される食品原材料の一つである香辛料の検査を実施した。検査した合計 70 検体の香辛料のうち、殺菌処理した香辛料 11 検体からはボツリヌス菌は分離されなかった。しかし、未殺菌の香辛料 59 検体のうち、インド産フェヌグリーク（原型）から D 型ボツリヌス菌、中国産ジンジャー（スライス）から I 群の B 型ボツリヌス菌、インド産ジンジャー（原型）から C/D 型（キメラ型）ボツリヌス菌を分離した（汚染率 5.1%）。未殺菌香辛料 36 検体には、高率（32/36、89%）にクロストリジアの汚染があったが、その汚染菌数は 1 CFU/g～ 4.8×10^3 CFU/g と少なかった。ボツリヌス菌汚染があったジンジャーのクロストリジア数は、2 CFU/g および 20 CFU/g と少なかった。

D. 考察

常温で流通している容器包装詰低酸性食品は、潜在的なボツリヌス中毒の可能性を有するため、リスク評価が必要かつ最優先しなければならない食品の一つである。ボツリヌス中毒に対する食品の安全性を評価するもっとも確実な方法はチャレンジテストである。本研究班では、常温流通食品を対象としているので、チャレンジテストには I 群菌（A 型菌と B 型菌芽胞の混合液）を使用した。II 群菌に比べて最低発育温度は高いが、より低い pH と水分活性環境下で発育が可能であるという I 群菌の特性を優先したためである。ボツリヌス菌の増殖と毒素産生が認められなかった「きのこの具」は、I 群菌の増殖が可能な pH の下限値である 4.6 以下であった。一方、I 群菌が発育可能な理化学的性状を有していた「サバの照り焼き」と「豚汁の具」では、予測どお

り高力価の毒素が検出された。これらの新含気調理食品は、原材料が何らかの原因でボツリヌス菌芽胞による汚染を受け、その芽胞が製造工程中の加熱不足等の原因で生残すれば、食中毒の原因となる可能性があることを実証した。平成 14 年度に実施した新含気調理食品へのチャレンジテストにより当初の目的は達成されたが、実験方法には以下のような問題点があることも報告した。(1) 食品の包装容器を完全に開封後にボツリヌス菌を接種したため、封入されているガスが空気に置換された。この結果、ボツリヌス菌の発育限界付近の物理化学的性状を有する食品の場合、封入されているガスが空気に置換されると、添加した芽胞の発芽増殖と毒素産生に影響を及ぼし、その食品のボツリヌス菌に対するリスクが低く評価される可能性がある。このような危険性を排除するためには、可能な限り封入されているガスの状態に影響を与えないような食品への芽胞接種法を検討する必要がある。例えば食品の容器を開封しないで、注射針を装着した分注器で芽胞を接種し、素早くシールする方法も有効かも知れない。(2) ボツリヌス菌芽胞の発芽増殖を促進する目的で、食品に接種した後に芽胞を 80℃で 20 分間ヒートショックした。食品の特性により熱伝導性が異なるため、この方法では食品ごとに中心温度が 80℃まで上昇する時間（カムアップタイム）を計測しなければならない。カムアップタイムを計測するためには大がかりな設備と時間を要する。検査法の簡略化を図るため、芽胞液を食品に接種する直前に加熱処理する方法も検討する必要があると考えられた。(3) 使用した芽胞混合液には、A 型ボツリヌス菌 4 株および B 型ボツリヌス菌 1 株の計 5 株の I 群菌を含んでいた。食品中に産生された毒素は「サバの照り焼き」で 5 検体中 1 検体、「豚汁の具」では 5 検体中 4 検体が A 型単独であり、残りの検体では A 型+B 型の混合であった。B 型毒素が単独で産生された検体はなかった。このような結果から、芽胞の混合液には

B 型毒素産生株を加えることも検討する必要があると考えられた。

平成 16 年度は以上のような問題点を改善した新しいチャレンジテストのプロトコルを策定した。すなわち (1) 封入されているヘッドスペースガスが空気に置換されないように、ゴムシールを貼った容器包装材の部位から芽胞液を注射器で接種し、生じた針穴をゴムシールで塞いだ。この方法により、容器包装内部に充填されているガスの状態等の内部環境の変化を最小限に食い止めることができ、より精度の高いチャレンジテストが実施できると思われる。(2) ボツリヌス菌芽胞は接種直前に 80℃で 20 分間加熱処理することにより、煩雑なカムアップタイムの測定が不要になった。(3) 接種菌株には新たに A 型菌として Renkon 株を、B 型菌として Okura 株を追加し、民間の検査センター等には分与が可能な 90A 株および BIG4 株を除外した。最終的には A 型菌と B 型菌それぞれ 5 株ずつ、合計 10 株を使用することを目標として、現在菌株の選定作業が本研究班で継続されている。このような改良プロトコルに従い、常温流通の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。実験に供した「蒸かし黒豆」と「切り餅」はいずれも水分活性が 0.94 を越え、かつ pH が 4.6 を超える容器包装詰低酸性食品であった。「切り餅」は、ボツリヌス菌芽胞接種後に 30℃で 68 日間保存しても、容器の膨張、菌の増殖、毒素の産生は認められなかった。最終的な安全確認のため、さらに保存試験を継続中である。

「蒸かし黒豆」は比較的早期に 2 検体のみで容器の明確な膨張が観察されたが、保存した 70 日目でも他の検体には明瞭な容器の膨張は観察できなかった。しかし、無作為に抽出した容器の膨張がなかった 3 検体（34 日間保存）からも、明瞭に容器の膨張した 2 検体と同程度の毒素を検出した。容器の膨張の有無とボツリヌス菌の菌数や総毒素量とは無関

係であった。このようにガスの産生に伴う容器の膨張なしに毒素が産生される現象は、真空包装されたポテトやベーコン等でも報告されている。酵素抗体法により A 型および B 型毒素をそれぞれ定量した結果、A 型毒素が多く検出された検体でのみ容器の明瞭な膨張が観察されたのが特徴的であった。「蒸かし黒豆」での A 型毒素産生量、すなわち A 型菌の発育性とガス産生による容器の膨張には何らかの関連があると推察された。いずれにしても、容器の膨張の有無がボツリヌス毒素産生の指標とはならないという事実は、たとえ容器の膨張がなくても食品の必要保存期間内の一定の時期に一度は毒素検査等が必要であることをチャレンジテストのプロトコールに付け加える必要があることを示している。「蒸かし黒豆」は原材料が何らかの原因でボツリヌス菌芽胞による汚染を受け、その芽胞が製造工程中の加熱不足等の原因で生残すれば、食中毒の原因となる可能性があることを実証できた。

平成 15 年度に行った市場調査により、多種多様なレトルト類似食品、あるいは常温保存が可能であると称される容器包装詰低酸性食品が市場に出回っていることが判明した。これらの食品群は、冷蔵設備が不要であることなどの理由により、販売効率が要求される量販店での需要が多くなる傾向にある。例えば加熱調理後にクリーンルーム内で無菌的に容器に充填する、いわゆる無菌包装米飯がある。この製品は包装形態からはレトルト米飯と判別しにくく、消費者が購入する際に表示を判読するのも時間もかかる。その他にも、野菜類の水煮、おでん、さつまいもや栗のような副食品やだし類も多く市販されている。これらの食品の中には水分活性が 0.94 を越え、かつ pH が 4.6 を越えるもの、すなわちボツリヌス中毒の原因となるリスクを有する食品が存在することは明白である。このような食品に対する安全性に関する確実な情報を得るためには、ボツリヌス菌のチャレンジテストが必要と考えられる。外見

上類似の食品であっても、商品ごとにその理化学的性状は異なり、しかも包装形態や封入される気体の状態や保存温度のような外的環境も異なる。さらに、食品の製造法（レシピ等）を少し変更するだけで、その安全性に影響を与える可能性がある。日本の食文化の変化や多様性が、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複雑かつ困難にしている。

加熱殺菌等によりボツリヌス菌芽胞を完全に死滅させることができない特性を有する食品、あるいは pH や水分活性等の物理化学的方法で菌の発育を制御できない食品は、一定温度以下での低温流通がボツリヌス中毒のリスクを回避するもっとも現実的な方法と考えられる。EU 諸国では *sous vide*（真空調理食品）が広く流通し、ボツリヌス中毒に対するリスク管理が活発に実施されている。このような形態の食品は低温流通しているのも、主として II 群菌に対するリスク評価が必要となるであろう。実際に II 群菌を使用した *sous vide* へのチャレンジテストが EU 諸国で多く実施されているが、現在でも確定されたプロトコールはないようである。ACMSF（Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food、UK）は、*sous vide* を 3.3℃未満で保存流通させることを推奨している。

香辛料（スパイスとハーブ）は約 350 種類あると言われており、80%以上が食品工業用として種々の製品に広く使用されている。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。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られる。香辛料の微生物汚染実態を正確に把握するための検査法を確立することは、リスク評価の精度を高めるために重要である。前年度の結果から以下のような検査法上の問題点が明らかになった。香辛料の形態

(粉末の粒子の大きさ等)は多様であり、しかも香辛料にはボツリヌス菌の発育を抑制する成分を含有することが知られている。平成 15 年度に実施した香辛料のボツリヌス菌検査で、粉末や吸水性の高い香辛料から少量の蒸留水でボツリヌス菌芽胞を抽出するのは困難であった。特にガラクトマンナンを高濃度に含有するフェヌグreekは吸水性が高く、液層を得るためには大量の蒸留水を加える必要があった。このような検体では、遠心操作が煩雑になるばかりでなく、ボツリヌス菌芽胞の回収率が低下することは避けられない。

平成 16 年度は、多種多様な香辛料から効率良くボツリヌス菌芽胞を検出できる検査法の改良を検討した。従来法からの大きな改良点は、抽出液として滅菌蒸留水の代わりに 50%エタノールを使用したこと、ストマフィルターを通過する微細な香辛料を除去するために 500 メッシュのステンレス製フィルターを使用したことであった。50%エタノール法は、蒸留水法に比べて少量でも液層を効率良く回収することが可能であった。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。ボツリヌス菌芽胞は 50%エタノールに長時間 (1 時間以上) 曝露されても、その発育性に大きな影響は受けなかった。これら以外にも 50%エタノール法には以下の様な利点があると考えられる。(1) 香辛料に含まれる細菌発育抑制物質 (ガーリックのアリシン、タイムのチモール、マスタード・ワサビのアリルイソチアネート、バニラのバリニン、クローブ・オールスパイスのオイゲノール等) の多くは脂溶性であるため、エタノール処理により低減・除去できる。(2) 溶液の比重が低下するので、低速遠心でも芽胞が沈殿しやすくなる。(3) 香辛料では効果がないかも知れないが、夾雑する栄養型の菌を殺菌できる。

平成 16 年度の結果および平成 15 年度の大府立公衆衛生研究所と東京都健康安全センターの検査結果から、未殺菌の香辛料はボツリヌス菌芽胞に高率

に汚染されていることが明らかとなった (99 検体中 5 検体陽性 : 汚染率 5%)。平成 16 年度の結果の中で特筆されるのは、ヒトの食中毒の原因となる I 群の B 型菌が分離されたことである。著者らはすでに、昭和 59 年に熊本県で発生したカラシレンコンによるボツリヌス中毒事件の際、カラシ粉から II 群の B 型菌を分離した経験がある。

香辛料は野菜や果物のような他の農産物と同様に、土壌等の環境に存在するボツリヌス菌芽胞により汚染を受けている可能性が疑われている。しかし、香辛料からのボツリヌス菌芽胞の分離報告は世界的にも極めて少ない。ガス充填パック詰め (Modified Atmosphere Packaging: MAP) の Green pepper や、生のガーリックの皮から A 型菌が分離された報告例がある位である。香辛料が高率にボツリヌス菌に汚染されているという今回の研究班で得られた結果は、香辛料の食品衛生上の取り扱いを考える際に大変貴重なデータになると考えられる。香辛料は食文化に欠かすことのできない食材であるが、これが容器包装詰低酸性食品に使用され、不適切な加工や保存が行われれば、ボツリヌス中毒に対してリスクの高い食材の一つであると結論された。

香辛料加工工場を視察した結果、現在の日本の香辛料の殺菌方法 (気流式過熱蒸気殺菌法が主流) では、香辛料に汚染したボツリヌス菌を含むクロストリジアを完全に死滅させるのは困難であると考えられた。香辛料の殺菌方法として、すでに諸外国で実施されている放射線の利用も考えざるを得ないかも知れない。放射線殺菌の有用性等について、以下に《追記》として記載した。

《追記》

1. 香辛料の殺菌の必要性

香辛料は熱帯、亜熱帯地域に産する植物を乾燥することによって調製されるため、その過程において土壌由来の微生物、害虫汚染は避けられない。カビ

毒による被害も無視できない。香辛料の汚染微生物のうち、耐熱性有芽胞細菌による汚染が著しい($10^5 \sim 10^6$ CFU/g)ので、香辛料を多用するハム、ソーセージなどの食肉加工においては食中毒防止のため香辛料の殺菌は不可欠である。

香辛料の加熱殺菌は熱による香味・色調の劣化のため好ましくない。以前は非加熱殺菌法としてエチレンオキシドガスが利用されていたが、その毒性・発ガン性のため現在では利用が禁止されている。このため現状では、品質劣化を容認した上で気流式過熱蒸気殺菌法が用いられている。

2. 冷殺菌法としての放射線照射の有効性

γ 線、電子線、エックス線などを農産物や食品に照射すると、腐敗や食中毒の原因となる食品に付着した微生物（細菌、酵母、カビなど）が死滅する。野菜、生鮮果実に照射した場合には成熟、発芽、老化等の生物的变化が抑制される。これらの照射効果を利用した放射線照射技術、いわゆる”食品照射”は、先進諸国を含め世界中で猛威を振るっている食中毒菌に対し、残留性のある薬剤に代わる防除法として、あるいは農作物の防疫に広く用いられてきたオゾン層破壊原因物質である臭化メチルの代替法としての期待が高まっている。1999年度においてはすでに世界中で257,000トンの食品が照射されており、そのうち香辛料の照射は100,000トン(39%)を占めている。

γ 線、電子線を香辛料に照射した場合、温度を上げることなく効果的な殺菌が可能であり、有芽胞菌に対しては7~10kGyの照射により食品衛生法で要求されている1g当たり 10^3 個以下の菌数が容易に達成できる。またアフラトキシンなどのカビ毒を産生する糸状菌、および大腸菌群に対しては4kGy程度の照射で十分殺菌可能である。香辛料の放射線殺菌は2002年8月現在、世界中で米国、EU諸国を含む45ヶ国においてすでに許可されており、我が国においても全日本スパイス協会がすでに厚生労働省

に許可申請中である。

3. 放射線殺菌された香辛料の品質特性

先にも述べたように加熱殺菌は、過熱水蒸気によるごく短時間の処理であっても香辛料の香味の劣化は避けられない。一方、冷殺菌法として一時香辛料に使われていたエチレンオキシドガス処理においても顕著な成分劣化が報告されている。筆者らは、わが国で最も流通量の多い黒コショウに ^{60}Co γ 線を照射し、菌数変化や代表的な香味成分の変動について分析し、無処理および気流式過熱蒸気殺菌法との比較を実施した。食品照射などの放射線利用についての知識普及を目的として毎年夏休みに大手百貨店で開催されている「みんなのくらしと放射線展」の来場者や専門家による官能試験を行った。

微生物検査の結果、 γ 線10kGy処理は気流式過熱蒸気殺菌処理以上の殺菌効果を示した。専門家による官能試験の結果は14名中8名(57%)が γ 線処理品の香味を第1位に挙げた。「みんなのくらしと放射線展」の来場者による官能試験評価では、 γ 線照射された黒コショウの香味を第1位に挙げた回答者が全体の約54%を占め、専門家パネルによる評価値と相関性のある結果となった。香味成分のGC/MSのパターンには、上記3種処理によって大きな差は見られなかったが、香味成分の総量は無処理に比べて γ 線および加熱処理は同程度減少する傾向が見られた。また、黒コショウの香気の主成分であるsabinene、vanilinの含有率は無処理 $>$ γ 線 $>$ 加熱処理の順に減少する傾向があった。以上の結果は香辛料の放射線殺菌の有効性を示す好例であるとともに一般の消費者にとっても十分に効果を体感できることを強く示唆するものであった。

E. 結論

1. 粉末や高い吸水性を有する香辛料からボツリヌス菌芽胞を効率よく抽出するには、蒸留水よりも50%エタノールが適していた。香辛料のストマフィ

ルターを通過する微細な残渣を除去する方法として、500 メッシュフィルター濾過が有効であった。本法は簡便であり、実用性が高いと考えられる。

2. 検査した未殺菌の香辛料 59 検体のうち、インド産フェヌグリーク（原型）から D 型ボツリヌス菌、中国産ジンジャー（スライス）から I 群の B 型ボツリヌス菌、インド産ジンジャー（原型）から C/D 型（キメラ型）ボツリヌス菌を分離した（汚染率 5.1%）。ボツリヌス菌汚染とクロストリジア数との間に相関はなかった。殺菌香辛料 11 検体からはボツリヌス菌は分離されなかった。香辛料は食文化に欠かすことのできない食材であるが、容器包装詰低酸性食品の不適切な加工や保存が行われれば、ボツリヌス中毒に対してリスクの高い食材の一つであると結論された。

3. ボツリヌス菌芽胞のチャレンジテストにより、常温で流通する不活性ガス充填容器包装詰加圧加熱殺菌食品（3 種類の新含気食品）やレトルト類似食品である「蒸かし黒豆」は、原材料が何らかの原因でボツリヌス菌芽胞による汚染を受け、その芽胞が製造工程中の加熱不足等の原因で生残すれば、食中毒の原因となる可能性があることを実証した。

4. 市販されている容器包装詰低酸性食品に該当する煮豆類（合計 60 検体）やぎんなんの缶詰（合計 50 検体）から、ボツリヌス菌をはじめ一般生菌、クロストリジア、好気性有芽胞菌は検出されなかった。

5. 多くの容器包装詰低酸性食品がスーパー等で販売されているが、その保存法の表示は明確でないものが多かった。例えば「高温直射日光をさけて、涼しい場所」や「冷暗所にて保存」などと表示されていた。

6. ボツリヌス菌の食品へのチャレンジテストのプロトコールを確立するためには、接種菌株の選定、食品への接種菌量や接種方法、接種検体数とその検査時期等のさらに詳細な検討が必要と考えられた。ボツリヌス毒素はバイオテロに使用される可能性が

もっとも高いカテゴリーに分類されている。このため、民間企業等がチャレンジテストを実施する場合、ボツリヌス菌株の分与方法や保管方法等についての厳格な規制が必要と思われる。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Asao, T., Y. Kumeda, T. Kawai, T. Shibata, H. Oda, K. Haruki, H. Nakazawa and S. Kozaki (2003) An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 130: 33-40.

2) Kumeda, Y., T. Asao, H. Takahashi and M. Ichinoe (2003) High prevalence of B and G aflatoxin-producing fungi in sugarcane field soil in Japan: Heteroduplex panel analysis identifies a new genotype within *Aspergillus* Section *Flavi* and *Aspergillus nomius*. *FEMS Microbiol, Ecol.* 45: 229-239.

3) 浅尾 努 (2003) 食品中の食中毒菌検査法、ボツリヌス菌、日本防菌防黴学会誌、31: 289-296.

4) Kumeda, Y. and T. Asao (2004) A rapid and mini-scale protocol of DNA extraction for PCR from *Aspergillus* section *Flavi* and other food-borne filamentous fungi. *Mycotoxins* 54: 39-41.

5) 塚本定三、田口真澄、神吉政史、川津健太郎、河合高生、依田知子、久米田祐子、浅尾 努、浜野米一、石橋正憲、勢戸和子、小林一寛 (2004) 多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium による大規模食中毒、病原微生物検出情報、25: p 99~100.

2. 学会発表

- 1) 久米田祐子、浅尾 努 (2003) カビからの簡便な DNA 抽出法 第 29 回カビ毒研究会
- 2) 久米田祐子、浅尾 努 (2003) *Aspegillus* Section *Flavi* の Heteroduplex panel analysis による同定について、真菌の有毒二次代謝産物と産生菌の分子分類に関する研究会
- 3) Kumeda, Y., Asao, T., Takahashi, H., Yokoyama, K. and Ichinoe, M. (2003) Rapid identification of *Neosartorya* species by heteroduplex panel analysis. International Symposium of Mycotoxicology in Kagawa.
- 4) 久米田裕子、浅尾 努、高橋治男、横山耕治、一戸正勝 (2003) 熱性子囊菌 *Neosartorya* の種の遺伝学的同定法、第 25 回日本食品微生物学会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

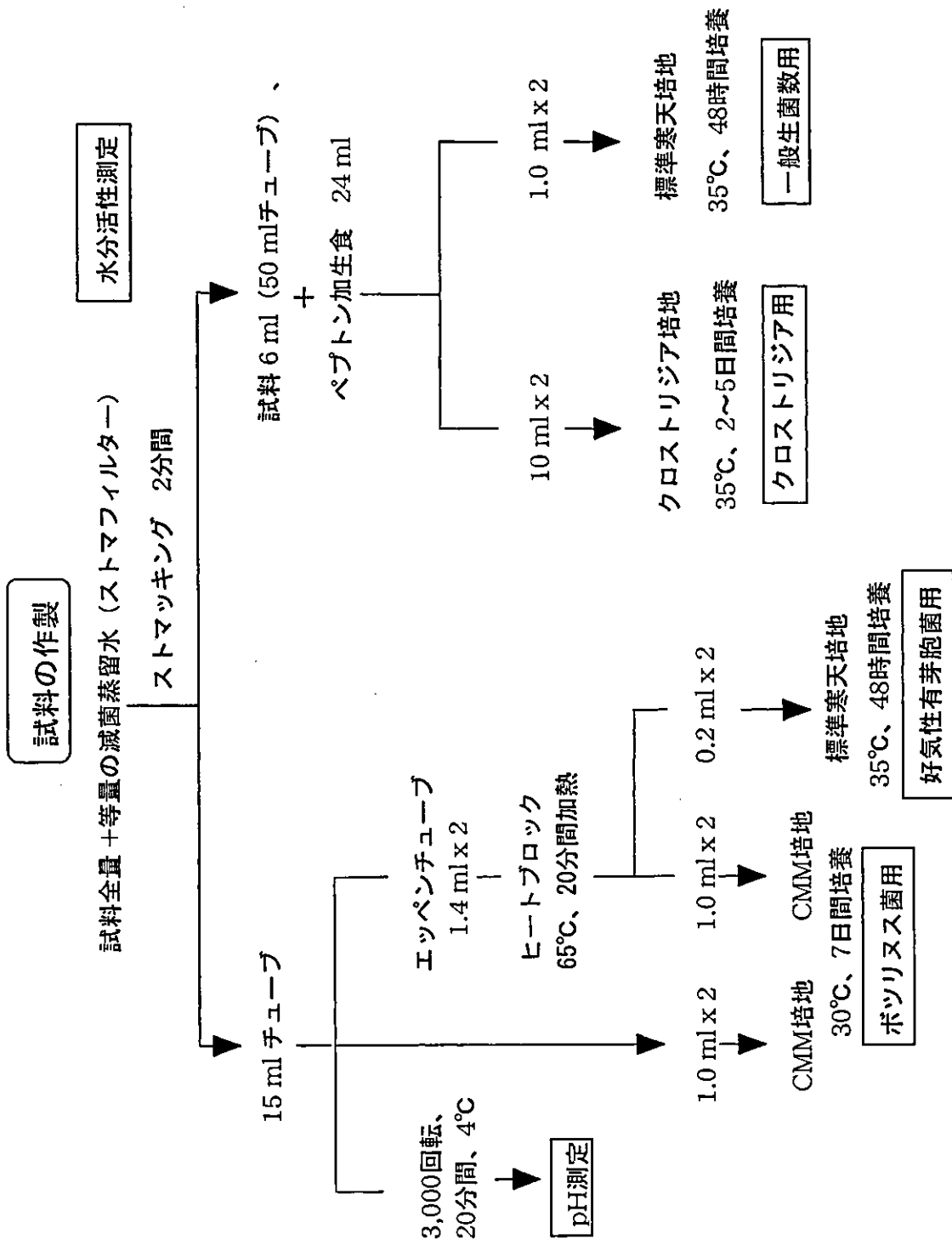


図1 食品の細菌・理化学検査法

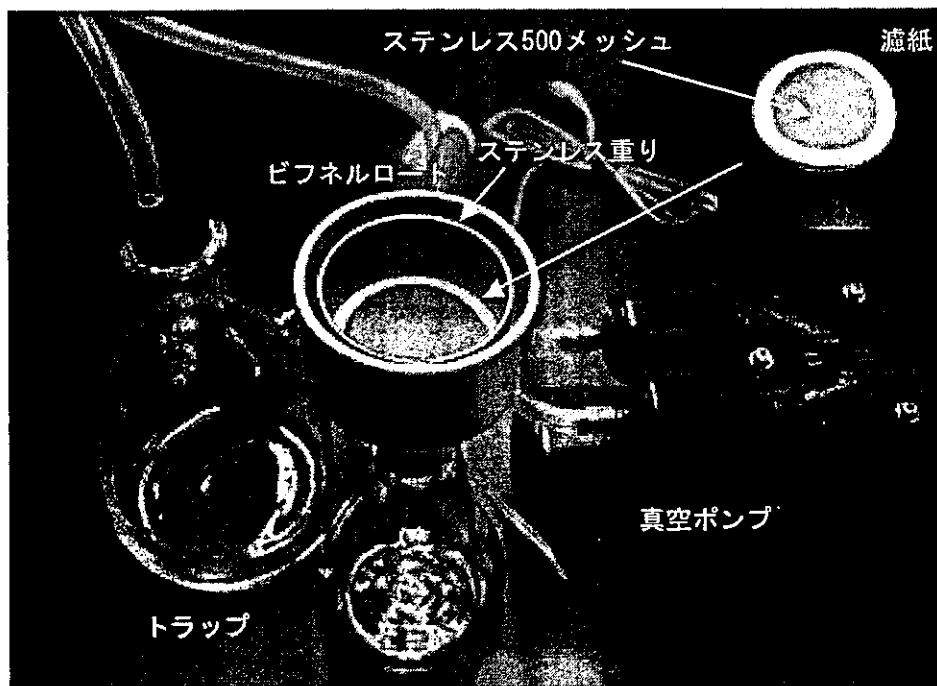


図2 濾過装置の組み立て写真

1. ステンレス製500メッシュフィルターをビフネルロートに合わせてハサミで切断する。
2. ワットマン5Aの濾紙を輪状に切断し、メッシュフィルターを挟み込む。
3. ビフネルロートに装着後、ロートにフィルターを密着させるために、ステンレス製の重しを載せる。
4. 真空ポンプへの水分の吸入を防止するためにトラップを装着する。
5. 試料をロートの中へ入れた後、軽く真空ポンプで吸引する。

*濾過操作は安全キャビネットかクリーンベンチ内で行う。

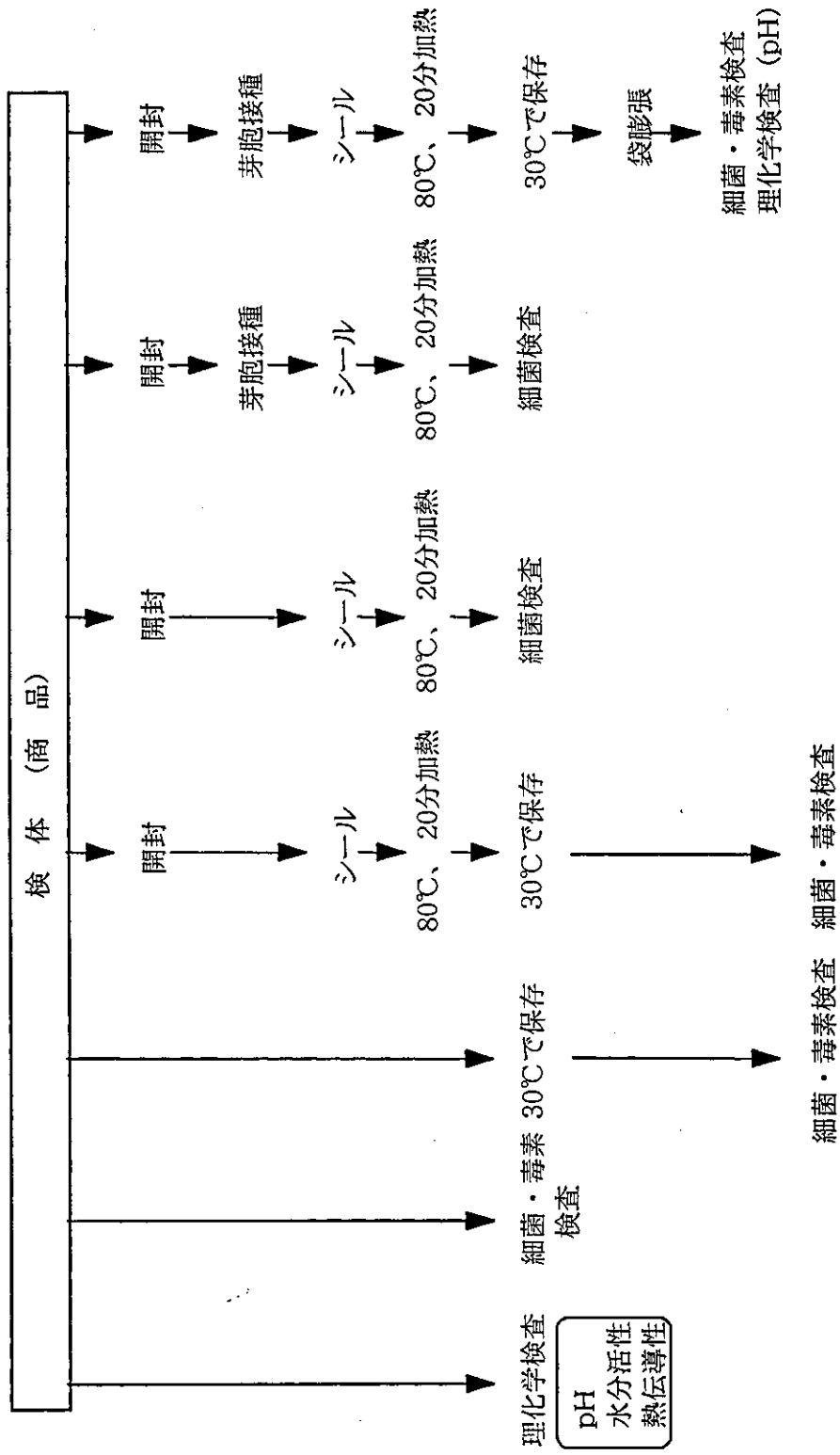


図3 ボツリヌス菌チャレンジテストの概要

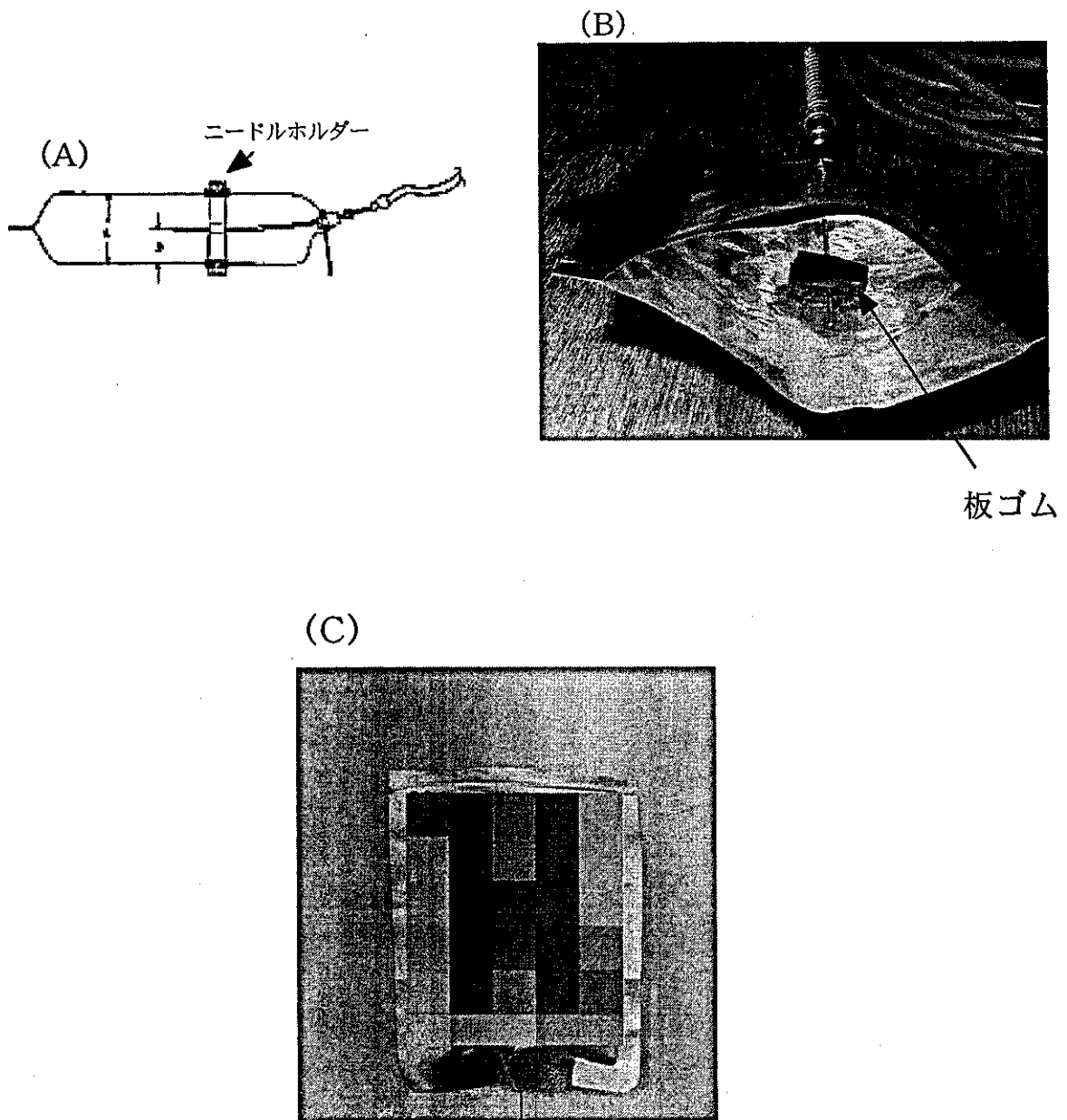


図 4 熱伝導試験法

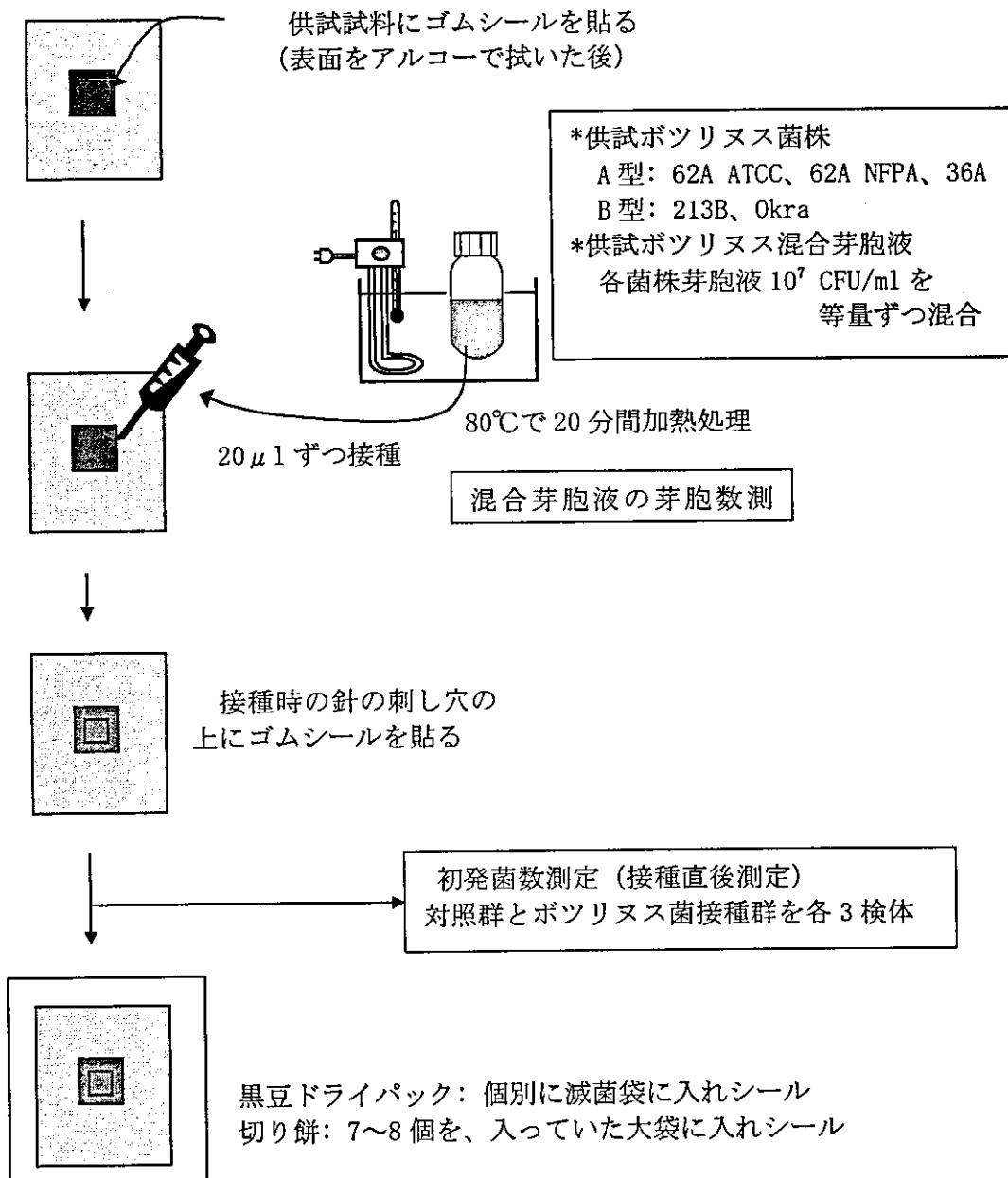


図5 ボツリヌス菌接種作業の概要

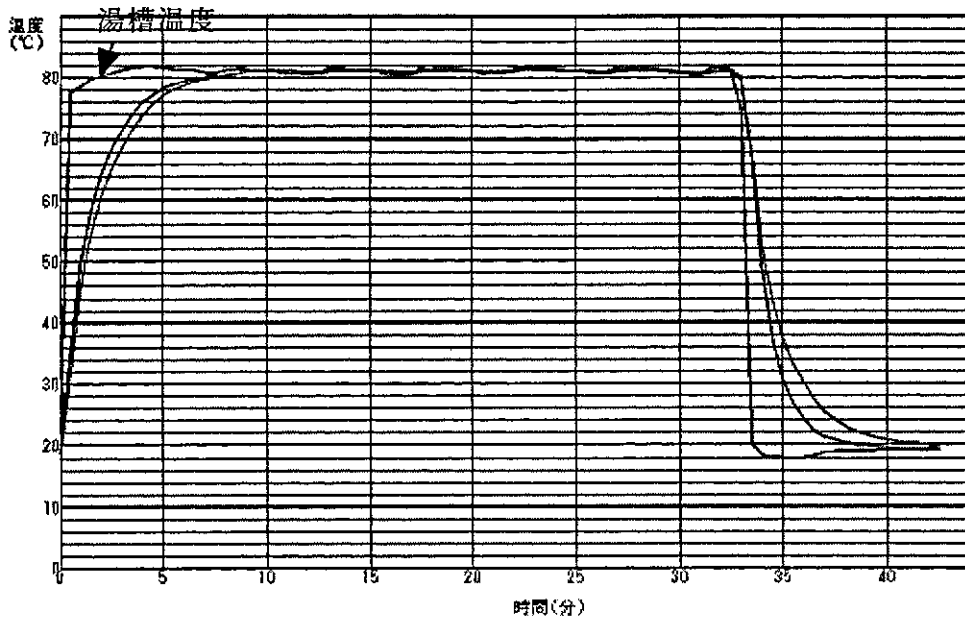


図6 きのこの具の熱伝導チャート

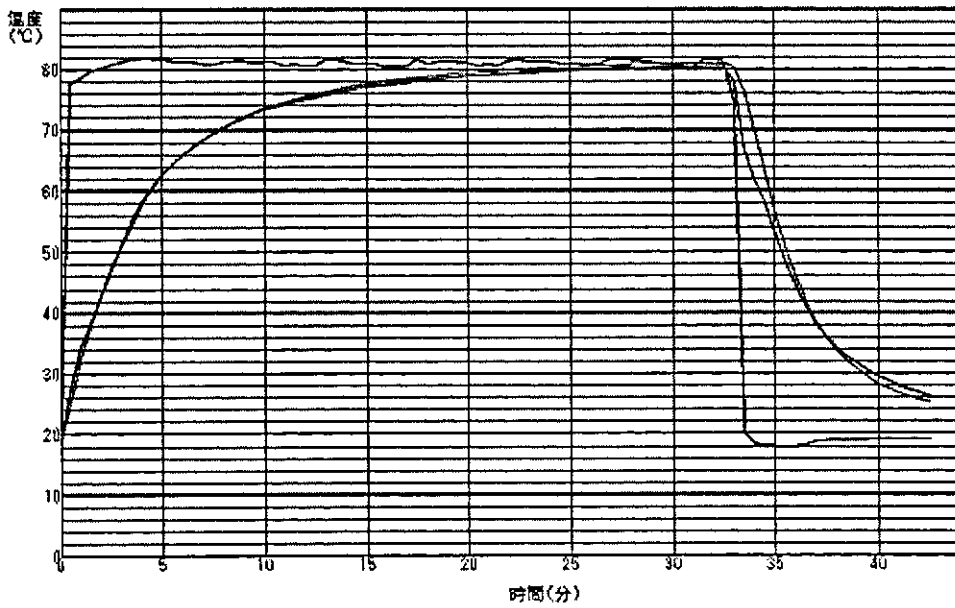


図7 さばの照り焼きの熱伝導チャート

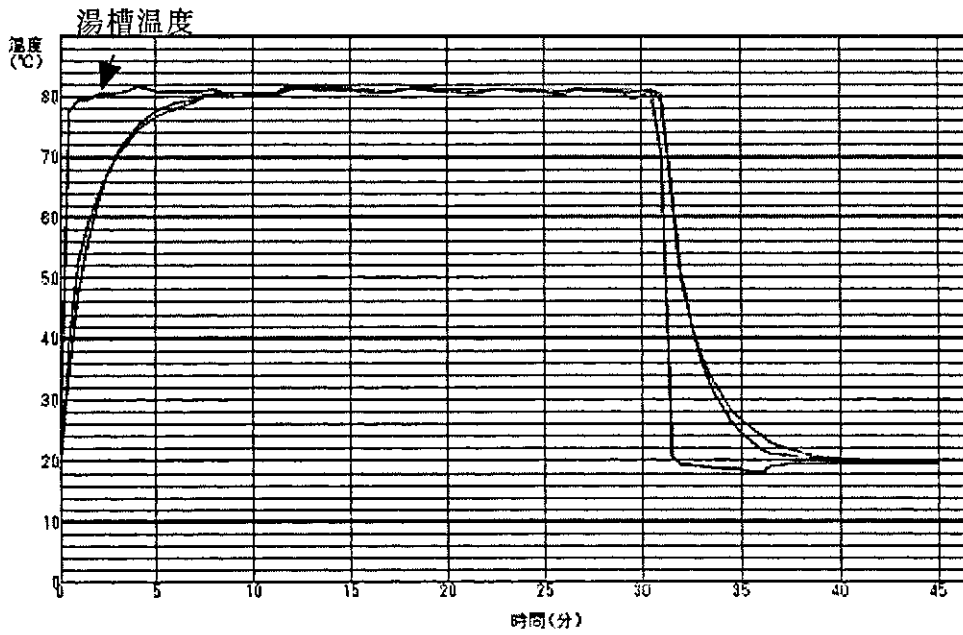
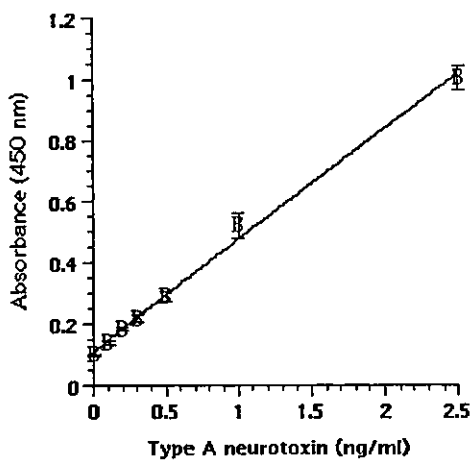
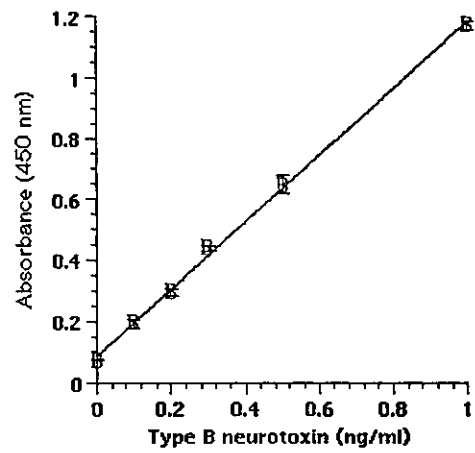


図 8 豚汁の具の熱伝導チャート



$$f(x) = 4.192366E-1 * x + 9.493384E-2$$

$$R^2 = 9.975655E-1$$



$$f(x) = 1.097252E+0 * x + 8.729517E-2$$

$$R^2 = 9.987381E-1$$

図 9 ボツリヌス毒素測定のための ELISA の標準曲線

表1 ポツリヌス毒素の中和試験法

群	検体量 (ml)	処理法	
1	1	無処理	
2	1	100°Cで10分間加熱	
3	1	抗毒素A (10 IU/ml)	0.25 ml
4	1	抗毒素B (10 IU/ml)	0.25 ml
5	1	抗毒素A (20 IU/ml)	0.125 ml
		抗毒素B (20 IU/ml)	0.125 ml

37°Cで30分間反応後、各2匹のマウスの腹腔内に0.5 ml注射する。

A型およびB型の抗毒素血清1Uの毒素中和能力(約 5×10^4 マウス ipLD₅₀)を超えない毒素量になるように検体を希釈した。

表2 サバの照り焼きへのポツリヌス菌芽胞接種試験結果

検体処理内訳				理化学・細菌・毒素検査結果								
区分	処理内容	袋数	No.	試験項目	培養日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC (CFU/g)	Clt (CFU/g)	毒素型	備考 (毒素価/g)
	無処理	3	21	理化学試験	0日	NT	6.1	0.96	NT	NT	NT	
			22				6.1	0.97				
			23				6.2	0.97				
A	無処理	3	15	細菌・毒素試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	1未満	ND	
			16						10未満	1未満	ND	
			17						10未満	1未満	ND	
B	無処理	3	18	保存試験 (未開封)	90日	無 無 無	NT	NT	10未満	1未満	ND	
			19						10未満	1未満	ND	
			20						10未満	1未満	ND	
C	開封芽胞非接種	3	9	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	1未満	NT	
			10						10未満	1未満		
			11						10未満	1未満		
D	開封芽胞非接種	3	12	保存試験 (開封)	90日	無 無 無	NT	NT	10未満	1未満	NT	
			13						10未満	1未満		
			14						10未満	1未満		
E	開封芽胞接種	3	6	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	1.0×10^4	NT	
			7						10未満	1.0×10^4		
			8						10未満	9.2×10^3		
F	開封芽胞接種	5	1	細菌・毒素試験	14日	有	6.3	NT	10未満	1.7×10^7	A + B	2.9×10^6
			2		14日	有	6.3		10未満	1.5×10^7	A	2.7×10^6
			3		14日	有	6.2		10未満	4.2×10^7	A + B	2.5×10^6
			4		14日	有	6.4		10未満	6.9×10^6	A + B	9.4×10^6
			5		14日	有	6.4		10未満	6.0×10^6	A + B	7.0×10^6

ND: not detected, NT: not tested, Aw:水分活性, SPC:一般生菌数, Clt:クロストリジア

表3 きのこの具へのボツリヌス菌芽胞接種試験結果

検体処理内訳				理化学・細菌・毒素検査結果								
区分	処理内容	袋数	No.	試験項目	培養日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC (CFU/g)	Clit (CFU/g)	毒素型	備考 (毒素価/g)
	無処理	3	21	理化学試験	0日	NT	4.8	0.99以上	NT	NT	NT	
			22				4.8	0.99以上				
			23				4.9	0.99以上				
A	無処理	3	15	細菌・毒素試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	1未満	ND	
			16						10未満	1未満	ND	
			17						10未満	1未満	ND	
B	無処理	3	18	保存試験 (未開封)	90日	無	NT	NT	10未満	1未満	ND	
			19						10未満	1未満	ND	
			20						10未満	1未満	ND	
C	開封芽胞非接種	3	9	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	1未満	NT	
			10						10未満	1未満		
			11						10未満	1未満		
D	開封芽胞非接種	3	12	保存試験 (開封)	90日	無	NT	NT	10未満	1未満	NT	
			13						10未満	1未満		
			14						10未満	1未満		
E	開封芽胞接種	3	6	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	4.3 × 10 ⁴	NT	
			7						10未満	4.3 × 10 ⁴		
			8						10未満	4.2 × 10 ⁴		
F	開封芽胞接種	5	1	細菌・毒素試験	90日	無	4.6	NT	10未満	3.5 × 10 ⁴	ND	
			2		90日	無	4.5		10未満	3.3 × 10 ⁴	ND	
			3		90日	無	4.6		10未満	4.5 × 10 ⁴	ND	
			4		90日	無	4.5		10未満	4.0 × 10 ⁴	ND	
			5		90日	無	4.5		10未満	4.3 × 10 ⁴	ND	

ND: not detected, NT: not tested, Aw:水分活性, SPC:一般生菌数, Clit:クロストリジア

表4 豚汁の具へのボツリヌス菌芽胞接種試験結果

検体処理内訳				理化学・細菌・毒素検査結果								
区分	処理内容	袋数	No.	試験項目	培養日数	袋の膨張	pH	Aw	SPC (CFU/g)	Clit (CFU/g)	毒素型	備考 (毒素価/g)
	無処理	3	21	理化学試験	0日	NT	6.2	0.99以上	NT	NT	NT	
			22				6.3	0.99以上				
			23				6.2	0.99以上				
A	無処理	3	15	細菌・毒素試験 (陰性確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	1未満	ND	
			16						10未満	1未満	ND	
			17						10未満	1未満	ND	
B	無処理	3	18	保存試験 (未開封)	90日	無	NT	NT	10未満	1未満	ND	
			19						10未満	1未満	ND	
			20						10未満	1未満	ND	
C	開封芽胞非接種	3	9	細菌試験 (開封操作確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	1未満	NT	
			10						10未満	1未満		
			11						10未満	1未満		
D	開封芽胞非接種	3	12	保存試験 (開封)	90日	無	NT	NT	10未満	1未満	NT	
			13						10未満	1未満		
			14						10未満	1未満		
E	開封芽胞接種	3	6	細菌試験 (接種菌数確認)	0日	NT	NT	NT	10未満	5.9 × 10 ⁴	NT	
			7						10未満	4.5 × 10 ⁴		
			8						10未満	5.7 × 10 ⁴		
F	開封芽胞接種	5	1	細菌・毒素試験	5日	有	6.3	NT	10未満	1.4 × 10 ⁶	A	1.2 × 10 ⁵
			2		5日	有	6.5		10未満	4.3 × 10 ⁷	A + B	3.6 × 10 ⁵
			3		13日	有	6.4		10未満	3.8 × 10 ⁶	A	3.0 × 10 ⁵
			4		10日	有	6.4		10未満	8.1 × 10 ⁶	A	3.7 × 10 ⁵
			5		6日	有	6.2		10未満	1.1 × 10 ⁶	A	9.5 × 10 ⁴

ND: not detected, NT: not tested, Aw:水分活性, SPC:一般生菌数, Clit:クロストリジア